

С.И.Тертышный

Запорожский государственный медицинский университет

Ключевые слова: постреанимационная энцефалопатия, эксперимент на животных, ультраструктура, астроглия.

Надійшла: 25.08.2015

Прийнята: 19.09.2015

УДК: 616.831-018-036.882-08-039-021.68-092.9

УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ АСТРОГЛИИ ПРИ ПОСТРЕАНИМАЦИОННОЙ ЭНЦЕФАЛОПАТИИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Дослідження проведено в рамках науково-дослідної роботи «Нові технології ранньої діагностики онкологічних, нейроендокринних, серцево-судинних, церебро-васкулярних, аутоімунних і інфекційних захворювань» (номер державної реєстрації 0106U003709).

Реферат. В эксперименте на животных с моделируемой клинической смертью изучены ультраструктурные изменения астроглии в динамике постреанимационного периода (ПРП). Показано, что в головном мозге после перенесенной клинической смерти развиваются деструктивные, адаптивные, репаративные и пролиферативные изменения астроглии, имеющие определенную динамику в течение ПРП. В раннем ПРП, наряду с разрушением части глиоцитов, усиливаются адаптивные изменения сохранившихся астроцитов, направленные на метаболически-транспортную поддержку частично поврежденных нейронов и поддержание гидро-ионного баланса центральной нервной системы. В периваскулярных очагах селективно-нейрональных некрозов активируются фагоцитарные функции астроцитов. В отдаленном ПРП активируется пролиферация астроцитов с последующим развитием заместительного астроцитарного глиоза и глиофиброза.

Morphologia. – 2015. – Т. 9, № 3. – С. 89-94.

© С.И.Тертышный, 2015

✉ tertishniy@i.ua

Tertishniy S.I. Ultrastructural changes of the astroglia in experimental postresuscitation encephalopathy.

ABSTRACT. Background. Astroglia plays crucial role in the functioning of the central nervous system both in normal and in pathological conditions. Data concerning changes of the astroglia during postresuscitatory brain pathology are rare and fragmentary. **Objective.** To study morphogenesis of the ultrastructural changes in astrocytes in postresuscitatory encephalopathy after experimental clinical death. **Methods.** Clinical death lasting 6-8 minutes was modeled on 17 domestic cats with subsequent resuscitation. The brain was studied after 1, 3 hours, 1, 3, 6-12, 30 days after the clinical death using optical light microscopy and electron microscopy techniques. **Results.** During 1 hour of postresuscitatory period uneven swelling of mitochondria with the local focal reduction of cristae and matrix in the perikaryon and processes of protoplasmic and fibrous astrocytes occurs. Increased in volume and devastated areas of cytoplasm are observed in astrocytes caused by reduction of free polyribosome and glycogen. The number of satellite glial cells is increased in medium density neurons without serious ischemic-coagulation changes of the nucleus and cytoplasm. The outer membranes of sharply increased astrocytic processes are destroyed in some areas, thereby forming a large cavity of true pericellular edema around lysed ischemically damaged neuron. Three days after piecemeal necrosis are formed. Phagocytic astrocytes are found in the interface with intact tissue. In some astrocytes submicroscopic signs of recovering organelles of partially destroyed cytoplasm are revealed. 3-6 days after experiment in the cerebral cortex significant cytoarchitectonic violations are found. They are caused by mosaic-focal "loss" of lysed neurons, fine-focal proliferation of glial cells in areas of destructing neurons, as well as by a violation of the normal orientation of bodies and processes of ischemic-necrotic nerve cells surrounded by expanded astrocytic processes. In subependymal areas of the lateral ventricles 3-6 days after experiment large foci of proliferating glial cells are revealed. 6-12 days after experiment focal selective neuronal necrosis are transformed in the foci of substitutional astrocytic gliofibrosis. 30 days after experiment fibrous astrocytes are observed adjacent to the damaged myelinated axons in the cortex and white matter, performing simultaneously synthetic and phagocytic function. **Conclusion.** 1. Destructive, adaptive, reparative and proliferative changes of astroglia develop in the brain after clinical death with certain dynamics within postresuscitatory period. 2. Along with the destruction of the glial cells, adaptive changes of surviving astrocytes are enhanced in the early postresuscitatory period. They are aimed at metabolic and transport support of partially damaged neurons and maintenance of hydro-ionic balance of the central nervous system. 3. Phagocytic function of astrocytes is activated in the foci of selective neuronal necrosis. In the distant postresuscitatory period activated proliferation of astrocytes is followed by the development of substitutional astrocytic gliosis and gliofibrosis.

Key words: postresuscitation encephalopathy, animal experiments, ultrastructure, astroglia.

Citation:

Tertishniy SI. [Ultrastructural changes of the astroglia in experimental postresuscitation encephalopathy]. *Morphologia*. 2015;9(3):89-94. Russian.

Введение

В работах последнего десятилетия, освещающих патогенез деструктивных и восстановительных процессов в головном мозге после перенесенной клинической смерти, незаслуженно малое внимание уделено исследованиям роли астроглии в восстановлении функций мозга [1,2]. Между тем астроглия играет исключительную роль в процессах функционирования центральной нервной системы, что предопределяет ее главенствующее положение в реализации компенсаторно-восстановительных процессов в патологических условиях. Астроциты контактируют с внутримозговыми артериолами и капиллярами, контролируют ионную и метаболическую среду нейропиля, поддерживают синаптическую активность нейронов [3,4,5], участвуют в электрических процессах и в интегративной деятельности корковых нейронов. В настоящее время изучены структурные изменения астроглии при цереброваскулярных заболеваниях [6,7], при ишемических некрозах мозга, а также при отеке мозга различного генеза. В публикациях, посвященных морфологическим аспектам постреанимационной патологии мозга, сведения об изменениях астроглии немногочисленны и фрагментарны, что побудило к проведению данного исследования.

Цель работы: в эксперименте с моделируемой клинической смертью изучить морфогенез ультраструктурных изменений астроцитов в динамике постреанимационной энцефалопатии (ПРЭ).

Материалы и методы

ПРЭ в эксперименте моделировалась на 17 здоровых взрослых беспородных домашних кошек обоего пола массой от 2,5 до 3 кг. Клиническая смерть моделировалась по методике В.Г. Корпачева с соавт. [8] под внутривенным наркозом тиопенталом натрия (50 мг на 1 кг веса животного) у предварительно заинтубированных кошек. Положительной стороной экспериментальной модели ПРЭ явилась возможность изучения морфогенеза изменений астроглии одновременно методами световой и электронной микроскопии (ЭМ), что по объективным причинам затруднено у умерших больных. После остановки сердца и дыхания длительностью 6-8 минут проводились реанимационные мероприятия: наружный массаж сердца в течении 2-5 минут до восстановления сердечной деятельности, а также искусственная вентиляция легких аппаратом "Мальш" (тип 265) в течении 15-20 минут до восстановления самостоятельного ритмичного дыхания.

Для забора материала животные умерщвлялись путем передозировки тиопентала натрия через 1 (3 наблюдения), 3 (n=3) часа, 1 (n=3), 3 (n=3), 6-12 (n=3), 30 (n=2) суток после клиниче-

ской смерти. В качестве контрольной группы изучен головной мозг 3 интактных кошек. Эксперимент на животных проведен с соблюдением положений «Европейской конвенции по защите позвоночных животных, которые используются для экспериментальных и научных целей» и Закона Украины «Про захист тварин від жорстокого поводження» (№1759-VI від 15.12.2009). Этапы обработки материала для проведения светоптического (окраска гематоксилином и эозином) и электронно-микроскопического исследования проводили по общепринятым методикам, изложенным в соответствующем руководстве [9]. Ультратонкие срезы, изучали в электронном микроскопе ПЭМ-100 при ускоряющем напряжении 75 кВ.

Результаты и их обсуждение

В течение первого часа постреанимационного периода (ПРП) при ультраструктурном исследовании в перикарионе и отростках протоплазматических и волокнистых астроцитов происходит неравномерное набухание митохондрий с локальной очаговой редукцией крист и матрикса, из-за чего в органеллах обнаруживаются очагово-деструктивные запустения. Мембраны гранулярной эндоплазматической сети подвергаются локальной коагуляции и лишаются фиксированных рибосом, цистерны трансформируются в вакуоли неправильной формы с осмиофильными утолщенными стенками. В астроцитах наблюдаются увеличенные в объеме из-за набухания и опустошенные из-за редукции свободных полирибосом и гликогена участки цитоплазмы (рис. 1). Существенных деструктивных изменений в ядрах астроцитов не обнаруживается. В отдельных клетках обнаруживаются зоны парциального некроза цитоплазмы с лизисом в них всех цитоплазматических структур.

Через 3 часа после перенесенной клинической смерти наблюдается разрушение некоторых астроцитов: ядро при этом подвергается пикнозу, цитоплазматические органеллы лизируются, разрушается цитолемма клетки. Реакция глиальных клеток в первые часы после клинической смерти во многом предопределяется тяжестью ишемических изменений нейронов. При световой микроскопии вокруг нейронов без тяжелых ишемических повреждений цитоплазмы и ядра отмечается нарастание перинейронального сателлитоза. Электронно-микроскопические исследования подтвердили, что увеличение числа сателлитных глиоцитов наблюдается у нейронов средней плотности без грубых ишемически-коагуляционных изменений ядра и цитоплазмы. В этот срок увеличивается число и протяженность специализированных контактов между сателлитными глиоцитами и нейронами с частичными постаноксическими повреждениями органелл цитоплазмы. Обнаруживается большое

число специализированных контактов типа нексусов в зоне истинного прилегания перикариона сателлитного астроцита к плазмолемме нейрона,

такие же контакты устанавливаются между дендритами нейронов и отростками астроцитов.

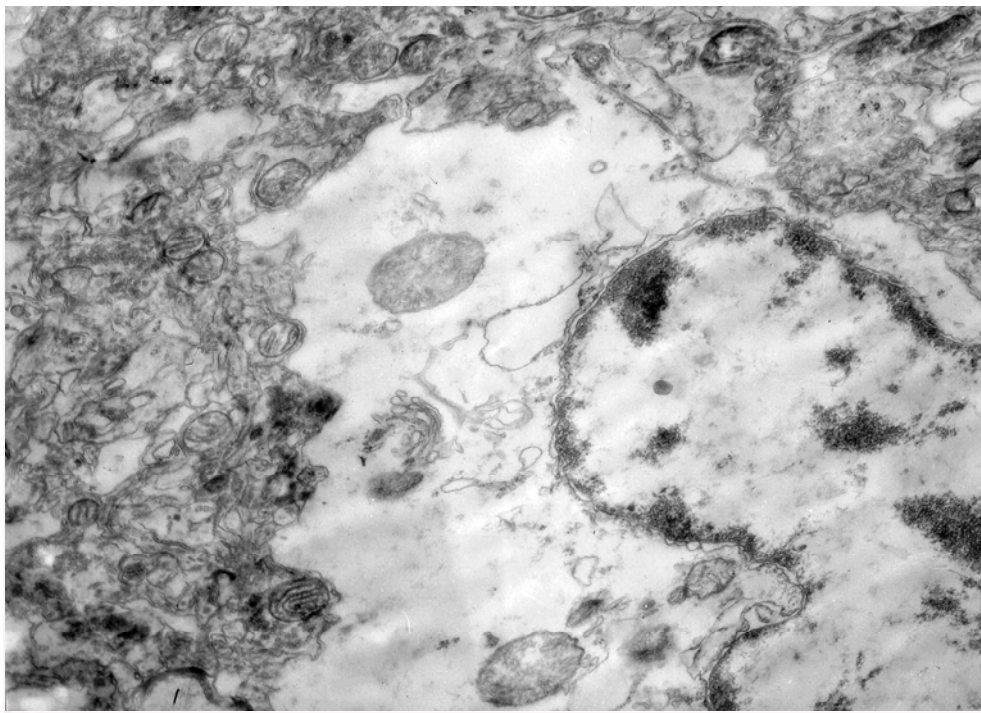


Рис. 1. Опустошенные участки цитоплазмы с деструкцией внутрицитоплазматических структур астроцита через 1 час после моделируемой клинической смерти. ТЭМ. $\times 4000$.

По мере углубления ишемических изменений нейронов вокруг них развивается прогрессирующее расширение перинейрональных астроцитарных отростков. Ишемически измененные нейроны могут полностью отделяться расширенными астроцитарными отростками от окружающего нейропиля и от сателлитных олигодендроцитов. В этом сроке ультраструктура аксо-соматических синапсов обычно не нарушается. Эти данные свидетельствуют о том, что в первый час ПРП вокруг ишемически измененных нейронов происходит процесс активного, метаболически зависимого набухания и увеличения объема астроцитарных отростков.

Прогрессирующие ишемические изменения нейронов сопровождаются ультраструктурной дезинтеграцией аксо-соматических синапсов. В резко расширенных отростках астроцитов, окружающих такие синапсы, усиливается микровезикуляция, формируются угловатой формы вакуоли. Во многих случаях мелкие фрагменты дезинтегрирующихся синапсов вокруг ишемически поврежденных нейронов оказываются внутри перинейрональных астроцитарных отростков. Несмотря на обнаруженные в раннем ПРП мозаичные аноксические повреждения органелл и разрушение отдельных клеток, астроциты продолжают выполнять функции регулятора гидро-

ионного баланса нервной ткани. По данным ЭМ в первые 1-3 часа после клинической смерти у животных подавляющее большинство микрососудов коры и белого вещества полушарий мозга с восстановившимся кровотоком сохраняет обычное субмикроскопическое строение. Периваскулярные отростки астроцитов не расширены, периваскулярные пространства компактной ультраструктуры. В части астроцитарных отростков обычного объема обнаруживается повышенное число микровакуолей или появляются гранулы гликогена.

Через сутки после клинической смерти морфологически идентифицируются патологические изменения в очагах невосстановленного кровотока. В части астроцитов наряду с прогрессирующими дистрофически-деструктивными процессами отмечаются выраженные адаптивные изменения метаболизма и объема малоповрежденных глиоцитов. В зонах восстановленного церебрального кровотока вокруг большей части полнокровных микрососудов наблюдаются компактно упакованные периваскулярные структуры, вокруг части капилляров наблюдается расширение всех периваскулярных астроцитарных отростков с сохранными органеллами. При световой микроскопии определяется нарастание ишемических изменений нейронов: пикноз ядер

с гомогенизацией гиперхромного хроматина, яркая эозинофилия гомогенной цитоплазмы, лишенной хроматофильного вещества. Вокруг таких нейронов, как правило, не наблюдается сателлитной глии, определяется значительное набухание перинейрональных отростков астроцитов. При ЭМ обнаруживаются деструктивные изменения и в перинейрональных отростках астроцитов. Наружные мембраны резко увеличенных астроцитарных отростков в некоторых участках разрушаются, вследствие чего образуется значительная полость истинного перичеллюлярного отека вокруг лизирующегося ишемически поврежденного нейрона. Выраженные деструктивные процессы в части астроцитов проявляются уменьшением ядра, конденсацией ядерного хроматина в глыбчато-гиперхромные конгломераты, в цитоплазме наблюдаются остатки лизированных органелл, очаги хлопьевидного материала, запустевшие полости или крупные вакуоли. При нарастающем пикнозе ядра наблюдается лакунообразное расширение кариотеки и полное опустошение цитоплазмы разрушающихся астроцитов. В малоповрежденных астроцитах развиваются приспособительные изменения. Наблюдается набухание кариоплазмы с мелкодисперстным хроматином, увеличенная в объеме и набухающая цитоплазма содержит вакуоли и малое число органелл.

Через 3 суток после клинической смерти в зонах невосстановленного кровотока вокруг мелких спавшихся сосудов формируется мелкоочаговый некроз, в зоне которого наблюдается разрушение отдельных астроцитов (путем зернистого распада) и увеличения числа макрофагов микроглиального генеза. На границе с неповрежденной тканью обнаруживаются фагоцитирующие астроциты. Такие клетки имеют эксцентрично расположенное ядро, в увеличенной и округлой цитоплазме определяются зернистые включения, отростки обычно утолщены и укорочены. При ЭМ в капиллярах с невосстановленным кровотоком обнаруживаются начальные некротические изменения эндотелия с пикнозом ядра и образованием крупных полостей в цитоплазме на месте лизированных органелл. Базальная мембрана таких капилляров разрывается, наблюдается также разрушение мембран резко набухших периваскулярных отростков астроцитов. В астроцитах, расположенных рядом с такими капиллярами, отмечаются кариопикноз, разрушение органелл и плазмолеммы. В очаге периваскулярного некроза обнаруживаются макрофаги, цитоплазма которых заполнена лизосомами, фагосомами и липидными включениями, а также некротизированные нейроны.

К 3 суткам в зонах восстановленного кровотока значительно нарастает количество ишемически-некротизированных нейронов. В таких нейронах наблюдается лакунообразная транс-

формация расширенных цистерн эндоплазматической сети, сливающихся с резко набухшими перинейрональными отростками астроцитов, из-за чего цитоплазма ишемически некротизированного нейрона фрагментируется на отдельные сегменты. Как и в прежние сроки сохраняется набухание ядер и перикарионов значительного числа астроцитов, а также набухание их периваскулярных отростков. При ЭМ можно наблюдать проявления фагоцитарно-изолирующей функции астроцитов: резко расширенные астроцитарные отростки полностью окружают и поглощают отдельные фрагменты некротизированных клеток, а также фрагменты аксонов и дендритов с коагуляционно-гомогенизирующими изменениями (рис. 2). Наряду с этим в отдельных астроцитах обнаруживаются субмикроскопические признаки восстановления органелл частично разрушенной цитоплазмы. В астроцитах с сохранной ультраструктурой ядра в цитоплазме появляется множество мелких митохондрий с уплотненным матриксом и плотно упакованными кристами.

Через 3-6 суток в коре больших полушарий обнаруживаются значительные citoархитектонические нарушения, обусловленные мозаично-очаговым "выпадением" лизированных нейронов, мелкоочаговой пролиферацией глиальных клеток в местах разрушающихся нейронов, а также нарушением обычной ориентации тел и отростков коллабированных ишемически-некротизированных нервных клеток, окруженных резко расширенными астроцитарными отростками. В фазе лизиса нервных клеток наблюдается повышенное количество астроцитов с эксцентричным подковообразным ядром и значительной по площади цитоплазмой. В цитоплазме таких клеток обнаруживается большое количество фагоцитированного липидного материала, не выявляемого в гистологических препаратах, а также множество мелких лизосом. В дальнейшем фагоцитирующие астроциты смещаются к капиллярам, занимая периваскулярное положение. В субэпендимных зонах боковых желудочков через 3-6 суток обнаруживаются крупные очаги пролиферирующих глиальных клеток, в центре которых преобладают недифференцированные глиоциты, а на периферии наблюдаются короткоотросчатые астроциты и олигодендроциты. В субпиальной зоне под наружной пограничной глиальной мембраной мозга регистрируется нарастание количества мелких волокнистых астроцитов вне связи с очаговыми деструктивными изменениями. Выявленные изменения свидетельствуют о том, что волокнистые астроциты в перифокальной зоне селективно-нейронального некроза выполняют также и фагоцитарные функции.

Через 6-12 суток у животных в очагах невосстановившегося мозгового кровотока очаговые селективно-нейрональные некрозы транс-

формируются в очаги заместительного астроцитарного глиофиброза. Наиболее ярко этот процесс выражен в субпиальной зоне мозга и в верхних слоях коры, а также в нижних слоях коры на границе с белым веществом. В таких очагах рядом со спавшимися микрососудами обна-

руживаются одиночные коллабировавшие гиперхромные клеточные тела ишемически-некротизированных нейронов, окруженные расширенными астроцитарными отростками. Рядом могут обнаруживаться немногочисленные фагоциты.

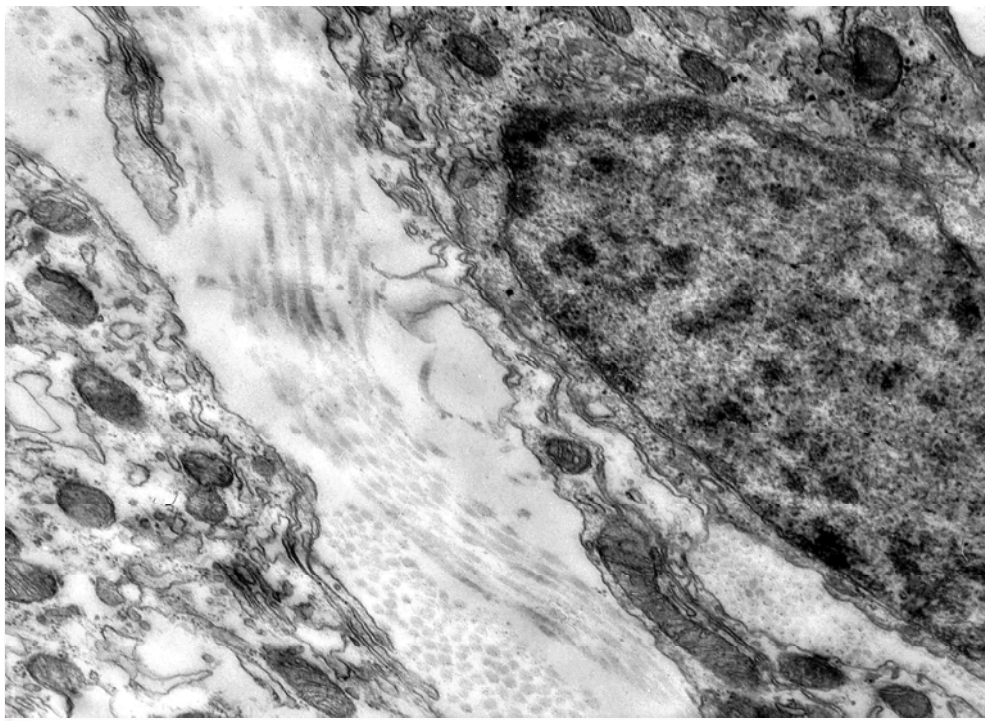


Рис. 2. Расширенные астроцитарные отростки окружают ишемически измененный нейрон. ТЭМ. ×4000.

Активированные волокнистые астроциты обычно имеют одно относительно большое ядро с крупным ядрышком, реже обнаруживаются двухядерные клетки. Кариоплазма таких клеток более плотная из-за повышенного количества рибонуклеопротеидов, формирующих мелкогранулярные скопления по всей площади ядра и у внутренней мембраны кариотеки. В цитоплазме таких клеток много митохондрий с умеренно просветленным матриксом, вокруг ядра концентрируется значительное количество полирибосом и цистерн гранулярной эндоплазматической сети. В перикарионе и отростках обнаруживается множество глиофибрилл, сгруппированных в крупные пучки или диффузно распределенных в цитоплазме. Обычно в таких клетках также наблюдается относительно много мелких лизосом. Надо отметить, что развитие реактивного астроглиоза отмечается многими авторами как реакция на повреждение ЦНС, которая, по-видимому, направлена на ограничение повреждения ткани и восстановление гомеостаза [10,11].

Через 30 суток в коре наблюдаются отдельные протоплазматические астроциты с набухшим перикарионом и отростками, астроциты с повышенным числом митохондрий, цистерн эн-

доплазматической сети и вакуолей. В коре и белом веществе рядом с поврежденными миелинизированными аксонами наблюдаются волокнистые астроциты, выполняющие одновременно фагоцитарные и синтетические функции. В цитоплазме таких клеток наблюдаются липидные включения, небольшие фагосомы с зернисто-плотным содержимым и множество глиофибрилл.

Выводы

1. Результаты проведенных исследований показали, что в головном мозге после перенесенной клинической смерти развиваются деструктивные, адаптивные, репаративные и пролиферативные изменения астроглии, имеющие определенную динамику в течении постреанимационного периода.

2. В раннем ПРП, наряду с разрушением части глиоцитов, усиливаются адаптивные изменения сохранившихся астроцитов, направленные на метаболически-транспортную поддержку частично поврежденных нейронов и поддержание гидро-ионного баланса центральной нервной системы.

3. В периваскулярных очагах селективно-нейрональных некрозов активируются фагоци-

тарные функции астроцитов. В отдаленном постреанимационном периоде активируется пролиферация астроцитов с последующим развитием заместительного астроцитарного глиоза и глиофиброза.

Перспективы дальнейших исследований предполагают более детальное изучение взаимо-

действий астроглии со всеми структурными элементами головного мозга, так как астроглия может быть мишенью терапевтического воздействия для осуществления нейропротекции у больных с тяжелыми ишемическими повреждениями ЦНС.

Литературные источники References

1. Evseyev AV. [Immunohistochemical and ultrastructural features of apoptosis of neurons and glial cells in postresuscitation encephalopathy]. *Pathologia*. 2010;7(2):18-21. Ukrainian.
2. Tumanskiy VA, Tumanskaya LM, Tertyshtyniy SI, Tymoshenko SG, Evseyev AV. [Cerebral insufficiency and structure targets of its protection in postresuscitation encephalopathies]. *Pathologia*. 2010;7(2):4-14. Russian.
3. Magistretti PJ. Neuron-glia metabolic coupling and plasticity. *J Exp Biol*. 2006 Jun;209(Pt 12):2304-11. PMID: 16731806.
4. Angelova PR, Kasymov V, Christie I, Sheikhabaehi S, Turovsky E, Marina N, Korsak A, Zwicker J, Teschemacher AG, Ackland GL, Funk GD, Kasparov S, Abramov AY, Gourine AV. Functional Oxygen Sensitivity of Astrocytes. *J Neurosci*. 2015 Jul 22;35(29):10460-73. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0045-15.2015. PMID: 26203141.
5. Verkhatsky A, Nedergaard M, Hertz L. Why are astrocytes important? *Neurochem Res*. 2015 Feb;40(2):389-401. doi: 10.1007/s11064-014-1403-2. PMID: 25113122.
6. Shimada IS, Borders A, Aronshtam A, Spees JL. Proliferating reactive astrocytes are regulated by Notch-1 in the peri-infarct area after stroke. *Stroke*. 2011 Nov;42(11):3231-7. doi: 10.1161/STROKEAHA.111.623280. PMID: 21836083.
7. Ding S. Dynamic reactive astrocytes after focal ischemia. *Neural Regen Res*. 2014 Dec 1;9(23):2048-52. doi: 10.4103/1673-5374.147929. PMID: 25657720.
8. Korpachev VG, Lysenkov SP, Tel' LZ. [Modeling clinical death and postresuscitation disease in rats]. *Patol Fiziol Eksp Ter*. 1982 May-Jun;(3):78-80. Russian. PMID: 7122145.
9. Sarkisov DS, Perov YL. [Microscopic technique. A guide for doctors and laboratory technicians]. Moscow: Medicine; 1996. 544 p. Russian.
10. Pekny M, Pekna M. Astrocyte reactivity and reactive astrogliosis: costs and benefits. *Physiol Rev*. 2014 Oct;94(4):1077-98. doi: 10.1152/physrev.00041.2013. PMID: 25287860.
11. Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol*. 2010 Jan;119(1):7-35. doi: 10.1007/s00401-009-0619-8. PMID: 20012068.

Тертишний С.І. Ультраструктурні зміни астроглії при постреанімаційній енцефалопатії в експерименті.

Реферат. В експерименті на тваринах при моделюванні клінічної смерті вивчені ультраструктурні зміни астроглії в динаміці постреанімаційного періоду (ПРП). Показано, що в головному мозку після перенесеної клінічної смерті розвиваються деструктивні, адаптивні, репаративні та проліферативні зміни астроглії, що мають певну динаміку протягом ПРП. У ранньому ПРП, поряд з руйнуванням частини гліоцитів, посилюються адаптивні зміни збережених астроцитів, спрямовані на метаболічно-транспортну підтримку частково пошкоджених нейронів і підтримання гідро-іонного балансу центральної нервової системи. У периваскулярних вогнищах селективно-нейрональних некрозів активуються фагоцитарні функції астроцитів. У віддаленому ПРП активується проліферація астроцитів з подальшим розвитком замінюючого астроцитарного глиозу і глиофіброзу.

Ключові слова: постреанімаційна енцефалопатія, експеримент на тваринах, ультраструктура, астроглія.