

Katedra i Zakład Histologii i Embriologii Akademii Medycznej w Lublinie
Kierownik: prof. dr hab. Irena Królikowska-Prasał

TAMARA MAJEWSKA, IRENA KRÓLIKOWSKA-PRASAŁ,
BEATA BUDZYŃSKA

*Histologiczne badania niektórych pól hipokampa
po doświadczalnej ischemii*

Histological examinations of some hippocampus fields after experimental ischaemia

Wiadomo z piśmiennictwa (9, 11), że przy ciężkich zaburzeniach pamięci stwierdza się znaczny ubytek neuronów w wielu obszarach centralnego układu nerwowego, m.in. w korze mózgu i hipokampie. Badania przy pomocy mikroskopu świetlnego wykazują, że również podczas ataków padaczki występują ostre zmiany neuronalne w wymienionych obszarach (10). Autorzy zajmujący się niedotlenieniem mózgu są zdania, że wpływ ischemii na neurony w hipokampie jest bardzo duży, powodujący ich degenerację (1, 8, 10).

Ostatnio coraz więcej uwagi poświęca się udziałowi apoptozy w ischemicznym uszkodzeniu mózgu oraz w degeneracji neuronów w chorobie Alzheimer'a, która charakteryzuje się dominującymi, degradacyjnymi zmianami w mózgu, m.in. w hipokampie (3, 6, 9).

Celem niniejszej pracy są badania pól CA1 i CA2 w hipokampie szczura po doświadczalnej ischemii, trwającej 20 minut.

MATERIAŁ I METODY

Do badań użyto szczurów rasy Wistar (samce) które podzielono na dwie grupy: doświadczalną i kontrolną.

Szczury grupy doświadczalnej usypiano pentobarbitem w dawce 60 mg/kg masy ciała, a następnie zamykano tętnice kręgowe, stosując koagulację. Po 24 godz. zamykano na okres 20 min. tętnice szyjne wspólne. Po upływie 24 godz. i 120 godz. dokonywano perfuzji mózgu 4% roztworem

formaliny o pH 7,2, następnie zwierzęta dekapitowano i w takim samym roztworze formaliny utrwalano mózgi przez 24 godziny.

Zwierzętom kontrolnym również dokonywano perfuzji mózgow 4% roztworem formaliny o pH 7,2, następnie je dekapitowano i pozostawiano mózgi na 24 godz. w powyższym roztworze formaliny.

Z mózgow zwierząt doświadczalnych i kontrolnych wykonano seryjne skrawki parafinowe o grubości 10 mm, które barwiono hematoksyliną i eozyną.

WYNIKI BADAŃ

Histologiczne badania kory hipokampa wykazały u zwierząt doświadczalnych istnienie rozległych neuronalnych uszkodzeń szczególnie w warstwie piramidalnej kory. Obserwacjom poddano skrawki mózgu szczura na poziomie cięć wg tablicy 39 i 49 w atlasie Königa i Klippel (5).

W grupie kontrolnej kora hipokampa, zbudowana z warstwy drobinowej, komórek piramidalnych i komórek wielokształtnych, nie wykazuje jakichkolwiek nieprawidłowości. Najbardziej charakterystyczna warstwa piramidalna zawiera duże i małe komórki. Jądra tych neuronów są duże i jasne, jąderka mocno wybarwione (ryc. 1 i 4). Pole CA1 leży na wypukłej powierzchni hipokampa i posiada kilka warstw komórek piramidalnych, pole CA2 jest najwęższe, a neurony w nim są najgęściej ułożone.

W mózgach szczurów doświadczalnych, dekapitowanych po upływie 24 godz. od zakończenia doświadczenia, występują zauważalne zmiany neuronalne szczególnie w polu CA1. Niektóre komórki piramidalne wydają się „obkurczone”, a wokół nich powstały puste przestrzenie. Cytoplazma zdegenerowanych komórek jest mocno zasadochłonna, jądra niewidoczne bądź przesunięte na obwód (ryc. 2 i 5).

Po 120 godz. od doświadczalnej ischemii zmiany w korze hipokampa, szczególnie w polu CA1, są bardzo duże. Komórki warstwy piramidalnej całkowicie zdegenerowane; wydaje się, jakby kilkakrotnie zmniejszyły swoją objętość i stały się bardzo ciemne. Jądra i jąderka niewidoczne. Przy neuronach „puste” przestrzenie, także przy naczyniach włosowatych. Komórki warstwy drobinowej i wielokształtne reagują na niedotlenienie w niewielkim zakresie (ryc. 3 i 6).

Należy zaznaczyć, że we wszystkich doświadczalnych mózgach zmiany patologiczne są asymetryczne. Hipokamp jednej z półkul mózgu wykazuje zawsze bardzo duże zaburzenia, drugiej znacznie mniejsze.

DYSKUSJA

U szczurów poddawanych doświadczalnej ischemii zamknięcie jedynie tętnic szyjnych nie powoduje zaburzeń na terenie mózgu, dlatego też należy najpierw zastosować koagulację tętnic kręgowych, jak i szyjnych.

Wieloletnie badania hipokampa wykazują, jak bardzo ważny i stosunkowo mało poznany jest ten obszar mózgu (1, 2, 4, 7, 8, 11). Najlepiej udokumentowany jest jego związek z pamięcią. W chorobie Alzheimerera stwierdza się uderzający ubytek neuronów zwłaszcza w polu CA1 hipokampa. Podobne zmiany neuronalne pojawiają się przy niedotlenieniu mózgu (6, 11).

Nasze badania wykazują, że po upływie 24 godz. od zakończenia doświadczenia w polu CA1 i CA2 hipokampa występują „obkurczone” komórki piramidalne, jest ich jednak stosunkowo niewiele. Cytoplazma tych komórek jest silnie zasadochłonna, jądra przesunięte do obwodu lub niewidoczne. Po 120 godz. warstwa komórek piramidalnych ulega w wymienionych polach prawie całkowitej degradacji (ryc.3 i 6). Neurony są ciemne i tak mocno „obkurczone”, że wydaje się, jakby kilkakrotnie zmniejszyły swoją objętość. Wokół nich są „puste” przestrzenie, podobnie przy naczyniach włosowatych. Obumieranie neuronów w polu CA1 obserwowano wielu autorów (1, 8, 10). U gerbilia już po 3-minutowej ischemii następowała śmierć komórek piramidalnych w hipokampie (1). Warto tu wspomnieć, że obniżenie temperatury mózgu tych zwierząt o 2°C zmniejszało rozległość zniszczeń spowodowanych niedotlenieniem. U szczurów poddanych hipoksji w badaniach Siekluckiej i wsp. (8) obserwowano m.in. w hipokampie „obkurczone” i ciemne neurony w warstwie piramidalnej tego obszaru. Zauważyli również (podobnie jak my), że zmiany były asymetryczne. Autorzy sugerują, że zniszczenia neuronalne zależą nie tylko od ograniczenia dostępu tlenu, ale także od hipoksji spowodowanej zamknięciem tętnic szyjnych, a różnice w przepływie krwi w poszczególnych mózgach zależą od specyfiki nasilonych okresów niedokrwienia.

Objawy padaczkowe wywołane pilokarpiną (10) wykazują, że najbardziej wrażliwą strukturą w mózgu jest hipokamp, ponieważ w nim pojawiają się najwcześniej zmiany elektrograficzne. Autorzy sugerują przyczynowy związek między nadmierną stymulacją receptorów cholinergicznym w mózgu a padaczkowym jego uszkodzeniem. Zdegenerowane neurony były czarne i obkurczone, podczas gdy neuropil nie był zmieniony. Uszkodzenia te autorzy zaliczyli do ciężkich, bowiem całe grupy komórek lub całe pola ulegają martwicy. W doświadczalnej padaczce degeneracją zostały objęte pola CA4 i CA3 w grzbietowym hipokampie, natomiast w brzuszonym – pola CA3 i CA1. Jak widać, objawy te różnią się od tych, które zostały wywołane niedotlenieniem mózgu, ale również dotyczą hipokampa. Pojawienie się intensywnej degeneracji neuronalnej w polu CA1 grzbietowego hipok-

kampa jest typowe w mózgu szczurów z doświadczalną ischemią (4, 7). Badania komórek hipokampa w mikroskopie świetlnym i elektronowym po doświadczalnym niedotlenieniu i wywołaniu stanu padaczkowego wykazały w większości neuronów uszkodzenia typu I – tzn. kondensację cyto i karioplazmy, a więc „obkurczenie” (2, 8).

Opisując takie zmiany morfologiczne w procesie śmierci komórki, Cohen (3) określa je jako apoptozę, a nie martwicę, bo tej ostatniej towarzyszyłby obrzęk komórek. Wśród mechanizmów molekularnych mogących brać udział w wywołaniu apoptozy w niedokrwieniu mózgu autor wymienia aktywację układu Fas/FasL. (Fas = białko, powierzchniowy receptor; FasL = jego ligand).

Niniejsza praca jest kontynuacją badań nad wpływem niedotlenienia mózgu szczura (2). Wcześniejsze badania wskazują, że hipokamp po 48 godz. od zakończenia 20 min. ischemii wykazywał intensywne uszkodzenia większej części komórek piramidalnych, szczególnie w polach CA1 i CA2.

Nasze badania, obejmujące wcześniejszy (24 godz.) i późniejszy (120 godz.) okres po niedotlenieniu, ujawniają początkowo niewielkie, a potem znaczące zmiany w zachowaniu się komórek warstwy piramidalnej w wymienionych obszarach hipokampa.

PIŚMIENNICTWO

1. Akira Mitani i wsp.: Transient forebrain ischemia of three-minute duration consistently induces severe neuronal damage in field CA1 of the hippocampus in the normothermic gerbil. *Neuroscience Letters*, 131, 171, 1991.
2. Budzyńska B., Zarębska A.: Morphometrical and histological alterations in the hippocampus cella affected by anoxia. *Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, sectio D*, vol. 51, Lublin 1996.
3. Cohen J.J.: Apoptosis. *Immunology Today*, 14, 126, 1993.
4. Kirino T. i wsp.: Selective vulnerability of the hippocampus to ischemia – reversible and irreversible types of ischemic cell damage [In:] *Progress in Brain Research* (Kogure K. et al., eds) Elsevier, New York 163, 39, 1985.
5. König J.F.R., Klippel R.A.: *The rat brain. A stereotaxic atlas of the forebrain and lower parts of the brain stem.* Williams and Wilkins, Baltimore, MD, 1993.
6. Loo D.T. i wsp.: Apoptosis induced by beta-amyloid in cultured central nervous system neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 7951, 1993.
7. Pulsinelli W.A., Brierley J.B.: A new model of model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat. *Stroke*, 10, 267, 1979.
8. Sieklucka M. i wsp.: Transient occlusion of rat carotid arteries increases formation of inositol phosphate. Evidence for a specific effect on α_1 -receptors. *Neurochem. Int.*, 18, 2, 175, 1991.
9. Słowiński J. i wsp.: Zjawisko apoptozy w układzie nerwowym. *Post. Biol. Kom.*, 23, 2, 299, 1996.

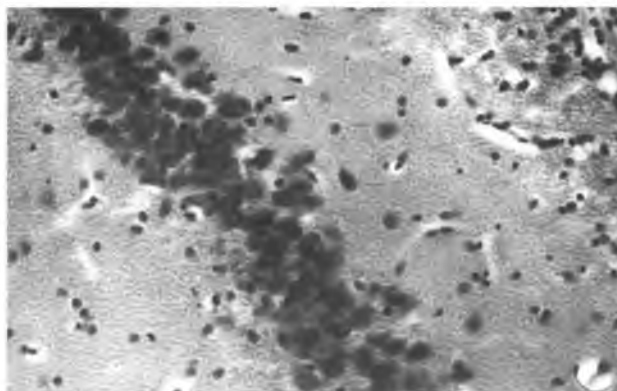


Fig. 1

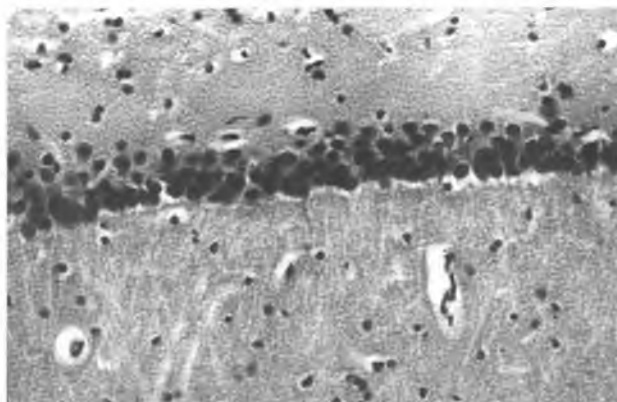


Fig. 2

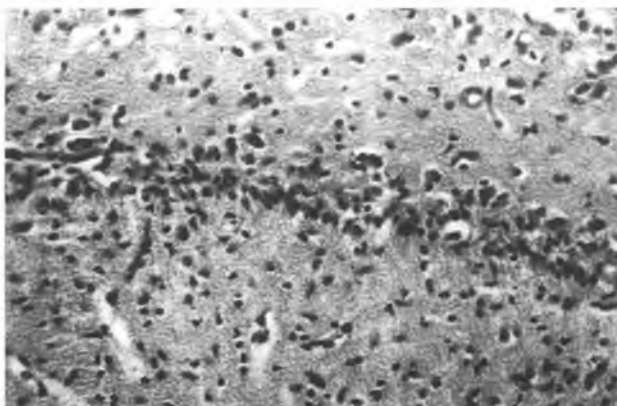


Fig. 3

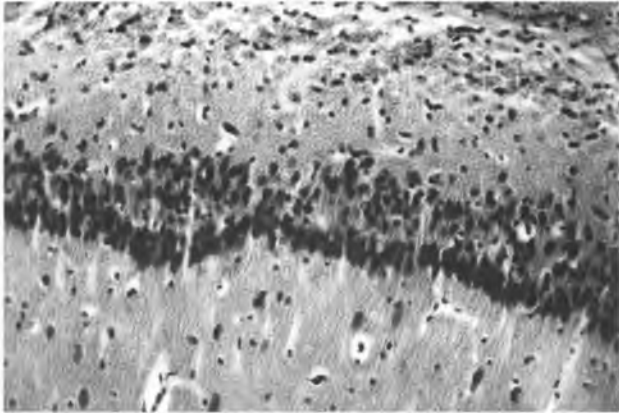


Fig. 4

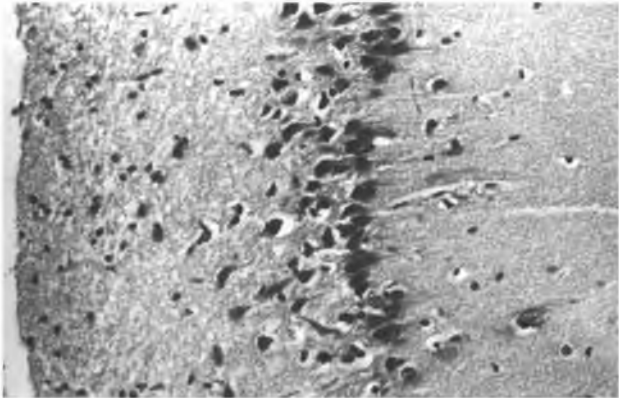


Fig. 5

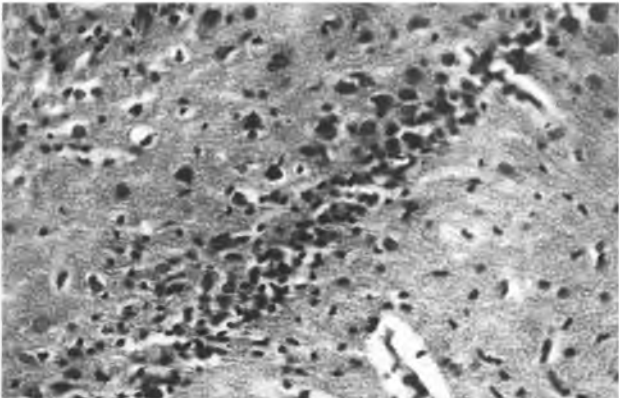


Fig. 6

10. Turski W.A. i wsp.: Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. *Behavioural Brain Research*, 9, 315, 1983.
11. Zola-Morgan S. i wsp.: Human amnesia and the medial temporal region: enduring memory impairment following a bilateral lesion limited to field CA1 of the hippocampus. *J. Neurosci.*, 6, 2950, 1986.

Otrz.: 1997.03.27

SUMMARY

The examinations of rats hippocampus were made after ischaemia (the rats vertebral and common carotid arteries were closed for 20 minutes). Serial sections of the brains were stained with hematoxylin and eosin.

24 hours after completing the experiment a small number of cells in the field CA1 was damaged. They were dark and shrunken.

120 hours after the experiment strong damages affected large groups of pyramidal cells, especially in field CA1.

The changes were asymmetrical and regarded one hemisphere of the brain only.

OBJAŚNIENIA RYCIN

Ryc. 1. Grupa kontrolna. Pole CA1 hipokampa wg tab. 39 (5). Barwienie H+E. Ca 360x.

Control group. The CA1 field of the hippocampus after Fig. 39 (5). Stained with H+E. Ca x 360.

Ryc. 2. Grupa doświadczalna. Pole CA1 hipokampa wg tab. 39 (5) 24 godziny po ischemii. Barwienie H+E. Ca 360x.

Experimental group. The CA1 field of the hippocampus after Fig. 39 (5) 24 hours after the ischaemia. Stained with H+E. Ca x 360.

Ryc. 3. Grupa doświadczalna. Pole CA1 hipokampa wg tab. 39 (5) 120 godzin po ischemii. Barwienie H+E. Ca 360x.

Experimental group. The CA1 field of the hippocampus after Fig. 39 (5) 120 hours after the ischaemia. Stained with H+E. Ca x 360.

Ryc. 4. Grupa kontrolna. Pole CA1 hipokampa wg tab. 49 (5) Barwienie H+E. Ca 360x.

Control group. The CA1 field of the hippocampus after Fig. 49 (5). Stained with H+E. Ca x 360.

Ryc. 5. Grupa doświadczalna. Pole CA1 hipokampa wg tab. 49 (5) 24 godziny po ischemii. Barwienie H+E. Ca 360x.

Experimental group. The CA1 field of the hippocampus after Fig. 49 (5) 24 hours after the ischaemia. Stained with H+E. Ca x 360.

Ryc. 6. Grupa doświadczalna. Pole CA1 hipokampa wg tab. 49 (5) 120 godzin po ischemii. Barwienie H+E. Ca 360x.

Experimental group. The CA1 field of the hippocampus after Fig. 49 (5) 120 hours after the ischaemia. Stained with H+E. Ca x 360.

