

Структурно-функціональний стан гематоенцефалічного бар'єра при ритмічних та безперервних гіпотермічних впливах на організм шурів

UDC 616.15.831-002:612.59

V.S. MARCHENKO*, G.A. BABIYCHUK, L.N. MARCHENKO

Structural and Functional State of Blood Brain Barrier at Rhythmic and Continuous Effects on Rat's Organism

Вивчена функціональна архітектура елементів гематоенцефалічного бар'єра (ГЕБ) неокортекса і гіпоталамуса шурів при гіпотермії із застосуванням радіоізотопної методики визначення транспорту нейротрансмітерів, електронної мікроскопії та морфометрії. Показано, що безперервні і ритмічно організовані холододові впливи викликають односпрямовані зміни лінійних морфометричних показників і принципово різні фрактальні особливості в структурно-функціональному рисунку елементів ГЕБ. При безперервних холододових впливах протягом 120 хв фрактальна розмірність вивчених структур мозку змінюється синхронно й часто становить $\sim 1,5$ (структурна організація перебуває в зоні неузгоджених перебудов). При ритмічних гіпотермічних впливах змінюється в основному фрактальна розмірність переднього відділу гіпоталамуса, але вона залишається в персистентній зоні ($D \sim 1,3$). У цих умовах істотно підвищується проникність ГЕБ для нейротрансмітерів, що може визначати лікувальні ефекти гіпотермії.

Ключові слова: ритмічна гіпотермія, гематоенцефалічний бар'єр, ультраструктура, нейротрансмітери, фрактальна розмірність.

Изучена функциональная архитектура элементов гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) неокортекса и гипоталамуса крыс при гипотермии с применением радиоизотопной методики определения транспорта нейротрансмиттеров, электронной микроскопии и морфометрии. Показано, что непрерывные и ритмически организованные холододовые воздействия вызывают однонаправленные изменения линейных морфометрических показателей и принципиально разные фрактальные особенности в структурно-функциональном рисунке элементов ГЭБ. При непрерывных холододовых воздействиях на протяжении 120 мин фрактальная размерность (D) элементов ГЭБ изученных структур мозга изменяется синхронно и часто составляет $\sim 1,5$ (структурная организация находится в зоне несогласованных перестроек). При ритмических гипотермических воздействиях изменяется в основном фрактальная размерность ГЭБ переднего отдела гипоталамуса, но она остается в персистентной области ($D \sim 1,3$). В этих условиях существенно повышается проницаемость ГЭБ для нейротрансмиттеров, что может определять лечебные эффекты гипотермии.

Ключевые слова: ритмическая гипотермия, гематоэнцефалический барьер, ультраструктура, нейротрансмиттеры, фрактальная размерность.

There was studied functional architecture of blood brain barrier (BBB) of rat's neocortex and hypothalamus at hypothermia using the methods of determining the transport of neurotransmitters, electron microscopy and morphometry. It has been shown that continuous and rhythmically organized cold effects cause mono-directional alterations of linear morphometric parameters and principally different fractal peculiarities in structural and functional pattern of BBB elements. At continuous cold effect for 120 min the fractal dimension (D) of BBB elements of the studied brain structures changes synchronously and frequently makes ~ 1.5 (structural organization is in the zone of discordant rearrangements). Under rhythmic hypothermic effects the fractal dimension for BBB of anterior hypothalamus basically changes, but it remains in a persistent area ($D \sim 1.3$). Under these conditions the BBB permeability significantly increases for neurotransmitters, that may determined the therapeutic effects of hypothermia.

Key-words: rhythmic hypothermia, blood brain barrier, ultrastructure, neurotransmitters, fractal dimension.

Сучасні дані літератури свідчать про те, що у людини і тварин відзначається особлива чутливість до низькочастотних зовнішніх подразнень, а найбільша ефективність сенсорних, в тому числі гіпотермічних, впливів досягається при відповідності параметрів стимуляції і властивостей регуляторних систем організму [5], до яких, безсумнівно, відноситься гематоенцефалічний бар'єр (ГЕБ). Одним

з доведених механізмів дії гіпотермії є підвищення селективної проникності ГЕБ [3]. Однак найважливішою невирішеною проблемою залишається визначення загальних і специфічних структурно-функціональних патернів – корелятивів активності ГЕБ при різних програмах гіпотермії. Виведений охолодженням з рівноваги баланс нейроактивних речовин може як викликати, так і бути наслідком

Інститут проблем криобіології і криомедицини
НАН України, м. Харків

* Автор, якому необхідно направляти кореспонденцію:
вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61015; тел.: +380 (057) 373-31-26, факс: +380 (057) 373-30-84, електронна пошта: cryo@online.kharkov.ua

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

* To whom correspondence should be addressed: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 372 3435, fax: +380 57 373 3084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

структурно-функціональних трансформацій, що змінюють морфофізіологічну рухливість, лабільність ГЕБ.

В останні роки в біології формується новий науковий напрямок, що дозволяє кількісно оцінювати найбільш загальний рівень упорядкованості чи хаотичності, лабільності функціональної архітекtonіки систем організму за показниками мультифрактальної розмірності [1-3]. Морфологічним фракталом можна назвати об'єкт зі складною ієрархією структур, що складається з частин у статистичному сенсі подібних до цілого [2]. Його розмірність за Хаусдорфом [6] більша евклідової (топологічної) і, як правило, дробова. Важливою складовою частиною, першим і останнім захисним рубежем ГЕБ є структурно-функціональний комплекс "ендокринного древа" ендотелію кровоносних капілярів мозку та епітеліального шару його шлуночків. Зв'язаний нейрогліальним "павутинням", пронизаний лабіринтом міжклітинного простору, він формує складну гармонію, структурна організація якої подібна при різних збільшеннях, що наочно демонструє переваги фрактальних і необхідність нових парадигм функціональної морфології.

Мета роботи – визначити фрактальні характеристики, морфометричні кореляти структурно-функціонального стану ГЕБ при ритмічній та безперервній дії холодного (12°C) повітря на організм ненаркотизованих щурів.

Матеріали і методи

Дослідження виконані на самцях щурів лінії Вістар масою 200-250 гр.

Ритмічні гіпотермічні впливи (РГВ) та безперервні гіпотермічні впливи (БГВ) проводили за допомогою промислового гіпотермогенератора. Холодне повітря (10–12°C) надходило в індивідуальні пластикові камери, в яких знаходились тварини протягом 120 хв безперервно або по 6 односекундних холодних стимулів у 1 хв. Обрані режими охолодження викликали коливання температури тіла щурів у межах 2°C.

Зразки тканини мозку для електронної мікроскопії ультратонких зрізів препарували за загальноприйнятими методиками. Серійні напівтонкі (0,5 мкм) зрізи фарбували метиленовим синім і фотографували на мікроскопі МБР-3 за допомогою відеокамери Panasonic WV-CP 470. Ультратонкі зрізи контрастували ураніацетатом і цитратом свинцю, перегляд і фотографування здійснювали в електронному мікроскопі ПЕМ-125К [3]. При морфометричній обробці даних використовували розроблену нами комп'ютерну систему аналізу FRAM v.3.0 [3]. Для фрактального аналізу в середовище FRAM переносили фрагменти цифрових зображень напівтонких і ультратонких зрізів

тканини мозку. Реалізуючи відомий математичний апарат [4], розраховували фрактальну розмірність (D). У розрахунках і інтерпретації даних враховувалися положення теорії узагальненого броуновського руху, у якій фігурує величина Н, пов'язана з D простим співвідношенням: $H = \text{dir} - D$ [6]. Вважається, що при $H = 1$ система лінійна і детермінована; при $H = 0,5$ – вона випадкова як траєкторії класичного броуновського руху. В інших випадках: $1 > H > 0,5$ – система персистентна (стабільна, має позитивну кореляцію), $0 < H < 0,5$ – антиперсистентна (має негативну кореляцію).

Проникність ГЕБ для ^3H -норадреналіну (^3H -НА) визначали радіоізотопним методом з використанням локальної суперфузії мозку за допомогою скляно-пластикової push-pull канюлі [3].

Результати і обговорення

Розрахунок розмірності препаратів показав, що в широкому масштабі величин збільшення ($\times 120$ – 12000) загальна архітекtonіка вивчених структур мозку особливо поблизу капілярів має виражені фрактальні властивості (рис. 1). За критерієм D як

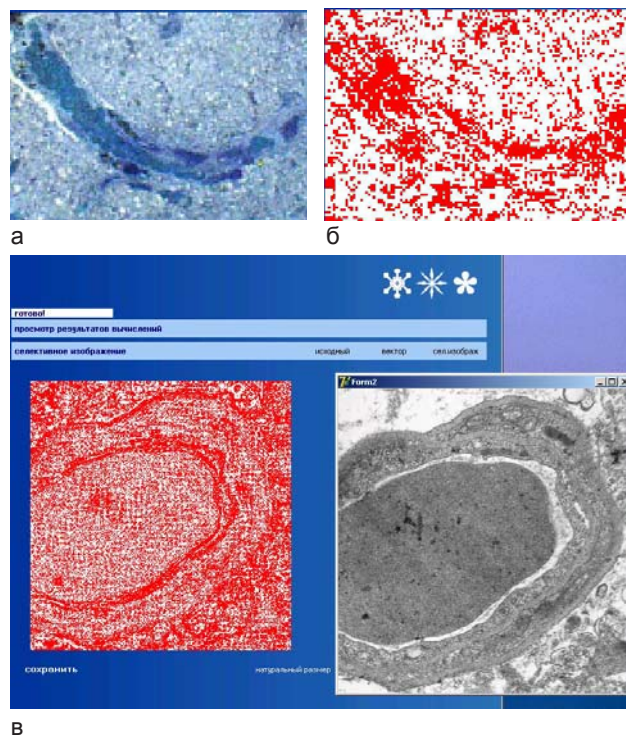


Рис. 1. Приклад мікроскопічного і фрактального аналізу структури периваскулярних зон гіпоталамуса головного мозку контрольного щура: а – профіль капіляра в нейропілі гіпоталамуса, напівтонкий зріз, фарбування метиленовим синім, $\times 300$; б – селективне зображення "а", сформоване з матриці значень D (чорному кольору відповідає діапазон фрактальної розмірності в межах $1,2 < D < 1,8$); в – праворуч: фрагмент капіляра гіпоталамуса в нейрогліальному оточенні, ультратонкий зріз, $\times 12000$, ліворуч: селективне зображення цієї електроннограми (чорному кольору відповідає діапазон фрактальної розмірності в межах $1,1 < D < 1,9$).

в умовах РГВ, так і БГВ відбувається істотна перебудова глибинних процесів нейрогліально-ендотеліальних взаємин при збереженні загальної архітектоніки мозкової тканини. При РГВ стан антиперсистентності (негативної кореляції взаємного розташування мікрочастинок біооб'єкта, що веде до їхнього перегруповання) на 40 і 80-й хвилинах обмежен персистентним станом елементів ГЕБ (з позитивною кореляцією розташування мікрочастинок біооб'єкта, що веде до підвищення лабільності, "пружності" при стабілізації його топології) на 10, 60 і 120-й хвилинах РГВ (рис. 2). Така динаміка зміни фрактальної розмірності при РГВ може свідчити про загальну стійкість функціональної геометрії структур при істотному підвищенні пластичності тріади: нейрон-глія-капіляр. Зміни ультраструктури більш виражені в передньому відділі гіпоталамуса (ПГТ) у порівнянні з заднім відділом гіпоталамуса (ЗГТ). У сенсомоторній корі (СМК) не виявлено достовірних відмінностей від контрольних значень. При БГВ також відбуваються кардинальні перебудови інтимних ультраструктурних взаємодій (рис.2). Динаміка D менш ритмічна в порівнянні з РГВ, без різких перепадів, менш стійка і специфічна (D знаходиться в небезпечній близькості до зони неузгоджених, випадкових змін, підвищена фракталізація елементів ультраструктури охоплює весь гіпоталамус і неокортекс).

На 10-й хвилині РГВ відбувається деяке зменшення товщини базальної мембрани мозкових капілярів, на 60-й хвилині цей показник збільшується і до 120-ї хвилини на 30–40 % перевищує контрольні значення. Важливо відзначити, що абсолютно ана-

логічних змін зазнають базальні мембрани і при БГВ. Специфіка дії РГВ і БГВ виявляється при фрактальному аналізі. За критерієм D на 20-й хвилині БГВ базальна мембрана стає менш "гнучкою" ($D < 1,1$), на 40-й хвилині – її структура на межі персистентності і зони броуновського руху (D порядку 1,45), а до 120-ї хвилини БГВ вона переходить в антиперсистентну зону (D порядку 1,55). При РГВ виявляється інша (в більшій частині протилежна) динаміка: від антиперсистентної геометрії до персистентної (рис. 3).

Істотні зміни при РГВ і БГВ виявляють і власне ендотеліоцити. В капілярному ендотелії з'являється велика кількість ендоцитозних везикул різних розмірів, зростає фракталізація компартментів з підвищеною везикуляризацією цитоплазми (рис. 4). Однак, як правило, дані зміни нівелюються, повертаються до вихідного наприкінці сеансів РГВ і БГВ. На люмінальному контурі ендотеліоцитів з'являються і звичайно залишаються після сеансів охолодження численні вп'ячування, збільшується кількість мікровілей. У результаті цього відносна довжина люмінальної мембрани на зрізах капілярів значно зростає, що приводить до відповідної зміни фрактальної розмірності і може свідчити про підвищення функціональної активності ГЕБ.

Відзначені особливості структурних перебудов у вивчених відділах мозку відповідають різній спрямованості і рівню проникності ГЕБ. Можна припустити, що високий, але нестабільний рівень фракталізації ($D \sim 1,6$) породжує стан зниженої адгезії ендотеліальних клітин до базальної мембрани. На деяких препаратах ми спостерігали відша-

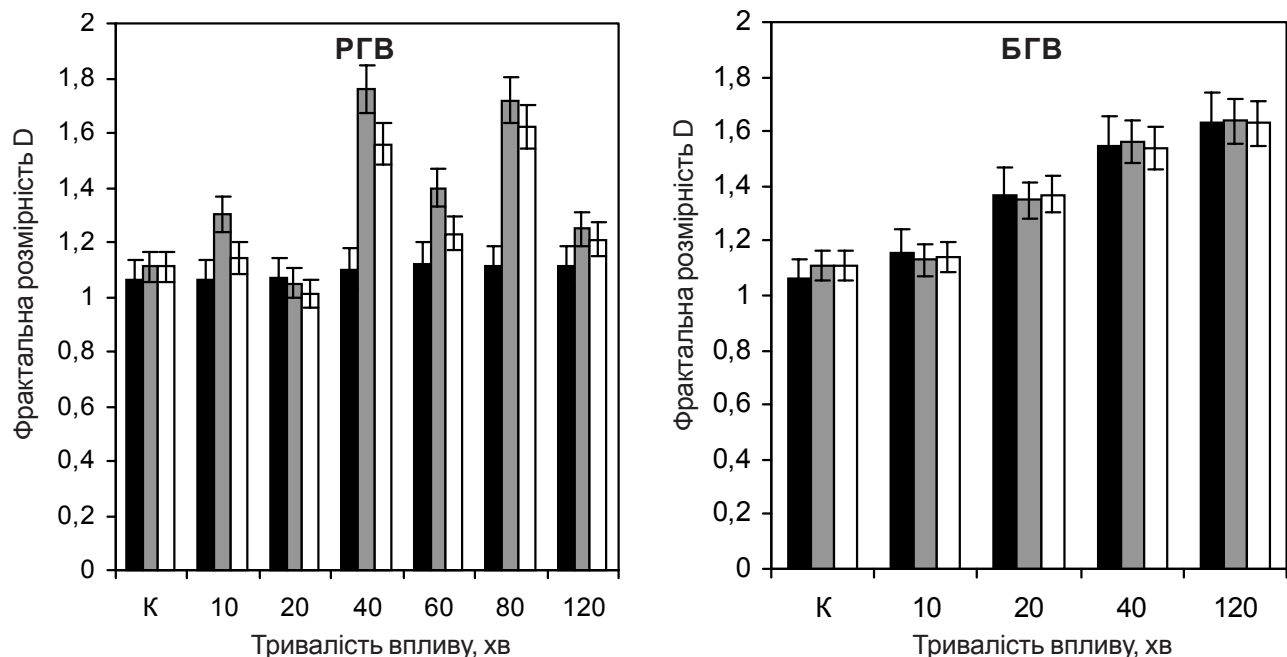


Рис. 2. Фрактальна розмірність структур мозку при холодних впливах: □ – СМК; ■ – ПГТ; ■ – ЗГТ.

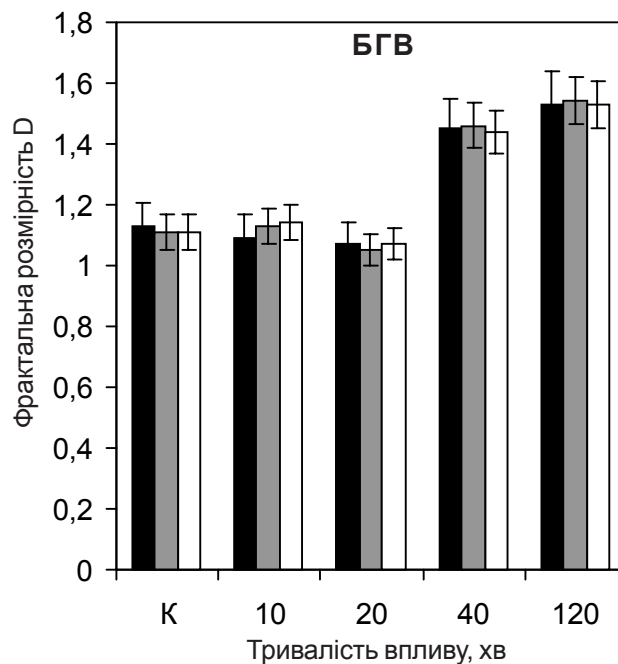
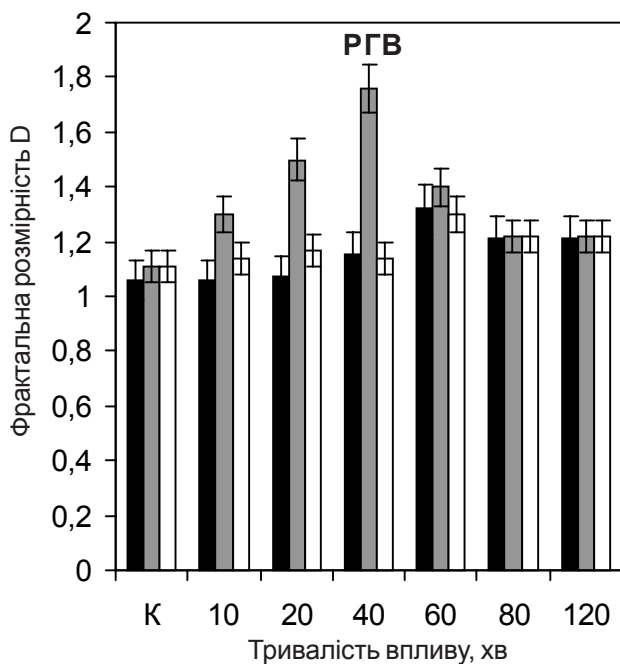


Рис. 3. Фрактальна розмірність базальної мембрани при холодкових впливах: □ – СМК; ■ – ПГТ; ■ – ЗГТ.

рування базальної мембрани проникнення з її дублікації відростків перицитів (рис. 4, а), утворення контактів з ендотеліоцитами капілярів. На нашу думку, ці ультраструктурні особливості сприяють підвищенню проникності ГЕБ у напрямку мозок – кров, їх можна трактувати з позицій недавно відкритого явища ентоза [7]. Персистентний рівень фракталізації ($D \sim 1,3$) супроводжується утворенням численних полідублікатур базального шару, спрямованих до відростків астроцитів, реактивним станом

органел перицитів, зокрема комплексу Гольджі (рис. 4, а), що характерно для секреторного стану. У цих умовах підвищується проникність ГЕБ для норадреналіну в напрямку кров – мозок (рис. 4, б).

Зміни структурно-функціональної активності ГЕБ, на нашу думку, є фізіологічно значимими для стимуляції адаптаційних механізмів. На різних етапах охолодження організму відбуваються швидкі адаптаційні перетворення, у тому числі на субклітинному рівні в ендотелії капілярів (везикулізація,

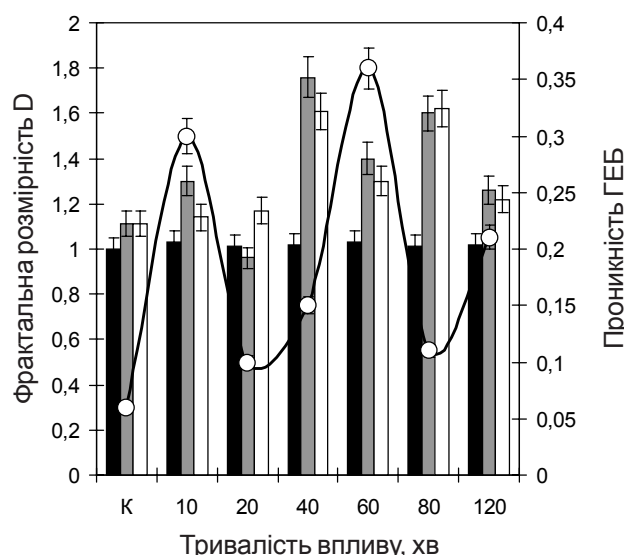
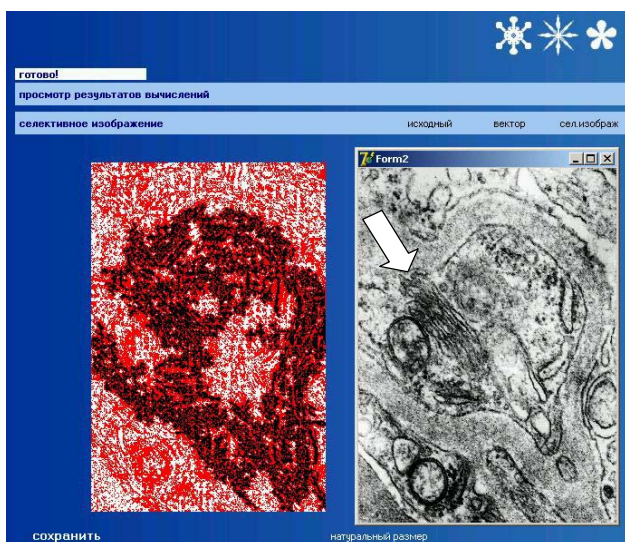


Рис. 4. Параметри структурно-функціонального стану ГЕБ при РГВ: а – праворуч: електронограма фрагмента ендотеліоцита капіляра ПГТ на 60-й хвилині РГВ, стрілка вказує на комплекс Гольджі перицита, $\times 30000$, ліворуч: селективне зображення електронограми, сформоване за значеннями D (чорному кольору відповідає діапазон фрактальної розмірності в межах $1,15 < D < 1,45$, сірому – $1,55 < D < 1,85$); б – фрактальна розмірність ендотеліозних компартментів ендотеліоцитів капілярів головного мозку щурів (ліва шкала) і проникність ГЕБ ПГТ для ^3H -норадреналіну при РГВ (права шкала).

транскитоз, активація базального шару, розгалуження і збільшення обмінної поверхні мембран капілярів). Холодова стимуляція апарата термоперцепції приводить до періодичної зміни структурно-функціональної активності ГЕБ, оптимізації вмісту різноманітних біоактивних месенджерів, дія яких інтегрується на рівні цитолемі і рецепторних комплексів ендотеліоцитів, синхронізується фрактальна організація ультраструктури, формуються спеціалізовані морфофізіологічні фрактальні системи. Завдяки надлишковій робастності фрактальне функціонування підвищує адаптаційні можливості організму.

Висновки

1. Ритмічні і безперервні холододові впливи мають структурно-функціональні особливості реагування елементів ГЕБ, які виявляються у показниках фрактальної розмірності (D). Відмінність D від одиниці свідчить про деякий рівень хаотичності структурно-функціональної організації ГЕБ.

2. РГВ і БГВ приводять до подібних локальних структурних змін тканини мозку. Однак, якщо при БГВ фрактальна розмірність усіх вивчених структур змінюється синхронно і часто складає 1,5 (структура переходить у зону неузгоджених змін), то при РГВ змінюється в основному фрактальна розмірність ПГТ, але і вона залишається в персистентній зоні ($D \sim 1,3$), тобто підвищується структурна лабільність, але зберігається загальна організація тканини.

3. При персистентному рівні фракталізації ультраструктури елементів ГЕБ в умовах дії на орга-

нізм ритмічних режимів охолодження спостерігається збільшення (у 2-3 рази) проникності ГЕБ для норадреналіну. Якщо $D \sim 1,3$, то вектор проникності переважно спрямований до мозку, при $D \sim 1,5$ можливе підвищення проникності ГЕБ у напрямку мозок – кров.

Література

1. Загоруйко Г.Е., Скидан И.Г. Проблемы и перспективы развития методов количественного анализа фрактальных биологических структур // Вісник проблем біології і медицини.– 2007.– Вып. 2.– С. 102–107.
2. Исаева В.В., Каретин Ю.А., Чернышев А.В., Шкуратов Д.Ю. Фракталы и хаос в биологическом морфогенезе.– Владивосток: Институт биологии моря ДВО РАН, 2004.– 128 с.
3. Марченко В.С., Бабійчук Г.О., Марченко Л.М. До фрактальних механізмів структурно-функціонального стану центрів терморегуляції при гіпотермії й гібернації // Пробл. криобиології.– 2005.– Т. 15, №3.– С. 503–508.
4. Пащенко Р.Э., Шаповалов А.В. Фрактальный анализ аэрокосмических изображений // Фрактальный анализ процессов, структур и сигналов.– Харьков, 2006.– С. 210–287.
5. Федотчев А.И., Бондарь А.Т., Матрусов С.Г. и др. Использование сигналов обратной связи от эндогенных ритмов пациента для нелекарственной коррекции функциональных расстройств // Успехи физиологических наук.– 2006.– Т. 37, №4.– С. 82–92.
6. Mandelbrot B.B. The fractal geometry of nature.– New York: Freeman, 1983.– 468 p.
7. Overholtzer M., Mailleux A.A., Mouneimne G. A nonapoptotic cell death process, entosis, that occurs by cell-in-cell invasion // Cell.– 2007.– Vol. 131, N30.– P. 966–979.

Надійшла 14.07.2008