

7. Gohin I. The lymphatic system and its functioning in sheep // *Vet. Res.* – 1997. – Vol.28, №5. – P. 417-438.
 8. The lymphatic vessels of the stomach in man / A. Pissas, R.Sarrazin, J.F.

- Dyon, Y. Bouchet // *Folia morphol. CSSR.* – 1992. – Vol. 30, № 4. – P. 363-365.
 9. Sallustio G., Giangregorio C., Cannas L. et al. Lymphatic system: morphofunctional considerations // *Rays.* – 2000. – Vol. 25, № 4. – P. 413-427.

**Коваленко Т.М., Осадченко І.О., Сможаник К.Г., Ніконенко О.Г., Скибо Г.Г.
 УЛЬТРАСТРУКТУРНІ ОСНОВИ ВІДСТРОЧЕНОЇ ЗАГИБЕЛІ НЕЙРОНІВ ГІПОКАМПУ ПІСЛЯ
 ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ІШЕМІЇ МОЗКУ**

Інститут фізіології ім.О.О.Богомольця НАН України, м.Київ

УЛЬТРАСТРУКТУРНІ ОСНОВИ ВІДСТРОЧЕНОЇ ЗАГИБЕЛІ НЕЙРОНІВ ГІПОКАМПУ ПІСЛЯ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ІШЕМІЇ МОЗКУ – Експериментальну ішемію мозку у щурів створювали шляхом 4-судинної оклюзії хребцевих та загальних сонних артерій. Проводили ультраструктурні дослідження зони СА1 гіпокампу та морфометричний аналіз загальної кількості синапсів та їх типів на одиницю площі у stratum radiatum цієї зони через 15 хв, 2 год, 1, 3, 7 днів після 15-хвилинної ішемії. У ранні строки постішемичного періоду виявлено високу ступінь синаптичної пластичності, що виявляється у перерозподілі форм синаптичних терміналей та збільшенні товщини постсинаптичного ушлінення. З 3-ї до 7-ї доби після ішемії відбувалася прогресуюча, відставлена у часі загибель нейронів.

УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ ОСНОВЫ ОТСРОЧЕННОЙ ГИБЕЛИ НЕЙРОНОВ ГИПОКАМПА ПОСЛЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ИШЕМИИ МОЗГА – Экспериментальную ишемию мозга у крыс создавали путем 4-сосудистой окклюзии позвоночных и общих сонных артерий. Проводили ультраструктурные исследования зоны СА1 гиппокампа и морфометрический анализ общего количества синапсов и их типов на единицу площади в stratum radiatum этой зоны через 15 мин, 2 ч, 1, 3, 7 суток после 15-минутной ишемии. В ранние сроки постишемического периода отмечена высокая степень синаптической пластичности, которая проявлялась в перераспределении форм синаптических терминалей и увеличении толщины постсинаптической плотности. С 3-их по 7-е сутки после ишемии происходила прогрессирующая, отсроченная во времени, гибель нейронов.

ULTRASTRUCTURAL FOUNDATIONS OF NEURONAL DELAYED DEATH IN HIPPOCAMPUS AFTER EXPERIMENTAL BRAIN ISCHEMIA – The experimental brain ischemia in the rats was realized by four-vessels occlusion of the vertebral and common carotid arteries. Electron microscopic studies of hippocampal CA1 area and morphometric analysis of synaptic density and type of synapses in stratum radiatum were carried out after 15 min, 2 hours, 1, 3, 7 days followed by 15 min ischemia. A high level of synaptic structural plasticity by way of synaptic terminal modifications and postsynaptic density thickening was observed in early postischemic terms. A progressive delayed neuronal death took place from the third to seventh days after ischemic effects.

Ключові слова: ішемія мозку, зона СА1 гіпокампу, ультраструктура, синаптична пластичність

Ключевые слова: ишемия мозга, зона СА1 гиппокампа, ультраструктура, синаптическая пластичность.

Key words: brain ischemia, hippocampal CA1 area, ultrastructure, synaptic plasticity

ПРОБЛЕМА. Протягом останніх десятиліть проблема гострого церебрального інсульту набула великого значення у всьому світі в зв'язку з надзвичайно високим рівнем летальності, значною інвалідизацією та соціальною дисадаптацією уражених цією недугою пацієнтів.

Ступінь ураження тканини мозку при ішемії перш за все залежить від її тривалості. Після жорсткої і довготривалої ішемії тканина мозку швидко досягає інфаркту. Коли тривалість ішемичного впливу помірна, уражена тканина мозку підлягає повільному процесу "дозрівання" до інфаркту [5]. Якщо ішемія дуже коротка, в тканині мозку не розвивається інфаркт взагалі. Замість цього певні групи популяцій нейронів селективно пошкоджуються і руйнуються, вказуючи на те, що ці нейрональні підгрупи надзвичайно чутливі до ішемії. Такі чутливі нейрони знаходяться в гіпокампі, стріатумі та корі мозку.

Як об'єкт досліджень, нами був обраний гіпокамп – структура мозку, відповідальна, як відомо, за процеси фор-

мування пам'яті та навчання. Ще 2 десятиліття тому було виявлено селективне зменшення кількості пірамідних клітин в СА1 зоні гіпокампу при короткочасній ішемії [5, 11]. Детальний аналіз часової залежності показав, що смерть нейронів є повільним процесом, який триває 2-3 дні до появи морфологічних ознак (відстрочена нейрональна смерть) [4, 8]. Явище відстроченої загибелі нейронів свідчить про те, що існує певний проміжок часу після ішемичного впливу, коли морфологічних змін ще немає, а зміни функціональних характеристик нейронів уже виявляються. Протягом цього часу потрібно застосовувати фармакологічну корекцію, яка дасть змогу перервати каскад ушкоджуючих процесів у нейронах, забезпечити повернення їх до нормального стану та попередити відставлену нейрональну загибель. Тому вивчення ранніх клітинних механізмів пошкодження мозку при ішемичному впливі має актуальність і особливу значущість для розробки шляхів фармакологічної корекції такого ураження.

Експериментальна глобальна ішемія мозку на щурах з припиненням кровозабезпечення мозку шляхом виключення кровотоку як по хребцевих, так і по обох загальних сонних артеріях, незважаючи на значну трудомісткість методу, є однією з кращих патоморфологічних моделей, оскільки дозволяє чітко виявити морфологічні зміни в нервовій тканині залежно від часових параметрів пошкоджуючого впливу.

Метою даної роботи було вивчити ультраструктурні характеристики ішемичного пошкодження зони СА1 гіпокампу в динаміці розвитку відстроченої загибелі нейронів.

ОСНОВНА ЧАСТИНА. Досліди проводили на 23 самцях щурів лінії Вістар масою 300-400 г, у яких створювали експериментальну модель глобальної ішемії мозку шляхом чотирисудинної оклюзії, як описано Pulsinelli W.A. [9], з деякими модифікаціями. При виконанні роботи були дотримані міжнародні принципи Європейської конвенції про захист хребетних тварин. Щурів наркотизували каліпсолом (75 мг/кг) і виділяли обидві загальні сонні артерії. Під кожну артерію підводили лігатуру без переривання кровотоку і розріз зашивали. Після цього у тварин коагулювали обидві вертебральні артерії між C1 - C2 хребцями. Наступного дня тварин знерухомлювали ефіром, знімали шов з переднього шийного розрізу і на загальні сонні артерії для припинення кровотоку накладали атравматичні затискачі, які знімали через 15 хвилин, і кровотік в сонних артеріях відновлювався. Матеріал для досліджень брали через 15 хв, 2 год після ішемії та початку реперфузії мозку, а також у віддалені строки постішемичного періоду - через 1, 3, чи 7 днів. Контрольними слугували 3 несправжньооперовані тварини. Щурів анестезували ефіром і їх мозок фіксували шляхом транскардіальної перфузії 4 % розчином параформальдегіду і 2,5 % розчином глютаральдегіду на 0,1 М фосфатному буфері. Виділений гіпокамп розрізали на поперечні зрізи товщиною ~500 мкм і дофіксували у цьому ж розчині 1,5 години, а потім у 1% OsO₄ протягом 1 години.

Тканину заливали в епоксидні смоли (Epon – Araldit) за загальноприйнятою методикою. Ультратонкі зрізи, товщиною 50 – 70 нм, контрастували в уранілацетаті і цитраті свинцю, вивчали в електронному мікроскопі JEM-100 CX (Японія).

Ультраструктурні дослідження зони CA1 гіпокампу через 15 хв після оклюзії не виявили жодних змін в сомі ней-

ронів, однак в дендритах і синаптичних терміналях зрідка спостерігались округлі вакуолі з електроннопрозорим вмістом, які, перш за все, є розширеними цистернами ендоплазматичного ретикулу. Після 2-годинного інтервалу після ішемії наростала вакуолізація в терміналях у вигляді множинних мембранних структур неправильної форми (рис. 1а)

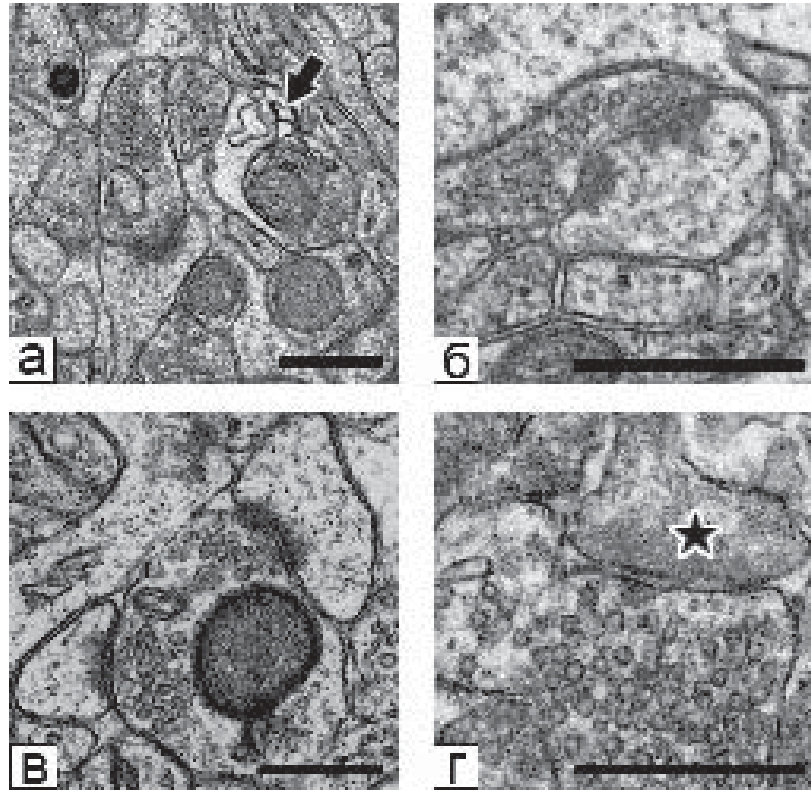


Рис. 1. Ультраструктура фрагментів нейропіля зони CA1 гіпокампу через 2 год (а, б, в) та 7 днів (г) після 15-хвилинної ішемії: а – поява мембранних структур (стрілка) в синаптичних терміналях; б) перфорований синапс; в) мультисинапс; г) потовщення та розшарування постсинаптичного ущільнення (зірочка). Шкала – 1мкм.

Змін в мітохондріальному апараті не спостерігалось, окрім незначного просвітлення матриксу та розширення міжкристних проміжків. Через 24 год після оклюзії виявлялись помірні зміни в пірамідних нейронах зони CA1 гіпокампу, які виявлялись у просвітленні цитоплазми нейронів внаслідок їх набрякання та початкових проявів порушення структури мітохондрій. Порушення білкового та ліпідного обміну проявлялось у деяких нейронах у вигляді фрагментації та вакуолізації ендоплазматичного ретикулу та накопичення гранул ліпофусцину внаслідок порушення обміну ненасичених жирних кислот. Ці зміни вказують на недостатність енергетичного забезпечення нейронів, викликану ішемією. Після першої доби звертало на себе увагу значне просвітлення дендритів та дендритних шипиків, що може бути пов'язане з їх набряканням. Часто зустрічались вакуолярні структури, частіше в дендритах і шипиках, ніж в пресинаптичних терміналях.

Із збільшенням постішемичного терміну з третьою по сьому добу в нейронах наростали явища деструкції – вакуолізація цитоплазми, значна осміофілія ядра та цитоплазми. Мембрани, як плазматичні, так і цитоплазматичні, руйнувались, відбувався лізис органел, і такі некробіотичні зміни призводили до загибелі нейронів. З третьої доби чітко простежувались активація мікрогліальних клітин, які накопичувались навколо дегенеруючих нейронів та периваскулярно. В гліальних клітинах відмічались активація лізо-

сомального апарату, локальний набряк цитоплазми, чітко виявлялась участь мікроглії в поглинанні та розщепленні дегенеруючих залишків нейронів. На сьому добу постішемичного періоду зустрічались також апоптотичні зміни нейронів у вигляді фрагментації їх ядер з утворенням апоптотичних тілець. В мікросудинах виявлявся прогресуючий з часом периваскулярний набряк структур, що складають гематоенцефалічний бар'єр, головним чином, астроцитарних відростків.

Таким чином, в проведених дослідженнях встановлено, що при 15-хвилинному терміні оклюзії та наступній постішемичній реперфузії в зоні CA1 гіпокампу розгорталось повільне, але прогресуюче, відставлене у часі, ураження нейронів. І хоча нейрони цієї зони в цілому підтримували свою структурну цілісність протягом першої доби після ішемичного впливу, вже на ранній стадії були помічені очевидні зміни на ультраструктурному рівні в синапсах.

Для виявлення змін, які з'являються першими в ультраструктурі нейронів та синаптичних терміналей в stratum radiatum CA1 зони гіпокампу в умовах ішемії-реперфузії на мікрофотографіях проводили морфометричний аналіз синапсів з чіткою вирізняюванню постсинаптичного ущільнення. Підраховували загальну кількість синапсів на одиницю площі зрізу та відносну кількість різних типів синапсів: а) простих (рис. 1а), б) перфорованих (з наявністю однієї або більше переривчастостей в постсинаптичному

ущільненні (ПСУ), (рис. 1б) [3] та в) множинних (чи мультисинапсів, рис. 1в) при наявності двох та більше окремих дендритних шипиків, які контактують з однією термінальною [13].

Через 2 год після ішемії вірогідно зменшувалась загальна кількість синапсів на одиницю площі, з подальшим прогресуючим зниженням цього показника до 7-ї доби (рис. 2).

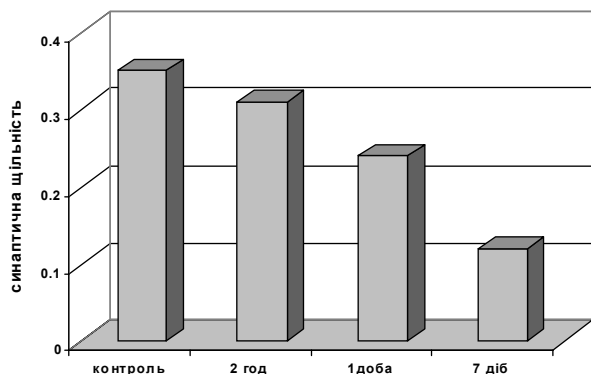


Рис. 2. Синаптична щільність (кількість синапсів на 100 мкм²) в stratum radiatum CA1 зони гіпокампу в різні строки після 15-хвилинної ішемії.

Привертають до себе увагу ранні зміни в структурній організації синаптичних контактів в умовах ішемії, а саме: чітке збільшення відносної кількості синапсів з перфорованим ПСУ вже на 15-й хвилині реперфузії, яке продовжувало далі зростати. Крім того, збільшувалась частка множинних синапсів через 2 год реперфузії і знову поверталась до попередніх значень через 24 год після ішемії. Тобто, змінювалось співвідношення типів синапсів у бік перфорованих та мультисинапсів. Недавніми дослідженнями було показано, що синапси в певних умовах проявляють високий рівень функціональної та структурної пластичності [6]. Висловлюють думку, що перфоровані синапси можуть бути більш ефективними для синаптичної передачі, ніж прості [1]. Форма дендритних шипиків може змінюватись при змінах концентрації внутрішньоклітинного кальцію [12], а при індукції LTP можливе утворення нових типів синапсів [2, 14].

Крім того, у синапсах після ішемії нами було виявлено виражене збільшення товщини ПСУ, в якому містяться молекулярні комплекси, які здійснюють рецепторну та сигнальну функцію при отриманні і передачі синаптичних сигналів у постсинаптичний нейрон. На 7 добу постішемичного періоду ми спостерігали максимальне потовщення і дифузне розшарування ПСУ. Доведено, що викликане ішемією збільшення внутрішньоклітинного кальцію і продукція вільних радикалів активує протеази і в результаті руйнує білки, зв'язані з ПСУ, крім того, відщеплені білки можуть агрегуватись і змінювати структуру ПСУ, роблячи його більш дифузним [10], що ми і спостерігали в наших дослідженнях.

Можна припустити, що відмічені нами ранні ультраструктурні зміни в синапсах після ішемії-реперфузії можуть створювати сигнал, який може прогресивно поширюватись ретроградно від синапсів до клітинного тіла [7] і там, з часом, викликати чи сприяти виникненню відстроченої нейрональної смерті в постішемичному періоді.

ВИСНОВКИ 1. Проведені дослідження свідчать про те, що ранні прояви порушень в нервовій тканині при ішемичному впливі в зоні CA1 гіпокампу відбуваються в синаптичних терміналях, що виявляється у перерозподілі форм синаптичних терміналей та у збільшенні величини ПСУ. 2. Одержані дані свідчать про високу ступінь синаптичної пластичності мозку при пошкоджуючій дії ішемії-реперфузії. Цілком можливо, що вказані особливості нервової тканини, які виявляються в ранні строки постішемичного періоду, можуть мати вирішальне значення в наступній відстроченій загибелі нейронів.

Література

1. Edwards F.A. Anatomy and electrophysiology of fast central synapses lead to a structural model for long term potentiation // *Physiol. Rev.* – 1995. – 75. – P. 759-787.
2. Engert F., Bonhoeffer T. Dendritic spine changes associated with hippocampal long-term synaptic plasticity // *Nature.* – 1999. – 399. – P. 66-70.
3. Geinisman Y., Morrell F., de Toledo-Morrell L. Axospinous synapses with segmented postsynaptic densities: a morphologically distinct synaptic subtype contributing to the number of profiles of "perforated" synapses visualized in random sections // *Brain Res.* – 1987. – 423. – P. 179-188.
4. Kirino T. Delayed neuronal death // *Neuropathology.* – 2000. – 20. – P. S95-S97.
5. Kirino T., Tamura A., Sano K. Selective vulnerability of the hippocampus to ischemia – reversible and irreversible types of ischemic cell damage // *Progress in Brain Res.* – 1985. – 63. – P. 39-58.
6. Luscher C., Nicoll R.A., Malenka R.C., Muller D. Synaptic plasticity and dynamic modulation of the postsynaptic membrane // *Nature Neuroscience.* – 2000. – 3. – P. 545-550.
7. Martone M.E., Jones Y.Z., Young S.J., Ellisman M.H., Zivin J.A., Hu B.-R. Modification of postsynaptic densities after transient cerebral ischemia: a quantitative and three-dimensional ultrastructural study // *J. Neurosci.* – 1999. – V. 19. – №6. – P. 1988-1997.
8. Nitatori T., Sato N., Waguri S., Karasawa Y., Araki H., Shibana K., Kominami E., Uchiyama Y. Delayed neuronal death in the CA1 pyramidal cell layer of the gerbil hippocampus following transient ischemia is apoptosis // *J. Neuroscience.* – 1995. – 15, № 2. – P. 1001-1011.
9. Pulsinelli W. A., Brierley J. B. A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat // *Stroke.* – 1979. – 10, № 4. – P. 267-272.
10. Robert-Lewis J.M., Savage M.J., Marcy V.R., Pinsker I.R., Simon R. Immunolocalization of calpain I-mediated spectrin degradation to vulnerable neurons in the ischemic gerbil brain // *J. Neurosci.* – 1994. – 14. – P. 3934-3944.
11. Schmidt-Kastner R., Freund T. F. Selective vulnerability of the hippocampus in brain ischemia. // *Neuroscience.* – 1991. – 40, 3. – P. 599-636.
12. Segal I., Korkotian I., Murphy D.D. Dendritic spine formation and pruning: common cellular mechanisms? // *Trends Neuroscience.* – 2000. – 23. – P. 53-57.
13. Sorra K.E., Harris K.M. Occurrence and three-dimensional structure of multiple synapses between individual radiatum axons and their target pyramidal cells in hippocampal area CA1 // *J. Neuroscience.* – 1993. – 13. – P. 3736-3748.
14. Toni N., Buchs P.A., Nikonenko I.R., Bron C.R., Muller D. LTP promotes formation of multiple spine synapses between a single axon terminal and a dendrite // *Nature.* – 1999. – 402. – P. 421-425.