

О.О. Волошанська
С.І. Тертишний

Запорізький державний медич-
ний університет,
Запоріжжя, Україна

Надійшла: 22.11.2020

Прийнята: 12.12.2020

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2020.4.16-28>

УДК: 616.16+616.16-031.63]:616.831-005.1]-091.8-092.9

УЛЬТРАСТРУКТУРНІ ЗМІНИ В МІКРОСУДИНАХ І ПЕРИВАСКУЛЯР- НОМУ ПРОСТОРИ ПРИ ІНФАРКТІ ГО- ЛОВНОГО МОЗКУ В ЕКСПЕРИМЕНТІ

Voloshanska O.O. ✉, Tertyshnyi S.I.  Ultrastructural changes in the microvessels and perivascular space in cerebral infarction in the experiment.

Zaporizhzhia State Medical University, Zaporizhzhia, Ukraine.


ABSTRACT. Background. Ischemic stroke is the second most common cause of death after coronary heart disease and the most common cause of disability worldwide. Much of the recent basic research on stroke is concerned with the mechanisms underlying the dysfunction and adaptation of the neurovascular block, which includes the blood-brain barrier structures, microglia, neurons, and the extracellular matrix of the basement membrane. Isolated studies of recent years have been devoted to the issues of morphology and in particular the ultrastructure of the brain in ischemic injury. Meanwhile, only morphological studies can reveal the peculiarities of the response of cellular structures to the influence of various adverse factors. **Objective** – to investigate ultrastructural changes in the vessels of the brain and perivascular space in experimental ischemic heart attack. **Methods.** Experimental cerebral infarction was reproduced on 15 white Wistar rats by injection of a suspension of barium sulfate in sterile saline in a ratio of 1: 3 in the amount of 0.1 -0.3 ml. Three animals formed a control group. The material was collected in terms of: up to 3, 9, 12 days and more than 12 days from the beginning of the experimental action, followed by standard processing of the material for electron microscopy. **Results.** In the early stages of ischemic brain damage perivascular edema, destructive changes of capillaries with destruction of basement membranes are registered. Some microvessels undergo irreversible changes with deformation of the vascular lumen, pyknosis and lysis of endothelial nuclei, destruction and vacuolation of cytoplasmic structures, microvacuolation and edema of mitochondria with partial destruction of cristae and enlightenment of the mitochondrial matrix. In the endothelium with signs of coagulation processes in the cytoplasm and nucleus, changes in cell contacts were observed. Structural changes of vessels are combined with changes of perivascular processes of astrocytes. On days 9 and 12, the structure of the endothelium, perivascular astrocytes, and intercellular contacts are restored. Hyperplasia of intracytoplasmic structures, increase in mitochondria and length of cytoplasmic network are noted. In the cells of the perivascular environment and in the cytoplasm of pericytes a significant number of phagolysosomes is detected, in the long term in the perifocal areas of irreversible ischemic changes around the vessels is reparative astrogliosis. **Conclusion.** Ultrastructural changes of the microcirculatory part in the perifocal areas of ischemic lesions within 3 days are characterized by perivascular edema and destructive changes in the endothelium of capillaries and pericytes, damage to basement membranes, changes in cell contacts. After 9-12 days in the endothelium, the processes of intracellular regeneration increase, the ultrastructure of intercellular contacts is restored. A significant number of phagolysosomes is registered in the cells of the perivascular environment and in the cytoplasm of pericytes, and reparative astrogliosis is detected in the perifocal areas of irreversible ischemic changes around the vessels.

Key words: cerebral ischemia, microvessels, endothelium, pericytes, astrocytes.

Citation:

Voloshanska OO, Tertyshnyi SI. [Ultrastructural changes in the microvessels and perivascular space in cerebral infarction in the experiment]. *Morphologia*. 2020;14(4):16-28. Ukrainian.

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2020.4.16-28>

 Tertyshnyi S.I. 0000-0003-3856-4234

✉ oliasydmed@gmail.com; tertishnyi@i.ua

© SI «Dnipropetrovsk Medical Academy of the Ministry of Health of Ukraine», «Morphologia»

Вступ

Незважаючи на значні досягнення за останні десятиліття в питаннях вивчення інсульту, останній залишається актуальною проблемою сучасної медичної науки. Згідно з оцінками Global Burden of Diseases, щорічно від інсульту вмирає понад 5,5 мільйонів чоловік у всьому

світі, що робить його другою за частотою, після серцево-судинних захворювань, причиною смертності [1]. Важкими залишаються і наслідки інсульту от раннього моторного дефіцита до довгострокових когнітивних порушень [2, 3]. У відповідь на довгострокові зміни в умовах порушеної гемодинаміки, важливим адаптивним про-

цесом є судинне ремоделювання. Даний процес модулюється локально чинниками зростання, вазоактивними речовинами і гемодинамічними стимулами. В даний час активно вивчаються процеси, які лежать в основі ремоделювання судинного русла і які відіграють важливу роль у відновлювальному періоді мозкового інсульту. Як вказує низка авторів, розуміння механізмів, що лежать в основі ремоделювання судин після гострої ішемії головного мозку, є критичним кроком на шляху до розробки ефективних методів лікування ішемічного інсульту [4]. Значна частина досліджень останніх років з проблеми інсульту присвячена вивченню механізмів, які лежать в основі дисфункції і адаптації нервово-судинного блоку, який включає структури гематоенцефалічного бар'єру (ендотелій капілярів, перицити, астроцити), мікроглію, нейрони і позаклітинний матрикс базальної мембрани [5-7]. Питанням морфології і зокрема ультраструктури мозку при ішемічному пошкодженні присвячені поодинокі дослідження останніх років [8, 9]. Тим часом тільки морфологічні дослідження можуть розкрити особливості реакції клітинних структур на вплив різних несприятливих факторів.

Мета

Дослідити ультраструктурні зміни в судинах головного мозку і периваскулярному просторі при експериментальному ішемічному інфаркті.

Матеріали та методи

Експериментальний інфаркт мозку відтворювався на 15 білих щурах лінії Вістар. Попередньо тваринам проводився розріз м'яких тканин на ший, виділялась права сонна артерія і інсуліновим шприцом інтраартеріально проводилась ін'єкція суспензії сульфату барію в стерильному фізіологічному розчині в пропорції 1: 3 в кількості 0,1 -0,3 мл. Зазначену методику використовували низка авторів при вивченні ішемічного інсульту в експерименті [10]. Три інтактних білих щурів склали групу контрольних тварин. Всі маніпуляції на тваринах проводились під внутрішньоочеревинним наркозом тіопенталом натрію з розрахунку 20 мг на 1 кг маси тварини. Тварини були забиті в терміни: до 3, 9, 12 діб і понад 12 діб від початку експериментальної дії (по 3 спостереження на кожний термін). Забій проводився шляхом декапітації під тіопенталовим наркозом (5 мг /1мл фіз.розчину). Дослідження на білих щурах були проведені з дотриманням Національних «Загальних етичних принципів експериментування тварин» (Україна, 2001), згідно з Директивою 2010 / 63EU Європейського Парламенту та Ради від 22 вересня 2010 р. щодо захисту тварин, які використовуються в наукових цілях.

Електронномікроскопічне дослідження перифокальних областей ішемічного інфаркту в експерименті проводилось за загально прийнятим методикам. Час узяття матеріалу для елек-

тронно-мікроскопічного дослідження складав до 5 хвилин. Кусочки тканини мозку відповідних участків мозку подрібнювались в краплі 2,5% глютаральдегіду на 0,1М фосфатному буфері при рН 7,4 шматочки мозку фіксувались в аналогічному розчині 2 години при $t = +4^{\circ}\text{C}$. Після відмивання фіксатора у фосфатному буфері матеріал обробляли в продовж 2 годин в 1% розчині OsO_4 , виготовленому на фосфатному буфері. В подальшому проводили дегідратацію в спиртах висхідної концентрації і контрастували 2 години в 2% розчині уранілацетату на 70° спирті. Далі матеріал зневоднювали і заливали в епон. Етапи обробки матеріалу для проведення електронно-мікроскопічного дослідження детально викладені у відповідному керівництві [11].

На ультратоме Reichert Om43 одержували напівтонкі (1-2 мкм) і ультратонкі (50-60 нм) зрізи. Напівтонкі зрізи забарвлювались метиленовим синім. Ультратонкі зрізи контрастували спиртним розчином уранілацетату (10 мін при 56°C) і цитратом свинцю за методом E.Reynolds протягом 30 хвилин при кімнатній температурі. Ультратонкі зрізи вивчали в електронному мікроскопі ПЕМ-100 при прискорюючій напрузі 75 кВ.

На ультратонких зрізах при збільшенні 7500 обчислювали товщину базальної мембрани в умовних одиницях (УО). Статистичну обробку отриманих даних проводили за допомогою пакета Statistica® for Windows 13.0 (StatSoft Inc., ліцензія № JPZ8041382130ARCN10-J) з обчисленням медіани (Me), нижнього і верхнього квартилей (Q1; Q3). Оцінку відмінностей між двома незалежними вибірками проводили за допомогою U-критерію Манна-Уїтні. Статистично значущими вважались відмінності між порівнюваними значеннями на рівні 95 % ($p < 0,05$).

Результати

В контрольних спостереженнях на ультратструктурному рівні в ендотеліальних клітинах відзначалися чіткі контури ядра. У нуклеоплазмі найчастіше містилися ущільнені зони гетерохроматину, розташовані біля краю ядерної мембрани і дрібні скупчення дифузно розташованих інтерхроматинових гранул. Цитоплазма клітин містила основний набір цитоплазматичних мембранних структур. Базальна мембрана судин була однорідною і мала чіткі контури на всьому протязі капілярів. З боку паренхиматозної частини до базальної мембрани щільно прилягали елементи нейропіля, які також мали чіткі контури. У просвіті капілярів в контрольних спостереженнях практично завжди містилися незмінені еритроцити, що було важливою ознакою ефективності кровотоку саме в судинах мікроциркуляції. Перицити капілярів мали більш велике і округле ядро в порівнянні з ендотеліальними клітинами, ядро яких, як правило, мало подовжений вигляд і вузьку смужку цитоплазми (рис.1).

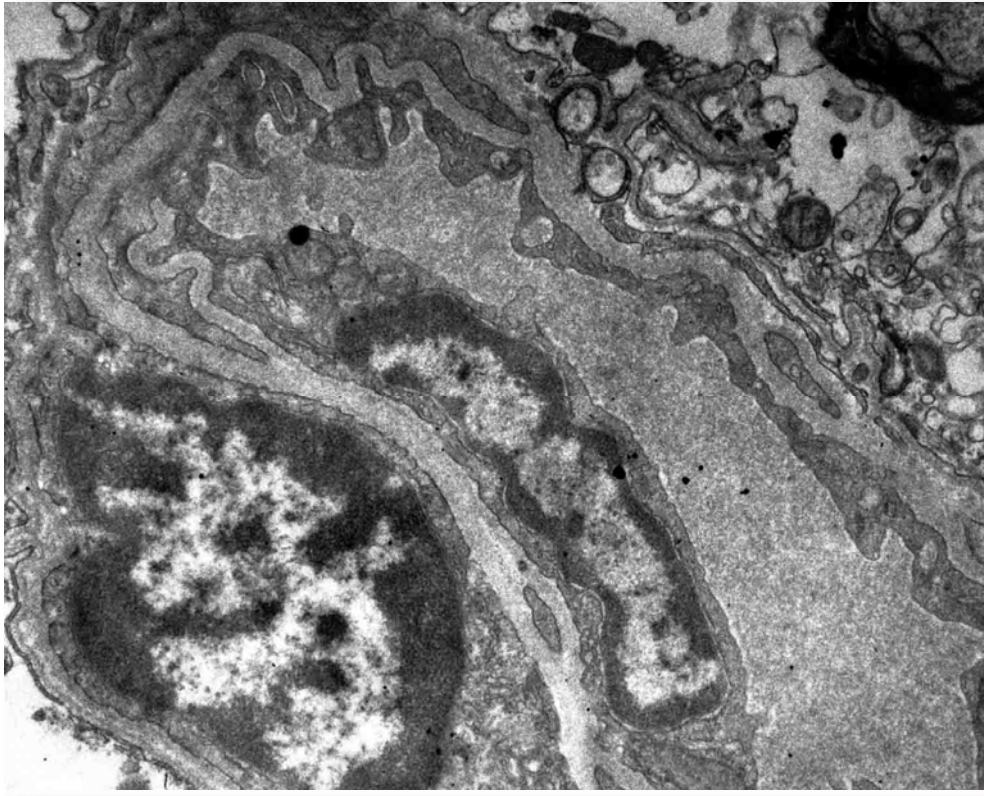


Рис. 1. Ультраструктура капіляра в контрольному спостереженні. Ядро ендотелію і ядро перицита (зліва внизу). ×6000.

Периваскулярні астроцити, які є складовою структурою гематоенцефалічного бар'єру, характеризувалися досить щільним розташуванням цитоплазматичних структур, поширеною мережею гранулярної ендоплазматичної мережі з великою кількістю рибосом, що свідчило про активні біосинтетичні процеси.

Розвиток експериментального інфаркту мозку з першої доби супроводжувався периваскулярним набряком, який реєструвався до 3 діб спостереження з подальшим його зниженням, однак в одиничних спостереженнях набрякові зміни реєструвався нами на 9 добу експерименту. В зоні інфаркту і в меншій мірі на кордоні з інфарктним ядром відзначалися деструктивні зміни капілярів з руйнуванням базальних мембран, що свідчило про їх незворотне пошкодження. Однак ушкодження базальних мембран капілярів не мало поширений характер, частіше відзначалися незначні осередки у вигляді дрібних ділянок лізису або розривів. У експериментальних тварин з більш тяжким перебігом, реєструвалися значні ділянки руйнування базальної мембрани по периметру судин. У таких спостереженнях, як правило, відзначалися ділянки нерівномірної товщини базальних мембран по периметру судини, реєструвалася нерівномірна електронна щільність, нечіткість і розмиття контурів мембрани, поява дрібних неправильної форми електроннощільних включень в її товщі.

На окремих ділянках повністю стиралися межі ендотеліальної поверхні базальних мембран (рис.2). Прилеглий до цих ділянок ендотелій характеризувався деструктивними змінами з руйнуванням цитоплазматичних структур, порушенням щільних контактів між окремими клітинами, які практично не диференціювалися або характеризувалися нерівномірною значною електронною щільністю.

З паренхиматозного боку ділянки ушкодження базальних мембран поєднувалися з ушкодженнями перицитів різного ступеня тяжкості. В цитоплазмі перицитів виявлялися великі вакуолі не пов'язані з цитоплазматичними структурами, а також дрібні вакуолі, які формувалися внаслідок розширення канальців і цистерн ендоплазматичної мережі і комплексу Гольджі. У цитоплазмі перицитів також реєструвалася поява дрібних електронно-щільних утворень і ущільнення мітохондріального матриксу (рис.3). Останнє свідчило про гостре зниження енергетичних можливостей клітини. Поряд з цим можна відзначити, що в ядрах перицитів патологічні зміни були виражені значно менше ніж в ядрах ендотелію. Пошкодження базальних мембран у всіх спостереженнях поєднувалося з наростанням периваскулярного набряку. Формування значних зон вазогенного набряку з ізолюванням судин від навколишнього нейропіля, посилювало деструктивні зміни в мікросудинах з формуван-

ням незворотніх змін в ендотелії і базальних мембранах. У периваскулярному просторі були наявні зруйновані структури нейропілія у вигляді безструктурного пластівчастого матеріалу різної електронної щільності. У випадках значного

пошкодження базальної мембрани, що спостерігалося в поодиноких спостереженнях, в окремих полях зору поряд з набряком відзначалася геморагічна інфільтрація периваскулярного простору.

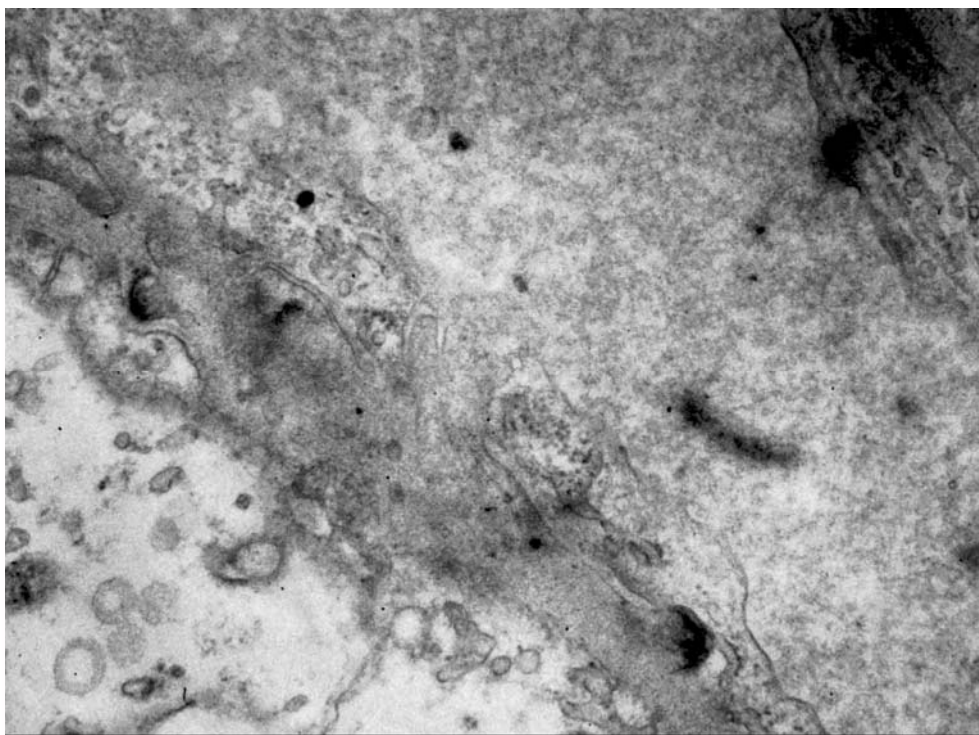


Рис. 2. Деструктивні зміни в ендотелії (термін 3 доби), руйнування базальної мембрани, лізис цитоплазматичних мембранних структур ендотеліоциту. $\times 15000$.

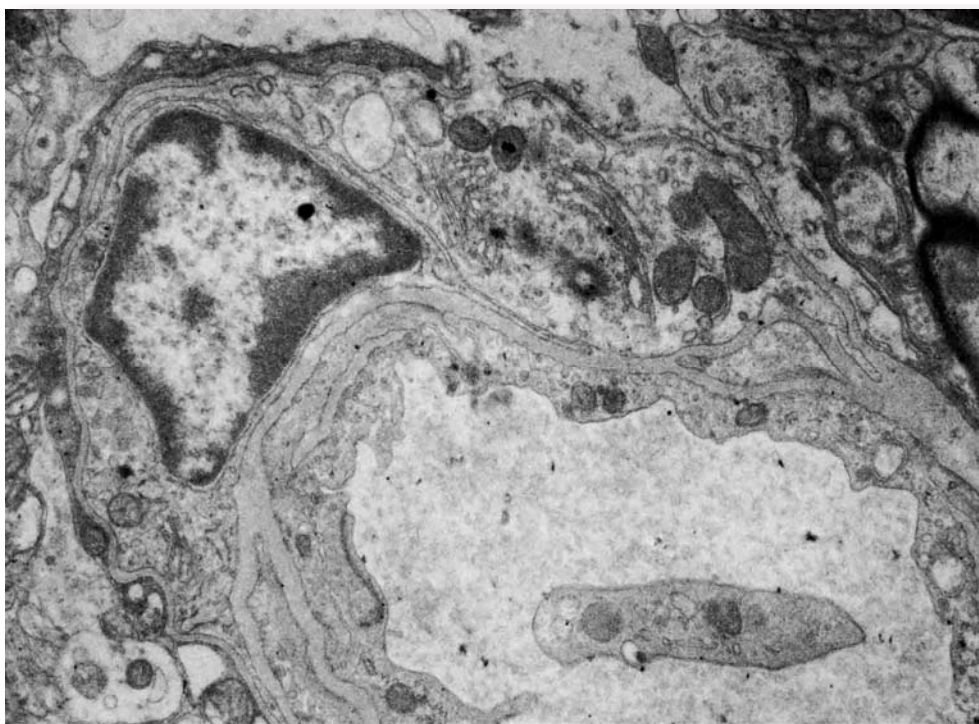


Рис. 3. Осередкове руйнування базальної мембрани з паренхіматозного боку. Деструктивні зміни в перициті (термін 3 доби). В просвіті судини тромбоцит. $\times 15000$.

Безпосередньо на кордоні з інфарктом частина мікросудин піддавалася незворотнім змінам. Відзначалася значна деформація просвіту судин, в ендотелії рееструвався пікноз ядер, які набували неправильну форму, зазначалося

руйнування і вакуолізація внутрішньоцитоплазматичних структур (рис.4). Надалі відбувався лізис ядра, просвіт судини набував щільну форму.

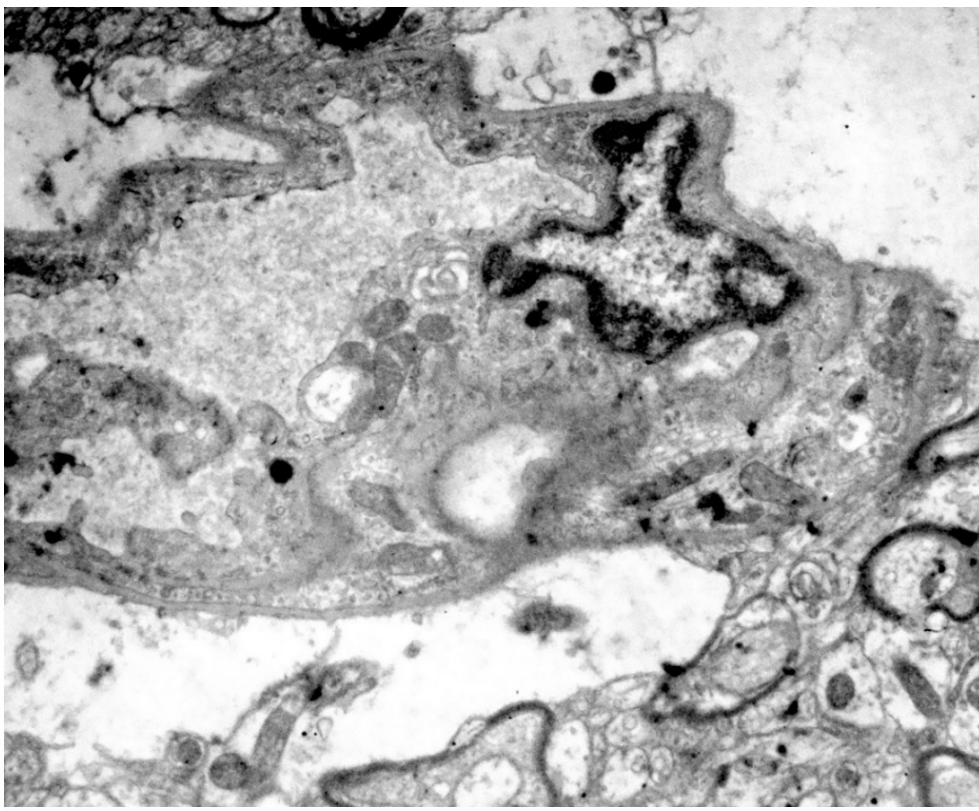


Рис. 4. Пікноз ядра ендотелія, руйнування цитоплазматичних структур, периваскулярний набряк. Термін спостереження 3 доби. $\times 6000$.

Ядра перицитів при цьому могли тривалий період залишатися в малозміненому вигляді. Такі зміни на світлооптичних препаратах розцінювалися як спадіння судин. В судинах, які перебували в такому стані відзначалася вакуолізація цитоплазматичного сектора ендотелію. Дрібні вакуолі на окремих ділянках досить щільно прилягали один до одного, люмінальна поверхня ендотелію на окремих ділянках була повністю зруйнована. Ділянки вакуолізації зустрічалися і в товщі базальної мембрани, яка мала нерівномірну товщину і електронну щільність. У таких спостереженнях просвіт судини був заповнений пластівчастим матеріалом зруйнованих структур - мембранних і цитоплазматичних, які мали різну електронну щільність (рис. 5).

Кількісні дослідження показали, що товщина базальної мембрани в контрольних спостереженнях і на 3 добу експерименту становила відповідно 14,75 (12,5; 18) і 19,9 (17,14; 21,26) УО. Оцінка відмінностей за допомогою U-критерію Манна-Уїтні показав що відмінності рівня ознаки в порівнюваних групах статистично значущі ($p < 0,05$). На 9 і 12 добу товщина ба-

зальної мембрани судин в перифокальних зонах ішемічного ураження практично не відрізнялась від контрольних спостережень.

Поряд з деструктивними змінами внутрішньоклітинних структур відзначалися зміни з боку клітинних контактів. Незважаючи на те, що більшість контактів між клітинами зберігали свою структуру, навіть при значному периваскулярному набряку, на окремих ділянках такі контакти мали нерівномірну електронну щільність (рис. 6). Такі міжклітинні контакти спостерігалися здебільшого в клітинах з переважанням процесів коагуляції в цитоплазмі і ядрі. Ядра ендотелію в таких клітинах зменшувалися в розмірах, збільшувалася ступінь конденсації хроматину, зазначалося перинуклеарне просвітління цитоплазми, електронна щільність базальної мембрани значно зменшувалася, проте зберігалися її чіткі контури. Такі зміни зустрічались як через 3 доби так і на 9 добу експерименту.

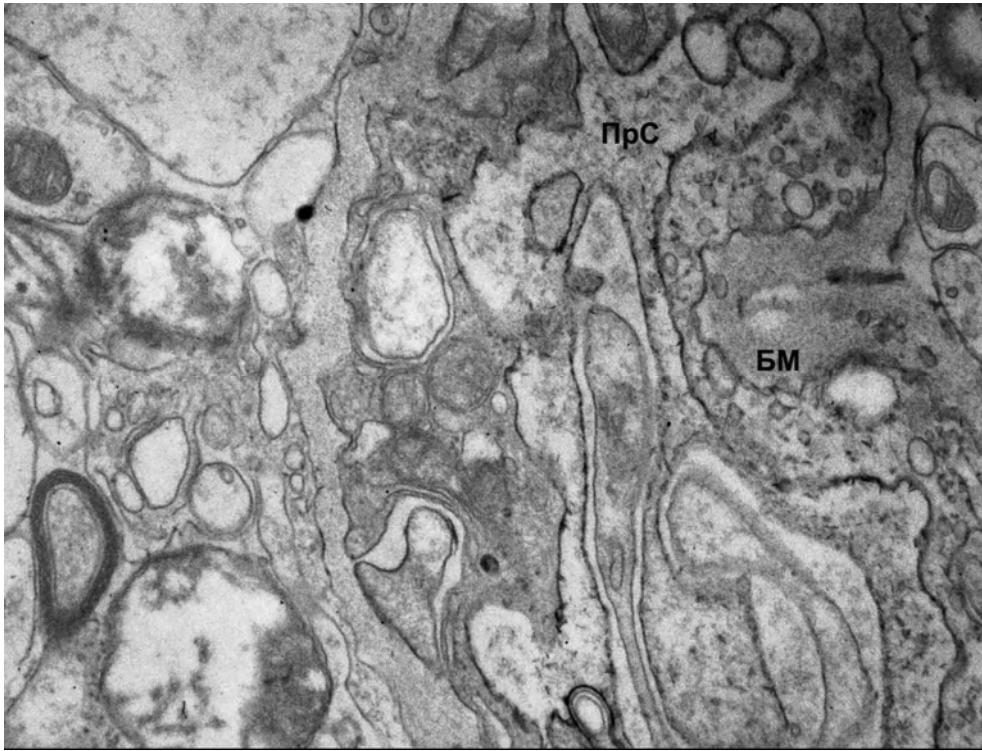


Рис. 5. Спадіння судини. Умовн. позн. ПрС – просвіт судини, БМ – базальна мембрана. ×15000.

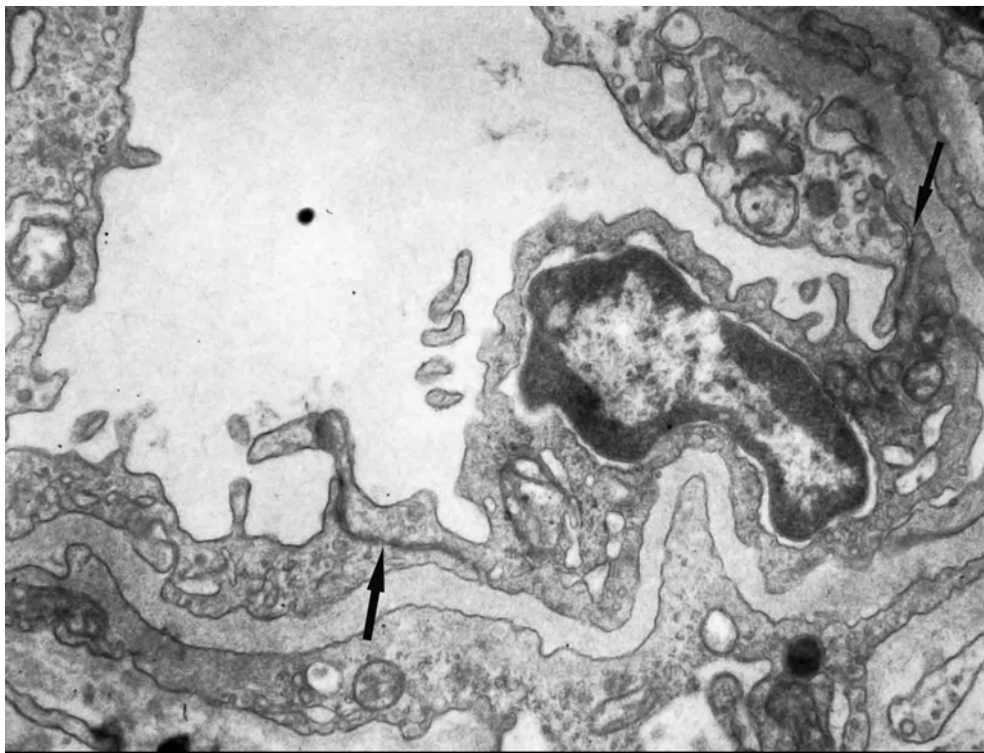


Рис. 6. Пікноз ядра ендотелію. Щільний контакт між ендотеліальними клітинами (показано стрілками). ×9000.

Виразені набряклі зміни внутрішньоцитоплазматичного сектора ендотелію супроводжувалися значною мікровакуолізацією, набуханням мітохондрій з частковим руйнуванням крист

і просвітлінням мітохондріального матриксу (рис. 7). При таких змінах ендотелію зазначалося і роз'єднання міжклітинних з'єднань, що було передумовою до значного підвищення проник-

ності капілярів. Між окремими ендотеліальними клітинами в зонах контактів чітко простежували-

ся ділянки нерівномірного розширення.

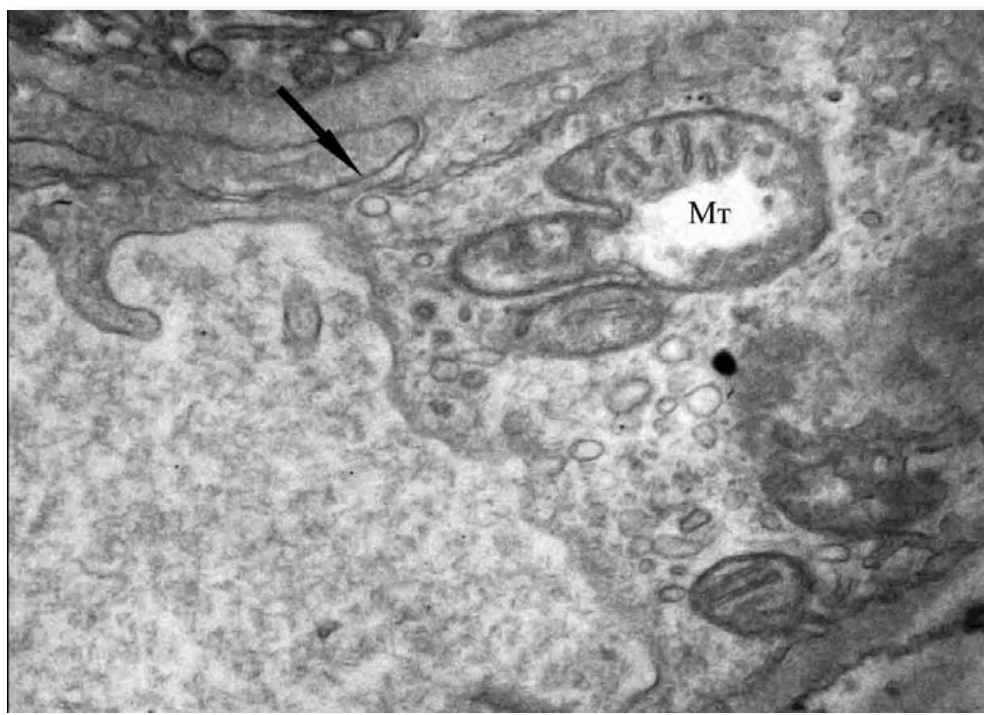


Рис. 7. Розширення контактів між ендотеліальними клітинами, виражені структурні зміни мітохондрій (Мт). $\times 15000$.

Структурні зміни з боку судин поєднувалися зі змінами периваскулярних відростків астроцитів. Зазначалося їх значне розширення, такі відростки часто містили вакуолі або уривки мембран зруйнованих структур, набрякли мітохондрії. Однак слід зазначити, що вираженість змін периваскулярних астроцитарних відростків не завжди корелювала з виразністю змін в ендотелії і порушеннями мікроциркуляції в судинах які з ними контактували. Так при відсутності вираженого периваскулярного набряку нами спостерігалися значні ультраструктурні зміни в ендотелії і навпаки. Реактивні зміни в астроцитах перш за все проявлялися вакуолізацією ультраструктур. Рееструвалася вакуолізація цистерн комплексу Гольджі (рис. 8), що відображала його дисфункцію і опосередковано свідчила про порушення процесів накопичення, транспортування і виведення речовин з клітини. Окремі вакуолі різної величини вільно розташовувалися в цитоплазмі. Це була найбільш рання реакція на гіпоксичне пошкодження. В таких клітинах зберігалася структура ядра, зернистої ендоплазматичної мережі, зберігалася чіткість мембран, визначався тільки помірний набряк мітохондрій. В подальшому наростання деструктивних змін призводило до значної редукції гранул цитоплазматичної РНК, фрагментарному лізису ядерної і мітохондріальної мембран, наявності ядерних інвагінацій.

Порушення кровообігу в мікросудинах, по-

ряд з руйнуванням частини мікрокапілярів, було обумовлено значним набуханням ядра, що призводило до значного звуження просвіту капілярів, аж до повного їх закриття (рис.9). Ядра ендотелію при цьому значно збільшувалися в обсязі, набували часто неправильну форму, відзначалася вакуолізація ядра, формувалися інвагінації каріолеми. При цьому просвіт капілярів значно звужувався, в окремих спостереженнях практично не виявлявся. Якщо набряк прогресував, деструктивні зміни посилювалися, периваскулярний набряк астроцитарних відростків трансформувався в великі зони вазогенного набряку, який ізолював капіляри від навколишнього нейропіля. У таких капілярах відзначалися незворотні зміни з боку ендотелію і базальної мембрани, яка нагадувала дрібногранулярний детрит, контури мембрани були стертими. В периваскулярному просторі знаходилися зруйновані структури нейропіля.

На 9 і 12 добу структура більшості ендотеліальних клітин і периваскулярних астроцитів відновлювалася (рис. 10 А). В клітинах виявлялася гіперплазія внутрішньоцитоплазматичних структур, значно збільшувалися мітохондрії і довжина цитоплазматичної мережі, відновлювалася ультраструктура міжклітинних контактів. Характерними змінами в ці терміни була наявність значної кількості фаголізосом в клітинах навколосудинного оточення і в цитоплазмі періцитів (рис.10 Б).

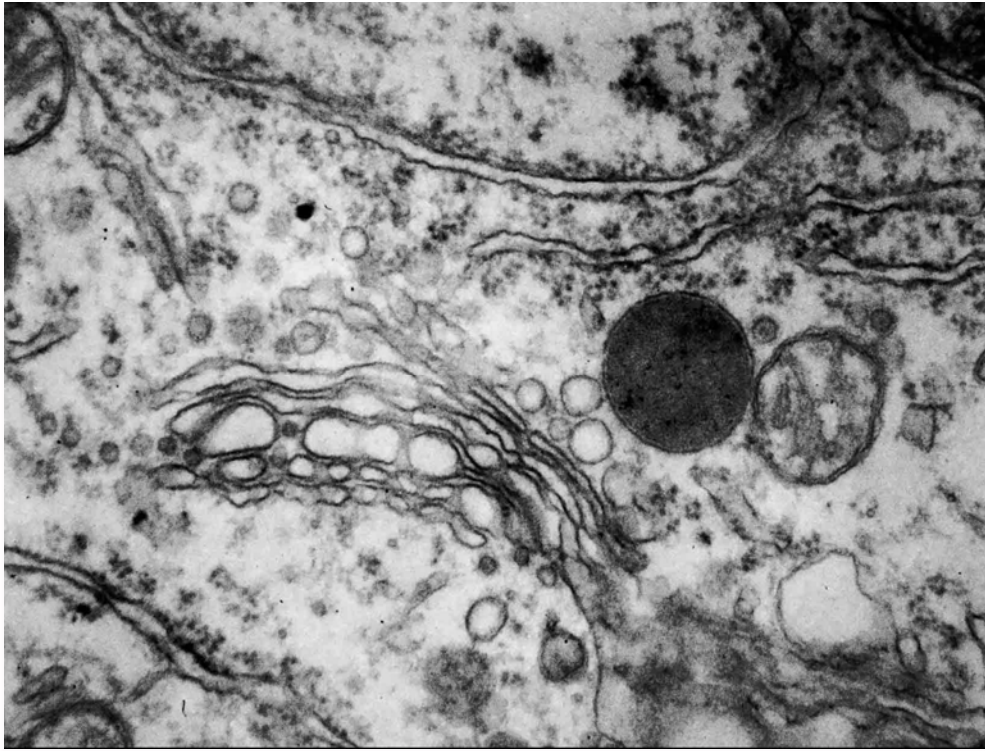


Рис. 8. Вакуолізація цистерн комплексу Гольджі в астроциті. $\times 22000$.

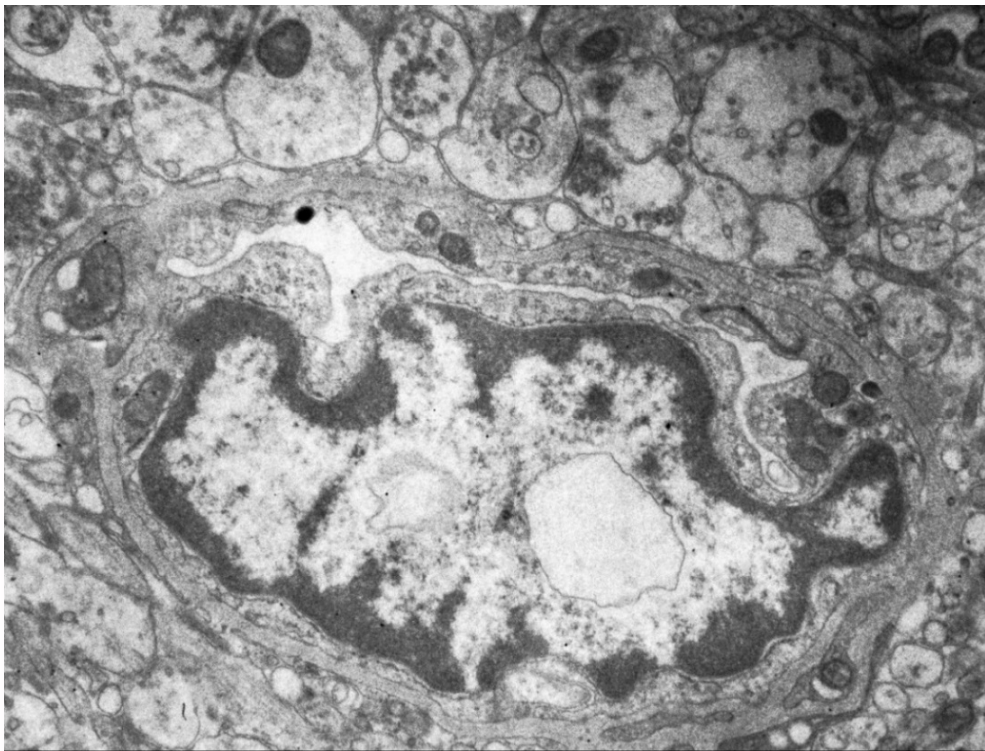


Рис. 9. Набухання ядра з його вакуолізацією і значним зменшенням просвіту судини. Термін спостереження 3 доби. $\times 7500$.

На 12 добу і більш пізні терміни навколо судин виявлялася значна кількість фібрилярних структур (рис. 11), що свідчило про склеротичні

процеси і можливо репаративний астрогліоз в перифокальних участках незворотніх ішемічних змін.

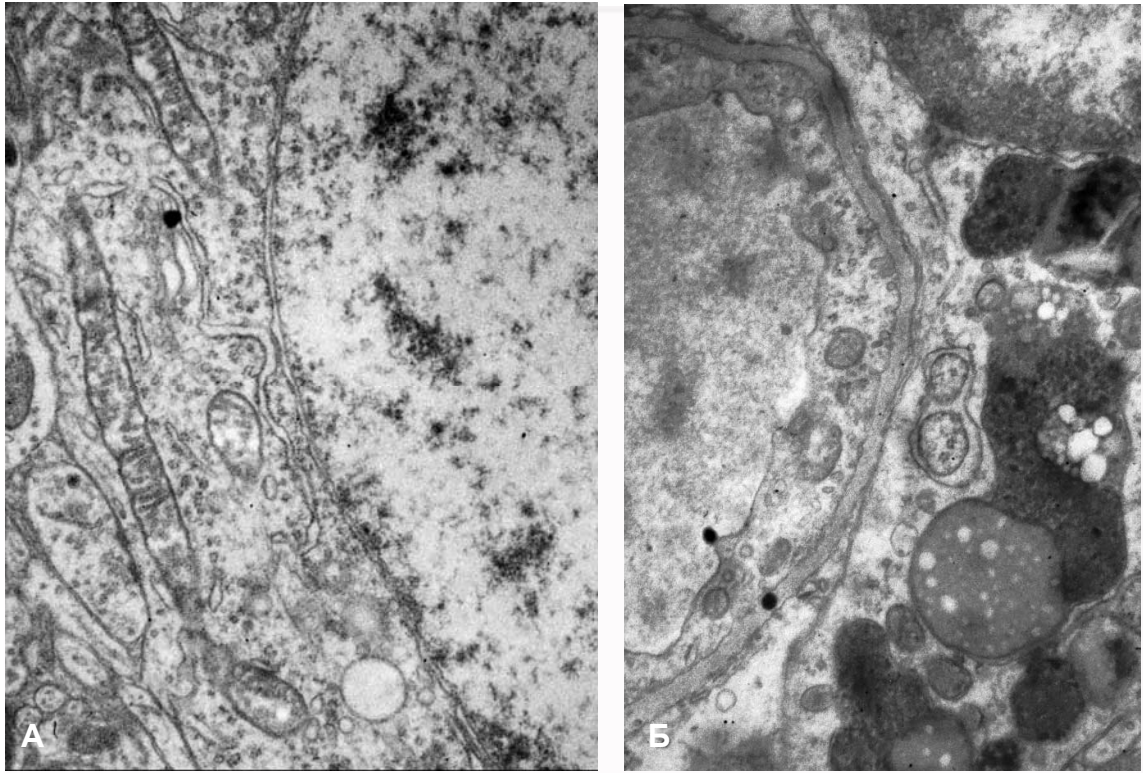


Рис. 10. А - Гіперплазія цитоплазматичних структур астроцита. Б – Накопичення фаголізосом в периваскулярному просторі. Термін спостереження 9 діб. ×9000.



Рис. 11. Фібрилярні структури в периваскулярному просторі перифокальної зони ішемічного ушкодження. Термін спостереження 12 діб. ×7500.

Обговорення

Ультраструктурне вивчення в експерименті стану мікроциркуляторного русла і навколосу-

динного простору підтвердило основні тенденції процесів судинного ремоделювання в різні терміни хвороби, які були описані раніше при

вивченні світлооптичних препаратів [12]. Однак була отримана більш повна характеристика стану як ендотелію, перицитів, так і навколишнього нейропілія.

Вивчення ультраструктури капілярів показало, що зміни в ранньому періоді ішемічного ушкодження характеризуються внутрішньо-оклітинним і периваскулярним набряком. Розвиток набряку ендотелію, як вказує ряд авторів, при експериментальній вогнищевій ішемії головного мозку спостерігається вже через 30 хвилин [13], при цьому в ендотелії артерій і капілярів реєструються аналогічні по тяжкості ультраструктурні ушкодження. У процес також залучені і астроцити як важливий компонент гематоенцефалічного бар'єру. Вважається, що після гострого пошкодження головного мозку ендотеліальні клітини і астроцити піддаються програмі пре- і посттранскрипційних змін активності іонних каналів і переносників. Ці зміни можуть призвести до дезадаптивного переносу іонів та виникнення аномальних осмотичних сил, які, як правило, проявляються у вигляді набряку мозку [14]. З боку ендотелію нами відзначався пікноз ядер, руйнування і вакуолізація внутрішньоцитоплазматичних структур, набухання мітохондрій з руйнуванням крист і просвітлінням мітохондріального матриксу. Аналогічні зміни ендотелію можна зустріти в роботах по вивченню ультраструктури мозку при ішемічному пошкодженні [8].

Виразені набряклі зміни, структурні зміни ендотелію, а також перицитів спостерігалися нами в перифокальних ділянках ішемічного ушкодження і поєднувалися з ушкодженнями базальних мембран. Пошкодження базальних мембран проявлялися у вигляді ділянок нерівномірної товщини і електронної щільності, визначавши нечіткість і розміття контурів, наявність електроннощільних включень в її товщі. Подібні ультраструктурні зміни після ішемії описані в роботі Nahirney P.C зі співавт. [15]. При цьому автори вказують, що розширення базальної мембрани тісно пов'язане зі ступенем ішемії. Механізми пошкодження базальних мембран до теперішнього часу активно вивчаються. Так з'ясовано, що після інсульту відзначається підвищена продукція запальних цитокінів, активних форм азоту і кисню, що може запускати секрецію MMP-9 і активацію про-MMP-9, які ймовірно здатні зв'язувати основні білки базальної мембрани, такі як фібронектин, колаген IV і ламінін і специфічно їх перетравлювати [16]. Пошкодження базальних мембран проявляється досить рано після розвитку інсульту, в терміні від 24 до 72 годин [17], що також зазначається в наших спостереженнях.

Поряд зі структурними змінами ендотелію нами відзначено порушення контактів между окремими клітинами. Незважаючи на те, що по-

рушення міжклітинних контактів асоціюється з прогресуванням набряку мозку більшість контактів між ендотеліальними клітинами в наших спостереженнях зберігали свою структуру, даже при значному периваскулярному набряку. В експериментальних дослідженнях низкою авторів доведено, що щільні з'єднання між клітинами залишаються неушкодженими до 24 годин після інсульту, не дивлячись на те, що підвищення проникності судин з розвитком набряку відзначається протягом 6 годин. Тому підвищення судинної проникності автори пов'язують не з порушенням щільних контактів, а зі збільшенням ендотеліальних везикул, ідентифікованих як кавеолі [18]. Останні в своєму складі мають білки рецептор-незалежного ендозитозу - кавеоліні. Вважається, що саме кавеоліні відіграють важливу роль в регуляції проникності гематоенцефалічного бар'єру [19].

На 9 і 12 добу структура ендотеліальних клітин і периваскулярних астроцитів відновлюється. Зазначаються процеси внутрішньо-оклітинної гіперплазії ультраструктур, відновлюється ультраструктура міжклітинних контактів. Наявність значної кількості фаголізосом в клітинах навколосудинного оточення і в цитоплазмі перицитів свідчило про активацію фагоцитарної активності в мозку і зміщення фагоцитарних клітин до функціонуючих капілярів. На фагоцитарну активність астроцитів і перицитів після інсульту вказують численні роботи останніх років [20, 21, 22].

На 12 добу і більш пізні терміни навколо судин виявлялась значна кількість фібрилярних структур, що свідчило про склеротичні процеси і репаративний астрогліоз в перифокальних участках незворотніх ішемічних змін. Функціональна оцінка таких змін досить суперечлива в наукових джерелах. З одного боку вважається, що гліальний рубець який утворюється в зонах ішемічного ураження сприяє посиленню запалення, створюючи токсичне мікрооточення, яке гальмує міграцію аксонів і перешкоджає довгостроковому відновленню рухової функції. З іншого боку реактивний астрогліоз може мати позитивний ефект, запобігаючи розширенню ішемічного ядра, а також здійснюючи позитивний вплив на неврологічне відновлення після інсульту [23, 24]. Так в роботі K. Nakayama зі співавт. показано, що реактивні астроцити які розташовані в зоні ішемічної півтини можуть суттєво поліпшити ремоделювання судин нервової системи і, таким чином, сприяти функціональному відновленню після інсульту [25].

Висновки

1. Ультраструктурні зміни мікроциркуляторного русла в перифокальних зонах ішемічного ураження впродовж 3 діб характеризуються периваскулярним набряком, деструктивними змінами ендотелію капілярів і перицитів у ви-

гляді вакуолізації цистерн ендоплазматичної мережі, комплексу Гольджі, ущільненням мітохондріального матриксу, а також ушкодженням базальних мембран.

2. Незворотні зміни мікросудин характеризувалися деформацією їх просвіту, руйнуванням і вакуолізацією внутрішньоцитоплазматичних структур, пікнозом ядер з подальшим їх лізісом. Зміни з боку клітинних контактів спостерігалися в клітинах з переважанням процесів коагуляції в цитоплазмі і ядрі.

3. В периваскулярних відростках астроцитів визначається значне розширення, однак вираженість цих змін не завжди корелювала з виразністю змін в ендотелії і порушеннями мікроциркуляції в судинах які з ними контактували.

4. У віддалені терміни (9, 12 діб) в ендотелії виявлялась гіперплазія цитоплазматичних структур, збільшення об'єму мітохондрій, довжини цитоплазматичної мережі, відновлювалась ультраструктура міжклітинних контактів. В клітинах навколосудинного оточення і в цито-

плазмі перицитів реєструвалась значна кількість фаголізосом. На 12 добу і більш пізні терміни в перифокальних участках незворотніх ішемічних змін навколо судин виявляється репаративний астрогліоз.

Перспективи подальших досліджень в цьому напрямку передбачають більш глибоке вивчення ультраструктурних проявів відновлення структур мікроциркуляторного русла при ішемічних ураженнях мозку в тому числі для оцінки ефективності проведеної терапії при ішемічних ураженнях мозку.

Інформація про конфлікт інтересів

Потенційних або явних конфліктів інтересів, що пов'язані з цим рукописом, на момент публікації не існує та не передбачається.

Джерела фінансування

Дослідження проведено в рамках науково-дослідної теми «Морфогенез деструктивно-репаративних процесів головного мозку при захворюваннях судинного та токсико-метаболического генезу» (номер державної реєстрації 0118U004253).

Літературні джерела References

1. GBD 2016 Stroke Collaborators. Global, regional, and national burden of stroke, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Neurol.* 2019 May;18(5):439-58. doi: 10.1016/S1474-4422(19)30034-1. Epub 2019 Mar 11. PMID: 30871944; PMCID: PMC6494974.

2. Freitas-Andrade M, Raman-Nair J, Lacoste B. Structural and Functional Remodeling of the Brain Vasculature Following Stroke. *Front Physiol.* 2020 Aug 7;11:948. doi: 10.3389/fphys.2020.00948. PMID: 32848875; PMCID: PMC7433746.

3. Donkor ES. Stroke in the 21st Century: A Snapshot of the Burden, Epidemiology, and Quality of Life. *Stroke Res Treat.* 2018 Nov 27;2018:3238165. doi: 10.1155/2018/3238165. PMID: 30598741; PMCID: PMC6288566.

4. Nishijima Y, Akamatsu Y, Weinstein PR, Liu J. Collaterals: Implications in cerebral ischemic diseases and therapeutic interventions. *Brain Res.* 2015 Oct 14;1623:18-29. doi: 10.1016/j.brainres.2015.03.006. Epub 2015 Mar 11. PMID: 25770816; PMCID: PMC4567541.

5. Liberale L, Gaul DS, Akhmedov A, Bonetti NR, Nageswaran V, Costantino S, Pahla J, Weber J, Fehr V, Vdovenko D, Semerano A, Giacalone G, Kullak-Ublick GA, Sessa M, Eriksson U, Paneni F, Ruschitzka F, Montecucco F, Beer JH, Lüscher TF, Matter CM, Camici GG. Endothelial SIRT6 blunts stroke size and neurological deficit by preserving blood-brain barrier integrity: a translational study. *Eur Heart J.* 2020 Apr 21;41(16):1575-87. doi:

10.1093/eurheartj/ehz712. PMID: 31603194.

6. Cai W, Liu H, Zhao J, Chen LY, Chen J, Lu Z, Hu X. Pericytes in Brain Injury and Repair After Ischemic Stroke. *Transl Stroke Res.* 2017 Apr;8(2):107-121. doi: 10.1007/s12975-016-0504-4. Epub 2016 Nov 12. PMID: 27837475; PMCID: PMC5350040.

7. Kang M, Yao Y. Basement Membrane Changes in Ischemic Stroke. *Stroke.* 2020 Apr;51(4):1344-1352. doi: 10.1161/STROKEAHA.120.028928. Epub 2020 Mar 3. PMID: 32122290; PMCID: PMC7101058.

8. Haley MJ, Lawrence CB. The blood-brain barrier after stroke: Structural studies and the role of transcytotic vesicles. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2017 Feb;37(2):456-470. doi: 10.1177/0271678X16629976. Epub 2016 Jul 21. PMID: 26823471; PMCID: PMC5322831.

9. Nahirney PC, Reeson P, Brown CE. Ultrastructural analysis of blood-brain barrier breakdown in the peri-infarct zone in young adult and aged mice. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2016 Feb;36(2):413-25. doi: 10.1177/0271678X15608396. Epub 2015 Oct 2. PMID: 26661190; PMCID: PMC4759675.

10. Lychko VS, Malakhov VA, Potapov AA. [Morphological changes in brain tissue in rats with an experimental model of ischemic stroke in the dynamics of treatment with the immunobiological drug cryocell-cryocord]. *Modern technologies in medicine.* 2015;7(4):58-63. Russian

11. Sarkisov DS, Perov YL [Microscopic

technique: Manual]. Moskva: Medicine, 1996. 544 p. Russian

12. Voloshanska OO., Tertyshnyi SI. [Pathomorphological changes of the vascular bed and the state of collateral blood flow in cerebral infarction]. *Pathologia*. 2020;2(49):234-40. Ukrainian. DOI: <https://doi.org/10.14739/2310-1237.2020.2.212808>

13. Krueger M, Mages B, Hobusch C, Michalski D. Endothelial edema precedes blood-brain barrier breakdown in early time points after experimental focal cerebral ischemia. *Acta Neuropathol Commun*. 2019 Feb 11;7(1):17. doi: 10.1186/s40478-019-0671-0. PMID: 30744693; PMCID: PMC6369548.

14. Stokum JA, Gerzanich V, Simard JM. Molecular pathophysiology of cerebral edema. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2016 Mar;36(3):513-38. doi: 10.1177/0271678X15617172. Epub 2015 Nov 16. PMID: 26661240; PMCID: PMC4776312.

15. Nahirney PC, Reeson P, Brown CE. Ultrastructural analysis of blood-brain barrier breakdown in the peri-infarct zone in young adult and aged mice. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2016 Feb;36(2):413-25. doi: 10.1177/0271678X15608396. Epub 2015 Oct 2. PMID: 26661190; PMCID: PMC4759675.

16. Thomsen MS, Routhe LJ, Moos T. The vascular basement membrane in the healthy and pathological brain. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2017 Oct;37(10):3300-3317. doi: 10.1177/0271678X17722436. Epub 2017 Jul 28. PMID: 28753105; PMCID: PMC5624399.

17. Yao Y. Basement membrane and stroke. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2019 Jan;39(1):3-19. doi: 10.1177/0271678X18801467. Epub 2018 Sep 18. PMID: 30226080; PMCID: PMC6311666.

18. Reeson P, Tennant KA, Gerrow K, Wang J, Weiser Novak S, Thompson K, Lockhart KL, Holmes A, Nahirney PC, Brown CE. Delayed inhibition of VEGF signaling after stroke attenuates blood-brain barrier breakdown and improves functional recovery in a comorbidity-dependent manner. *J Neurosci*. 2015 Apr 1;35(13):5128-43. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2810-14.2015. PMID: 25834040; PMCID: PMC6705411.

19. Choi KH, Kim HS, Park MS, Lee EB, Lee

JK, Kim JT, Kim JH, Lee MC, Lee HJ, Cho KH. Overexpression of caveolin-1 attenuates brain edema by inhibiting tight junction degradation. *Oncotarget*. 2016 Oct 18;7(42):67857-67867. doi: 10.18632/oncotarget.12346. PMID: 27708218; PMCID: PMC5356525.

20. Cai W, Liu H, Zhao J, Chen LY, Chen J, Lu Z, Hu X. Pericytes in Brain Injury and Repair After Ischemic Stroke. *Transl Stroke Res*. 2017 Apr;8(2):107-21. doi: 10.1007/s12975-016-0504-4. Epub 2016 Nov 12. PMID: 27837475; PMCID: PMC5350040.

21. Wakida NM, Cruz GMS, Ro CC, Moncada EG, Khatibzadeh N, Flanagan LA, Berns MW. Phagocytic response of astrocytes to damaged neighboring cells. *PLoS One*. 2018 Apr 30;13(4):e0196153. doi: 10.1371/journal.pone.0196153. PMID: 29708987; PMCID: PMC5927416.

22. Morizawa YM, Hirayama Y, Ohno N, Shibata S, Shigetomi E, Sui Y, Nabekura J, Sato K, Okajima F, Takebayashi H, Okano H, Koizumi S. Reactive astrocytes function as phagocytes after brain ischemia via ABCA1-mediated pathway. *Nat Commun*. 2017 Jun 22;8(1):28. doi: 10.1038/s41467-017-00037-1. Erratum in: *Nat Commun*. 2017 Nov 14;8(1):1598. PMID: 28642575; PMCID: PMC5481424.

23. Choudhury GR, Ding S. Reactive astrocytes and therapeutic potential in focal ischemic stroke. *Neurobiol Dis*. 2016 Jan;85:234-244. doi: 10.1016/j.nbd.2015.05.003. Epub 2015 May 14. PMID: 25982835; PMCID: PMC4644522.

24. Sims NR, Yew WP. Reactive astrogliosis in stroke: Contributions of astrocytes to recovery of neurological function. *Neurochem Int*. 2017 Jul;107:88-103. doi: 10.1016/j.neuint.2016.12.016. Epub 2017 Jan 3. PMID: 28057555.

25. Hayakawa K, Nakano T, Irie K, Higuchi S, Fujioka M, Orito K, Iwasaki K, Jin G, Lo EH, Mishima K, Fujiwara M. Inhibition of reactive astrocytes with fluorocitrate retards neurovascular remodeling and recovery after focal cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2010 Apr;30(4):871-82. doi: 10.1038/jcbfm.2009.257. Epub 2009 Dec 9. PMID: 19997116; PMCID: PMC2949171.

Волошанська О.О. Тертишний С.І. Ультрaструктурні зміни в мікросудинах і периваскулярному просторі при інфаркті головного мозку в експерименті.

РЕФЕРАТ. Актуальність. Ішемічний інсульт являє собою другу глобальну причину смерті після ішемічної хвороби серця і найбільш часту причину інвалідності в усьому світі. Значна частина фундаментальних досліджень останніх років з проблеми інсульту присвячена вивченню механізмів, які лежать в основі дисфункції і адаптації нервово-судинного блоку, який включає структури гематоенцефалічного бар'єру, мікроглію, нейрони і позаклітинний матрикс базальної мембрани. Питанням морфології і зокрема ультрaструктурі мозку при ішемічному пошкодженні присвячені поодинокі дослідження останніх років. Тим часом тільки морфологічні дослідження можуть розкрити особливості реакції клітинних структур на вплив різних несприятливих факторів. **Мета** — Дослідити ультрaструктурні зміни в судинах

головного мозку і периваскулярному просторі при експериментальному ішемічному інфаркті. **Методи.** Експериментальний інфаркт мозку відтворювався на 15 білих щурах лінії Вістар шляхом ін'єкції суспензії сульфату барію в стерильному фізіологічному розчині в пропорції 1:3 в кількості 0,1 -0,3 мл. Три тварини склали групу контролю. Забір матеріалу здійснювався в терміни: до 3, 9, 12 діб і понад 12 діб від початку експериментальної дії з подальшою стандартною обробкою матеріалу для проведення електронної мікроскопії. **Результати.** В ранні терміни ішемічного ушкодження головного мозку реєструється периваскулярний набряк, деструктивні зміни капілярів з руйнуванням базальних мембран. Частина мікросудин піддається незворотнім змінам з деформацією просвіту судин, пікнозом і лізисом ядер ендотелію, руйнуванням і вакуолізацією цитоплазматичних структур, мікровакуолізацією і набряком мітохондрій з частковим руйнуванням крист і просвітлінням мітохондріального матриксу. В ендотелії з ознаками процесів коагуляції в цитоплазмі і ядрі спостерігалися зміни клітинних контактів. Структурні зміни судин поєднуються зі змінами периваскулярних відростків астроцитів. На 9 і 12 добу структура ендотелію, периваскулярних астроцитів і міжклітинних контактів відновлюється. Зазначається гіперплазія внутрішньоцитоплазматичних структур, збільшення мітохондрій і довжини цитоплазматичної мережі. В клітинах навколосудинного оточення і в цитоплазмі перицитів виявляється значна кількість фаголізосом, в віддалені терміни в перифокальних участках незворотніх ішемічних змін навколо судин виявляється репаративний астрогліоз. **Висновки.** Ультраструктурні зміни мікроциркуляторного русла в перифокальних зонах ішемічного ураження впродовж 3 діб характеризуються периваскулярним набряком і деструктивними змінами ендотелію капілярів і перицитів, ушкодженням базальних мембран, змін з боку клітинних контактів. Через 9-12 діб в ендотелії наростають процеси внутрішньоклітинної регенерації, відновлюється ультраструктура міжклітинних контактів.

Ключові слова: ішемія головного мозку, мікросудини, ендотелій, перицити, астроцити.

Волошанская О.А. Тертышный С.И. Ультраструктурные изменения в микрососудах и периваскулярном пространстве при инфаркте головного мозга в эксперименте.

РЕФЕРАТ. Актуальность. Ишемический инсульт представляет собой вторую глобальную причину смерти после ишемической болезни сердца и наиболее частую причину инвалидности во всем мире. Значительная часть фундаментальных исследований последних лет по проблеме инсульта посвящена изучению механизмов, лежащих в основе дисфункции и адаптации нервно-сосудистого блока, который включает структуры гематоэнцефалического барьера, микроглию, нейроны и внеклеточный матрикс базальной мембраны. Вопросам морфологии и в частности ультраструктуре мозга при ишемическом повреждении посвящены единичные исследования последних лет. Между тем только морфологические исследования могут раскрыть особенности реакции клеточных структур на воздействие различных неблагоприятных факторов. **Цель:** исследовать ультраструктурные изменения в сосудах головного мозга и периваскулярном пространстве при экспериментальном ишемическом инфаркте. **Методы.** Экспериментальный инфаркт мозга воспроизводился на 15 белых крысах линии Вистар путем инъекции суспензии сульфата бария в стерильном физиологическом растворе в пропорции 1: 3 в количестве 0,1 -0,3 мл. Три животных составили группу контроля. Забор материала осуществлялся в сроки: до 3, 9, 12 суток и более 12 суток от начала экспериментальной действия с последующей стандартной обработкой материала для проведения электронной микроскопии. **Результаты.** В ранние сроки ишемического повреждения головного мозга регистрируется периваскулярный отек, деструктивные изменения капилляров с разрушением базальных мембран. Часть микрососудов подвергается необратимым изменениям с деформацией просвета сосудов, пикнозом и лизисом ядер эндотелия, разрушением и вакуолизацией цитоплазматических структур, микровакуолизацией и набуханием митохондрий с частичным разрушением крист и просветлением митохондриального матрикса. В эндотелии с признаками процессов коагуляции в цитоплазме и ядре наблюдались изменения клеточных контактов. Структурные изменения сосудов сочетаются с изменениями периваскулярных отростков астроцитов. На 9 и 12 сутки структура эндотелия, периваскулярных астроцитов и межклеточных контактов восстанавливается. Отмечается гиперплазия цитоплазматических структур, увеличение митохондрий и длины цитоплазматической сети. В клетках периваскулярного окружения и в цитоплазме перицитов появляется значительное количество фаголизосом, в отдаленные сроки в перифокальных участках необратимых ишемических изменений вокруг сосудов отмечается репаративный астроглия. **Выводы.** Ультраструктурные изменения микроциркуляторного русла в перифокальных зонах ишемического поражения в течение 3 суток характеризуются периваскулярным отеком и деструктивными изменениями эндотелия капилляров и перицитов, повреждением базальных мембран, изменений со стороны клеточных контактов. Через 9-12 суток в эндотелии нарастают процессы внутриклеточной регенерации, восстанавливается ультраструктура межклеточных контактов.

Ключевые слова: ишемия головного мозга, микрососуды, эндотелий, перициты, астроциты.