



УКРАЇНСЬКИЙ МЕДИЧНИЙ АЛЬМАНАХ

3'2013
ДОДАТОК

НАУКОВО - ПРАКТИЧНИЙ ЖУРНАЛ

УКРАЇНСЬКИЙ МЕДИЧНИЙ АЛЬМАНАХ

Том 16, № 3 (додаток), 2013

ЗАСНОВАНИЙ У 1998 РОЦІ

Адреса редакції:

91045, м. Луганськ, кв. 50 років
Оборони Луганська, 1

Телефон/факс:

(0642) 53-20-36

rector@lsmu.lg.ua

Телефон:

(0642) 63-02-55

*Літературні редактори
і коректори:*

Т.В. Сівач
Д.А. Астраханцев

*Художній редактор
і комп'ютерний дизайн,
оригінал-макет:*

А.В. Єрьомін
Є.Ю. Шутов

Засновники:

Міністерство охорони здоров'я
України,
Луганський державний медичний
університет

Журнал зареєстрований
Міністерством інформації України
Свідоцтво про реєстрацію
КВ № 3006

Журнал зареєстрований
ВАК України:
"Бюлетень ВАК України"
№ 5, 2009 р.

Рекомендовано до друку Вченою
радою Луганського державного
медичного університету (протокол
№ 04 від 04.04.2013 р.)

Підписано до друку 05.04.2013 р.
Формат 60x84,8. Папір офсетний.
Наклад 350 прим.
Видавництво ЛДМУ
м. Луганськ

Підписний індекс 06487

Головний редактор:

В.К. Івченко (Луганськ)

Редакційна колегія:

А.А. Бабанін (Сімферополь), І.Р. Баріляк (Київ), Ю.М. Вовк (Луганськ), Ю.М. Вороненко (Київ), В.Т. Германов (Луганськ), О.П. Гудзенко (Луганськ), Н.К. Казимірко (Луганськ), С.А. Кащенко (Луганськ), Л.Я. Ковальчук (Тернопіль), В.Г. Ковешніков (Луганськ), А. Książek (Люблін, Польща), В.М. Мороз (Вінниця), О.А. Орлова (Луганськ), В.П. Пішак (Чернівці), Ю.Г. Пустовий (Луганськ), Л.В. Савченкова (Луганськ), В.П. Черних (Харків), В.О. Шаповалова (Харків), Є.Ю. Шутов (Луганськ) – відповідальний секретар

Редакційна рада:

Ю.Г.Бурмак (Луганськ), І.Б. Єршова (Луганськ), Л.М. Іванова (Луганськ), С.Є. Казакова (Луганськ), Ю.М. Колчін (Луганськ), І.О. Комаревцева (Луганськ), І.В. Лоскутова (Луганськ), В.Д. Лук'янчук (Луганськ), Т.В. Мироненко (Луганськ), М.П. Павловський (Львів), А.М. Петруня (Луганськ), Л.Л. Пінський (Луганськ), М.С. Пономаренко (Київ), В.Г. Радіонов (Луганськ), О.С. Решетнікова (Луганськ), Л.Д. Савенко (Луганськ), В.В. Сімрок (Луганськ), Т.П.Тананакіна (Луганськ), С.О. Тихонова (Харків), В.М. Толочко (Харків), З.М. Третьякевич (Луганськ), С.А. Усатов (Луганськ), В.В. Шаповалов (Харків), В.М. Шимон (Ужгород), Л.О. Шкондін (Луганськ).



Журнал є фаховим виданням для публікації основних
результатів дисертаційних робіт у галузі медичних наук
(Постанова Президії ВАК України від 27 травня 2009 р. № 1-05/2) і
фармацевтичних наук (Постанова президії ВАК України від 10
лютого 2010 р. №1-05/1)

УДК: 618.8-091.943-001.8-092.9

© Кихтенко Е.В., Губина-Вакулик Г.И., Дмитренко А.П., 2013

ПАТОМОРФОЛОГИЯ АСТРОЦИТОВ ПРИ ПЕРИНАТАЛЬНОМ ГИПОКСИЧЕСКОМ ПОВРЕЖДАЮЩЕМ ВОЗДЕЙСТВИИ (экспериментальное исследование)

Кихтенко Е.В., Губина-Вакулик Г.И., Дмитренко А.П.

Харьковский национальный медицинский университет

Современные исследователи нервной системы большое внимание уделяют изучению нейроглии, ее функции в норме и при различных патологических состояниях. Доказано, что нейроглия, помимо опорной функции, играет значительную роль в энергообеспечении нейронов [1, 2], а также принимает участие в формировании таких высших нервных функций, как память и обучаемость [4]. Вероятно нарушение высших нервных функций при различных патологических состояниях зачастую обусловлено не только патологией нейронов, но и патологическими изменениями в глиальном аппарате.

Весь клон глиальных клеток делится на три класса: астроглиоциты, олигодендроциты и микроглиоциты (клетки Ортега). По существующим представлениям последние происходят из клеток крови, вероятнее всего, из моноцитов [6]. Астроглия и олигодендроциты (так называемая макроглия) имеют нейроэктодермальное происхождение, т.е. как и нейроны происходят из нервной трубки [6], что, по-видимому, и обуславливает их достаточно высокую чувствительность к гипоксии [7]. В процессе эмбриогенеза источником нейроглии является так называемая зона глиального паравентрикулярного герминативного матрикса (ЗГПВМ), расположенная вблизи стенок боковых желудочков. Еще эту зону называют субэпендимарным слоем [6]. На ранних этапах эмбриогенеза зона глиального паравентрикулярного матрикса (ЗГПВМ) представлена спонгиобластами, которые в последующем дифференцируются в астробласты и олигодендроциты, а последние – в астроциты и олигодендроциты [6]. Сведения о влиянии перинатальной гипоксии на становление и дифференцировку макроглии (астроцитов и олигодендроцитов) скудны и не систематизированы.

Целью данного исследования явилось изучение закономерностей повреждающего воздействия различных типов перинатальной гипоксии на макроглию мозга, имея в виду их присутствие в гематоэнцефалическом барьере (ГЭБ).

Материал и методы: Экспериментальное исследование проведено на крысках трех групп: 1 – крыска самки с физиологически протекающей беременностью, подвергшиеся острой постнатальной асфиксии (группа ОПНА – 12 наблюдений); 2 – крыска самки с артериальной гипертензией, выношенные в условиях хронической внутриутробной гипоксии (ХВУТ), подвергшиеся острой постнатальной асфиксии (группа ХВУТ+ОПНА – 9 наблюдений); 3 – крыска контрольной группы (группа К – 7 наблюдений).

Для моделирования хронической внутриутробной гипоксии из контингента крыс популяции «черный капюшон» путем ежедневного измерения уровня артериального давления на центральной хвостовой артерии отобрали 15 самок в возрасте 4-5 месяцев со стабильно повышенным давлением. 5 животных выведено из эксперимента и при патоморфологическом исследовании их внутренних органов в головном мозге, сердце и почках обнаружены изменения, характерные для артериальной гипертензии (гиалиноз мелких артерий, гиперплазия мышечного слоя артерий мышечного типа, эластофиброз артерий мышечно-эластического типа, мелкоочаговый кардиосклероз, склероз и гиалиноз гломерул и т.д.). Таким образом в исследовании использована модель ХВУТ материнского генеза.

У 10 самок того же возраста повышения артериального давления при динамическом мониторинге не обнаружено. Потомки этих крыс составили контрольную группу и группу ОПНА.

Для моделирования острой постнатальной асфиксии крыска группы ОПНА и ХВУТ+ОПНА сразу после рождения подвергались воздействию «высокогорной» гипоксии в течение 15 мин. Для этого крыска помещались в специальную герметичную камеру, из которой выкачивался воздух, и создавались условия резкого уменьшения атмосферного давления (аналогично 7 000 м над уровнем моря).

Для выяснения динамики морфологических изменений в исследуемых клетках макроглии ряда крыска всех групп выводились из эксперимента в следующие сроки: 1 – в течении первых суток после рождения; 2 – на 14-е сутки жизни; 3 – на 35-е сутки постнатального онтогенеза.

После выведения животных из эксперимента для морфологического исследования брался участок головного мозга, а именно правая и левая зоны глиального паравентрикулярного матрикса (ЗГПВМ), расположенные латеральнее 3-го желудочка, где во внутриутробном и раннем постнатальном периодах проходят процессы дифференцировки глиоцитов.

Для морфометрической характеристики субэпендимарного слоя помощью программ Olympus DP-Soft и Microsoft-Exel на микроскопе Olympus BX-41 подсчитывали его толщину, плотность расположения клеточных элементов в нем. Что бы судить о степени миграции глиоцитов из субэпендимарного слоя определяли плотность расположения клеток латеральнее ЗГПВМ.

Для иммунологической верификации астроцитов использовали антитела к глиальному фибриллярному белку – GFAP (клон GA-5, LabVision). Визуализация осуществлялась пероксидазным методом.

Результаты исследования. Субэпендимарный слой у животных всех исследуемых групп определялся только в первые сутки жизни. У крыска более старшего возраста он не выявлялся, что свидетельствует о завершении процессов дифференцировки в нем. Вследствие этого морфометрические исследования проводили только у животных, выведенных из эксперимента в первые сутки постнатального онтогенеза. Морфометрические показатели ЗГПВМ крыска различных групп, представлены в таблице.

Животные контрольной группы. ЗГПВМ у

животных данной группы представлена узкой полосой. Определены толщина субэпендимарного слоя, плотность расположения клеточных элементов в нем самом и латеральнее (табл.).

При проведении иммуногистохимического исследования с использованием антител к основному маркеру астроцитов – глиальному фибриллярному

кислоту протенину (GFAP) обнаружено, что астроциты в этой зоне во все сроки экспериментального исследования расположены равномерно, из их отростков сформирована нежная плотная сеть. Отростки астроглиоцитов длинные, тонкие, с четкими контурами, на всем протяжении имеют одинаковую степень интенсивности окрашивания.

Таблица. Морфометрическая характеристика субэпендимарного слоя крысят различных исследуемых групп

Исследуемый показатель	Группа	Толщина субэпендимарного слоя (в $\text{мх}10^{-6}$)	Плотность клеток в ЗГПВМ (количество на $15 \times 10^{-9} \text{ м}^2$)	Плотность клеток латеральнее ЗГПВМ (количество на $15 \times 10^{-9} \text{ м}^2$)
	К	76,33±3,52	117,32±4,12	20,33±1,13
	ОПнА	78,93±3,33	122,56±5,33	22,17±1,0
	ХВУГ+ОПнА	122,32±5,75*^	143,17±6,12*^	44,37±1,75*^

* - разница двух средних достоверна при сравнении с группой К;

^ - разница двух средних достоверна при сравнении группы ХВУГ+ОПнА с группой ОПнА.

Животные группы ОПнА. У крысят, которые были выведены из эксперимента в течении суток после рождения и воздействия постнатальной асфиксии, было проведено морфометрическое исследование зоны глиального паравентрикулярного матрикса (табл.). Следует отметить, что субэпендимарный слой у животных данной группы относительно неширокий, представлен в основном округлыми дифференцированными глиальными элементами. Толщина исследуемого слоя, плотность расположения клеток как в нем, так и латеральнее его достоверно не отличается от аналогичных показателей животных контрольной группы, хотя тенденция увеличения этих показателей имеет место.

У животных, выведенных из эксперимента на 14-е сутки после рождения, в ответ на воздействие постнатальной гипоксии в единичных астроцитах регистрируются признаки клазматодендроза (набухания и распада отростков). При иммуногистохимическом верифицировании некоторые астроцитарные клетки набухшие с признаками начинающегося плазморексиса. Отростки астроцитов укорочены, утолщены, с неровными ломанными контурами и неравномерным прокрашиванием по всей длине. Сеть из астроцитарных отростков неравномерная. В единичных олигодендроцитах обнаруживаются признаки кариопикноза с уплотнением хроматина и уменьшением размера ядер. Однако несмотря на признаки клеточной гибели глиоцитов, следует отметить, что в эти сроки процессы пролиферации и гиперплазии уже преобладают над процессами гибели. В жизнеспособных астроцитах и олигодендроцитах ядра резко эухромны, увеличены, что говорит о повышенном уровне их морфофункциональной активности, регистрируется феномен сателлитоза нейронов олигодендроцитами. К 35-м суткам эксперимента реакций со стороны макроглии не регистрируется. У некоторых животных выявляются микрофокусы глиоза, представленные единичными астроцитами и клетками Ортега.

Животные группы ХВУГ+ОПнА. У крысят, которые были выведены из эксперимента через сутки после рождения, зона глиального паравентрикулярного матрикса достоверно более широка, с высокой плотностью содержания клеточных элементов в ней и латеральнее (табл.).

В астроцитах в эти сроки регистрируются признаки клазматодендроза и набухания. Единичные олигодендроциты имеют уплотненные, сморщенные ядра, что говорит об их кариопикнозе. Кроме

этого выявляется очаговая пролиферация астроцитов, олигодендроцитов и микроглиоцитов, которая явно имеет внутриутробное происхождение.

К 14-м суткам в макроглиальных клетках продолжают обнаруживаться признаки гибели – клазматодендроз, набухание, пикноз. Наряду с этим со стороны астроцитов имеются признаки активной пролиферации, т.е. можно говорить о гиперплазии. Сохранные астроциты и олигодендроциты имеют светлые эухромные ядра, что говорит о высоком уровне морфофункциональной активности этих клеток. Олигодендроциты осуществляют сателлитоз нейронов.

К 35-м суткам эксперимента признаки гибели астроцитов и олигодендроцитов отсутствуют. В астроцитах хорошо заметны признаки очаговой пролиферации и гиперплазии. Полного восстановления мозгового кровотока к этому сроку еще не происходит, обнаруживаются немногочисленные очаги неонангиогенеза.

Обсуждение полученных результатов. Животные, выношенные в условиях физиологически протекающей беременности, рождаются с относительно нешироким субэпендимарным слоем, дифференцировка которого к 14-м суткам уже практически полностью завершается.

На 14-е сутки после перенесенной острой постнатальной гипоксии в части астроцитов регистрируются явления клазматодендроза [3, 5] и набухания, появляются признаки их активной пролиферации и гиперплазии. Т.е. кратковременная гипоксия поле рождения обусловила клеточную гибель части астроцитов, что сопровождается стимуляцией их пролиферации. Этот процесс продолжается в течение двух недель последующим затуханием. На 35-е сутки эксперимента признаки гибели макроглиоцитов практически полностью отсутствуют. Интенсивно идут процессы очаговой пролиферации астроглии и микроглии.

Животные, выношенные в условиях хронической внутриутробной гипоксии, рождаются с достоверно более широкой ЗГПВМ, с высокой плотностью расположения клеточных элементов как в самой зоне, так и латеральнее нее. Описанные изменения свидетельствуют о гиперплазии субэпендимарного слоя, пролиферации и повышенной миграции глиальных элементов из него в ответ на повреждающее воздействие гипоксии во внутриутробном периоде. В первые сутки в единичных астроцитах и олигодендроцитах выявляются признаки повреждения и гибели. На 14-й день экспе-

римента явлення гібели макрогліоцитів продовжують реєструватися, но також відзначаються ознаки очагової проліферації та гіперплазії астроцитів. Обнаружується феномен сателітоза нейронів. На 35-е сутки експериментального дослідження процеси регенерації ще продовжуються.

Попоставляючи результати гистологічного, морфометричного та іммуногістохімічного досліджень, можна утверджувати, що при гострій постнатальній гіпоксії гине частина зрілих гліоцитів, що беруть участь у формуванні ГЭБ, але проліферація камбіальних елементів з подальшою диференцировкою та міграцією в біле речовина дозволяє швидко відновити гліальний компонент бар'єра. У крыс цей період має тривалість близько 2-х тижнів.

При хронічній внутрішньоматричної гіпоксії підвищена гібель макрогліоцитів в антенатальному періоді призводить до гіперплазії ЗППВМ. При поєднанні постнатальної та внутрішньоматричної гіпоксії ознаки «гострого» пошкодження наслідуються на вже існуючі деструктивні та репаративні процеси внутрішньоматричного генезу, що утяжеляє перебіг гострого періоду гіпоксично-ішемічної енцефалопатії та уповільнює настання періоду відновлення. Повної репарації не відбувається до 35-ти сутки експерименту. Виходячи з розуміння важливості ролі астроцитів в

нормальному функціонуванні ГЭБ можна утверджувати, що у тварин даної групи ГЭБ залишається нестійким на більш тривалий проміжок часу.

Проецируючи результати даного дослідження на людську популяцію, неонатологам та педиатрам при призначенні лікарських препаратів необхідно мати на увазі факт «нестійкості» ГЭБ у новонароджених з перинатальною гіпоксично-ішемічною енцефалопатією (навіть при легкій та помірною гіпоксичною дією) на ранніх етапах постнатального онтогенезу. Також слід враховувати, що період тривалості вказаної «нестійкості» при різних формах гіпоксичного впливу різний.

Висновки та перспективи подальших досліджень. В експерименті на крысах показано, що тимчасова гіпоксія після народження впливає на «растянуті» в час гібель та відновлення клітинної популяції астроцитів. Хронічна внутрішньоматрична гіпоксія супроводжується розвитком внутрішньоматричної гіперплазії зони гліального паравентрикулярного матриксу, а наявність ще й гострої постнатальної гіпоксії веде до збільшення тривалості періоду гібель та проліферації астроцитів і, відповідно, збільшенню тривалості періоду нестійкості гемато-енцефалічного бар'єра.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Дзяк Л.А. Сучасні принципи консервативного лікування набряку головного мозку та внутрішньочерепної гіпертензії / Л.А. Дзяк, А.Г. Сірко, В.М. Сук // Міжнародний неврологічний журнал. – 2009. – №6(28). – С. 81-87.
 2. Личко В.С. Гематоенцефалічний бар'єр та сучасні можливості управління ним в експерименті / В.С. Личко, В.О. Малахов // Український неврологічний журнал. – 2012. – №4. – С. 33-38.
 3. Марченко В.С. Функціональна архітектура гематоенцефалічного бар'єру в центральних механізмах терморегуляції та гіпотермії / В.С. Марченко // Науковий вісник НАУ. – 2008. – Т.126. – С. 88-97.
 4. Отдельные показатели функционального состояния эндотелия у новорожденных в критическом состоянии / Н. В. Харламова, Т. В. Чаша, Г. Н. Кузьменко [и др.] // Сибирский медицинский журнал. – 2011. – №3. – С.80-83.
 5. Постренимационные энцефалопатии: особенности морфогенеза и патологоанатомической диагностики / [В.А. Туманский, В.А. Визир, С.И. Тертишный [и др.]; под ред. В.А. Туманского. – Запорожье, 1994. – 44 с.
 6. Хэм А. Гистология в пяти томах / А. Хэм, Д. Кормак – Том 3. – М.: Мир, 1983. – 237 с.
 7. Шабалов Н.П. Педиатрия / Н.П. Шабалов – СПб.: СпецЛит, 2002. – 895 с.
- Кіхтенко О.В., Губіна-Вакулік Г.І., Дмитренко О.П.** Патоморфологія астроцитів при перинатальному гіпоксичному пошкодженню впливу (експериментальне дослідження) // Український медичний альманах. – 2013. – Том 16, №3 (додаток). – С. 94-96.
- При хронічній внутрішньоматричній гіпоксії загибель макрогліоцитів в антенатальному періоді призводить до гіперплазії субпендлярного шару. При сумісному впливі гострої постнатальної та хронічної внутрішньоматричної гіпоксії ознаки гостро пошкодження комбінуються з деструктивними та репаративними процесами, які мають внутрішньоматричний генез. Це призводить до більш тяжкої течії гострого періоду гіпоксично-ішемічної енцефалопатії та уповільнює період відновлення. Таким чином гемато-енцефалічний бар'єр залишається неспроможним більш тривалий відрізок часу.
- Ключові слова:** перинатальна гіпоксія, гемато-енцефалічний бар'єр, астроцити, новонароджений.
- Кіхтенко Е.В., Губина-Вакулік Г.И., Дмитренко А.П.** Патоморфология астроцитов при перинатальном гипоксическом повреждающем воздействии (экспериментальное исследование) // Украинский медицинский альманах. – 2013. – Том 16, №3 (додаток). – С. 94-96.
- При хронічній внутрішньоматричній гіпоксії підвищена гібель макрогліоцитів в антенатальному періоді призводить до гіперплазії субпендлярного шару. При поєднанні постнатальної та внутрішньоматричної гіпоксії ознаки «гострого» пошкодження наслідуються на вже існуючі деструктивні та репаративні процеси внутрішньоматричного генезу, що утяжеляє перебіг гострого періоду гіпоксично-ішемічної енцефалопатії та уповільнює настання періоду відновлення. Таким чином гемато-енцефалічний бар'єр залишається нестійким на більш тривалий проміжок часу.
- Ключевые слова:** перинатальная гипоксия, гемато-энцефалический барьер, астроциты, новорожденный.
- Kihtenko E.V., Gubina-Vakulik G.I., Dmitrenko A.P.** Astrocyte pathology under perinatal hypoxic damaging influence (experimental investigation) // Украинский медицинский альманах. – 2013. – Том 16, №3 (додаток). – С. 94-96.
- At chronic intrauterine hypoxia increased microglial cell death in the antenatal period results in hyperplasia of subependymal layer. At combination of postnatal and intrauterine hypoxia the signs of acute damage merge with the present destructive processes on the intrauterine origin, which exacerbates the course of acute period of hypoxic-ischemic encephalopathy and decelerates restoration period onset. Complete repairation does not occur by day 35 of the experiment. Thus, in the animals of this group BBB is incompetent for a longer period.
- Key words:** perinatal hypoxia, blood-brain barrier, astrocytes, newborn.