

BARBARA GAJKOWSKA, ROMAN GADAMSKI, MIROSŁAW J. MOSSAKOWSKI

WPLYW KRÓTKOTRWAŁEGO NIEDOKRWIENIA  
NA ULTRASTRUKTURĘ ZAKRĘTU HIPOKAMPA  
U CHOMIKÓW MONGOLSKICH  
CZĘŚĆ II. OBRAZ MIKROSKOPOWO-ELEKTRONOWY SYNAPS  
WE Wczesnym OKRESIE PONIEDOKRWIENNYM

Pracownia Ultrastruktury Układu Nerwowego i Zakład Neuropatologii Centrum Medycyny  
Doświadczalnej i Klinicznej PAN, Warszawa

Analiza zmian ultrastrukturalnych odcinka CA<sub>1</sub> rogu Amona u chomika mongolskiego po przebytych incydencie niedokrwiennym była przedmiotem wielu wcześniejszych badań (Kirino 1982; Kirino, Sano 1984; Kirino i wsp. 1985, Suzuki i wsp. 1985; Mossakowski i wsp. 1986, 1989). W badaniach tych wykazano, że w modelu doświadczalnego niedokrwienia mózgu, mieszczącego się w granicach odwracalności zmian tkankowych, wybiórcze uszkodzenie neuronów piramidowych odcinka CA<sub>1</sub> jest procesem rozwijającym się wolno i ujawniającym się po upływie 3–5 dni. Zanik neuronów określony nazwą opóźnionej śmierci komórki (delayed neuronal death) poprzedzony jest ich wzmożoną aktywnością bioelektryczną, przypadającą na pierwszą dobę po niedokrwieniu (Suzuki i wsp. 1983). Zjawisko to wiąże się zazwyczaj z ekscytotoksycznym działaniem aminokwasowych neuroprzekazników. Spostrzeżenia te sugerować mogą istotną rolę synaps w regulacji poniedokrwiennych procesów patologicznych.

Zmiany ultrastrukturalne obserwowane we wcześniejszych badaniach własnych (Mossakowski i wsp. 1989) skłoniły nas do podjęcia szczegółowej analizy obrazu mikroskopowo-elektronowego synaps we wszystkich kolejnych warstwach odcinka CA<sub>1</sub> (*stratum oriens, pyramidale, radiale, lacunosum-moleculare* i *moleculare*) wytwarzanych przez zakończenia aksonalne o zróżnicowanym pochodzeniu i charakteryzujących się obecnością różnych substancji neuroprzekaznikowych (Gajkowska i wsp. 1988). Przedmiotem przedstawionej obecnie części pracy jest ultrastruktura synaps we wczesnym okresie poniedokrwiennym obejmującym fazę hiperaktywności bioelektrycznej komórek piramidowych.

## MATERIAŁ I METODY

Badania wykonano na 10 3-miesięcznych chomikach mongolskich, u których w narkozie wziewnej (2% narkotan w układzie otwartym w mieszaninie gazowej składającej się z 70% azotu i 30% tlenu) wywołano niedokrwienie przodomózgowia przez zaciśnięcie tętnic szyjnych wspólnych przy użyciu klipsów Heifetzą na okres 7,5 min. Po zabiegu zwierzęta pozostawiano w warunkach hodowlanych na okres 12 (I grupa doświadczalna) lub 24 godziny (II grupa doświadczalna). Po tym czasie wykonywano im w narkozie eterowej przezsercową perfuzję aldehydem\* glutarowym.

Materiał kontrolny stanowiło 5 zdrowych 3-miesięcznych chomików mongolskich, u których w sposób identyczny jak u zwierząt doświadczalnych wykonywano przezsercową perfuzję aldehydem glutarowym. Sposób pobierania i przeprowadzania materiału biologicznego do badań w mikroskopie elektronowym został dokładnie opisany w poprzedniej pracy (Gajkowska i wsp. 1988).

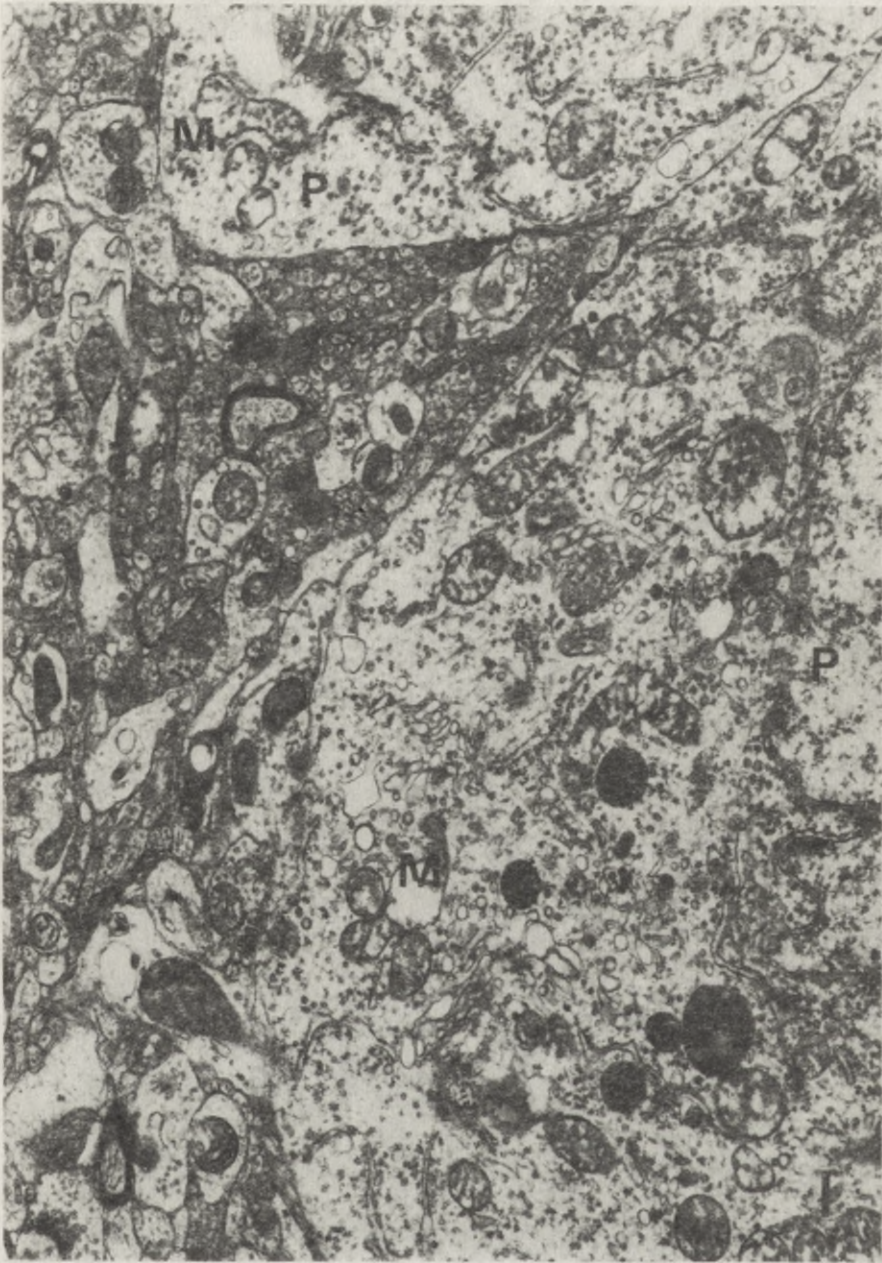
## WYNIKI

## I Grupa doświadczalna (12 godzin po niedokrwieniu)

1. *Stratum pyramidale*. Niektóre neurony piramidowe wykazują tu nieznaczne zmiany w obrazie mikroskopowo-elektronowym. Mają one niewielkie nasilenie i dotyczą pojedynczych mitochondriów wykazujących cechy obrzmienia. W perykarialnej cytoplazmie neuronów i ich dendrytach spotyka się także pojedyncze, elektronowo-przeziernie wakuole oraz liczne lizosomy (ryc. 1, 2 i 3). Zawarte w tej warstwie interneurony stosunkowo często są obrzmiałe. Cechy obrzmienia wykazuje zarówno cytoplazma komórek, jak również poszczególne mitochondria. Poza tym w interneuronach stwierdza się zwiększenie ilości włóknistych elementów cytoskeletonu oraz obecność polimorficznych lizosomów (ryc. 4). Synapsy o typie symetrycznym, znajdujące się na powierzchni neuronów piramidowych i interneuronów oraz na ich dendrytach, nie wykazują zmian w obrazie ultrastrukturalnym. Natomiast w neuropilu, w okolicy neuronów piramidowych, niektóre kolbki presynaptyczne charakteryzują się obrzmieniem aksoplazmy oraz niewielką ilością pęcherzyków synaptycznych. Wiele odcinków postsynaptycznych wykazuje również cechy obrzmienia. W licznych dendrytach obserwuje się elektronowo-przezierną cytoplazmę podstawową oraz wakuole (ryc. 3 i 5). W neuropilu tej warstwy, zwłaszcza w okolicach przynacyniowych, spotyka się astrocyty z obrzmiałą cytoplazmą perykarialną i wypustkową (ryc. 5).

2. *Stratum oriens*. W warstwie tej składającej się z aksonów oraz dendrytów podstawnych neuronów piramidowych i zakończeń komórek ziarnistych, jak również z wypustek interneuronów i ich zakończeń położonych na dendrytach neuronów piramidowych, obserwuje się stosunkowo niewielkie zmiany ultrastrukturalne dotyczące nielicznych kolbek presynaptycznych. Polegają one na rozrzedzeniu aksoplazmy, zmniejszeniu ilości pęcherzyków synaptycznych oraz

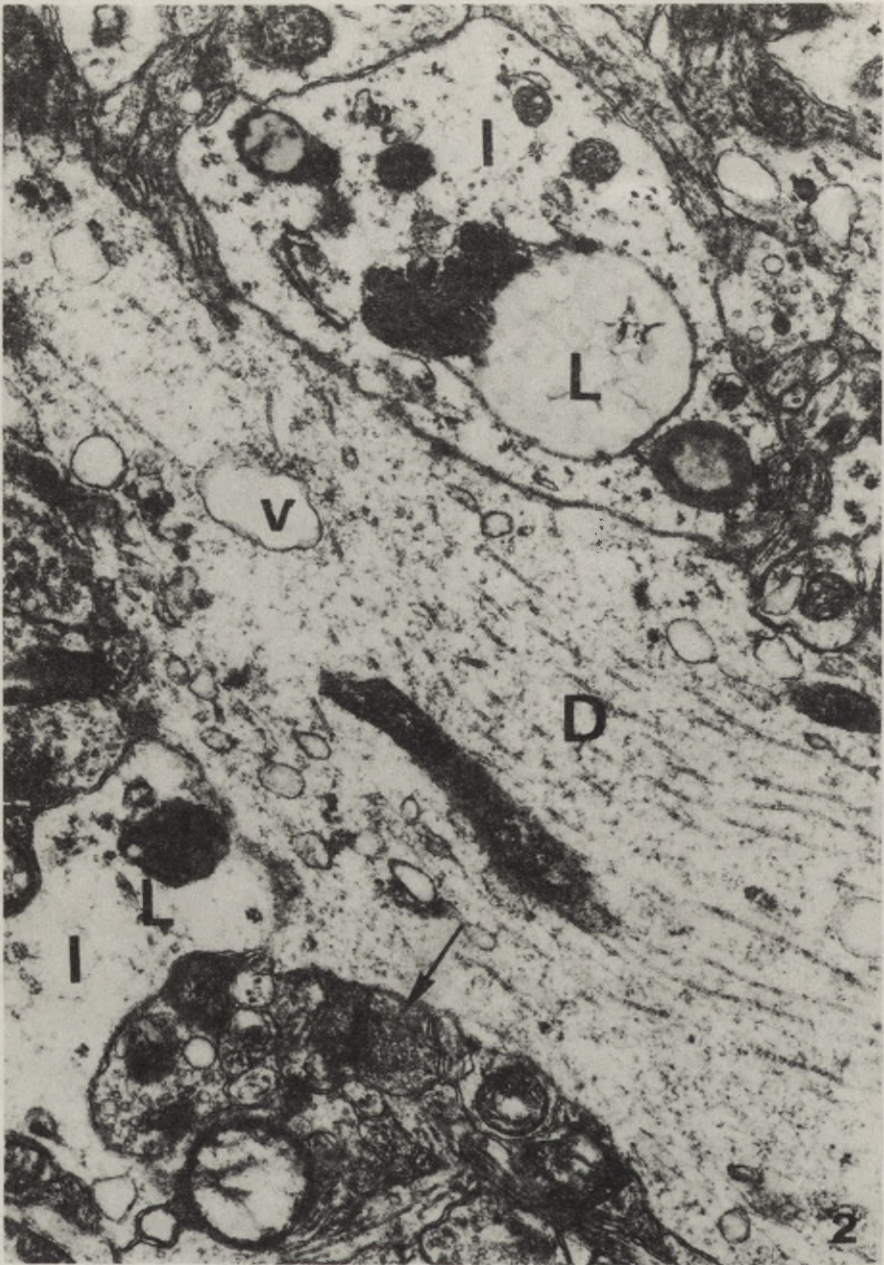




Ryc. 1. I grupa doświadczalna. *Stratum pyramidale*. Fragmenty dwóch komórek piramidowych (P) pokrytych gęsto synapsami o prawidłowym obrazie ultrastrukturalnym. W cytoplazmie komórek niektóre mitochondria (M) obrzmiały, oraz liczne lizosomy. Pow. 15 000 ×

Fig. 1. I experimental group. *Stratum pyramidale*. Fragments of two pyramidal neurons (P) densely covered with unchanged synapses. In the cytoplasm some swollen mitochondria (M) and numerous lysosomes. × 15 000

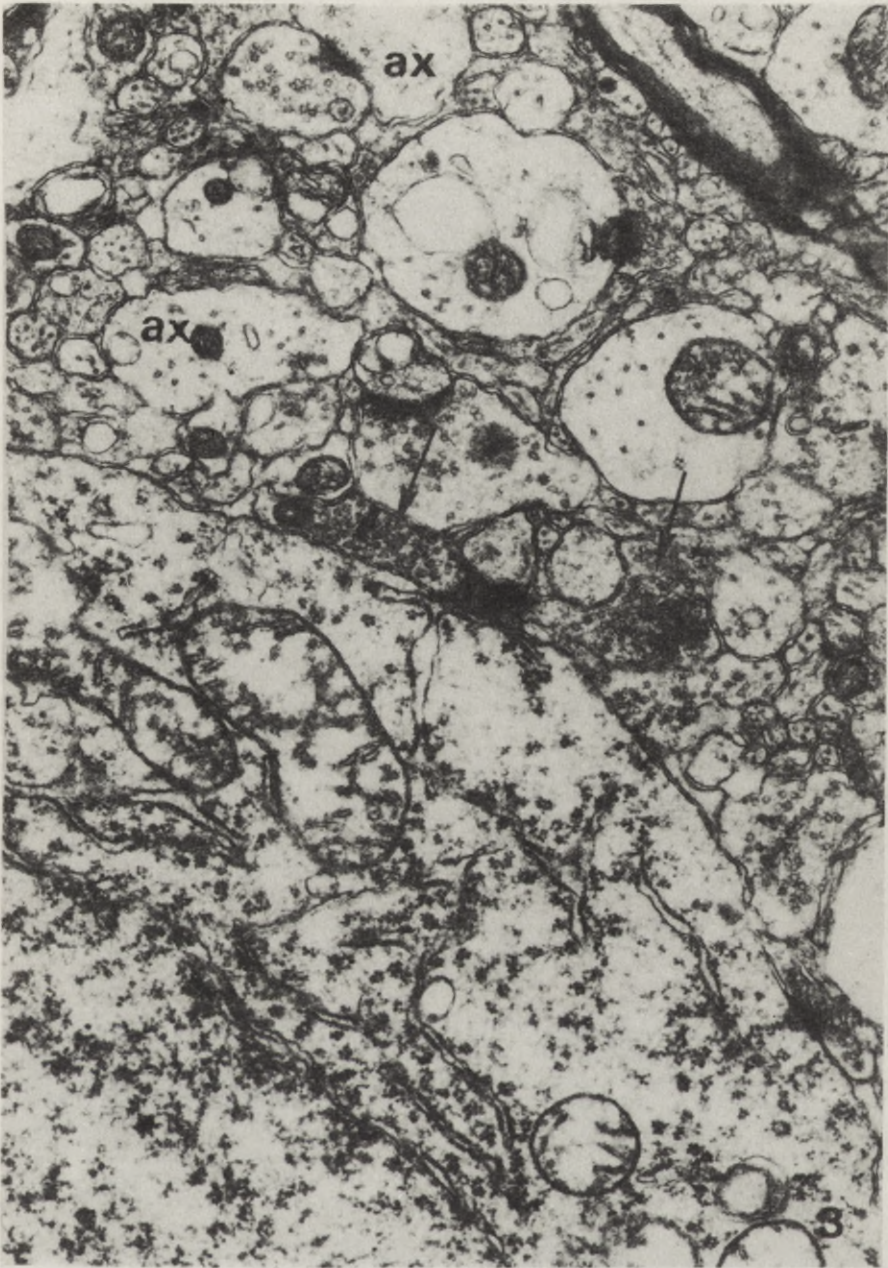




Ryc. 2. I grupa doświadczalna. *Stratum pyramidale*. Fragment dendrytu komórki piramidowej (D). W cytoplazmie liczne neurotubule i neurofilamenty oraz elektronowo-przeziernie wakuole (V). Obecne są obrzmiałe wypustki interneuronów (I) zawierające polimorficzne lizosomy (L). Synapsy zawarte w otaczającym neuropilu wykazują prawidłowy obraz ultrastrukturalny (strzałka). Pow. 29 000 ×

Fig. 2. I experimental group. *Stratum pyramidale*. Fragment of dendrite of pyramidal neuron (D). In cytoplasm numerous neurotubules, filaments and electron-lucent vacuoles (V). Note swollen processes of interneurons (I), containing polymorphic lysosomes (L). Unchanged synapses are present in neuropil (arrow). × 29 000

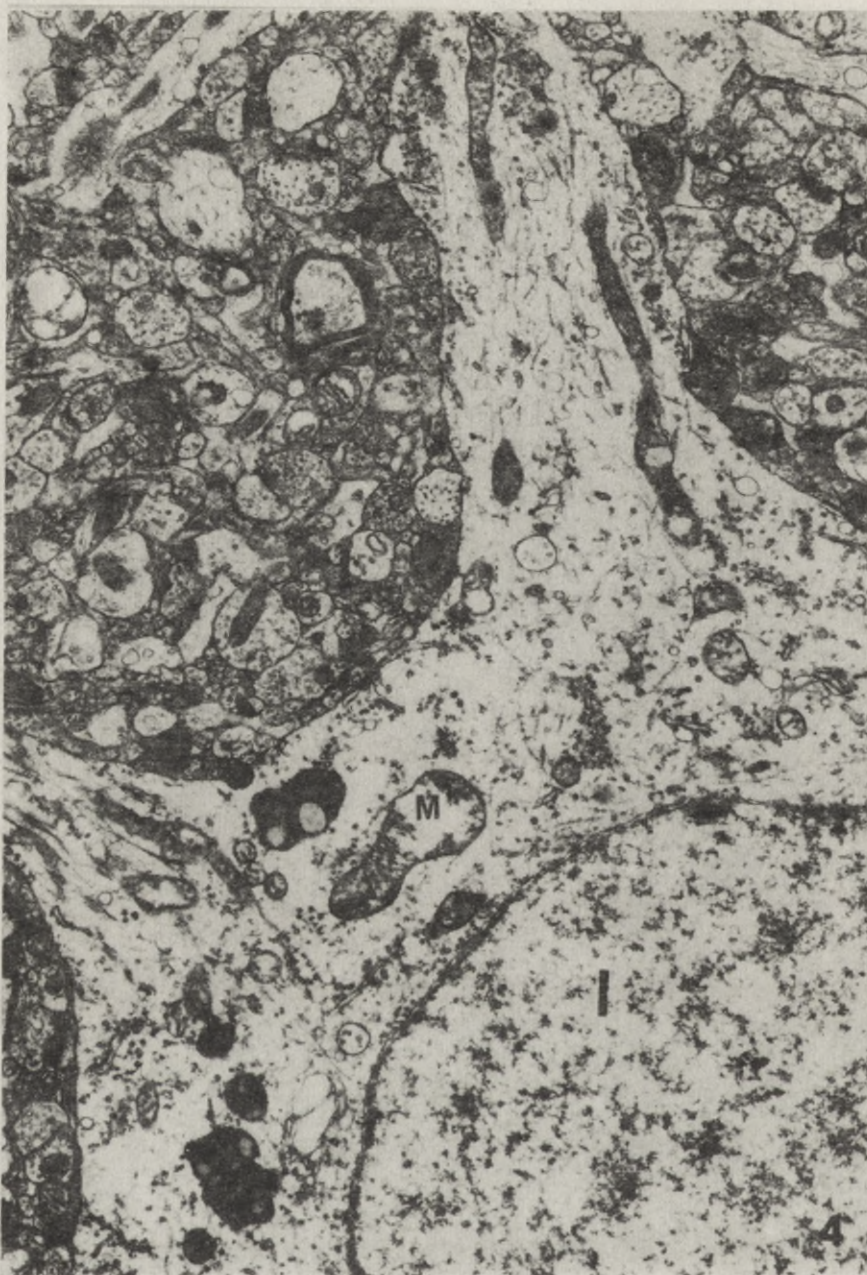




Ryc. 3. I grupa doświadczalna. *Stratum pyramidale*. Fragment neuronu piramidowego. W cytoplazmie obecne obrzmiałe mitochondria. Synapsy o typie symetrycznym pokrywające neuron (strzałki) wykazują prawidłową ultrastrukturę. W neuropilu niektóre synapsy typu asymetrycznego (ax) wykazują obrzmiałe odcinki pre- i postsynaptyczne. Pow. 29 000 ×

Fig. 3. I experimental group. *Stratum pyramidale*. In the cytoplasm of pyramidal neuron swollen mitochondria are present. Unchanged symmetric synapses cover pyramidal neuron body (arrows). In neuropil some asymmetric synapses (ax) are swollen in both pre- and postsynaptic areas. × 29 000

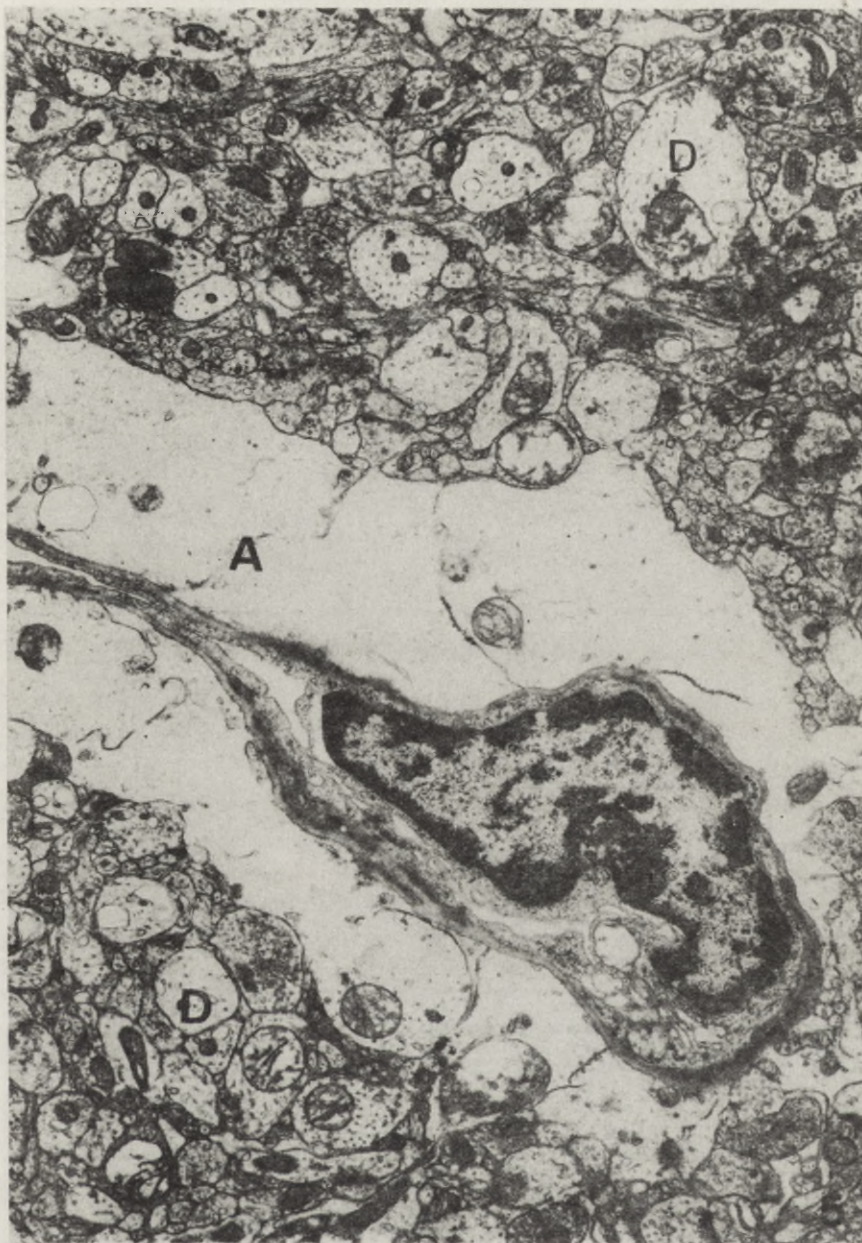




Ryc. 4. I grupa doświadczalna. *Stratum pyramidale*. Obrzmiały interneuron z wypustkami (I). W cytoplazmie widoczne obrzmiałe mitochondria (M), polimorficzne lizosomy i włókniste elementy cytoskeletonu. Synapsy znajdujące się na perykarionie interneuronu oraz w neuropilu wykazują prawidłową ultrastrukturę. Pow. 12 500 ×

Fig. 4. I experimental group. *Stratum pyramidale*. Swollen interneuron with processes (I). Swollen mitochondria (M), polymorphic lysosomes and abundant cytoskeleton elements are present in the cytoplasm. Synapses on interneuron body and in neuropil show normal ultrastructure. × 12 500

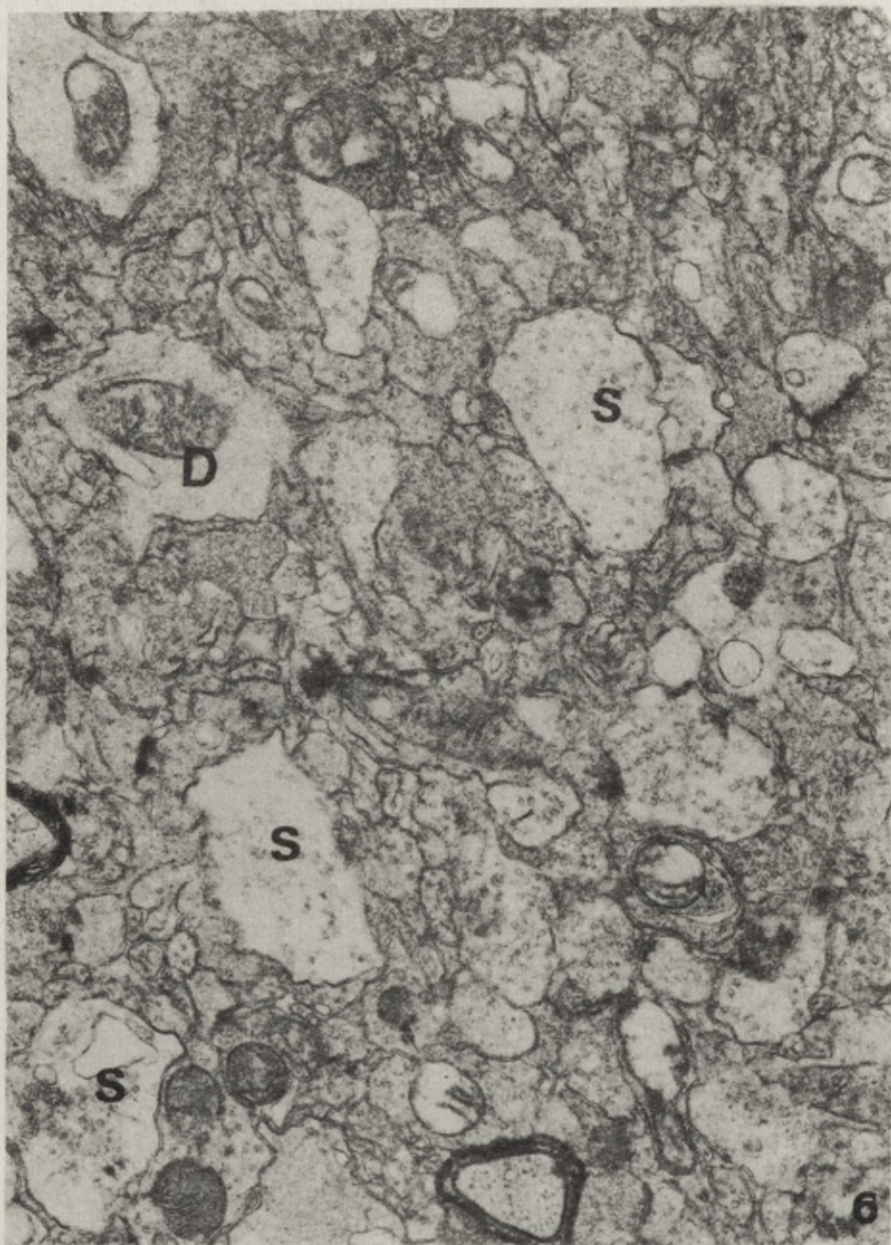




Ryc. 5. I grupa doświadczalna. *Stratum pyramidale*. Obrzmiałe wypustki astrocytarne (A) zaciskające światło naczynia. W neuropilu widoczne obrzmiałe dendryty (D). Synapsy o prawidłowym obrazie ultrastrukturalnym. Pow. 12 500 ×

Fig. 5. I experimental group. *Stratum pyramidale*. Swollen astrocytic processes (A) are present in perivascular area. Swollen dendrites (D) are visible in neuropil. Synapses with normal ultrastructure. × 12 500

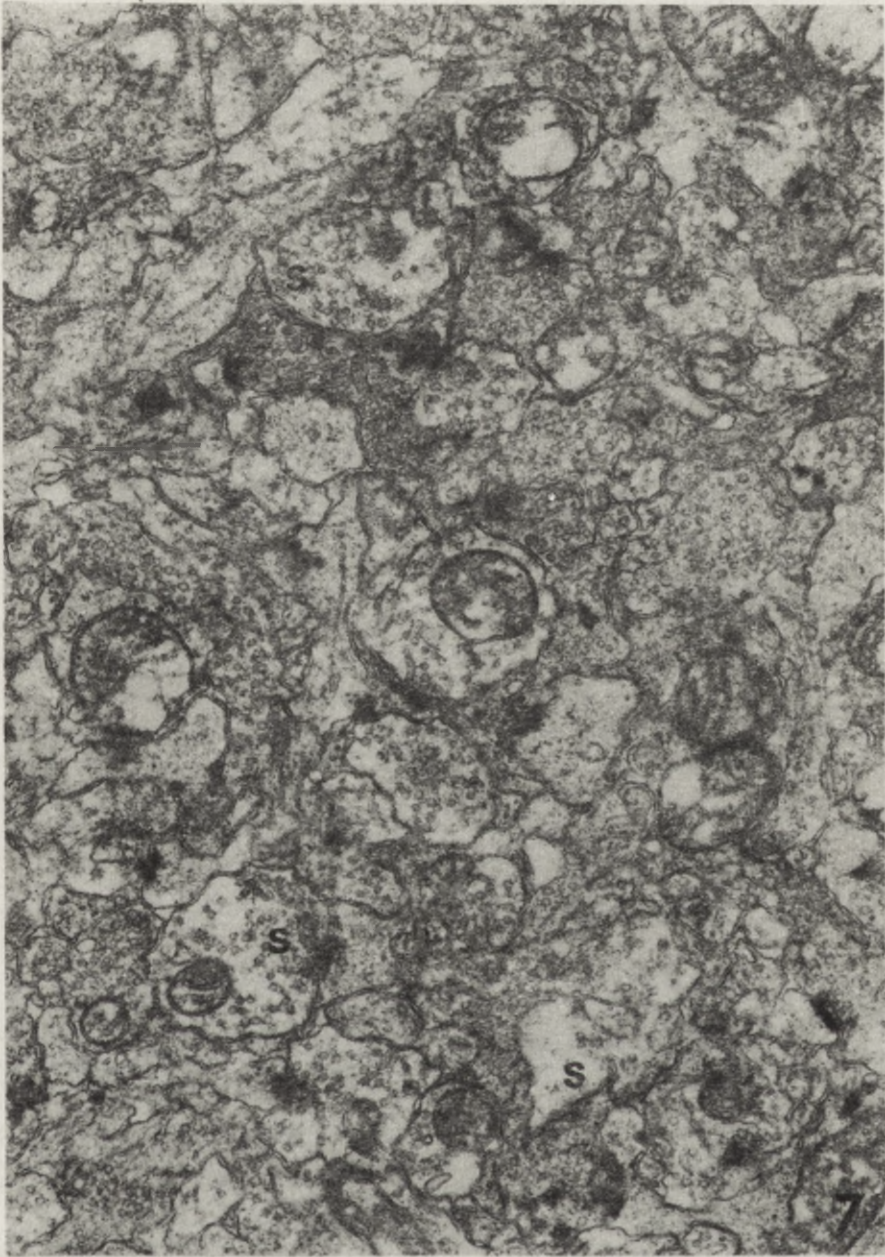




Ryc. 6. I grupa doświadczalna. *Stratum oriens*. Niektóre kolbki presynaptyczne obrzmiałe (S) z niewielką ilością pęcherzyków synaptycznych i elektronowo-pustymi wakuolami. Pojedyncze obrzmiałe dendryty (D). Pow. 22 500 ×

Fig. 6. I experimental group. *Stratum oriens*. Some swollen presynaptic boutons containing small number of synaptic vesicles and electron-lucent vacuoles (S). Some swollen dendrites (D) are visible. × 22 500





Ryc. 7. I grupa doświadczalna. *Stratum oriens*. Widoczne różnego stopnia obrzmienie pojedynczych kolbek presynaptycznych (S) położonych wśród synaps o niezmienionej ultrastrukturze. Pow. 29 000 ×

Fig. 7. I experimental group. *Stratum oriens*. Some presynaptic boutons with varying degree of swelling (S) are visible between normal synapses. × 29 000



pojawianiu się elektronowo-przeziernych wakuoli (ryc. 6 i 7). Większość występujących połączeń synaptycznych nie wykazuje jednak zmian ultrastrukturalnych. Poza tym obserwuje się podobnie jak w *stratum pyramidale* znaczne obrzmienie okółonaczyniowych wypustek astrocytów.

3. *Stratum radiale*. Warstwa ta, zbudowana ze szczytowych dendrytów neuronów piramidowych, zawiera także nieliczne zakończenia synaptyczne należące do kolaterali Schaffera, interneuronów oraz włókien pochodzących z zakrętu zębatego. Wszystkie obserwowane w tej warstwie synapsy wykazują niezmienną ultrastrukturę zarówno w odcinkach pre-, jak postsynaptycznych (ryc. 8). Niekiedy tylko w poszczególnych synapsach obserwuje się obecność pojedynczych, obrzmiętych mitochondriów (ryc. 9).

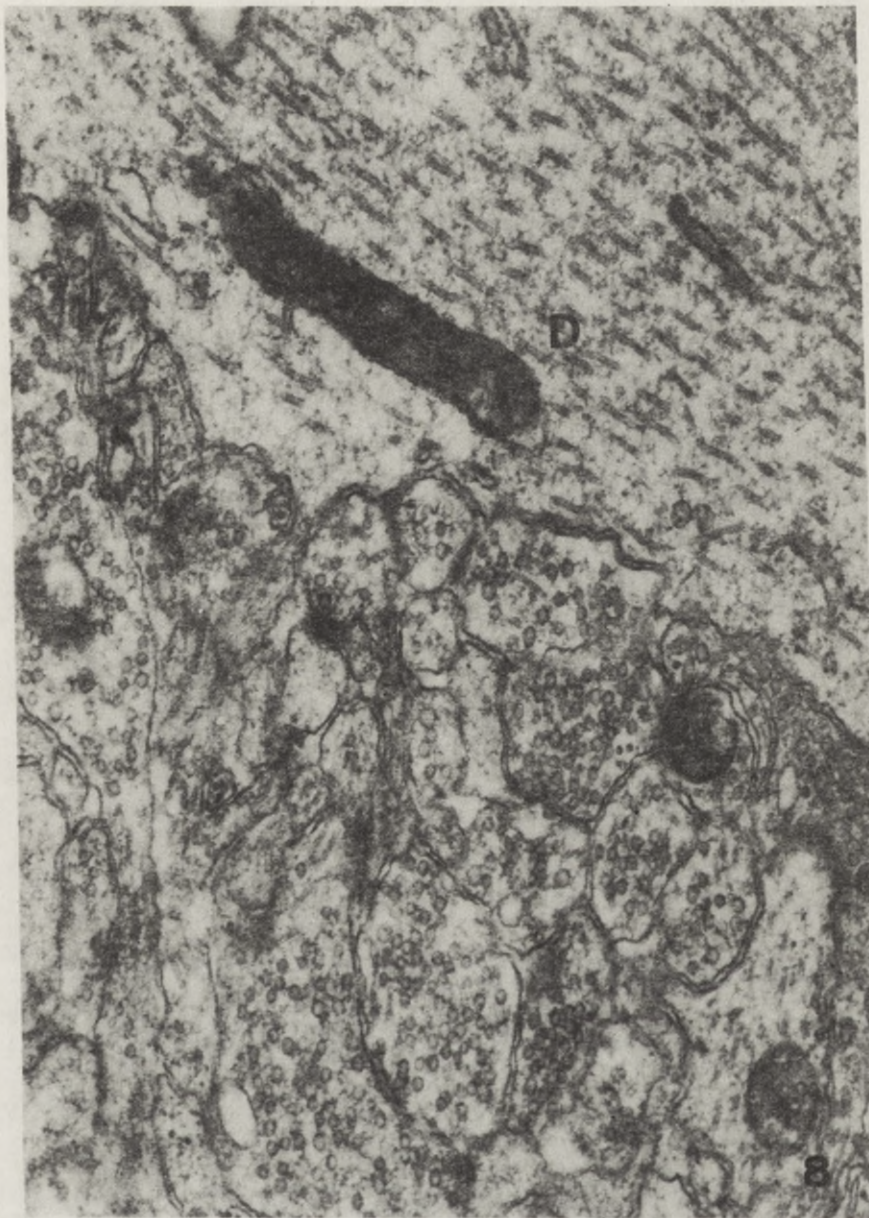
4. *Stratum lacunosum-moleculare*. W warstwie tej na dendrytach wierzchołkowych neuronów piramidowych obecne są zakończenia włókien spoidłowych, kolaterali Schaffera oraz interneuronów. Interneurony tworzą również pomiędzy sobą synapsy „en passant”. Większość obserwowanych synaps w odcinku presynaptycznym zarówno na dendrytach, jak również w neuropilu, wykazuje znaczne obrzmienie. Aksoplazma ich jest jasna, ilość pęcherzyków synaptycznych występujących przeważnie w skupieniach jest mniejsza; pojedyncze mitochondria są obrzmięte. Dotyczy to zarówno synaps typu symetrycznego, jak i asymetrycznego. Zachowany jest jednak ścisły kontakt pomiędzy odcinkiem pre- i postsynaptycznym (ryc. 10). W warstwie tej spotyka się także obrzmięte, okółonaczyniowe wypustki astrocytarne.

5. *Stratum moleculare*. Oprócz wyżej podanych struktur morfologicznych wchodzących w skład *stratum lacunosum-moleculare* znajdują się tu dodatkowo zakończenia włókien nerwowych pochodzących z kory entorynalnej. Obrazy ultrastrukturalne synaps nie różnią się od opisanych powyżej. Oprócz synaps o prawidłowej budowie ultrastrukturalnej, wiele synaps wykazuje cechy znacznego obrzmienia (ryc. 11).

## II Grupa doświadczalna (24 godz. po niedokrwieniu)

1. *Stratum pyramidale*. Pojedyncze neurony piramidowe wykazują w tym okresie cechy morfologiczne sugerujące ich wzmożoną aktywność. Cechuje je obecność obfitej siateczki śródplazmatycznej ziarnistej i dobrze rozwiniętego kompleksu Golgiego oraz liczne mitochondria, lizosomy i polirybosomy. Obficie występują również włókniste elementy cytoskeletonu. Na perykariach komórek oprócz ultrastrukturalnie niezmiennych synaps, występują również synapsy o przejaśnionej aksoplazmie (ryc. 12). Stosunkowo liczne neurony piramidowe wykazują jednakże zaawansowane nieprawidłowości obrazu mikroskopowo-elektronowego. Występują one przede wszystkim w obszarze cytoplazmy. Obserwuje się tu dezintegrację siateczki śródplazmatycznej ziarnistej i polirybosomów. Pojawiają się także małe skupiska elektronowo-gęstego nieobłonionego, ziarnistego materiału identyfikowanego ze złogami wapnia. Mitochondria w tak zmienionych neuronach mają na ogół prawidłową budowę, niektóre tylko wykazują cechy obrzmienia (ryc. 13). Synapsy

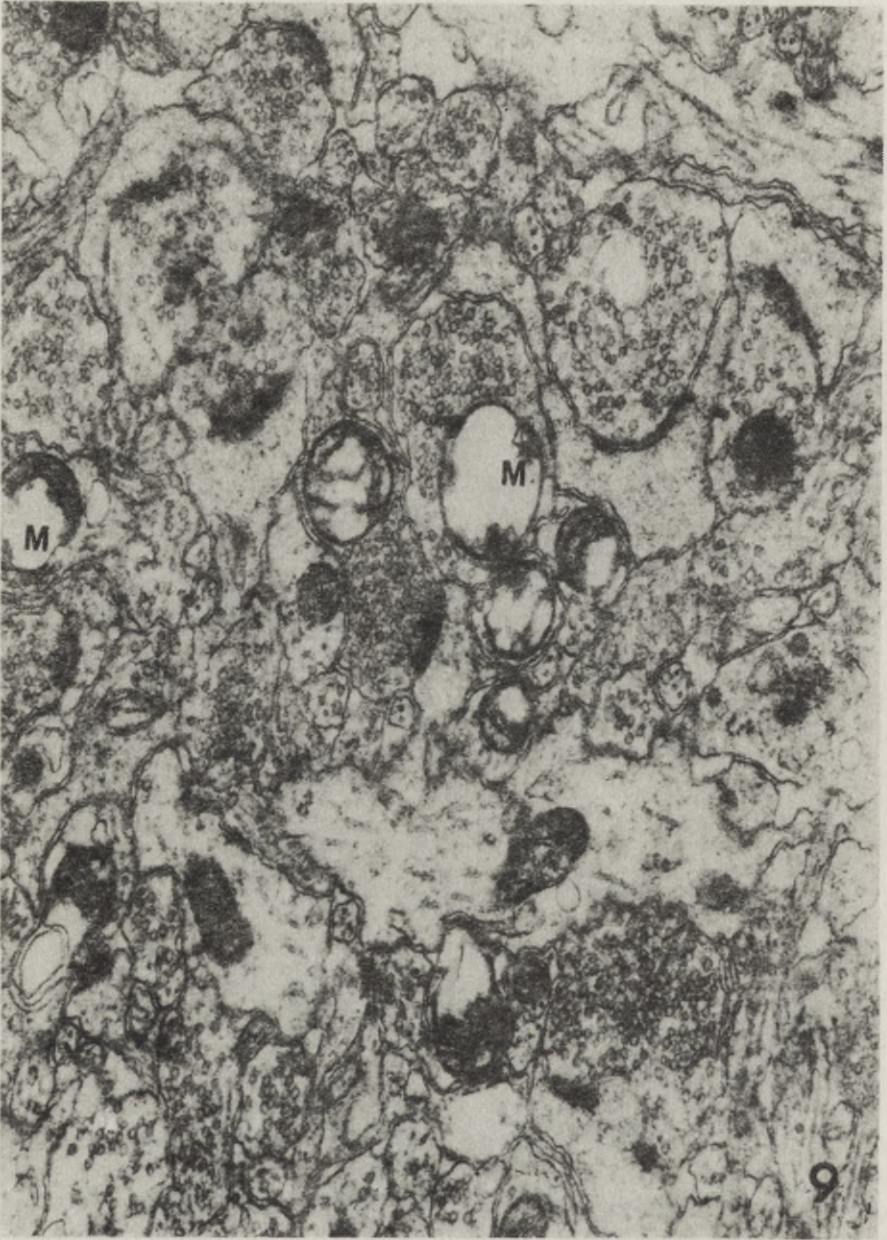




Ryc. 8. I grupa doświadczalna. *Stratum radiale*. Fragment dendrytu szczytowego (D) neuronu piramidowego o prawidłowej budowie oraz neuropil składający się z synaps ultrastrukturalnie niezmiennych. Pow. 45 000 ×

Fig. 8. I experimental group. *Stratum radiale*. Fragment of apical dendrite (D) of pyramidal neuron revealing entirely normal ultrastructure. Unchanged synapses are present in neuropil. × 45 000

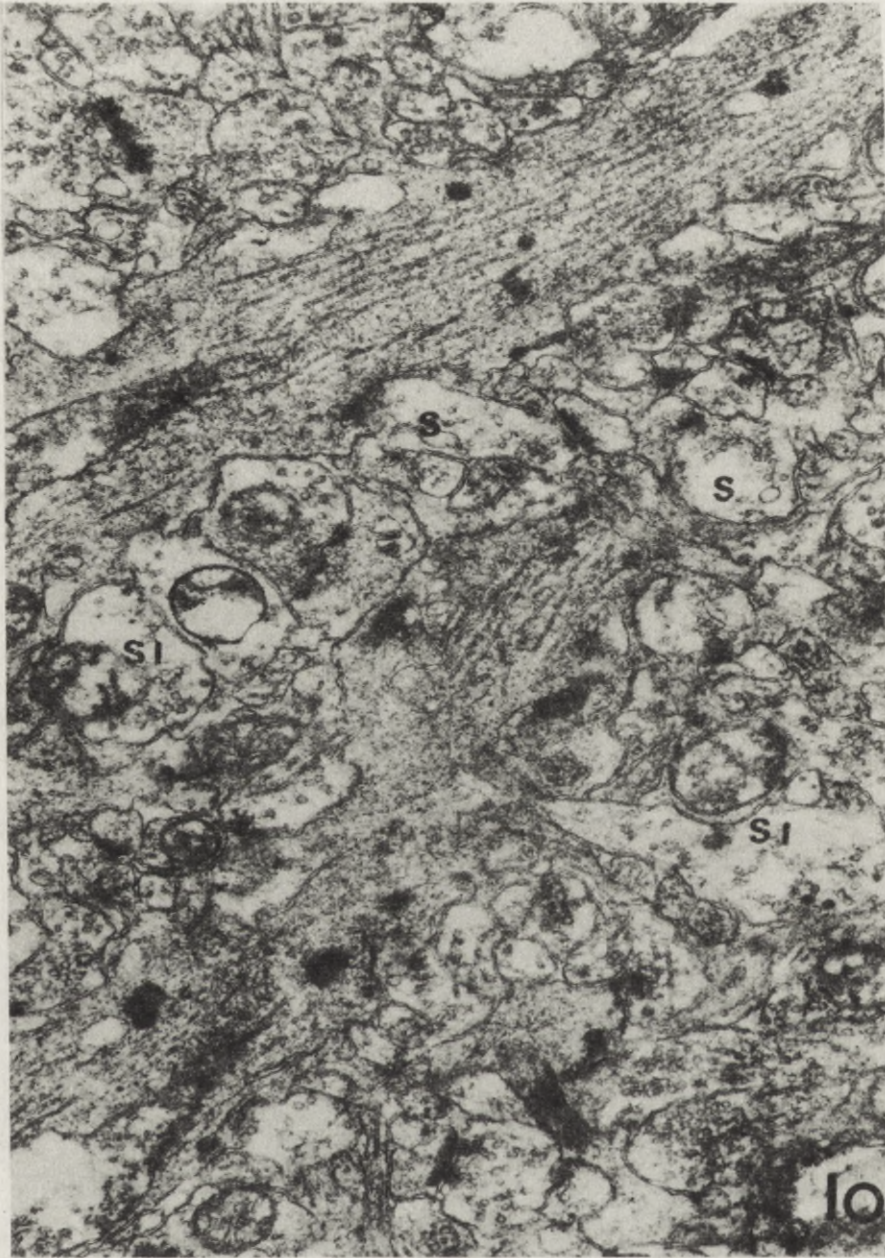




Ryc. 9. I grupa doświadczalna. *Stratum radiale*. W neuropilu widoczne synapsy z obrzmiałymi pojedynczymi mitochondriami (M). Pow. 37 500 ×

Fig. 9. I experimental group. *Stratum radiale*. Synapses occasionally containing swollen mitochondria (M) are visible in neuropil. × 37 500

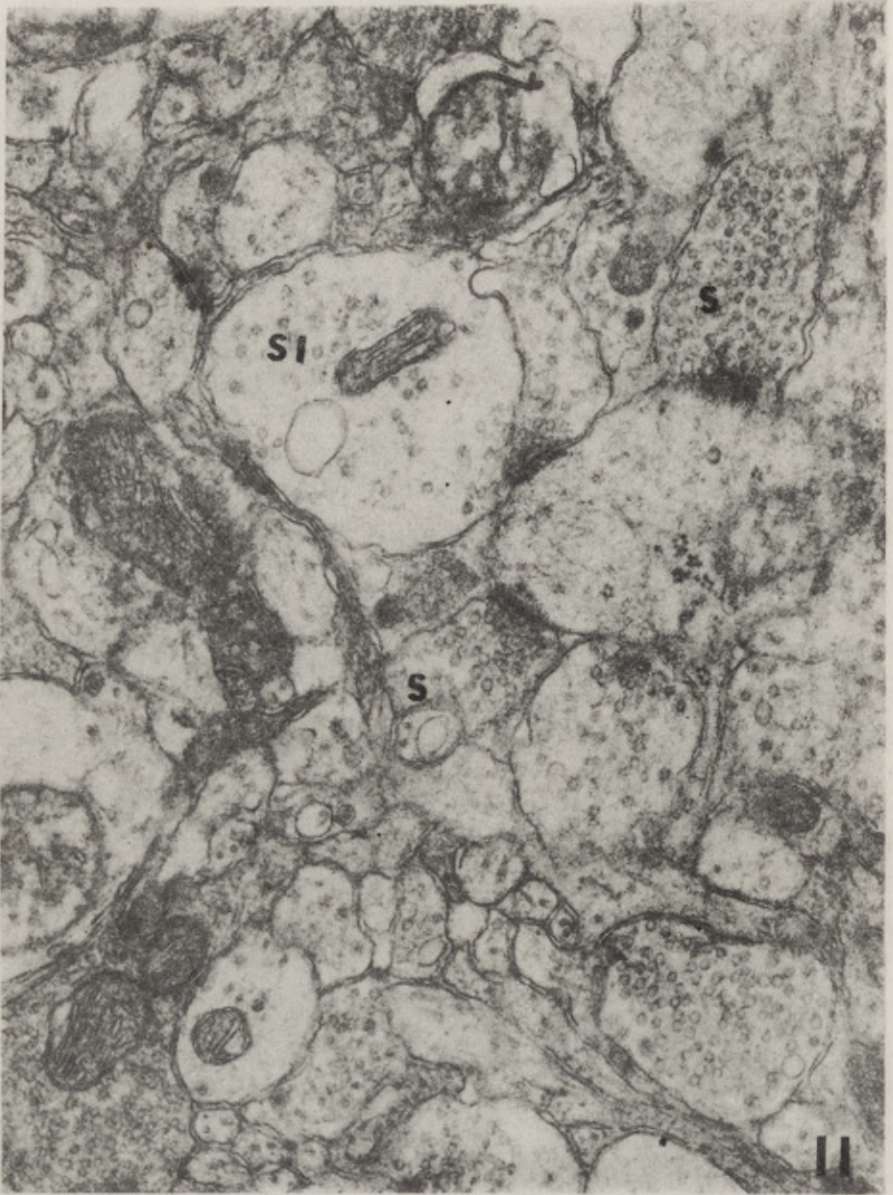




Ryc. 10. I grupa doświadczalna. *Stratum lacunosum-moleculare*. Widoczne połączenia akso-dendrytyczne (S) oraz akso-aksonalne (SI). Niektóre wykazują obrzmienie w częściach presynaptycznych. Pow. 36 000 ×

Fig. 10. I experimental group. *Stratum lacunosum-moleculare*. Axo-dendritic (S) and axo-axonal (SI) synapses are visible. Some of them show swelling in presynaptic areas. × 36 000

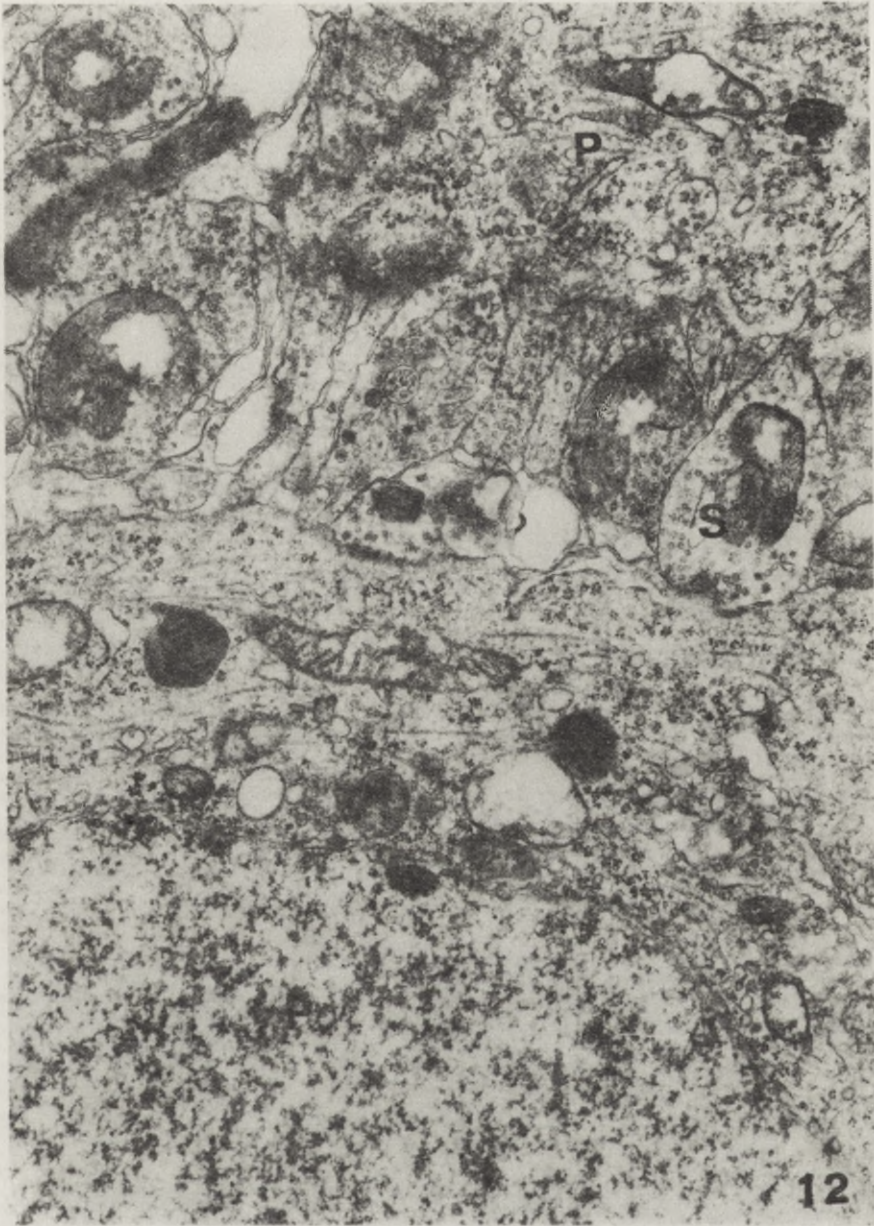




Ryc. 11. I grupa doświadczalna. *Stratum moleculare*. W neuropilu widoczne są asymetryczne synapsy akso-dendrytyczne o prawidłowej w większości ultrastrukturze (S) lub obrzmiałe w części presynaptycznej ( $S_1$ ). Pow. 52 500  $\times$

Fig. 11. I experimental group. *Stratum moleculare*. Asymmetric axo-dendritic synapses with predominantly normal ultrastructure (S) and some swollen in presynaptic parts ( $S_1$ ) are visible in neuropil.  $\times 52\ 500$

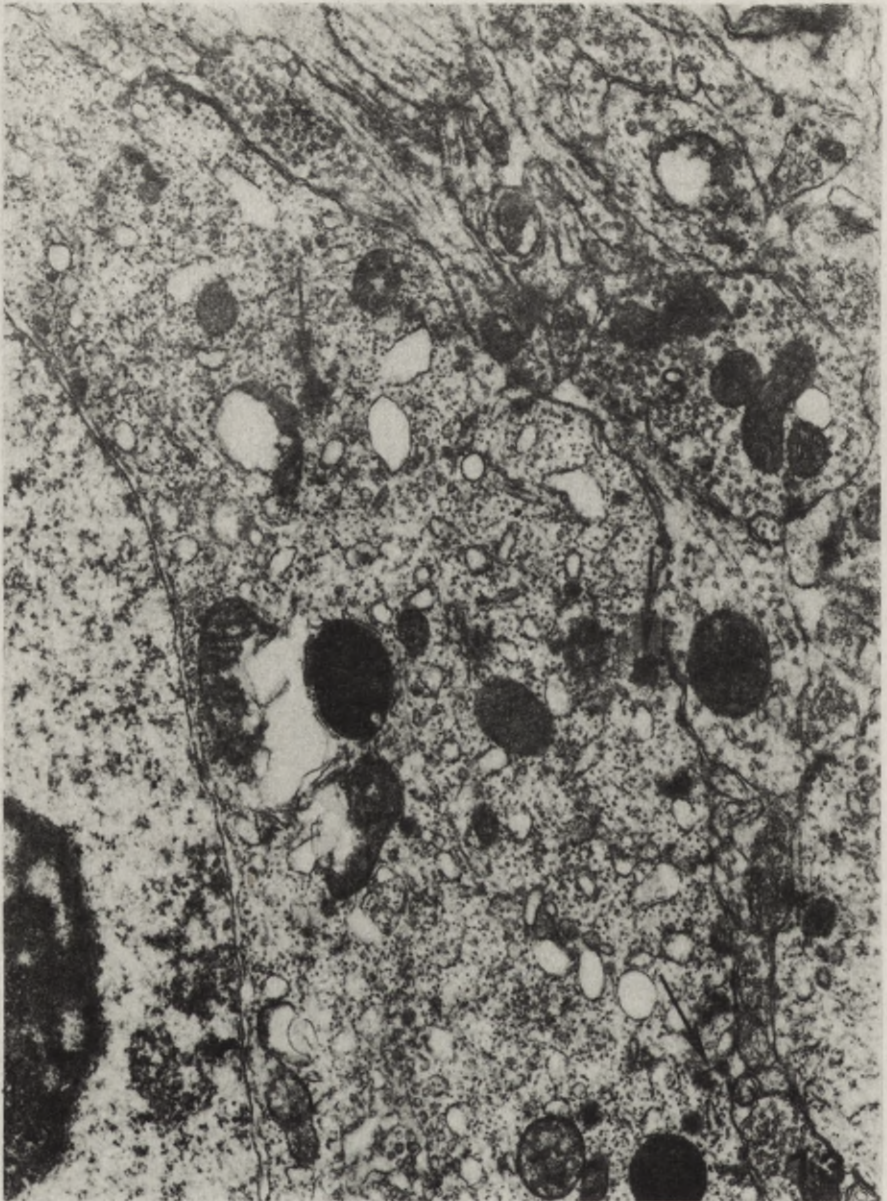




Ryc. 12. II grupa doświadczalna. *Stratum pyramidale*. Fragmenty dwóch neuronów piramidowych (P). Pomiędzy nimi zawarte są synapsy ze zróżnicowaną zawartością pęcherzyków (S). Pow. 25 000  $\times$

Fig. 12. II experimental group. *Stratum pyramidale*. Fragments of two pyramidal neurons (P) with synapses located between them. Note varying content of synaptic vesicles (S).  $\times 25\ 000$

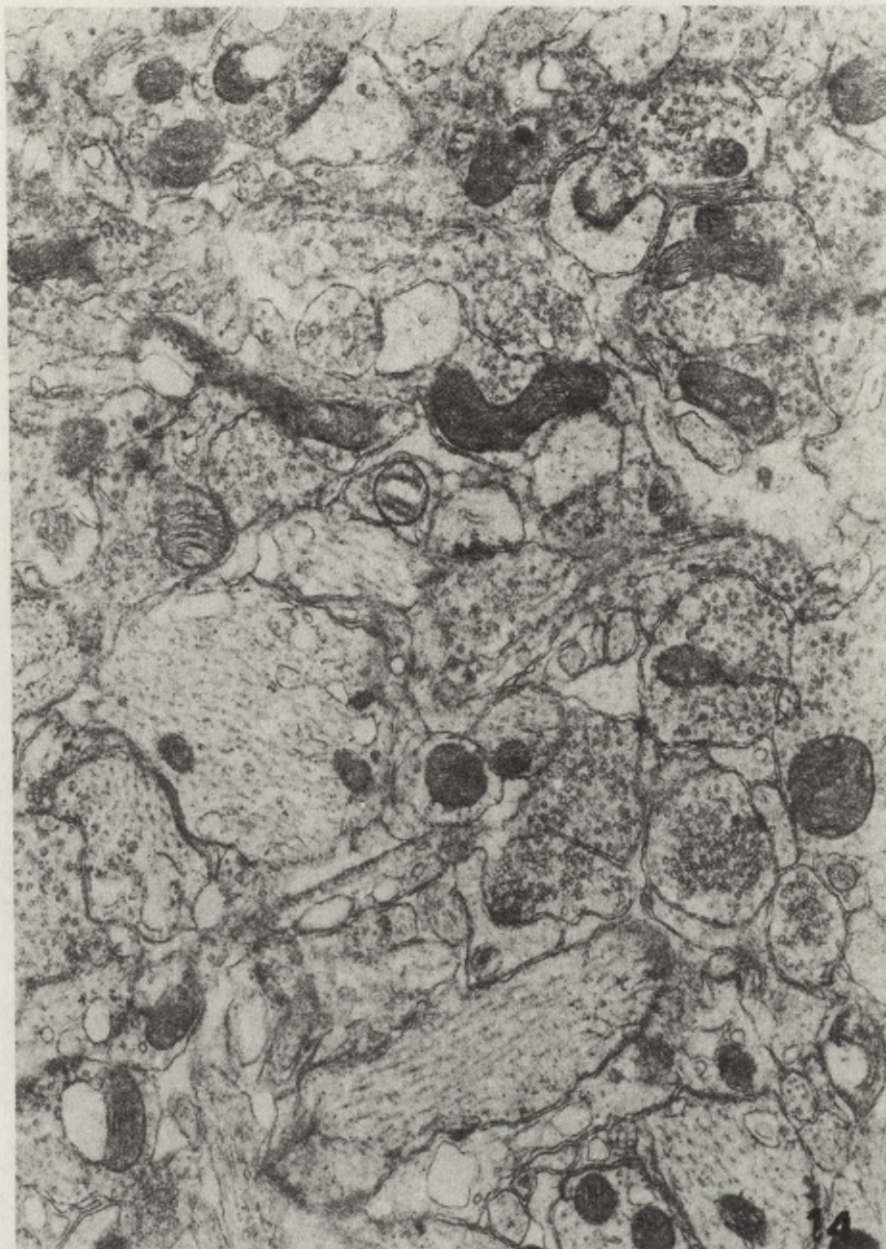




*Ryc. 13.* II grupa doświadczalna. *Stratum pyramidale*. Fragment zmienionego neuronu piramidowego. W cytoplazmie widoczna dezintegracja siateczki śródplazmatycznej ziarnistej i polirybosomów. Strzałki pokazują skupienia materiału elektronowo-gęstego. Synapsy (S) o prawidłowej ultrastrukturze. Pow. 25 000 ×

*Fig. 13.* II experimental group. *Stratum pyramidale*. Fragment of altered pyramidal neuron. Disintegration of granular endoplasmic reticulum and polyribosomes. Arrows point to aggregation of electron dense material. Synapses (S) with normal ultrastructure. × 25 000

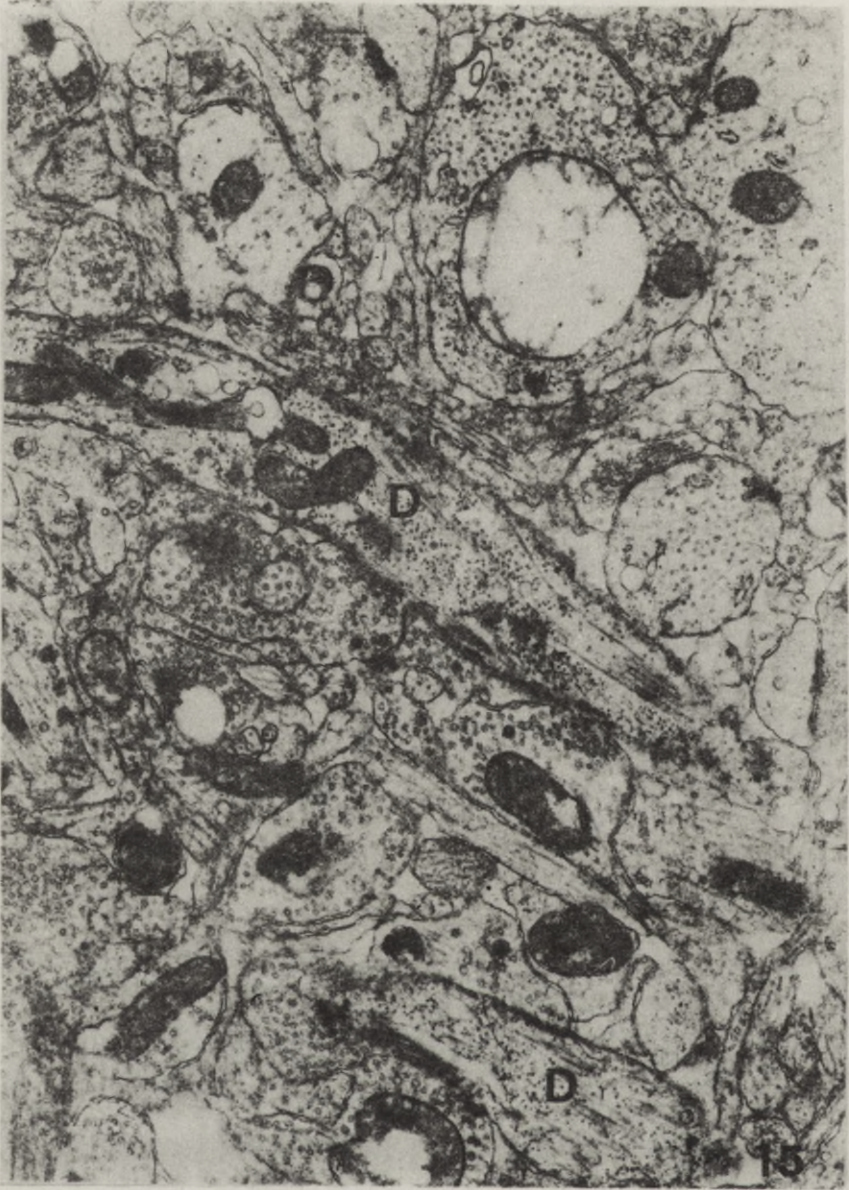




Ryc. 14. II grupa doświadczalna. *Stratum pyramidale*. Fragment neuropilu o prawidłowym obrazie ultrastrukturalnym połączeń akso-dendrytycznych i pozostałych elementów tkankowych. Pow. 25 000 ×

Fig. 14. II experimental group. *Stratum pyramidale*. Fragment of neuropil exhibiting normal ultrastructure of both axo-dendritic synapses as well as other tissue elements. × 25 000

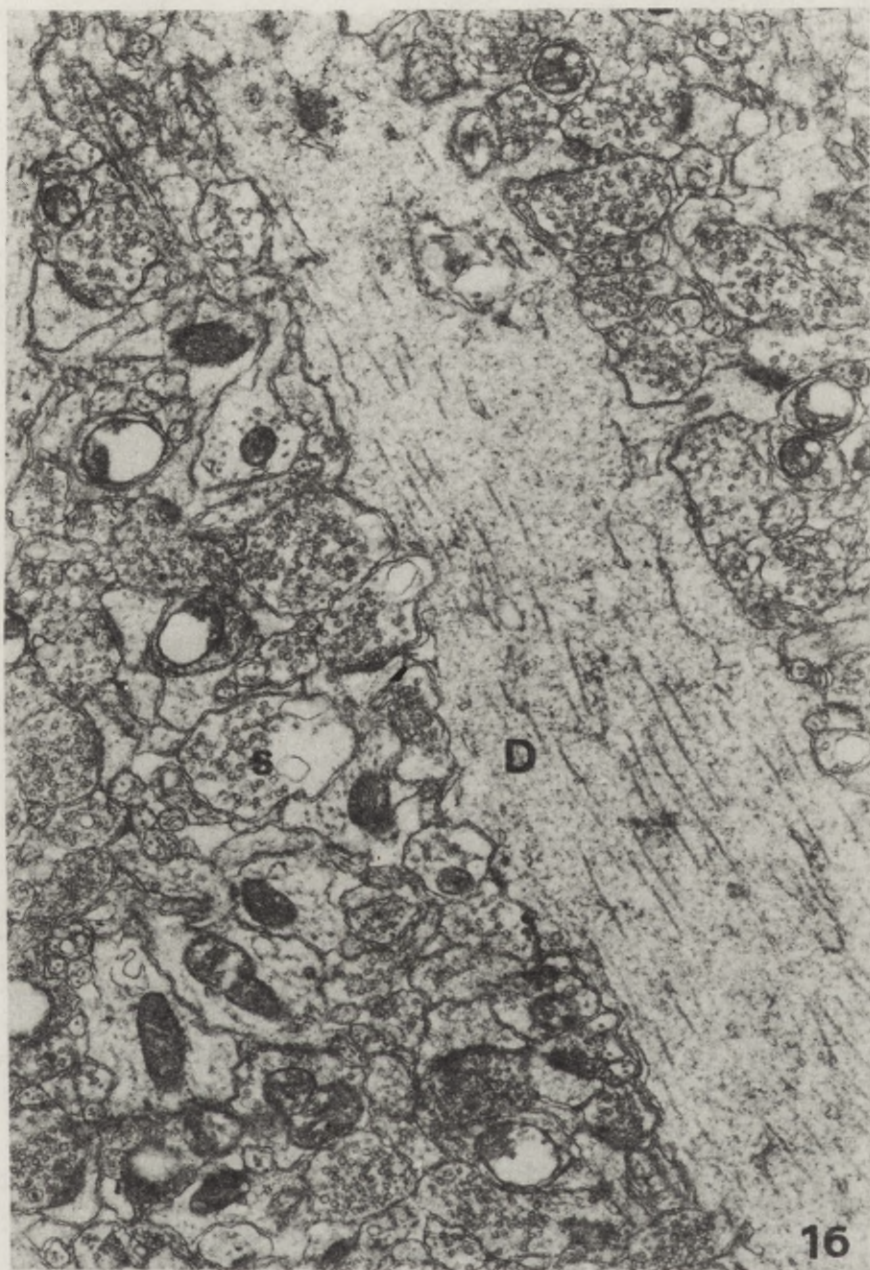




Ryc. 15. II grupa doświadczalna. *Stratum oriens*. Na podłużnych i poprzecznych przekrojach dendrytów podstawnych neuronów piramidowych (D) widoczne są obrzmiałe mitochondria oraz liczne rybosomy. Synapsy wykazują prawidłową ultrastrukturę. Pow. 25 000 ×

Fig. 15. II experimental group. *Stratum oriens*. Longitudinal and transverse profiles of basic dendrites (D) of pyramidal neurons exhibiting swollen mitochondria and abundant ribosomes. Synapses unchanged. × 25 000.

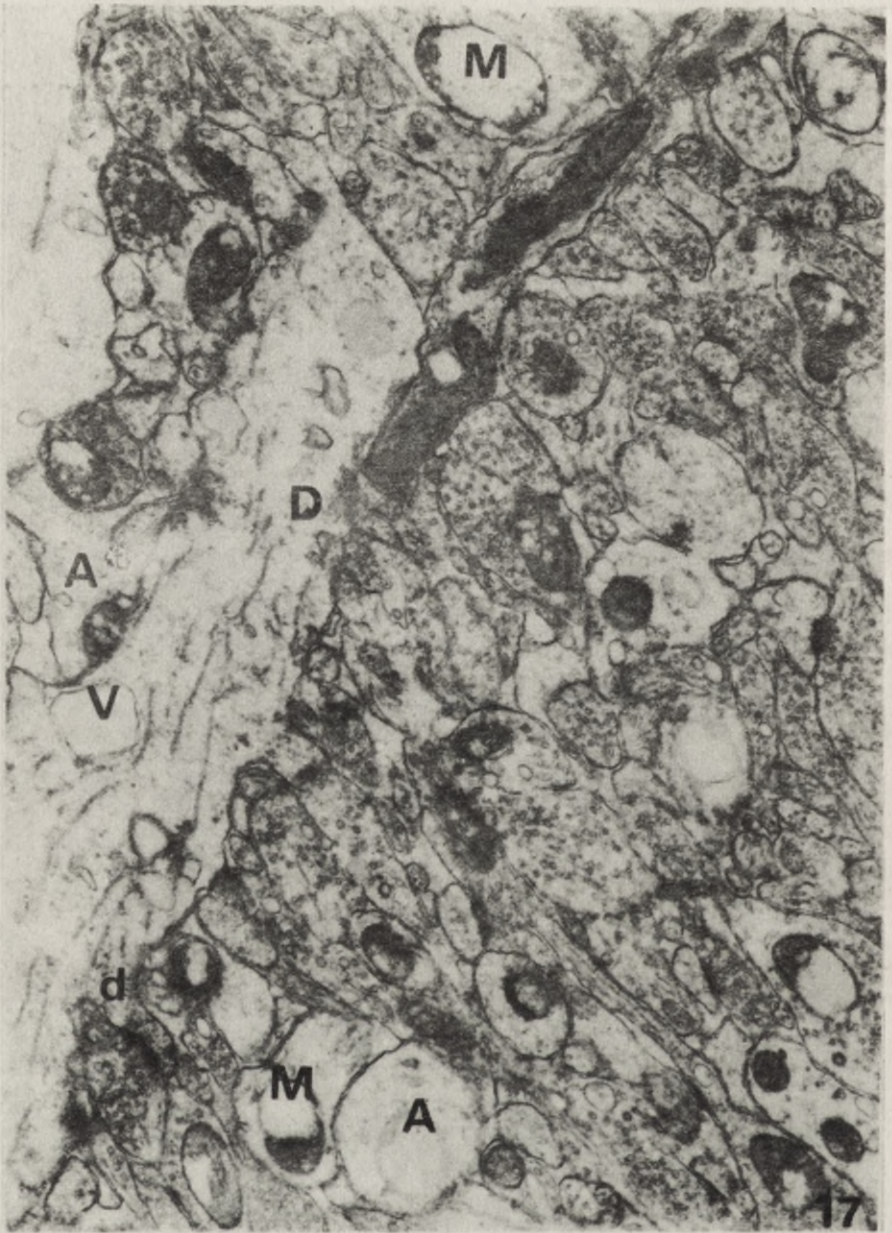




Ryc. 16. II grupa doświadczalna. *Stratum radiale*. Dendryt szczytowy neuronu piramidowego (D). Synapsy w neuropilu w większości wykazują prawidłową ultrastrukturę. Niektóre z nich (S) wykazują cechy obrzmienia. Pow. 25 000 ×

Fig. 16. II experimental group. *Stratum radiale*. Apical dendrite (D) of pyramidal neuron. Majority of synapses on dendrite are normal. Occasional synapses in neuropil exhibiting considerable swelling (S). × 25 000

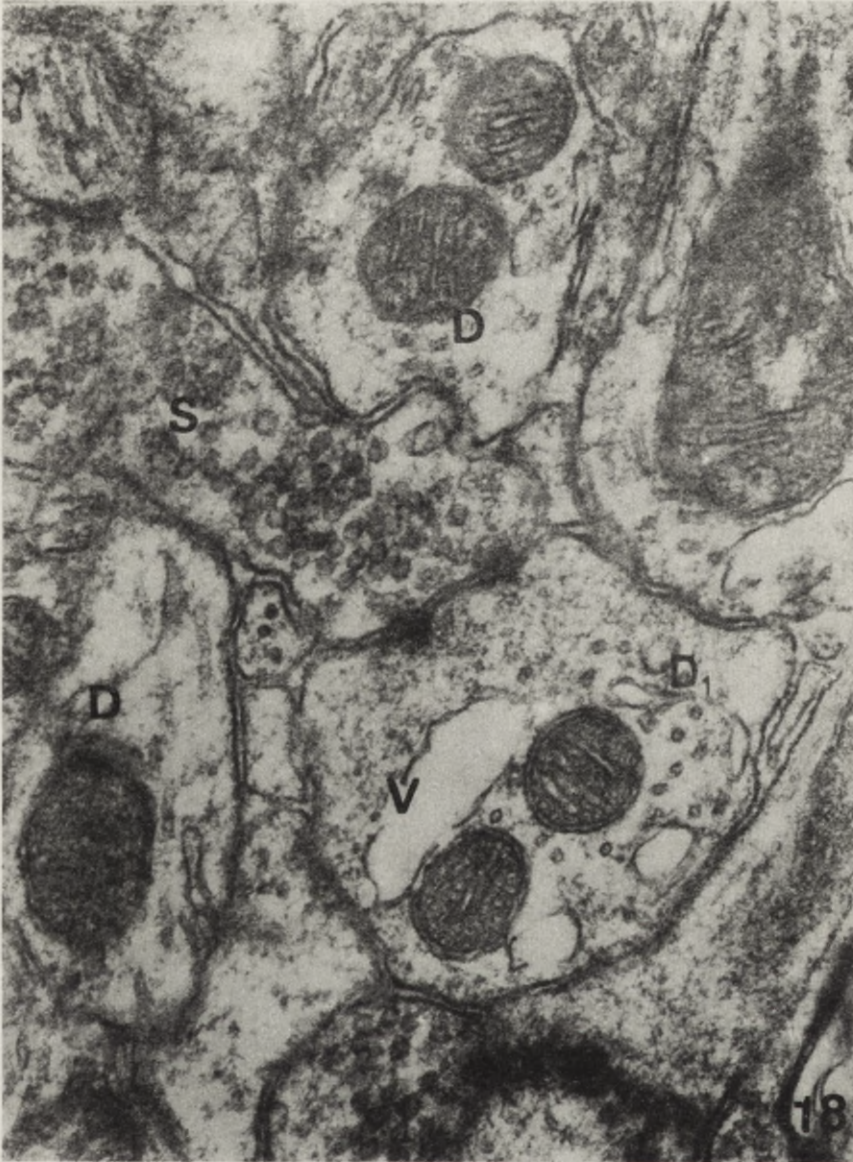




Ryc. 17. II grupa doświadczalna. *Stratum lacunosum-moleculare*. W neuropilu widoczne są obrzmiałe wypustki astrocytów (A) oraz obrzmiałe dendryty (D). W ich cytoplazmie występują elektronowo-przeźierne wakuole (V) bądź obrzmiałe mitochondria (M). Na kolcach dendrytycznych (d) oraz w neuropilu obecne są niezmiennione kolbki presynaptyczne. Pow. 25 000 ×

Fig. 17. II experimental group. *Stratum lacunosum-moleculare*. Swollen astrocytic processes (A) and dendrites (D) are visible in neuropil. Electron-lucent vacuoles (V) and swollen mitochondria (M) are present in their cytoplasm. Unchanged axo-spinal synapses (d) are present in neuropil. × 25 000





Ryc. 18. II grupa doświadczalna. *Stratum moleculare*. Widoczne dwa przekroje poprzeczne dendrytów o prawidłowej ultrastrukturze (D) oraz jeden zmieniony (D<sub>1</sub>) z przejaśnioną cytoplazmą zawierającą wakuole (V). Wchodzące z nim w kontakt kolbki synaptyczne (S) nie wykazują nieprawidłowości ultrastrukturalnych. Pow. 75 000 ×

Fig. 18. II experimental group. *Stratum moleculare*. Two transverse profiles of dendrites (D) with normal ultrastructure and one (D<sub>1</sub>), exhibiting electron-lucent cytoplasm. Some vacuoles (V) are visible. Note ultrastructurally unchanged synapses (S). × 75 000



obecne w tej warstwie w większości zachowują prawidłowy obraz ultrastrukturalny. Przeważnie zawierają one dużą ilość pęcherzyków synaptycznych (ryc. 14). Interneurony w tym okresie nie wykazują nieprawidłowości ultrastrukturalnych.

2. *Stratum oriens*. Wiele zawartych w tej warstwie dendrytów podstawnych neuronów piramidowych charakteryzuje się nagromadzeniem dużych, obrzmiałych mitochondriów, znaczną ilością luźno leżących pojedynczych rybosomów oraz obecnością figur mielinowych. Większość synaps tej warstwy wykazuje prawidłową ultrastrukturę. Część z nich odznacza się zwiększoną ilością pęcherzyków synaptycznych (ryc. 15).

3. *Stratum radiale*. W większości obserwowanych w tej warstwie synaps jedyną spotykaną nieprawidłowością jest obecność obrzmiałych mitochondriów oraz zmienna ilość pęcherzyków synaptycznych (ryc. 16). Poza tym synapsy wykazują prawidłowy obraz ultrastrukturalny.

4. *Stratum lacunosum-moleculare*. Oprócz dendrytów o prawidłowym obrazie ultrastrukturalnym obecne są tu stosunkowo liczne obrzmiałe dendryty o elektronowo-przeziernym cytoplazmie z licznymi wakuolami. Charakteryzują je przy tym dobrze zachowane elementy cytoskeletonu.

Niektóre z widocznych w nich mitochondriów wykazują cechy obrzmienia. Charakterystyczne dla tej okolicy liczne niesymetryczne synapsy aksonalno-kolcowe wykazują prawidłową ultrastrukturę, nawet w tych przypadkach, gdy kolce związane są z nieprawidłowymi dendrytami. Podobnie, pozostałe kontakty synaptyczne widoczne w tej warstwie nie wykazują mikroskopowo-elektronowych nieprawidłowości. Zwraca uwagę natomiast obecność obrzmiałych wypustek astrocytarnych (ryc. 17).

5. *Stratum moleculare*. W warstwie tej, podobnie jak w poprzedniej, wśród dendrytów o prawidłowej budowie spotyka się dendryty wykazujące cechy obrzmienia. Charakteryzują się one przejaśnioną cytoplazmą oraz występowaniem elektronowo-przeziernych wakuoli, a także obecnością znacznie obrzmiałych mitochondriów. Kolbki presynaptyczne spotykane w tej warstwie nawet wówczas gdy wytwarzają kontakty ze zmienionymi dendrytami nie wykazują nieprawidłowości ultrastrukturalnych. Niekiedy tylko zawierają pojedyncze, nieco obrzmiałe mitochondria (ryc. 18).

#### OMÓWIENIE

Obserwacje mikroskopowo-elektronowe pozwoliły na stwierdzenie, że krótkotrwałe 7,5 minutowe pełne niedokrwienie przodomózgowia u chomików mongolskich powoduje pojawienie się nieprawidłowości ultrastrukturalnych we wszystkich warstwach kory sektora CA<sub>1</sub> zakrętu hipokampa we wczesnym okresie poniedokrwinnym. W zależności jednak od czasu dokonywanych obserwacji po przeprowadzeniu doświadczenia można prześledzić różnice charakteru i nasilenia pojawiających się odchyień od stanu prawidłowego.

W najwcześniejszym okresie obserwacji, to jest w 12 godz. po niedokrwie-



niu, neurony piramidowe wykazywały minimalne zmiany, wyrażające się w niektórych spośród nich zwiększeniem liczebności lizosomów, a niekiedy również obecnością elektronowo przeziernych wakuoli, zarówno w ich cytoplazmie perykarialnej, jak i w dendrytach. Natomiast znaczna część interneuronów widocznych w warstwie piramidowej wykazywała cechy obrzmienia o zróżnicowanym nasileniu. Większość synaps w poszczególnych warstwach odcinka CA<sub>1</sub> nie wykazywała istotnych nieprawidłowości ultrastrukturalnych. Dotyczyło to zwłaszcza warstwy komórek piramidowych oraz *stratum oriens* i *pyramidale*. Jednakże i w nich spotykało się nieliczne zarówno symetryczne, jak i niesymetryczne synapsy z cechami obrzmienia, zawierające nieregularne skupienia pęcherzyków o zmniejszonej liczebności oraz obrzmiałe mitochondria. W *stratum lacunosum-moleculare* natomiast, a w mniejszym stopniu w warstwie drobinowej, większość synaps znajdujących się na dendrytach szczytowych komórek piramidowych wykazywała znacznego stopnia obrzmienie kolbek presynaptycznych z zaburzonym rozkładem i liczebnością pęcherzyków synaptycznych. Cechą znamioną wszystkich warstw sektora CA<sub>1</sub> w tym okresie poniedokrwinnym było obrzmienie cytoplazmy astrocytów, a zwłaszcza ich wypustek okołonaczyniowych.

Po upływie 24 godz. od niedokrwienia większość synaps we wszystkich warstwach odcinka CA<sub>1</sub> wykazywała prawidłowy obraz ultrastrukturalny. Dotyczyło to w szczególności kolbek presynaptycznych, obficie wypełnionych pęcherzykami synaptycznymi. Sporadycznie jedynie spotykano nieznacznie obrzmiałe kolbki presynaptyczne, a nieco częściej kolbki zawierające pojedyncze obrzmiałe mitochondria.

Wyraźne zmiany natomiast dotyczyły stosunkowo licznych piramidowych komórek nerwowych. Były one dwojakiego rodzaju. Część neuronów charakteryzowała się dezintegracją ziarnistej siateczki śródplazmatycznej i polirybosomów oraz odkładaniem się drobnoziarnistych złogów nieobłonionego, elektronowo gęstego materiału, identyfikowanego z wapniem. Obok tak zmienionych komórek piramidowych, występowały neurony z wyraźnymi cechami hiperaktywności z obfitą siateczką śródplazmatyczną ziarnistą, dobrze rozwiniętym kompleksem Golgiego i licznymi układami polirybosomów. Niekiedy w perykarionach i dendrytach tych neuronów obecne były pojedyncze elektronowo-przeziernie wakuole. Opisane zmiany spostrzegano również w dendrytach podstawnych komórek piramidowych, zawartych w *stratum oriens*, jak i w ich dendrytach szczytowych rozgałęziających się w pozostałych warstwach kory.

W przeciwieństwie do wcześniejszego okresu obserwacji, komórki nerwowe sektora CA<sub>1</sub>, identyfikowane jako interneurony nie wykazywały żadnych nieprawidłowości ultrastrukturalnych. Obrzmienie okołonaczyniowych wypustek astrogleju charakteryzowało znaczne zróżnicowanie nasilenia.

Mechanizm zjawiska określonego nazwą opóźnionej śmierci neuronów, występującego wybiórczo w odcinku CA<sub>1</sub> zakrętu hipokampa, nie jest wyjaśniony. Przypuszcza się, że nieodwracalne uszkodzenie komórek piramidowych



tego obszaru stanowi nie tyle następstwo niedokrwienia tkanki, ile efekt ekscytotoksycznego działania aminokwasowych neurotransmiterów, wyzwolonego przez incydent niedokrwienno (Olney 1978; Pulsinelli 1985; Suzuki i wsp. 1985; Mossakowski i wsp. 1986). Związana z tym czynnościowa hiperaktywność neuronów występująca we wczesnym okresie po niedokrwieniu stanowi czynnik sprzyjający dkomórkowemu napływowi jonów wapnia (Harris i wsp. 1981; Simon i wsp. 1984), prowadzącemu do zaburzenia przemian metabolicznych kończących się śmiercią komórki (Siesjö 1981). Na ewentualny udział jonów wapnia w patomechanizmie tego typu uszkodzeń komórek piramidowych sektora CA<sub>1</sub> wskazują również korzystne wyniki z zastosowaniem czynników blokujących błonowe kanały wapniowe (Mossakowski, Gadamski 1987).

Przyjęcie koncepcji udziału ekscytotoksycznych neuromediatorów aminokwasowych w mechanizmie wybiórczych uszkodzeń neuronów piramidowych sektora CA<sub>1</sub> zwraca uwagę na charakter i stan ich aparatu synaptycznego. Jest faktem znanym iż neurony sektora CA<sub>1</sub> hipokampa otrzymują bogatą inerwację glutaminergiczną, pochodzącą między innymi z kolaterali Schaffera rozpoczynających się w komórkach piramidowych sektora CA<sub>3</sub> (Olney 1978; Wieraszko 1983). Stwierdzono ponadto, że wiele synaps w odcinku CA<sub>1</sub> hipokampa zawiera liczne neuropeptydy takie jak wazoaktywny polipeptyd jelitowy (VIP), cholecystokinina (CCK), substancja P, somatotensyna oraz metionina-enkefalina. Wszystkie te synapsy wywierają działanie pobudzające na neurony piramidowe (Kelly, Dodd 1981; Roberts i wsp. 1984; Harris i wsp. 1985; Nunzi i wsp. 1985). Oprócz synaps o charakterze pobudzającym na powierzchni neuronów piramidowych znajdują się synaptyczne zakończenia hamujące, pochodzące przede wszystkim od komórek koszyczkowych (Andersen i wsp. 1963). Istnieje również wiele danych wskazujących, że interneurony rozsiane z różną liczebnością we wszystkich warstwach odcinka CA<sub>1</sub> hipokampa, w których wykazano obfitą zawartość kwasu gamma-aminomasłowego (GABA), spełniają nadrzędną hamującą kontrolę nad populacją (a przynajmniej znaczną jej częścią) komórek piramidowych (Ribak i wsp. 1978; Frotscher i wsp. 1984).

Z obserwacji naszych wynika, iż większość synaps w odcinku CA<sub>1</sub> hipokampa we wczesnym okresie po niedokrwieniu, nie wykazuje istotnych nieprawidłowości ultrastrukturalnych. Na uwagę zasługuje jednakże fakt, iż stosunkowo mało nasilone w ogólnym obrazie zmiany dotyczyły w największej mierze *stratum lacunosum-moleculare* oraz *stratum moleculare*. Są to te warstwy kory odcinka CA<sub>1</sub>, w których znajduje się największe zagęszczenie glutaminergicznych zakończeń synaptycznych kolaterali Schaffera (Andersen i wsp. 1966). Na podstawie naszych badań nie można wiązać obrazu mikroskopowo-elektronowego synaps z ich stanem czynnościowym. Stwierdzone obrzmienia kolbek synaptycznych, zmiany liczebności i rozmieszczenia pęcherzyków mogą bowiem w równej mierze odzwierciedlać zmiany czynności neurotransmisyjnych, jak i zaburzenia przepuszczalności błon zakończeń aksonalnych, stano-



wiące następstwo niedokrwienia. Za taką interpretacją mogłyby przemawiać współistniejące niekiedy nieprawidłowości w obrazie mitochondriów. Zmiany przepuszczalności błon w synapsach w przypadkach niedokrwienia mózgu opisywano w korze odcinka CA<sub>1</sub> u szczurów przy zastosowaniu peroksydazy chrzanowej (Diemer, Ekström von Lubitz 1983). Dotyczyły one jednak głównie błon postsynaptycznych, a tylko w nieznacznym stopniu kolbek presynaptycznych i odnosiły się do wcześniejszych niż w naszych badaniach okresów po niedokrwieniu.

W spostrzeżeniach naszych odnoszących się do obrazu synaps odnotować trzeba również ewolucję zmian w okresie między 12 i 24 godz. po niedokrwieniu. W okresie wcześniejszym opisane nieprawidłowości w *stratum lacunosum-moleculare*, a po części również w warstwie drobinowej ograniczały się przede wszystkim do kolbek presynaptycznych, a znacznie mniej dotyczyły części postsynaptycznych. Obraz zakończeń presynaptycznych ulegał niemal całkowitej normalizacji w 24 godzinie okresu postischemicznego. W tym czasie natomiast w obu wspomnianych warstwach pojawiły się zmiany w obrazie rozgałęzień szczytowych dendrytów komórek piramidowych. Wzorec zmian przypominał tu nieprawidłowości opisywane w następstwie działania pobudzającego swoistych neurotoksyn, typu kwasu chinolinowego (Schwarcz i wsp. 1983).

Odrębnego omówienia wymaga zachowanie się interneuronów sektora CA<sub>1</sub> w badanym materiale. Obserwacje prowadzone w 12 godz. po niedokrwieniu wykazywały obecność znacznie obrzmiałych interneuronów. Ich obraz mikroskopowo-elektronowy ulegał normalizacji po upływie dalszych 12 godz. Można przypuszczać, że stwierdzone we wczesnym okresie poniedokrwieniowym zmiany towarzyszyły zaburzeniom funkcji interneuronów, wyrażającym się ich okresową niewydolnością, prowadzącą w konsekwencji do upośledzenia hamującej inercji neuronów piramidowych.

Obraz ultrastrukturalny interneuronów i jego ewolucja sugeruje odwracalność stwierdzonych nieprawidłowości. Wczesne zmiany interneuronów (obrzemie cytoplazmy, mitochondriów oraz synaps w odcinkach presynaptycznych) są typowe dla niedokrwieniowego uszkodzenia komórek nerwowych. Być może odzwierciedlają one zaburzenia czynnościowe, stanowiące wynik działania „czynników cytotoksycznych” towarzyszących niedokrwieniu np. zaburzeń elektrolitowych. Z badań Shigeno i wsp. (1986) wiadomo, iż istotnym czynnikiem patogenetycznym wczesnego cytotoksycznego, odwracalnego obrzęku mózgu w niedokrwieniu, związanego przede wszystkim z masywnym obrzmiem astrocytów, są zaburzenia homeostazy jonowej. Pogląd ten potwierdza Choi (1988), który wskazuje na jonowy mechanizm wczesnych uszkodzeń komórkowych po niedotlenieniu.

Podsumowując nasze spostrzeżenia można wysunąć przypuszczenie, iż nieodwracalne uszkodzenie neuronów piramidowych sektora CA<sub>1</sub> w następstwie krótkotrwałego niedokrwienia, poprzedzone ich wstępną, przejściową hiperaktywnością zainicjowane jest zachwianiem równowagi między ich pobu-



dzającą i hamującą inercją. Stanowi ono z jednej strony efekt ekscytotoksycznego działania aminokwasowych neurotransmiterów, z drugiej zaś czynnościowej niewydolności GABA-ergicznego interneuronów. Taki właśnie mechanizm opóźnionej śmierci neuronów był brany pod uwagę przez szereg autorów, między innymi przez Suzuki i wsp. (1985), w świetle znanej wrażliwości neuronów GABA-ergicznego na niedokrwienie (Sloper i wsp. 1980). Został on jednakże odrzucony na podstawie biochemicznych spostrzeżeń Francisa i Pulsinelli (1982) oraz ultrastrukturalnych obserwacji Johansena i wsp. (1983), wskazujących na stosunkowo znaczną oporność interneuronów odcinka CA<sub>1</sub> hipokampa szczura na niedokrwienie. Podobnie w naszych wcześniejszych badaniach stwierdzaliśmy niezmienny obraz mikroskopowo-elektronowy interneuronów odcinka CA<sub>1</sub> u chomików mongolskich, kontrastujący z postępującą dezintegracją komórek piramidowych (Mossakowski i wsp. 1989). Należy jednakże uwzględnić w tym miejscu fazę okresu poischemicznego, w której prowadzono obserwacje. Nasze obecne badania wykazały zmianę obrazu interneuronów w 12 godz. po niedokrwieniu. W tym samym czasie procesu patologicznego Arai i Yasumoto (cyt. za Suzuki i wsp. 1985) stwierdzili znaczny spadek zawartości GABA w odcinku CA<sub>1</sub>. Badania Francisa i Pulsinelli (1982) oraz Johansena i wsp. (1983), a także nasze własne (Mossakowski i wsp. 1989) prowadzone były po upływie 24 godz. od niedokrwienia kiedy, jak wynika z naszych obecnych obserwacji, dochodzi do całkowitej ultrastrukturalnej normalizacji interneuronów.

INFLUENCE OF SHORT-TERM ISCHEMIA ON THE ULTRASTRUCTURE  
OF HIPPOCAMPAL GYRUS IN MONGOLIAN GERBILS.  
Part II. ELECTRON MICROSCOPE PICTURE OF SYNAPSES  
IN EARLY POSTISCHEMIC PERIOD

Summary

Ultrastructure of synaptic contacts, located in all cortical layers (*stratum oriens, pyramidale, radiale, lacunosum-moleculare* and *moleculare*) of CA<sub>1</sub> hippocampal sector were studied in Mongolian gerbils, subjected to 7.5 min forebrain ischemia, resulting from bilateral ligation of common carotid arteries. Two experimental groups were used. Group I included animals with 12 h postischemic survival, group II consisted of those which survived 24 h after ischemic insult.

CA<sub>1</sub> sector in animals from group I was characterized by cytoplasmic and mitochondrial swelling of hippocampal interneurons (both perikarya and cell processes and their endings) localized in *stratum pyramidale*. Additional abnormality consisted in remarkable swelling with vesicular disorganization of presynaptic bags situated mostly in *stratum lacunosum-moleculare* and to lesser degree in *stratum moleculare*. There was considerable swelling of astrocytic perikarya and processes, mostly perivascular ones in all Ammon's horn cortical layers. Pyramidal neurons and all other tissue elements remained ultrastructurally unchanged.

In experimental group II ultrastructural abnormalities concerned CA<sub>1</sub> pyramidal neurons which showed either electron microscopic evidences of cell metabolic activation or features of early phase of the delayed neuronal death. On the contrary electron microscope picture of hippocampal interneurons was totally normalized. So was ultrastructure of great majority of presynaptic nerve



endings visible in all cortical layers. However, great proportion of postsynaptic structures localized in *stratum lacunosum-moleculare* and partially in *stratum moleculare* revealed considerable swelling. This electron microscope picture was similar to that described as axon-sparing lesions resulting from the action of excitotoxic substances.

The authors conclude that the phenomenon known under the name of delayed neuronal death of CA<sub>1</sub> pyramidal cells may be initiated by imbalance between their excitatory and inhibitory innervation resulting from an early reversible insufficiency of GABA-ergic interneurons and excitatory action of glutamergic synapses originating from Schaffer's collaterals.

#### PIŚMIENNICTWO

1. Andersen A., Blackstad B., Lomo T.: Location and identification of excitatory synapses on hippocampal pyramidal cells. *Exp Brain Res*, 1966, 1, 236–248.
2. Andersen A., Eccles J. C., Löyning V.: Recurrent inhibition in the hippocampus with identification of the inhibitory cell and its synapses. *Nature*, 1963, 198, 540–542.
3. Arai H., Yasumoto T.: – cytowane za Suzuki i wsp. poz.30.
4. Choi D. W.: Calcium-mediated neurotoxicity: relationship to specific channel types and role in ischemic damage. *Trends Neurosci*, 1988, 11, 456–469.
5. Diemer N. H., Ekström von Lubitz D. K. J.: Cerebral ischemia in the rat: increased permeability of postsynaptic membranes to horseradish peroxidase in the early postischemic period. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 1983, 9, 403–414.
6. Francis A., Pulsinelli W. A.: Response of GABA-ergic and cholinergic neurons to transient cerebral ischemia. *Brain Res*, 1982, 243, 271–278.
7. Frotscher M., Lerenth Cs., Lubbers K., Oertel W. H.: Commissural afferents innervate glutamate decarboxylase immunoreactive non-pyramidal neurons in the guinea pig hippocampus. *Neurosci Lett*, 1984, 46, 137–143.
8. Gajkowska B., Gadamski R., Wawrzyniak E.: Wpływ krótkotrwałego niedokrwienia na ultrastrukturę zakrętu hipokampa u chomików mongolskich. Część I. Ultrastrukturalna charakterystyka odcinka CA<sub>1</sub> rogu Amona ze szczególnym uwzględnieniem obrazu połączeń synaptycznych. *Neuropatol Pol*, 1988, 26, 455–476.
9. Harris K. M., Marshall, P. E., Landis D. M. D.: Ultrastructural study of cholecystokinin-immunoreactive cells and processes in area CA<sub>1</sub> of the rat hippocampus. *J Comp Neurol*, 1985, 233, 147–158.
10. Harris R. J., Symon L., Branston N. M., Bayhan M.: Changes in extracellular calcium activity in cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1981, 1, 203–209.
11. Johansen F. F., Jørgensen M. B., Diemer N. H.: Resistance of hippocampal CA<sub>1</sub> interneurons to 20 min transient cerebral ischemia in the rat. *Acta Neuropathol (Berl)*, 1983, 61, 135–140.
12. Kelly J. S., Dodd J.: Cholecystokinin and gastrin as transmitters in mammalian central nervous system. W: *Neurosecretion and brain peptides*. Red.: J. B. Mortin, S. Reichlin, K.L. Bick, Raven Press, New York, 1981, 133–144.
13. Kirino T.: Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. *Brain Res*, 1982, 239, 57–69.
14. Kirino T., Sano K.: Selective vulnerability in the gerbil hippocampus following transient ischemia. *Acta Neuropathol (Berl)*, 1984, 62, 201–208.
15. Kirino T., Tamura A., Sano K.: Selective vulnerability of the hippocampus to ischemia – reversible and irreversible types of ischemic cell damage. *Prog Brain Res*, 1985, 63, 39–58.
16. Mossakowski M. J., Gadamski R.: Wpływ blokowania błonowych kanałów wejścia wapnia na rozwój niedokrwienych uszkodzeń neuronów sektora CA<sub>1</sub> rogu Amona u chomików mongolskich. *Neuropatol Pol*, 1987, 25, 439–450.
17. Mossakowski M. J., Gajkowska B., Tsitsishvili A.: Lesions of CA<sub>1</sub> sector neurons in short-lasting cerebral ischemia in Mongolian gerbils. XIX Danube Symposium of Neurological Sciences. Heidelberg. 10–12 October 1986. Abstracts 47.



18. Mossakowski M. J., Gajkowska B., Tsitsishvili A.: Ultrastructure of neurons from the CA<sub>1</sub> sector of Ammon's horn in short-term cerebral ischemia in Mongolian gerbil. *Neuropatol Pol.* 1989, 27, 39–53.
19. Nunzi M. G., Gorio A., Milan F., Freud T. F., Somogyi P., Smith A. D.: Cholecystokinin-immunoreactive cells from symmetrical synaptic contacts with pyramidal and nonpyramidal neurons in the hippocampus. *J Comp Neurol*, 1985, 237, 485–489.
20. Olney J. W.: Neurotoxicity of excitatory amino acids. W: Kainic acid as a tool in neurobiology. Red.: E. G. McGeer, J. W. Olney, P. L. McGeer, Raven Prees, New York, 1978, 37–70.
21. Pulsinelli W. A.: Selective neuronal vulnerability: morphological and molecular characteristics. *Brain Res.* 1985, 63, 29–37.
22. Ribak C. E., Vaughn J. E., Saito K.: Immunocytochemical localization of glutamic acid decarboxylase in neuronal somata following colchicine inhibition of axonal transport. *Brain Res.* 1978, 140, 315–332.
23. Roberts G. W., Woodhams P. L., Polak J. M., Crow T. J.: Distribution of neuropeptides in the limbic system of the rat: the hippocampus. *Neuroscience*, 1984, 11, 35–77.
24. Schwarcz R., Whetsell W. D., Mangano R. M.: Quinolinic acid: an endogenous metabolite that produces axon-sparing lesions in rat brain. *Science*, 1983, 219, 316–318.
25. Shigeno T., Hanamura T., Mima T., Kaneko M., Asano T., Tahakura K.: Mechanism of ischemic brain edema: Aspects from brain capillary and glial function for ion transport. W: Brain microcirculation. Erwin Riesch Symposium. Berlin, September 2–5. 1986. Abstr.
26. Siesjö B. K.: Cell damage in the brain. A speculative synthesis. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1981, 1, 155–185.
27. Simon R. P., Griffiths T., Evans M. C., Swan J. H., Meldrum B. S.: Calcium overload in selectively vulnerable neurons of the hippocampus during and after ischemia. An electron microscopy study in rat. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1984, 4, 350–361.
28. Sloper J. J., Johanson P., Powell T. P. S.: Selective degeneration of interneurons in the motor cortex of infant monkeys following controlled hypoxia a possible cause of epilepsy. *Brain Res.* 1980, 198, 204–209.
29. Suzuki R., Yamaguchi T., Inaba V., Wagner H. G.: Microphysiology of selectively vulnerable neurons. *Prog Brain Res.* 1985, 63, 59–68.
30. Suzuki R., Yamaguchi T., Li C. L., Klatzo I.: The effect of 5-minute ischemia in Mongolian gerbils. II. Changes of spontaneous neuronal activity in cerebral cortex and CA<sub>1</sub> sector of hippocampus. *Acta Neuropathol (Berl)*, 1983, 60, 217–222.
31. Wieraszko A.: Biochemiczne przejawy plastyczności synaps ze szczególnym uwzględnieniem roli kwasu glutaminowego jako domniemanego neurotransmitera niektórych szlaków hipokampalnych. Praca habilitacyjna. Biblioteka Instytutu Biologii Doświadczalnej PAN, Warszawa, 193, ss. 4–12.

Adres autorów: Pracownia Ultrastruktury Układu Nerwowego; Zakład Neuropatologii Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN, 00–784 Warszawa, ul. Dworkowa 3.