

В.А. Туманский, А.В. Евсеев, Ю.Ф. Полковников

Апоптоз и селективный некроз нейронов ЦНС после клинической смерти и церебральной ишемии: молекулярные механизмы и морфологические особенности

Запорожский государственный медицинский университет

Ключові слова: апоптоз і некроз нейронів ЦНС, імуногістохімічні і морфологічні ознаки, постреанімаційний і постішемічний період

Ключевые слова: апоптоз и некроз нейронов ЦНС, иммуногистохимические и морфологические признаки, постреанимационный и постишемический период

Key words: apoptosis and necrosis of brain neurons, immunohistochemical and morphological features, prestresuscitation and postischemic period

В роботі наведені основні концепції морфогенезу і молекулярні шляхи патогенно індукваного апоптозу і некрозу нейронів; висвітлена експресія імуногістохімічних маркерів (p53, BCL-x, Вах, CD95-Fas), мікроскопічні і електронномікроскопічні характеристики апоптозу і некрозу нейронів ЦНС після клінічної смерті і церебральної ішемії.

В работе приведены основные концепции морфогенеза и молекулярные пути патогенно индуцированного апоптоза и некроза нейронов; освещена экспрессия иммуногистохимических маркеров (p53, BCL-x, Вах, CD95-Fas), микроскопические и электронномикроскопические характеристики апоптоза и некроза нейронов ЦНС после клинической смерти и церебральной ишемии.

The research includes the major conceptions of morphogenesis and molecular pathways of the neuronal pathogenic induced apoptosis and necrosis; immunohistochemical markers expression (p53, Bcl-X, Вах, CD95/Fas), microscopic and electronic-microscopic characteristics of brain neuronal apoptosis and necrosis after clinical death and brain ischemia are reported.

В обычных условиях жизнедеятельность нейронов ЦНС поддерживается кооперативными молекулярными взаимодействиями с астроцитами и олигодендроцитами, которые поддерживают определенный баланс ионов, трофогенных и ростовых факторов в межклеточном матриксе, а также метаболизм продуктов деградации нейромедиаторов, высвобождающихся в процессе синаптической передачи. Нейроны обладают молекулярными механизмами ответа на экзогенные и эндогенные повреждающие факторы, в реализации этих защитных механизмов важную роль играют специализированные глиальные клетки, мигрирующие к поврежденным нейронам. В плазматических мембранах глиальных клеток имеется широкий ассортимент потенциалзависимых натриевых и кальциевых каналов, хлорных каналов, ионных помп для транспорта натрия, калия, бикарбоната и протонов, а также рецепторов к ростовым факторам, нейротрофинам и всем нейромедиаторам (ГАМК, глутамату, глицину, норадреналину, ацетилхолину) [1]. В последние годы интенсивно изучаются молекулярные пути, которые активируются при повреждении нейронов и обеспечивают выживание или гибель клетки. При летальном критическом повреждении после исчерпания или искажения всех защитных молекулярно-клеточных механизмов в нейроне активируются сложные молекулярные системы, реализующие его гибель апоптозом или некрозом [4].

Апоптоз при критическом повреждении является точно рассчитанным, контролируемым генами способом быстрой досрочной самоликвидации поврежденной клетки путем каскадной активации эндонуклеаз и каспаз, а

также дезинтеграции ее остатков макрофагами, в то время как некроз - это преждевременная гибель нейрона, исчерпавшего все программы борьбы за выживание, которая реализуется кальпаинами, сериновыми протеазами и лизосомальными ферментами (гидролазами и катепсинами) [19]. В головном мозге некроз нейрона также завершается фагоцитозом продуктов клеточного распада.

Регуляция апоптоза осуществляется преимущественно белками семейства Bcl-2, которые разделяют на два класса: тормозящие апоптоз (Bcl-2, bcl-xl Bcl-w, Bfl-1, Brag-1, Mcl-1, A-1) и индуцирующие этот процесс (Вах, Вак, Вок). Все белки этого семейства в соответствии с наличием функциональных Bcl-2 гомологичных доменов (ВН1, ВН2, ВН3, ВН4) составляют три субсемейства. Антиапоптотические белки Bcl-2, Bcl-X_L и Mcl-1 содержат все четыре (ВН1-4) функциональных домена; они имеют общий принцип локализации в мембранах митохондрий, эндоплазматической сети и кариолеммы ядра. Проапоптотические белки Вах, Вак, Вок (а также Mtd) содержат три функциональных домена (ВН1, ВН2 и ВН3); белки Vad, Bik, Blk, Hrk, Bcl-Xs, Vim, Bid, Puma и Noxa содержат только ВН3 функциональный домен, они являются антагонистами протеинов выживания клеток [9, 34]. Соотношение белков Bcl-2 агонистов и антагонистов апоптоза определяет способность нейронов и других клеток положительно отвечать на внешние и внутренние апоптотические сигналы [26].

Каспазы, играющие важную роль в апоптозе, представляют собой семейство цистеиновых протеаз, специфически расщепляющих поврежденные белки после аспарагинового остатка. На основании структуры и функциональных аспектов каспазы делятся на 2 группы: инициаторные каспазы (каспазы-2, -8, -9, и -10), имеющие продомен для инициации каскадной активации других каспаз, и эффекторные каспазы (каспазы-3, -6, and -7), способные после активации разрушать клеточные субстраты [28]. Субстратами каспазы-3 являются белки цитоскелета (гельзолин, ламинин, G-актин, фодрин), ДНК-репарировочные ферменты и молекулы-регуляторы клеточного цикла, а также протеинкиназы. Каспаза-3 также расщепляет специфический ингибитор каспазо-активируемой ДНКазы – CAD, после чего эндонуклеазы (ДНКазы I, ДНКазы II) рассекают ядерную ДНК на мелкие межнуклеосомальные фрагменты [52].

Лизосомальные катепсинами (аспартил-катепсин D и цистеин-катепсины B, H и L) активируются при кислом значении pH и вызывают неспецифическое

расщепление белков при двух типах гибели нейронов – некрозе и апоптозе [22].

Кальпаины представляют собой семейство нейтральных кальций-активируемых цистеиновых протеаз, которые в отличие от кислых протеаз лизосом, находятся в цитозоле, кариоплазме, рибосомах и митохондриях. Различают 2 изоформы кальпаинов: м-кальпаин (кальпаин I) и т-кальпаин (кальпаин II), которые *in vitro* активируются микро- или миллимолярными концентрациями ионов кальция (соответственно). В клетке обычно поддерживается баланс протеаз и их ингибиторов: молекулы кальпаинов связываются кальпаистаминами [10]. Субстратами кальпаинов 1 и 2 являются белки цитоскелета (альфа- и бета-спектрины, нейрофиламенты), мембранные рецепторы к трофическим факторам и G-протеины, сигнал-передающие ферменты, протеин-киназа Ц, многие кальмодулин-зависимые ферменты, кальциевая помпа плазмолеммы, кальцинейрин и нейронная синтаза оксида азота (nNOS). В обычных условиях кальпаины модифицируют эти клеточные протеины, опасность для клетки представляет нерегулируемая активация кальпаинов [52]. При локальной и транзитной глобальной ишемии мозга активированные кальпаины разрушают в нейронах такие протеины как спектрин, фодрин, Ca²⁺-АТФаза, протеин киназу Ц, ядерный фактор каппа Б (NF-κB), а также протеины NMDA-рецепторов (N-метил-D-аспартат-рецепторов), каинатных рецепторов и аминокислот-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазол-пропионатных (AMPA)-рецепторов [47].

Альтернативная концепция селективной гибели клеток апоптозом или некрозом основана на молекулярно-иммуноцитохимических и биохимических исследованиях маркеров апоптоза в гомогенатах ткани и не отражает классические патоморфологические проявления гибели специализированных клеток органов, которые еще в XIX-XX столетиях описали R. Virchow (1859-1871), W. Flemming (1885), J. Cohnheim (1887), C. Weigert (1887-1890), F. Nissl (1896-1899), F. Recklinghausen (1910), R. Cajal (1909-1911), W. Spielmeier (1922), Л.И. Смирнов (1935), П.Е. Снесарев (1946-1949), А.П. Авцын (1967-1969). Адекватная интерпретация определяемого уровня молекулярно-иммуноцитохимических маркеров требует также учета особенностей гистоархитектоники органов: высокий уровень маркеров апоптоза в гомогенате печени, в которой доминирующей популяцией специализированных клеток являются гепатоциты, с высокой вероятностью свидетельствует о развитии апоптоза именно этих клеток; в то время как высокий уровень таких же маркеров в гомогенате ткани головного мозга, в котором количество глиальных клеток на порядок выше, чем нейронов, требует патогистологической и иммуногистохимической верификации. Поэтому в последние годы интенсивно изучаются дифференциальные морфологические различия патогенно индуцированного апоптоза и селективного некроза специализированных клеток, необходимые для адекватной патоморфологической оценки состояния жизненно важных органов у больных.

Цель исследования. Изучить молекулярно-иммуногистохимические и микроскопические проявления апоптоза и селективного некроза нейронов ЦНС после перенесенной клинической смерти и при неполной це-

ребральной ишемии.

Материал и методы. Апоптоз и селективный некроз изучен в стволе, коре больших полушарий и мозжечка головного мозга у 15 умерших больных через 30 минут – 3 суток после перенесенной клинической смерти; у 15 кошек через 5 минут – 24 часа после экспериментальной клинической смерти, а также у 19 белых крыс при неполной церебральной ишемии после перевязки левой общей сонной артерии. Эксперименты и декапитация животных проводились под внутрибрюшинным наркозом тиопенталом натрия.

Клиническая смерть длительностью 6 минут моделировалась у беспородных домашних кошек массой 2-4 кг разработанным нами [5] методом контролируемой компрессии грудной клетки. Декапитация экспериментальных кошек проводилась под внутрибрюшинным наркозом тиопенталом натрия через 5, 60 минут, 3, 12, 24 часа после клинической смерти (по 3 кошки в каждой группе исследований), декапитация экспериментальных крыс проводилась через 30 минут, 1, 6, 12 часов, 1, 3 суток от начала эксперимента. Кусочки исследуемых отделов мозга экспериментальных животных иссекались для световой и электронной микроскопии.

Для световой микроскопии секционный и экспериментальный материал фиксировали в забуференном 10% формалине и заливали в парафин. На прецезионном ротационном микротоме HM 3600 («MICROM Laborgerdte GmbH» - Германия) изготавливали серийные срезы толщиной 3-5 м, которые помещали на обычные предметные стекла (для стандартного окрашивания гематоксилином и эозином) или на адгезивные предметные стекла фирмы «DAKO» - Дания (для иммуногистохимических исследований).

В головном мозге умерших после клинической смерти больных иммунопероксидазным методом изучена экспрессия p53, bcl-x, Вах, CD95/Fas с использованием системы визуализации DAKO CSA.

Для электронной микроскопии кусочки мозга экспериментальных кошек и крыс фиксировали в 2,5% глутаральдегиде на 0,1М фосфатном буфере, после промывания дофиксировали в 1% OsO₄, обезвоживали в спиртах восходящей концентрации и заливали в аралдит. Ультратонкие срезы контрастировали цитратом свинца по E. Reynolds и изучали в электронном микроскопе ПЭМ-100.

У экспериментальных крыс методами электронной цитохимии изучена активность магний-активируемой аденозинтрифосфатазы (Mg²⁺+АТФ-азы) в ядрах нейронов по M. Wachstein-E. Meisel (1957), а также распределение в нейронах рибонуклеопротеидов (РНП) после их регрессированного контрастирования по Bernhard модифицированным нами методом [8].

Результаты исследования и их обсуждение.

В первые 60 минут-24 часа постреанимационного периода у умерших больных и выживших кошек, а также у крыс при неполной церебральной ишемии гистологическими, электронномикроскопическими и иммуногистохимическими методиками в головном мозге обнаруживаются нейроны с ишемическими и апоптотическими изменениями разной степени выраженности. Патологически измененные нейроны мозаично распределены в нервной ткани, они чередуются со структурно

сохранными клетками, но чаще наблюдаются в зонах невосстановленной гемомикроциркуляции и в зонах ишемической полутени.

Основными инициаторами развития патогенно индуцированного апоптоза нейронов ЦНС после перенесенной клинической смерти и неполной церебральной ишемии являются тяжелые постишемически-реперфузионные повреждения митохондрий, плазматической мембраны и эндоплазматической сети; активация внутренних сигнальных путей, чувствительных к избытку свободных радикалов, ионов кальция (Ca^{2+}) и водородных ионов (H^+), дефицит трофических факторов и избыток глутамата а межклеточном секторе, а также взаимодействие апоптогенных растворимых цитокинов и лигандов микроглиоцитов с трансмембранными рецепторами апоптоза плазмолеммы нейрона [38].

В патогенезе апоптоза нейронов выделяется 2 главных пути: «внутренние пути» и рецептор-опосредованные «внешние пути» апоптоза. После перенесенной клинической смерти и церебральной ишемии во время ишемически-реперфузионных повреждений в первую очередь активируются «внутренние пути» апоптоза нейронов из-за тяжелого повреждения митохондрий; а также из-за молекулярных повреждений эндоплазматической сети и плазмолеммы, приводящих к возрастанию в цитозоле нейрона уровня Ca^{2+} , высвобождающегося из эндоплазматической сети или в избытке проникающего через поврежденную плазмолемму. Кроме этого, белок p53 в нейронах может активировать цитоплазматический домен Fas-рецептора [30], а также индуцировать другие проапоптотические белки (в частности, Вах) и опосредовано запускать апоптоз, связанный с дисфункцией митохондрий в синапсах ЦНС [17].

Цитоплазматические белки Bcl-2 и Вах являются модуляторами апоптоза, в норме способствующими синтезу в межмембранном пространстве митохондрий цитохрома Ц, который транспортирует электроны между III и IV митохондриальным комплексом, и флавопротеина AIF (апоптоз-индуцирующего фактора). При ишемии мозга цитохром Ц может мигрировать в цитозоль и активировать каспазы, а AIF может транслоцироваться в цитозоль и индуцировать апоптоз нейрона [39, 41, 51]. Большинство зрелых нейронов содержит неопределяемо низкий уровень Bcl-2 и более значительный уровень Bcl-x. Сверхэкспрессия Bcl-2 в цитоплазме нейронов ингибирует каспазный каскад и способствует выживанию поврежденных клеток [42].

В большинстве клеток Вах находится в цитозоле в виде мономера, при апоптотических воздействиях он интегрируется в митохондриальные мембраны, олигомеризуется, формирует крупные молекулярные агрегаты и вызывает повышение проницаемости мембран митохондрий. Активация Вах или Вах является триггером митохондриальной дисфункции, вызывающей апоптоз [35].

Активацию внутреннего «митохондриального» пути при реперфузии после ишемии мозга запускает транслокация Вах из цитозоля в митохондрии, во время которой отмечается повышенная экспрессия одновременно Вах и Bcl-2 в цитоплазме нейрона [21]. Конкурентное взаимодействие Вах с Bcl-2, Вах и Ваd в митохондриальной мембране инициирует открытие трансмембранных пор и высвобождение цитохрома Ц из митохондрий в цито-

золь. Цитохром Ц связывается с активирующим протеазы апоптотическим фактором-1 (Araf-1: apoptotic protease activating factor-1) и дАТФ, привлекает прокаспазу-9, формируя молекулярный комплекс, названный апоптосомой (см. схему 1, цв. вкладка 1). Активация в апоптосоме инициаторной каспазы-9 вызывает активацию эффекторных каспаз. Каспазы -8 и -9 активируют каспазу-3, расщепляющую ключевые компоненты цитоскелета и ферменты. Вдобавок, каспаза-8 расщепляет протеин Bid, который в такой форме приобретает способность к транслокации в митохондрии и дополнительно индуцирует высвобождение цитохрома Ц в цитозоль. Из митохондрий в цитозоль также высвобождаются другие апоптотические факторы - апоптоз-индуцирующий фактор (AIF), Smac/Diablo (Smac - второй митохондриальный активатор каспаз; Diablo – фактор, прямо связывающий ингибиторы апоптоза протеины с низким pI), которые активируют эффекторные каспазы или инактивируют эндогенный ингибитор каспаз XIAP (см. схему 1, цв. вкладка 1) [21]. Маркерами повреждения и высокой проницаемости митохондриальных мембран для высвобождающихся апоптотических молекул является значительная экспрессия в цитоплазме нейронов проапоптотических белков Вах, Вах, Ваd, Вим, Вох, Ноха, PUMA [34].

Внутренний путь апоптоза нейронов при ишемии-гипоксии может также инициироваться экспрессией рецептор-взаимодействующего белка Rip (Rip – receptor-interacting protein), активирующего каспазу-1, которая в свою очередь участвует в образовании проапоптотических tBid фрагментов, способствующих освобождению из митохондрий таких апоптотических факторов, как цитохром Ц, Smac/Diablo и AIF [53].

Апоптоз может индуцировать дисфункция эндоплазматической сети, которая играет важнейшую роль в процессах синтеза, модификации (процессинга), свертывания (фолдинга) и адресного высвобождения синтезированных протеинов, а также в регуляции внутриклеточного баланса ионов кальция. Известно 5 молекулярных путей индукции апоптоза, возникающих при дисфункции эндоплазматической сети (см. схему 1, цв. вкладка 1): кальциевый путь апоптоза; апоптоз, связанный с ген-p53 опосредованным синтезом проапоптотических протеинов PUMA и NOXA (вторично активирующих митохондриальный апоптотический Araf-1-путь); P53-независимый и Araf-1-независимый СНОР-путь активации эффекторной каспазы 12; путь активации каспазы 12 из-за Вах/Вах дисфункции в самой эндоплазматической сети [29, 32], а также нарушение процессинга и фолдинга протеинов в эндоплазматической сети [37] (в схеме не отражено).

Эндоплазматическая сеть влияет на уровень кальция в цитозоле через рианодиновые и инозитол-трифосфатные канал-рецепторы, которые выпускают кальций из эндоплазматической сети в цитозоль, а также через свои кальциевые помпы, возвращающие ионы кальция против высокого концентрационного градиента из цитозоля обратно в эндоплазматическую сеть с помощью АТФ-азы саркоплазматической/эндоплазматической сети (SERCA) [37]. В цитозоле нейрона ионы кальция связываются прежде всего с кальций-сенсорным белком кальмодулином, во вторую очередь – с кальбиндином, парвальбумином и кальретинином, которые в совокупности выполняют роль своеобразного внутриклеточно-

го кальциевого буфера [44].

Дисфункция кальций-связывающего шаперона кальнексина эндоплазматической сети и ее инозитол-трифосфатных и рианодиновых канал-рецепторов может приводить к избыточному освобождению ионов кальция из эндоплазматической сети в цитозоль; избыток Ca^{2+} формирует активный комплекс Ca^{2+} -кальмодулин, взаимодействующий с протеинкиназами, которые активируют каспазу 3 и запускают апоптоз клетки [37] (см. схему 1, цв. вкладка 1). Стресс эндоплазматической сети может опосредованно (через повышение транскрипции гена p53) инициировать синтез в цитоплазме проапоптотических протеинов PUMA и NOXA, которые вторично вызывают освобождение из митохондрий цитохрома C и Араф-1-зависимую активацию эффекторных каспаз [27] (см. схему 1, цв. вкладка 1). Дислокация Bax/Bak в мембранах самой эндоплазматической сети может напрямую активировать эффекторную каспазу 12 (см. схему 1, цв. вкладка 1). Стресс эндоплазматической сети может через ядро клетки инициировать p53-независимый синтез С/ЕВР-гомологичного протеина (СНОР), напрямую активирующего эффекторную каспазу 12 (см. схему 1, цв. вкладка 1).

Нарушение процессинга и фолдинга (сворачивания) протеинов в эндоплазматической сети, проявляющееся накоплением в ней несвернутых протеинов и нарушением их деградации в протеасомах, а также нарушение нормального паркинга вновь синтезированных протеинов в цитоплазме, приводящее к апоптозу нейронов, имеет место при нейродегенеративных заболеваниях [31,37].

Многочисленные исследования показали, что при ишемии и реперфузии мозга могут также активироваться рецептор-опосредованные «внешние пути» апоптоза. Семейство трансмембранных рецепторов апоптоза плазмолеммы нейрона включает Fas/CD95/Apo-1, TNF/R1, TNF/R2, DR3/TRAMP/Wsl-1, TRAIL-R1/DR4, TRAIL-R2/DR5/Killer/TRICK2, TRAIL-R3/DcR1/TRID, TRAIL-R4/DcR2/TRUNDD, DcR3, DR1, DR6, p75NTR. «Внешняя» активация Fas/CD95, TNF/R1, TRAIL/R1, TRAIL/R2 и DR1 рецепторов нейрона растворимыми цитокинами (TNF- β , интерлейкинами-1, -6) и лигандами активированных микроглиоцитов при реперфузии мозга после ишемии запускает несколько внутриклеточных молекулярных путей реализации апоптоза [15]. Ишемия мозга индуцирует транслокацию FasL и Fas в микродомены липидного бислоя плазмолеммы, где Fas ассоциируется с адаптерными белками FADD (Fas-ассоциированный домен смерти) или с TRADD (домен смерти, ассоциированный с опухоленекротическим рецептором TNF/R), с каспазой-8, с каспаз-8-ингибирующим протеином FLIP или с FLIP(L) - длинной формой клеточного FLIP, формируя смерть-индуцирующий сигнальный комплекс (DISC) (см. схему 1, цв. вкладка 1). Формирование сигнальной платформы DISC быстро активирует инициирующую каспазу-8 и эффекторную каспазу-3, вызывая апоптоз нейрона [18, 33].

Кроме этого, активация трансмембранных Fas/CD95 рецепторов нейронов при ишемии мозга индуцирует JNK-путь апоптоза (путь c-Jun-N-terminal киназы) с активацией эффекторной каспазы-3 [10] (см. схему 1, цв. вкладка 1).

В первые 60 минут – 24 часа после клинической смерти в отдельных мозаично распределенных в голоавном мозге нервных клетках иммуногистохимическими методиками выявляется экспрессия Fas/CD95: в одних нейронах

экспрессия Fas/CD95 выражена в плазматической мембране, в других нейронах – в цитоплазме нервных клеток (рис. 1,2, цв. вкладка 1). Возрастание экспрессии Fas кортикальными нейронами и астроцитами в интервале времени от 15 минут до 72 часов после травмы мозга отмечена также другими исследователями [11]. Астроциты, несмотря на значительный уровень экспрессии Fas, резистентны к спонтанному и Fas-индуцированному апоптозу [25].

В первые часы неполной церебральной ишемии и постреанимационного периода начальные ишемические изменения нейронов проявляются неравномерным вакуолоподобным набуханием митохондрий, набуханием дендритов и аксонных терминалей аксо-дендритных синапсов, а также редукцией синаптических пузырьков. В некоторых нейронах отмечается набухание цитозоля и кариоплазмы, в других нейронах – наоборот, конденсация и уплотнение цитозоля клетки, а также кариоплазмы ядра. Ишемически измененные нейроны окружаются расширенными астроцитарными отростками или мигрировавшими к ним и тесно прилежащими астроцитами и олигодендроцитами.

По данным электронной микроскопии наиболее ранним ультраструктурным проявлением апоптоза нейрона является уплотнение кариоплазмы в ядре с сохранным ядрышком и агрегация хроматина в крупные конгломераты у кариолеммы, образующей почковидные выпячивания в цитоплазму с набухшими митохондриями и сохранными другими органеллами (рис. 3).

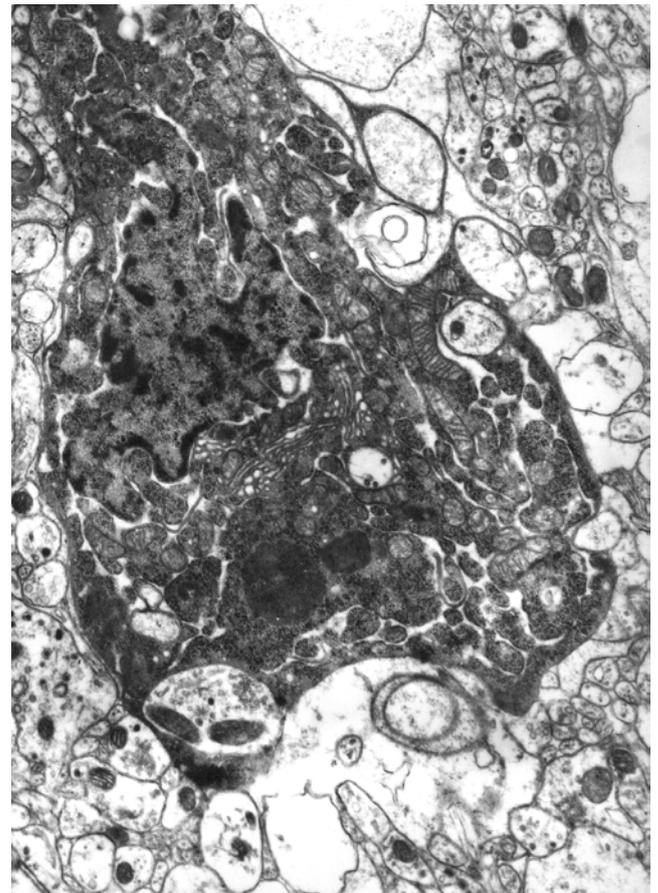


Рис. 3 Ультраструктура кортикального нейрона при апоптозе через сутки после клинической смерти. Ув. x 12000

По данным электронно-цитохимических исследований в крупном ядрышке сохраняются рибонуклеопротеиновые гранулы, в кариоплазме увеличивается количество плотных перихроматиновых гранул и исчезают фибриллярные РНП (рис. 4, 5), при краевой агрегации хроматина в нем сохраняется активность Mg²⁺-АТФ-азы, что в совокупности свидетельствует о снижении сохраненного ядерно-цитоплазматического транспорта РНК и биосинтеза апоптоз-ассоциированных белков в гранулярной эндоплазматической сети. При световой микроскопии в апоптотически измененном нейроне при сохранном ядрышке наблюдается конденсация хроматина ядра и его маргинация у кариолеммы, пикноз ядра с гофрированными контурами, эозинофилия цитоплазмы и уменьшение клетки с расширенным и просветленным перинейрональным пространством.

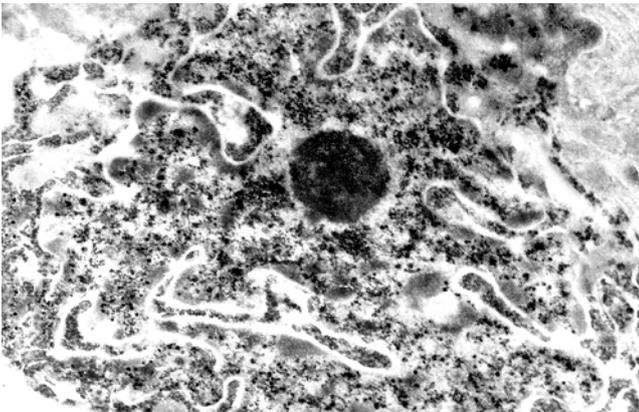


Рис. 4 Ультрацитохимия РНП в кортикальном нейроне при апоптозе через сутки церебральной ишемии. Регрессивное контрастирование по Bernhard-Шаврину-Полковникову. Ув. x 14000.

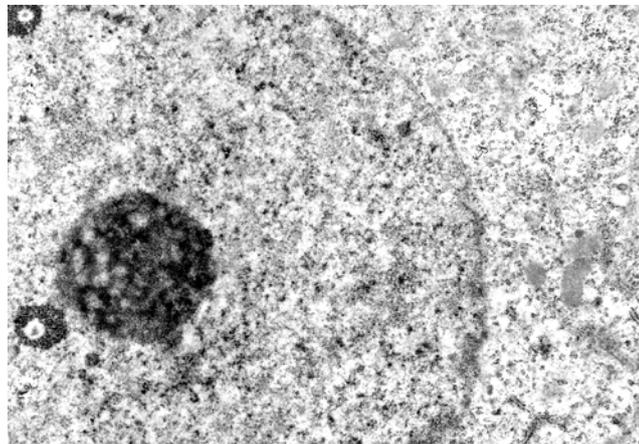


Рис. 5 Ультрацитохимия РНП в кортикальном нейроне в норме. Регрессивное контрастирование по Bernhard-Шаврину-Полковникову. Ув. x 16000.

В первые часы неполной церебральной ишемии и реперфузии мозга после перенесенной клинической смерти возможна также эксайтотоксическая селективная гибель части нейронов коры больших полушарий, гиппокампа и мозжечка, в которых осуществляется возбуждающая синаптическая передача глутаматом через инотропные глутаматные N-метил-Д-аспарат (NMDA)-рецепторы с участием каинатных рецепторов и аминоксидогидрокси-5-

метил-4-изоксазол-пропионатных (AMPA)-рецепторов. Эксайтотоксическую селективную гибель глутамат-чувствительных нейронов объясняют активацией в них кальциевых и свободнорадикальных механизмов деструкции. Результатом ишемии является быстрая потеря нейронами высокоэнергетических фосфатов и общая деполяризация, которая стимулирует высвобождение глутамата и открытие вольтаж-зависимых и глутамат-регулируемых кальциевых каналов в глутамат-чувствительных нейронах. При реперфузии после ишемии головного мозга избыток глутамата в межклеточном пространстве промотирует эксайтотоксичность через активацию NMDA-рецепторов в постсинаптических нейронах, в которых активируется n-изоформа синтазы оксида азота (nNOS: n-neuronal), избыточный синтез оксида азота, а также генерация пероксинитрита (ONOO⁻) и супероксидного аниона (O₂⁻), вызывающих гибель нейронов [23]. К токсичному воздействию оксида азота при глутаматной эксайтотоксичности, обусловленной ишемией мозга, чувствительны пять процентов кортикальных нейронов, которые экспрессируют конститутивную n-изоформу синтазы оксида азота (nNOS), некоторые нейроны гиппокампа, в которых обнаруживается коэкспрессия эндотелиальной изоформы синтазы оксида азота (eNOS), а также гранулярные нейроны мозжечка, которые экспрессируют три изоформы синтазы оксида азота: конститутивную nNOS, индуцибельную iNOS и эндотелиальную eNOS [12]. Одновременно при реперфузии мозга после ишемии, при высоком уровне глутамата и низком уровне внеклеточного Na⁺, AMPA-рецепторы постсинаптических нейронов непрямым путем содействуют проникновению в их цитозоль кальция, который запускает кальциевые механизмы апоптоза [24,31].

В течение 1-3-х суток постреанимационного периода в головном мозге экспериментальных кошек и умерших больных обнаруживается мозаично распределенный апоптоз нейронов, а тяжелые ишемические повреждения нейронов прогрессируют в карио-цитолитический и коагуляционный некроз нервных клеток. Во всех отделах головного мозга в однотипных клеточных популяциях обнаруживаются частично поврежденные и апоптотически измененные нервные клетки, а также нейроны, погибающие путем карио-цитолитического и коагуляционного некроза (рис. 6, 7, цв. вкладка 2). В этом периоде иммуногистохимическими методиками выявляется ярко выраженная экспрессия маркеров гибели в одних нейронах и маркеров выживания – в других нейронах. Сверхэкспрессия Вах в цитоплазме кортикальных нейронов в наших исследованиях обнаружена в зонах невосстановившегося кровотока через 1,5 суток после перенесенной клинической смерти при отсутствии экспрессии Вах в рядом расположенных глиальных клетках (рис. 8, цв. вкладка 2). Сверхэкспрессия Вах в цитоплазме нейрона считается предвестником его гибели, хотя апоптоз может быть заблокирован одновременной сверхэкспрессией Bcl-x в цитоплазме нейрона [42]. У больных, умерших через 2-3 суток после перенесенной клинической смерти, экспрессия Bcl-x обнаруживается в цитоплазме одиночных выживших грушевидных нейронов коры мозжечка (на фоне на фоне гибели большинства соседних нейронов) (рис. 9, цв. вкладка 2).

При развитии карио-цитолитического в ранней фазе отмеча-

ется набухание ядра и цитоплазмы нейрона, значительная вакуолизация митохондрий, резкое расширение полостей гранулярной и гладкой эндоплазматической сети, деструкция аксо-дендритных и аксо-соматических синапсов. Далее следует разрушение ядрышка, ядерного хроматина и опустошение ядра (кариолизис); параллельно расщепляются и исчезают рибонуклеопротеиды цитозоля, отмечается лизис органелл и компонентов цитоскелета, набухшая цитоплазма нейрона опустошается (рис. 10).

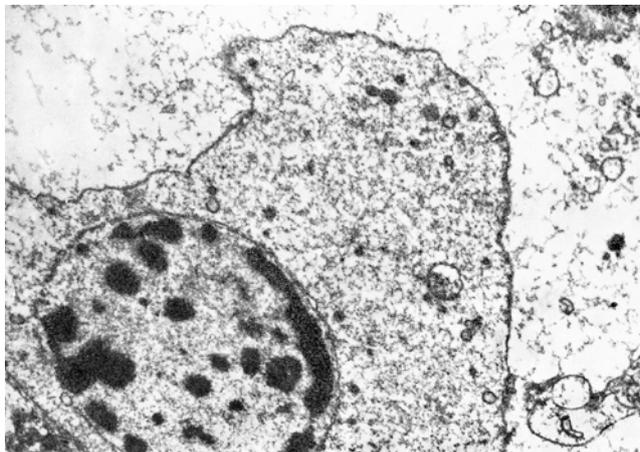


Рис. 10 Ультраструктура кортикального нейрона при кариоцитоллизисе. Ув. x 14000.

При световой микроскопии погибший путем кариоцитоллизиса нейрон выглядит как бледная бесструктурная «клеточная тень» с расплывчатыми контурами ядерной и плазматической мембраны.

Развитие некроза клетки с биохимических позиций отличается снижением окислительного фосфорилирования в митохондриях, выработка активных форм кислорода, а также не-каспазный протеолитический каскад, включающий сериновые протеазы, кальпаины или катепсины [19]. Истощение энергетических ресурсов клетки после ишемии приводит к повышению концентрации ионов кальция в цитозоле, проникающих через поврежденные ионные насосы и открытые деполяризационные и нейротрансмиттерные каналы [54].

Повышение концентрации ионов кальция в цитозоле приводит к активации м-кальпаинов, кальцинейрина и фосфолипаз, а также к проникновению кальция из цитозоля в митохондрии, блокированию дыхательной цепи и синтеза энергии. Избыточное поступление кальция из цитозоля ишемически поврежденного нейрона в митохондрии вызывает освобождение флавопротеина AIF (апоптоз-индуцирующего фактора), который может транслоцироваться в ядро и вызвать крупноузловую фрагментацию ДНК, т.е. может стать митохондриальным фактором каспаз-независимого некроза нейрона [51]. Активированные м-кальпаины разрушают цитоскелет клетки. После активации кальпаинов в цитоплазме освобождаются катепсины-киллеры, которые нарушают целостность мембран лизосом и способствуют миграции в цитоплазму нейрона лизосомальных гидролаз. В раннем периоде реперфузии активированные фосфолипазы высвобождают из мембран свободные жирные кислоты, в том числе - арахидоновую. Оксидантный метаболизм производных арахидоновой кислоты вызывает взрыв ге-

нерации радикалов кислорода, оксида азота (NO), пероксинитритов, а также избыточную пероксидацию липидов – таким образом разрушаются органеллы и плазмолемма нейронов [47,54].

В течение первых 3 суток постаноксически-реперфузионных повреждений головного мозга очень сложно дифференцировать апоптоз и коагуляционно-ишемический некроз нейронов из-за сходных микроскопических и ультраструктурных характеристик этих двух разновидностей гибели клеток. В этом периоде во всех уплотненных нейронах определяется кариопикноз с глыбчатой конденсацией и маргинацией хроматина, набухание митохондрий с значительной редукцией крист, расширение вакуолей комплекса Гольджи и цистерн гранулярной эндоплазматической сети, утративших прикрепленные рибосомы. В цитоплазме уплотненных нейронов повышена осмиофилия нуклеопротеидов и дезинтегрированных рибосом; повышена электронная плотность белков цитозоля, аксоплазмы и дендроплазмы; обнаруживается разрушение аксо-дендритных и аксо-соматических синапсов. Уплотненный и уменьшенный нейрон окружается умеренно расширенными отростками астроцитов и макрофагов.

При световой микроскопии определяется гиперхромное остаточное клеточное тело - уменьшенная клетка с гиперхромным пикнотичным ядром и плотной, бесструктурной, эозинфильной цитоплазмой, лишенной базофильных глыбок вещества Ниссля (полисом и цистерн гранулярной эндоплазматической сети); в цитоплазме обычно отсутствуют остатки фрагментированного ядра – так называемые «ядерные апоптозные тельца». Гиперхромное и уменьшенное остаточное клеточное тело окружено расширенным «перинейрональным пространством», представляющим собой расширенные отростки астроцитов и отростки макрофагов, плотно окружающие нейрон, лишенный аксо-соматических синапсов. Такие структурные изменения могут быть одной из микроскопически улавливаемых фаз апоптоза нейрона накануне его дезинтеграции каспазами, а могут быть также проявлениями коагуляционного ишемического некроза нервной клетки.

Как показали проведенные нами электронномикроскопические и ультрацитохимические исследования, в начале развития ишемического коагуляционного некроза нейрона наблюдается набухание митохондрий, локальная коагуляция и гиперосмиофилия протеинов мембран микротрубочек, крист митохондрий и цистерн эндоплазматической сети. Хроматин ядра конденсируется в плотные глыбки (рис. 11) с увеличением в кариоплазме количества плотных перихроматиновых гранул (рис. 12), после чего следует уплотнение агрегированного хроматина с отсутствием в нем активности Mg²⁺-АТФ-азной активности, что свидетельствует о резко сниженном ядерно-цитоплазматическом транспорте РНК. В течение суток происходит распад РНП ядрышка и его дезинтеграция, рибосомы отделяются от цистерн гранулярной эндоплазматической сети, значительно расширяются цистерны кариотеки и эндоплазматической сети, что в совокупности означает прекращение процессов биосинтеза в погибающем нейроне. Эти ультраструктурно-цитохимические признаки развивающегося некроза клетки отличают его от апоптоза. Дифференциальным морфологическим признаком патогенно индуцированного апоп-

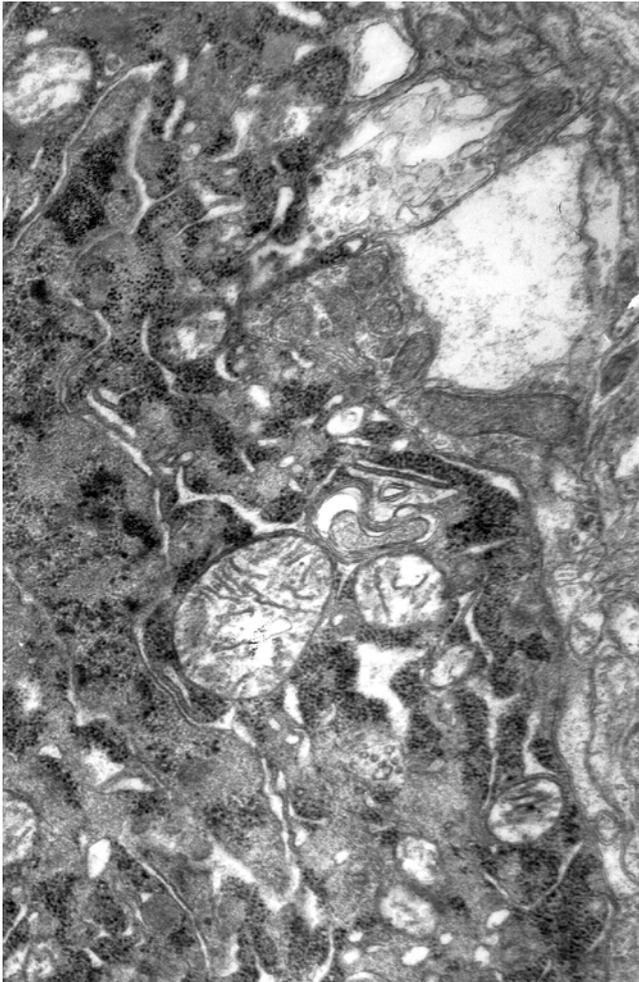


Рис. 11 Ультраструктура кортикального нейрона при ишемическом коагуляционном некрозе. Ув. x 18000.

тоза нейрона в этом периоде реперфузионных повреждений головного мозга является сохранность ядрышка в пикнотизированном ядре с гофрированными контурами, в то время как при коагуляционном некрозе наблюдается глубокий пикноз ядра, не содержащего ядрышка.

Предполагается, что при ишемическом повреждении инициирующим моментом развития коагуляционного некроза клетки является блокада внутриклеточного управляемого протеолиза, обычно осуществляемого нейтральными протеиназами – кальпаинами, которая возникает из-за ранней их денатурации в момент резкого возрастания в цитозоле уровня ионов кальция, в избытке поступающего из эндоплазматической сети по причине нарушения функции кальций-связывающего шаперона кальнексина, а также кальретикулина эндоплазматической сети и ее инозитол-трифосфатных и рианодиновых канал-рецепторов выпуска кальция [46]. Наступающая вслед за этим необратимая денатурация структурированных белков цитозоля завершается их коагуляцией в стойкие, трудно расщепляемые соединения [4]. При коагуляционном некрозе не отмечается ультрацитохимических признаков активации гидролаз лизосом (возможно из-за конформационных нарушений лизосомальных мембран, исключающих освобождение гидролаз).

Ишемически поврежденные нейроны выживают бла-

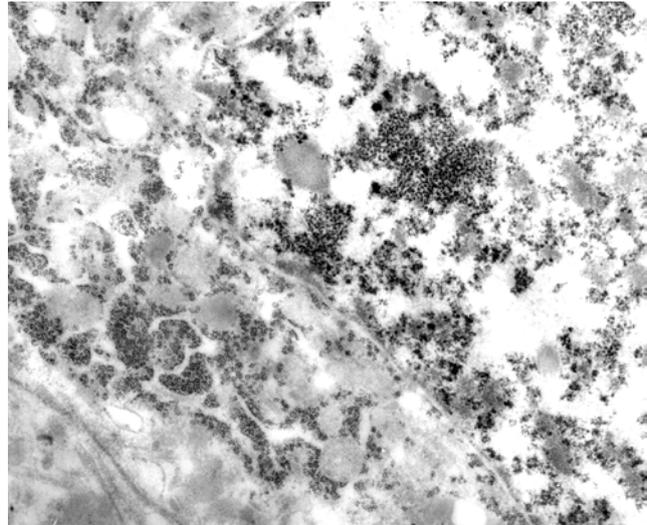


Рис. 12 Ультрацитохимия РНП в кортикальном нейроне при ишемическом некрозе через сутки церебральной ишемии. Регрессивное контрастирование по Bernhard–Шаврину–Полковникову. Ув. x 16000

годаря трофической поддержке мигрирующих к ним глиальных клеток, при этом при микроскопии наблюдается феномен перинеурального глиальноклеточного сателлитоза. Среди глиальных клеток, окружающих поврежденные нейроны, доминируют астроциты и олигодендроциты, могут обнаруживаться одиночные микроглиоциты (рис. 13, цв. вкладка 2). Через 3 суток после перенесенной клинической смерти значительная экспрессия маркера выживания Bcl-x обнаруживается в глиальных клетках-сателлитах, расположенных рядом с хромолитически измененными нейронами (рис. 14, цв. вкладка 2). Роль перинеуральных сателлитов-олигодендроцитов при ишемии мозга пока не ясна. Астроциты синтезируют и освобождают фактор роста нервов (NGF), глиальноклеточный нейротрофный фактор (GDNF), инсулиноподобный фактор роста (IGF-1), цилиарный нейротрофный фактор (CNTF), фактор роста фибробластов (FGF-2) нейротрофин NT-3 [48,49]. Полагают, что при ишемии мозга глиальноклеточный нейротрофический фактор астроцитов (GDNF) через рецепторы (GFRalpha-1 и c-Ret) снижают NMDA-индуцированный приток кальция, активируют митоген-активирующую протеин-киназу (MAP-kinase) и предотвращают эксайтоксическую гибель нейронов [36]. Фактор роста нервов (NGF) астроцитов, как и другие нейротрофины, через аффинные NGF-рецепторы и Trk-A,-B,-C рецепторы активируют митоген-активирующую протеин-киназу и фосфатидилинозитол-3-киназу ишемически поврежденных нейронов, и таким образом, играет центральную роль в реализации путей выживания нейронов при ишемии мозга [43].

Нерешенные и спорные аспекты селективной гибели нейронов.

В широко распространенных концептуальных схемах морфологических отличий апоптоза и некроза клетки постулируется, что в феномене некроза клетки важную роль играет повреждение плазматической мембраны, мембран митохондрий, эндоплазматической сети и лизосом. Некроз клетки не требует синтеза новых протеинов,

в условиях дефицита энергии происходит расщепление мембранно-цитоплазматических белков и липопротеидов активированными кальпайнами, а также лизосомальными катепсинами и гидролазами, пассивно мигрирующими в цитоплазму вследствие спонтанного повышения проницаемости мембран лизосом. При микроскопии отмечается кариолизис, лизис органелл и компонентов цитоскелета клетки, опустошение цитоплазмы и формирование бесструктурной «клеточной тени».

Сформулирована также унифицированная «кальпайн-катепсиновая» гипотеза, в которой выделяется три ключевых момента деструкции нейрона путем некроза. Во-первых, непосредственное или косвенное возрастание концентрации внутриклеточного кальция в ответ на множественные иницирующие некроз повреждения. Во-вторых, активация кальцием кальпайнов, которые вызывают локальные повреждения лизосомальных мембран. В-третьих, активация в цитозоле катепсинов-киллеров, которые разрушают клетку, нарушая целостность мембран лизосом. Активированные кальпайны, а также лизосомальные гидролазы могут инициировать блокаду генерации энергии в митохондриях. Этот несметный каскад событий быстро приводит нейрон к смерти путем некроза [50].

В последние годы специалисты-биологи и биохимики, далекие от морфологической диагностики, выделяют 2 типа апоптоза: I «классический» тип апоптоза, реализуемый каспазами, и II тип апоптоза, при котором активируются альтернативные «не каспазные» механизмы клеточной гибели [40]. При этом подчеркивается, что апоптотические сигналы могут параллельно активировать в нейроне каспаз-зависимые молекулярные пути апоптоза и каспаз-независимые механизмы его некроза. К числу важнейших каспаз-независимых триггеров гибели нейронов относят утрату митохондриями цитохрома Ц. Освобождение из митохондрий цитохрома Ц, кроме активации апоптотического каспазного каскада в цитозоле клетки, может вести к разрушению электронного потока в митохондриях и снижать производство АТФ, а также вызывать генерацию свободных радикалов в этих органеллах. В конечном счете, после утраты цитохрома Ц, митохондрии необратимо деполяризуются в процессе каспаз-зависимой или каспаз-независимой гибели нейронов. Также было показано, что каспаз-независимая гибель нейронов связана не с функциональным истощением митохондрий, а с аутофагическим разрушением митохондрий, которые утратили цитохром Ц [56].

Последние исследования показали, что некоторые деструктивные механизмы патогномичны и для апоптоза и для некроза нейронов. Таким внутренними триггерами гибели нейронов либо некрозом, либо апоптозом являются избыток в цитозоле клетки (Ca^{2+}), свободных ионов водорода (H^+), а также молекул свободных радикалов при оксидантном стрессе [38], а также утрата цитохрома Ц митохондриями. Важнейшее значение для гибели клетки имеет повышение уровня в ее цитозоле свободных ионов кальция.

Взаимодействие внешнего апоптотического сигнала с трансмембранным рецептором гибели клетки активирует каспазу 3 и апоптоз, а также одновременно инициирует два молекулярных пути некроза: деградацию белков цитоскелета и протеинов плазмолеммы, повышающих

проницаемость плазматической мембраны для ионов Ca^{2+} ; кроме этого - также частичную инактивацию кальпастатинов и вторичное повышение активности кальпайнов. Таким образом, клетка может погибать либо некрозом либо апоптозом [10, 52].

Такие радикалы как супероксид O_2^{*-} , перекись водорода (H_2O_2), гидроксильный ион $(*)OH$ образуются различными оксидазами в процессе физиологического метаболизма и кратковременно появляются в цитозоле, плазматической мембране, митохондриях, лизосомах и пероксисомах. Однако в норме они очень быстро инактивируются антиоксидантными ферментами в цитозоле, супероксиддисмутазой - в митохондриях, каталазой и глутатионпероксидазой - в пероксисомах. При оксидантном стрессе происходит избыточная генерация и освобождение из митохондрий свободных радикалов, таких как супероксид O_2^{*-} , пероксид водорода (H_2O_2), гидроксил-радикал $(*)OH$, оксид азота (NO) и пероксинитрит ($ONOO^-$), которые необратимо повреждают клеточные липиды, белки и нуклеиновые кислоты [10, 31]. Оксидантная модификация белков усиливает их деградацию нейтральными протеиназами и вызывает протеолиз цитозоля клетки [16]. Перекись водорода в низких дозах (10 - 100 мкмоль) индуцирует клеточный апоптоз, в больших дозах она вызывает некроз клетки [13]. При накоплении липоперекисей отмечается усиленное образование гидрофильных пор в мембранах лизосом и выход кислых гидролаз, расщепляющих белки, липопротеиды, рибонуклеопротеиды цитоплазмы и ядра - развивается некроз клетки. Избыток NO^* блокирует в митохондриях транспорт электронов и ингибирует аконитазу в цикле трикарбоновых кислот с полным прекращением окисления глюкозы. В результате в клетке возникает летальная биоэнергетическая недостаточность, инициирующая апоптоз или некроз клетки [45].

В последние годы выяснилось, что избыток свободно-радикальных молекул в цитозоле автоматически активирует аутофагию и появление в клетке аутофагосом, в которых разрушаются поврежденные органеллы [14]. Появление аутофагосом в ишемически поврежденных нейронах, по нашему мнению [2, 3, 7], предупреждает развитие некроза клетки, секвестрируя зоны свободно-радикальной деструкции клетки.

Нет однозначности в вопросе роли низкого рН цитозоля, который, при ишемии мозга, по мнению одних исследователей, вызывает повышение проницаемости лизосомальных мембран и высвобождение лизосомальных ферментов, реализующих некроз клетки, а по мнению других исследователей - наоборот, индуцирует митохондриальный путь апоптоза нейронов. Дефицит кислорода и глюкозы при ишемии вызывает повышение протонного градиента вдоль внутренней митохондриальной мембраны, что ведет к падению митохондриального мембранного потенциала и повышает проницаемость мембран митохондрий для цитохрома Ц. Освобождающийся в цитозоль цитохром Ц связывается с Araf-1 и прокаспазой 9, формирует апотосому и далее активирует каспазу 3 [24]. Подтверждено, что внутриклеточный ацидоз вызывает апоптоз культивируемых нейронов [20]. Возможна и другая ситуация: ацидоз активирует ионные каналы, чувствительные к высокой концентрации ионов водорода (ASIC-acid sensing ion channels) и повышает их проница-

емость для ионов Ca^{2+} , после чего запускаются кальциевые механизмы некроза, не зависящие от глутаматных механизмов эксайтоксичности [55].

В дифференциальных различиях апоптоза и некроза клетки задекларированы различия в уровнях энергообеспечения гибнущих клеток. При апоптозе клетки в физиологических условиях, в отличие от энергетически кризисного некроза, генами самоликвидирующейся клетки запрограммированы по крайней мере два энергоёмких этапа. На раннем этапе самоликвидации клетки при сохранном ядрышке, митохондриях и биосинтетических органеллах в ее цитоплазме происходит синтез РНК и апоптоз-специфических белков-хемоаттрактантов для будущего фагоцитоза фрагментов обреченной клетки; в эффекторной фазе апоптоза поддерживается энергоёмкая работа протонных помп лизосомальных мембран, предотвращающая активацию лизосомальных кислых протеаз и гидролаз и их утечку в цитозоль поэтапно дезинтегрируемой клетки. Как показали проведенные нами электронномикроскопические исследования, в постишемически-реперфузионном периоде и патогенно индуцированный апоптоз и некроз нейронов «стартует» на фоне ишемического набухания митохондрий с повреждением их крист и начавшемся процессе активации лизосомальной аутофагии, которая, по нашему мнению, является ранней фазой восстановления ишемически поврежденных нейронов [6,7]. Поэтому изменения ультраструктуры митохондрий и лизосом не могут быть ранними дифференциальными признаками постишемически-реперфузионного апоптоза и некроза нейронов.

Таким образом, проведенные исследования показали, что иммуногистохимические исследования экспрессии проапоптотических и антиапоптотических маркеров в головном мозге больных в постреанимационном периоде дает возможность прогнозировать лишь вероятность гибели или выживания нейронов, но не определяют конкретный тип клеточной гибели: апоптоз, карио-цитолитический или коагуляционный некроз. Поэтому для уточнения типа гибели нейронов и прогнозирования выживания частично поврежденных нейронов, обеспечиваемого перинеурональными глиоцитами-сателлитами, необходимы параллельные патогистологические и электронномикроскопические исследования. Необходимо отметить, что селективная гибель нейронов ЦНС апоптозом и некрозом в постреанимационном периоде, несмотря на арефлексию и комагозное состояние больных, не приводит к изменениям формы, размеров и массы головного мозга, регистрируемым при патологоанатомическом вскрытии умерших.

Выводы.

1. В головном мозге умерших в раннем постреанимационном периоде больных экспрессируются маркеры активации «внутренних» и «внешних» путей инициации апоптоза нейронов ствола, коры мозжечка больших полушарий мозга.

2. Определяемая иммуногистохимическими методиками экспрессия в нейронах Вах, CD95/Fas свидетельствует лишь о молекулярной инициации и возможности развития патогенно индуцированного апоптоза нейронов, в то время как гистологические и электронномикроскопические методики выявляют селективную гибель нейронов ЦНС путем апоптоза, цитокариолизиса и коагуляционно-

го некроза у умерших больных и экспериментальных животных при неполной ишемии мозга и при гемореперфузии мозга после перенесенной клинической смерти.

3. Патогенно индуцированный апоптоз и селективный некроз нейронов в стволе, коре больших полушарий и мозжечка головного мозга после перенесенной клинической смерти характеризуется мозаичным распределением в нервной ткани и максимальной выраженностью в зонах невосстановившейся церебральной гемомикроциркуляции.

4. До настоящего времени не разработаны доказательные иммуногистохимические, микроскопические и ультраструктурные дифференциальные различия апоптоза и коагуляционного некроза нейронов.

Литература.

1. *Николлс Дж., Роберт М., Брюс В., Фукс П.* От нейрона к мозгу. - М.: Едиториал УРСС, 2003. - 672 с.
2. *Туманский В.А.* Особенности восстановительных процессов в головном мозге при постреанимационной энцефалопатии // В кн: Методологические, теоретические и методические аспекты современной нейроморфологии. - М., 1987. - С.148-149.
3. *Туманский В.А.* Постреанимационные энцефалопатии: морфогенез репаративных и адаптивных изменений в мозге // Запорожский медицинский журнал. - 2002. - №3. - С.12-13.
4. *Туманский В.А.* Селективная гибель специализированных клеток // Патология, 2005. -Т.2, - № 1, с. 10-18.
5. *Туманский В.О., Евсеев А.В.* Патент на корисну модель № 27721 UA МПК (2006) G01N1/00, G01N21/00 Спосіб моделювання клінічної смерті. Опубл. 12.11.2007, Бюл. № 18.
6. *Tumansky V.A., Shavrin V.A.* Morphogenesis of destructive, adaptive, reparative neuronal and glial changes in the dynamics of postresuscitation encephalopathy // Constituent Congress International Society for Pathophysiology (Moscow, 1991) / Abstracts. - Moskow. 1991. - P.335.
7. *Tumansky V., Shavrin V., Polkovnikov Yu., Gremitsky A.* Postresuscitative encephalopathy: molecular-ultrastructural analysis of the reversible ischemic injuries and reparative changes of neurons // In: XVI European Congress of Pathology / Pathology Research and Practice. 1997. Vol.193. No. 5-6, p.366.
8. *Шаврин В.А., Полковников Ю.Ф.* Применение галаскорбина в качестве фиксатора гистологического материала для световой и электронной микроскопии // Арх. патологии. 1985, т.47, вып.3, стр.73-76.
9. *Adams J.M., Cory S.* The Bcl-2 Protein Family: Arbiters of Cell Survival // *Science*, 1998. Vol. 281? № 5381, p.1322-1326.
10. *Artal-Sanz M., Tavernarakis N.* Proteolytic mechanisms in necrotic cell death and neurodegeneration // *Proteins and Peptides*. 2005. Vol.579, Iss.15, p.3287-3896.
11. *Beer R., Franz G., Schupf M.et al.* Expression of Fas and Fas ligand after experimental traumatic brain injury in the rat // *J Cereb Blood Flow Metab.*, 2000. Vol.20, No4, p.669-677.
12. *Boje K.M.* Neurotoxic Mechanisms of Nitric Oxide. - In: *Neuroinflammation. Mechanisms and Management*. 2nd Edition. Ed. by: P. L. Wood © Humana Press Inc., Totowa, N.J, 2003. p.117-135.
13. *Buttke T.M., Sandstrom P.A.* Oxidative stress as a mediator of apoptosis // *Immunol. Today*, 1994. Vol. 15, No.1, p. 7 - 10.
14. *Chen Y., Gibson S.B.* Is mitochondrial generation of reactive oxygen species a trigger for autophagy? // *Autophagy*. 2008, Vol.4, No.2, p.246-248.
15. *Chulhee Choi, Joo Young Park, Jeonggi Lee et al.* Fas ligand and Fas are expressed constitutively in human astrocytes and the expression increases with IL-1, IL, TNF-6, or IFN-γ // *The Journal of Immunology*, 1999. Vol.162, p.1889-1895.
16. *Cotran R. S., Kumar V., Robbins S. L.* Pathologic Basis of Disease. - 5th Ed., - Philadelphia: W. B. Saunders Comp., 1994. - 1400 p.

17. *Culmsee C., Mattson M.P.* p53 in neuronal apoptosis // *Biochem Biophys Res Commun.*, 2005. Vol.331, No.3, p.761-772.
18. *Davis A.R., Lotocki G., Marcillo A.E. et al.* FasL, Fas, and death-inducing signaling complex (DISC) proteins are recruited to membrane rafts after spinal cord injury // *J Neurotrauma*, 2007. Vol.24, No.5, p.823-34.
19. *Denecker G., Vercammen D., Declercq W., Vandenaabeele P.* Apoptotic and necrotic cell death induced by death domain receptors // *Cell Mol. Life Sci.*, 2001. Vol.58. No.3, p.356-370.
20. *Ding D., Moskowitz S.I., Li R. Et al.* Acidosis induces necrosis and apoptosis of cultured hippocampal neurons // *Exp. Neurol.*, 2000. Vol. 162, No.1, p.123-127.
21. *Ferrer I., Friguls B., Dalfo E. et al.* Caspase-dependent and caspase-independent signalling of apoptosis in the penumbra following middle cerebral artery occlusion in the adult rat // *Neuropathol Appl Neurobiol.*, 2003. Vol.29, No.5, p.472-481.
22. *Ferri K.F., Kroemer G.* Organelle-specific initiation of cell death pathways // *Nat. Cell Biol.*, 2001. Vol. 3, p. E255-E263.
23. *Gursoy-Ozdemir Y., Bolay H., Saribas O., Dalkara T.* Role of endothelial nitric oxide generation and peroxynitrite formation in reperfusion injury after focal cerebral ischemia // *Stroke*, 2000. Vol.31, p.1974-1980.
24. *Gwag B.J., Won S.J., Kim D.Y.* Excitotoxicity, Oxidative Stress, and Apoptosis in Ischemic Neuronal Death. – In: *New concepts in cerebral ischemia / Ed. Rick C. S. Lin.* London - New York - Washington: CRC PRESS. 2002, p. 88-121.
25. *Jin H. Song, Bellail A., Margaret C. L. Tse et al.* Human astrocytes are resistant to Fas ligand and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis // *The Journal of Neuroscience.* – 2006. – P.5572-05.
26. *Kroemer G.* The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. // *Nature Medicine*, 1997. Vol.3, p.614-620.
27. *Li J., Lee B., Lee A.S.* Endoplasmic Reticulum Stress-induced Apoptosis. Multiple pathways and activation of p53-up-regulated modulator of apoptosis (PUMA) and NOXA by p53 // *J. Biol. Chem.*, 2006, Vol. 281, Iss. 11, p.7260-7270.
28. *Los M., Wesselborg S., Schulze-Osthoff K.* The role of caspases in development, immunity, and apoptotic signal transduction: lessons from knockout mice // *Immunity*, 1999. Vol. 10, p. 629-639.
29. *Marks A.M.* Intracellular calcium-release channels: regulators of cell life and death // *Am J Physiol.*, 1997. Vol.272, p.597-605.
30. *Martin L.J., Chen K., Zhiping L.* Adult motor neuron apoptosis is mediated by nitric oxide and Fas death receptor linked by DNA damage and p53 activation // *The Journal of Neuroscience*, 2005. Vol.25, No. 27, p.6449-6459.
31. *Mattson M.P.* Apoptosis in neurodegenerative disorders // *Nature Reviews Molecular Cell Biology.*, 2000, Vol.1, p.120-130.
32. *Mattson M.P., LaFerla F.M., Chan S.L et al.* Calcium signaling in the ER: its role in neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci.* 2000, Vol. 23, p.222-229.
33. *Miguel F. Segura, Carme Sole, Marta Pascual et al.* The long form of Fas apoptotic inhibitory Molecule Is Expressed Specifically in Neurons and Protects Them against Death Receptor-Triggered Apoptosis // *The Journal of Neuroscience.* 2007. Vol.27, No. 42, p.11228-11241.
34. *Morrison R. S., Kinoshita Y., Johnson M.D. et al.* Neuronal survival and cell death signaling pathways. - In: *Molecular and Cellular Biology of Neuroprotection in the CNS.* Ed. by Christian Alzheimer. -New York: 2002 Kluwer Academic / Plenum Publishers. p.42-86.
35. *Nechushtan A., Smith C.L., Lamensdorf I. et al.* Bax and Bak coalesce into novel mitochondria-associated clusters during apoptosis // *J Cell Biol.*, 2001, Vol.153, p.1265-1267.
36. *Nicole O., Ali C., Dacagne F., Plawinski L. et al.* Neuroprotection mediated by glial cell line-derived neurotrophic factor: involvement of a reduction of NMDA-induced calcium influx by the mitogen-activated protein kinase pathway // *J. Neurosci.*, 2001. Vol.21, No. 9, p.3024-3033.
37. *Pashen W.* The organelles II: endoplasmic reticulum and its overload. Endoplasmic reticulum dysfunction in various brain disorders. – In: *Brain Damage and Repair.* Eds. T. Herdegen and J.M Delgado-Garcia - Kluwer Academic Publishers. 2004. p.111-121.
38. *Pettmann B, Henderson CE.* Neuronal cell death // *Neuron* 1998, Vol.20, No.4, p.633-647.
39. *Plesnila N.* Role of mitochondrial proteins for neuronal cell death after focal cerebral ischemia // *Acta Neurochir Suppl.*, 2004. Vol.89, p.15-19.
40. *Prehn J.H.M., Kogel D.* The self-destruction of neurons physiological and pathophysiological decisions for the functional integrity. – In: *Brain Damage and Repair.* Eds.T. Herdegen and J.M Delgado-Garcia; Kluwer Academic Publishers. -2004 p.79-93.
41. *Prunell G.F., Troy C.M.* Balancing neuronal death // *J Neurosci Res.*, 2004. Vol.78, No.1, p.1-6.
42. *Rubin L.L.* Neuronal cell death: when, why and how // *British Medical Bulletin.*, 1997. Vol.53, -No.3, p.617-631.
43. *Saito A., Tominaga T., Chan P.H.* Neuroprotective role of neurotrophins: relationship between nerve growth factor and apoptotic cell survival pathway after cerebral ischemia // *Curr Atheroscler Rep.*, 2005. Vol.7, No.4, p.268-273.
44. *Sayer R.J.* Intracellular Ca²⁺ handling. - In: *Molecular and Cellular Biology of Neuroprotection in the CNS.* Ed. by Christian Alzheimer. - New York: Kluwer Academic / Plenum Publishers. 2002, – p.183-196.
45. *Sen S.* Programmed cell death: concept, mechanism and control // *Biol. Revs. Cambridge. Phil. Soc.*, 1992. Vol. 67, No.3, p. 287 – 319.
46. *Sharp A.H, McPherson P.S, Dawson T.M. et al.* Differential immunohistochemical localization of inositol 1,4,5-trisphosphate- and ryanodine-sensitive Ca release channels in rat brain // *J Neurosci.*, 1993. Vol.13, p.3051-3063.
47. *Shiels P., Davies R.W.* Ageing and the death of neurones. – In: *Molecular Biology of the Neuron (Second edition).* Ed. by Davies R.W., Morris B.J. -New York: Oxford University Press. – 2004. - p. 435-465.
48. *Simi A., Tsakiri N., Wang P., Rothwell N.J.* Interleukin-1 and inflammatory neurodegeneration // *Biochem. Soc. Trans.* 2007. Vol.35, p.1122-1126.
49. *Simons M.,Trajkovic K.* Neuron-glia communication in the control of oligodendrocyte function and myelin biogenesis // *J. of Cell Science.* 2006, Vol.119, p.4381-4389.
50. *Syntichaki P., Tavernarakis N.* Death by necrosis. Uncontrollable catastrophe, or is there order behind the chaos? // *EMBO reports.*, 2002. Vol.3, No.7, p. 604-609.
51. *Stefanis L.* Caspase-dependent and -independent neuronal death: two distinct pathways to neuronal injury // *The Neuroscientist*, 2005. Vol.11, No.1, p.50-62.
52. *Wang K. K.W.* Calpain and Caspase in Ischemic and Traumatic Brain Injury. – In: *New concepts in cerebral ischemia / Ed. Lin R.C.S.* CRC Press LLC. – 2002., p.190-209.
53. *Wen-Hua Zhang, Xin Wang, Malini Narayanan, et al.* Fundamental role of the Rip2/caspase-1 pathway in hypoxia and ischemia-induced neuronal cell death // *PNAS.* 2003. Vol.100, No.26, p.16012-16017.
54. *White B.C., Sullivan J.M., DeGracia D.J. et al.* Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury // *J. Neurological Sciences.* 2000. Vol.1, No 1, p. 1-33.
55. *Xiong Z.G. et al.* Neuroprotection in ischemia: blocking calcium-permeable acid-sensing ion channels // *Cell.*, 2004. Vol.118, p. 687-698.
56. *Xue L., Fletcher G.C., Tolkovsky A.M.* Mitochondria are selectively eliminated from eukaryotic cells after blockade of caspases during apoptosis // *Curr Biol.*, 2001. Vol.11, p.361-365.