



## ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ПРОЛИФЕРАЦИИ И АПОПТОЗА КОМПОНЕНТАМИ ГЕМАТО-ЭНЦЕФАЛИЧЕСКОГО БАРЬЕРА ПРИ ПЕРИНАТАЛЬНОМ ГИПОКСИЧЕСКОМ ПОВРЕЖДЕНИИ

**Г.И. ГУБИНА-ВАКУЛИК**  
**Е.В. КИХТЕНКО**  
**Р.В. СИДОРЕНКО**

*Харьковский национальный  
медицинский университет*

*e-mail: kihtenko@ukr.net*

Представлены результаты иммуногистохимического исследования уровня экспрессии каспазы-3 и Ki-67 в клеточных элементах гематоэнцефалического барьера головного мозга крысят первого месяца жизни после перенесенного перинатального гипоксического воздействия. Установлена динамика интенсивности клеточной гибели и пролиферации в различные периоды гипоксически-ишемической энцефалопатии в эксперименте.

Ключевые слова: перинатальная гипоксия, апоптоз, пролиферация, каспаза-3, Ki-67.

Клинические последствия перинатальных поражений центральной нервной системы (ЦНС) являются темой острых дискуссий педиатров, неонатологов и неврологов на протяжении многих десятилетий. Недооценить роль перинатальных поражений ЦНС в формировании детской патологии сложно: в структуре детской инвалидности поражения нервной системы составляют около 50%, при этом 70–80% случаев приходится на перинатальные поражения [1, 5].

Наиболее частой причиной перинатальных повреждений ЦНС являются гипоксически-ишемические поражения мозга — 47% [3], последствия которых занимают ведущее место в структуре заболеваемости и смертности у детей неонатального периода и раннего возраста [2, 13]. К моменту рождения головной мозг ребенка является незрелым, особенно большие полушария [10]. Наиболее высокие компенсаторные возможности имеет именно незрелый мозг, находящийся в стадии бурного развития. Главным повреждающим фактором у этой категории детей является гипоксия [1–4], которая может быть следствием как гипоксемии, так и ишемии мозга и является главным фактором, предрасполагающим к развитию гипоксически-ишемической энцефалопатии (ГИЭ) [11, 13].

Исходя из нозологического принципа гипоксические состояния плода и новорожденного классифицируют следующим образом: 1) острая асфиксия в результате острого прекращения маточно-плацентарного или плацентарно-плодового кровообращения; 2) хроническая внутриутробная гипоксия как проявление фетопатии вследствие заболеваний сердечно-сосудистой, дыхательной и кроветворной систем беременной; эндокринных заболеваний беременной; интоксикаций (профессиональных, лекарственных); патологии беременности (эклампсия); хронической плацентарной недостаточности и недостаточности пуповины; инфекционных заболеваний плода; пороков развития плода.

Смертность новорожденных при перинатальном поражении ЦНС гипоксической природы составляет 11,5% (среди детей с умеренными церебральными нарушениями — 2,5%, тяжелыми — 50%). У детей с легким течением гипоксически-ишемической энцефалопатии в неонатальном периоде осложнений не возникает [8]. По данным Ment L.R. и соавт. [14], у 80% доношенных новорожденных тяжелые гипоксически-ишемические поражения ЦНС приводят к смерти или тяжелым неврологическим нарушениям.

Основные аспекты функционирования ЦНС невозможно понять без учета современных представлений про гемато-энцефалический барьер (ГЭБ). Этот механизм эволюционно создан для обеспечения автономности мозга. Морфологическая организация ГЭБ охватывает несколько уровней клеточных систем. Первый — двухмембранный слой эндотелиоцитов, второй — базальная мембрана с перичитами, третий — астроцитарная «муфта» из отростков астроцитов, которые окутывают 85–90% поверхности церебральной капиллярной сети [7]. Морфологические закономерности различных перинатальных гипоксических поражений мозга на настоящий момент изучены недостаточно. Материалы по патоморфологическим особенностям перинатального гипоксического поражения ГЭБ скудны и несистематизированы. Данных с использованием современных иммуногистохимических методов нет.

**Цель исследования.** На основании данных уровня экспрессии маркера апоптоза — каспазы-3 и маркера пролиферации — Ki-67 изучить морфологические закономерности клеточной гибели и регенерации компонентов гемато-энцефалического барьера при различных типах перинатальной гипоксии (острой постнатальной и хронической внутриутробной) в эксперименте.

**Материалы и методы исследования.** Экспериментальное исследование проведено на крысятах трех групп: 1 — крысята самок с физиологически протекающей беременностью, подвергшиеся острой постнатальной асфиксии (группа ОПнА); 2 — крысята самок с артериальной гипертензией,



выношенные в условиях хронической внутриутробной гипоксии (ХВУГ), подвергшиеся острой постнатальной асфиксии (группа ХВУГ+ОПнА); 3 – крысы контрольной группы (группа К).

Для моделирования хронической внутриутробной гипоксии из контингента крыс популяции «черный капшон» вивария Харьковского национального медицинского университета путем ежедневного в течение 2-х недель 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.).

Для моделирования острой постнатальной асфиксии крысы групп ОПнА и ХВУГ+ОПнА сразу после рождения подвергались воздействию «высокогорной» гипоксии в течение 15 мин. Для этого крысы помещались в специальную герметичную камеру, из которой выкачивался воздух, и создавались условия резкого уменьшения атмосферного давления и содержания кислорода (аналогично 11 000 м над уровнем моря).

Для выяснения динамики морфологических изменений при течении гипоксически-ишемической энцефалопатии крысы всех групп выводились из эксперимента в следующие сроки: 1 – через сутки после рождения (период острых изменений ГИЭ); 2 – на 14-е сутки жизни (период ранних восстановительных изменений ГИЭ); 3 – на 35-е сутки постнатального онтогенеза (период восстановительных изменений ГИЭ).

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. Эта зона является очень чувствительной к повреждающему гипоксическому воздействию [12]. Срезы толщиной 3-5 мкм наносили на адгезивные предметные стекла SuperFrost Plus и депарафинировали согласно принятым протоколам.

В иммуногистохимическом исследовании для оценки процессов апоптоза и пролиферации использовали антитела к каспазе-3 (клон CPP32, LabVision) и Ki-67 (Ab-4, LabVision). Визуализация осуществлялась пероксидазным методом. Количественные и качественные показатели экспрессии маркеров изучали как минимум на 8-10 случайно избранных полях зрения микроскопа при увеличении  $\times 200$ ,  $\times 400$  и  $\times 1000$ .

С помощью программ Olympus DP-Soft и Microsoft-Excel на микроскопе Olympus BX-41 подсчитывали среднее абсолютное количество антиген – позитивных клеток на ограниченной площади –  $360 \times 10^{-12} \text{ м}^2$  при увеличении в 400 раз, а также определяли оптическую плотность антиген-позитивных структур с использованием метода цитофотометрии. При этом следует отметить, что при оценке уровня экспрессии маркеров как апоптоза, так и пролиферации, согласно современным канонам [6, 9], наличие до 3-5 позитивных клеток в поле зрения считается нормой и оценивается как негативная реакция (в дальнейшем в таблицах при изложении цифровых данных используется знак «-»).

**Результаты исследования.** Цифровые данные о среднем содержании клеток с активной каспазой-3 и положительных к маркеру апоптоза Ki-67 приведены в таблице 1. Данные об оптической плотности цитоплазмы клеток, экспрессирующих каспазу-3, и оптической плотности ядер клеток, позитивных к Ki-67 приведены в табл. 2.

Таблица 1

**Среднее количество клеток позитивных к каспазе-3 и к Ki-67 на ограниченной площади ( $360 \times 10^{-12} \text{ м}^2$  при увеличении в 400 раз) (в экз.)**

Длительность постнатального онтогенеза (в сут.)	Исследуемая группа					
	К		ОПнА		ХВУГ+ОПнА	
	каспаза-3	Ki-67	каспаза-3	Ki-67	каспаза-3	Ki-67
1	15,7±0,3	12,3±0,4	27,7±0,9	27,4±0,7*	62,3±2,7* **	97,7±3,3* ** ^
14	- ^	- ^	16,9±0,4*	25,2±0,6*	33,2±1,1* ^	44,0±1,3* ^
35	-	-	-	-	17,1±0,2* **	16,6±0,4* **

Примечание:

\* – разница двух средних достоверна при сравнении с группой К;

\*\* – разница двух средних достоверна при сравнении группы ХВУГ+ОПнА с группой ОПнА;

^ – разница двух средних достоверна в соседние сроки длительности постнатального онтогенеза.



**Оптическая плотность цитоплазмы клеток, позитивных к caspasa-3, и оптическая плотность ядер клеток, позитивных к Ki-67 в условных единицах (усл. ед.)**

Длительность постнатального онтогенеза (в сут.)	Исследуемая группа					
	К		ОПнА		ХВУГ+ОПнА	
	каспаза-3	Ki-67	каспаза-3	Ki-67	каспаза-3	Ki-67
1	0,149± 0,004	0,233± 0,003	0,250± 0,012	0,354± 0,005	0,467± 0,023* **	0,573± 0,022* **
14	- ^	- ^	0,144± 0,006*	0,337± 0,005*	0,277± 0,012* ^	0,432± 0,017*
35	-	-	-	- ^	0,156± 0,007* **	0,242± 0,002* ** ^

Примечание:

\* – разница двух средних достоверна при сравнении с группой К;

\*\* – разница двух средних достоверна при сравнении группы ХВУГ+ОПнА с группой ОПнА;

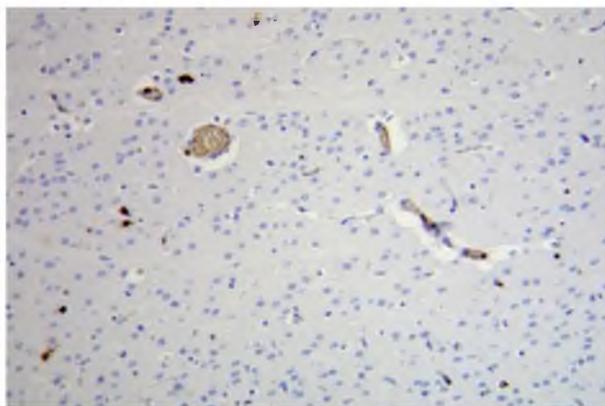
^ – разница двух средних достоверна в соседние сроки длительности постнатального онтогенеза.

**Животные контрольной группы.** Учитывая данные таблиц 1 и 2 можно констатировать, что в первые сутки постнатального онтогенеза у животных контрольной группы регистрируется низкая экспрессия каспазы-3, что, вероятнее всего является следствием перенесенного родового стресса. В эти же сроки обнаруживается незначительное повышение пролиферативной активности всех глиоцитов и эндимиоцитов. На 14-е и 35-е сутки жизни клеточные элементы ГЭБ у животных данной группы не экспрессируют маркеры апоптоза и пролиферации.

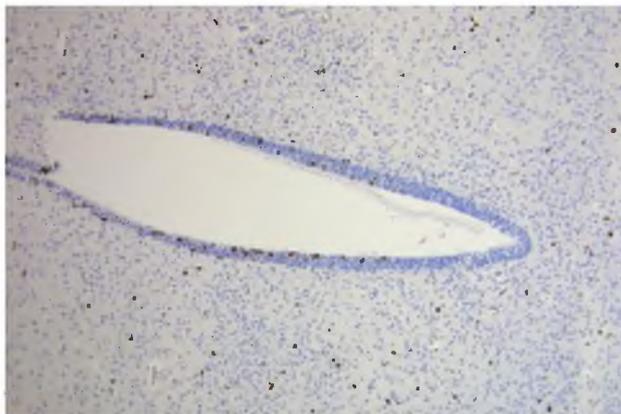
**Группа ОПнА (животные, выношенные в условиях физиологически протекающей беременности и подвергшиеся воздействию постнатальной гипоксии).** У животных, выведенных из эксперимента через сутки после рождения, уровень экспрессии каспазы-3 можно охарактеризовать как умеренный.

К 14-м суткам постнатального онтогенеза процессы апоптотической гибели снижают свою интенсивность, однако все же еще продолжают регистрироваться. К 35-м суткам постнатального онтогенеза у животных данной группы, судя по данным иммуногистохимического исследования с маркером каспазы-3, процессы интенсивной клеточной гибели путем апоптоза прекращаются.

При оценке выраженности пролиферации установлено, что через сутки после смоделированной высокогорной гипоксии среднее число пролиферирующих клеток на ограниченной площади составляет (27,4±0,7), оптическая плотность их ядер – (0,354±0,005) усл. ед. в среднем (табл. 1, 2). При этом пролиферируют преимущественно эндотелиоциты и единичные глиоциты (рис. 1). К 14-м суткам эксперимента цифровые данные, характеризующие выраженность клеточной пролиферации, достоверно не изменяются. Однако меняется качественный состав пролиферирующих клеток: пролиферируют преимущественно глиальные клетки, эндотелиоциты – в меньшей степени. Также среди Ki-67-позитивных клеток имеются единичные эндимиоциты (рис. 2). К 35-м суткам эксперимента показатели клеточной пролиферативной активности резко снижаются (табл. 1, 2).



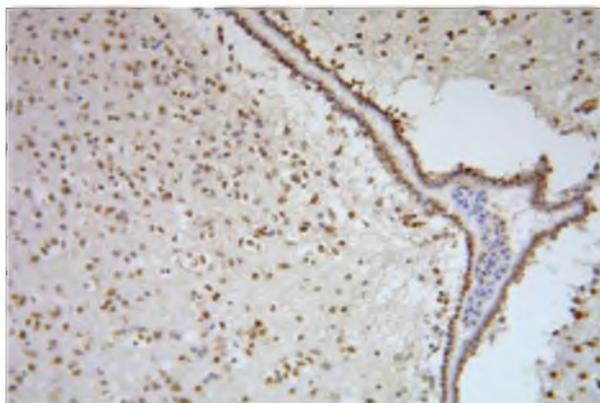
**Рис. 1.** Крысенок группы ОПнА выведенный из эксперимента в 1-е сутки после рождения. Отмечается экспрессия протеина пролиферации Ki-67 преимущественно эндотелиоцитами капилляров и единичными глиоцитами. Увеличение x 400



*Рис. 2.* Крысенок группы ОПНА выведенный из эксперимента на 14-е сутки после рождения. Экспрессия протеина пролиферации Ki-67. Пролиферируют преимущественно клетки глии, эпендимоциты и, в меньшей степени, эндотелиоциты капилляров. Увеличение x 200

**Группа ХВУГ+ОПНА (животные, выношенные в условиях хронической внутриутробной гипоксии и подвергшиеся воздействию постнатальной гипоксии).** Исследование уровня экспрессии маркера апоптоза каспазы-3 показало, что наиболее высок он у животных через сутки после рождения. Экспрессируют каспазу все типы глиоцитов и нейроциты. К 14-м суткам эксперимента процессы апоптогической гибели несколько снижают свою интенсивность, их можно охарактеризовать как умеренно выраженные. У животных, выведенных из эксперимента на 35-е сутки постнатального онтогенеза, процессы клеточной гибели путем апоптоза продолжают регистрироваться на низком уровне (табл. 1, 2).

При оценке выраженности пролиферативных процессов у животных данной исследуемой группы, выведенных из эксперимента через сутки после рождения, можно констатировать, что степень пролиферации очень высока: среднее количество Ki-67-позитивных клеток –  $(97,7 \pm 3,3)$  экз., средняя оптическая плотность их ядер –  $(0,573 \pm 0,022)$  усл. ед. Что касается характеристики клеточного состава пролиферирующего пула, то можно констатировать, что пролиферируют буквально все имеющиеся в исследуемой зоне клетки: эндотелиоциты, глиоциты, эпендимоциты и в отдалении нейроны (рис. 3).



*Рис. 3.* Крысенок группы ХВУГ+ОПНГ выведенный из эксперимента в 1-е сутки после рождения. Высокая экспрессия Ki-67. Пролиферируют все клеточные пулы зоны глиального паравентрикулярного матрикса. Увеличение x 400

К 14-м суткам интенсивность пролиферации снижается и характеризуется как умеренно выраженная (табл. 1, 2). В эти сроки пролиферируют клетки глии и эндотелиальной капиллярной выстилки (рис. 4).

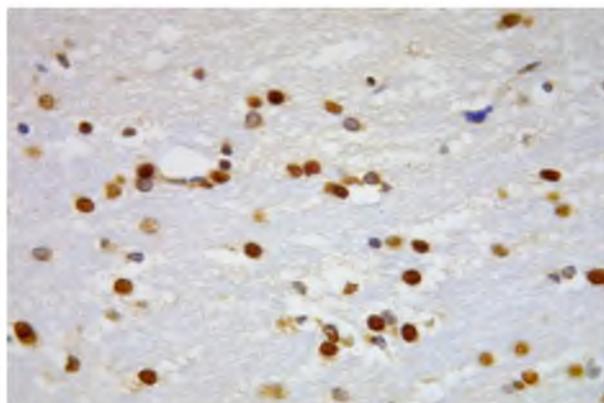


Рис. 4. Крысенок группы ХВУГ+ОПНА выведенный из эксперимента на 14-е сутки после рождения. Экспрессия Ki-67 глиоцитами и эндотелиоцитами. Выраженный цитотоксический отек. Увеличение x 1000

На 35-е сутки экспериментального исследования показатели пролиферативной клеточной активности резко снижаются.

**Обсуждение полученных результатов.** Животные контрольной группы в качестве показателей реализации родового стресса сразу после рождения имеют незначительно повышенные показатели апоптотической гибели и пролиферативной активности клеток, формирующих ГЭБ [7].

Животные группы ОПНА вследствие сочетанного воздействия родового стресса и постнатальной гипоксии имеют умеренную степень апоптотических процессов и пролиферации через сутки после рождения. Экспрессируют каспазу глиоциты, пролиферируют эндотелиоциты. К 14-м суткам эксперимента, уровень экспрессии каспазы-3 резко снижается и к 35-м суткам признаки клеточной гибели путем апоптоза фактически исчезают. К 14-м суткам эксперимента цифровые показатели пролиферации достоверно не изменяются, но при этом кардинально меняется клеточный состав пролиферирующих клеток – пролиферировать преимущественно начинают глиальные клетки и клетки эпендимы желудочков. Такое изменение качественного состава пролиферирующих клеток отражает закономерности регенераторных процессов и свидетельствует о том, что эндотелий первый отвечает на повреждающее воздействие смоделированной высокогорной гипоксии.

Уровень экспрессии каспазы-3 как глиоцитами, так и нейрочитами, у животных группы ХВУГ+ОПНА в первые сутки эксперимента наиболее высок, в эти же сроки регистрируются наиболее высокие показатели пролиферативной клеточной активности, что обусловлено в первую очередь воздействием хронической внутриутробной гипоксии, во вторую – смоделированной высокогорной гипоксией. В незрелой зоне глиального паравентрикулярного матрикса интенсивно продолжаются процессы пролиферации и дифференцировки различных пулов глиальных и эпендимарных клеток. К 14-м суткам эксперимента показатели апоптоза и пролиферации снижаются до умеренных цифр. К 35-м суткам экспериментального исследования пролиферативная активность глиальных и эндотелиальных клеток снижается до показателей, которые можно охарактеризовать как невысокие, но все же не свидетельствующие об окончании регенераторных процессов после повреждающего сочетанного гипоксического воздействия.

#### **Выводы:**

1. Родовой стресс реализуется незначительным увеличением интенсивности апоптотических и пролиферативных процессов в первые сутки постнатального онтогенеза.
2. Смоделированная высокогорная асфиксия (ОПНА) приводит к умеренному повышению уровня процессов апоптоза и пролиферативной активности клеточных элементов ГЭБ. Причем первым на повреждающее воздействие гипоксии реагирует эндотелий.
3. Наиболее тяжелые повреждения клеточных элементов ГЭБ регистрируются при сочетанном воздействии хронической внутриутробной гипоксии и острой постнатальной смоделированной асфиксии. При этом процессы регенерации эндотелиоцитов и глиоцитов еще не заканчиваются даже к 35-м суткам эксперимента, что отражает морфологические закономерности течения восстановительного периода ГИЭ у животных, подвергшихся гипоксическому воздействию как во внутриутробном периоде, так и в раннем постнатальном.

#### **Литература**

1. Волосовец А.П. Последствия перинатальных поражений центральной нервной системы: дискуссионные вопросы / А.П. Волосовец, С.П. Кривоустов, И.А. Логинова, М.А. Шакотько // Неонатология. 2008. – № 4(13). – С. 17-23.



2. Головченко О.В. Особенности гемодинамики головного мозга у новорожденных с отрой и хронической гипоксией / О.В. Головченко, И.С. Лукьянова, О.М. Дзюба, Г.Ф. Медведенко // Перинатология и педиатрия. – 2003. – № 1. – С. 8 – 11.
3. Євтушенко С.К., Шестова О.П., Морозова Т.М. Гіпоксичні ушкодження головного мозку у новонароджених. – К.: Інтермед, 2003. – 101 с.
4. Знаменская Т.К. Место тромбгеморрагического синдрома среди причин перинатальной смертности / Т.К. Знаменская, Т.Д. Задорожная, А.О. Закревский и соавт. // Перинатология и педиатрия. – 2003. – № 3. – С. 19 – 20.
5. Клименко Т.М. Status marmoratus и лейкомаляция мозга у новорожденных: особенности течения и перспективы терапии / Т.М. Клименко, С.В. Водяницкая, Г.А. Королева и др. // Планета здоровья. – 2005. – Т. 6, № 3. – С. 23 – 27.
6. Колобов В.В. Влияние антител к глутамату на активность каспазы-3 в структурах головного мозга крыс с экспериментальной болезнью Альцгеймера / В.В. Колобов, И.А. Захарова, В.Г. Фомина, В.Ю. Горбатов, Т.В. Давыдова // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2012. – №10. – С. 417 – 420.
7. Личко В.С. Гемато-энцефалический барьер и современные возможности управления им в эксперименте / В.С. Личко, В.О. Малахов // Украинский неврологический журнал. – 2012. – №4. – С. 33-38.
8. Макарова Е.А. Перивентрикулярная лейкомаляция: факторы риска и прогноз / Е.А. Макарова, В.Ю. Здвижкова, В.Ю. Мартынюк // Современная педиатрия. – 2007. – № 1(14). – С. 195-197.
9. Меньшанов П.Н. Эффекты дексаметазона на развитие неонатальных крысят и уровень активной каспазы-3 в коре мозга / П.Н. Меньшанов, В.В. Музыка, Н.Н. Дыгало // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2012. – № 4. – С. 467 – 469.
10. Мошчич П.С., Сулима О.Г. Неонатология: учебное пособие. Киев: Вища школа, 2004. – 407 с.
11. Фризе К., Кахель В. Инфекционные заболевания беременных и новорожденных: Пер. с нем. М.: Медицина, 2003. – 422 с.
12. Шабалов Н.П. Неонатология: учебное пособие: В 2 т.: 4-е изд., испр. и доп.: Т. 1. М.: МЕДпресс-информ, 2006. – 608 с.
13. Шабалов Н.П. Неонатология: Учебное пособие: В 2 т.: 4-е изд., испр. и доп.: Т. 2. М.: МЕДпресс-информ, 2006. – 656 с.
14. Ment L.R. 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 / L.R. Ment, H.S. Bada, P. Barnes et al. // Neurology. – 2002, June 25. – № 58(12). – P. 1726 – 1738.

## **PECULIARITIES OF EXPRESSION OF PROLIFERATIVE AND APOPTOTIC MOLECULAR-BIOLOGICAL MARKERS IN COMPONENTS OF BLOOD-BRAIN BARRIER WITH THE PERINATAL HYPOXIC DAMAGE**

**G.I. GUBINA-VAKULIK  
E.V. KIHTENKO  
R.V. SIDORENKO**

*Pathological Anatomy  
Department of Kharkiv  
National Medical University*

*e-mail: kihtenko@ukr.net*

The cellular elements of the blood-brain barrier in the one month old rats after perinatal hypoxia were investigated using antibodies to caspase-3 and to Ki-67 (markers of cellular apoptosis and proliferation). It was found the dynamics of apoptosis and proliferation intensity in the cellular elements of the blood-brain barrier due to hypoxic-ischemic encephalopathy in the experiment.

Keywords: perinatal hypoxia, apoptosis, proliferation, caspase-3, Ki-67.