



УДК: 616.831-02:616-036.882-08]:[616.8-091.81+616.8-091.94]-091.818-076

А.В. Євсєєв

Імуногістохімічні та ультраструктурні особливості апоптозу нейронів та гліальних клітин при постреанімаційній енцефалопатії

Запорізький державний медичний університет

Ключові слова: постреанімаційна енцефалопатія, апоптоз, імуногістохімія.

У роботі наведено дані патоморфологічних, імуногістохімічних та електронно-мікроскопічних досліджень патогенно-індукованого апоптозу нейронів та гліальних клітин головного мозку в динаміці постреанімаційного періоду. Показано, що апоптоз є максимально виразним протягом першого тижня після перенесеної клінічної смерті у нейронах і до кінця другого тижня – у клітинах нейроглиї.

Иммуногистохимические и ультраструктурные особенности апоптоза нейронов и глиальных клеток при постреанимационной энцефалопатии

А.В. Евсеев

В работе приведены данные патоморфологических, иммуногистохимических и электронно-микроскопических исследований патогенно-индуцированного апоптоза нейронов и глиальных клеток головного мозга в динамике постреанимационного периода. Показано, что апоптоз максимально выражен на протяжении первой недели после перенесенной клинической смерти в нейронах и до конца второй недели – в клетках нейроглии.

Ключевые слова: постреанимационная энцефалопатия, апоптоз, иммуногистохимия.

Патология. – 2010. – Т.7., №2. – С. 18–21

Immunohistochemical and ultrastructural features of apoptosis of neurons and glial cells in postresuscitation encephalopathy

A.V. Evseyev

Results of pathomorphological, immunohistochemical and electron microscopic investigations of pathogen-induced apoptosis of brain neurons and glial cells in the dynamic of postresuscitation period are cited in work. It was shown, that apoptosis is the most pronounced during the first week after apparent death in neurons and by the end of the second week - in glial cells.

Key words: postresuscitation encephalopathy, apoptosis, immunohistochemistry.

Pathologia. 2010; 7(2): 18–21

Постреанімаційна енцефалопатія (ПРЕ) є головним проявом постреанімаційної хвороби, що виникає після перенесеної клінічної смерті (КС) тривалістю більше 3–5 хвилин і характеризується важкими розладами різних ланок гомеостазу, у тому числі, тимчасовими або стійкими порушеннями функцій центральної нервової системи (ЦНС) [5,6]. ПРЕ виникає внаслідок гострої тотальної кисневої недостатності клітин головного мозку (ГМ) під час КС і постішемично-реперфузійних пошкоджень постреанімаційного періоду (ПРП). Припинення системного і мозкового кровотоку під час КС викликає значні зміни в нейронах ЦНС, найбільш чутливих до ішемії й нестачі кисню, а відновлення системної гемодинаміки після серцево-легеневої реанімації супроводжується неповним відновленням церебрально-капілярної гемомікроциркуляції та новими постішемично-реперфузійними ушкодженнями нейронів і гліальних клітин ГМ, які завершуються їх апоптозом і некрозом.

У літературі є поодинокі відомості щодо морфогенезу і морфологічних особливостей апоптозу нейронів і гліоцитів [3,10], а також щодо їх відношень у

динаміці ПРП [1,4], які можна використовувати для патологоанатомічної оцінки тяжкості перебігу ПРЕ і танатогенезу, а також для розробки основ ефективної превентивної патогенетичної терапії незворотних ушкоджень ЦНС при ПРЕ. Водночас, сьогодні майже відсутні відомості стосовно молекулярно-імуногістохімічних (ІГХ) та електронно-мікроскопічних (ЕМ) особливостей нейронного та нейрогліального апоптозу у ГМ після перенесеної КС.

Мета роботи

Патогістологічне, ІГХ та ЕМ дослідження патогенно-індукованого апоптозу нейронів та гліальних клітин у динаміці ПРП.

Матеріали і методи дослідження

Робота виконана на секційному матеріалі 116 померлих хворих віком від 21 до 89 років (середній вік хворих склав $61,66 \pm 11,45$ років), які перенесли КС тривалістю від 30 секунд до 40 хвилин, або двоп'ятикратну КС сумарною тривалістю від 7 до 60 хвилин, і експериментальному матеріалі 65 домашніх кішок обох статей масою від 2 до 5,5 кг, яким під внутрішньочеревинним наркозом тіопенталом натрію моделювали КС тривалістю 5–6 хвилин за розробле-

ною нами методикою [2] з наступним забиттям тварин шляхом декапітації через 1, 3, 6, 12 годин, 1, 2, 3, 6, 9, 12 діб після КС.

Для нейроморфологічних та ІГХ досліджень у померлих хворих через 3–24 години після біологічної смерті при розтині вирізалися шматочки кори прецентральної звивини ГМ, гіпокампа, стовбура мозку, а також кори мозочка, які фіксували в забуференому 10% формаліні й заливали в парафін. Зрізи, виготовлені на прецизійному ротатійному мікромомі HM 3600 («MICROM Laborgerdte GmbH», Німеччина), фарбували гематоксиліном й еозинном за стандартною методикою. Для ІГХ досліджень виготовляли серійні парафінові зрізи завтовшки 3 мкм, які поміщали на адгезивні предметні скельця «Super Frost Plus» («Menzel Glaser», Німеччина). ІГХ-визначення експресії про- та антиапоптотичних білків проводилось з використанням моноклональних антитіл Мо a-Rat Bcl-X проти білка *Bcl-X_L* і системи візуалізації LSAB2; Мо a-Hu CD95, APO-1/Fas проти рецептора *Fas* і системи візуалізації EnVision+; а також поліклональних антитіл Rb a-Hu Bax проти протеїну *Bax* і системи візуалізації CSA System Rabbit Link (всі реактиви фірми «ДАКО», Данія).

Для ЕМ у експериментальних кішок у перші 3–5 хвилин після декапітації зі зрешеного 2,5% глютаральдегідом на 0,1М фосфатному буфері ГМ вилучались дрібні шматочки кори з білою речовиною лобної області лівої півкулі та стовбура мозку, які фіксували 2 години в аналогічному розчині при температурі +4°C, далі фіксували 2 години в 1% розчині OsO₄ на 0,1М фосфатному буфері, потім зневоднювали в спиртах, контрастували 2 години в 2% ураніл-ацетаті і заливали в аралдит. Ультратонкі зрізи, виготовлені на ультрамікромомі Reichert Om43, контрастували на сіточках цитратом свинцю за E.S. Reynolds (1963) та вивчали в електронному мікроскопі ПЕМ-100.

Результати досліджень оброблені сучасними статистичними методами аналізу на персональному комп'ютері з використанням стат. пакету ліцензійної програми «STATISTICA® for Windows 6.0» (StatSoft Inc., № AXXR712D833214FAN5).

Результати та їх обговорення

За даними патоморфологічних, ІГХ та ЕМ досліджень у постішемично-реперфузійному періоді після КС у ГМ визначався мозаїчно розповсюджений патогенно-індукований апоптоз нейронів, а також загибель нервових і гліальних клітин у ділянках невідновленої капілярної гемомікроциркуляції, які мали певні структурні відмінності в динаміці ПРП. Вже у перші години ПРП початкові ішемічні зміни нейронів проявлялись нерівномірним вакуолоподібним набряканням мітохондрій з редукацією і руйнуванням крист. Патологічно змінені нейрони були мозаїчно розподілені між структурно збереженими клітинами в нервовій тканині, але частіше вони спостерігались у зонах невідновленої гемомікроциркуляції. Це корелює з даними, отриманими іншими авторами [7,8,11].

Встановлено, що апоптоз нейронів ЦНС активують внутрішні мітохондріальні фактори (*Bax*) та мембранні *Fas-APO*-рецептори. Ушкодження мітохондрій протягом перших 3-х діб ПРП призводило до активації внутрішніх мітохондріальних шляхів апоптозу нейронів та гліальних клітин; можливим його активатором могли бути також іони кальцію і білки, вивільнені з розширених цистерн ендоплазматичної сітки з втраченими прикріпленими рибосомами. При ЕМ вже через 6 годин після КС у деяких нейронах відзначався каріопікноз зі збереженим ядрцем, виразне ущільнення цитоплазми і поява цитоплазматичних випинань при відносно збережених органелах, тобто розвивалися морфологічні ознаки апоптозу, а наприкінці 1-ї доби виявлялись загиблі шляхом апоптозу нервові клітини. За даними ІГХ-дослідження, протягом першої доби ПРП спостерігалася експресія білка *Bax* одиничними нейронами кори головного мозку, які при світловій мікроскопії найчастіше мали ознаки початкових ішемічних змін. При цьому, характерною рисою була імуногістохімічно інтенсивна експресія цього маркера в таких клітинах. Дослідження експресії протеїну *Bcl-X_L* у цей же період часу показало, що цей білок імуногістохімічно виявлявся в незначній кількості нейронів кори великих півкуль, ще меншою мірою – у нейронах інших відділів мозку. При цьому відзначалася наступна закономірність: чим тривалішим був період КС, тим меншою мірою спостерігалась експресія *Bcl-X_L*, що можна пояснити значним енергетичним дефіцитом у нейронах із пригніченням експресії білків-інгібіторів апоптозу. На 1-й добі після реанімації було відзначено, що білок *Fas* експресувався переважно в цитоплазмі одиничних нейронів кори й стовбура головного мозку, що найчастіше мали ознаки ішемічного ушкодження, поруч із якими знаходились одна або декілька гліальних клітин-сателітів. У цей термін ПРП в клітинах нейроглії спостерігалась відсутність експресії білків-регуляторів апоптозу сімейства *Bcl-2 – Bax* і *Bcl-X_L*, а також білка *Fas*.

Через 2 доби після реанімації відзначено значне зростання експресії білка *Bax* нейронами ЦНС, при якому цей маркер мозаїчно виявлявся в нейронах і зрідка – у групах нейронів кори й стовбура головного мозку в зонах з регіональним порушенням кровотоку. Поряд з кількісними змінами експресії *Bax* у нейронах спостерігались також якісні відмінності інтенсивності ІГХ-забарвлення різних клітин у групі поряд розташованих нейронів. У цей же термін експресія *Bcl-X_L* у нейронах була максимально виразною, однак кількісне співвідношення *Bax*⁺/*Bcl-X_L*⁺ нейронів було досить значним і досягало 20:1. На 2-й добі ПРП спостерігалось незначне збільшення кількості нейронів, що експресували *Fas*. Іноді біля таких нейронів знаходились одиничні сателітні олігодендроцити. Якісні відмінності в рівні експресії цього маркера в різних нейронах, навпаки, були досить значними й навіть поруч розташовані нейрони, що мали подібні патоморфологічні зміни, показували різну інтенсивність забарвлення при ІГХ-маркуванні. Однак, незважаючи на це, все ж таки простежува-

лась пряма залежність між інтенсивністю експресії *Fas* і виразністю ішемічних змін у цих нейронах. У цей час починала виявлятися експресія білка *Bax* в олігодендроцитах, розташованих поруч із ушкодженими нейронами. Для цього терміну ПРЕ також була характерною поява експресії *Bcl-X_L* гліальними клітинами, однак, на відміну від *Bax*, білок *Bcl-X_L* виявлявся в основному в цитоплазмі астроцитів, меншою мірою – олігодендроцитів. Експресія *Fas* у гліальних клітинах у цей термін ПРЕ імуногістохімічно не виявлялась.

Протягом перших 3-х діб ПРП ішемічний коагуляційний некроз і апоптоз нейронів в головному мозку мали майже подібні мікроскопічні і ультраструктурні ознаки. У цьому періоді в усіх апоптотично і пренекротично ущільнених нейронах визначався каріопікноз із брильчатою конденсацією і маргінацією хроматину, набрякання мітохондрій зі значною редукцією крист, розширення вакуолей комплексу Гольджі і цистерн гранулярної ЕПС без прикріплених рибосом, а також виявлялись зруйновані аксо-дендритні й аксо-соматичні синапси. Електронно-мікроскопічно цитоплазма таких нейронів відрізнялась підвищеною осміофілією нуклеопротейдів і дезінтегрованих рибосом; підвищеною електронною щільністю білків цитозолу, аксоплазми і дендроплазми. Ущільнені й зменшені нейрони були оточені розширеними відростками астроцитів і макрофагів. Такі структурні зміни могли бути однією з фаз апоптозу нейрона напередодні його дезінтеграції каспазами, а могли бути також проявами розвитку коагуляційного ішемічного некрозу. Характерною ознакою патогенно-індукованого апоптозу була збереженість ядерця в пікнотизованому ядрі з гофрованими контурами, а в більш пізній фазі – залишки фрагментованого ядра (так звані «ядерні апоптозні тільця»).

На 3–4 добу ПРП відзначалася максимальна виразність експресії *Bax* нейронами, що, очевидно, пов'язане з розвитком відстрочених ушкоджень клітин ЦНС у ПРП. Експресія цього білка найчастіше була якісно виразнішою в зменшених у розмірах нейронах з пікнотичним ядром, однак ця ознака спостерігалася далеко не завжди. У деяких випадках мала місце відсутність ІГХ-забарвлення цитоплазми нейронів з явними ознаками каріопікнозу та ущільненою цитоплазмою, що, як видно, свідчило про настання апоптотичної фази деградації у цих клітинах або про їхню загибель шляхом коагуляційного некрозу. Також у цей термін ПРЕ в корі ГМ виявлялася найбільша кількість *Fas*-позитивних нейронів. При цьому експресія *Fas* була більш виразною в групах нейронів без перинейронального сателітозу або з одиничними сателітними олігодендроцитами. Експресія *Bcl-X_L* у нейронах, навпаки, мала стійку тенденцію до зниження. У цей час відзначалася максимальна виразність експресії *Bax* олігодендроцитами міжнейронної локалізації, у той час як перинейрональні сателіти вкрай рідко мали позитивну реакцію на *Bax*. Експресія *Bcl-X_L* у клітинах нейроглії незначно знижувалася, зберігаючись, у першу чергу, в перинейрональних олігодендроцитах і астроцитах. Дані

ІГХ досліджень підтверджувались даними ЕМ, при якій виявлявся каріопікноз, каріорексис і розпад нейронів на апоптотичні тіла. Також, поряд з інтерфасцикулярними олігодендроцитами нормальної структури, виявлялися клітини з ознаками апоптозу. У пікнотизованому ядрі таких клітин визначалася гомогенізація та конденсація хроматину у вигляді брилок, в ущільненій цитоплазмі виявлялися одиничні вакуолізовані мітохондрії та дрібні вакуолі. Пікнотично змінені олігодендроцити оточувались розширеними астроцитарними відростками.

Через 5–6 діб після перенесеної КС спостерігалось поступове зниження кількості клітин, що експресували білок *Bax*, та інтенсивності їх ІГХ-забарвлення. Аналогічний процес був відзначений при аналізі динаміки зміни експресії білка *Bcl-X_L*, що зберігалася в одиничних нейронах з виразним перинейрональним сателітозом. У той самий час спостерігалася максимальна кількість нейронів стовбура мозку, що експресували білок *Fas*, коли експресія останнього в нейронах кори мала тенденцію до зниження. Накопичення білка *Fas* відмічалось у групах нейронів, і було значно більш виразним у нейронах, що оточені декількома клітинами-сателітами. Протягом 5–7 доби після реанімації починали виявлятися одиничні *Fas*-позитивні гліальні клітини. За даними світлової мікроскопії, в цей термін ПРЕ відзначався розповсюджений апоптоз нейронів гіпокампа, більшість яких є глутамат-чутливими клітинами, що свідчило про розвиток у хворих після КС також ексайтотоксичного апоптозу глутамат-чутливих нейронів ЦНС. За даними ЕМ, у великій кількості ідентифікувались окремі фрагменти нейронів, що гинули шляхом патогенно-індукованого апоптозу.

У пізніші терміни – з початку 2-го тижня ПРП – експресія нейронами *Bax*, *Bcl-X_L* та *Fas* виявлялася вкрай рідко у вигляді одиничних хаотично розташованих клітин, що містили слабкозабарвлені гранули в цитоплазмі. У цей термін ПРЕ експресія *Bax* гліоцитами виявлялася вкрай рідко у вигляді одиничних хаотично розташованих клітин, що містили слабкозабарвлені гранули в цитоплазмі. У цей же час знову зростала експресія білка *Bcl-X_L* проліферуючими астроцитами в зонах замісного гліофіброзу. У цих ділянках мозку експресія *Bcl-X_L* в астроцитах спостерігалась навіть через місяць після перенесеної клінічної смерті. У цей час в зонах невідновлення кровотоку імуногістохімічно також відзначалося зростання числа *Fas*-позитивних гліальних клітин, головним чином олігодендроцитів і, зрідка, астроцитів. Повне припинення експресії білка *Fas* гліальними клітинами відзначено лише наприкінці 2 тижня ПРП.

Проведені ЕМ дослідження показали, що найбільш раннім ультраструктурним проявом патогенно-індукованого апоптозу нейрона було ущільнення каріоплазми ядра з крупним ядерцем і агрегація хроматину у великі конгломерати біля каріолеми (маргінація хроматину), при цьому визначались брунькоподібні випинання ядра в цитоплазму з набряклими мітохондріями

і збереженими іншими органелами. Надалі спостерігався каріопікноз та каріорексис на гіперхромні «ядерні апоптотичні тільця», фрагментація нервових клітин і фагоцитоз цих фрагментів макрофагами. Імуногістохімічно апоптоз нейронів ГМ був достовірно верифікований протягом першого тижня, гліальних клітин – до кінця другого тижня після КС. Незважаючи на дані ПГХ щодо поширеної в ПРП експресії *Bax* і *CD95/Fas* в значній кількості клітин, дані світлової і електронної мікроскопії показали, що далеко не всі ці клітини гинуть шляхом апоптозу. Відомо [7], що надекспресія *Bax* у цитоплазмі нейрона вважається провісником його загибелі, хоча *Bax*-індукований апоптоз може блокуватися одночасною експресією *Bcl-X_L* [9]. Таким чином, ПГХ-виявлення експресії проапоптотичних і антиапоптотичних маркерів у головному мозку хворих у ПРП дає можливість прогнозувати лише вірогідність загибелі або виживання нейронів, але не визначає конкретний тип клітинної загибелі. Встановлено, що, незважаючи на ПГХ-верифіковану ініціацію апоптозу, значна кількість ішемічно ушкоджених нейронів в ПРП відновлювалась при підтримці оточуючих гліальних клітин за умов ранньої активації адаптивно-метаболическої кооперації між ними. Протягом першого тижня після КС відмічалась міграція гліальних клітин до ішемічно ушкоджених нейронів зі збереженим ядром і ядерцем, при світловій і електронній мікроскопії визначався феномен перинейронального астроцитарно-олігодендрогліального сателітозу з експресією в цих клітинах антиапоптотичних молекул *Bcl-X_L*.

Висновки

1. Апоптоз нейронів і гліальних клітин у ПРП стимулюють внутрішні мітохондріальні фактори (*Bax*) і активовані внутрішньоклітинні домени мембранних *Fas*-*APO*-рецепторів;

2. Ультраструктурними проявами патогенно-індукованого апоптозу є конденсація та маргінація ущільненого хроматину і каріопікноз із збереженим великим ядерцем, ущільнення цитоплазми із збереженими мітохондріями й іншими органелами, каріорексис, фрагментація нервових клітин на «апоптотичні тільця»

з їх наступним фагоцитозом;

3. Порівняння даних світлової мікроскопії, ПГХ і ЕМ показує, що апоптоз в ПРП розвивається лише в частині тих нейронів та гліоцитів, що експресують *Bax* і *CD95/Fas*.

Література

1. Морфология адаптивных изменений в сосудисто-глио-нейрональном комплексе головного мозга при постреанимационной болезни / Туманский В.А., Тertyshnyy С.И., Гремицкий А.В. [и др.] // Мед. журн. России. – 1997. – Т. 1, № 1-2. – С. 105–108.
2. Пат. 28969 UA, МПК G 09 B 23/28. (2007.01). Спосіб моделювання клінічної смерті / Туманський В.О., Євсєєв А.В. (Україна) – № 2007 u10103; заявл. 10.09.07; опубл. 25.12.07, Бюл. № 21.
3. *Пермяков Н.К.* Постреанимационная энцефалопатия / Н.К. Пермяков, А.В. Хучуа, В.А. Туманский. – М.: Медицина, 1986. – 240 с.
4. Постреанимационные энцефалопатии: особенности морфогенеза и патологоанатомической диагностики / Туманский В.А., Визир В.А., Тertyshnyy С.И. [и др.]. – Запорожье, 1994. – 46 с.
5. *Туманский В.А.* Постреанимационные энцефалопатии: морфогенез репаративных и адаптивных изменений в мозге / В.А. Туманский // Запорож. мед. журн. – 2002. – №3. – С.12–13.
6. *Туманський В.О.* Концепції молекулярно-метаболическої альтерації клітин / В.О. Туманський // Укр. журн. патології. – 2000. – № 1. – С.110–120.
7. *Lipton P.* Ischemic cell death in brain neurons / Lipton P. // *Physiol. Rev.* – 1999. – Vol. 79. – P. 1431–1568.
8. Outcome after ischemia in the developing sheep brain: an electroencephalographic and histological study / Williams C.E., Gunn A. J., Mallard C., Gluckman P. D. // *Ann. Neurol.* – 1992. – Vol. 31, N 1. – P. 14–21.
9. *Pashen W.* The organelles II: endoplasmic reticulum and its overload. Endoplasmic reticulum dysfunction in various brain disorders / Pashen W. // In: *Brain Damage and Repair* Eds. T. Herdegen and J. M. Delgado-Garcia – Kluwer Academic Publishers, 2004. – P. 111–121.
10. Postresuscitative encephalopathy: hystopathologic parameters of the irreversible brain damages / Tumansky V., Tertyshny S., Alekseeva A., Timoshenko S. // *Pathology International.* – 1996. – Vol. 46, suppl. 1. – P. 648.
11. *Rubin L. L.* Neuronal cell death: when, why and how / L. L. Rubin // *British Medical Bulletin.* – 1997. – Vol. 53, N 3. – P. 617–631.

Відомості про автора:

Євсєєв А. В., к. мед. н., асистент кафедри патологічної анатомії та судової медицини з основами права ЗДМУ.

Адреса для листування:

Євсєєв Антон Володимирович, пр. Маяковського, 26, м. Запоріжжя, 69035, кафедра патологічної анатомії та судової медицини з основами права ЗДМУ.