

ПАТОМОРФОЛОГИЯ ОСОБЕННОСТЕЙ РАЗВИТИЯ МАКРОГЛИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА ПЛОДА И НОВОРОЖДЕННОГО ПРИ ПОВРЕЖДАЮЩЕМ ВОЗДЕЙСТВИИ ХРОНИЧЕСКОЙ ВНУТРИУТРОБНОЙ ГИПОКСИИ В ПЕРИНАТАЛЬНОМ ПЕРИОДЕ (ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

Губина-Вакулик Галина Ивановна

*д-р мед. наук, проф. кафедры патологической анатомии
Харьковского национального медицинского университета
61022, Украина, г. Харьков, пр. Науки, 4*

Омельченко Ольга Анатольевна

*канд. мед. наук, доц. кафедры патологической анатомии
Харьковского национального медицинского университета
61022, Украина, г. Харьков, пр. Науки, 4*

Кихтенко Елена Валерьевна

*канд. мед. наук, доц. кафедры патологической анатомии
Харьковского национального медицинского университета
61022, Украина, г. Харьков, пр. Науки, 4*

Сидоренко Руслан Валерьянович

*канд. мед. наук, ассистент кафедры патологической анатомии
Харьковского национального медицинского университета
61022, Украина, г. Харьков, пр. Науки, 4*

Андреев Андрей Валентинович

*канд. мед. наук, ассистент кафедры патологической анатомии
Харьковского национального медицинского университета
61022, Украина, г. Харьков, пр. Науки, 4
E-mail: natand@ukr.net*

PATHOMORPHOLOGY OF DEVELOPMENT PECULIARITIES OF BRAIN MACROGLIA OF THE UNBORN CHILD AND THE NEWBORN UNDER NOCI-INFLUENCE OF CHRONIC PRENATAL HYPOXIA IN THE PERINATAL PERIOD (THE EXPERIMENTAL RESEARCH)

Galina Gubina-Vakulik

*doctor of medical science, professor of Pathoanatomy Chair, Kharkiv National Medical University
61022, Ukraine, Kharkov, Science, 4*

Olga Omelchenko

*candidate of medical science, associate professor of Pathoanatomy Chair, Kharkiv National Medical University
61022, Ukraine, Kharkov, Science, 4*

Elena Kikhtenko

*candidate of medical science, associate professor of Pathoanatomy Chair, Kharkiv National Medical University
61022, Ukraine, Kharkov, Science, 4*

Ruslan Sidorenko

*candidate of medical science, assistant of Pathoanatomy Chair, Kharkiv National Medical University
61022, Ukraine, Kharkov, Science, 4*

Andrey Andreev

*candidate of medical science, assistant of Pathoanatomy Chair, Kharkiv National Medical University
61022, Ukraine, Kharkov, Science, 4*

АННОТАЦИЯ

Представленное в данной статье проведенное исследование на экспериментальном материале с использованием иммуногистохимических маркеров апоптоза и пролиферации доказывает замедление темпов эмбрионального развития такого компонента гематоэнцефалического барьера, как макроглия при воздействии тяжелой хронической внутриутробной гипоксии.

ABSTRACT

The carried out research based on the experimental material using immunohistochemical markers of apoptosis and proliferation proves the slowdown of the embryonic development of such a component of the hematoencephalic barrier as macroglia under the influence of severe chronic prenatal hypoxia.

Ключевые слова: перинатальный период; хроническая внутриутробная гипоксия; макроглия; апоптоз; пролиферация.

Keywords: perinatal period; chronic prenatal hypoxia; macroglia; apoptosis; proliferation.

Проблема перинатального поражения центральной нервной системы (ЦНС) занимает одно из первых мест среди проблем современной неонатологии и педиатрии. Среди причин инвалидности в детском возрасте именно поражения головного мозга составляют около 50 %, при этом в 70–80 % поражения возникают в перинатальном периоде онтогенеза [5].

Гипоксическое повреждение является в свою очередь наиболее частой причиной всех перинатальных поражений ЦНС. По данным литературы, на его долю приходится порядка 47 % от всех перинатальных поражений. При этом в 27 % случаев как повреждающий фактор выступает хроническая внутриутробная гипоксия (ХВУГ) [9].

Различные последствия гипоксического повреждения ЦНС занимают ведущее место в структуре заболеваемости и смертности в раннем неонатальном периоде у детей [2; 6]. Необходимо отметить, что гипоксические перинатальные поражения ЦНС имеют неблагоприятные последствия не только в периоде новорожденности, но и влияют на состояние здоровья детского организма в дальнейшем онтогенезе [1; 8].

Своевременная диагностика и адекватная терапия в раннем неонатальном периоде данных поражений ЦНС значительно уменьшает впоследствии как риск возникновения стойкого неврологического дефицита, так и степень его тяжести.

Сведения о морфологических особенностях повреждающего воздействия ХВУГ на такие компоненты гематоэнцефалического барьера, как астроциты в доступной отечественной и зарубежной литературе скудны и не систематизированы.

Целью настоящего исследования явилось изучение патологоанатомических особенностей повреждающего воздействия ХВУГ на астроциты головного мозга.

Материал и методы исследования

Экспериментальное исследование проведено на крысятах двух групп: 1 – крысята, выношенные в условиях ХВУГ; 2 – крысята контрольной группы (группа К) – интактные.

Экспериментальная хроническая внутриутробная гипоксия у крысят моделировалась следующим образом. Из контингента крыс популяции «черный капюшон» вивария Харьковского национального медицинского университета в течение 2-х недель путем ежедневного измерения уровня артериального давления на центральной хвостовой артерии отобрали 15

самок в возрасте 4–5 месяцев со стабильно повышенным давлением. Именно потомство данных самок и составило группу животных, выношенных в условиях хронической внутриутробной гипоксии. Крысята выводились из эксперимента в течение суток после рождения.

При содержании экспериментальных животных, а также при выводе их из эксперимента соблюдались международные нормы GLP, а также правила Европейской конвенции по защите животных (18 марта, 1986 г.).

Для морфологического исследования во всех случаях брались кусочки головного мозга в перивентрикулярной зоне, а именно субэпендимарный слой боковых желудочков, где расположена зона глиального паравентрикулярного матрикса (ЗГПВМ). В данной зоне во внутриутробном и раннем постнатальном периодах проходят процессы дифференцировки макроглиоцитов и эпендимоцитов.

Весь биологический материал подвергался стандартной проводке. Все срезы окрашивались гематоксилином с эозином для проведения обзорного микроскопического исследования, а также галоцианин-хромовыми квасцами по Эйнарсону для выявления апоптотических изменений в клетках.

В работе проведено иммуногистохимическое исследование. В исследовании для оценки значения иммуногистохимических маркеров в качестве первичных антител использовали спектр антител, который включал маркеры к GFAP (клон GA-5, LabVision) – для верификации клеток астроцитарного ряда, Ki-67 и каспаза-3 (Ab-4, LabVision) – для определения уровня пролиферации и апоптоза. Визуализация проводилась путем обработки хромогеном диаминаминобензидина (DAB).

Количественные и качественные показатели экспрессии маркеров изучали как минимум на 8–10 случайно избранных полях зрения микроскопа гистологических срезов при увеличении $\times 400$ и $\times 1000$. Оценка экспрессии каждого маркера проводилась индивидуально в соответствии с рекомендациями других исследователей путем цитофотометрии.

Результаты исследования и их обсуждение

У однодневных животных, выношенных в условиях физиологической беременности, субэпендимарный слой достаточно широкий, содержит мелкие

глиоциты с крайне скудной цитоплазмой и гиперхромными ядрами.

При использовании иммуногистохимического исследования с использованием антител к основному маркеру астроцитов – глиального фибриллярного

кислого протеина (GFAP) обнаружено, что астроциты в этой зоне расположены равномерно, из их отростков сформирована нежная плотная сеть. Отростки астроглиоцитов длинные, тонкие, с четкими контурами, на всем протяжении имеют одинаковую степень интенсивности окрашивания (рис. 1).

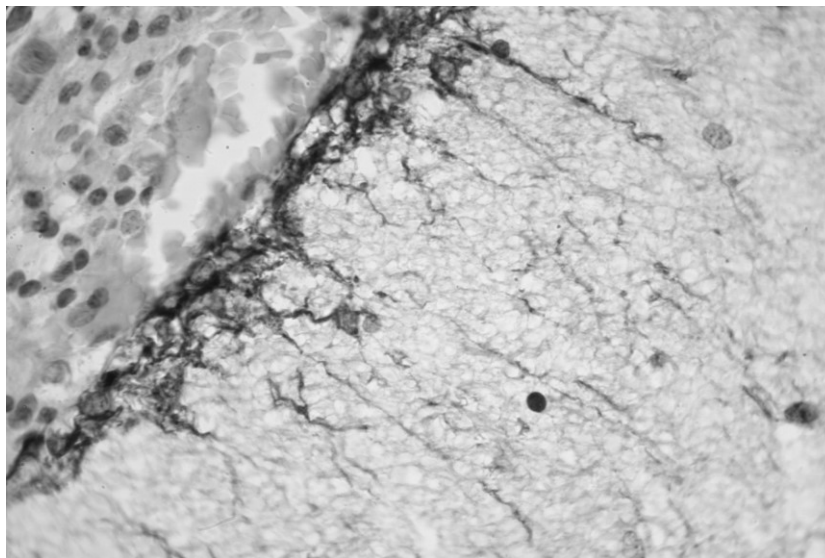


Рисунок 1. Однодневный крысенок контрольной группы

Иммуногистохимическое исследование с маркером астроглии GFAP. Отростки астроцитов длинные, равномерной толщины, с четкими контурами и одинаковой степенью восприятия интенсивности красителя. Увеличение $\times 1000$.

Исследование субэпендимарного слоя у однодневных экспериментальных новорожденных животных группы ХВУГ позволило выявить следующие закономерности. Так, крысята этой группы рождаются с более широким слоем ЗГПВМ и с повышенной плотностью расположения клеточных глиальных элементов в нем (табл. 1). Этот факт мы трактуем как признак замедления эмбрионального развития и дифференцировки клеток макроглиального ряда вследствие хронического, но нетяжелого воздействия внутриутробной гипоксии.

Таблица 1.

Морфометрическая характеристика субэпендимарного слоя крысят, выведенных из эксперимента в течение суток после рождения

Исследуемый показатель	Толщина субэпендимарного слоя (в $\text{м}\times 10^{-6}$)	Плотность клеток (количество на $15\times 10^{-9}\text{ м}^2$)
Группа ХВУГ	$122,32\pm 5,75$	$143,17\pm 6,12$
Группа К	$78,93\pm 3,33$	$122,56\pm 5,33$

При этом в единичных астроцитах выявляются признаки клазматодендроза – распада отростков астроцитов, что, как известно, является начальным признаком клеточной астроцитарной гибели. Отростки астроцитов укорочены, утолщены, с неровными ломаными контурами и неравномерным прокрашиванием по всей длине (рис. 2). Сеть из астроцитарных отростков неравномерная. В единичных олигодендронитах обнаруживаются признаки кариопикноза с

уплотнением хроматина и уменьшением размера ядер. В жизнеспособных астроцитах и олигодендронитах ядра резко эухромны, увеличены, что говорит о повышенном уровне их морфофункциональной активности. В некоторых астроцитах хорошо заметны признаки очаговой пролиферации и гиперплазии (рис. 3).

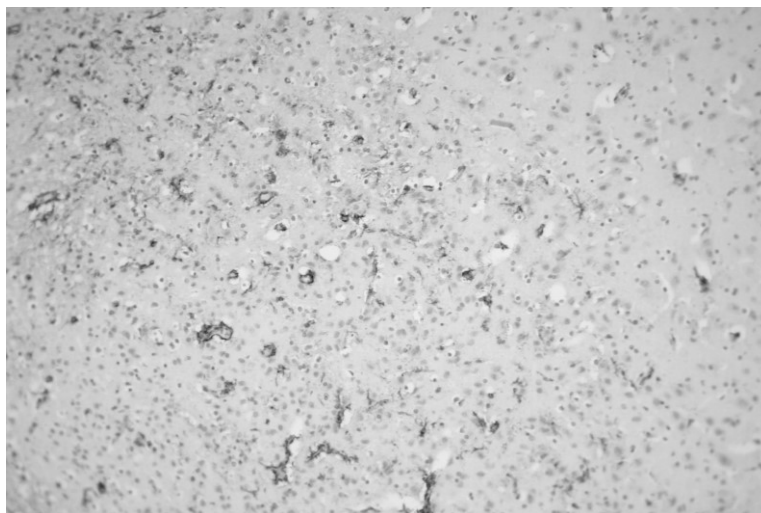


Рисунок 2. Однодневный крысенок группы ХВУГ

Очаговая гибель астроцитов (слева сверху) – набухание клеточных тел и клазматодендроз отростков. Единичные астроциты активны, в состоянии гиперплазии (посередине внизу). Иммуногистохимическое исследование с использованием антител к GFAP. Увеличение $\times 200$ раз.

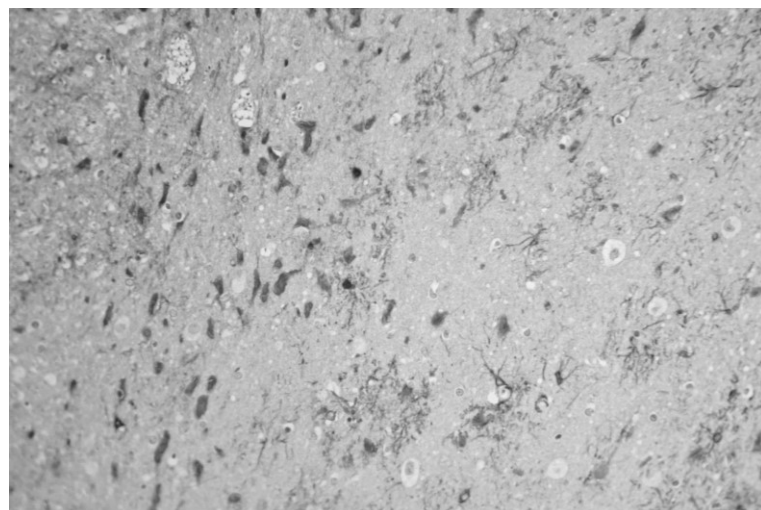


Рисунок 3. Однодневный крысенок группы ХВУГ

Очаговая пролиферация и гиперплазия астроцитов (справа). Иммуногистохимическое исследование с использованием антител к GFAP. Увеличение $\times 400$ раз.

При исследовании уровня экспрессии каспазы-3 обнаружено, что данная ключевая протеаза апоптоза незначительно экспрессируется у интактных животных в первые сутки после рождения, что, по-видимому, обусловлено только что перенесенным стрессом рождения. То же самое можно сказать и об индексе пролиферации. Установлено, что у животных данной группы уровень экспрессии каспазы-3 можно охарактеризовать как умеренный. Число клеток, экспрессирующих данный маркер, в среднем составляет $15,7 \pm 0,3$ экз. на ограниченном поле зрения. Средняя оптическая плотность цитоплазмы экспрессирующих клеток – $0,149 \pm 0,004$ усл. ед. Число пролиферирующих клеток в среднем составляет $12,3 \pm 0,4$ экз. на ограниченном поле зрения, оптическая плотность их ядер – $0,233 \pm 0,003$ усл. ед. в зеленой части

спектра. Пролиферируют макроглиоциты, микроглиоциты, единичные эпендимоциты и эндотелиоциты.

В группе животных ХВУГ процессы клеточной гибели и пролиферации выражены гораздо сильнее. Уровень экспрессии каспазы-3 – $27,7 \pm 0,9$ клеток на ограниченном поле зрения, средняя оптическая плотность их цитоплазмы – $0,250 \pm 0,012$ усл. ед. При оценке качественного состава позитивных по отношению к данному маркеру клеток выявлено, что в ЗГПВМ каспаза-3 активна во всех клетках глиального ряда и в нейронах.

Мы наблюдали экспрессию каспазы-3 в отдалении от субэпендимарного слоя нейронами подкорковых образований (рис. 4). При оценке выраженности пролиферации установлено, что через сутки после смоделированной высокогорной гипоксии среднее

число пролиферирующих клеток на ограниченном поле зрения составляет $27,4 \pm 0,7$ экз., оптическая плотность их ядер – $(0,354 \pm 0,005)$ усл. ед. в среднем.

При этом пролиферируют преимущественно эндотелиоциты и единичные глиоциты (рис. 5).

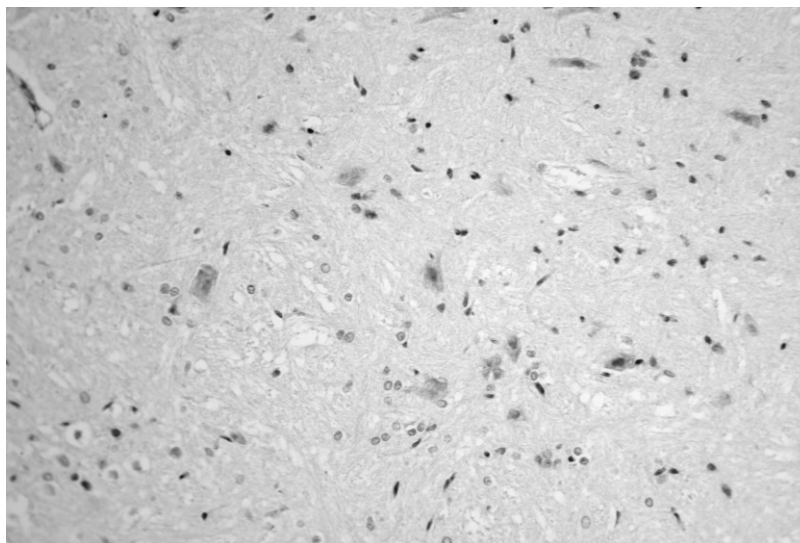


Рисунок 4. Однодневный крысенок группы ХВУГ

Экспрессия caspase-3 (клон CPP32) нейронами подкорковых образований. Увеличение $\times 400$.

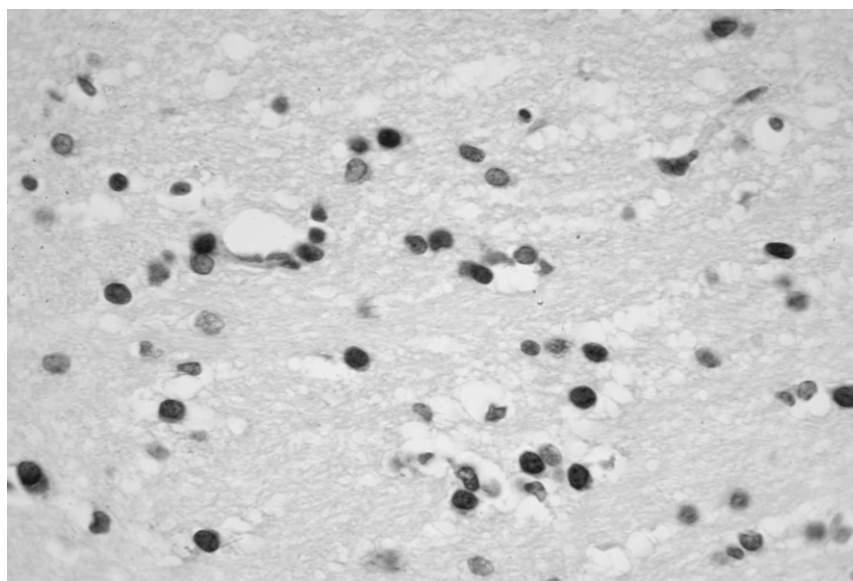


Рисунок 5. Однодневный крысенок группы ХВУГ

Экспрессия Ki-67 (Ab-4, LabVision) глиоцитами и эндотелиоцитами. Выраженный цитотоксический отек. Увеличение $\times 1000$.

В современной литературе имеются сведения о замедлении дифференцировки нейронов коры под воздействием ХВУГ. Так, в эксперименте на животных обнаружено нарушение архитектоники коры и обилие в ней незрелых нейронов эмбрионального типа у потомков, подвергшихся внутриутробному воздействию хронической гипоксии [3]. Аналогичные изменения, возникающие под воздействием ХВУГ, выявляли и в некоторых зонах гиппокампа [7]. Установлено также замедление темпов эмбрионального развития нейронов Пуркинье мозжечка [4].

Таким образом, замедление формирования и дифференцировки глиального аппарата можно считать одним из патогенетических звеньев замедления развития головного мозга в целом под влиянием ХВУГ.

Выводы

Таким образом, основываясь на результатах проведенного исследования, можно утверждать, что воздействие хронической внутриутробной тяжелой гипоксии приводит к замедлению созревания и дифференцировки глиального аппарата, а именно макроглиоцитов головного мозга. Данную особенность

внутриутробного морфо- и эмбриогенеза макроглии можно считать одним из патогенетических звеньев в

формировании последующего неврологического дефицита у детей, перенесших воздействие хронической внутриутробной гипоксии.

Список литературы:

1. Надев А.П., Перова О.В., Травин М.А. Роль цитокинов в дифференцировке клеток паравентрикулярной зоны головного мозга у плодов с внутриутробным энцефалитом // Архив патологии. – 2014. – № 3. – С. 20-23.
2. Трофимова Л.К., Граф А.В., Маслова М.В. и др. Влияние прерывистой нормобарической гипоксии на ранний органогенез белых крыс // Изв. Акад. Наук. – 2008. – № 3. – С. 310-314.
3. Bозоуян Л., Khightayan J., Saghatelyan A. Astrocytes control the development of the migration-promoting vasculature scaffold in the postnatal brain via VEGF signaling // J. Neurosci. 2012. – 32(5). – P. 1687-1704.
4. Candelario-Jalil M.E. Injury and repair mechanisms in ischemic stroke: considerations for the development of novel neurotherapeutics. Curr Opin Investig Drugs. – 2009, 27 (Suppl.1). – P. 644-654.
5. Graf A.V., Maslova M.V., Trofimova L.K. et al. Effect of antenatal hypoxia on age-specific dynamics of ECG parameters and content of biogenic amines in the central nervous system // Bull. Exp. Biol. Med. – 2007. – Vol. 144. – № 8. – P. 155-158.
6. Lau C., Rogers J.M. Embryonic and fetal programming of physiological disorders in adulthood // Birth. Defects Res. C. Embryo. Today. – 2004. – Vol. 73. – № 4. – P. 300-312.
7. Liu X., Bolteus A.J., GFAP-expressing cells in the postnatal subventricular zone display a unique glial phenotype intermediate between radial glia and astrocytes. Glia, 2006. – 54(5). – P. 394-410.
8. Meaney M.J., Szyf J.W., Seckl J.R. Epigenetic mechanisms of perinatal programming of hypothalamic-pituitary-adrenal functional and health // Trends Mol. Med. – 2007. – Vol. 13. – № 7. – P. 269-277.
9. Ment L.R., Bada H.S., Barnes P., Grant P.E., Hirtz D., Papile L.A., Pinto-Martin J., Rivkin M., Slovis T.L. Practice parameter: Neuroimaging of the neonate: Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology and the Practice Committee of the Child Neurology Society // Neurology. – 2002, June 25. – 58(12). – P. 1726-1738.