

**МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ  
КРИМСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
ім. С.І. ГЕОРГІЄВСЬКОГО**

**ЄВСЄВ АНТОН ВОЛОДИМИРОВИЧ**

УДК 616-036.882-08-036.8-06:611.018.82-091.8

**МОРФОГЕНЕЗ СЕЛЕКТИВНОЇ ЗАГИБЕЛІ ТА ВІДНОВЛЕННЯ  
НЕЙРОНІВ ГОЛОВНОГО МОЗКУ ПРИ ПОСТРЕАНІМАЦІЙНІЙ  
ЕНЦЕФАЛОПАТІЇ**

14.03.02 – патологічна анатомія

**АВТОРЕФЕРАТ**  
дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата медичних наук

**Сімферополь – 2009**

Дисертацією є рукопис.

Роботу виконано в Запорізькому державному медичному університеті МОЗ України.

**Науковий керівник:**

доктор медичних наук, професор **Туманський Валерій Олексійович**, Запорізький державний медичний університет МОЗ України, завідувач кафедри патологічної анатомії та судової медицини з основами права.

**Офіційні опоненти:**

- доктор медичних наук, професор **Загорулько Олександр Кімович**, Кримський державний медичний університет ім. С.І. Георгієвського МОЗ України, завідувач кафедри патологічної анатомії;

- доктор медичних наук, професор **Шлопов Валерій Геннадійович**, Донецький національний медичний університет ім. М. Горького МОЗ України, завідувач відділу патоморфології ЦНДЛ.

Захист дисертації відбудеться « 20 »  травня  2009 р. о  12  годині, на засіданні вченої ради Д 52.600.02 при Кримському державному медичному університеті ім. С.І. Георгієвського (95006, м. Сімферополь, б. Леніна, 5/7).

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Кримського державного медичного університету ім. С.І. Георгієвського (95006, м. Сімферополь, б. Леніна, 5/7).

Автореферат розісланий « 14 »  квітня  2009 р.

Вчений секретар  
спеціалізованої вченої ради

Г.О. Мороз

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** Збереження життя хворого після перенесеної клінічної смерті (КС) залежить, насамперед, від відновлення функцій центральної нервової системи (ЦНС), яке обумовлюється співвідношенням незворотно ушкоджених нейронів, що гинуть, і частково ушкоджених нейронів, що відновлюються в постреанімаційному періоді (ПРП) (В.А. Туманский, Ю.Ф. Полковников, С.И. Тертышный зі співавт., 1996). Припинення системного і мозкового кровотоку під час КС викликає значні зміни в нейронах ЦНС, найбільш чутливих до ішемії й нестачі кисню, а відновлення системної гемодинаміки після серцево-легеневої реанімації супроводжується неповним відновленням церебрально-капілярної гемомікроциркуляції та новими постішемично-реперфузійними ушкодженнями нейронів головного мозку, які завершуються або їх апоптозом і некрозом, або їх структурно-функціональним відновленням. У літературі є поодинокі відомості щодо морфогенезу і морфологічних особливостей селективної загибелі нейронів у ПРП (Н.К. Пермяков, А.В. Хучуа, В.А. Туманский, 1986; V. Tumansky, S. Tertyshny, A. Alekseeva, S. Timoshenko, 1996), яка визначає незворотність коматозного стану хворого, а також щодо молекулярно-морфологічних особливостей виживання нейронів і їх відношень із гліальними клітинами в динаміці ПРП (В.А. Туманский, С.И. Тертышный, А.В. Гремицкий зі співавт., 1997; В.А. Туманский, В.А. Визир, С.И. Тертышный зі співавт., 1994), які можна використовувати для патологоанатомічної оцінки тяжкості перебігу постреанімаційної енцефалопатії (ПРЕ) і танатогенезу, а також для розробки основ ефективної превентивної патогенетичної терапії незворотних ушкоджень ЦНС при постреанімаційній хворобі (ПРХ).

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертаційна робота є фрагментом науково-дослідної роботи Запорізького державного медичного університету: «Нові технології ранньої діагностики онкологічних, нейро-ендокринних, серцево-судинних, цереброваскулярних, аутоімунних і інфекційних захворювань», 2006-2010 рр. (№ державної реєстрації 0106U003709).

### **Мета і завдання дослідження:**

Обґрунтування ультраструктурно-молекулярних особливостей морфогенезу селективної загибелі і відновлення нейронів головного мозку в динаміці ПРП для використання в патологоанатомічній діагностиці.

Для досягнення поставленої мети були сформульовані наступні завдання:

1. Вивчити молекулярні механізми, терміни розвитку і структурні особливості апоптозу нейронів головного мозку у померлих хворих на ПРЕ.
2. Вивчити морфогенез, терміни розвитку і структурні особливості ішемичного ушкодження й селективного некрозу нейронів головного мозку при ПРЕ у хворих і експериментальних кішок.
3. Вивчити структурні порушення в нервовій тканині при невідновленні в ПРП капілярної гемомікроциркуляції та їх наслідки.

4. Вивчити морфогенез і структурні особливості ретроградних змін/дегенерації нейронів головного мозку в ПРП у хворих і експериментальних кішок.

5. Вивчити структурні особливості відновлення ушкоджених нейронів і нейроно-гліальних відношень при ПРЕ у хворих і експериментальних кішок

6. Виділити основні мікроскопічні прояви селективної загибелі нейронів головного мозку і їх наслідки для патологоанатомічної оцінки дефіциту нейронів у померлих хворих на ПРЕ.

*Об'єкт дослідження:* морфогенез селективної загибелі і відновлення нейронів головного мозку.

*Предмет дослідження:* патоморфологічні прояви ішемічних змін, селективного некрозу, апоптозу та ретроградної дегенерації нейронів головного мозку, а також особливості відновлення частково ушкоджених нейронів і нейроно-гліальні відношення при ПРЕ.

*Методи дослідження:* патогістологічні, імуногістохімічні (ІГХ), електронно-мікроскопічні та комп'ютерно-морфометричні дослідження тканини головного мозку, статистичний аналіз отриманих результатів.

**Наукова новизна одержаних результатів.** На підставі комплексного патогістологічного, електронно-мікроскопічного, ІГХ і морфометричного дослідження встановлено, що з перших хвилин після КС у нейронах розвиваються ішемічні ушкодження, субмікроскопічними проявами яких є значне вакуолеподібне набрякання мітохондрій з руйнуванням крист, руйнування органел аксо-дендритних синапсів з редукцією синаптичних везикул, а також ішемічне ущільнення або набрякання цитозолу та каріоплазми нервових клітин. Вперше доведено, що основними морфогенетичними типами селективної загибелі нервових клітин головного мозку в ПРП, що обумовлюють коматозний стан хворих, крім каріоцитолізу та коагуляційного некрозу нейронів, є також апоптоз і ретроградне руйнування нейронів, що розвиваються внаслідок постішемічно-реперфузійних і ексайтотоксичних ушкоджень та стійкого невідновлення кровообігу в капілярах головного мозку.

Методами електронної мікроскопії і ІГХ вперше встановлено, що в ПРП внаслідок нестачі енергії активовані внутрішні (Вах) мітохондріальні фактори і внутрішньоклітинні домени мембранних Fas-АРО-рецепторів стимулюють апоптоз нейронів; реалізації апоптозу протидіє експресія антиапоптотичних молекул Bcl-X<sub>L</sub> нейронами та гліальними клітинами. Показано, що патогенно-індукований апоптоз нейронів кори півкуль мозку, мозочка, гіпокампа і стовбура головного мозку максимально виражений протягом першого тижня після КС.

Вперше встановлено, що ретроградне руйнування нейрона в ПРП може починатися з повної ішемічної деструкції органел і мієлінової оболонки аксона або з його руйнування у вогнищі перикапілярного некрозу. У подальшому, при відсутності перинеуронального астроцитарно-олігодендрогліального сателітозу, у цитоплазмі нейрона розвивається «хроматоліз», що переходить в ареактивний каріоцитолізис нервової клітини.

Показано, що при стійкому невідновленні церебро-капілярного кровотоку виникають дрібні вогнища перикапілярного некрозу нейронів, аксонів, дендритів і відростків гліоцитів з наступним фагоцитозом зруйнованих структур макрофагами і мікрогліоцитами та формуванням дрібних вогнищ астроцитарного гліофіброзу.

У роботі вперше встановлено, що прогностичними ознаками можливого відновлення ішемічно ушкоджених нейронів у ранньому ПРП є розвиток адаптивного перинеуронального астроцитарно-олігодендрогліального сателітозу з експресією гліоцитами антиапоптотичних молекул і збільшенням спеціалізованих гліо-нейронних контактів. При відновленні в ішемічно ушкоджених нейронах активується лізосомальний аутофагоцитоз зруйнованих компонентів цитоплазми і репарація мітохондріальної ДНК з наступним збільшенням числа мітохондрій, рибосом і ультраструктур ендоплазматичної сітки (ЕПС).

Разом з науковим керівником розроблений і запатентований новий спосіб моделювання КС і ПРХ шляхом контрольованої й оборотної компресії грудної клітини у кішок з високими показниками успішної реанімації і загальної виживаності експериментальних тварин.

**Практичне значення одержаних результатів.** У роботі вперше чітко визначені мікроскопічні прояви селективної загибелі нейронів головного мозку і їх наслідки для патологоанатомічної оцінки дефіциту нейронів у померлих хворих. Вперше отримані нові дані про морфологічні відмінності патогенно-індукованого апоптозу, селективного некрозу і ретроградного руйнування нейронів у динаміці ПРХ. Доведено, що патогенно індукований апоптоз мікроскопічно проявляється ущільненням і маргінацією ядерного хроматину, каріопікнозом зі збереженням великого ядерця, ущільненням і зменшенням цитоплазми з набряклими мітохондріями і збереженими іншими органелами, каріорексисом на гіперхромні «ядерні апоптотичні тільця», а також фрагментацією загиблих клітин і фагоцитозом цих фрагментів макрофагами. Диференціальними морфологічними ознаками коагуляційного некрозу нервової клітини є значне набрякання мітохондрій, рання коагуляція хроматину, руйнування ядерця і каріопікноз, ущільнення цитозолу зі значним розширенням цистерн ЕПС і зменшення клітини, оточеної відростками макрофагів і астроцитів. Встановлено, що при каріоцитолізісі в нейроні руйнуються мітохондрії та інші цитоплазматичні органели, а також ядро і хроматин ядра; при світловій мікроскопії відзначається набрякання і спустошення каріоплазми і цитоплазми нейрона, формування «клітинної тіні». Ретроградні зміни нейронів діагностуються за наявності сегментів зруйнованих мієлінізованих аксонів у білій речовині та нейропіді, а також округлених нейронів із центральним або тотальним хроматолізом без перинеуронального сателітозу; проявом ретроградного руйнування нейронів є ареактивний каріоцитолізіс округлених хроматолітично змінених клітин з каріопікнозом. Апоптоз і селективний некроз нейронів мозочка, гіпокампа, стовбура і кори головного мозку найбільш виражений з 1 по 5–8 добу ПРП, ретроградне руйнування кортикальних і стовбурних нейронів проявляється через 2 тижні – 2 і більше місяців

після КС.

На місці загиблих нейронів залишаються клітинні «випадіння», порушується нормальна нейронна цитоархітектоніка мозочка, кори і стовбура головного мозку. Селективна загибель нейронів ЦНС у ПРП, незважаючи на арефлексію і коматозний стан хворих, не призводить до змін форми, розмірів і маси головного мозку, що рееструються при патологоанатомічному розтині померлих.

Проведені ІГХ і електронно-мікроскопічні дослідження показали, що експресія проапоптотичних і антиапоптотичних маркерів у головному мозку хворих у ПРП дає можливість прогнозувати лише ймовірність апоптозу або виживання нейронів, але не визначає тип клітинної загибелі: апоптоз, каріоцитолізіс, коагуляційний некроз або ретроградне руйнування. Для уточнення поширеності і типу загибелі нейронів, а також тенденції до виживання частково ушкоджених нейронів, яка забезпечується перинеурональними гліоцитами-сателітами, необхідні паралельні патогістологічні і електронно-мікроскопічні дослідження.

Результати дослідження з позитивним діагностичним ефектом впроваджені в практичну роботу Запорізького, Дніпропетровського та Чернівецького обласних патологоанатомічних бюро та патологоанатомічного відділення Херсонської обласної клінічної лікарні. Матеріали дисертації використовуються в навчальному процесі на кафедрі патологічної анатомії і судової медицини з основами права та на кафедрі патологічної фізіології Запорізького державного медичного університету, а також на кафедрах патоморфології Харківського національного медичного університету, Донецького національного медичного університету ім. М. Горького та Луганського державного медичного університету.

**Особистий внесок дисертанта.** Дисертаційна робота є самостійно виконаним дослідженням автора, науковим керівником визначені тема й складена програма дослідження. Дисертант особисто виконав патентно-інформаційний пошук і проаналізував літературу по даній проблемі, самостійно виконав патогістологічні, електронно-мікроскопічні, ІГХ і комп'ютерно-морфометричні дослідження головного мозку померлих хворих і експериментальних тварин, провів статистичний аналіз отриманих даних, інтерпретував і систематизував отримані результати. Для вивчення репаративних процесів у головному мозку через 30 діб після КС запозичені 5 експериментальних тварин з архівного матеріалу кафедри, що не ввійшли в дисертації інших співробітників. Дисертант самостійно написав всі розділи дисертації, сформулював висновки і рекомендації.

**Апробація результатів дисертації.** Основні положення роботи були представлені і обговорені на 58-й науково-практичній конференції молодих вчених і студентів Національного медичного університету ім. О.О. Богомольця «Актуальні проблеми сучасної медицини» (Київ, 2003), на всеукраїнських наукових конференціях молодих вчених «Сучасні аспекти медицини та фармації» (Запоріжжя, 2005, 2006, 2008), на 69-й міжнародній науково-практичній конференції

молодих вчених «Актуальні питання клінічної, експериментальної та профілактичної медицини та стоматології» (Донецьк, 2007), на VIII Міжнародному Конгресі патологів України «Сучасні проблеми патологічної анатомії» (Полтава, 2008) і на V Національному Конгресі патофізіологів України з міжнародною участю «Сучасні проблеми патофізіології: від молекулярно-генетичних до інтегративних аспектів» (Запоріжжя, 2008).

**Публікації.** За матеріалами дисертації опубліковано 10 наукових праць: 8 статей у виданнях, рекомендованих ВАК України (з яких 3 – без співавторів), а також 2 тези у матеріалах всеукраїнських науково-практичних конференцій. Отримано патент України на корисну модель № 28969.

**Об'єм і структура дисертації.** Дисертація викладена українською мовою на 219 сторінках. Дисертаційна робота складається із вступу, огляду літератури, розділу матеріалу й методів дослідження, 3-х розділів власних досліджень, аналізу і обговорення результатів дослідження, висновків, практичних рекомендацій і списку з 247 літературних джерел (43 вітчизняних і 204 закордонних авторів). Робота ілюстрована 133 малюнками, 4 діаграмами, 3 графіками, 2 схемами та 3 таблицями, які займають 68 сторінок.

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

**Матеріал і методи досліджень.** Дослідження були виконані на базі Запорізького обласного патологоанатомічного бюро та на кафедрі патологічної анатомії та судової медицини з основами права Запорізького державного медичного університету. Морфологічний аналіз змін нейронів і глії при ПРЕ проведений у головному мозку 106 померлих хворих віком від 21 до 89 років (64 чоловіки і 42 жінки), які перенесли КС тривалістю від 30 секунд до 40 хвилин або дво-п'ятикратну КС сумарною тривалістю від 7 до 60 хвилин. Середній вік померлих хворих склав  $61,66 \pm 11,45$  років: хворі молодого і середнього віку (21–55 років) склали 30,19% секційних спостережень, особи літнього віку (56–75 років) – 55,66%, особи старечого віку (76–89 років) – 14,15% від загальної кількості всіх секційних досліджень.

Для визначення змін нейронів в динаміці ПРП в секційних дослідженнях було виділено 9 груп: хворі, що померли через 1–12 годин після КС (22 спостереження), через 13–24 години (15 спостережень), через 25–48 годин (17 спостережень), через 3 доби (12 померлих), через 4 доби (9 померлих), через 5–7 діб (12 спостережень), через 8–14 діб (9 спостережень), через 15–30 діб (6 спостережень), через 31–127 діб (4 спостереження). Групу умовного контролю склали 5 хворих 56–72 років, що не страждали захворюваннями ЦНС і померли від гострої коронарної недостатності. Групу порівняння склали 5 хворих 45–68 років, що вмерли в стаціонарі після раптової КС і безуспішної 30-хвилинної реанімації.

У померлих хворих через 3–24 години після біологічної смерті при розтині вирізалися шматочки кори прецентральної звивини лобної долі лівої півкулі головного мозку, гіпокампа,

стовбура мозку на рівні верхнього й нижнього кута ромбовидної ямки, а також кори мозочка з його нижньої оливи для нейроморфологічних, ПГХ і комп'ютерно-морфометричних досліджень.

Експериментальні дослідження виконані на 65 свійських кішках і 12 білих щурах. Для вивчення ранніх субмікроскопічних і патогістологічних змін нейронів і гліо-нейронних відношень при ПРЕ на 50 дорослих здорових безпородних свійських кішках обох статей масою від 2 до 5,5 кг під внутрішньоочеревинним наркозом тіопенталом натрію (50 мг на 1 кг маси тварини) після інтубації моделювалась зупинка серця і дихання тривалістю 5–6 хвилин за розробленою нами методикою (патент України № 28969 від 25.12.2007 р.) шляхом компресії грудної клітини надувною манжетою. Після зняття манжети проводилися непрямий масаж серця до відновлення серцевої діяльності та штучна вентиляція легенів апаратом «Малыш» (тип 265) до відновлення самостійного ритмічного дихання. Динаміка перебігу ПРП фіксувалась за баловою системою Сафара і Гурвича та за удосконаленою нами шкалою Глазго-Пітсбург. Для дослідження морфологічних змін в динаміці ПРЕ експериментальні тварини під внутрішньоочеревинним наркозом тіопенталом натрію забивалися шляхом декапітації через 1, 3, 6, 12 годин, 1, 2, 3, 6, 9, 12 діб після КС (по 5 кішок в кожній групі спостережень). Зміни у головному мозку через 30 діб після КС вивчені у 5 тварин з архівного матеріалу кафедри. Групу порівняння склали 5 кішок, яких не вдалося реанімувати після КС; контрольну групу склали 5 здорових інтактних кішок. У всіх випадках проводили патологоанатомічний розтин тварин з гістологічним дослідженням внутрішніх органів. Після декапітації тварин для електронної мікроскопії брали ділянки кори з білою речовиною лобної області лівої півкулі та стовбура головного мозку; для світлової мікроскопії вирізали ділянки кори та білої речовини лобної області правої півкулі головного мозку, гіпокампа, стовбура мозку і мозочка.

Репаративні процеси у нейронах і гліальних клітинах головного мозку в ПРП вивчені з використанням бромдезоксидуридину у 9 лабораторних білих щурів лінії Wistar, яким моделювали КС позагрудинним кліпуванням судинного пучка серця Г-подібним гачком без торакотомії за методикою В.Г. Корпачова (1982). У ПРП щурам щодня внутрішньоочеревинно однократно вводили BrdU (5-Bromo-2'-deoxyuridine, «Sigma-Aldrich» – Німеччина) на фізіологічному розчині з розрахунку 40 мг на 1 кг маси тварини. Через 3, 5, 7 діб після КС щури забивалися шляхом декапітації під загальним ефірним наркозом (по 3 щури в кожній групі спостережень). Контрольну групу склали 3 інтактних білих щури, забиті під ефірним наркозом через 3 доби після щоденного однократного введення BrdU у аналогічних дозах.

Для нейроморфологічного дослідження шматочки тканини головного мозку фіксували в забуференому 10% формаліні і заливали в парафін; зрізи, виготовлені на прецизійному ротатійному мікротомі НМ 3600 («MICROM Laborgeräte GmbH» – Німеччина), фарбували гематоксиліном і еозином за стандартною методикою, а також вибірково фарбували крезил-віолетом за F. Nissl і галоціанін-хромовими галунами за L. Einarson. Гліальні клітини виявляли в



заморожених зрізах завтовшки 20-30  $\mu$ , виготовлених на мікроскопі HM 500 O («MICROM Laborgeräte GmbH» – Німеччина) з фіксованих в бром-формолі шматочків мозку, які імпрегнували в золото-сулемовому розчині за Ramon-i-Sajal (для астроглії) або в аміачному розчині вуглекислого срібла за Rio-Hortega (для мікроглії). Зміни мієлінових оболонок аксонів оцінювали в препаратах, оброблених за M. Krutsau.

Для електронної мікроскопії в перші 3-5 хвилин після декапітації тварин зі зрошеного 2,5% глутаральдегідом на 0,1M фосфатному буфері мозку вилучались дрібні шматочки, які фіксували 2 години в аналогічному розчині при температурі +4°C, далі фіксували 2 години в 1% розчині OsO<sub>4</sub> на 0,1M фосфатному буфері, потім зневоднювали в спиртах, контрастували 2 години в 2% ураніл-ацетаті і заливали в аралдит. Ультратонкі зрізи, виготовлені на ультрамікроскопі Reichert Om43, контрастували на сіточках цитратом свинцю за E.S. Reynolds (1963) та вивчали у електронному мікроскопі ПЭМ-100.

Для ІГХ досліджень на мікроскопі HM 3600 виготовляли серійні парафінові зрізи головного мозку завтовшки 3  $\mu$ , які поміщали на адгезивні предметні скельця «Super Frost Plus» («Menzel Glaser» – Німеччина). ІГХ-визначення експресії про- та антиапоптозних білків проводилось з використанням моноклональних антитіл Мо a-Rat Bcl-X проти білка Bcl-X<sub>L</sub> і системи візуалізації LSAB2; Мо a-Hu CD95, APO-1/Fas проти рецептора Fas і системи візуалізації EnVision+; а також поликлональних антитіл Rb a-Hu Bax проти протеїну Bax і системи візуалізації CSA System Rabbit Link. Фагоцити імуногістохімічно визначались за допомогою моноклональних антитіл Мо a-Hu CD68 Macrophage проти поверхневого рецептора макрофагів і системи візуалізації EnVision+ (всі реактиви фірми «ДАКО» – Данія). З використанням моноклональних антитіл Мо a-BrdU («Sigma-Aldrich» – США) та системи візуалізації EnVision+ («ДАКО» – Данія) досліджувалось включення бромдезоксирідину в ядра проліферуючих гліальних клітин, а також в мітохондрії при репарації ушкоджених нейронів.

На комп'ютерній системі цифрового аналізу зображення KS 200 («Kontron Elektronik» – Німеччина), інтегрованої в мікроскоп Axioplan 2 («Carl Zeiss» – Німеччина) з відеокамерою DXС-151А («Sony» – Японія), у померлих в різні терміни після КС хворих визначались зміни площі, периметру, коефіцієнту форми та оптичної щільності великих пірамідних нейронів 5-го шару кори прецентральної звивини великих півкуль мозку у гістологічних препаратах, забарвлених гематоксиліном і еозином, при чотирьохкратному вимірюванні кожного об'єкту. У експериментальних кішок у різні терміни ПРП у гістологічних препаратах, забарвлених гематоксиліном і еозином, підраховувалась кількість патологічно змінених кортикальних нейронів у 10 стандартних полях зору мікроскопа Axioplan 2 «Carl Zeiss» (об'єктив х40).

Отримані кількісні результати оброблялись методом варіаційно-статистичного аналізу середніх величин на персональному комп'ютері з процесором «Intel Core 2 Quad 6600» із використанням програмного пакета Statistica 6.1 for Windows. Обчислювалась середня

арифметична величина ( $M$ ), середнє квадратичне відхилення ( $\sigma$ ) і стандартна помилка середньої арифметичної ( $m$ ). Вірогідність відмінностей порівнюваних величин визначалася за допомогою критерію Стьюдента ( $T$ ). За достовірну мінімальну ймовірність розходжень приймали  $p < 0,05$ .

**Результати дослідження та їх обговорення.** За даними нейроморфологічних, ІГХ, електронно-мікроскопічних і комп'ютерно-морфометричних досліджень у постішемично-реперфузійному періоді після КС в головному мозку визначався мозаїчно розподілений селективний некроз і апоптоз нейронів, а також загибель нервових і гліальних клітин в ділянках невідновленої капілярної гемомікроциркуляції, які мали певні структурні відмінності в динаміці ПРП.

Патогістологічні і електронно-мікроскопічні дослідження головного мозку показали, що в перші години ПРП початкові ішемічні зміни нейронів проявлялись нерівномірним вакуолоподібним набряканням мітохондрій з редукцією і руйнуванням крист. За даними комп'ютерної морфометрії ішемічно змінені кортикальні нейрони в цей термін ПРП мали площу  $276,4 \pm 12,6$  мкм<sup>2</sup>, периметр –  $68,1 \pm 3,4$  мкм, коефіцієнт форми –  $0,79 \pm 0,03$ , оптичну щільність –  $131,3 \pm 6,2$  умовних одиниць.

Наприкінці 1-ї доби після КС в головному мозку переважали ішемічно ущільненні і хроматолітично змінені нейрони. Цитоплазма хроматолітично змінених нейронів була значно просвітленою, з майже відсутньою речовиною Нісля, ядра таких нейронів були набряклими, просвітленими, з пилоподібно-дрібнозернистим хроматином і ексцентрично розташованим дрібним ядерцем. В ішемічно ущільнених нейронах визначалось рівномірно зменшене, базофільне та гіперхромне ядро без ядерця, з гомогенним і ущільненим хроматином; зменшена цитоплазма була гомогенно еозинофільною внаслідок повної редукції хроматофільної речовини, іноді спостерігались її залишки у вигляді слабоконтурних смуг або брилок. За даними комп'ютерної морфометрії наприкінці 1-ї доби після перенесеної КС ішемічно набрякли або хроматолітично змінені нервові клітини, а також ішемічно ущільнені гіперхромні нейрони мали відповідно такі параметри: площа складала  $427,2 \pm 23,4$  і  $162,5 \pm 7,8$  мкм<sup>2</sup>, периметр –  $108,4 \pm 5,1$  і  $53,1 \pm 2,5$  мкм, коефіцієнт форми –  $0,89 \pm 0,05$  і  $0,75 \pm 0,03$  та оптична щільність –  $147,4 \pm 7,4$  і  $127,6 \pm 6,2$  умовних одиниць. Патологічно змінені нейрони були мозаїчно розподілені між структурно збереженими клітинами в нервовій тканині, але частіше вони спостерігались в зонах невідновленої гемомікроциркуляції.

Ушкодження мітохондрій протягом перших 3-х діб ПРП призводило до активації внутрішніх мітохондріальних шляхів апоптозу нейронів, можливим його активатором могли бути також іони кальцію і білки, вивільнені з розширених цистерн ЕПС з втраченими прикріпленими рибосомами. Встановлено, що апоптоз нейронів ЦНС активують внутрішні (Вах) мітохондріальні фактори та мембранні Fas-АРО-рецептори. В цей період ІГХ методом виявлялась надекспресія проапоптотичного білка Вах у цитоплазмі кортикальних нейронів при відсутності експресії цього

протеїну в поруч розташованих гліальних клітинах. Починаючи з 1-ї доби після перенесеної КС ІГХ методом виявлялась також експресія молекул CD95/Fas у цитоплазмі окремих нейронів або, рідше, – у плазматичній мембрані. Рівень експресії цього білка зростав до 3–4-ї доби після реанімації в корі головного мозку та до 5–6-ї доби – в стовбурі мозку, а потім його експресія поступово регресувала. За даними світлової мікроскопії на 3–5-й добі ПРП визначався розповсюджений апоптоз нейронів гіпокампа, більшість яких є глутамат-чутливими клітинами (Portera-Cailleau C. et al., 1997; MacManus J.P. et al., 1997; Gwag B.J. et al., 2002), що свідчило про розвиток у хворих після клінічної смерті також ексайтотоксичного апоптозу глутамат-чутливих нейронів ЦНС.

Встановлено, що найбільш раннім ультраструктурним проявом патогенно-індукованого апоптозу нейрона було ущільнення каріоплазми ядра з крупним ядерцем і агрегація хроматину у великі конгломерати біля каріолеми (маргінація хроматину), при цьому визначались брунькоподібні випинання ядра в цитоплазму з набряклими мітохондріями і збереженими іншими органелами. Надалі спостерігався каріопікноз та каріорексис на гіперхромні «ядерні апоптотичні тільця», фрагментація нервових клітин і фагоцитоз цих фрагментів макрофагами. За літературними даними (White B.C. et al., 2000; Wang K.K.W., 2002; Stefanis L., 2005) провідну роль в саморозборці клітин при апоптозі відіграє програмована активація каспаз. Апоптоз нейронів гіпокампа, стовбура мозку, кори великих півкуль і кори мозочка спостерігався протягом першого тижня після КС. Незважаючи на дані ІГХ щодо поширеної в ПРП експресії Вах і CD95/Fas в значній кількості клітин, дані світлової і електронної мікроскопії показали, що далеко не всі ці клітини гинуть шляхом апоптозу. Відомо (Lipton P., 1999), що надекспресія Вах у цитоплазмі нейрона вважається провісником його загибелі, хоча Вах-індукований апоптоз може блокуватися одночасною експресією Bcl-X<sub>L</sub> (Pashen W., 2004). В головному мозку хворих, померлих через 2–3 доби після реанімації, на тлі загибелі більшості нейронів експресія Bcl-X<sub>L</sub> визначалась у цитоплазмі поодиноких нейронів, що вижили. ІГХ-виявлення експресії проапоптотичних і антиапоптотичних маркерів у головному мозку хворих у ПРП дає можливість прогнозувати лише вірогідність загибелі або виживання нейронів, але не визначає конкретний тип клітинної загибелі: апоптоз, каріоцитолізис або коагуляційний некроз. Найбільш вірогідною долею ішемічно ушкоджених нейронів, враховуючи дефіцит енергії в ПРП, є загибель шляхом коагуляційного некрозу і каріоцитолізу, або рання активація шляхів виживання за допомогою гліальних клітин-сателітів.

Протягом 2–3–8-ї доби після реанімації при мікроскопії у всіх відділах головного мозку визначався каріоцитолізис і коагуляційний некроз нервових клітин. В ранній фазі розвитку каріоцитолізу нейрона при електронній мікроскопії визначалось ішемічне набрякання цитозолу, набрякання ядра, значна вакуолізація мітохондрій, різке розширення порожнин ЕПС, деструкція аксо-дендритних і аксо-соматичних синапсів. Далі спостерігалось руйнування ядерця і ядерного

хроматину (кариолізіс), паралельно визначалась редукція майже всіх рибосом і набрякання цистерн ЕПС, і у фіналі – лізіс органел і компонентів цитоскелета з спустошенням цитоплазми (цитолізіс), який за даними M. Artal-Sanz M. et. al. (2005) відбувається внаслідок міграції лізосомальних гідролаз. Нейрони з ознаками каріоцитолізісу мали наступні комп'ютерно-морфометричні параметри: площу  $1002,8 \pm 42,5$  мкм<sup>2</sup>, периметр –  $122,3 \pm 5,8$  мкм, коефіцієнт форми –  $0,93 \pm 0,05$  та оптичну щільність –  $175,7 \pm 6,4$  умовних одиниць. При світловій мікроскопії загиблій шляхом каріоцитолізісу нейрон мав вигляд безструктурної «клітини-тіні» з розпливчастими контурами ядерної і плазматичної мембрани.

Протягом перших 3-х діб ПРП ішемічний коагуляційний некроз і апоптоз нейронів в головному мозку мали майже подібні мікроскопічні і ультраструктурні ознаки. У цьому періоді в усіх апоптотично і пренекротично ущільнених нейронах визначався каріопікноз із глибокою конденсацією і маргінацією хроматину, набрякання мітохондрій зі значною редукцією крист, розширення вакуолей комплексу Гольджі і цистерн гранулярної ЕПС без прикріплених рибосом, а також виявлялись зруйновані аксо-дендритні і аксо-соматичні синапси. Цитоплазма таких нейронів відрізнялась підвищеною осміофілією нуклеопротейдів і дезінтегрованих рибосом; підвищеною електронною щільністю білків цитозолу, аксоплазми і дендроплазми. Ущільнені і зменшені нейрони були оточені розширеними відростками астроцитів і макрофагів. Такі структурні зміни могли бути однією з фаз апоптозу нейрона напередодні його дезінтеграції каспазами, а могли бути також проявами розвитку коагуляційного ішемічного некрозу нервової клітини. За даними комп'ютерної морфометрії такі нейрони мали площу –  $139,2 \pm 6,8$  мкм<sup>2</sup>, периметр –  $48,1 \pm 2,3$  мкм, коефіцієнт форми –  $0,83 \pm 0,04$  та оптичну щільність –  $115,5 \pm 4,9$  умовних одиниць.

За даними електронної мікроскопії, на початку розвитку ішемічного коагуляційного некрозу нейрона, крім набрякання мітохондрій, спостерігалась локальна коагуляція і гіперосміофілія мембран мікротрубочок, крист мітохондрій і цистерн ЕПС, а також коагуляція і дрібнобрильчата конденсація щільного хроматину ядра. Протягом доби відбувалась редукція ядерця, рибосоми від'єднувались від цистерн гранулярної ЕПС, значно розширювались цистерни каріотеки і ЕПС, що в сукупності свідчило про припинення процесів біосинтезу в нейроні при його некрозі. На відміну від патогенно-індукованого апоптозу, характерною ознакою якого була збереженість ядерця в пікнотизованому ядрі з гофрованими контурами, при коагуляційному некрозі спостерігався глибокий пікноз ядра з відсутністю в ньому ядерця, у цитоплазмі зазвичай були відсутні залишки фрагментованого ядра – так звані «ядерні апоптозні тільця». Загиблій ішемічним коагуляційним некрозом нейрон визначався при світловій мікроскопії як зменшена («муміфікована») клітина з гіперхромним пікнотичним ядром без ядерця і щільною, безструктурною, еозинофільною цитоплазмою, позбавленою базофільних глибок речовини Нісля. Навколо загиблої зменшеної і гіперхромної клітини завжди спостерігався розширений

«перинейрональний простір», який, за даними електронної мікроскопії, представляв собою розширені відростки астроцитів і макрофагів, що щільно оточували нейрон, позбавлений аксо-соматичних синапсів. У віддаленому після КС періоді на місці загиблих каріоцитолізісом або коагуляційним некрозом нейронів формувалися дрібні вогнища замісного гліофіброзу.

Значну роль в загибелі нервових і гліальних клітин в ранньому ПРП відігравали численні вогнища невідновленої капілярної гемомікроциркуляції, які визначались при мікроскопії в перші хвилини після реанімації у всіх відділах головного мозку. Крім цього, у хворих, померлих у віддаленому після КС періоді, в головному мозку спостерігались «свіжі» ділянки невідновленого кровотоку, які з'являлись внаслідок значного зниження системного і церебрального кровотоку. Протягом 2-х діб у «свіжих» ділянках невідновлення кровотоку визначалися порожні капіляри з некротизованим ендотелієм, оточені значно розширеними відростками астроцитів, в наступні 3–5-ть діб знекровлені порожні капіляри спадалися і трансформувалися в безклітинні тяжі базальних мембран. При стійкому невідновленні капілярного кровотоку в ранньому періоді активувався некроз поодиноких перикапілярних нейронів, а в подальші 3–5 діб виникали дрібні вогнища перикапілярного некрозу нейронів, дендритів, мієлінізованих аксонів і гліальних клітин. З перифокальних зон у вогнища перикапілярних мікронекрозів мігрували CD68-позитивні макрофаги та мікрогліоцити, які визначались при імпрегнації за Ріо-Гортега. На 5–7–9-ту добу ПРП у вогнища перикапілярних мікронекрозів з макрофагами мігрували фібрилоутворюючі астроцити, які визначались при імпрегнації за Кахалем. Вони спочатку формували навколо залишків базальних мембран зруйнованих капілярів дрібні вогнища замісного астроцитарного гліозу, а в наступному – вогнища гліофіброзу.

Через 2 тижні – 2 і більше місяців після КС в окремих нейронах головного мозку визначались явища так званої ретроградної дегенерації або ретроградних змін, які були обумовлені ішемічною деструкцією органел і мієлінової оболонки аксона зі спустошенням аксона, або руйнуванням мієлінізованого аксона у вогнищі перикапілярного некрозу. При мікроскопії гістологічних препаратів, забарвлених гематоксилином і еозином або галоціаніном за Ейнарсонем, спустошені аксони спостерігались в нейропілі кори і в субкортикальній білій речовині великих півкуль головного мозку у хворих, померлих через 2 тижні – 2 місяці після КС, а деструктивні зміни мієлінових оболонок верифікувались в препаратах, забарвлених за Крутшау. Характерні для початку аксональної дегенерації явища центрального хроматолізу, що полягають у пилоподібному подрібненні і блідому забарвленні хроматофільної речовини в центральних відділах перикаріону нейрону, спостерігались вже на 5 добу після перенесеної КС в препаратах, забарвлених крезил-віолетом за Ніслем або гематоксилином та еозином. Протягом 2-х тижнів центральний хроматоліз трансформувався в тотальний хроматоліз, при відсутності перинейронального сателітозу спустошений нейрон округлявся і збільшувався внаслідок набрякання, в його цитоплазмі часто накопичувалась значна кількість гранул ліпофусцину. Ретроградній загибелі нейрона передували

лізис хроматину ядра, ексцентрично розташованого біля цитолемі, або глибокий каріопікноз. Максимально виражені ретроградні зміни нейронів визначались в гіпокампі і в корі великих півкуль мозку, в той час як в нейронах Пуркін'є кори мозочка ретроградні зміни не спостерігались.

Селективна загибель нейронів ЦНС шляхом апоптозу та некрозу проявлялась в ПРП арефлексією і коматозним станом хворих, вона не призводила до змін форми, розмірів і маси головного мозку, що реєструвалась при патологоанатомічному розтині померлих.

Встановлено, що незважаючи на імуногістохімічно верифіковану ініціацію апоптозу нейронів і мікроскопічно визначений селективний некроз нервових клітин, значна кількість ішемічно ушкоджених нейронів в ПРП відновлювалась при підтримці оточуючих гліальних клітин за умов ранньої активації адаптивно-метаболическої кооперації між гліоцитами і нейронами. За даними електронної мікроскопії у перші хвилини-години після перенесеної КС між ішемічно зміненими нейронами та перинейрональними олігодендроцитами і астроцитами виявлялася велика кількість активних контактів типу субповерхневих цистерн, щілинних і щільних з'єднань. Протягом першого тижня після КС відмічалась міграція гліальних клітин до ішемічно ушкоджених нейронів зі збереженим ядром і ядерцем, при світловій і електронній мікроскопії визначався феномен перинейронального астроцитарно-олігодендрогліального сателітозу. При ІГХ дослідженні в перинейрональних гліальних клітинах визначалася експресія антиапоптотичних молекул Bcl-X<sub>L</sub>.

Проведені дослідження показали, що частково ушкоджені нейрони відновлювались в ПРП шляхом внутрішньоклітинної регенерації органел, що також відзначено в роботах Туманського В.О. (1987, 2002). За даними електронної мікроскопії протягом 3–6-ї доби в ішемічно ушкоджених нейронах, оточених гліальними клітинами-сателітами, активувався лізосомальний аутофагоцитоз зруйнованих цитоплазматичних компонентів. За даними ІГХ досліджень на 7-й добі після КС у експериментальних щурів в нейронах зареєстровано включення бромдезоксирідину в цитоплазматичні структури, які за формою і локалізацією ідентифікувались при імерсійній мікроскопії як мітохондрії; в цей же термін ПРП при електронній мікроскопії в нейронах було відмічено збільшення числа дрібних мітохондрій з ущільненим матриксом і компактно запакованими кристами. Ці результати імуногістохімічно верифікували репаративний синтез мітохондріальної ДНК та електронно-мікроскопічно засвідчили збільшення кількості мітохондрій при відновленні структури ішемічно пошкоджених нейронів, а також підтвердили радіоавтографічні данні про включення попередників ДНК при новоутворенні мітохондрій (В.А. Туманский, 2002).

За даними електронної мікроскопії, через 9–12 діб після реанімації частково ушкоджені нейрони з ознаками структурного відновлення мали велике просвітлене ядро зі значною кількістю гранул рибонуклеопротейдів і одним або двома великими ядерцями; в цитоплазмі помірної

електронної щільності визначалась значна кількість невеликих мітохондрій з ущільненим матриксом і компактно запакованими кристами, полірибосом та ультраструктур зернистої і гладкої ЕПС, а також певна кількість невеликих вторинних лізосом і дрібних мієліноподібних залишкових тілець. Такі нейрони мали структурно нормальні аксо-соматичні і аксо-дендритні синапси. Через 12–30 діб в нейронах з великим ядром спостерігалось підвищене число дрібних мітохондрій, а також цистерн комплексу Гольджі і гранулярної ЕПС, що свідчило про інтенсивні біосинтетичні процеси; при світловій мікроскопії в помірно базофільній цитоплазмі визначались численні брилки хроматофільної речовини. Про раніше перенесені ушкодження свідчили дрібні осміофільні залишкові тіла або невеликі лізосоми з осміофільно-гранулярними включеннями.

Внутрішньоклітинна регенерація переважної більшості нейронів головного мозку забезпечувала відновлення сомато-неврологічного статусу експериментальних кішок на 5 добу ПРП, однак, повного структурного відновлення окремих нейронів ЦНС не спостерігалось навіть через місяць після реанімації експериментальних тварин.

ІГХ дослідження з використанням бромдезоксипіридину визначили особливості відновлення в ПРП популяцій гліальних клітин, які були раніше частково висвітлені при гісторадіоавтографії (Tumansky V., Tertysny S., 1995; Туманский В.А., 2002). На 3–7 добі після КС визначено включення BrdU в ядра субвентрикулярних недиференційованих гліальних клітин, що свідчило про їх готовність до вступу у мітоз. Водночас з проліферацією недиференційованих субвентрикулярних гліоцитів відмічена міграція новоутворених гліальних клітин в ділянки ішемічних ушкоджень мозку, про що свідчила наявність біля ішемічно ушкоджених нейронів на 5 добі ПРП гліоцитів з залишками в ядрах BrdU, які за структурою ядер ідентифікувались як олігодендроцити і астроцити. Новоутворені астроцити і олігодендроцити разом з CD68+ макрофагами також формували в ПРП гліально-клітинні «вузлики» у великих півкулях і в стовбурі мозку.

## ВИСНОВКИ

У дисертації приведено теоретичне узагальнення і нове рішення важливої для патологоанатомічної діагностики наукової задачі щодо морфогенезу селективної загибелі нейронів ЦНС, яка є основою коматозного стану хворих після реанімації, а також щодо структурного відновлення нервових клітин, ушкоджених після КС.

1. Головними морфогенетичними типами селективної загибелі нервових клітин в ПРП є патогенно-індукований апоптоз, каріоцитолізис і коагуляційний некроз, а також ретроградне руйнування нейронів, які розвиваються внаслідок постішемічно-реперфузійних і ексайтотоксичних ушкоджень, а також внаслідок стійкого невідновлення кровообігу в капілярах головного мозку. Апоптоз і селективний некроз нейронів мозочка, гіпокампа, стовбура та кори головного мозку найбільш виражений з 1-ї по 5–8-му добу ПРП, ретроградне руйнування

кортикальних і стовбурних нейронів проявляється через 2 тижні – 2 і більше місяців після КС.

2. Початкові ішемічні ушкодження нейронів головного мозку проявляються через 60 хвилин – 24 години після КС з успішною реанімацією значним вакуолеподібним набряканням мітохондрій з руйнуванням крист, руйнуванням органел аксо-дендритних синапсів з редукцією синаптичних везикул, а також каріопікнозом і ішемічним ущільненням цитоплазми або набряканням каріоплазми і цитозолу нервових клітин.

3. За даними ІГХ та електронної мікроскопії, апоптоз нейронів у ПРП стимулюють внутрішні (Вах) мітохондріальні фактори і активовані внутрішньоклітинні домени мембранних Fas-АРО-рецепторів, далі розвивається маргінація ущільненого хроматину і каріопікноз із збереженим великим ядрцем, ущільнення цитоплазми із збереженими мітохондріями і іншими органелами, каріорексис на гіперхромні «апоптотичні тільця», фрагментація нервових клітин і фагоцитоз відростками CD68+ макрофагів.

4. Порівняння даних ІГХ, світлової і електронної мікроскопії показує, що в ПРП значно розповсюджений каріоцитолізис і коагуляційний некроз нейронів головного мозку, в той час як апоптоз розвивається лише в частині нейронів, що експресують Вах і CD95/Fas. Вах-індукований апоптоз блокується при одночасній експресії нейроном антиапоптотичного білка Bcl-X<sub>L</sub>.

5. У процесі каріоцитолізісу руйнуються мітохондрії, хроматин ядра і інші цитоплазматичні органели, що проявляється при світловій мікроскопії набряканням і спустошенням каріо-цитоплазми нейрона, який трансформується в «клітинну тіль». При коагуляційному некрозі спостерігається значне набрякання мітохондрій, коагуляція хроматину і руйнування ядрця, каріопікноз і ущільнення цитозолу, значне розширення цистерн ЕПС.

6. Ретроградне руйнування/дегенерація нейрона в ПРП починається з ішемічної деструкції органел і мієлінової оболонки аксона або із сегментарного руйнування аксона у вогнищі перикапілярного некрозу. Надалі, при відсутності перинейронального астроцитарно-олігодендрогліального сателітозу, наростає «хроматоліз» – невідновлення полірибосом і гранулярної ЕПС в цитоплазмі ушкодженого нейрона, що завершується ареаактивним каріоцитолізисом нервової клітини.

7. При стійкому невідновленні кровотоку в церебральних капілярах виникає селективний некроз перикапілярних нейронів або дрібні вогнища перикапілярного некрозу нервової тканини з фагоцитозом зруйнованих структур CD68+ макрофагами і мікрогліоцитами.

8. Прогностичними ознаками відновлення ушкоджених нейронів є розвиток у перші 60 хвилин після КС перинейронального астроцитарно-олігодендрогліального сателітозу з експресією гліоцитами антиапоптотичних молекул Bcl-X<sub>L</sub> і збільшенням числа спеціалізованих гліо-нейронних контактів. При регенерації в ішемічно ушкоджених нейронах активується лізосомальний аутофагоцитоз зруйнованих ультраструктур цитоплазми, репарація ДНК мітохондрій із включенням у них бромдезоксирідину, а також поступово зростає число



мітохондрій, рибосом, ультраструктур зернистої та гладкої ЕПС.

9. У хворих, що померли в коматозному стані через 8–127 діб після КС, при нормальних макроскопічних параметрах головного мозку, у ділянках селективної загибелі нейронів мозочка, кори й стовбура головного мозку виявляються клітинні «випадіння» і дрібні вогнища астроцитарного гліозу, а також дрібні вогнища астроцитарного гліофіброзу в ділянках перикапілярного некрозу.

### **ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ**

1. Для коректної морфологічної оцінки тяжкості ПРЕ і танатогенезу при розтині померлих реанімованих хворих необхідно обов'язково досліджувати стовбур головного мозку, кору великих півкуль і мозочка.

2. Дефіцит нейронів головного мозку, який лежить в основі коматозного стану хворих після реанімації, документується при мікроскопії по наявності апоптозу, каріоцитолізу, коагуляційного некрозу і ретроградного руйнування/дегенерації нейронів, нейронно-клітинних «випадіннь» та дрібних вогнищ астроцитарного гліозу, а також вогнищ астроцитарного гліофіброзу навколо спалих капілярів.

3. В якості мінімального комплексу патогістологічних методик для виявлення цих змін у патологоанатомічній практиці необхідно використовувати фарбування зрізів гематоксиліном і еозином, галоціаніном за Ейнарсоном і забарвлення мієліну за Крутшау (після відповідної фіксації шматочків головного мозку).

4. Для поглибленого вивчення морфогенезу ПРЕ слід застосовувати ІГХ-набори для виявлення експресії про- і антиапоптотичних білків, електронну мікроскопію та імпрегнаційні методики елективного виявлення астро-оліго-мікроглії.

### **СПИСОК НАУКОВИХ ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ**

1. Клинико-морфологическая характеристика кардио-респираторного центра ствола головного мозга в динамике постреанимационной болезни и церебрального полушарного инсульта / [Туманский В.А., Дарий В.И., Туманская Л.М., Тertyшный С.И., Евсеев А.В.] // Патология. – 2005. – Т. 2, № 3. – С. 82–91. *(Автором проводився набір частини первинного матеріалу, обробка та аналіз результатів дослідження).*

2. Патоморфология деструктивных и восстановительных процессов в ЦНС после клинической смерти и церебральной ишемии / [Туманский В.А., Евсеев А.В., Тertyшный С.И., Туманская Л.М., Тимошенко С.Г.] // Світ медицини та біології. – 2008. – № 2, ч. 2. – С. 99–101. *(Автором самостійно проводився аналіз частини літературних джерел, написано розділ на підставі власних матеріалів та результатів дослідження, забезпечено оформлення статті).*

3. Туманский В.А. Апоптоз и селективный некроз нейронов ЦНС после клинической

смерти и церебральной ишемии: молекулярные механизмы и морфологические особенности / В.А. Туманский, А.В. Евсеев, Ю.Ф. Полковников // Патологія. – 2008. – Т.5, № 2. – С. 19–28. *(Автором самостійно проводився аналіз частини літературних джерел, написано розділ на підставі власних матеріалів та результатів дослідження, забезпечено оформлення статті).*

4. Туманский В.А. Моделирование клинической смерти контролируемой и обратимой компрессией грудной клетки и динамика восстановления соматоневрологического статуса у кошек в постреанимационном периоде / В.А. Туманский, А.В. Евсеев // Патологія. – 2008. – Т.5, № 3. – С. 104–106. *(Автором самостійно проводився набір первинного матеріалу, обробка та аналіз результатів дослідження, формулювалися висновки).*

5. Туманский В.А. Морфологическая характеристика ретроградного разрушения (ретроградной дегенерации) нейронов головного мозга при постреанимационной энцефалопатии / В.А. Туманский, А.В. Евсеев // Патологія. – 2008. – Т.5, № 4. – С.24–28. *(Автором самостійно проводився набір частини первинного матеріалу та його морфологічне дослідження, обробка та аналіз частини результатів дослідження, формулювалися висновки).*

6. Пат. 28969 UA, МПК G 09 B 23/28. (2007.01). Спосіб моделювання клінічної смерті / Туманський В.О., Євсєєв А.В. (Україна) – № 2007 u10103 ; заявл. 10.09.07 ; опубл. 25.12.07, Бюл. № 21. *(Автором самостійно проводився збір первинного матеріалу, виконана експериментальна частина, аналіз отриманих даних, проводилася робота з патентами).*

7. Евсеев А.В. Некоторые молекулярные механизмы апоптоза нейронов ЦНС при ишемии мозга / А.В. Евсеев // Актуальні питання фармац. та мед. науки та практики : зб. наук. ст. – Запоріжжя, 2005. - Вип.XIV. – С. 186–190.

8. Евсеев А.В. Роль белков семейства каспаз в развитии апоптоза / А. В. Евсеев // Актуальні питання фармац. та мед. науки та практики : зб. наук. ст. – Запоріжжя, 2006. - Вип.XVII. – С. 168–172.

9. Евсеев А.В. Динамика изменения соматоневрологического статуса кошек в раннем постреанимационном периоде / А.В. Евсеев // Актуальні питання фармац. та мед. науки та практики : зб. наук. ст. – Запоріжжя, 2008. – Вип. XXI, т.2. – С. 65–71.

10. Євсєєв А.В. Морфогенез селективної загибелі нейронів в постреанімаційному періоді / А.В. Євсєєв, О.П. Толок // Актуальні проблеми сучасної медицини : 58 наук.-практ. конф. студентів та молодих вчених Нац. мед. ун-ту ім. О.О. Богомольця з міжнар. участю, Київ, 28-31 жовтня 2003 р. – К., 2003. – С. 81. *(Автором самостійно проводився набір первинного матеріалу, обробка та аналіз результатів дослідження, формулювалися висновки).*

11. Evseyev A.V. Immunohistochemical research of Bcl-X protein expression in brain neurons at the postresuscitation disease / A.V. Evseyev // Актуальні проблеми клінічної, експериментальної та профілактичної медицини : міжнар. наук.-практ. конф. молодих вчених, Донецьк, 4-7 квітня 2007 р. – Донецьк, 2007. – Вип. 69. – С. 175.

## АНОТАЦІЯ

**Євсєєв А.В. Морфогенез селективної загибелі та відновлення нейронів головного мозку при постреанімаційній енцефалопатії. – Рукопис.**

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.03.02 – патологічна анатомія. – Кримський державний медичний університет ім. С.І. Георгієвського МОЗ України, Сімферополь, 2009.

Дисертація містить результати комплексних нейроморфологічних досліджень головного мозку хворих на ПРЕ, які визначили особливості селективної загибелі та відновлення нейронів ЦНС після перенесеної КС для використання в патологоанатомічній діагностиці.

Визначено, що в перші години ПРП початкові ішемічні зміни нейронів проявляються набряканням мітохондрій, що призводить до активації внутрішніх шляхів апоптозу. Апоптоз нейронів стимулюють внутрішні мітохондріальні фактори (Вах) і активовані домени Fas-АРО-рецепторів. Вах-індукований апоптоз блокується при одночасній експресії білка Bcl-X<sub>L</sub>.

Головними типами селективної загибелі нейронів в ПРП є апоптоз, каріоцитолізіс, коагуляційний некроз та ретроградне руйнування, які розвиваються внаслідок постішемічно-реперфузійних і ексайтотоксичних ушкоджень, а також стійкого невідновлення кровообігу в капілярах мозку.

Основними умовами відновлення частково ушкоджених нейронів є розвиток у ранньому ПРП адаптивного сателітозу з експресією гліоцитами білка Bcl-X<sub>L</sub>, збільшення числа спеціалізованих гліо-нейронних контактів, аутофагоцитоз зруйнованих компонентів, а також відновлення мітохондрій та інших органел.

При стійкому невідновленні кровотоку в капілярах виникає селективний некроз перикапілярних нейронів або дрібні вогнища перикапілярного некрозу нервової тканини з наступним формуванням вогнищ гліофіброзу.

**Ключові слова:** постреанімаційна енцефалопатія, селективна загибель нейронів, імуногістохімічні маркери апоптозу, ретроградне руйнування, відновлення структури нейронів.

## АННОТАЦИЯ

**Евсеев А.В. Морфогенез селективной гибели и восстановления нейронов головного мозга при постреанимационной энцефалопатии. – Рукопись.**

Диссертация на соискание научной степени кандидата медицинских наук по специальности 14.03.02 – патологическая анатомия. – Крымский государственный медицинский университет им. С.И. Георгиевского МЗ Украины, Симферополь, 2009.

Диссертация содержит результаты комплексного патогистологического, электронно-микроскопического, ИГХ и морфометрического исследования головного мозга больных ПРЕ, которые определили особенности селективной гибели и восстановления нейронов ЦНС после

перенесенной КС для использования в патологоанатомической диагностике.

Определено, что в первые часы ПРП начальные ишемические изменения нейронов проявляются неравномерным вакуолеподобным набуханием митохондрий с редукцией их крист, что приводит к активации внутренних путей апоптоза. Апоптоз нейронов в ПРП стимулируют внутренние (Вах) митохондриальные факторы и активированные внутриклеточные домены мембранных Fas-АРО-рецепторов. Возможным активатором нейронного апоптоза могут быть ионы кальция и белки, высвобождённые из расширенных цистерн ЭПС. Вах-индуцированный апоптоз блокируется при одновременной экспрессии нейроном антиапоптотического белка Bcl-X<sub>L</sub>.

Основными морфогенетическими типами селективной гибели нервных клеток в ПРП являются патогенно-индуцированный апоптоз, кариоцитолитический некроз и коагуляционный некроз, а также ретроградное разрушение нейронов, которые развиваются вследствие постишемически-реперфузионных и эксайтотоксических повреждений, а также вследствие стойкого невосстановления кровообращения в капиллярах головного мозга.

Впервые показано, что ИГХ-выявление экспрессии проапоптотических и антиапоптотических маркеров в головном мозге больных в ПРП дает возможность прогнозировать лишь вероятность гибели или выживания нейронов, но не определяет конкретный тип клеточной гибели: апоптоз, кариоцитолитический некроз или коагуляционный некроз. Для уточнения типа гибели нейронов и прогнозирования выживания частично поврежденных нейронов, обеспечиваемого перинейрональными глиоцитами-сателлитами, необходимы параллельные патогистологические и электронно-микроскопические исследования.

Установлено, что на протяжении первых 3-х суток ПРП очень сложно дифференцировать апоптоз и ишемический коагуляционный некроз нейронов, поскольку эти два разновидности гибели клеток имеют сходные микроскопические и ультраструктурные характеристики. Как показали электронно-микроскопические исследования, дифференциальным морфологическим признаком патогенно-индуцированного апоптоза нейрона в этом периоде реперфузионных повреждений головного мозга была сохранность ядрышка в пикнотизированном ядре с гофрированными контурами, в то время как при коагуляционном некрозе наблюдался глубокий пикноз ядра с отсутствием в нем ядрышка.

Ретроградное разрушение/дегенерация нейрона в ПРП начинается с ишемической деструкции органелл и миелиновой оболочки аксона или с сегментарного разрушения аксона в очаге перикапиллярного некроза. Эти изменения миелиновых оболочек аксонов четко выявлялись при окраске по Крутшау или по Эйнарсону. Далее, при отсутствии перинейронального астроцитарно-олигодендроглиального сателлитоза, нарастает «хроматолитический» – невосстановление полирибосом и гранулярной ЭПС в цитоплазме повреждённого нейрона, завершающийся ареактивным кариоцитолитическим разрушением нервной клетки.

В проведенных исследованиях установлено, что из первых минут после КС активировалась

адаптивно-метаболическая кооперация между глиальными клетками и нейронами. В первые минуты-часы после КС по данным электронной микроскопии между нейронами и перинейрональными олигодендроцитами выявлялось большое количество активных контактов, что способствовало дальнейшему структурно-функциональному восстановлению большинства поврежденных нейронов на протяжении первой недели после КС.

Основными условиями восстановления частично поврежденных нейронов с сохранным ядром и ядрышком после КС является развитие в раннем ПРП адаптивного перинейронального астроцитарно-олигодендроглиального сателлитоза с ИГХ-верифицированной экспрессией в глиальных клетках антиапоптотических молекул Bcl-X<sub>L</sub>. Также неперенным условием этого, по данным электронной микроскопии, является увеличение числа специализированных глио-нейронных контактов, лизосомальный аутофагоцитоз разрушенных цитоплазматических компонентов, а также восстановление необходимого количества митохондрий (благодаря подтверждённым исследованиям с использованием BrdU репарации митохондриальной ДНК), рибосом и ультраструктур ЭПС.

Показано, что при стойком невосстановлении кровотока возникает селективный некроз перикапиллярных нейронов или мелкие очаги перикапиллярного некроза нервной ткани, к которым мигрируют микроглиоциты и CD68+ макрофаги. Одновременно отмечается пролиферация недифференцированных глиальных клеток с их дифференциацией в олигодендроциты и астроциты. В периваскулярных скоплениях макрофагов на 5–9-е сутки ПРП появлялись фибриллообразующие астроциты, которые способствовали развитию на месте нейронных «выпадений» мелких очагов астроцитарного глиофиброза.

По результатам исследования определен минимальный комплекс патогистологических методик для выявления деструктивных и адаптивных изменений в головном мозге: окрашивание срезов гематоксилином и эозином, галоцианином по Эйнарсону, окрашивание миелина по Крутшау. Для углубленного изучения морфогенеза ПРЭ целесообразно применять ИГХ-маркирование про- и антиапоптотических белков, электронную микроскопию и импрегнационные методики.

**Ключевые слова:** постреанимационная энцефалопатия, селективная гибель нейронов, иммуногистохимические маркеры апоптоза, ретроградное разрушение, восстановление структуры нейронов.

## ANNOTATION

**Evseyev A.V. Morphogenesis of selective death and recovery of brain neurons at the postresuscitation encephalopathy. – Manuscript.**

Thesis is for application on scientific degree of the Medical Science Candidate in specialty 14.03.02 – Pathological anatomy. – Crimean State Medical University after S.I. Georgievsky Ministry of

Public Health of Ukraine, Simferopol, 2009.

The thesis contains results of complex neuromorphological researches of a brain of patients with PRE which defined features of selective death and restoration of brain neurons after AD for use in postmortem diagnostics.

It is defined, that during the first hours of PRP early ischemic changes of neurons show a swelling of mitochondrions that leads to activation of intrinsic pathways of an apoptosis. A neuronal apoptosis is stimulated by intrinsic mitochondrial factors (Bax) and by the activated domains of Fas-APO-receptors. Bax-induced apoptosis is blocked when protein Bcl-X<sub>L</sub> is expressed simultaneously.

The main types of neuronal selective death at the PRP are apoptosis, karyocytolysis, coagulative necrosis and retrograde destruction of neurons, which are developed through the postischemic-reperfusion and excitotoxic damages and permanent blood flow unrenewal in brain capillares.

The basic conditions of restoration of particulate damaged neurons is adaptive satellitosis development in early PRP with glial expression of Bcl-X<sub>L</sub> protein, augmentation of number of specialized glio-neuronal contacts, autophagocytosis of the blasted components and restoration of mitochondrions and other organelles.

The selective necrosis of pericapillare neurons or the small loci of perivascular necrosis of nervous tissue are developed at zones of permanent blood flow unrenewal with the subsequent development of the loci of gliofibrosis.

**Key words:** postresuscitation encephalopathy, neuronal selective death, immunohistochemical markers of apoptosis, retrograde destruction, neuronal structure recovery.

### ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

BrdU – бромдезоксидуридин

ЕПС (ЭПС, EPR) – ендоплазматична сітка

ІГХ (ИГХ, ІНС) – імуногістохімія, імуногістохімічний

КС (AD) – клінічна смерть

ПРЕ (ПРЭ, PRE) – постреанімаційна енцефалопатія

ПРП (PRP) – постреанімаційний період

ПРХ – постреанімаційна хвороба

ЦНС – центральна нервова система

Підписано до друку 06.04.2009. Гарнітура Times New Roman.

Папір друкарський. Формат 60x90/16. Умовн. друк. арк.0,9.

Наклад – 100 прим. Зам. № 4013

Надруковано з оригінал-макету в типографії

Запорізького державного медичного університету

м. Запоріжжя, пр. Маяковського, 26.