Małgorzata Frontczak- Baniewicz

" REAKCJA NACZYŃ KAPILARNYCH NA DOŚWIADCZALNE OGNISKOWE USZKODZENIE MÓZGU SZCZURA"

Rozprawa doktorska



Z Pracowni Ultrastruktury Komórki Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej Polskiej Akademii Nauk

> Promotor: Doc. dr hab. Barbara Gajkowska

Warszawa 1999

Składam wyrazy wdzięczności Pani Docent dr hab. Barbarze Gajkowskiej za pomoc w realizacji moich naukowych zamierzeń

Małgorzata Frontczak-Baniewicz

SPIS	TREŚCI

Wstęp	1
Cel pracy	
Materiał i metody	13
Wyniki	18
1. Zmiany ultrastrukturalne w naczyniach kapilarnych kory r	nózgowej
w modelu fotochemicznie indukowanej agregacji płytek krv	vi w pobliżu
ogniska uszkodzenia	
1.1. Grupa zwierząt eksperymentalnych	
1.1.1 Jeden dzień po wywołaniu reakcji fotochemicznej	18
1.1.2 Cztery dni po wywołaniu reakcji fotochemicznej	20
1.1.3 Siedem dni po wywołaniu reakcji fotochemicznej	22
1.1.4 Czternaście dni po wywołaniu reakcji fotochemicznej	
1.2 Grupa zwierząt kontrolnych –po wstrzyknięciu czerwieni ber	ngalskiej,
bez naświetlania po jednym, czterech, siedmiu i czternastu d	niach23
1.3 Grupa zwierząt kontrolnych – zwierzęta nie poddawane żadny	ym
zabiegom	
2. Zmiany ultrastrukturalne w naczyniach kapilarnych nerwow	ej części
przysadki mózgowej w modelu fotochemicznie indukowanej a	agregacji
płytek krwi	
2.1 Grupa zwierząt eksperymentalnych	
2.1.1 Jeden dzień po wywołaniu reakcji fotochemicznej	25
2.1.2 Cztery dni po wywołaniu reakcji fotochemicznej	

2.1.3	Siedem dni po wywołaniu reakcji fotochemicznej	28
2.1.4	Czternaście dni po wywołaniu reakcji fotochemicznej	29
2.2	Grupa zwierząt kontrolnych -po wstrzyknięciu czerwieni bengalskiej,	
	bez naświetlania po jednym, czterech, siedmiu i czternastu dniach	29
2.3	Grupa zwierzat kontrolnych nie poddawanych żadnym zabiegom	.30

3.1.G	rupa zwierząt eksperymentalnych	31
3.1.1	Jeden dzień po zastosowaniu metody ucisku	31
3.1.2	Cztery dni po zastosowaniu metody ucisku	.32
3.1.3	Siedem dni po zastosowaniu metody ucisku.	.34
3.1.4	Czternaście dni zastosowaniu metody ucisku	.36

- 3.2 Grupa zwierząt kontrolnych wykonanie otworu trepanacyjnego bez zastosowania ucisku po jednym, czterech, siedmiu i czternastu dniach...37
- 3.3 Grupa zwierząt kontrolnych-zwierzęta nie poddawane żadnym zabiegom.37

4. Zmiany ultrastrukturalne w naczyniach kapilarnych nerwowej części	
przysadki mózgowej w modelu mechanicznego urazu mózgu	38
4.1 Grupa zwierząt eksperymentalnych	
4.1.1 Jeden dzień po zastosowaniu metody ucisku	38
4.1.2 Cztery dni po zastosowaniu metody ucisku	39
4.1.3 Siedem dni po zastosowaniu metody ucisku	41
4.1.4 Czternaście dni po zastosowaniu metody ucisku	42
4.2 Grupa zwierząt kontrolnych- wykonanie otworu trepanacyjnego bez	
zastosowania ucisku po jednym, czterech, siedmiu i czternastu dniac	h43

4.3 Grupa zwierząt kontrolnych-zwierzęta nie poddawane żadnym zabiegom..43

5. Zmiany ultrastrukturalne w naczyniach kapilarnych kory mózgowej
półkuli przeciwległej do ogniska uszkodzenia w modelu fotochemicznie
indukowanej agregacji płytek krwi
5.1 Grupa zwierząt eksperymentalnych jeden, cztery, siedem, i czternaście
dni po wywołaniu reakcji fotochemicznej
5.2 Grupa zwierząt kontrolnych-po wstrzyknięciu czerwieni bengalskiej
bez naświetlania po jednym, czterech, siedmiu i czternastu dniach45
6. Zmiany ultrastrukturalne w naczyniach kapilarnych kory mózgowej
półkuli przeciwległej do ogniska uszkodzenia w modelu mechanicznego
urazu mózgu
6.1. Grupa zwierząt eksperymentalnych jeden, cztery, siedem i czternaście
dni po zastosowaniu metody ucisku
6.2 Grupa zwierząt kontrolnych- wykonanie otworu trepanacyjnego bez
zastosowania ucisku po jednym, czterech, siedmiu i czternastu dniach46
7. Immunofluorescencyjne badanie obecności fibronektyny i lamininy
po wywołaniu reakcji fotochemicznej
7.1. Fibronektyna
7.2. Laminina
Dyskusja
Podsumowanie
Wnioski

WSTĘP

Od wielu lat badania nad niedokrwieniem mózgu prowadzone były przy wykorzystaniu różnych modeli eksperymentalnych. Modele odwracalnej globalnej ischemii indukowanej poprzez: podwiązanie tętnic szyjnych wspólnych (Pulsinelli, Brierly 1979, Kagstrom i wsp. 1984), podwiązanie pęczka sercowo-naczyniowego (Korpaczew i wsp. 1982, Łazarewicz i wsp. 1989, Pluta i wsp. 1991), czy też wstrzykiwanie endoteliny (Fuxe i wsp. 1989) były właśnie takimi próbami.

Uszkodzeniom mózgu powstałym na skutek ogniskowego i globalnego niedotlenienia towarzyszą zmiany w naczyniach krwionośnych. Pomimo rozlicznych badań nadal wiemy niewiele o zmianach zachodzacych błonie podstawnej czy macierzy zewnatrzkomórkowej w śródbłonku. w przebiegu niedokrwienia choć struktury te są kluczowymi elementami zachodzacych wówczas procesów patofizjologicznych. Dotychczasowe badania wykazały, że niedokrwienie mózgu może doprowadzić do zmian w naczyniach kapilarnych. Zmiany patomorfologiczne w mózgu po niedokrwieniu obserwuje się w komórkach śródbłonka naczyń kapilarnych w postaci zwiększonej liczby mikrokosmków i wgłobień w błonie plazmatycznej komórek śródbłonkowych, następuje także agregacja płytek krwi i ich przyleganie do luminalnej powierzchni śródbłonka naczyń (Petito 1979a, Hossmann i wsp. 1980, Pluta i wsp. 1991, 1994, Wester i wsp. 1995)

Naczynia kapilarne ośrodkowego układu nerwowego zbudowane są z pojedyńczej warstwy komórek śródbłonka otoczonej od zewnątrz błoną podstawną i przydanką. Błony komórek śródbłonkowych nie zawierają włóknistych elementów łącznotkankowych, natomiast w przydance naczyń kapilarnych mogą występować nieliczne komórki mięśniowe gładkie.

W obrazie mikroskopowo-elektronowym naczyń włosowatych ich światło

- 1 -

wysłane jest pojedyńczą warstwą płaskich komórek śródbłonka, których długa oś ułożona jest równolegle do kierunku krwi płynącej w naczyniu. Powierzchnia luminalna komórek śródbłonka wykazuje nieliczne uwypuklenia i zagłębienia. Powierzchnię abluminalną komórek śródbłonkowych otacza lita miejscami rozgałęziona błona podstawna, zbudowana z bezpostaciowej substancji o umiarkowanej gęstości elektronowej. W rozgałęzienia błony podstawnej wnikają wypustki komórek śródbłonka i pericyty. Sąsiadujące komórki śródbłonka łączą zespolenia desmosomalne, wytwarzające tzw. zespolenia ścisłe. całkowicie nieprzepuszczalne dla substancji wielkocząsteczkowych i wysoce ograniczające przechodzenie substancji małocząsteczkowych. Stanowią one istotny element bariery krew-mózg. Cechą wyróżniającą śródbłonki naczyń włosowatych kory mózgowej jest brak fenestracji.

Komórki śródbłonka w obrazie mikroskopowo-elektronowym wykazują obecność typowych organelli komórkowych. Ich duże jądra zawierają obfitą osmofilną heterochromatynę, zagęszczającą się na obwodzie nukleoplazmy. W cytoplazmie występują kanały i spłaszczone zbiorniki siateczki śródplazmatycznej ziarnistej, aparat Golgiego, różnokształtne lizosomy oraz liczne mitochondria. Komórki śródbłonka naczyń kapilarnych ośrodkowego układu nerwowego wyróżniają się ponadto małą zawartością pęcherzyków pinocytarnych.

Dodatkowym elementem strukturalnym ściany naczyń są pericyty. Są to komórki przynaczyniowe znajdujące się między listkami błony podstawnej naczyń kapilarnych, będące w ścisłej strukturalnej zależności z leżącymi w sąsiedztwie komórkami śródbłonkowymi. Błona podstawna oddziela pericyty od komórek śródbłonkowych i przynaczyniowych wypustek astrocytów. Pericyty są heterogenną populacją komórek wykazującą specyficzność zależną od rodzaju tkanki i od rodzaju naczynia (Hirshi,

- 2 -

D'Amore 1996). Cytoplazmatyczne wypustki pericytów sąsiadujące z komórkami śródbłonkowymi dostarczają strukturalnego rusztowania dla naczyń kapilarnych mózgu (Balabanov, Dore-Duffy 1998). Pericyty posiadają receptory dla neurotransmiterów i innych substancji modulujących takich jak: katecholaminy (Elfont i wsp. 1989), endotelina-1 (Dehouick i wsp. 1997), angiotensyna II (Hearly, Wilk 1993), co sugeruje, że mogą być zaangażowane w mózgowo-naczyniową autoregulację i przepływ krwi (Sims 1991, Herman 1993, Shepro, Morel 1993).

W przestrzeni okołonaczyniowej znajdują się komórki, które są w kontakcie z abluminalną powierzchnią naczyń krwionośnych, ale od komórek śródbłonkowych oddzielone pozostają błoną podstawną. Mają one wpływ na zmiany w funkcjonowaniu komórek śródbłonkowych. Do grupy tej należą komórki mikroglejowe o cechach komórek fagocytarnych (Lassman i wsp. 1991), które uwalniać mogą cytokiny i enzymy proteolityczne (McGeer i wsp. 1993, Williams i wsp. 1997). Inną grupę stanowią przynaczyniowe makrofagi (Mato i wsp. 1996). Znajdują się one pomiędzy rozgałęzieniami błony podstawnej otaczającej śródbłonek (Greaber i wsp. 1992). Komórki te wydzielają proteazy degradujące macierz zewnątrzkomórkową (Seilhean i wsp. 1997, Williams i wsp. 1997).

Istnieje grupa komórek przynaczyniowych, które nie są pericytami, komórkami mikroglejowymi ani makrofagami. Pełnią one rolę fagocytów w przestrzeni okołonaczyniowej mózgu (Kida i wsp. 1993). Przypuszczano, że niektóre komórki przynaczyniowe mogą ulegać transformacji do komórek mikroglejowych (Greaber i wsp. 1990, Streit i wsp.1989). Przypuszczenie takie opierano na podobieństwie fenotypu komórek przynaczyniowych i mikroglejowych w warunkach patologicznych. Jednak dopiero badania Kidy i wsp. (1993) dowiodły, że rzeczywiście komórki przynaczyniowe mogą migrować do parenchymy mózgowej stając się komórkami mikroglejowymi

- 3 -

lub makrofagami. Komórki przynaczyniowe w odróżnieniu od pericytów nie są całkowicie otoczone przez błonę podstawną chociaż mogą być w kontakcie z błoną podstawną komórek glejowych i pericytów (Balabanov, Dore-Duffy 1998).

Oprócz wyżej wymienionych komórek w przestrzeni okołonaczyniowej mogą się znajdować także mastocyty. Uwalniając liczne aminy biogenne, enzymy, cytokiny, tlenek azotu biorą udział w regulacji ciśnienia tętniczego krwi, angiogenezie, przebudowie tkankowej, w procesie wykrzepiania wewnątrznaczyniowego (Silver i wsp. 1996, Gajkowska i wsp. 1999).

Istotnym elementem budowy naczyń kapilarnych w ośrodkowym układzie nerwowym jest błona podstawna. Jest to warstwa macierzy zewnątrz-

komórkowej występująca na granicy komórek śródbłonka naczyń krwionośnych, otoczona przynaczyniowymi wypustkami astrocytów. Błona podstawna jest wytworem komórek śródbłonkowych. pericvtów i przynaczyniowych wypustek astrocytów (Bar, Wolff 1972, Martinez-Hernandez, Amenta 1983, Kusaka i wsp. 1985, Abrahamson 1986). Zbudowana jest z materiału ziarnisto-włókienkowatego, ułożonego w trzy warstwy (Bar, Wolff 1972, Abrahamson 1986). Pomiędzy dwiema elektronowo-jasnymi warstwami brzeżnymi znajduje się elektronowo-ciemna warstwa zbudowana z delikatnych włókienek (Inoue 1989, Leblond, Inoue 1989, Abrahamson, Leardkamolkarn 1991). Blaszkę jasną leżącą poniżej błony plazmatycznej komórek śródbłonka tworzy, zbudowany głównie z proteoglikanów, glikokaliks. Położona poniżej blaszki jasnej elektronowogęsta, ziarnisto-włóknista warstwa zbudowana jest z kolagenu typu IV oraz glikoprotein takich jak fibronektyna i laminina.

Fibronektyna jest glikoproteiną o masie ok. 220.000, występującą przeważnie w postaci polimeru w macierzy zewnątrzkomórkowej i błonach komórkowych. Bierze udział w takich zjawiskach fizjologicznych jak: przyleganie komórek,

- 4 -

migracja, organizacja cytoszkieletu (Hynes 1987, Dean i wsp. 1991, Nagai i wsp. 1991). Jako składnik macierzy zewnątrzkomórkowej fibronektyna bierze udział w tworzeniu środowiska, w którym następuje różnicowanie komórek (Watt 1986, Argraves i wsp. 1989).

Ekspresja fibronektyny ma miejsce w czasie wczesnych stadiów naprawy tkankowej (Vartio i wsp. 1987).

W badaniach z użyciem przeciwciał obecność fibronektyny stwierdzono w rozwijającym się układzie nerwowym (Hatten i wsp.1982 Chen i wsp.1986). Fibronektyna bierze tam udział w migracji komórek pochodzących z grzebienia nerwowego (Sanes 1983). W układzie nerwowym człowieka fibronektyna pojawia się tylko w miejscach kontaktu między neuroektodermą i mezenchymą (Paetau i wsp. 1980, Esiri, Morris 1991). Uwalnianie fibronektyny ze ścian naczyń odbywa się w wielu procesach patologicznych prowadzących do uszkodzenia bariery krew-mózg (Salahuddin i wsp. 1988, Sokrab i wsp. 1989, Suzuki, Choi 1990) oraz bariery krew-rdzeń kręgowy (lizuka i wsp. 1987, Farooque i wsp. 1992). Na przykład obecność fibronektyny w wysokich stężeniach w naczyniach i na zewnątrz naczyń wykazano w doświadczalnym modelu stwardnienia rozsianego (EAE) u świnki morskiej (Sobel i wsp. 1988, Butter i wsp. 1989).

Badania *in vitro* wskazują na udział fibronektyny w procesach agregacji płytek krwi, gdzie sprzyja ona ich przyleganiu do ściany naczyń krwionośnych (Grinnell i wsp. 1979, Hynes, Yamada 1982).

Receptor fibronektyny jest kompleksem błonowym złożonym z dwóch łańcuchów glikoproteinowych α , β integrynowych (Buck, Horowitz 1987). Receptor integrynowy wiąże się z fibronektyną w sposób, który umożliwia przezbłonowe połączenie między zewnątrzkomórkowym ligandem i cytoszkieletem (Katz, Yamada 1997). Są dwie koncepcje przenoszenia sygnału za pośrednictwem integryn. Jedna z nich mówi, że integryny biorą

- 5 -

udział w przenoszeniu sygnału poprzez reorganizację cytoszkieletu, a tym samym kształtu komórki. Cytoplazmatyczne domeny integryn kontaktują się z komponentami cytoszkieletu, natomiast miejsca przylegania komórek do macierzy zewnątrzkomórkowej, w czym pośredniczą integryny, pomagają jako centra nukleacji w formowaniu cytoszkieletu (Burridge i wsp.1988). Druga koncepcja czyni integryny odpowiedzialnymi za przenoszenie sygnałów biochemicznych w komórce (Juliano, Haskill 1993).

Receptory dla fibronektyny znajdują się w ośrodkowym i obwodowym układzie nerwowym. W ośrodkowym układzie nerwowym receptory integrynowe dla fibronektyny występują na komórkach glejowych i astrocytach, a nie występują na neuronach. W obwodowym układzie nerwowym receptory dla fibronektyny obecne są na komórkach glejowych i na neuronach (Psheva i wsp. 1988).

Laminina jest inną glikoproteiną będącą istotnym elementem większości błon podstawnych. Pojawia się ona jako pierwsze białko macierzy zewnątrzkomórkowej produkowane w czasie embriogenezy na etapie stadium dwóch komórek (Dziadek, Timpl 1985). Odgrywa istotną rolę w przyleganiu komórek, polaryzacji, rozprzestrzenianiu się i migracji (Weber 1992).

W badaniach z użyciem przeciwciał stwierdzono obecność lamininy w różnych regionach zarodka, tam gdzie odbywa się wzrost aksonów, włączając mięśnie (Chiu, Sanes 1984), grzbietowe i brzuszne korzenie nerwów (Rogers i wsp. 1986), nerw wzrokowy (Mc Loon i wsp. 1988), korę mózgową (Liesi 1985a), hipokamp (Gordon-Weeks i wsp. 1989). Stąd wniosek, że laminina wpływa na rozwój zarówno w układzie nerwowym ośrodkowym jak i obwodowym (Hunter i wsp. 1992). W mózgu laminina pojawia się w okresie płodowym w błonie podstawnej, co wiąże się z dojrzewaniem bariery krew-mózg (Butt i wsp. 1990).

Wracając do morfologii naczyń kapilarnych należy podkreślić, że nie we

- 6 -

wszystkich strukturach ośrodkowego układu nerwowego charakteryzuja się one posiadaniem śródbłonka typu ciągłego. W okolicach, w których nie występuje bariera krew-mózg między komórkami śródbłonkowymi znajduja się tzw. fenestracje. Są to: nerwowa część przysadki mózgowej, splot naczyniówkowy, szyszynka oraz niektóre ugrupowania jąder podwzgórza, a także pole najdalsze w dnie komory czwartej. Ściana wiekszości naczyń kapilarnych nerwowej części przysadki jest cienka, a jej kształt jest nieregularny. Komórki śródbłonka spoczywają na cienkiej błonie podstawnej i leżącej pod nią szerokiej warstwie macierzy zewnatrzkomórkowej. W większości naczyń włosowatych nerwowej części przysadki mózgowej komórkami śródbłonka nie między występują zespolenia ścisłe. W cytoplazmie komórek śródbłonkowych występują miejsca znacznie węższe i z tego powodu leżąca pod nimi cienka błona podstawna wydaje się prawie odsłonięta. W cytoplazmie komórek śródbłonka występuja liczne różnej wielkości pęcherzyki pinocytarne. Fenestracje zwiększają przepuszczalność dla cząsteczek o niskim ciężarze molekularnym (Levick, Smaje 1987). Oprócz komórek śródbłonka i błony podstawnej ścianę naczyń budują pericyty oraz inne komórki przynaczyniowe.

W ostatnich latach coraz częściej zwraca się uwagę na istotną rolę śródbłonka naczyń zarówno w fizjologii jak i w patologii wielu procesów chorobowych.

W mózgu śródbłonek naczyń kapilarnych z powodu swego położenia między krążącą krwią i parenchymą mózgową oraz jako element bariery krew-mózg pełni szczególną rolę związaną ze stworzeniem środowiska dla prawidłowego funkcjonowania wszystkich elementów tkanki nerwowej będąc kluczowym regulatorem homeostazy w ośrodkowym układzie nerwowym. Prawidłowo funkcjonujące komórki śródbłonka utrzymują równowagę w układzie naczyniowym, a także biorą udział w regulacji procesów takich jak:

- 7 -

kurczliwość i rozszerzanie naczyń (Furchgott, Vanhoutte 1989), przyleganie elementów morfotycznych krwi (Vane i wsp. 1990), krzepliwość (Gertler, Abbott 1992) oraz promocja wzrostu np.; komórek mięśniowych w czasie rozwoju miażdżycy naczyń (Nabel 1991).

Niezwykle istotne okazały się współzależności między komórkami śródbłonkowymi i błoną podstawną lub macierzą zewnątrzkomórkową. Interakcje komórek śródbłonkowych naczyń kapilarnych z komponentami macierzy zewnątrzkomórkowej, sąsiadującymi komórkami, także odpowiedź komórek śródbłonkowych na autokrynne i parakrynne czynniki wzrostowe odgrywa istotną rolę w czasie rozwoju układu naczyniowego w utrzymaniu prawidłowej struktury i funkcji kapilar. Przenoszenie takich informacji często wymaga przykomórkowej, kontrolowanej proteolizy błony podstawnej i macierzy zewnatrzkomórkowej (Birkedal-Hansen 1995, Basbaum, Werb 1996). W proces proteolizy zaangażowanych jest wiele klas enzymów. Wśród nich znaczna rolę odgrywają metaloproteinazy. Badania ostatnich lat wykazały udział metaloproteinaz w patogenezie wielu chorób związanych z układem nerwowym w procesach przebiegających z uszkodzeniem bariery krew-mózg (Gay, Esiri 1991) np.; w czasie wewnątrzmózgowego krwawienia (Rosenberg i wsp. 1992), ischemii, po wystąpieniu zawału mózgu (Rosenberg i wsp. 1996), a także w przebiegu chorób zwiazanych z procesami zapalnymi takich jak: stwardnienie rozsiane i eksperymentalny model stwardnienia rozsianego (EAE) (Cuzner i wsp. 1996, Clements i wsp. 1997). Udział metaloproteinaz wykazano również w procesach wzrostu nowotworów (Sreenath i wsp. 1992),

W wywoływaniu uszkodzeń naczyń krwionośnych istotną rolę odgrywają płytki krwi, które odpowiedzialne są za uwalnianie wielu substancji (Fujimoto i wsp. 1985). Często w stosowanych modelach doświadczalnych ogniskowego uszkodzenia mózgu nie obserwuje się reakcji ze strony płytek krwi, dlatego też modele te nie są przydatne w badaniach nad niedokrwieniem mózgu

- 8 -

wywołanym zatorami płytkowymi. W związku z tym Watson i współpracownicy w 1983 roku stworzyli nowy model niedokrwienia mózgu szczura przez zatory płytkowe. Podstawą tego modelu było uszkodzenie śródbłonka wywołane przez wewnątrznaczyniową reakcję fotochemiczną, która stymuluje odpowiedź płytek krwi w naczyniach mózgu. Fotoczuły barwnik wstrzykiwany był dożylnie a światło o długości odpowiedniej dla absorpcji barwnika wykorzystywane było aby naświetlić określony region powierzchni mózgu. Odpowiedzią na reakcję fotochemiczną było formowanie zatorów płytkowych w świetle naczyń krwionośnych mózgu.

Badania wykazały, że naczynia krwionośne kory mózgowej, które poddane bvłv działaniu tlenu singletowego tworzacego sie podczas reakcji fotochemicznej ulegały zaczopowaniu przez formujące się agregaty płytkowe (Watson i wsp. 1985, 1988, Dietrich i wsp. 1987 a, b) skoncentrowane głównie na powierzchni oponowej mózgu (Watson i wsp. 1987). W mikroskopie elektronowym obserwowano adhezję i degranulację płytek (Watson i wsp. 1988, Dietrich i wsp. 1987). Niejasna jest zależność między agregacją płytek krwi w naczyniach i uszkodzeniem śródbłonka. Wydaje się, że agregacja krwi płytek postępuje równocześnie ze zmianami w komórkach śródbłonkowych, a jej zapoczątkowanie może pojawiać się bez złuszczania śródbłonka (Povlishock i wsp. 1983). Istnieją jednakże przypuszczenia, że uszkodzenie śródbłonka inicjuje przyleganie płytek krwi do ściany naczyń krwionośnych (Hovig i wsp. 1974). Wywołanie reakcji fotochemicznej jest metodą, w której czynnik uszkadzający generowany jest bezpośrednio w świetle naczyń i powoduje pierwotne jego uszkodzenie. Wydawało się więc celowym zastosowanie porównawcze również innej metody, w której rozwój zmian naczyniowych byłby efektem wtórnym do działania czynników uszkadzających.

Operacyjne leczenie głębokich uszkodzeń mózgu, tętniaków

-9-

wewnątrzczaszkowych, zmian tętniczo-żylnych, operowanie nowotworów (nerwiaków nerwu słuchowego, guzów przysadki, oponiaków) wymaga odsłoniecia tkanki mózgowej (Yasargil, Fox 1974, Rhoton 1976, Malis 1979, Sugita i wsp. 1979). Zarówno retraktory automatyczne jak i retraktory ręczne wywierają znaczący ucisk na powierzchnie mózgu. Ucisk powstały w wyniku retrakcji w czasie operacji chirurgicznych wynosi 20-40 mmHg (Andrews, Bringas 1993). W wyniku ogniskowego ucisku na powierzchnie mózgu może powstawać lokalne uszkodzenie i miejscowe odkształcenie tkanki mózgowej, powodując redukcję lub przerwanie lokalnego krążenia z ryzykiem rozwoju ischemicznego uszkodzenia mózgu (Albin i wsp. 1977, 1980, Hongo i wsp.1987, Rosenorn, Diemer 1985, 1988). Retrakcja może więc powodować bezpośrednie uszkodzenie tkanki mózgowej i martwice tkanki (neuronów, ich wypustek i/lub gleju) (Fukumachi i wsp. 1985, Rosenorn 1989, Nazarro i wsp. 1992, Sekhar i wsp. 1992). Dane z literatury podają, że uszkodzenie mózgu w wyniku retrakcji pojawia się w 10% operacji usunięcia nowotworów podstawy czaszki i 5% wewnątrzczaszkowych tętniaków lub operacji usunięcia nowotworów mózgu (Hongo i wsp. 1987, Yokoh i wsp. 1987, Rosenorn 1989).

Wykorzystanie bezinwazyjnej metody fotochemicznie indukowanej agregacji płytek krwi (MF), która indukuje pierwotne zmiany w naczyniach oraz metody ucisku odsłoniętej powierzchni mózgu (MU), która wpływa na wtórny rozwój zmian naczyniowych, pozwala na obserwację dynamiki czasowej przebiegu zmian związanych z procesem niedokrwiennym we wszystkich elementach strukturalnych naczynia kapilarnego. Badano wpływ ogniskowego uszkodzenia kory mózgowej w tych dwóch modelach na naczynia kapilarne regionów odległych od ogniska uszkodzenia takich jak kora mózgowa półkuli przeciwległej względem ogniska uszkodzenia oraz nerwowa część przysadki mózgowej.

- 10 -

Dodatkowym uzasadnieniem dla badania wpływu ogniskowego uszkodzenia kory mózgowej na naczynia kapilarne nerwowej części przysadki mózgowej była również istotna rola naczyń przysadki w tworzeniu połączenia między podwzgórzem i przysadką. Połączenia naczyniowe stwarzają możliwość szybkiego przenikania neurohormonów z podwzgórza do części obwodowej przysadki mózgowej, jak również przenikania hormonów przysadkowych do wyniosłości pośrodkowej i wyżej położonych części podwzgórza.

Wybrany czas trwania eksperymentu pozwolił na obserwację nie tylko tworzenia się uszkodzeń, ale też procesu naprawy uszkodzonego śródbłonka naczyń kapilarnych. Uszkodzenie naczyń kapilarnych doprowadzało do śmierci komórek śródbłonkowych na drodze apoptozy lub nekrozy. Uruchomieniu procesów naprawczych, które przebiegały bądź z udziałem sąsiadujących komórek śródbłonkowych, bądź z udziałem komórek przynaczyniowych, towarzyszyło formowanie nowych naczyń kapilarnych.

W odpowiedzi na czynnik uszkadzający, stan zapalny lub czynniki angiogeniczne komórki śródbłonka naczyń kapilarnych degradują błonę podstawną, proliferują oraz migrują do przestrzeni pozanaczyniowej biorąc udział w formowaniu nowych naczyń (Horak i wsp.1992). Gęstość nowo utworzonych naczyń kapilarnych może być wskaźnikiem wczesnych procesów naprawczych. Ostatnie badania procesu angiogenezy wskazują na możliwość jego sterowania przy wykorzystaniu izolowanych z krwi obwodowej angioblastów, które w hodowli przechodzą proces różnicowania w komórki śródbłonkowe. Przypuszcza się, że takie komórki mogą być użyteczne do indukcji angiogenezy również w patologii niedokrwiennej (Asahara i wsp.1997). Jak wiadomo ognisko niedokrwienia mózgu obejmuje pola o różnym stopniu uszkodzenia. Strefa graniczna zawału stanowi obszar tkanki częściowo zachowanej, ale zagrożonej narastaniem martwicy, powiększającej pole zawału. Jest to też obszar, w którym obserwuje się reakcję ze strony

- 11 -

niedokrwionych, ale zachowanych naczyń i komórek. Ochrona tego obszaru mogłaby obejmować działania zmierzające m.in. do poprawy przepływu krwi. Wyróżnienie faz wieloetapowego procesu angiogenezy pozwoliłoby na ocenę udziału komórek śródbłonkowych, macierzy zewnątrzkomórkowej i komórek przynaczyniowych w tym procesie. Dane te mogą pomóc w ustaleniu potencjalnego celu terapii angiogenicznej w niedokrwieniu mózgu.

CEL PRACY

Celem pracy było prześledzenie dynamiki zmian ultrastrukturalnych w naczyniach kapilarnych mózgu towarzyszących ogniskowym uszkodzeniom kory w wyniku fotochemicznie indukowanej, lokalnej agregacji płytek krwi (MF) oraz czasowego ucisku powierzchni mózgu (MU). Dwie różne zastosowane metody, które można uznać za modele zawału mózgu wywołanego zatorem płytkowym oraz urazem mechanicznym mózgu, miały na celu analizę zmian ultrastrukturalnych nie tylko w naczyniach kapilarnych kory mózgowej okolic sąsiadujących z ogniskiem uszkodzenia, ale także okolic mózgu odległych od ogniska uszkodzenia takich jak kora przeciwległej półkuli mózgu oraz nerwowa część przysadki mózgowej.

- 12 -

MATERIAŁ I METODY

Materiał

Badania przeprowadzono na szczurach szczepu Wistar. Użyto zwierząt o wadze 170-200g (2-2,5 miesiąca) obojga płci. Wszystkie zwierzęta przebywały w typowych warunkach zwierzętarni, karmione standardową paszą granulowaną, ze swobodnym dostępem do wody.

Do badań eksperymentalnych zwierzęta podzielono na dwie grupy:

- I-Pierwszą grupę doświadczalną stanowiły szczury poddawane fotochemicznej indukcji zatoru płytkowego (MF) wywołującego zmiany ogniskowe. Zwierzętom tym wstrzykiwano czerwień bengalską

i naświetlano a materiał do badań pobierano po przeżyciu 1 dnia (7 szczurów), 4 dni (7 szczurów), 7 dni (4 szczury) i 14 dni (4 szczury). Grupę kontrolną stanowiły szczury, którym wstrzykiwano czerwień bengalską, ale nie naświetlano, materiał pobierano po przeżyciu 1, 4, 7 i 14 dni (po 2 szczury, w sumie 8 szczurów).

II-Drugą grupę doświadczalną stanowiły zwierzęta poddane czasowemu uciskowi powierzchni mózgu (MU) indukującemu ogniskowe uszkodzenie.
Na zwierzętach wykonywano zabieg ucisku powierzchni mózgu, a materiał do badań pobierano po przeżyciu 1 dnia (7 szczurów), 4 dni (7 szczurów), 7 dni (4 szczury) i 14 dni (4 szczury).

Grupę kontrolną stanowiły szczury, którym wykonywano otwór trepanacyjny lecz nie wykonywano zabiegu ucisku powierzchni mózgu, materiał pobierano po przeżyciu 1, 4, 7 i 14 dni (po 2 szczury, w sumie 8 szczurów)

Dodatkową grupę kontrolną dla wszystkich badań stanowiły zwierzęta nie poddawane żadnym zabiegom.

- 13 -

Metoda fotochemicznie indukowanej agregacji płytek krwi (MF)

Szczury usypiano wodzianem chloralu wstrzykiwanym podskórnie w dawce 325mg/kg masy ciała. Do żyły podobojczykowej wstrzykiwano czerwień bengalską w dawce 40mg/kg masy ciała (3% roztwór podstawowy przygotowywano przez rozpuszczenie czerwieni bengalskiej w 0,9% NaCl). Zwierzęta umieszczono w aparacie stereotaktycznym. Po przecięciu skóry na głowie usuwano okostną na wysokości kości czołowej w odległości 2mm bocznie od bregma i 2mm ku przodowi od szwu wieńcowego.

Energię świetlną pochodzącą z żarówki o mocy 250 W (Osram) przenoszono za pomocą światłowodu przyłożonego w połowie odległości między bregma a lambda. Koniec światłowodu przylegający bezpośrednio do czaszki chłodzony był wodą. Czas naświetlania wynosił 30 min. Następnie zwierzęta umieszczano w standardowych warunkach zwierzętarni.

Do badań pobierano fragmenty kory mózgowej z okolicy czołowej z miejsca znajdującego się 3 mm od ogniska uszkodzenia w lewej półkuli mózgu oraz fragmenty kory mózgowej półkuli przeciwległej, a także całą nerwową część przysadki mózgowej.

Metoda ucisku powierzchni mózgu (MU)

Zwierzęta usypiano wodzianem chloralu tak jak w modelu fotochemicznego uszkodzenia mózgu. Po unieruchomieniu głowy w aparacie stereotaktycznym nawiercano otwór trepanacyjny w odległości 2mm bocznie od bregma i 2mm ku przodowi od szwu wieńcowego. Nacinano oponę twardą i na odsłoniętą powierzchnię kory mózgu opuszczano umieszczony w rurce szklanej ciężarek metalowy w kształcie walca. Rozmiary stosowanego ciężarka zgodnie z przeprowadzoną wcześniej standaryzacją dawały możliwość uzyskiwania

- 14 -

ucisku równego 40mm Hg (wielkość stosowanego ucisku była zgodna z opisywaną w badaniach Rosenorn, Diemer 1987 oraz Andrews, Bringas 1993). Czas trwania ucisku wynosił 15min.

Do badań pobierano fragmenty kory mózgowej z okolicy czołowej z miejsca znajdującego 3mmm od ogniska uszkodzenia w lewej półkuli mózgu oraz z kory mózgowej półkuli przeciwległej, a także całą nerwową część przysadki mózgowej.

Badania mikroskopowo-elektronowe

Zwierzęta usypiano eterem, a następnie uśmiercano za pomoca przezsercowej perfuzji roztworem 2,5% aldehydu glutarowego i 2% paraformaldehydu w buforze kakodylanowym o pH 7.4 (0,2M kakodylan sodu+0,2M HCl). Aby zapewnić odpływ płynu perfuzyjnego z łożyska naczyniowego nacinano prawe uszko serca. Po wydobyciu mózgu z czaszki pobierano fragmenty tkanki i utrwalano 2 godziny w temperaturze 4°C w płynie perfuzyjnym. Następnie płukano trzykrotnie 0,1M buforem kakodylanowym o pH 7.4 przez 30 min. Dodatkowo materiał utrwalano w roztworze 2% czterotlenku osmu w buforze kakodylanowym przez 2 godziny. Proces odwadniania tkanki w szeregu roztworów alkoholu etylowego o wzrastającym stężeniu od 30% do 99,8% poprzedzony był trzykrotnym płukaniem tkanki przez 30 min. w 0,1 M buforze kakodylanowym. Odwadnianie tkanki w etanolu trwało w sumie 40 min. Następnie tkankę umieszczano kolejno w tlenku propylenu na 2 minuty, 3 minuty i 5 minut. Przed ostatecznym zatopieniem w żywicy materiał przesycano mieszaniną żywic z tlenkiem propylenu w stosunku 1:3 (10 min.), 1:1 (25 min.) i 3:1 (25 min.). Żywica stanowiła mieszaninę: E-812 (epon 812), DDSA (dodecenyl succinic anhydride), MNA (methylnadic anhydride), DMP

- 15 -

(dimethyl aminomethyl phenol).

Zatopiony materiał umieszczano na 1 dobę w temperaturze pokojowej, a następnie na 2 doby w temp. 60°C. Bloczki z zatopionym materiałem krojono na ultramikrotomie LKB NOVA (Szwecja, Gőtteborg) na skrawki o grubości ok. 600Å. Skrawki nanoszono na miedziane siatki i barwiono nasyconym roztworem wodnym octanu uranylu przez 15min. Płukano kilkakrotnie w wodzie dwukrotnie destylowanej i suszono. Dobarwiano roztworem cytrynianu ołowiu przez 10min. w obecności wodorotlenku sodu. Ponownie płukano w wodzie dwukrotnie destylowanej i suszono w temperaturze pokojowej. Wybarwione skrawki były oceniane w mikroskopie elektronowym JEOL 1200EX.

Badania immunocytochemiczne

Od szczurów poddanych metodzie fotochemicznie indukowanej agregacji płytek krwi do badań immunocytochemicznych pobierano tkankę kory i nerwowej części przysadki mózgowej.

Pobraną tkankę zamrażano w izopentanie chłodzonym ciekłym azotem. Zamrożoną tkankę krojono na kriostacie firmy Reichert (Austria, Wiedeń) na skrawki o grubości około 7 mikrometrów. Następnie tkankę umieszczoną na szkiełku podstawowym nawadniano buforem fosforanowym (PBS) pH 7.3 i inkubowano z następującymi przeciwciałami: 1)poliklonalnym przeciwciałem królika skierowanym przeciw fibronektynie myszy (DAKO, Dania, Golstrup) w rozcieńczeniu 1:300 oraz 2) poliklonalnym przeciwciałem królika skierowanym przeciw lamininie myszy (SIGMA, St. Louis, USA) w rozcieńczeniu 1:500. Przeciwciała rozcieńczano w PBS. Preparaty pozostawiano na 1 godzinę w komorze wilgotnej w temperaturze pokojowej. Następnie tkankę płukano kilkakrotnie w PBS przez 20min. oraz inkubowano z przeciwciałem owcy skierowanym przeciwko IgG królika sprzeżonym

- 16 -

z rodaminą (DAKO, Dania, Golstrup) w rozcieńczeniu 1:30 przez 1 godzinę. Tkankę płukano ponownie przez 20 min. w PBS i zamykano w żelu Gel/Mount-Biomeda (USA). Preparaty oglądano w mikroskopie fluorescencyjnym firmy Zeiss (Niemcy, Jena) (filtr zielony-długość fali 510-560nm) i fotografowano na filmach Ilford.

WYNIKI

1. Zmiany ultrastrukturalne w naczyniach kapilarnych kory mózgowej w modelu fotochemicznie indukowanej agregacji płytek krwi w pobliżu ogniska uszkodzenia.

1.1 Grupa zwierząt eksperymentalnych

1.1.1 Jeden dzień po wywołaniu reakcji fotochemicznej

Cechą charakterystyczną w tej grupie doświadczalnej było występowanie zatorów płytkowych i płytkowo-krwinkowych w naczyniach kapilarnych w tkance pobranej do badań jeden dzień po wywołaniu MF. Znaczna część naczyń kapilarnych była zmieniona i ich kształt ulegał deformacji (schemat la). Powierzchnia śródbłonka tych naczyń uległa silnemu pofałdowaniu. Cytoplazma komórek śródbłonkowych była elektronowo-ciemna.

W niektórych tak zmienionych naczyniach kapilarnych struktura zarówno śródbłonka jak i błony podstawnej i pericytów była zatarta. Te elektronowociemne naczynia wyróżniały się na tle otaczających je obrzmiałych wypustek przynaczyniowych astrocytów. W przynaczyniowych wypustkach astrocytów cytoplazma ulegała silnej wakuolizacji powodując, iż światło większości naczyń przekształciło się w wąską szczelinę, w której znajdowały się elementy morfotyczne krwi (Fot.3,4)

W badanym materiale obecne były również naczynia kapilarne, które zachowały swój regularny kształt (schemat 1b), a w ich świetle występowały zatory płytkowo-krwinkowe (Fot.5) (schemat 1c). Pozbawione ziarnistości płytki krwi i erytrocyty formujące zator znajdowały się w bezpośrednim

- 18 -

kontakcie ze zmienionym śródbłonkiem o elektronowo-ciemnej cytoplazmie. Błona podstawna otaczająca te naczynia była ultrastrukturalnie niezmieniona. Przynaczyniowe wypustki astrocytów wykazywały cechy obrzęku.

Obserwowane były również naczynia kapilarne o nieprawidłowej budowie ultrastrukturalnej, w świetle których nie występowały zatory płytkowe. Cytoplazma komórek śródbłonkowych tych naczyń była elektronowo-ciemna i bogata w organella. Występowały w niej liczne pęcherzyki pinocytarne. Na powierzchni naczyń od strony światła w błonie plazmatycznej komórek śródbłonkowych pojawiły się liczne wgłobienia i wydłużone mikrokosmki (schemat 1b). Wydłużeniu uległy też połączenia między sąsiadującymi komórkami śródbłonka. Błona podstawna wokół tak zmienionych naczyń kapilarnych była pofałdowana i ogniskowo poszerzona, a jej trójwarstwowa struktura miejscami ulegała zatarciu. Pericyty otoczone błoną podstawną posiadały niezmienioną budowę ultrastrukturalną. Wokół tych naczyń obrzęku przynaczyniowych wypustek kapilarnych nie obserwowano astrocytów (Fot.6).

(a)

(b)



- 19 -



(c)

Schemat 1

E-śródbłonek; P-pericyt; BM-błona podstawna; A-przynaczyniowa wypustka astrocyta; Pt-płytki krwi

1.1.2 Cztery dni po wywołaniu reakcji fotochemicznej

W świetle wielu naczyń kapilarnych nadal występowały zatory płytkowokrwinkowe, a opisane powyżej zmiany ultrastrukturalne nasiliły się. W materiale pobranym do analizy można było oprócz komórek niezmienionych morfologicznie oraz elektronowo-ciemnych o wysokiej wyodrębnić morfologiczne komórek aktywności pinocytarnej formy śródbłonkowych: komórki z elektronowo-jasną cytoplazmą, zawierające dużą liczbę pęcherzyków pinocytarnych i krótkie mikrokosmki oraz hypertroficzne komórki z elektronowo-ciemną bogatą w rybosomy cytoplazmą, bez aktywności pinocytarnej (Fot.7).

W niektórych naczyniach kapilarnych obserwowaliśmy złuszczanie komórek

- 20 -

śródbłonkowych (Fot.8) (schemat 2a). Niekiedy obserwowano odsłonięcie błony podstawnej do której bezpośrednio przylegały płytki krwi. Błona podstawna otaczająca naczynia kapilarne była nieregularna. Miejscami była ona wyraźnie poszerzona i jej trójwarstwowa struktura ulegała zatarciu. Pomiędzy blaszkami zewnętrznymi błony podstawnej znajdowała się elektronowo-ciemna substancja o ziarnistym charakterze. W miejscach poszerzeń błony podstawnej występowały elektronowo-jasne obrzmienia, w których widoczny był kolagen (schemat 2b). Wokół większości naczyń obserwowano liczne rozgałęzienia błony podstawnej (Fot.8,9). Budowa ultrastrukturalna pozostałych elementów naczyń nie wykazywała zmian.

(a)





(b)

Schemat 2

E-śródbłonek; BM-błona podstawna; P-pericyt; A-przynaczyniowa wypustka astrocyta; Cl-kolagen

1.1.3. Siedem dni po wywołaniu reakcji fotochemicznej

W materiale pobranym do badań z kory siedem dni po MF większość naczyń kapilarnych była morfologicznie niezmieniona. Płaskie komórki śródbłonkowe pozbawione wydłużonych mikrokosmków i licznych wgłobień leżały na cienkiej, morfologicznie niezmienionej błonie podstawnej.

Na uwagę zasługiwała jednak nieliczna, ale swym wyglądem odbiegająca od dotychczas obserwowanych, grupa naczyń kapilarnych. Płaskie ultrastrukturalnie niezmienione komórki śródbłonkowe spoczywały na pogrubiałej błonie podstawnej, której trójwarstwowa struktura była miejscami zatarta. Między blaszkami zewnętrznymi błony podstawnej znajdował się elektronowo-gęsty, ziarnisty materiał oraz kolagen. Kolagen występował także w elektronowo-jasnych obrzmieniach, które obejmowała blaszka zewnętrzna błony podstawnej (Fot.10). W wielu miejscach zmienione fragmenty błony podstawnej wpuklone były w sąsiadujące z naczyniami kapilarnymi wypustki komórek (Fot.11).

1.1.4 Czternaście dni po wywołaniu reakcji fotochemicznej

Naczynia kapilarne w materiale pobranym do badań czternaście dni po MF nie wykazywały zmian morfologicznych. Zarówno komórki śródbłonkowe jak i błona podstawna oraz sąsiadujące z naczyniami pericyty i przynaczyniowe wypustki astrocytów morfologicznie odpowiadały temu, co obserwowano w materiale kontrolnym.

1.2 Grupa zwierząt kontrolnych -po wstrzyknięciu czerwieni bengalskiej, bez naświetlania *po jednym, czterech, siedmiu i czternastu dniach*

Budowa morfologiczna naczyń kapilarnych w materiale pobranym od zwierząt I grupy kontrolnej nie odbiegała od budowy morfologicznej naczyń kapilarnych zwierząt nie poddawanych żadnym zabiegom. Wszystkie elementy strukturalne naczyń: komórki śródbłonkowe, błona podstawna, pericyty, komórki przynaczyniowe oraz przynaczyniowe wypustki astrocytów pozostawały ultrastrukturalnie niezmienione.

1.3. Grupa zwierząt kontrolnych-zwierzęta nie poddawane żadnym zabiegom

Śródbłonek naczyń kapilarnych w materiale pobranym do badań od zwierząt kontrolnych, nie poddawanych żadnym zabiegom, charakteryzuje się prawie gładką powierzchnią luminalną i składa się z płaskich komórek o wyraźnych granicach (Fot.1). Pomiędzy sąsiadującymi komórkami śródbłonkowymi występują połączenia ścisłe. Komórki śródbłonka ułożone są w ścianie naczynia kapilarnego w ten sposób, że ich większa średnica jest równoległa do długiej osi naczynia. Komórki śródbłonkowe tych naczyń posiadają elektronowo-jasną cytoplazmę, w której występują nieliczne pęcherzyki pinocytarne. Komórki śródbłonkowe spoczywają na cienkiej błonie podstawnej o wyodrębnionej trójwarstwowej strukturze (Fot.2). Błona podstawna ulega nielicznym rozgałęzieniom, otaczając

- 23 -



Schemat 3

E-śródbłonek; P-pericyt; BM-błona podstawna; A-przynaczyniowa wypustka astrocyta

całkowicie pericyty i częściowo komórki przynaczyniowe. W komórkach przynaczyniowych występuje znaczna liczba ciał lizosomalnych, co świadczy o tym iż pełnią one rolę makrofagów. Do błony podstawnej od strony abluminalnej naczynia kapilarnego przylegają przynaczyniowe wypustki astrocytów (schemat 3).

 Zmiany ultrastrukturalne w naczyniach kapilarnych nerwowej części przysadki mózgowej w modelu fotochemicznie indukowanej agregacji płytek krwi

2.1 Grupa zwierząt eksperymentalnych

2.1.1. Jeden dzień po wywołaniu reakcji fotochemicznej

W tkance pobranej do badań jedeń dzień po MF wszystkie naczynia zachowały swój regularny kształt. Większość naczyń kapilarnych posiadała prawidłową budowę ultrastrukturalną. Światło niektórych naczyń było całkowicie zamknięte przez uformowany zator (Fot.13) (schemat 4b).

Sporadycznie obserwowano zmiany w ultrastrukturze naczyń kapilarnych. Śródbłonek w zmienionych ultrastrukturalnie kapilarach nerwowej części przysadki mózgowej był często pogrubiały, a na jego powierzchni występowały wydłużone mikrokosmki (Fot.14). Część tych naczyń posiadała komórki śródbłonkowe z elektronowo-ciemną cytoplazmą wypełnioną ułożonymi szeregowo pęcherzykami pinocytarnymi. Bardzo często komórki śródbłonkowe ulegały rozerwaniu wzdłuż tak ułożonych pęcherzyków. Oderwane fragmenty komórek śródbłonka wypełnione były szczątkowym, zwakuolizowanym materiałem cytoplazmatycznym (Fot.15) (schemat 4a). Błona podstawna i macierz zewnątrzkomórkowa wokół naczyń kapilarnych zachowały swą prawidłową strukturę.

- 25 -



Schemat 4

E- śródbłonek; P-pericyt; BM-błona podstawna; ECM-macierz zewnątrzkomórkowa; Pt-płytki krwi

2.1.2 Cztery dni po wywolaniu reakcji fotochemicznej

W tej grupie doświadczalnej oprócz naczyń kapilarnych o prawidłowej budowie ultrastrukturalnej obserwowano również naczynia wykazujące zmiany w budowie ultrastrukturalnej. W świetle niektórych zmienionych naczyń występowały nadal zatory. Zator uformowany był z erytrocytów, monocytów i płytek krwi. Cytoplazmę komórek śródbłonkowych wypełniały obrzmiałe mitochondria. Błona podstawna była poszerzona, a między jej blaszkami zewnętrznymi znajdował się jednorodny ziarnisty materiał. W niektórych miejscach poszerzona błona podstawna była wpuklona w przylegające do niej wypustki komórek przynaczyniowych (Fot.16).

Śródbłonek licznych naczyń kapilarnych był pogrubiały, a jego powierzchnia była silnie pofałdowana (Fot.17). Pogrubiały śródbłonek tworzyły hypertroficzne komórki posiadające duże jądro z zagęszczoną obwodowo

- 26 -

chromatyną i liczne pęcherzyki w cytoplazmie (schemat 5a). Na abluminalnej powierzchni komórek śródbłonkowych występowały ułożone szeregowo liczne pęcherzyki pinocytarne (Fot.18). Obserwowano również naczynia kapilarne, w których komórki śródbłonkowe posiadały połączenia ścisłe. W jasnej cytoplazmie komórek śródbłonkowych wykazujących takie połączenia występowały liczne pęcherzyki pinocytarne, z których większość leżała na błonie plazmatycznej przylegającej bezpośrednio do błony podstawnej. Naczynia te posiadały pogrubiałą błonę podstawną, nietypową dla tej okolicy (Fot.19) (schemat 5b). W błonie tej można było miejscami wyodrębnić jej trójwarstwową strukturę. W komórkach śródbłonkowych niektórych naczyń kapilarnych obecne były centriole (Fot.20).

(a)

(b)





Schemat 5

E-śródbłonek; P-pericyt; BM-błona podstawna; ECM-macierz zewnątrzkomórkowa; N-jądro komórki śródbłonkowej

2.1.3 Siedem dni po wywołaniu reakcji fotochemicznej

W materiale pobranym do badań w tym czasie większość naczyń kapilarnych nie wykazywała zmian morfologicznych. Znaczną grupę stanowiły jednak naczynia, których komórki śródbłonkowe posiadały w swej cytoplazmie centriole.

Uwagę zwracały naczynia kapilarne, posiadające wysokie komórki śródbłonkowe, wykazujące punktowo połączenia ścisłe. Często światło tych naczyń zamykał drobnoziarnisty materiał. Macierz zewnątrzkomórkowa wokół takich naczyń zatraciła swój typowy włókienkowaty charakter, stając się w przeważającej części jednorodną ziarnistą, elektronowo-gęstą substancją (Fot.21).

Szczególnie interesujace były naczynia kapilarne, które jak się wydaje brały udział w procesie formowania nowych naczyń (angiogeneza). Na Fot. 22a i 22b znajdują się naczynia, które cechuje obecność ciągłego śródbłonka. zewnątrzkomórkową wypełniającą Macierz przestrzeń między tymi naczyniami tworzy w przeważającej części ziarnista, jednorodna substancja, zawierająca nieliczne włókienka kolagenowe. Pomiędzy tymi naczyniami leżą naczynia kapilarne, których światło wypełnia jednorodna substancja podobna w swej strukturze do macierzy zewnatrzkomórkowej, otaczającej wszystkie trzy naczynia. Komórki śródbłonkowe centralnie leżących naczyń są wysokie i wykazują punktowo połączenia ścisłe, a ich cytoplazma różni się gestościa elektronową i zawiera nieliczne pęcherzyki pinocytarne. W macierzy zewnątrzkomórkowej znajdują się też pojedyńcze komórki, które łączą się ze soba wnikając pomiędzy wypustki aksonów. Pojedyńcze migrujące komórki śródbłonkowe są też połączone z wypustkami komórek przynaczyniowych.

Obserwowano też naczynia kapilarne, które nosiły cechy dwóch odmiennych typów morfologicznych naczyń. Na Fot.23 przedstawiony jest przykład

- 28 -

takiego połączenia. Jedno z naczyń kapilarnych posiada wysokie, nietypowe dla tej okolicy komórki śródbłonkowe, ściśle ze sobą połączone, o elektronowo-jasnej cytoplazmie. Pomiędzy komórkami śródbłonkowymi tego naczynia znajduje się fragment komórki śródbłonkowej, o ciemniejszej cytoplazmie. Komórka ta wydaje się należeć do naczynia przylegającego. Posiada cytoplazmę bogatszą w pęcherzyki pinocytarne. Otaczająca naczynia macierz zewnątrzkomórkowa zawiera głównie włókienkowaty kolagenowy materiał. Cechy morfologiczne naczyń obserwowane w tej grupie doświadczalnej są typowe dla poszczególnych etapów formowania nowych naczyń.

2.1.4 Czternaście dni po wywołaniu reakcji fotochemicznej

W tym czasie naczynia kapilarne nerwowej części przysadki posiadały typową dla tej okolicy prawidłową budowę morfologiczną.

2.2. Grupa zwierząt kontrolnych-po wstrzyknięciu czerwieni bengalskiej, bez naświetlania *po jednym, czterech*, *siedmiu i czternastu dniach*

Budowa ultrastrukturalna wszystkich elementów strukturalnych naczyń kapilarnych nerwowej części przysadki mózgowej I grupy kontrolnej nie odbiegała od budowy morfologicznej ultrastrukturalnie niezmienionych naczyń kapilarnych nerwowej części przysadki mózgowej przedstawionych w pkt. 2.3.

- 29 -

2.3 Grupa zwierząt kontrolnych nie poddawanych żadnym zabiegom.

Komórki śródbłonka typu okienkowatego spoczywają na cienkiej błonie podstawnej nie wykazującej warstwowości. Między komórkami śródbłonka nie występują zespolenia ścisłe. Nieregularnej grubości komórki śródbłonka miejscami ulegają silnemu zwężeniu (600-800Å). W ich cytoplazmie oprócz organelli komórkowych występują liczne pęcherzyki pinocytarne. Szeroka warstwa macierzy zewnątrzkomórkowej pod błoną podstawną jest cechą charakterystyczną dla wszystkich naczyń kapilarnych nerwowej części przysadki mózgowej (Fot.12). W macierzy zewnątrzkomórkowej otaczającej sa liczne włókienka kolagenowe obecne komórki naczynia oraz przynaczyniowe i pericyty (schemat 6).



Schemat 6 E-śródbłonek; P-pericyt; BM-błona podstawna; ECMmacierz zewnatrzkomórkowa

3. Zmiany ultrastrukturalne w naczyniach kapilarnych kory mózgowej w modelu mechanicznego urazu mózgu w pobliżu ogniska uszkodzenia

3.1 Grupa zwierząt eksperymentalnych

3.1.1 Jeden dzień po zastosowaniu metody ucisku

W materiale pobranym jeden dzień po zastosowaniu MU w świetle naczyń kapilarnych występowały zatory uformowane z płytek krwi i monocytów. Elementy zatoru znajdowały się w bezpośrednim kontakcie ze ścianą naczynia kapilarnego. Na powierzchni komórek śródbłonka pojawiły się wydłużone mikrokosmki i wgłobienia. W elektronowo-jasnej cytoplazmie tych komórek znajdowały się niezmienione ultrastrukturalnie organella i pęcherzyki pinocytarne. Naczynia takie otoczone były miejscami nieznacznie poszerzoną błoną podstawną, której trójwarstwowa struktura ulegała przeważnie zatarciu (Fot.24). W niektórych naczyniach między blaszkami zewnętrznymi błony podstawnej występowały masywne pasma kolagenu. Włókienka kolagenowe, posiadające wyraźne poprzeczne prążkowanie, wypełniały całą przestrzeń między blaszkami zewnętrznymi błony podstawnej (Fot.25) (schemat 7).

Przynaczyniowe wypustki astrocytów oraz pozostałe elementy komórkowe neuropilu wykazywały prawidłową budowę ultrastrukturalną.


Schemat 7

E-śródbłonek; BM-błona podstawna; A-przynaczyniowa wypustka astrocyta; Cl-kolagen

3.1.2 Cztery dni po zastosowaniu metody ucisku

Cztery dni po zastosowaniu MU w wielu naczyniach kapilarnych w pobranym przez nas materiale nadal występowały zatory przylegające do ściany naczynia. Zmiany w komórkach śródbłonkowych pogłębiły się. Na ich powierzchni liczniej występowały wydłużone mikrokosmki, zwiększyła się też liczba wgłobień w błonie plazmatycznej komórek śródbłonkowych. Cytoplazma większości naczyń kapilarnych, często ulegająca wakuolizacji, bogata w rybosomy, zawierała też obrzmiałe organella komórkowe i liczne pęcherzyki pinocytarne. W cytoplazmie wielu komórek śródbłonkowych występowały centriole (Fot 26).

Zmiany pojawiały się także w pericytach. W wielu naczyniach cytoplazma pericytów była rozrzedzona i silnie zwakuolizowana, a leżące w niej organella

- 32 -

były obrzmiałe (Fot.27, Fot.29) Obecne były także pericyty o cechach morfologicznych makrofagów (Fot.28). Błona podstawna otaczajaca większość naczyń była pogrubiała. Dotyczyło to także naczyń, których komórki śródbłonkowe wydawały się ultrastrukturalnie niezmienione. W wielu miejscach błona podstawna zatraciła swą trójwarstwową strukturę stając się elektronowo-ciemną warstwą o raczej ziarnistym charakterze. W niektórych miejscach zatarciu uległy też blaszki zewnętrzne błony podstawnej. Błona podstawna wokół wielu naczyń posiadała obrzmiałe przejaśnienia, w których znajdował się kolagen (Fot.28) (schemat 8b). Cechą charakterystyczną większości naczyń kapilarnych były liczne rozgałęzienia błony podstawnej, które obejmowały nie tylko wypustki pericytów, ale również przylegające do naczynia wypustki astrocytów. Istotną cechą był obrzek wszystkich wypustek, które obejmowała błona podstawna. Komórki śródbłonkowe w takich były przeważnie ultrastrukturalnie niezmienione naczyniach (Fot.29). kapilarnych błona podstawna W niektórych naczyniach wnikała do przynaczyniowej wypustki astrocyta (Fot.30) (schemat 8a). W tym czasie cecha charakterystyczna okolicy okołonaczyniowej był obrzęk wypustek przynaczyniowych astrocytów, także tych, które obejmowała błona podstawna. Obrzmieniu uległy również wypustki przynaczyniowe tych astrocytów, których komórki śródbłonkowe wydawały się ultrastrukturalnie niezmienione. Cechy obrzęku obserwowano wokół wszystkich naczyń kapilarnych w materiale pobranym cztery doby po zastosowaniu MU.

- 33 -



Schemat 8

E-śródbłonek; P-pericyt; BM-błona podstawna; A-przynaczyniowa wypustka astrocyta; Pt-płytki krwi

3.1.3 Siedem dni po zastosowaniu metody ucisku

Naczynia kapilarne były w większości ultrastrukturalnie niezmienione, jednakże występowała grupa naczyń, w których obserwowano zmiany w błonie podstawnej. W naczyniach tych ultrastrukturalnie niezmienione komórki śródbłonkowe leżały na poszerzonej, rozgałęzionej i uformowanej na kształt sieci błonie podstawnej. Poszerzona błona podstawna posiadała elektronowo-jasne obrzmienia, w których występował kolagen otoczony blaszkami zewnętrznymi. W okach sieci zatopione były wypustki pericytów i przynaczyniowe wypustki astrocytów (Fot.31).

Bardzo nieliczną grupę stanowiły naczynia kapilarne, których

- 34 -

charakterystyczną cechą było zwężone światło, a także wysoki, postrzępiony śródbłonek z wydłużonymi mikrokosmkami oraz obecność ścisłych połączeń miedzy sasiadującymi komórkami śródbłonkowymi. Błona podstawna wokół takich naczyń była morfologicznie niezmieniona (Fot.32) (schemat 9a). Wystepowały też naczynia kapilarne o ultrastrukturalnie zmienionym śródbłonku z cechami apoptozy i ogniskowo nieznacznie poszerzonej błonie podstawnej, które otoczone były ściśle wypustkami komórek o cechach morfologicznych fagocytów mózgowych. Komórki te wypełniała elektronowogesta, bogata w rybosomy i włókienka cytoplazma, w której licznie występowały kule lipidowe. Wypustki tych komórek nie były otoczone błona podstawną. W pobliżu tych naczyń obecne były także komórki mikrogleju (Fot33). Nietypową grupę stanowiły w tym materiale naczynia z zatorami krwinkowo-płytkowymi o niezmienionych ultrastrukturalnie komórkach śródbłonkowych, otoczone poszerzoną, miejscami rozgałęzioną błoną podstawna, która obejmowała włókna nerwowe (Fot.34, Fot.35) (schemat 9b). W miejscach poszerzeń zatarta była trójwarstwowa struktura błony podstawnej. Błona podstawna otaczająca tak zmienione naczynia wnikała w wielu miejscach do przynaczyniowych wypustek astrocytów. Większość wypustek przynaczyniowych astrocytów oraz otaczający neuropil były ultrastrukturalnie niezmienione.

- 35 -

(a)





Schemat 9

E-śródbłonek; P-pericyt; BM-błona podstawna; A-przynaczyniowa wypustka astrocyta; WN-włókno nerwowe

3.1.4 Czternaście dni po zastosowaniu metody ucisku

Naczynia kapilarne kory mózgowej były w większości ultrastrukturalnie niezmienione. Tylko nieliczna grupa naczyń wyróżniała się zmianami morfologicznymi. Cechą charakterystyczną tej grupy naczyń była, potwierdzona obserwacją na wielu seryjnych skrawkach, jednokomórkowa budowa ściany obserwowana w wielu przekrojach poprzecznych. Ścianę naczynia tworzyła jedna komórka śródbłonkowa, która leżała na cienkiej błonie podstawnej. Błona ta, nieznacznie pogrubiała na niewielkim odcinku, wnikała w wielu miejscach do przynaczyniowej wypustki astrocyta (Fot.36).

- 36 -

3.2. Grupa zwierząt kontrolnych wykonanie otworu trepanacyjnego bez zastosowania ucisku *po jednym, czterech, siedmiu i czternastu dniach*

Naczynia kapilarne w materiale pobranym od zwierząt po wykonaniu jedynie otworu trepanacyjnego, bez wykonania MU pozostały ultrastrukturalnie niezmienione. Wszystkie elementy strukturalne tych naczyń posiadały budowę ultrastrukturalną podobną do budowy naczyń kapilarnych zwierząt nie poddawanych żadnym zabiegom i opisanych w pkt. 1.3.

3.3 Grupa zwierząt kontrolnych-zwierzęta nie poddawane żadnym zabiegom

Budowa ultrastrukturalna naczyń kapilarnych w tkance pobranej od zwierząt nie poddawanych żadnym zabiegom była prawidłowa i nie odbiegała od opisanej w pkt.1.3

Zmiany ultrastrukturalne w naczyniach kapilarnych nerwowej części przysadki mózgowej w modelu mechanicznego urazu mózgu

4.1 Grupa zwierząt eksperymentalnych

4.1.1 Jeden dzień po zastosowaniu metody ucisku

Większość naczyń kapilarnych w nerwowej części przysadki mózgowej posiadała prawidłową budowę ultrastrukturalną. Sporadycznie w świetle niektórych naczyń kapilarnych występowały zatory płytkowe (Fot.37). Płytki krwi, które znajdowały się w bezpośrednim kontakcie ze śródbłonkiem naczyń niekiedy pozbawione były ziarnistości. W niektórych zmienionych ultrastrukturalnie naczyniach kapilarnych śródbłonek był pogrubiały. W jasnej, bogatej w rybosomy cytoplazmie takich komórek śródbłonkowych znajdowało się duże, nieregularnego kształtu jądro (Fot.38). Niektóre komórki śródbłonkowe posiadały rozrzedzoną i elektronowo-jasną cytoplazmę, wypełnioną wakuolami i pęcherzykami różnej wielkości.

W niektórych naczyniach obok komórek o tak rozrzedzonej cytoplazmie występowały też komórki śródbłonkowe o elektronowo-ciemnej cytoplazmie. Cytoplazmę tych komórek wypełniały liczne pęcherzyki pinocytarne. Powierzchnia elektronowo-ciemnych komórek śródbłonkowych była silnie pofałdowana, a krótkie, płatowate fragmenty cytoplazmy skierowane były do światła naczynia. Komórki te prezentowały niektóre cechy typowe dla komórek apoptotycznych (Fot.39, Fot.40).

W niektórych naczyniach kapilarnych oprócz komórek ultrastrukturalnie niezmienionych oraz komórek o elektronowo-ciemnej cytoplazmie

- 38 -

występowały komórki śródbłonkowe, których błona plazmatyczna od strony luminalnej naczynia uległa rozerwaniu. Z cytoplazmy takich komórek uwalniał się zwakuolizowany materiał cytoplazamatyczny pozbawiony organelli komórkowych (Fot.40) (schemat 10). Naczynia te otaczała cienka błona podstawna.

Macierz zewnątrzkomórkowa bogata w włókienka kolagenowe pozostała niezmieniona ultrastrukturalnie, podobnie jak pericyty i komórki przynaczyniowe oraz wypustki pituicytów towarzyszące tak zmienionym naczyniom (Fot.40).



Schemat 10

E-śródbłonek; BM-błona podstawna; P-pericyt; ECM-macierz zewnątrzkomórkowa

4.1.2 Cztery dni po zastosowaniu metody ucisku

W tej grupie doświadczalnej poza ultrastrukturalnie niezmienionymi

http://rcin.org.pl

naczyniami kapilarnymi częściej niż w poprzedniej grupie obserwowano zmienione ultrastrukturalnie naczynia kapilarne. W świetle niektórych naczyń kapilarnych nadal występowały zatory uformowane z elementów morfotycznych krwi. Często były to erytrocyty, które bezpośrednio stykały się z powierzchnią komórek śródbłonkowych.

W niektórych miejscach komórki śródbłonkowe pozbawione były błony plazmatycznej i erytrocyty bezpośrednio przylegały do uszkodzonej powierzchni. Naczynia kapilarne otaczała cienka, ale wyraźnie zarysowana błona podstawna. Charakterystyczny był niewielki obrzęk wypustek glejowych (pituicytów) oraz aksonów przylegających do ściany naczynia (Fot.41).

Śródbłonek większości zmienionych naczyń kapilarnych wypełniały liczne pęcherzyki, często ułożone wzdłuż błony plazmatycznej przylegającej do błony podstawnej (Fot.42). Tylko nieliczne naczynia otaczała poszerzona, nietypowa dla tej okolicy błona podstawna. Pomiędzy jej blaszkami zewnętrznymi znajdowała się homogenna elektronowo-ciemna substancja.

Naczynia o poszerzonej błonie podstawnej cechowała obecność ciągłego śródbłonka. Płaskie komórki śródbłonkowe wykazujące połączenia ścisłe posiadały gładką, pozbawioną wgłobień i mikrokosmków powierzchnię. W jasnej cytoplazmie znajdowały się nieliczne pęcherzyki (schemat 11). Wokół takich naczyń niewidoczna była macierz zewnątrzkomórkowa natomiast otaczały je fibroblasty (Fot.43).

W tej grupie doświadczalnej występowały naczynia kapilarne, w których obserwowano proces naprawy śródbłonka. Na Fot.44 ścianę naczynia kapilarnego tworzą komórki śródbłonkowe o elektronowo-jasnej cytoplazmie. Pomiędzy takimi komórkami leży komórka o elektronowo-gęstej cytoplazmie, różniąca się morfologicznie od sąsiadujących komórek. Podczas gdy, na powierzchni luminalnej naczynia komórka ta łączy się z sąsiadującymi komórkami śródbłonkowymi, to jej część abluminalna znajduje się,

- 40 -

w wypełnionej w przeważającej części ziarnistym raczej niż włóknistym materiałem, macierzy zewnątrzkomórkowej. Wydaje się iż występuje tu proces naprawy uszkodzonego śródbłonka przebiegający z udziałem komórki przynaczyniowej.



Schemat 11

E-śródbłonek; P-pericyt; BM-błona podstawna; ECM-macierz zewnątrzkomórkowa

4.1.3 Siedem dni po zastosowaniu metody ucisku.

W materiale pobranym do badań siedem dni po zastosowaniu MU nadal część naczyń kapilarnych była morfologicznie zmieniona. Komórki śródbłonkowe niektórych naczyń posiadały rozrzedzoną cytoplazmę, w której znajdowały się liczne pęcherzyki ułożone wzdłuż abluminalnej błony plazmatycznej oraz nieregularne wakule (Fot.45). Śródbłonek znacznej części zmienionych ultrastrukturalnie naczyń kapilarnych był pogrubiały i wysoki, skierowany do światła naczynia (schemat 12). W cytoplazmie takich komórek znajdowało się nieregularne duże jądro i organella komórkowe.

- 41 -

Komórki śródbłonkowe wykazywały punktowo połączenia ścisłe. Naczynia takie otaczała cienka błona podstawna. Cechy obrzęku obserwowano w sąsiadujących z naczyniami kapilarnymi pituicytach oraz wypustkach aksonów (Fot.45, Fot.46). Pozostałe elementy strukturalne ściany naczynia pozostawały ultrastrukturalnie niezmienione.

Najliczniejszą grupę naczyń stanowiły jednak niezmienione ultrastrukturalnie naczynia kapilarne.



Schemat 12

E-śródbłonek; P-pericyt; BM-błona podstawna; ECM-macierz zewnątrzkomórkowa; TJ-połączenia ścisłe

4.1.4 Czternaście dni po zastosowaniu metody ucisku

Większość naczyń kapilarnych w materiale pobranym do badań czternaście dni po zastosowaniu MU była ultrastrukturalnie niezmieniona.

Obserwowano również naczynia, które cechowała obecność wysokich komórek śródbłonkowych i obecność szerokiej warstwy ziarnistej, bezwłókienkowej macierzy zewnątrzkomórkowej (Fot.47). Cechy

- 42 -

morfologiczne wskazują iż mogą to być nowo uformowane naczynia.

4.2. Grupa zwierząt kontrolnych- wykonanie otworu trepanacyjnego bez zastosowania ucisku *po jednym, czterech, siedmiu i czternastu dniach*

Budowa ultrastrukturalna naczyń kapilarnych nerwowej części przysadki mózgowej w materiale pobranym od zwierząt grupy kontrolnej- nie poddawanych uciskowi była niezmieniona w porównaniu z budową ultrastrukturalną naczyń kapilarnych nerwowej części przysadki mózgowej opisaną w pkt. 2.3. Wszystkie elementy strukturalne naczyń kapilarnych zachowały swą prawidłową morfologię ultrastrukturalną.

4.3 Grupa zwierząt kontrolnych-zwierzęta nie poddane żadnym zabiegom

Budowa morfologiczna naczyń kapilarnych nerwowej części przysadki mózgowej w tkance pobranej od zwierząt nie poddawanych żadnym zabiegom była niezmieniona w porównaniu z opisaną w pkt.2.3.

5. Zmiany ultrastrukturalne w naczyniach kapilarnych kory mózgowej półkuli przeciwległej do ogniska uszkodzenia w modelu fotochemicznie indukowanej agregacji płytek krwi

5.1. Grupa zwierząt eksperymentalnych *jeden, cztery, siedem i czternaście dni po wywołaniu reakcji fotochemicznej.*

Większość naczyń kapilarnych w badanym materiale nie wykazywała zmian ultrastrukturalnych. Jedynie pojedyńcze naczynia kapilarne swą budową morfologiczną różniły się od naczyń kapilarnych obserwowanych u zwierząt kontrolnych.

Jeden dzień po MF wśród ultrastrukturalnie niezmienionych naczyń, kształt niektórych naczyń kapilarnych uległ deformacji, a ich światło przekształciło się w wąską szczelinę. Cechą charakterystyczną była silna wakuolizacja przynaczyniowych wypustek astrocytów, które przylegały do zdeformowanych naczyń (Fot. 48). Komórki śródbłonkowe oraz pericyty tak zmienionych naczyń kapilarnych wypełnione były elektronowo-gęstą cytoplazmą, w której trudno było rozróżnić organella komórkowe. W takich naczyniach zatarciu ulegała również struktura błony podstawnej.

Cztery dni po MF zmiany ultrastrukturalne naczyń kapilarnych obserwowano również jedynie sporadycznie. Większość obserwowanych naczyń pozostała ultrastrukturalnie niezmieniona. Niektóre zmienione ultrastrukturalnie naczynia kapilarne posiadały komórki śródbłonkowe, w których występowały pęcherzyki pinocytarne ułożone wzdłuż błony plazmatycznej na luminalnej ich powierzchni oraz liczne mikrokosmki i wgłobienia w błonie plazmatycznej. Wokół tych naczyń kapilarnych

- 44 -

trójwarstwowa struktura błony podstawnej ogniskowo ulegała zatarciu, pogrubieniu i zwielokrotnieniu (Fot.49). Budowa ultrastrukturalna pericytów i przynaczyniowych wypustek astrocytów w większości kapilar pozostawała niezmieniona.

W materiale badanym siedem i czternaście dni po MF nie obserwowano zmian w budowie ultrastrukturalnej naczyń kapilarnych.

5.2 Grupa zwierząt kontrolnych-po wstrzyknięciu czerwieni bengalskiej bez naświetlania *po jednym, czterech , siedmiu i czternastu dniach*

Budowa morfologiczna ultrastrukturalna naczyń kapilarnych grupy kontrolnej nie odbiegała od budowy ultrastrukturalnej naczyń kapilarnych zwierząt nie poddawanych żadnym zabiegom i opisanej w pkt. 1.3. Komórki śródbłonkowe, błona podstawna, pericyty, komórki przynaczyniowe oraz przynaczyniowe wypustki astrocytów pozostały ultrastrukturalnie niezmienione.

- Zmiany ultrastrukturalne w naczyniach kapilarnych kory mózgowej półkuli przeciwległej do ogniska uszkodzenia w modelu mechanicznego urazu mózgu.
- 6.1 Grupa zwierząt eksperymentalnych jeden, cztery, siedem i czternaście dni po zastosowaniu metody ucisku.

- 45 -

Jeden dzień po zastosowaniu MU w badanym materiale nie obserwowano ultrastrukturalnie zmienionych naczyń kapilarnych.

Cztery dni po indukcji uszkodzeń większa część naczyń kapilarnych pozostała ultrastrukturalnie niezmieniona. Sporadycznie jedynie występowały naczynia o zmienionej budowie ultrastrukturalnej, które cechowało pofałdowanie powierzchni komórek śródbłonkowych i obrzmiałe organella komórkowe. Błona podstawna otaczająca tak zmienione naczynia kapilarne była miejscami rozgałęziona i otaczała wypustki komórek o elektronowociemnej cytoplazmie i niewyraźnej budowie ultrastrukturalnej (Fot.50). Pericyty pozostawały ultrastrukturalnie niezmienione.

Cechą charakterystyczną zmienionych ultrastrukturalnie naczyń kapilarnych był obrzęk przynaczyniowych wypustek astrocytów.

Siedem i czternaście dni po zastosowaniu MU w badanym materiale nie obserwowano zmienionych ultrastrukturalnie naczyń kapilarnych.

6.2 Grupa zwierząt kontrolnych wykonanie otworu trepanacyjnego bez wykonywania ucisku *po jednym, czterech, siedmiu i czternastu dniach*

W materiale kontrolnym naczynia kapilarne pozostały morfologicznie niezmienione. Budowa ultrastrukturalna komórek śródbłonkowych, błony podstawnej, pericytów, komórek przynaczyniowych oraz przynaczyniowych wypustek astrocytów nie różniła się od budowy ultrastrukturalnej naczyń kapilarnych zwierząt nie poddawanych żadnym zabiegom i była podobna do budowy ultrastrukturalnej naczyń kapilarnych opisanych w pkt. 1.3.

- 46 -

 7. Immunofluorescencyjne badanie obecności fibronektyny i lamininy po wywołaniu reakcji fotochemicznej

7.1. Fibronektyna

W materiale kontrolnym pobranym z kory mózgowej i nerwowej części przysadki mózgowej fibronektyna występowała w formie pierścienia wokół naczyń krwionośnych zarówno naczyń kapilarnych jak i naczyń o większym przekroju. Lokalizacja fibronektyny odpowiadała okolicy wokół naczyń prawdopodobnie między światłem naczynia, a błoną podstawną.

W materiale pobranym z kory mózgowej nie obserwowano obecności fibronektyny w neuropilu, natomiast w nerwowej części przysadki mózgowej obecność fibronektyny objawiała się w postaci sieci gęsto ułożonych włókienek w macierzy zewnątrzkomórkowej (Fot.51, Fot.56).

W naczyniach kapilarnych kory mózgowej w pobliżu ogniska uszkodzenia oraz naczyniach kapilarnych nerwowej części przysadki mózgowej ilość fibronektyny zwiększała się pierwszego, czwartego i siódmego dnia po wywołaniu reakcji fotochemicznej. Pierścień wokół naczyń ulegał poszerzeniu zarówno wokół naczyń kory mózgowej (Fot.52, Fot.53, Fot.54) jak i nerwowej części przysadki (Fot.57, Fot.58, Fot.59). Dopiero po czternastu dniach grubość pierścienia fibronektyny wokół naczyń wracała do normy (Fot.55, Fot.60). Była ona podobna do obserwowanej w materiale kontrolnym pobranym z kory mózgowej oraz nerwowej części przysadki mózgowej.

Pierwszego, czwartego i siódmego dnia eksperymentu fibronektyna w macierzy zewnątrzkomórkowej w materiale pobranym do badań z nerwowej części przysadki mózgowej zanikała. Sieć włókienek ponownie pojawiała się po czternastu dniach osiągając poziom porównywalny z obserwowanym w materiale kontrolnym.

- 47 -

W korze mózgowej półkuli przeciwległej do ogniska uszkodzenia obecność fibronektyny wokół większości naczyń kapilarnych nie zmieniała się w porównaniu ze stanem obserwowanym w materiale kontrolnym. Jedynie sporadycznie wokół niektórych naczyń kapilarnych obserwowano zwiększenie obecności fibronektyny po pierwszym i czwartym dniu eksperymentu (Fot.71).

7. 2. Laminina

W materiale kontrolnym pobranym z kory i nerwowej części przysadki mózgowej obecność lamininy stwierdzano w formie pierścienia wokół naczyń krwionośnych. Pozanaczyniowo obecność lamininy obserwowano w nerwowej części przysadki w macierzy zewnątrzkomórkowej jako sieć wypełniającą przestrzenie międzykomórkowe (Fot.61, Fot.66).

Wokół naczyń w materiale pobranym do badań z kory mózgowej w pobliżu ogniska uszkodzenia obserwowano zwiększenie grubości pierścienia lamininy pierwszego i czwartego dnia po MF (Fot.62, Fot.63). Począwszy od siódmego aż do czternastego dnia obecność lamininy zbliżała się do poziomu obserwowanego w materiale kontrolnym (Fot.64, Fot.65). Objawiało się to zmniejszeniem grubości pierścienia lamininy wokół naczyń kapilarnych.

W materiale pobranym do badań z nerwowej części przysadki mózgowej od pierwszego do czternastego dnia po MF grubość pierścienia lamininy wokół naczyń kapilarnych nie ulegała zmianie w porównaniu z kontrolą (Fot.67, Fot.68, Fot.69, Fot.70).

W badanej tkance pobranej z kory mózgowej półkuli przeciwległej do ogniska uszkodzenia nie obserwowano zmian grubości pierścienia lamininy wokół kapilar po MF (Fot.72).

Badano grubość pierścienia fibronektyny i lamininy w naczyniach kapilarnych na 5 odbitkach fotograficznych z grupy kontrolnej i każdej grupy

- 48 -

doświadczalnej: po 1 dniu, 4 dniach, 7 dniach i 14 dniach eksperymentu. W materiale kontrolnym grubość pierścienia fibronektyny i lamininy wokół naczyń kapilarnych mieściła się w przedziale między 1mm a 1,5 mm. W materiale doświadczalnym naczynia podzielono na 2 grupy: 1) grubość pierścienia fibronektyny i lamininy mieści się w przedziale 1mm - 1,5 mm, 2) grubość pierścienia fibronektyny i lamininy mieści się w przedziale 1,5 mm - 3mm. Liczba naczyń kapilarnych o określonej grubości pierścienia fibronektyny i lamininy przedstawiona jest w tabelach i na wykresach.

Dane dla fibronektyny przedstawione są w tabeli 1 i na wykresie 1 (kora mózgowa) oraz w tabeli 2 i na wykresie 2 (nerwowa część przysadki mózgowej).

W materiale pobranym z kory mózgowej jeden dzień po wywołaniu reakcji fotochemicznej pojawiła się grupa naczyń kapilarnych o grubości pierścienia fibronektyny większej niż w grupie kontrolnej. Naczynia takie o grubości pierścienia 1,5-3 mm występowały także cztery, siedem i czternaście dni po MF. Liczba tych naczyń zmniejszyła się czternaście dni po wywołaniu reakcji fotochemicznej. W materiale tym począwszy od pierwszego dnia eksperymentu zwiększyła się też liczba naczyń kapilarnych o grubości pierścienia fibronektyny 1-1,5mm (tabela 1, wykres 1).

W tabeli 2 i na wykresie 2 przedstawione są dane dla nerwowej części przysadki mózgowej. W materiale tym jeden dzień po wywołaniu reakcji fotochemicznej, podobnie jak w materiale pobranym z kory mózgowej, pojawiła się grupa naczyń kapilarnych o grubości pierścienia fibronektyny 1,5-3 mm. Szczególnie duża liczba takich naczyń występowała siedem dni po MF. Jeśli porównać te dane z obserwacjami mikroskopowo-elektronowymi, to można przypuszczać, że w skład tej grupy naczyń wchodzą nowo utworzone naczynia kapilarne.

W tabeli 3 i na wykresie 3 przedstawiono dane dla lamininy z materiału

- 49 -

pobranego z kory mózgowej. Jeden dzień, cztery dni, siedem dni oraz czternaście dni po MF występowała grupa naczyń kapilarnych o grubości pierścienia lamininy większej niż w grupie kontrolnej. Cztery dni po indukcji uszkodzeń zwiększyła się liczba takich naczyń, a następnie siedem i czternaście dni po wywołaniu reakcji fotochemicznej ich liczba zmniejszyła się poniżej tej, którą obserwowano pierwszego dnia. Jeden i cztery dni po MF zwiększyła się też liczba naczyń kapilarnych o grubości pierścienia lamininy 1-1,5 mm. W nerwowej części przysadki mózgowej (tabela 4 i wykres 4) grupa naczyń kapilarnych o grubości pierścienia lamininy 1,5-3 mm pojawiła się jedynie siedem dni po MF. Były to pojedyńcze naczynia kapilarne. Wynik ten wskazuje na niewielki udział lamininy w badanych procesach uszkodzenia i naprawy w nerwowej części przysadki mózgowej.

Tabela 1

Zmiany grubości pierścienia fibronektyny wokół naczyń kapilarnych kory mózgowej

	liczba naczyń o średnicy		liczba naczyń o średnicy	
grupa	1,5 - 3 mm	mediana	1 - 1,5 mm	mediana
kontrola			7	6,4
			7	
			8	
			5	
			5	
1 dzień	11	15,6	9	10
	18		10	
	24		8	
	10		12	
	15		11	
4 dni	21	17,6	10	8,2
	17		8	
	19		9	
	20		7	
	11		7	
7 dni	15	16,4	9	9,6
	20		10	
	21		11	
1. 1. S. M. S.	15		11	
	11		7	
14 dni	15	12	7	7,6
	15		7	
	10		8	
	10		8	
	10		8	

grupa	liczba naczyń o średnicy		
	1,5 - 3 mm 1 - 1,5 mm		
kontrola		6,4	
1 dzień	15,6	10	
4 dni	17,6	8,2	
7 dni	16,4	9,6	
14 dni	12	7,6	

Wykres 1

Zmiany grubości pierścienia fibronektyny wokół naczyń kapilarnych kory mózgowej



- 52 -

http://rcin.org.pl

Tabela 2

Zmiany grubości pierścienia fibronektyny wokół naczyń kapilarnych nerwowej części przysadki mózgowej

	liczba naczyń o średnicy		liczba naczyń o średnicy	
grupa	1,5 - 3 mm	mediana	1 - 1,5 mm	mediana
kontrola			6	6
			4	
			6	
			8	
			6	
1 dzień	10	14	8	8,4
	9		4	
	23		13	
	16	1.	10	
	12		7	
4 dni	27	17,4	7	8
	13		9	
	17		7	
	13		7	
	17		10	
7 dni	20	25,6	7	10
	28		11	
	25		10	
	28		10	
	27		12	
14 dni	15	13,4	8	8,8
	20		9	1
	10		9	
	10		8	
	12		10	

grupa	liczba naczyń o średnicy		
	1,5 - 3 mm	1 - 1,5 mm	
kontrola		6	
1 dzień	14	8,4	
4 dni	17,4	8	
7 dni	25,6	10	
14 dni	13,4	8,8	

Wykres 2

Zmiany grubości pierścienia fibronektyny wokół naczyń kapilarnych nerwowej części przysadki mózgowej





http://rcin.org.pl

Tabela 3

Zmiany grubości pierścienia lamininy wokół naczyń kapilarnych kory mózgowej

	liczba naczyń o średnicy		liczba naczyń o średnicy	
grupa	1,5 - 3 mm	mediana	1 - 1,5 mm	mediana
kontrola			9	8,2
			8	
1.1.1.1.1.2.2			7	
			9	
			8	
1 dzień	14	12,6	10	9,4
	12		9	
	14		9	
	13		9	
	10		10	
4 dni	15	14,2	10	9,6
	14		9	
	13		9	
	15		10	
1	14		10	
7 dni	13	11,6	10	8,4
	12		8	
	11		7	
1.4.4.4.4.4.4.4.4.4.4.4.4.4.4.4.4.4.4.4	11		8	
	11		9	
14 dni	12	11,2	10	8,6
	11		7	
	11		8	
	12		9	
	10		9	

grupa	liczba naczyń o średnicy		
	1,5 - 3 mm 1 - 1,5 mr		
kontrola		8,2	
1 dzień	12,6	9,4	
4 dni	14,2	9,6	
7 dni	11,6	8,4	
14 dni	11,2	8,6	



Zmiany grubości pierścienia lamininy wokół naczyń kapilarnych kory mózgowej



liczba naczyń o średnicy 1,5 - 3 mm

http://rcin.org.pl

Tabela 4

Zmiany grubości pierścienia lamininy wokół naczyń kapilarnych nerwowej części przysadki mózgowej

	liczba naczyń o średnicy		liczba naczyń o średnicy	
grupa	1,5 - 3 mm	mediana	1 - 1,5 mm	mediana
kontrola			11	8
			8	
			8	
1			6	
			7	
1 dzień			7	9
			11	
1.1.1.1.1.1			12	
			7	
			8	
4 dni			12	8,8
			6	
			7	
			8	
			11	
7 dni	1	1,2	9	8,6
	2		9	
	1		9	
	1		9	
	1		7	
14 dni			10	7,8
			7	
A 2 6			6	
			8	
			8	

grupa	liczba naczyń o średnicy		
	1,5 - 3 mm 1 - 1,5 mm		
kontrola		8	
1 dzień	9		
4 dni		8,8	
7 dni	1,2	8,6	
14 dni		7,8	



Zmiany grubości pierścienia lamininy wokół naczyń kapilarnych nerwowej części przysadki mózgowej





DYSKUSJA

Analiza porównawcza, mikroskopowo-elektronowa zmian w naczyniach kapilarnych kory mózgowej po zastosowaniu metody fotochemicznie indukowanej agregacji płytek krwi (MF) i metody ogniskowego ucisku powierzchni mózgu (MU) nasuwa podobieństwo tych zmian do opisywanych uprzednio efektów niedokrwienia oraz mechanicznego urazu.

Agregacja płytek krwi w naczyniach wywołana reakcją fotoczułego barwnika ze światłem przechodzącym przez nienaruszoną mózgoczaszkę oraz mechaniczny ucisk odsłoniętej powierzchni mózgu prowadziły do istotnych zmian w komórkach śródbłonka. błonie podstawnej i macierzy zewnątrzkomórkowej. Zmiany występowały zarówno w naczyniach kapilarnych tkanki pobranej do badań z miejsca znajdującego się w pobliżu ogniska uszkodzenia jak i w naczyniach regionów mózgu odległych od ogniska uszkodzenia. W materiale pobranym do badań od wszystkich zwierzat doświadczalnych charakter obserwowanych zmian mikroskopowoelektronowych oraz czas ich występowania były podobne. Analiza mikroskopowo-elektronowa materiału pobranego do badań po zastosowaniu obu metod wykazała zarówno zmiany degeneracyjne jak i procesy naprawy uszkodzonych naczyń.

Obserwacje morfologiczne mikroskopowo-elektronowe kory mózgowej z miejsca znajdującego się w pobliżu ogniska uszkodzenia prowadzone w pierwszej dobie po zastosowaniu MF ujawniły nieprawidłową budowę ultrastrukturalną kapilar. Naczynia kapilarne uległy silnemu obkurczeniu i zniekształceniu. Wokół naczyń występował duży obrzęk przynaczyniowych wypustek astrocytów. W świetle większości naczyń kapilarnych występowały zatory płytkowe bądź płytkowo-krwinkowe. Agregaty płytkowe występujące

- 59 -

w świetle naczyń kapilarnych po wywołaniu reakcji fotochemicznej złożone były głównie z płytek pozbawionych ziarnistości. Formowaniu zatorów w naczyniach kapilarnych towarzyszyły zmiany w komórkach śródbłonka. Komórki śródbłonka uległy silnemu pofałdowaniu, a na ich powierzchni występowały wgłobienia i długie mikrokosmki.

Reakcja naczyń kapilarnych na MU w pierwszej dobie była słabiej wyrażona niż po wywołaniu reakcji fotochemicznej. Nie występował obrzęk przynaczyniowych wypustek astrocytów i naczynia kapilarne nie ulegały obkurczeniu. Masowy obrzęk przynaczyniowych wypustek astrocytów wystąpił dopiero cztery dni po zastosowaniu MU. Cztery dni po zastosowaniu obu metod wspólną cechą były nasilające się wyżej opisane zmiany ultrastrukturalne w komórkach śródbłonka.

Badano również wpływ ogniskowego uszkodzenia tkanki mózgowej na naczynia kapilarne w regionach mózgu odległych od ogniska uszkodzenia. Zmiany ultrastrukturalne w naczyniach kapilarnych kory mózgowej półkuli przeciwległej względem ogniska uszkodzenia występowały sporadycznie w pierwszym i czwartym dniu po zastosowaniu MF, a jedynie w czwartym dniu po zastosowaniu MU. Zarówno charakter jak i czas występowania tych zmian nie różnił się od obserwowanych w materiale pobranym w pobliżu ogniska uszkodzenia, różnica dotyczyła częstotliwości i zaawansowania tych zmian.

Obserwacje mikroskopowo-elektronowe, morfologiczne regionów odległych od ogniska uszkodzenia, w których nie występuje bariera krew-mózg, prowadzone na przykładzie nerwowej części przysadki mózgowej wykazały także nieprawidłowości ultrastrukturalne w budowie niektórych naczyń kapilarnych po zastosowaniu obu metod. W świetle niektórych naczyń nerwowej części przysadki mózgowej występowały zatory płytkowe lub płytkowo krwinkowe. Niekiedy elementy morfotyczne krwi bezpośrednio

- 60 -

przylegały do odsłoniętej błony podstawnej. Komórki śródbłonkowe nerwowej części przysadki mózgowej reagowały podobnie na fotochemiczną agregację płytek krwi w naczyniach i na ucisk powierzchni mózgu. Obserwowano nekrozę lub apoptozę komórek śródbłonkowych. Często rozerwaniu ulegały fragmenty błony plazmatycznej komórek śródbłonkowych od strony światła naczynia.

W naczyniach kapilarnych nerwowej części przysadki obserwowano także cechy morfologiczne wskazujące na proces naprawy uszkodzonego śródbłonka. Obecność centrioli w cytoplazmie komórek śródbłonka wielu naczyń kapilarnych pozwalała przypuszczać iż zachodził podział komórek śródbłonkowych, który był zaangażowany w proces naprawy uszkodzonych naczyń kapilarnych. Obserwowano też cechy morfologiczne naczyń wskazujące na proces naprawy uszkodzonego śródbłonka przebiegający z udziałem komórki przynaczyniowej lub pericyta. Istotna cecha obserwowanego zjawiska były ścisłe połączenia jakie powstawały między migrujaca komórka przynaczyniowa i sasiadujacymi komórkami śródbłonkowymi.

Częstotliwość zmian ultrastrukturalnych stwierdzanych w naczyniach kapilarnych nerwowej części przysadki mózgowej była znacznie mniejsza w porównaniu z częstotliwością zmian występujących w naczyniach kapilarnych kory mózgowej w pobliżu ogniska uszkodzenia. Zmiany te jednak były bardziej nasilone w porównaniu ze zmianami obserwowanymi w naczyniach kapilarnych kory mózgowej półkuli przeciwległej względem ogniska uszkodzenia. Zmiany ultrastrukturalne obserwowane w niektórych naczyniach kapilarnych nerwowej części przysadki mózgowej świadczą o wpływie jaki wywiera ogniskowe uszkodzenie kory mózgowej na ultrastrukturę naczyń kapilarnych w regionie odległym od ogniska uszkodzenia, jakim jest przysadka mózgowa. Ponieważ zmiany te były

- 61 -

bardziej nasilone niż w korze mózgowej półkuli przeciwległej do ogniska uszkodzenia wpływ ten należy prawdopodobnie wiązać z niewielką liczbą ścisłych połączeń między sąsiadującymi komórkami śródbłonka, a więc obniżeniem skuteczności mechanizmów barierowych. Zcieńczały, okienkowaty śródbłonek jest przepuszczalny np.; dla makrofagów, które są źródłem NO oraz dla wielu elementów komórkowych, czy też substancji, których przenikanie w przypadku obecności ścisłych połączeń jest niemożliwe lub znacznie ograniczone.

Badanie obecności fibronektyny i lamininy wykazało udział głównie fibronektyny w obserwowanych procesach uszkodzenia i naprawy zarówno w naczyniach kapilarnych kory mózgowej w pobliżu ogniska uszkodzenia, jak i w naczyniach kapilarnych nerwowej części przysadki mózgowej.

Powszechnie uważa się, że w reakcji fotochemicznej generatorem zmian jest tlen singletowy (Gandin i wsp. 1983). Ta wysoce reaktywna forma tlenu (Foote 1976) może reagować z białkami i lipidami błon komórkowych i inicjować reakcje ich utleniania (Pooler, Valenzeno 1981, Herrmann 1983, Watson i wsp. 1985). Przypuszczalnie reakcje takie moga zachodzić w błonach komórek śródbłonka i prowadzić do formowania się zatorów płytkowych (Dietrich i wsp. 1987a, 1987b). Większość autorów uważa, że formowanie zatorów płytkowych w naczyniach kapilarnych w tym modelu jest bezpośrednią konsekwencją uszkodzenia błon komórek śródbłonkowych (Packham, Mustard 1984). Śródbłonek traci cechy, które decyduja o nieprzyleganiu elementów morfotycznych krwi w warunkach prawidłowych. Przypuszczenia te potwierdzają wyniki naszych wcześniejszych badań. Podanie zwierzętom gangliozydu GM1, który może osłaniać błony plazmatyczne komórek śródbłonkowych przed szkodliwym działaniem wolnych rodników zabezpieczało je również przed formowaniem zatorów płytkowych (Frontczak-Baniewicz i wsp. in press).

Zmiany obserwowane w MU można oceniać nie tylko jako wynik niedokrwienia, ale także jako bezpośredni efekt mechanicznego urazu. W patofizjologię zarówno niedokrwienia jak i urazowego uszkodzenia mózgu mogą być zaangażowane wolne rodniki, które poprzez działanie utleniające uszkadzają wtórnie naczynia krwionośne (Ikeda, Long 1990, Sen i wsp. 1994, Awashti i wsp. 1997). W modelach uszkodzenia mózgu w wyniku urazu opisywano także agregację płytek krwi (Dietrich i wsp. 1994). Podobną reakcję obserwowano w modelach urazu rdzenia kręgowego (Goodman i wsp. 1979).

Gromadzenie płytek krwi w naczyniach po niedokrwieniu mózgu może być powodem wczesnych zmian w komórkach śródbłonka. Śródbłonek natomiast jest źródłem substancji, które biorą udział we wczesnych fazach tworzenia zatorów. Komórki śródbłonkowe zawierają wolne rodniki, które same wytwarzają lub przenoszone są do komórek śródbłonkowych z przestrzeni zewnątrzkomórkowej. W komórkach śródbłonkowych wolne rodniki są również redukowane (Davies, Hagen 1993). Zidentyfikowano kilka grup cząsteczek, które uważa się za regulatory formowania zatorów (Simionescu, Simionescu 1988, Vane i wsp.1990). Pierwszą grupą substancji są eikozanoidy i w tym głównie prostacyklina, która działa jako antyagregator oraz tromboxan A₂, który działa jako proagregator. Równowaga między tymi substancjami jest istotna dla kontroli aktywności płytek na powierzchni komórek śródbłonkowych. Dodatkowym modulatorem funkcji naczyń jest NO, który zabezpiecza przed adhezją i aktywacją płytek krwi. Tlenek azotu może jednak również wywierać niekorzystny wpływ na naczynia krwionośne. Toksyczne działanie wysokich stężeń NO spowodowane jest jego reakcją z anionami nadtlenkowymi i formowaniem peroksynitratów (Gryglewski i wsp. 1998). Trzecią grupą substancji, które są regulatorami formowania zatorów są ektonukleotydazy powierzchni śródbłonka. 5' mononukleotydaza bierze udział

- 63 -

w procesie rozkładu AMP (odpowiedzialnego za agregację płytek krwi i uwalnianego przez uszkodzone komórki śródbłonka i płytki krwi) do adenozyny, która działając poprzez swoisty receptor (A₂) może podnosić poziom cAMP i działać hamująco na aktywność płytek krwi (Davies, Hagen 1993).

W badaniach Fujimoto i wsp. (1985), w których indukowano uszkodzenia w naczyniach mózgu aktywując płytki krwi wykazano, że substancje uwalniane z płytek odgrywają istotną rolę w tym procesie. Zaktywowane płytki krwi odpowiedzialne są bowiem za tworzenie wolnych rodników, co wywołuje i pogłębia uszkodzenie naczyń (śródbłonków) (Wedmore, Williams 1981, Raichle 1983). Również niedokrwienie tkanki wpływa na agregację płytek krwi w świetle naczyń ponieważ spadek poziomu tlenu i towarzyszące mu lokalne zmiany metaboliczne stymulują produkcję pro-agregacyjnych mediatorów (Yao i wsp. 1996).

Analizując procesy zachodzące w naczyniach podczas formowania zatorów należy też wziąć pod uwagę mechano-chemiczne oddziaływania towarzyszące agregacji płytek krwi w naczyniach. Uformowany zator płytkowy może bowiem powodować mechaniczne uszkodzenia ściany naczyń w odpowiedzi na pulsacyjny stres przepływowy (shear-stress). Pulsacyjny stres przepływowy związany jest ze strumieniem krwi płynącej przez naczynie (Dietrich i wsp. 1993). Zjawisko to jest szczególnie ważne w procesach patologicznych przebiegających ze zmianą szybkości strumienia przepływającej krwi, a śródbłonek jest głównym elementem odpowiadającym na zmiany szybkości krwi przepływającej w naczyniach kapilarnych (Vane i wsp. 1990, Gertler, Abbott 1992). Położone między strumieniem płynącej krwi i ścianą naczynia komórki śródbłonkowe działają jak mechanosensory mogące przetwarzać fizyczne napięcia wytwarzane przez płynącą krew na sygnały chemiczne (Davies, Tripathi 1993). Szybkie odpowiedzi komórek śródbłonkowych na

- 64 -

fizyczne napięcia wytwarzane przez płynącą krew powodują, poprzez swoiste receptory związane z białkami G, zmiany w wewnątrzkomórkowym stężeniu wapnia, aktywności kanałów jonowych, aktywności cyklazy adenylowej i kinazy białkowej C oraz produkcji NO. Odpowiedzi te związane są również z fosforylacją białek szlaku MAPK (ang. mitogen activated protein kinases), i zmianami w ekspresji genów np.;. genów dla PDGF (płytkowy czynnik wzrostu) i ET-1 (endotelina-1), wzmożoną sekrecją PGI₂ (prostacyklina) oraz syntezą histaminy (Herman i wsp. 1987, Fajardo 1989, Lan i wsp. 1994, Kuchan, Franges 1993, Luscher, Tanner 1993, Morita i wsp. 1993, Malek, Izumo 1994, Nagel i wsp. 1994, James i wsp. 1995, Resnick, Gimbrone 1995). Efektami działania pulsacyjnego stresu przepływowego na śródbłonki są też zmiany kształtu komórki śródbłonkowej i ich zwiększona przepuszczalność.

Wpływ jaki wywierało ogniskowe uszkodzenie kory mózgowej na odległe od ogniska uszkodzenia naczynia kapilarne nerwowej części przysadki mózgowej oraz kory mózgowej półkuli przeciwległej względem ogniska uszkodzenia należy prawdopodobnie również wiązać z działaniem pulsacyjnego stresu przepływowego i sygnałów, które zostają uruchomione po zmianie szybkości przepływającej w naczyniach krwi.

Bardzo istotnym i wspólnym dla obu modeli objawem patologicznym obserwowanym w badaniach własnych był silny obrzęk przynaczyniowych wypustek astrocytów. Obrzęk przynaczyniowych wypustek astrocytów jest to także jedna z najwcześniejszych morfologicznych odpowiedzi na niedokrwienie mózgu (Petito i wsp. 1982, Dietrich i wsp. 1987, 1989, 1993). Dotychczas przypuszczano, że wczesny obrzęk mózgu jest wynikiem bezpośredniego działania czynników cytotoksycznych na komórki (Klatzo 1967, Olsson i wsp. 1971). Rozwój obrzęku naczyniopochodnego spowodowanego uszkodzeniem kapilar lokowano zwykle później i wiązano z rozwcjem ogniska martwicy tkanki (Olsson i wsp. 1971, Ito i wsp. 1976,

- 65 -

Katzmann i wsp. 1977, Mossakowski i wsp. 1986). We wcześniej publikowanych pracach, w których badano wpływ reakcji fotochemicznej na mózgowe wykazano jednak penetrację znaczników naczynia niskocząsteczkowych: peroksydazy chrzanowej i błękitu Evansa z krwi do mózgu krótko po naświetlaniu (Dietrich i wsp. 1987). Tak więc reakcja fotochemiczna wydaje się indukować obrzęk naczyniopochodny spowodowany bardzo wczesnym otwieraniem bariery krew-mózg dla białek surowicy (Laursen i wsp. 1993).

Przepuszczalność ściany naczyń krwionośnych mózgu może ulegać zwiększeniu z powodu otwarcia ścisłych połączeń, ale również z powodu zwiększenia transportu pęcherzykowego i uszkodzenia błon komórek śródbłonkowych (Auer i wsp. 1980, Mayhan, Heistad 1986, Mayhan i wsp. 1986b). W badanym materiale własnym obserwowałam głównie zwiększony transport pęcherzyków pinocytarnych i uszkodzenie błon komórek śródbłonkowych w obydwu modelach doświadczalnych. Wydaje się jednak, że w MF bezpośrednią przyczyną obserwowanego przez nas obrzęku było uszkodzenie błon komórek śródbłonkowych.

Na uszkodzenie bariery krew-mózg i tworzenie obrzęku naczyniopochodnego wpływ mają także wolne rodniki działając toksycznie na komórki śródbłonka (Kontos 1985)

zasługuje też reakcja pericytów w Na uwagę obu modelach doświadczalnych. Cztery dni po zastosowaniu MU w analizowanym materiale, gdzie powszechnie występował obrzęk przynaczyniowych wypustek astrocytów, pericyty również wykazywały morfologiczne cechy obrzęku. Pericyty ośrodkowego układu nerwowego uważane są za "drugą linię obrony" krew-mózg barierze (Broadwell, Salcman 1981). W W warunkach patologicznych, w których występuje obrzęk pericyty biorą aktywny udział w pinocytozie (Castejon 1984). Przechodzą one wyraźne zmiany

- 66 **-**

i wykazują zwiększony transport pęcherzykowy i tubularny (Glees i wsp. 1989). Pericyty odgrywają również ważną rolę hemostatyczną zawierając czynnik krzepnięcia krwi dzięki któremu możliwe jest gromadzenie kompleksu protrombiny (Bouchard i wsp. 1997). Stąd, przypuszcza się iż z powodu swego położenia pod komórkami śródbłonkowymi pericyty odgrywają ważną rolę w procesach naprawy związanych z uszkodzeniem naczyń mózgowych (Balabanov, Dore-Duffy 1998).

W materiale pobranym do badań siedem dni po zastosowaniu MU wokół nowo uformowanych naczyń kory mózgowej w pobliżu ogniska uszkodzenia występowały też komórki przynaczyniowe o cechach makrofagów. Ich rolą było prawdopodobnie usunięcie nadmiaru błony podstawnej, która otaczała nowo powstałe naczynia i rozluźnienie struktury macierzy (Kida i wsp. 1993).

W materiale pobranym do badań cztery dni po zastosowaniu reakcji fotochemicznej oraz cztery i siedem dni po zastosowaniu metody ucisku w sasiedztwie kapilar występowały komórki przynaczyniowe, które w przeciwieństwie do pericytów nie były całkowicie otoczone błoną podstawną, natomiast mogły być w kontakcie z błoną plazmatyczną pericyta lub astrocyta. Jak wykazały badania (Hickey i wsp. 1992) te komórki zawieraja mikrotubul przynaczyniowe nie ani znaczacej ilości mikrofilamentów w swej cytoplazmie, lecz może występować w nich znaczna liczba ciał lizosomalnych o dużej gęstości elektronowej.

W badanym materiale własnym zaobserwowałam także udział komórki przynaczyniowej w procesie naprawy uszkodzonych naczyń kapilarnych. Wiąże się to prawdopodobnie z możliwością zmiany jej fenotypu.

W badaniach prowadzonych w innych laboratoriach wykazano, że między pericytem, a komórką śródbłonkową istnieje zależność, która umożliwia pericytowi regulowanie proliferacji komórek śródbłonkowych (Fujimoto 1995). Obecność punktowych połączeń między komórkami śródbłonka

- 67 -
i pericytami w naczyniach kapilarnych stwierdzano wcześniej w układzie bezbarierowym (Rivera-Pomar 1966, Dermietzel, Leibstein 1978). Połączenia ścisłe między komórkami śródbłonowymi i pericytami obserwowano też w procesie formowania nowych naczyń, gdzie migrującym komórkom śródbłonkowym towarzyszyły pericyty. Pericyty uważa się za rusztowanie wzdłuż którego komórki śródbłonkowe migrują w czasie angiogenezy (Nehls i wsp 1992). Znane są przypadki zmiany fenotypu pericyta w czasie procesu angiogenezy (Diaz-Flores i wsp. 1992), gdzie pericyt może przyjmować fenotyp fibroblasta wytwarzając kolagen (Sundberg i wsp. 1996). Wykazano także, że w czasie naprawy uszkodzonych naczyń pericyty ulegają podziałom mitotycznym (Diaz-Flores i wsp.1992).

W badanym materiale własnym w obu zastosowanych metodach (MF, MU) zwraca uwagę obecność nietypowych dla nerwowej części przysadki mózgowej naczyń kapilarnych, których komórki śródbłonkowe ściśle ze sobą połączone nie wykazywały okienkowatości – cechy typowej dla komórek śródbłonkowych w układzie bezbarierowym. Badania przeprowdzone przez Gotlieb, Spector (1981) i Sholley i wsp. (1984) sugerują, że proces naprawy uszkodzonych naczyń oraz proces formowania nowych naczyń polegać może na zwiększaniu powierzchni i rozprzestrzenianiu się komórek śródbłonkowych przy braku ich proliferacji. Można więc przypuszczać że daje to efekt zaniku okienkowatości w badaniach morfologicznych. Naczynia te charakteryzowały się również obecnością pogrubiałej błony podstawnej.

W tym samym czasie w badaniach immunocytochemicznych przy wykorzystaniu przeciwciał skierowanych przeciwko fibronektynie stwierdzono zwiększoną grubość pierścienia fibronektyny wokół naczyń nerwowej części przysadki mózgowej. Fibronektyna może wpływać na morfologię komórek śródbłonka i często związana jest z aktynowymi włóknami stresowymi (Gotlieb i wsp. 1991), a interakcja fibronektyny z powierzchnią komórek

- 68 -

śródbłonkowych ma wpływ na cytoszkieletalne komponenty śródbłonka (Chen i wsp. 1986a). Biorąc pod uwagę te dwa fakty można przypuszczać, że opisane w nerwowej części przysadki mózgowej naczynia kapilarne w MF i MU posiadające śródbłonek typu ciągłego, a nie okienkowatego przechodziły proces naprawy poprzez zastępowanie komórek uszkodzonych przez rozpłaszczające się komórki nieuszkodzone. Jest to zgodne z jednym ze schematów procesu naprawy (Gotlieb i wsp. 1991). Przemodelowanie cytoszkieletu umożliwiałoby zwiększanie powierzchni nieuszkodzonych komórek śródbłonkowych.

W ocenie mikroskopowo-elektronowej naczyń kapilarnych zarówno kory mózgowej w pobliżu ogniska uszkodzenia jak i zmienionych ultrastrukturalnie naczyń kapilarnych kory mózgowej półkuli przeciwległej względem ogniska uszkodzenia oraz kapilar nerwowej części przysadki mózgowej reakcja błony podstawnej i macierzy zewnątrzkomórkowej wydawała się być proporcjonalna i równie istotna jak reakcja śródbłonka. Zmiany w błonie podstawnej i macierzy zewnątrzkomórkowej występowały między pierwszym i czternastym dniem eksperymentu po zastosowaniu obu metod.

Badania immunocytochemiczne wykazały, że spośród dwóch badanych białek macierzy laminina nie bierze większego udziału w procesach uszkodzenia i naprawy naczyń w MF. Niewielkie zwiększenie ekspresji lamininy wokół naczyń kapilarnych kory mózgowej jeden i cztery dni po zastosowaniu MF może towarzyszyć rozluźnieniu struktury błony podstawnej obserwowanemu mikroskopie elektronowym W jako zatarcie iei trójwarstwowej struktury. Jeśli natomiast porównać ekspresję fibronektyny z obrazami morfologicznymi blony podstawnej i macierzy zewnątrzkomórkowej z mikroskopu elektronowego, to największa ekspresja fibronektyny, spowodowana prawdopodobnie jej syntezą, przypada między czwartym i siódmym dniem eksperymentu. Zwiększona ekspresja fibronektyny

- 69 -

nie pozwala określić, czy komórka wiąże, wydziela, czy adsorbuje fibronektynę. Może to jednak sugerować rolę fibronektyny jako efektywnego substratu dla przylegania komórek, co jest procesem potrzebnym do naprawy uszkodzonych kapilar. Zmiany w ekspresji fibronektyny mogą być również powiązane z regeneracją oraz różnicowaniem komórek obserwowanym w organogenezie (Chen 1973, Linder i wsp. 1975, Vaheri i wsp. 1976B, Wartiovaara i wsp. 1979, Wartiovaara, Vaheri 1980).

Podobnie jak w naszych badaniach zwiększenie ilości fibronektyny stwierdzano w eksperymentach ucisku rdzenia kręgowego u szczurów w przestrzeniach zewnątrzkomórkowych i wokół rejonu ucisku (Farooque i wsp. 1992). Podobne obserwacje dotyczyły zwierzęcego modelu stwardnienia rozsianego (EAE) (Butter i wsp. 1989). Ucisk rdzenia kręgowego może indukować otwieranie bariery krew-rdzeń kręgowy, co prawdopodobnie uwalnia cząsteczki fibronektyny i pozwala na ich przejście do przestrzeni zewnątrzkomórkowych parenchymy rdzenia kręgowego (Iizuka i wsp. 1987).

Interesującym zjawiskiem obserwowanym w materiale pobranym z kory mózgowej w pobliżu ogniska uszkodzenia, było wpuklanie błony podstawnej do przynaczyniowych wypustek astrocytów. Może to świadczyć o istotnym ich udziale w polimeryzacji nowej błony podstawnej. Stwierdzono, że astrocyty mogą brać udział w formowaniu nowej błony podstawnej gdy wchodzą w kontakt z tkankami pochodzenia mezenchymalnego w różnych regionach mózgu (Bar, Wolff 1972, Peters i wsp. 1976, Bernstein i wsp. 1985).

Potwierdzają to też badania in vitro, które wykazały, że astrocyty w hodowli mogą wytwarzać fibronektynę (Price, Hynes 1985, Kusaka i wsp. 1985). Natomiast po przecięciu rdzenia kręgowego astrocyty wydzielają lamininę jako prekursora błony podstawnej (Bernstein i wsp. 1985).

Można zatem sugerować, że interakcja między komponentami błony podstawnej i przynaczyniowymi wypustkami astrocytów jest bardzo istotna dla

- 70 -

polimeryzacji tych cząsteczek, a skoordynowane współdziałanie mezenchymalnych i astroglejowych komórek wzmacnia ostateczną polimeryzację błony podstawnej (Berry i wsp. 1983, Maxwell i wsp. 1984, Suzuki, Choi 1990).

Wpuklanie błony podstawnej do komórek przynaczyniowych obserwowano również w materiale własnym pobranym z nerwowej części przysadki mózgowej. Prawdopodobnie komórki przynaczyniowe także biorą udział w polimeryzacji nowej błony podstawnej w procesach naprawy naczyń w przysadce mózgowej.

Pogrubieniu błony podstawnej obserwowanemu w mikroskopie transmisyjnym odpowiadało poszerzenie immunofluorescencji ściany naczyń po zastosowaniu przeciwciał skierowanych przeciwko fibronektynie. Zjawisko to mogło być funkcjonalnie związane z uszczelnieniem naczyń.

Błona podstawna i macierz zewnątrzkomórkowa odgrywają główną rolę w utrzymaniu strukturalnej integralności naczyń. Biorą także udział w procesach rozwoju i morfogenezy, mają niewątpliwy wpływ na podstawowe procesy takie jak: proliferacja, różnicowanie i adhezja komórek. Błona podstawna i macierz zewnątrzkomórkowa nie są jednak stabilne (Matrisian 1992). Interakcje między komórkami, a także między komórkami i macierzą zewnątrzkomórkową generują sygnały istotne dla tych procesów. Przenoszenie takich informacji często wymaga przykomórkowej, kontrolowanej proteolizy błony podstawnej i macierzy zewnątrzkomórkowej (Birkedal-Hansen 1995, Wolfsberg i wsp. 1995, Adams, Watt 1993, Alexander, Werb 1991, Basbaum, Werb 1996). Chociaż w ten proces zaangażowanych jest wiele klas proteaz (np.; serynowe proteinazy-aktywatory plasminogenu), to metaloproteinazy wydają się głównie za niego odpowiedzialne.

Metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej są grupą enzymów, które degradują składniki błony podstawnej i macierzy zewnątrzkomórkowej takie jak: proteoglikany, glikoproteiny i różne typy kolagenu (Matrisian 1990, Woessner 1991, Sato, Seiki 1993). Aktywność metaloproteinaz regulują ich inhibitory (TIMPS) (Basbaum, Werb 1996, Matrisian 1992, Opdeenaker, Van Damme 1992, Matrisian 1992, Werb i wsp. 1990). Wykazano, że metaloproteinazy i ich inhibitory odgrywają istotną rolę w przemodelowaniu naczyń w czasie pierwszych etapów nadciśnienia (Robert i wsp. 1997) i miażdzycy naczyń (Ye i wsp. 1998). Zamknięcie światła naczyń krwionośnych, w wyniku którego dochodzi do ogniskowej ischemii mózgu, powoduje uaktywnienie kaskady enzymów zewnątrzkomórkowych (Ginsberg, Pulsinelli 1994, Siesjo, Bengtson 1989). Następuje zwiększenie ilości cytokin i wolnych rodników (Chan i wsp. 1991, An i wsp. 1992, Iadecola i wsp. 1994), a także uaktywnienie zewnątrzkomórkowych proteaz degradujących błonę podstawna, czego konsekwencją jest otwarcie bariery krew-mózg i obrzek (Rosenberg i wsp. 1996). Aktywacja metaloproteinaz może być włączona w mechanizm uszkodzenia bariery krew-mózg i tkanki nerwowej w ischemii (Anthony i wsp. 1997), a także we wtórne, opóżnione, poischemiczne uszkodzenie neuronów (Rosenberg i wsp. 1998). Udział metaloproteinaz wykazano także w procesach związanych z agregacją płytek krwi i aktywacją czynników wzrostowych (Sawicki i wsp. 1997, Mangan i wsp. 1994).

W ośrodkowym układzie nerwowym zmiany zapalne i przerwanie bariery krew-mózg doprowadza do przecieku białek takich jak fibronektyna, która poprzez receptory integrynowe może wpływać na aktywność metaloproteinaz jak i może być przez nie degradowana (Esiri, Morris 1991, Maeda, Sobel 1996). Uważa się również, że uwolnienie kolagenazy typu IV w tkance po wystąpieniu zawału mózgu, urazów głowy, a także w przypadku nowotworów mózgu powoduje uszkodzenie bariery krew-mózg poprzez degradację kolagenu błony podstawnej. Wprowadzenie inhibitora specyficznego dla kolagenazy typu IV, TIMP-2, blokuje wzrost przepuszczalności kapilar.

- 72 -

Nasuwa to możliwości terapeutycznego wykorzystania inhibitorów metaloproteinaz, które zabezpieczają błonę podstawną i macierz zewnątrzkomórkową i mogłyby pomóc w leczeniu wielu uszkodzeń mózgu (Rosenberg i wsp. 1992).

Jeśli przyjąć, że degradacja błony podstawnej występuje we wszystkich procesach, które związane są z uszkodzeniem naczyń, to zatarcie trójwarstwowej struktury tej błony w korze mózgu oraz pojawienie się bezwłókienkowej, ziarnistej macierzy zewnątrzkomórkowej w nerwowej części przysadki, które obserwowano w naszych eksperymentach może być morfologicznym obrazem tego procesu. Wydaje się również, że zarówno działanie enzymów degradujących błonę podstawną jak i wcześniej omówiona reakcja komórek śródbłonkowych na pulsacyjny stres przepływowy prowadza do zerwania funkcjonalnych połączeń między cytoszkieletem komórek śródbłonkowych i komponentami błony podstawnej i macierzy zewnatrzkomórkowej.

Badanie działania winkrystyny i jej wpływ m.in. na naczynia krwionośne wykazało zatarcie trójwarstwowej struktury błony podstawnej kapilar oraz jej zwielokrotnienie i ogniskowe poszerzenie (Muzylak, rozprawa doktorska 1997). Wydaje się więc, że bez względu na to, czy następuje uszkodzenie cytoszkieletu, czy jedynie uszkodzenie błony plazmatycznej komórek śródbłonkowych uruchomione zostają procesy związane z naprawą lub przemodelowaniem naczynia, którym musi towarzyszyć reorganizacja błony podstawnej. Podobny obraz rozgałęzienia i rozwarstwienia obserwowano też np.; w neuropatii cukrzycowej (Malik i wsp. 1993), po połowiczym przecięciu rdzenia kręgowego (Bernstein i wsp. 1985), a także w torbielowatości nerek u ludzi (Haverty, Neilson 1988) i zwierząt (Kanwar, Cavone 1984).

Na podstawie danych z piśmiennictwa i naszych obserwacji morfologicznych w mikroskopie elektronowym można stworzyć hipotetyczny

- 73 -

schemat reakcji naczyń kapilarnych na czynnik patologiczny. Zwiększenie aktywności metaloproteinaz degraduje połączenia między komponentami błony podstawnej i macierzy zewnątrzkomórkowej oraz rozluźnia ich obrebie rozluźnionej strukture. W błony podstawnej i macierzy zewnątrzkomórkowej mogą poruszać się pericyty, komórki przynaczyniowe, a także przynaczyniowe wypustki astrocytów. Przemieszczenie elementów obrębie rozluźnionej komórkowych W blony podstawnej stwarza w mikroskopie elektronowym morfologiczny obraz jej zwielokrotnienia i rozgałęzienia, bądź rozwarstwienia. Rozluźnienie struktury błony podstawnej powoduje, że komórki z nią związane zostają w niej zatopione. Umożliwia to bardziej swobodne przemieszczanie wszystkich typów komórek. Wyjaśnia to także możliwość migracji komórki przynaczyniowej w kierunku światła naczynia w procesie naprawy uszkodzonego śródbłonka. Zaobserwowano to w nerwowej części przysadki mózgowej cztery dni po zastosowaniu ucisku powierzchni mózgu. Uzasadnienie znajduje również obecność innych elementów komórkowych (np.; aksonów) pomiędzy rozgałęzieniami błony podstawnej. Na korzyść przedstawionej powyżej hipotezy przemawia fakt, że siedem dni po zadziałaniu czynników patologicznych, gdy procesy związane z naprawą uległy zakończeniu, wokół większości naczyń kapilarnych występowała błona podstawna o prawidłowej, trójwarstwowej strukturze, niezwielokrotniona i nierozgałęziona i otoczona pericytami bądź komórkami przynaczyniowymi. W nielicznych tylko kapilarach była ona rozgałęziona.

Wielu autorów uważa, że wielowarstwowość i rozgałęzienie błony podstawnej wokół naczyń jest wynikiem powtarzających się epizodów śmierci komórek śródbłonkowych oraz ich regeneracji jak również zaburzonej resorbcji błony podstawnej po jej uszkodzeniu (Vracko, Beneditt 1970). Zgodnie z tą hipotezą każda nowa komórka śródbłonkowa wytwarza błonę podstawną. Podczas gdy uszkodzony śródbłonek ulega złuszczeniu,

- 74 -

sasiadujące komórki biorace udział w regeneracji mogą produkować składniki budulcowe nowej błony podstawnej. Przypuszcza się też, że pericyt, który występuje między blaszkami błony podstawnej może przyczyniać się do wytworzenia nieprawidłowego materiału budulcowego błony, a tym samym do zwielokrotnienia jej blaszek. Nadmiar błony podstawnej wokół niektórych naczyń obserwowany w materiale własnym siedem dni po zadziałaniu czynników patologicznych zostaje prawdopodobnie usunięty przy udziale komórek przynaczyniowych lub pericytów o funkcjach makrofagów. Po czternastu dniach od działania czynników patologicznych bardzo nieliczna grupę naczyń stanowiły naczynia o jednokomórkowej budowie ściany (na przekrojach poprzecznych) i błonie podstawnej wpuklajacej się do przylegających wypustek astrocytów. Jeśli uwzględnimy spostrzeżenia, że liczba tych kapilar zwiększa się w czasie formowania nowych naczyń, to obrazy przez nas obserwowane świadczą o tym, że zachodziła tu angiogeneza, a wpuklanie błony podstawnej związane było prawdopodobnie z synteza nowych składników budulcowych.

Obserwacje mikroskopowo-elektronowe prowadzone czternaście dni po wykonaniu eksperymentu wykazały także obecnośc elektronowo-jasnych obrzmień pomiędzy blaszkami błony podstawnej. W obrzmieniach poszerzonej występował błony podstawnej często prażkowany kolagenu typ rozpoznawalny w badaniach ultrastrukturalnych. Uważa się, że synteza kolagenu jest konieczna aby dostarczyć rusztowania dla ostatecznego uformowania błony podstawnej w procesach angiogenezy fizjologicznej i patologicznej (Maragoudakis i wsp. 1995), a ilość zsyntetyzowanego kolagenu może służyć jako wskaźnik angiogenezy (Maragoudakis i wsp. 1988, 1988a, Tsopanoglou i wsp. 1993, 1993a). Badania Haralabopoulos i wsp. (1994) potwierdziły, że synteza kolagenu jest też głównym procesem dla tworzenia naczyń zarówno w czasie angiogenezy in vitro jak i in vivo u myszy.

- 75 -

Przypuszcza się, że za syntezę kolagenu odpowiadają również pericyty, które same produkują kolagen, bądź też są prekursorami komórek produkujących kolagen (Pierce i wsp. 1991, Sundberg i wsp. 1996).

W badanym przez nas materiale siedem dni po indukcji uszkodzeń w korze mózgowej znajdowała się znaczna grupa naczyń kapilarnych o cechach morfologicznych młodych naczyń. Pogrubiały, wysoki śródbłonek, obecność na przekroju poprzecznym często tylko jednej komórki śródbłonkowej wokół światła naczynia to cechy tych naczyń. Często młode naczynia otaczały komórki przynaczyniowe, które prawdopodobnie pełniły rolę komórek uprzątających nadmiar błony podstawnej otaczającej młode naczynia.

Rozluźnienie struktury błony podstawnej i macierzy zewnątrzkomórkowej jest także warunkiem koniecznym w procesie formowania nowych naczyń krwionośnych. W nerwowej części przysadki mózgowej siedem dni po indukcji uszkodzeń niektóre naczynia i macierz zewnątrzkomórkowa wykazywały cechy morfologiczne wskazujące na proces formowania nowych naczyń. Proces angiogenezy obejmuje kilka etapów takich jak: zerwanie homotypowych kontaktów międzykomórkowych, migracja komórek przez błonę podstawną i macierz zewnątrzkomórkową, dzięki rozluźnieniu jej struktury, proliferacja i reorganizacja, która doprowadza do powstania nowego naczynia (Kirckpatrick i wsp. 1997). W odpowiedzi na czynnik indukujący angiogenezę komórki śródbłonkowe z naczynia macierzystego (zazwyczaj z żyły) oddzielają się od innych komórek migrując przez błonę podstawną. Następnie komórki te ulegają podziałowi. Migrujące i proliferujące komórki tworzą tubę nowego naczynia. Składniki nowej błony podstawnej sa wydzielane, aby otoczyć wydłużającą się tubę naczyniową. Następnie światło nowego naczynia łączy się ze światłem naczynia macierzystego (Furcht 1986, Fajardo 1989).

W badanym materiale własnym obserwowano naczynia i komórki

- 76 -

śródbłonkowe o cechach morfologicznych typowych dla różnych etapów procesu angiogenezy. Na uwagę zasługuje fakt iż naczynie macierzyste, z którego oddziela się komórka śródbłonkowa otoczone jest bezwłókienkową macierzą zewnątrzkomórkową. Migracja komórek śródbłonkowych w kierunku czynnika indukującego angiogenezę odbywa się również w macierzy zewnątrzkomórkowej pozbawionej włókienek kolagenowych.

Proces angiogenezy kontrolowany jest przez czynniki angiogeniczne i angiostatyczne. Wśród czynników angiogenicznych są czynniki wzrostowe takie jak: VEGF, TGF α , FGF 2 (Folkman, Shing 1992) i cytokiny takie jak: IL1, IL6, IL8 (Koch i wsp. 1992). Do tej grupy czynników należą też oligosacharydy hialuronidowe (Montesano i wsp. 1996) oraz cząsteczka adhezji komórkowej (CAM) i E-selektyna (Kraling i wsp. 1996, Polverini 1996). Do czynników angiostatycznych (antyangiogenicznych) należy trombospondyna (Di Pietro, Polverini 1993), angiostatyna (O'Reilly i wsp. 1994), czynnik płytkowy 4 (Maione i wsp. 1990) oraz interferon- α (Ezekowitz i wsp. 1992).

Istotną rolę w procesie angiogenezy pełnią także wspomniane już metaloproteinazy (Moscatelli, Rifkin 1988) W badaniach nad angiogeneza oprócz czynników chemicznych pod uwagę bierze się także czynniki mechaniczne jako modulatory angiogenezy i nie pomija się roli omówionego już pulsacyjnego stresu przepływowego (shear-stress) jako czynnika odgrywającego znaczną rolę w fizjologicznej adaptacji systemu naczyniowego (Ichioka i wsp. 1997). Przenoszenie bowiem sygnału drodze na mechanotransdukcji powoduje uruchomienie syntezy m.in. cytokin. Jak już wspomniano, efektem działania pulsacyjnego stresu przepływowego jest także ekspresja genów odpowiedzialnych za aktywność mitogenną sąsiadujących ze śródbłonkiem komórek.

Istotna jest też rola pericytów w procesie angiogenezy. Pericyty biorą udział

- 77 **-**

we wszystkich trzech stadiach formowania nowych naczyń. Degradują błonę podstawną, opuszczają ścianę naczynia i przechodzą do przestrzeni okołonaczyniowej (Diaz-Flores i wsp. 1992, 1994). Wykazano też, że pericyty w czasie angiogenezy towarzyszą migrującym komórkom śródbłonkowym (Nehls i wsp. 1992, Schlingemann i wsp. 1990), gdzie spełniają pomocniczą rolę we wzroście i migracji komórek śródbłonkowych naczyń kapilarnych. Komórki przynaczyniowe, podobne do fibroblastów, w czasie dojrzewania nowych naczyń przylegają do śródbłonka i zostają otoczone przez błonę podstawną po czym ulegają transformacji w pericyty w nowo-utworzonym naczyniu (Rhodin, Fujita 1989, Diaz-Flores i wsp. 1992).

Badania *in vitro* wskazują iż pericyty posiadają dużą zdolność do szybkiego, trwającego zaledwie godziny, łączenia się z nowo utworzoną tubą naczynia kapilarnego. Tymczasem astrocyty potrzebują na ten proces więcej niż trzech dni (Minakawa i wsp. 1991).

- 78 -

http://rcin.org.pl

PODSUMOWANIE

Podsumowujac wyniki przeprowadzonych badań mikroskopowoelektronowych oraz immunocytochemicznych mikroskopie W fluorescencyjnym stwierdziłam, że zastosowanie dwóch różnych modeli patologicznych wywołujących ogniskowe uszkodzenie mózgu szczura o charakterze niedokrwiennym powoduje wyraźną i typową reakcję naczyń kapilarnych. Zmiany w budowie ultrastrukturalnej naczyń kapilarnych w obydwu stosowanych modelach wykazują ten sam charakter.

Istotnym spostrzeżeniem jest występowanie zmian w budowie ultrastrukturalnej naczyń kapilarnych nie tylko w pobliżu ogniska uszkodzenia lecz również w badanych, odległych od ogniska uszkodzenia miejscach. W miejscach odległych od ogniska uszkodzenia nasilenie i częstotliwość występowania tych zmian jest jednak niewielka.

Analiza mikroskopowo-elektronowa wykazała zmiany w ultrastrukturze przede wszystkim komórek śródbłonka, a także pericytów, komórek przynaczyniowych i astrocytów, oraz błony podstawnej i macierzy zewnątrzkomórkowej. Monitorowanie ekspresji dwóch ważnych białek macierzy zewnątrzkomórkowej: fibronektyny i lamininy wykonane w mikroskopie fluorescencyjnym wykazało udział błony podstawnej i macierzy zewnątrzkomórkowej w procesach uszkodzenia i naprawy naczyń kapilarnych.

Uszkodzenie niektórych naczyń kapilarnych obserwowane w obydwu modelach patologicznych uruchamiało fizjologiczne mechanizmy naprawy jak również formowanie nowych naczyń.

- 79 -

WNIOSKI

Jakościowa analiza zmian ultrastrukturalnych w modelach ogniskowego uszkodzenia mózgu wykazała, że pierwotne uszkodzenie naczyń po zastosowaniu metody fotochemicznej oraz wtórne uszkodzenie naczyń w wyniku zastosowania metody ucisku powierzchni mózgu szczura:

- -wywołuje zmiany o podobnym charakterze lecz różnym nasileniu i dynamice w komórkach śródbłonka, pericytach i astrocytach ściśle związane ze zmianami w błonie podstawnej i macierzy zewnątrzkomórkowej
- 2) -wpływa nie tylko na naczynia kapilarne kory mózgowej w pobliżu ogniska uszkodzenia, ale wywołuje podobne, choć mniej nasilone zmiany ultrastrukturalne w naczyniach kapilarnych okolic odległych od ogniska uszkodzenia
- prowadzi do powstania obrzęku okołonaczyniowego, który w zależności od czynnika indukującego uszkodzenie wykazuje różną dynamikę czasową.
- uruchamia mechanizmy odpowiedzialne za naprawę uszkodzeń naczyń kapilarnych oraz powoduje formowanie nowych naczyń w zmienionym środowisku macierzy zewnątrzkomórkowej.

- 80 -

PIŚMIENNICTWO

- 1. Abrahamson DR: Recent studies on the structure and pathology of basement membranes. J Pathol, 1986, 149, 257-278.
- 2. Abrahamson DR, Leardkamolkarn V: Development of kidney tubular basement membranes. Kidney Int, 1991, 39, 382-393.
- 3. Adams JC, Watt FM: Regulation of development and differentiation by the extracellular matrix. Development 1993, 117, 1183-1198.
- 4. Albin MS, Bunegin L, Bennett MH, Dujovny M., Jannetta P: Clinical and experimental retraction pressure monitoring. Acta Neurol Scand, 1977, 57, 522-523.
- 5. Albin MS, Bunegin L, Helsel P, Marlin A, Babinski M: Intracranial pressure and regional cerebral blood flow responses to experimental brain retraction pressure. In: Intracranial Pressure IV, Shulman, Marmarou, Miller (eds), New York, Springer-Verlag, 1980, 131-134.
- 6. Alexander CM, Werb Z: Extracellular matrix degradation. In: Cell Biology of Extracellular Matrix, Hay ED (ed), New York, Plenum Press, 1991, 255-302.
- 7. An G, Lin TN, Liu JS, Hsu CY: Induction of Krox-20 expression after focal cerebral ischemia. Biochem Biophys Res Commun, 1992, 188, 1104-1110.
- A review Bringas of Andrews RJ. JR: brain 8. retraction and recommendations minimizing intraoperative for brain injury. Neurosurgery, 1993, 33(6), 1052-1064.
- 9. Anthony Dc, Ferguson B, Matyzak MK, Millert KM, Esiri MM, Perry VH: Differential matrix metalloproteinase expression in cases of multiple sclerosis and stroke. Neuropathol Appl Neurobiol, 1997, 23, 406-415.
- 10. Argraves Ws, Dickerson K, Burgess WH, Ruoslahti E: Fibulin, a novel protein that interacts with the fibronectin receptor beta subunit cytoplasmic domain. Cell, 1989, 58(4), 623-629.
- 11. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM: Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. Science, 1997, 275, 964-967.
- 12. Auer L, Johansson B, MacKenzie ET: Cerebral venous pressure during actively induced hypertension and hypercapnia in cats. Stroke, 1980, 11, 180-183.
- 13. Awashti D, Church DF, Torbati D: Oxidative stress following traumatic brain injury in rats. Surg Neurol, 1997, 47, 575-582.
- 14. Balabanov R, Dore-Duffy P: Role of the CNS Microvascular pericyte in the blood-brain barrier. J Neurosci Res, 1998, 53, 637-644.
- 15. Bar T, Wolff JR: The formation of capillary basement membranes during internal vascularization of the rat's cerebral cortex. Z Zellforsch Mikrosk Anat, 1972, 133, 231-248.

- 16. Basbaum CB, Werb Z: Focalized proteolysis: spatial and temporal regulation of extracellular matrix degradation at the cell surface. Curr Opin Cell Biol, 1996, 8, 731-738.
- 17. Bernstein JJ, Getz R, Jefferson M., Kelemen M.: Astrocytes secrete basal lamina after hemisection of rat spinal cord. Brain Res, 1985, 327, 135-141.
- 18. Berry M., Maxwell WL, Logan A, Mathewson A, McConnell P., Ashhust DE, Thomas GH: Deposition of the scar tissue in the central nervous system. Acta Neurochir (Suppl) (Wien), 1983, 32, 31-53.
- 19. Birkedal-Hansen H: Proteolytic remodeling of extracellular matrix. Curr Opin Cell Biol 1995, 7, 728-735.
- 20. Bouchard BA, Shatos MA, Tracy PB:Human brain pericytes differentially regulate expression of procoagulant enzyme complexes comprising the extrinsic pathway of blood coagulation. Arteroscler Thromb Vasc Biol, 1997, 17, 1-9.
- 21. Broadwell RD, Salcman M: Expanding the definition of the blood-brain barrier to protein. Proc Natl Acad Sci USA, 1981, 78, 7820-7824.
- 22. Buck C, Horwitz AF: Cell surface receptors for extracellular matrix molecules. Ann Rev Cell Biol, 1987, 3, 179-205.
- 23. Burridge K, Fath K, Kelley G, Nuckolls, Turner C: Focal adhesions:transmembrane junctions between the extracellular matrix and the cytoskeleton. Annu Rev Cell Biol, 1988, 4, 487-525.
- 24. Butt AM, Jones HC, Abbott NJ: Electrical resistance across the blood-brain barrier in anesthetized rats: A developmental study. J Physiol, 1990, 429, 47-62.
- 25. Butter C, Healey DG, Agha N, Wilcox CE, Antoniou AV, Turk JL: The localization of fibrin, fibronectin and class II major histocompatibility complex antigen in the spinal cord in chrinic relapsing experimental allergic encephalomyelitis. J Neuroimmunol, 1989, 22, 11-17.
- 26. Castejon OJ: Submicroscopic changes of cortical capillary pericytes in human perifocal edema. J Submicrosc Cytol, 1984, 16, 601-618.
- 27. Chan PH, Yang GY, Chen SF, Carlsson E, Epstein CJ: Cold-induced brain edema and infarction are reduced in transgenic mice overexpressing CuZn-superoxide dismutase. Ann Neurol, 1991, 29, 482-486.
- 28. Chen LB: Alteration in cell surface LETS protein during myogenesis. Cell, 1973, 10, 393-400.
- 29. Chen WT, Chen JM, Mueller S.C.: Coupled expression and colocalization of 140K cell adhesion molecules, fibronectin, and laminin during morphogenesis and cytodifferentiation of chick lung cells. J Cell Biol, 1986a, 103, 1073-1090.
- 30. Chen WT, Wang J, Hasegawa T, Yamada SS, Yamada KM: Regulation of fibronectin receptor distribution by transformation, exogenous fibronectin, and synthetic peptides. J Cell Biol, 1986b, 103, 1649-1661.

- 31. Chiu Ay, Sanes JR: Differentiation of basal lamina in synaptic and extrasynaptic portions of embryonic rat muscle. Dev Biol, 1984, 103, 456-467.
- 32. Clements JM, Cossins JA, Wells GMA, Corkill DJ, Helfrich K, Wood LM, Pigott R, Stabler G, Ward GA, Gearing AJH, Miller KM: Matrix metalloproteinase expression during experimental autoimmune encephalomyelitis and effects of a combined matrix metalloproteinase and tumor necrosis factor-a inhibitor. J Neuroimm, 1997, 74, 85-94.
- 33. Cuzner ML, Gveric D, Strand C, Loughlin AJ, Paemen L, Opdenakker H, Newcombe J: The expression of tissue-type plasminogen activator, matrix metalloproteases and endogenous inhibitors in the central nervous system in multiple sclerosis: comparison of stages in lesion evolution. J Neuropathol Exp Neorol, 1996, 55 (12), 1194-1204.
- 34. Davies MG, Hagen P.-O: The vascular endothelium. A new horizon. Ann Surg, 1993, 218(5), 593-609.
- 35. Davies PF, Tripathi S.C.: Mechanical sterss mechanisms and the cell: An endothelial paradigm. Circ Res, 1993, 72, 239-245.
- 36. Dean DC, Birkenmeier TM, Rosen GD, Weintraub SJ: Glycoprotein synthesis and secretion. Expression of fibronectin and its cell surface receptors. Am Rev Respir Dis, 1991, 144(3), S25-28.
- 37. Dehouick MP, Vigne P, Torpier G, Breittmayer JP, Cecchelli R, Frelin c: Endothelin-1 as a mediator of endothelial cell-pericyte ineractions in bovine brain capillaries. J Cereb Blood Flow Metab, 1997, 17, 464-469.
- 38. Dermietzel R, Leibstein AG: The microvascular pattern and perivascular linings of the area postrema. Cell Tissue Res, 1978, 186, 97-110.
- 39. Diaz-Flores L, Gutierrez R, Varela H: Behavior of postcapillary venule pericytes during postnatal angiogenesis. J Morphol, 1992, 213, 33-45.
- 40. Diaz-Flores L, Gutierrez R, Varela H: Angiogenesis-an update. Histol Histopathol, 1994, 9, 807-843.
- 41. Dietrich WD, Ginsberg MD, Busto R, Watson BD, Yoshida S: Vascular aspects and hemodynamic consequences of central nervous system injury. Cent Nerv Syst Trauma, 1987, 3, 265-280.
- 42. Dietrich WD, Watson BD, Busto R, Bethea JR, Scheinberg P., Ginsberg MD: Photochemically induced cerebral infarction: I. Early microvascular alterations. Acta Neuropth (Berl), 1987a, 72, 315-325.
- 43. Dietrich WD, Busto R, Watson BD, Scheinberg P., Ginsberg MD: Photochemically induced cerebral infarction. II. Edema and blood-brain barrier disruption. Acta Neuropathol (Berl), 1987b, 72, 326-334.
- 44. Dietrich WD, Nakayama H, Watson BD, Kanemitsu H: Morphological consequences of early reperfusion following thrombotic or mechanical occlusion of the rat middle cerebral artery. Acta Neuropathol, 1989, 78, 605-614.

- 45. Dietrich WD, Prado R, Halley M, Watson BD: Microvascular and neuronal conequences of common carotid artery thrombosis and platelet embolization in rats. J Neuropathol Exp Neurol, 1993, 52(4), 351-360.
- 46. Dietrich WD, Alonso O, Halley M: Early microvascular and neuronal consequences of traumatic brain injury: a light and electron microscopic study in rats. J Neurotrauma, 1994, 11(3), 289-301.
- 47. Dziadek M., Timpl R: Expression of nidogen and laminin in basement membrane during mouse embryogenesis and in teretocarcinoma cells. Dev Biol, 1985, 111,372-382.
- 48. Elfont R, Sundaresan PR, Sladek C: Adrenergic receptors on cerebral microvessels: pericyte contribution. Am J Physiol, 1989, 256, 224-230.
- 49. Esiri MM, Morris CS: Immunocytochemical study of macrophages and microglial cells and extracellular matrix components in human CNS disease. 2. Non-neoplastic diseases. J Neurol Sci, 1991, 101, 59-72.
- 50. Ezekowitz RA, Mulliken JB, Folkman J: Interferon –2a therapy for life threatening hemangiomas of infancy. N Engl J Med., 1992, 326, 1456-1463.
- 51. Fajardo LF: Special report. The complexity of endothelial cells. Am J Clin Pathol, 1989, 92, 241-250.
- 52. Farooque M., Zhang Y, Holtz A, Olsson Y: Exudation of fibronectin and albumin after spinal cord injury in rats. Acta Neuropathol, 1992, 84, 613-620.
- 53. Folkman J, Shing Y: Angiogenesis. J Biol Chem, 1992, 267, 10931-10934.
- 54. Foote CS: Photosensitized oxidation and singlet oxygen: consequences in biological systems. In: Free Radicals in Biology, Pryor (ed) Academic Press, New York, 1976, 2, 85-134.
- 55. Frontczak-Baniewicz M, Gadamski R, Barskov I, Gajkowska B.: Beneficial effects of GM1 ganglioside on photochemically-induced microvascular injury in cerebral cortex and hypophysis in rat. Exp Toxicol Pathol. In press.
- 56. Fujimoto T, Suzuki H, Tanoue K, Fukushima Y, Yamazaki H: Cerebrovascular injuries induces by activation of platelets in vivo. Stroke, 1985, 16, 245-250.
- 57. Fujimoto K: Pericyte-endothelial gap junctions in developing rat cerebral capillaries: a fine structural study. Anat Rec, 1995, 242, 562-565.
- 58. Fukumachi A, Koizumi H, Nukui H: Postoperative intracerebral hemorrhages: A survey of computed tomographic findings after 1074 intracranial operations. Surg Neurol, 1985, 23, 575-580.
- 59. Furcht LT: Critical factors controlling angiogenesis: cell products, cell matrix and growth factors. Lab invest, 1986, 55, 505-509.
- 60. Furchgott RF, Vanhoutte PM: Endothelium derived relaxing and contracting factors. FASEB J, 1989, 3, 2007-2017.

- 61. Fuxe K, Cintra A, Andbjer B, Anggard E, Goldstein M, Agnati LF: Centrally administered endothelin-1 produces lesions in the brain of the male rat. Acta Physiol Scand, 1989, 137, 155-156.
- 62. Gajkowska B, Viron A, Cholewiński M: Immunocytochemical localization of endothelial nitric oxide synthase (e-NOS) and inducible nitric oxide synthase (i-NOS) in rat neurohypophysis after transient cerebral ischemia. Folia Neuropathol, 1999, 37, 10-19.
- 63. Gandin E, Lion Y, Van de Vorst A: Quantum Yield of singlet oxygen production by xanthene derivatives. Photochem Photobiol, 1983, 37, 271-278.
- 64. Gay S, Esiri M: Blood-brain barrier damage in acute multiple sclerosis plaques. Brain, 1991, 114, 557-572.
- 65. McGeer P, Kawamata T, Walker DG, Akiyama H, Tooyama I, McGeer EG: Microglia in degenerative neurological disease. Glia, 1993, 7, 84-92.
- 66. Gertler JP, Abbott WM: Protothrombic and fibrinolytic function of normal and perturbed endothelium. J Surg Res, 1992, 52, 89-102.
- 67. Ginsberg MD, Pulsinelli WA: The ischemic penumbra, injury thresholds, and the therapeutic window for acute stroke. Ann Neurol, 1994, 36, 553-554.
- 68. Glees P, Hasan M, Voth D, Scharz M: Fine structural features of the cerebral microvasculature in hydrocephalic human infants: correlated clinical observations. Neurosurg Rev, 1989, 12, 315-321.
- 69. Goodman JH, Bingham WG, Hunt WE: Platelet aggregation in experimental spinal cord injury. Arch Neurol, 1979, 36, 197-201.
- 70. Gordon-Weeks PR, Giffin N, Weeks St E, Barben C: Transient expression of laminin immunoreactivity in the developing rat hippocampus. J Neurocyt, 1989, 18, 451-463.
- 71. Gottlieb AI, Spector W: Migration into an experimental wound: a comparison of porcine aortic endothelial and smooth muscle cells and the effect of culture irradiation. Am J Pathol, 1981, 103, 271-
- Gottlieb AI, Langille BL, Wong MKK, Kim DW: Biology of disease. Structure and function of the endothelial cytoskeleton. Lab Invest, 1991, 65 (2), 123-137.
- 73. Greaber MB, Streit WJ, Kiefer R, Schoen SW, Kreutzberg GW: New expression of myelomonocytic antigen by microglia and perivascular cells following lethal motor neuron injury. J Neuroimmunol, 1990, 27, 121-132.
- 74. Greaber MB, Streit WJ, Buringer D, Sparks DL, Kreutzberg GW: Ultrastructural location of major histocompatibility complex (MHC). Class II positive perivascular cells in histologically normal human brain. J Neuropathol Exp Neurol, 1992, 51, 303-311.
- 75. Grinnell F, Feld M, Snell W: The influence of cold insoluble globulin on platelet morphological response to substrata. Cell Biol Int Rep, 1979, 3, 585-592.

- 76. Gryglewski RJ, Wolkow P, Uracz W, Janowska E, Bartus JB, Balbatun O, Patton S, Brovkovych, Maliński T: Protective role of pulmonary nitric oxide in the acute phase of endotoxemia in rats. Circ Res, 1998, 82, 819-827.
- 77. Haralabopoulos GC, Grant DS., Kleinman HK, Lelkes PI, Papaioannou SP, Maragoudakis ME: Inhibitors of basement membrane collagen synthesis prevent endothelial cell allignment in matrigel in vitro and angiogenesis in vivo. Lab Invest, 1994, 71(4), 575-581.
- 78. Hatten ME, Furie MB, Rifkin DB: Binding of developing mouse cerebellar cells to fibronectin: a possible mechanism for the formation of the external granular layer. J Neurosci, 1982, 2(9), 1195-2006.
- 79. Haverty TP, Neilson EG: Basement membrane gene expression in polycystic kidney disease. Lab Invest, 1988, 58, 245-248.
- 80. Hearly DP, Wilk S: Localization of immunoreactive glutamyl aminopeptidase in rat brain. II. Distribution and correlation with angiotensin II. Brain Res, 1993, 606, 295-303.
- 81. Herman IM, Brant AM, Warty VS, Bonaccorso J, Klein EC, Kormos RL, Borovetz HS: Hemodynamics and the vascular endothelial cytoskeleton. J Cell Biol, 1987, 105, 291-302.
- 82. Herman IM: Microvascular pericytes in development and disease. In: The blood-brain barrier-cellular and molecular biology. Pardridge E (ed), New York, Raven Press, Ltd, 1993, 127-135.
- 83. Herrmann KS: Platelet aggregation in the hamster cheek pouch by a photochemical process with excited flurescein isothiocyanate-dextran. Microvasc Res, 1983, 26, 238-249.
- 84. Hirschi KK, D'Amore PA: Pericytes in the microvasculature. Cardiovasc Res, 1996, 32, 687-698.
- 85. Hickey WF, Vass K, Lassmann H: Bone narrow-derived elements in the central nervous system: an immunohistochemical and ultrastructural survey of rat chimeras. J Neuropathol Exp Neurol, 1992, 51, 246-256.
- 86. Hongo K, Kobayashi S, Yokoh A: Monitoring retraction pressure on the brain. J Neurosurg, 1987, 66, 270-275.
- 87. Horak ER, Leel R, Klenk N, LeJeune S, Smith K, Stuart N, Greenall M, Stępniewska K, Harris AL.: Angiogenesis, assessed by platelet/endothelial cell adhesion molecule antibodies, as indicator of node metastases and survival in breast cancer. Lancet, 1992, 340, 1120-1124.
- 88. Hossmann V, Hossmann KA, Takagi S: Effect of intravascular platelet aggregation on blood recirculation following prolonged ischemia of the cat brain. J Neurol, 1980, 222, 159-170.
- 89. Hovig T, Mc Kenzie FN, Arfors K-E: Measurement of the platelet response to laser induced microvascular injury. Thromb Diath Haemorrh, 1974, 32, 695-703.

- 90. Hunter DD, Llinas R, Ard M, Merlie JP, Sanes JR: Expression of S-laminin in the developing rat central nervous system. J Comp Neurol, 1992, 323, 238-251.
- 91. Hynes RO, Yamada KM: Fibronectin: multifunctional modular glycoproteins. J Cell Biol, 1982, 95, 369-377.
- 92. Hynes R: Fibronectins: a family of complex and versatile adhesive glycoproteins derived from a single gene. The Harvey Lectures, 1987, series 81, 133-152.
- 93. Iadecola C, Pelligrino DA, Moskowitz MA, Lassen NA: Nitric oxide synthase inhibition and cerebrovascular regulation. J Cereb Blood Flow Metab, 1994, 14, 175-192.
- 94. Ichioka S, Shibata M, Kosaki K, Sato Y, Harii K, Kamiya A: Effects of shear stress on wound-healing angiogenesis in the rabbit ear chamber. J Surg Res, 1997, 72, 29-35.
- 95. Iizuka H, Yamamoto H, Iwasaki Y, Yamamoto T, Konno H: Evolution a nd tissue damage in compressive spinal cord injury in rats. J Neurosurg, 1987, 66, 595-603.
- 96. Ikeda Y, Long DM: The molecular basis of brain injury and brain edema: the role of oxygen free radicals. Neurosurgery, 1990, 27, 1-11.
- 97. Inoue S: Ultrastructure of basement membranes. Int Rev Cytol, 1989, 117, 57-98.
- 98. Ito U, Go KG, Walker JT, Spatz M., Klatzo I: Experimental cerebral ischemia in Mongolian gerbils. III. Behavior of the blood-brain barrier. Acta Neuropathol (Berl), 1976, 34, 1-6.
- 99. James LJ, Harrison DG, Nerem RM: Effects of shear on endothelial cell calcium in the presence and absence of ATP. FASEB J, 1995, 9, 968-973.
- 100. Juliano RL, Haskill S: Signal transduction from extracellular matrix. J Cell Biol, 1993, 120 (3), 577-585.
- 101. Kågstrőm E, Smith ML, Siesjő BK: Recirculation in the rat brain following incomplete brain ischemia. Acta Neuropathol (Berl), 1984, 64, 319-332.
- 102. Kanwar YS, Cavone FA: Reversible changes of tubular cell and basement membrane in drug induced renal cystic disease. Kidney Int, 1984, 26, 35-43.
- 103. Katz BZ, Yamada KM: Integrins in morphogenesis and signaling. Biochemie, 1997, 79, 467-476.
- 104. Katzman R, Clasen R, Klatzo I, Meyer JS, Pappius HM, Waltz AG: Brain edema in stroke: study group on brain edema in stroke. Stroke, 1977, 8, 529-540.
- 105. Kida S, Steart PV, Zhang ET, Weller RO: Perivascular cells act as scavengers in the cerebral perivascular spaces and remain distinct from pericytes, microglia and macrophages. Acta Neuropathol, 1993, 85, 646-652.

- 106. Kirkpatrick CJ, Wagner M, Hermanns I, Klein CL, Kohler H, Otto M, van Kooten TG, Bittinger F: Physiology and cell biology of the endothelium: a dynamic interface for cell communication. Int J Microcirc, 1997, 17, 231-240.4
- 107. Klatzo I: Neuropathological aspects of brain edema. J Neuropathol Exp Neurol, 1967, 26, 1-14.
- 108. Koch AE, Polverini PJ, Kunkel SL, Harlow LA, DiPietro LA, Elner VM, Elner SG, Strieter R: Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. Science, 1992, 258, 1798-1801.
- 109. Kontos HA: Oxygen radicals in cerebral vascular injury. Circ Res, 1985, 57, 508-516.
- 110. Korpaczew WG, Lysenkow SP, Tel LZ: Modelirowanie kliniczeskoj smerti i postreanimacionnoj bolezni u krys (in Russian). Patol Fizjol Eksp Ter, 1982, 3, 78-80.
- 111. Kraling BM, Razon MJ, Boon LM, Zurakowski D, Seachord C, Darveau RP, Mulliken JB, Corless CL, Bischoff J: E-selectin is present in proliferating endothelial cells in human hemangiomas. Am J Pathol, 1996, 148, 1181-1191.
- 112. Kuchan MJ Franges JA: Shear-stress regulates endothelin-1 release via protein kinase C and cGMP in cultured endothelial cells. Am J Physiol, 1993, 264, H150-H156.
- 113. Kusaka H, Hirano A, Bornstein MB, Raine CS: Basal lamina formation by astrocytes in organotypic cultures of mouse spinal cord tissue. J Neoropathol Exp Neurol, 1985, 44, 295-303.
- 114. Lan Q, Mercurius KO, Davies PF: Stimulation of transcriptional factors NFB and AP1 in endothelial cells subjected to shear stress. Biochem Biophys Res Commun, 1994, 201, 950-956.
- 115. Lassman H, Zimpfrich F, Vass K, Hickey WF: Microglial cells are a component of the perivascular glial limitants. J Neurosci Res, 1991, 28, 236-243.
- 116. Leblond CP, Inoue S: Structure, composition, and assembly of basement membrane. 1989, 185, 367-390.
- 117. Levick JR, Smaje LH: An analysis of the permeability of a fenestra. Microvasc Res, 1987, 33, 233-256.
- 118. Laursen H, Hansen AJ, Sheardown M: Cerebrovascular permeability and brain edema after cortical photochemical infarcts in the rat. Acta Neuropathol, 1993, 86, 378-385.
- 119. Liesi P: Do neurons in the vertebrate CNS migrate on laminin? EMBO J, 1985a, 4, 1163-1170.
- 120. Linder E, Vaheri A, Ruoslahti E, Wartiovaara J: Distribution of fibroblast surface antigen in developing chick embryo. J Exp Med., 1975, 142, 41-49.

- 121. Mc Loon S.C., Mc Loon LK, Palm SL, Furcht LT: Transient expression of laminin in the optic nerve of the developing rat. J Neurosci, 1988, 8, 1981-1990.
- 122. Luscher TF, Tanner FC: Endothelial regulation of vascular tone and growth. Am J Hypertens, 1993, 6, 283S-293S.123. Łazarewicz JW., Pluta R, Salińska E, Puka M: Beneficial effect of
- 123. Łazarewicz JW., Pluta R, Salińska E, Puka M: Beneficial effect of nimodipine on metabolic and functional disturbances in rabbit hippocampus following complete cerebral ischemia. Stroke, 1989, 20, 70-77.
- 124. Maeda A, Sobel RA: Matrix metalloproteinases in the normal human central nervous system, microglial nodules, and multiple sclerosis lesions. J Neuropathol Exp Neurol, 1996, 55, 300-309.
- 125. Maione TE, Gray GS, Petro J, Hunt AJ, Donner AL., Bauer SI, Carson HF, Sharpe RJ: Inhibition of angiogenesis by recombinant human platelet factor-4 and related peptides. Science, 1990, 247, 77-79.
- 126. Malek AM, Izumo S: Molecular aspects of signal transduction of shear stress in the endothelial cell. J Hypertension, 1994, 12, 989-999.
- 127. Malik RA, Tesfaye S, Thompson SD, Veves A, Sharman AK, Boulton AJM, Ward ID: Endoneurial localization of microvascular damage in human diabetic neuropathy. Diabetologia, 1993, 36, 454-459.
- 128. Malis LI: Instrumentation and techniques in microsurgery. Clin Neurosurg, 1979, 26, 626-636.
- 129. Mangan M, Miller K, Nayee P: Processing of tumor necrosis factor-alpha precursor by metalloproteinases. Nature (London), 1994, 370, 555-557.
 130. Maragoudakis ME, Panoutsakopoulou M, Sarmonika M: Rate of basement
- Maragoudakis ME, Panoutsakopoulou M, Sarmonika M: Rate of basement membrane synthesis as an index of angiogenesis. Tissue Cell, 1988, 20, 531-539.
- 131. Maragoudakis ME, Sarmonika M, Panoutsakopoulou M: Inhibition of basement membrane biosynthesis prevents angiogenesis. J Pharmacol Exp Therap, 1988a, 244, 729-733.
- 132. Maragoudakis ME, Haralabopoulos GC, Tsopanoglou NE, Pipili-Synetos E: Validation of collagenous protein synthesis as an index for angiogenesis with the use of morphological methods. Microvasc Res, 1995, 50, 215-222.
 133. Martinez-Hernandez A, Amenta PS: The basement membrane in
- 133. Martinez-Hernandez A, Amenta PS: The basement membrane in pathology. Lab Invest, 1983, 48(6), 656-677.
- 134. Mato M, Ookawara S, Sakamoto A, Aikawa E, Ogawa T, Mitsuhashi U, Masusawa T, Suzuki H, Honda M, Yazaki Y, watanabe E, Luoma J, Yla-Herttuala S, Fraser I, Gordon S, Kodama T: Involvement of specific macrophage-lineage cells surrounding arterioles in barrier and scavenger funtion in brain cortex. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93, 3269-3274.
- 135. Matrisian LM: Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling. TIG, 1990, 6, 121-125.

9

- 136. Matrisian LM: The matrix-degrading metalloproteinases. BioEssays, 1992, 14(7), 455-463.
- 137. Mayhan WG, Heistad DD: Role of veins and cerebral venous pressure in disruption of the blood-brain barrier. Circ Res, 1986, 59, 216-220.
- 138. Mayhan Wg, Faraci FM, Heistad D: Disruption of the blood-brain barrier in cerebrum and brain stem during acute hypertension. Am J Physiol, 1986b, 251, H1171-H1175.
- 139. Maxwell WL, Duance VC, Letho M., Ashurst DE, Berry M: The distribution of types I, III, IV collagens in penetrant lesions of the central nervous system of the rat. Histochem J, 1984, 16, 1219-1229.
- 140. Minakawa T, Bready J, Berliner J, Fisher M, Cancilla PA: In vitro interaction of astrocytes and pericytes with capillary-like structures of brain microvessel endothelium. Lab Invest, 1991, 65(1), 32-40.
- 141. Montesano R, Kumar S, Orci L, Pepper MS: Synergistic effect of hyaluronan oligosaccharides and vascular endothelial growth factor on angiogenesis in vitro. Lab Invest, 1996, 75, 249-262.
- 142. Morita T, Kurihara HI, Maemura K, Yoshizumi M, Yazaki Y: Disruption of cytoskeletal structures mediates shear stress-induced endothelin-1 gene expression in cultured porcine aortic endothelial cells. J Clin Invest, 1993, 92, 1706-1712.
- 143. Moscatelli D, Rifkin DB: Membrane and matrix localization of proteinases: A common theme in tumor cell invasion and angiogenesis. Biochem Biophys Acta, 1988, 948. 67-85.
- 144. Mossakowski MJ, Hilgier W, Januszewski S: Ocena zmian morfologicznych w ośrodkowym układzie nerwowym w doświadczalnym zespole poreanimacyjnym. Doniesienie wstępne. Neuropat Pol, 1986, 24, 471-489.
- 145. Muzylak M: Neurotoksyczne działanie winkrystyny na mózg królika. Badania ultrstrukturalne. Rozprawa doktorska, 1997.
- 146. Nabel EG: Biology of the impaired endothelium. Am J Cardiol, 1991, 68, 6C-8C.
- 147. Nagai T, Yamakawa N, Aota S, Yamada SS, Akiyama SK, Olden K, Yamada KM: Monoclonal antibody characterization of two distinct sites fequired for function of the central cell-binding domain of fibronectin in cell adhesion, cell migration, and matrix assembly. J Cell Biol, 1991, 114(6), 1295-1305.
- 148. Nagel T, Resnick N, Atkinson WJ, Forbes Dewey C, Gimbrone MA: Shear stress selectively upregulates intercellular adhesion molecule-1 expression in cultured human vascular endothelial cells. J Clin Invest, 1994, 94, 885-891.
- 149. Nazzaro JM, Shults WT, Neuwelt EA: Neuro-ophtalmological function of patients with pineal region tumors approached transtentorially in the semisitting position. J Neurosurg, 1992, 76, 746-751.

- 150. Nehls V, Denzer K, Drenckhahn D: Pericyte involvement in capillary sprouting during angiogenesis in situ. Cell Tissue Res, 1992, 270, 469-474.
- 151. Olsson Y, Crowell RM, Klatzo I: The blood-brain barrier to protein tracers in focal cerebral ischemia and infarction caused by occlusion of the middle cerebral artery. Acta Neuropathol (Berl), 1971, 18, 89-102.
- 152. Opdenakker G, Van Damme J: Cytokines and proteases in invasive processes: Molecular similarities between inflammation and cancer. Cytokine, 1992, 4, 251-258.
- 153. Packham MA, Mustard JF: Platelet adhesion. Hemostasis Thromb, 1984, 7, 221-288.
- 154. Paetau A, Mellstrom K, Vaheri K, Haltia M: Distribution of a major tissue protein fibronectin in normal and neoplastic human nervous tissue. Acta Neuropathol (Berl), 1980, 51, 47-51.
- 155. Peters A, Palay S, De Webster H: The fine structure of the Nervous System: Neurons and Supporting Cells. W. B. Saunders Company, Philadelphia, 1976, 248-254.
- 156. Petito CK: Early and late mechanisms of increased vascular permeability following experimental cerebral infarction. J Neuropathol Exp Neurol, 1979 a, 38, 222-234.
- 157. Petito CK, Pulsinelli WA, Jacobson G, Plum F: Edema and vascular permeability in cerebral ischemia: comparison between ischemic neuronal damage and infarction. J Neuropathol Exp Neurol, 1982, 41(4), 423-436.
- 158. Pierce GF, Mustoe TA, Altrock BW, Deuel TF, Thomason A: Role of platelet-derived growth factor in wound healing. J Cell Biochem, 1991, 45, 319-326.
- 159. Di Pietro LA, Polverini PJ: Angiogenic macrophages produce the angiogenic inhibitor thrombospondin 1. Am J Pathol, 1993, 143, 678-684.
- 160. Pluta R, AS Lossinsky, MJ Mossakowski, L Faso and HM Wisniewski: Reassessment of a new model of complete cerebral ischemia in rats. Method of induction of clinical death, pathophysiology and cerebrovascular pathology. Acta Neuropathol, 1991, 83, 1-11.
- 161. Pluta R, AS Lossinsky, HM Wisniewski and MJ Mossakowski: Early blood-brain barrier changes in rat following transient complete cerebral ischemia induced by cardiac arrest. Brain Res, 1994, 633, 41-52.
- 162. Pluta R, Lossinsky AS, Walski M., Wisniewski HM, Mossakowski MJ: Platelet occlusion phenomenon after short-and long-term survival following complete cerebral ischemia in rats produced by cardiac arrest. J Brain Res, 1994, 35(4), 463-471.
- 163. Polverini PJ: Cellular adhesion molecules. Newly identified mediators of angiogenesis. Am J Pathol, 1996, 148, 1023-1029.
- 164. Pooler JP, Valenzeno DP: Dye-sensitized photodynamic inactivation of cells. Med. Phys, 1981, 8, 614-628.

- 165. Povlishock JT, Rosenblum WI, Sholley MM, Wei EP: An ultrastructural analysis of endothelial change paralleling platelet aggregation in a light/dye model of microvascular insult. Am J Pathol, 1983, 110, 148-160.
- 166. Price J, Hynes RO: Astrocytes in culture synthetize and secrete a variant form of fibronectin. J Neurosci, 1985, 5, 2205-2211.
- 167. Psheva P, Juliano RL, Schachner M: Expression and localization of the fibronectin receptor in the mouse nervous system. J Neurosci Res, 1988, 20, 420-430.
- 168. Pulsinelli WA, Brierley JB: A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat. Stroke, 1979, 10(3), 267-272.
- 169. Raichle ME: The pathophysiology of brain ischemia. Ann Neurol, 1983, 13, 2-10.
- 170. O'Reilly MA, Holmgren L, Shing Y, Chen C, Rosenthal RA, Moses M, Lane WS, Cao Y, Sage EH, Folkman J: Angiostatin: A novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. Cell, 1994, 79, 315-328.
- 171. Resnick N, Gimbrone MA: Hemodynamic forces are complex regulators of endothelial gene expression. FASEB J, 1995, 9, 874-882.
- 172. Rhodin JAG, Fujita H: Capillary growth in the mesentary of normal yoyng rats. Intrarital video and electron microscope analyses. J Submicrosc Cytol Pathol, 1989, 21, 1-34.
- 173. Rhoton AL: Instruments for removal of acoustic neuromas. Surg Neurol, 1976, 6, 291-302.
- 174. Rivera-Pomar JM: Die ultrastruktur der Kapillaren in der Area postrema der Katze. Z Zellforsch, 1966, 75, 542-554.
- 175. Robert V, Besse S, Sabri A, Silvestre JS, Assayag P, Thiem N, Swynghedauw B, Delcayre C: Differential regulation of matrix matalloproteinases associated with aging and hypertension in the rat heart. Lab invest, 1997, 76, 729-738.
- 176. Rogers SL, Edson KJ, Letourneau PC, Mc Loon S.C.: Distribution of laminin in the developing peripheral nervous system of the chick. Dev Biol, 1986, 113, 429-435.
- 177. Rosenberg GA, Kornfeld M., Estrada E, Kelley RO, Liotta LA, Stetler-Stevenson WG: TIMP-2 reduces proteolytic opening of blood-brain barrier by type IV collagenase. Brain Res, 1992, 576, 203-207.
- 178. Rosenberg GA, Navratil M, Barone F, Feuerstein G: Proteolytic cascade enzymes increase in focal cerebral ischemia in rat. J Cereb Blood Flow and Metab, 1996, 16, 360-366.
- 179. Rosenberg GA, Estrada EY, Dencoff IE: Matrix metalloproteinases and TIMPs are associated with blood-brain barrier opening after reperfusion in rat brain. Stroke, 1998, 29(10), 2189-2195.
- 180. Rosenorn J, Diemer NH: The risk of cerebral damage during graded brain retractor pressure in the rat. J Neurosurg, 1985, 60, 608-611.

- 181. Rosenorn J, Diemer NH: The influence of inttermittent vs. Continuous brain retraction pressure on regional cerebral blood flow and neuropathology in the rat. Acta Neurochir, (Wien) 1988, 93, 13-17.
- 182. Rosenorn J: The risk of ischemic brain damage during the use of selfretaining brain retractors. Acta Neurol Scand, 1989, 79 (Suppl 120), 1-30.
- 183. Salahuddin TS, Kalimo H, Johansson BB, Olsson Y: Observations on exudation of fibronectin, fibrinogen and albumin in the brain after carotid infusion by hyperosmolar solutions. Acta Neuropathol, 1988, 76, 1-10.
- 184. Sanes JR: Roles of extracellular matrix in neural development. Annu Rev Physiol, 1983, 45, 581-600.
- 185. Sato H, Seiki M: Regulatory mechanism of 92 kDa type IV collagenase gene expression which is associated with invasiveness of tumor cells. Oncogene, 1993, 8, 395-405.
- 186. Sawicki G Salas E, Murat J, Miszta-Lane H, Radomski MW: Release of gelatinase during platelet activation mediates aggregation. Nature (London), 1997, 386, 616-619.
- 187. Schlingemann RO, Rietveld FJR, De Waal RMW, Ferrone S, Ruiter DJ: Expression of the high molecular weight melanoma-associated antigen by pericytes during angiogenesis in tumours and in healing wounds. Am J Pathol, 1990, 136, 1393-1405.
- 188. Seilhean D, Kobayashi K, He Y, Uchihra T, Rosenblum O, Katlama C, Bricaire F, Duyckaerts C, Hauw JJ: Tumor necrosis factor-alpha, microglia and astrocytes in AIDS dementia complex. Acta Neuropathol, 1997, 93, 508-517.
- 189. Sekhar LN, Nanda A, Sen CN, Snyderman CN, Janecka IP: The extended frontal approach to tumors of the anterior, middlle, and posterior skull base. J Neurosurg, 1992, 76, 198-206.
- 190. Sen S, Goldman H, Morehead M, Murphy S, Phillis JW.: Alpha-phenyltert-butyl-nitrone inhibits free radical release in brain concussion. Free Rad Biol Med., 1994, 16, 685-691.
- 191. Shepro D, Morel N: Pericyte physiology. FASEB J, 1993, 7, 1031-1038.
- 192. Sholley MM, Ferguson GP, Seibel HL, Montour JL, Wilson JD: Mechanisms of neovascularization: vascular sprouting can occur without proliferation of endothelial cells. Lab Invest, 1984, 51(6), 624-628.
- 193. Siesjo BK, Bengtsson F: Calcium fluxes, calcium antagonists, and calciumrelated pathology in brain ischemia, hypoglycemia, and spreading depression: a unifying hypothesis. J Cereb Blood Flow Metab, 1989, 9, 127-140.
- 194. Silver R, Silverman A.J, Vitković L, Lederhendler I. I: Mast cells in the brain: evidence and functional significance. Trends neurosci. 1996, 19, 25-31.
- 195. Simionescu M., Simionescu M. (eds). Endothelial Cell Biology in Health and Disease. 1st ed. New York: Plenum Press, 1988.

- 196. Sims DE: Resent advances in pericyte biology-implications for health and diseases. Can J Cardiol, 1991, 7, 431-443.
- 197. Sobel RA, Schneeberger EE, Colvin RB: The immunopathology of acute experimental allergic encephalomyelitis. A light microscopic and ultrastructural immunohistochemical analysis of fibronectin and fibrinogen. Am J Pathol, 1988, 131, 547-558.
- 198. Sokrab T-EO, Muntzing K, Fredriksson K, Johansson BB, Kalimo H: Immunohistochemical demonstration of extravasated endogenous plasma proteins in studies of blood-brain barrier disturbances. In: Sokrab T-EO (ed), Neoronal damage in acute experimental hypertension and epileptic seizures. Long-term consequences of blood-brain barrier dysfunction. Doctoral dissertation, University of Lund, Sweden, 1989, pp 1-34.
- 199. Sreenath T, Matresian LM, Stetler-Stevenson WG, Ganoni-Celli S, Pozatti RO: Expression of matrix metalloproteinase genes in transformed rat cell lines of high and low metastatic potential. Cancer Res, 1992, 52, 4942-4947.
- 200. Streit WJ, Graeber MB, Kreutzberg GW: Expression of Ia antigen on perivascular and microglial cells after sublethal and lethal motor neuron injury. Exp Neurol, 1989, 105, 115-126.
- 201. Sugita K, Kobayashi S, Mutsuga N: Microsurgery for acoustic neurinomalateral position and preservation of facial and cochlear nerves. Neurol Med Chir (Tokyo), 1979, 19, 637-641.
- 202. Sundberg C, Ivarsson M, Gerdin B, Rubin K: Pericytes as collagen producing cells in excessive dermal scarring. Lab Invest, 1996, 74, 452-466.
- 203. Suzuki M., Choi BH: The behaviour of the extracellular matrix and the basal lamina during the repair of cryogenic injury in the adult rat cerebral cortex. Acta Neuropathol, 1990, 80, 355-361.
- 204. Tsopanoglou NE, Pipili-Synetos E, Maragoudakis ME: Thrombin promotes angiogenesis by a mechanism independent of fibrin formation. Am J Physiol, 1993, 264 (Cell Physiol 33), C1302-C1307.
- 205. Tsopanoglou NE, Pipili-Synetos E, Maragoudakis ME: Protein kinase C involvement in the regulation of angiogenesis. J Vasc Res, 1993, 30, 202-208.
- 206. Vaheri A, Ruoslahti E, Linder E, Wartiovaara J, Keski-Oja J, Kuusela P, Saksela O: Fibroblast surface antigen (SF): molecular properties, distribution in vitro and in vivo, and altered expression in transformed cells. J Supramol Struct, 1976b, 4, 63-70.
- 207. Vane JR, Anggard EE, Botting RM: Regulatory functions of the vascular endothelium. N Engl J Med., 1990, 323, 27-36.
- 208. Vartio T, Laitinen L, Narvanen O, Cutolo M, Thornell L: differential expression of the ED sequence-containing form of cellular fibronectin in embryonic and adult human tissues. J Cell Sci, 1987, 88, 419-430.

- 209. Vracko R, Benditt EP: Capillary basal lamina thickening. Its realationship to endothelial cell death and replacement. J Cell Biol, 1970, 47, 281-285.
- 210. Wartiovaara J, Stenman S, Vaheri A: Changes in expression of fibroblast surface antigen (SFA) during cytodifferentiation and heterokaryon formation. Differentiation, 1979, 5, 85-89.
- 211. Wartiovaara J, Vaheri A: Fibronectin and early mammalian embryogenesis. Dev Mamm, 1980, 4, 233-266.
- 212. Watson BD, Dietrich WD, Busto R, Ginsberg MD: Photochemically induced thrombotic stroke in rat brain. Ann Neurol, 1983, 14, 126.
- 213. Watson BD, Dietrich WD, Busto R, Wachtel MS, Ginsbeg MD: Induction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis. Ann Neurol, 1985, 17, 497-504.
- 214. Watson BD, Prado R, Dietrich WD, Busto R, Scheinberg P., Ginsberg MD: Mitigation of evolving cortical infarction in rats by recombinant tissue plasminogen activator following photochemically induced thrombosis. In: Cerebrovascular Diseases-Fifteenth Research (Princeton) Conference, Raichle, Powers (eds), Raven Press, New York, 1987, 317-330.
- 215. Watson BD, Dietrich WD, Prado R, Green BA: Photochemically induced vascular thrombosis (photothrombosis). N.A.T.O. ASI Ser, 1988, H22, 507-524.
- 216. Watt F: The extracellular matrix and cell shape. TIBS, 1986, 1, 482-485.
- 217. Weber M: Basement membrane proteins. Kidney Int, 1992, 41, 620-628.
- 218. Wedmore CV, Williams TJ: Control of vascular permeability by polymorphonuclear leukocytes in inflammation. Nature, 1981, 289, 646-650.
- 219. Werb Z, Tremble P., Damsky CH: Regulation of extracellular matrix degradation by cell-extracellular matrix interactions. Cell Diff Dev, 1990, 32, 299-306.
- 220. Wester P, Brant D, Prado R, Dietrich D: A photothrombic ring model of rat stroke-in-evolution displaying putative penumbral inversion. Stroke, 1995, 26, 444-450.
- 221. Williams A, Van Dam AM, Ritchie D, Eikelenboom P, Fraser H: Immunocytochemical appearance of cytokines, prostaglandin E2 and lipocortin-1 in the CNS during the incubation period of murine scrapie correlates with progressive PrP accumulations. Brain Res, 1997, 754, 171-180.
- 222. Woessner JF: Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. FASEB J, 1991, 5, 2145-2153.
- 223. Wolfsberg TG, Straight PD, Gerena RL, Huovila AP, Primakoff P., Myles DG, White JM: ADAM, a widely distributed and developmentally regulated gene family encoding membrane proteins with disintegrin and metalloprotease domain. Dev Biol, 1995, 169, 378-383.

- 224. Yao H, Ibayashi S, Sugimori H, Fuji K, Fujishima M: Simplified model of krypton laser-induced thrombotic distal middle cerebral artery occlusion in spontaneously hypertensive rats. Stroke, 1996, 27(2), 333-336.
- 225. Yasargil MG, Fox JL: The microsurgical approach to acoustic neurinomas. Surg Neurol, 1974, 2, 393-398.
- 226. Ye S, Humphries S, Henney A: Matrix metalloproteinases: implication in vascular matrix remodelling during atherogenesis. Clin Sci, 1998, 94, 103-110.
- 227. Yokoh A, Sugita K, Kobayashi S: Clinical study of brain retraction in different approaches and diseases. Acta Neurochir (Wien), 1987, 87, 134-139.