



УДК 616.831 – 018.74 : 618.33

СОСУДИСТЫЙ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫЙ ФАКТОР РОСТА И КЛЕТОЧНАЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКА В ПАРАВЕНТРИКУЛЯРНОЙ ЗОНЕ ГОЛОВНОГО МОЗГА ПРИ ВНУТРИУТРОБНОМ ЭНЦЕФАЛИТЕ У ПЛОДОВ

А.П. НАДЕЕВ
О.В. ПЕРОВА
М.А. ТРАВИН

*Новосибирский
государственный
медицинский университет*

e-mail: nadeevngma@mail.ru

Исследованы особенности клеточной дифференцировки и миграции нейроэпителиальных клеток паравентрикулярной зоны у плодов человека с врожденным энцефалитом. Изучена паравентрикулярная зона таламуса головного мозга 47 плодов с признаками врожденного энцефалита при сроке гестации 24-27 недель и 10 здоровых плодов при сроке гестации 26-27 недель. Показано, что патоморфологические изменения в головном мозге плодов человека при врожденном энцефалите характеризовалась продуктивным и продуктивно-некротическим воспалением, и являлись в большинстве случаев проявлением генерализованной внутриутробной инфекции. При врожденном энцефалите уменьшение клеточности паравентрикулярной зоны, увеличение количества нейронов и глиальных клеток в таламической области, увеличение количества клеток, экспрессирующих глиальный фибриллярный белок, повышенная пролиферативная активность клеток паравентрикулярной зоны указывает на ускоренное созревание клеток паравентрикулярной зоны, однако, с уменьшением в ней образования сосудов, что обусловлено снижением экспрессии сосудистого эндотелиального фактора роста в клетках паравентрикулярной зоны.

Ключевые слова: паравентрикулярная зона, плод, врожденный энцефалит, сосудистый эндотелиальный фактор роста.

Введение. Значение внутриутробном энцефалита определяется высокой летальностью плодов и новорожденных и развитием инвалидности в последующие периоды жизни, в том числе – детских церебральных параличей [5]. Морфологическая картина воспалительного процесса в головном мозге характеризуется значительным полиморфизмом [7, 8], что обусловлено как полиэтиологичностью энцефалитов [5, 8], так и гетероформным реагированием нейронов в условиях патологии [4].

Паравентрикулярная зона (ПВЗ) развивающегося мозга в период между 26-40 неделями проходит ряд однотипных морфологических изменений, связанных с процессами миграции и дифференцировки зародышевых клеток [2]. Во время миграции нейробласты дифференцируются в нейроны, а глиобласты дают начало клеткам глии. Миграция нейробластов из зародышевого слоя в корковую пластинку заканчивается к 32-33 недели. После этого начинается миграция глиобластов, которые созревают в астроциты и олигодендроциты [6]. Показано, что при преждевременных родах нейrogenез у новорожденных нарушается, в том числе подавляется миграция клеток из ПВЗ [16]. ПВЗ – это богато васкуляризованная область, имеющая незрелую сосудисто-капиллярную сеть, перестраивающуюся в зрелую после исчезновения ПВЗ. При гестационном сроке от 24 до 32 недель сосуды, кровоснабжающие ПВЗ, по объему значительно больше сосудов коры головного мозга [2]. Капилляры ПВЗ включают эндотелиоциты на тонкой и прерывистой базальной мембране, которая частично окружена отростками астроцитов, для которых характерен глиальный фибриллярный белок промежуточного типа [14], немногочисленные перициты, которые не полностью окружают капилляр [8]. Отсутствие существенной механической поддержки делает сосуды ПВЗ чувствительными к увеличению давления и местной гипоксии, ведет к субэпендимальным кровоизлияниям, к прорыву крови в боковые желудочки головного мозга [2, 9]. Значение образования сосудистой сети ПВЗ также обусловлено тем, что сосуды обеспечивают миграцию нейрональных предшественников в ряд зон головного мозга, таких как обонятельная луковица, при этом рост сосудов связан с сосудистым эндотелиальным фактором роста (VEGF), экспрессируемым астроцитами [11]. В свою очередь,



нейроэпителий ПВЗ влияет на состояние ее сосудистой сети [13, 16]. Показано, что в условиях внутриутробной гипоксии изменяются процессы клеточной дифференцировки и миграции в ПВЗ [20]. В этой связи изменения в клеточном составе ПВЗ, а также механизмы ее «исчезновения» и кровоизлияний при внутриутробном энцефалитах у плодов человека остаются малоизученными.

Целью исследования было изучение структурной организации ПВЗ и экспрессии его клетками VEGF у плодов при внутриутробном энцефалите.

Материалы и методы. Исследовали головной мозг 47 плодов, которых разделили на 2 группы: 1-ю группу составили 37 плодов при сроке гестации 24-27 недель, у которых выявляли признаки врожденного энцефалита и менингоэнцефалита. Прерывание беременности носило самопроизвольный характер в 54,1%, при сроке гестации 26-27 недель – 59,5%. Во 2-й (контрольной) группе было 10 плодов при сроке гестации 26-27 недель, полученных после искусственного прерывания беременности по медицинским показаниям со стороны матери (юные первородящие, психоневрологические нарушения и др.). Для световой микроскопии и иммуногистохимического исследования забирали фрагменты головного мозга, таламическую область, фиксировали в 10%-ном растворе нейтрального формалина и проводили по стандартной методике. Готовили серийные парафиновые срезы толщиной 5-7 мкм и окрашивали гематоксилином и эозином, по Нислю [3]. На парафиновых срезах методом иммуногистохимического типирования с использованием пероксидазной метки определяли в клетках глиальный фибриллярный кислый белок при помощи моноклонального антитела GFAP («Novocastra Laboratories Ltd», Великобритания); эндотелий сосудов – CD34; определяли пролиферативную активность клеток ПВЗ – с помощью моноклонального антитела Ki-67 («Novocastra Laboratories Ltd», Великобритания); а также VEGF («Novocastra Laboratories Ltd», Великобритания). В таламической области подсчитывали численную плотность (N_{ai}) клеток ПВЗ, глиальных клеток и нейронов в тестовой площади 25 мкм². В ПВЗ подсчитывали количество (N_{ai}) сосудов; клеток ПВЗ, экспрессирующих GFAP, VEGF, Ki-67 в тестовой площади 25 мкм². Для оценки достоверных различий средних значений применяли t-критерий Стьюдента, при $p < 0,05$ [1].

Результаты исследования и их обсуждение. У плодов 1-й (врожденный энцефалит) группы наиболее часто как при самопроизвольном прерывании, так в случаях прерывания беременности по медицинским показаниям врожденный энцефалит явился проявлением генерализованной внутриутробной инфекции (86,48%). При генерализованной внутриутробной инфекции врожденный менингоэнцефалит сочетался с портальным гепатитом, интерстициально-десквамативной пневмонией, межлесточным миокардитом, продуктивным энтероколитом, акцидентальной инволюцией тимуса разной степени. Основное заболевание осложнялось геморрагическим синдромом с субэпендимальными и внутрижелудочковыми кровоизлияниями, очагами перивентрикулярной лейкомаляции, отеком вещества и оболочек головного мозга, что служило непосредственной причиной смерти.

Патоморфологические изменения в головном мозге плодов при врожденном энцефалите характеризовались очаговым (периваскулярным) продуктивным и продуктивно-некротическим воспалением (рис. 1), в том числе с образованием гранулем, нередко с вовлечением в воспалительный процесс мягких мозговых оболочек. При морфологическом исследовании в таламической области головного мозга отмечали неравномерное полнокровие, очаги микрокровоизлияний, дистрофические изменения нейронов с вакуолизацией цитоплазмы, хроматолиза, сморщивания тел нейронов. В ядрах нейронов изменения были представлены наличием крупных, гиперхромных или гипохромных ядер, явлениями кариопикноза. Вокруг сосудов и в веществе головного мозга наблюдали скопления из макрофагов, лимфоцитов, в ряде случаев с примесью нейтрофилов, периваскулярный и перичеселлюлярный отек, деструкцию стенок сосудов. Отмечали гиперплазию глиальных клеток с образованием очаговых скоплений. Учитывая результаты морфологического исследования головного мозга, а также инфекционного поражения последа в виде виллузита, интервиллузита, базального и париетального децидуита в сочетании с хронической плацентарной недостаточностью, отри-



цательные результаты бактериологического исследования головного мозга, и воспалительные поражения внутренних органов, можно предположить, что основным путем инфицирования плода был гематогенный, а этиология, вероятно, вирусной, микоплазменной или хламидийной природы [7, 8].

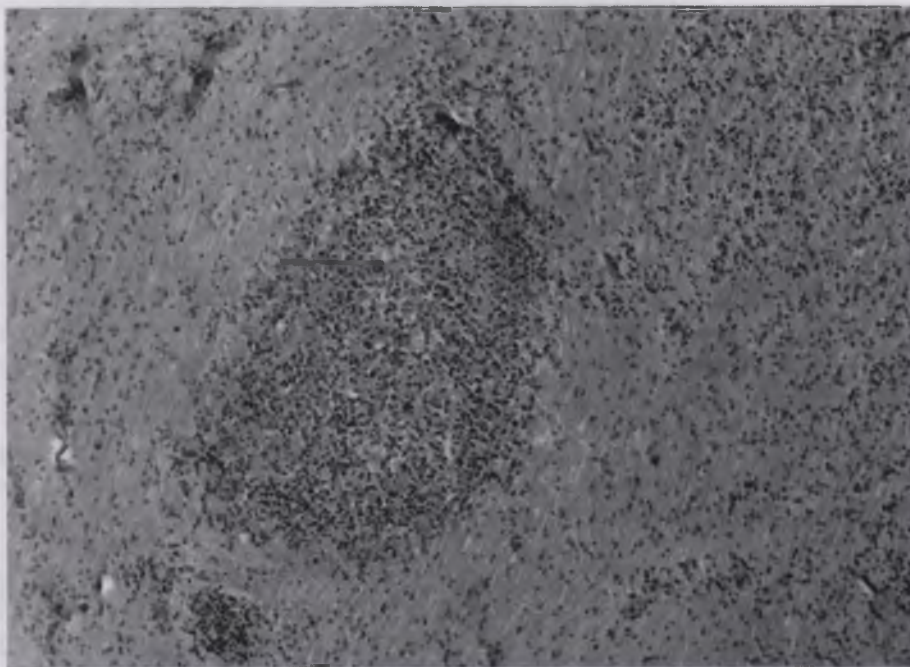


Рис. 1. Продуктивный энцефалит у плода человека. Окраска гематоксилином и эозином. Увел. 100

У плодов 1-й (врожденный энцефалит) группы ПВЗ была представлена неравномерным скоплением зародышевых клеток с очагами сгущения и просветления, полнокровными сосудами, очагами кровоизлияний (рис. 2). ПВЗ у плодов 2-й (контрольной) группы была представлена равномерно расположенными мелкими герминативными клетками, с полнокровными сосудами, отграниченная со стороны боковых желудочков эндимиоцитами.

Результаты морфометрического исследования клеток таламической области демонстрируют, что в таламической области головного мозга плодов 1-й группы (внутриутробного энцефалита) увеличивается количество нейронов и глиальных клеток: численная плотность нейронов и глиальных клеток было большим в сравнении с величинами аналогичных показателей у плодов 2-й (контрольной) группы в 1,2 и 2,5 раза, соответственно (табл. 1).

Таблица 1

Численная плотность (N_{ai}) клеток паравентрикулярной зоны таламуса головного мозга плодов человека при врожденном энцефалите ($M \pm m$)

Исследованные группы	Экспрессия GFAP в клетках паравентрикулярной зоны	Нейроны	Глиальные клетки
1-я группа (Врожденный энцефалит)	15,60±0,56*	15,36±0,45*	49,37±1,49*
2-я (контрольная) группа	11,33±0,57	13,05±0,52	20,40±0,75

Примечание: (*) обозначены достоверные различия в сравнении с таковыми у плодов 2-й (контрольной) группы ($p < 0,05$).



Рис. 2. Паравентрикулярная зона головного мозга плода 1-й (внутриутробный энцефалит) группы: неравномерное распределение зародышевых клеток паравентрикулярной зоны, очаг кровоизлияния. Окраска гематоксилином и эозином. Увел. 100

Известно, что GFAP является маркером зрелости астроцитов и выявляется при сроке гестации с 14 недель [8]. При этом численная плотность клеток ПВЗ, экспрессирующих GFAP, у плодов 1-й группы была больше на 37%, в сравнении с величиной аналогичного показателя у плодов 2-й (контрольной) группы (табл. 1, рис. 3).



Рис. 3. Экспрессия глиального фибриллярного кислого белка в клетках паравентрикулярной зоны головного мозга плодов при внутриутробном энцефалите. Окрашивание с использованием моноклонального антитела GFAP с докраской гематоксилином. Увел. 400

Общее количество клеток ПВЗ таламической области головного мозга у плодов 1-й группы была меньше в сравнении с величиной аналогичного показателя у плодов 2-й (контрольной) группы на 33%, а их пролиферативная активность, наоборот, увеличена: экспрессия Ki-67-положительных клеток была большей в 1,86 раз у плодов 1-й группы в сравнении с величиной аналогичного показателя у плодов 2-й (контрольной) группы (табл. 2).



Таблица 2

Численная плотность (N_{ai}) клеток паравентрикулярной зоны головного мозга плодов и их пролиферативная активность при врожденном энцефалите ($M \pm m$)

Исследованные группы	Общая клеточность паравентрикулярной зоны	Ki-67
1-я группа (врожденный энцефалит)	31,92±0,55*	3,62±0,45*
2-я (контрольная) группа	42,52±0,68	1,95±0,19

Примечание. (*) обозначены достоверные различия в сравнении с аналогичными показателями у плодов 2-й (контрольной) группой, $p < 0,05$.

У плодов 1-й группы с внутриутробным энцефалитом выявляли уменьшение численной плотности сосудов ПВЗ в 3,4 раза (табл. 3). Учитывая, что рост сосудов связан с ростовым фактором VEGF, то, вероятно, что его сниженная экспрессия в клетках ПВЗ (в 1,5 раза) обусловила нарушение ангиогенеза в ПВЗ (рис. 4).

Таблица 3.

Численная плотность (N_{ai}) клеток, сосудов и клеток, экспрессирующих VEGF, паравентрикулярной зоны головного мозга плодов человека при врожденном энцефалите ($M \pm m$)

Исследованные группы	Экспрессия клетками паравентрикулярной зоны VEGF	Сосуды паравентрикулярной зоны
1-я группа (врожденный энцефалит)	44,24±0,47*	24,15±1,36*
2-я (контрольная) группа	64,41±1,75	81,95±3,79

Примечание: (*) обозначены достоверные различия средних величин в сравнении с таковыми у плодов 2-й (контрольной) группы ($p < 0,05$).

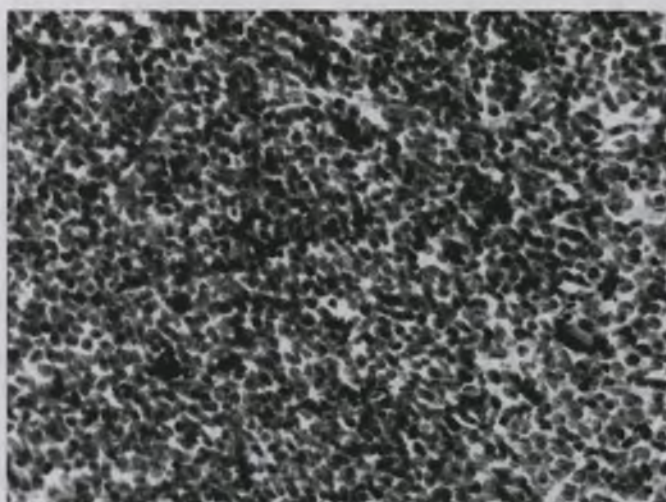


Рис. 4. Экспрессия VEGF в клетках паравентрикулярной зоны головного мозга плодов при внутриутробном энцефалите. Окрашивание с использованием моноклонального антитела VEGF с докраской гематоксилином. Увел. 200.

Учитывая тесные структурно-функциональные взаимоотношения нейронов, глиального ретикулума и сосудистой сети головного мозга в процессе нормального функционирования и патологического воздействия, головной мозг можно рассматривать как единую нейро-глио-сосудистую систему [4]. В этой связи, полученные резуль-



таты свидетельствуют, что при врожденном энцефалите количество нейроэпителиальных клеток в ПВЗ, несмотря на их повышенную пролиферативную активность, уменьшается, в то время как количество нейронов и глиальных клеток в таламической области увеличивается, что можно рассматривать, вероятно, как ускоренное созревание нейроэпителиальных клеток в нейроны и глиальные клетки, и их миграцию из ПВЗ. Повышенная дифференцировка клеток может быть связана с секрецией воспалительными клетками цитокинов, оказывающих регулирующее влияние на процессы дифференцировки и миграции клеток в ПВЗ, таких как IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , IL-6 [12, 15, 18, 19]. Учитывая, что рост сосудов определяется ростовым фактором VEGF, то, вероятно, что уменьшение количества клеток, его экспрессирующих, обусловило существенное снижение ангиогенеза в ПВЗ, что, в свою очередь, могло сопровождаться нарушением процессов клеточной миграции и пополнения пула клеток в других отделах головного мозга и, в конечном счете, привести к изменению нейрогенеза у взрослых [10].

Выводы. 1. Морфологические изменения в головном мозге плодов человека при внутриутробном энцефалите характеризовались продуктивным и продуктивно-некротическим воспалением, и явились в большинстве случаев проявлением генерализованной внутриутробной инфекции.

2. При внутриутробном энцефалите в паравентрикулярной зоне уменьшение ее общей клеточности и увеличение пролиферативной активности клеток сопровождалось увеличением количества нейронов и глиальных клеток в таламической области.

3. При внутриутробном энцефалите в ПВЗ обнаруженное уменьшение сосудов, влияющих на процессы клеточной миграции нейрональных предшественников, обусловлено снижением экспрессии сосудистого эндотелиального фактора роста.

Литература

1. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия [Текст] / Г.Г. Автандилов. – М.: Медицина. 1990. – 256 с.
2. Милованов А.П. Внутриутробное развитие человека [Текст] / А.П. Милованов, С.В. Савельев. – М.: МДВ, 2006. – 384 с.
3. Саркисов Д.С., Перов Ю.Л. Микроскопическая техника [Текст] / Д.С. Саркисов, Ю.Л. Перов. – М.: Медицина, 1996. – 544 с.
4. Семченко В.В. Постаноксическая энцефалопатия [Текст] / В.В. Семченко, С.С. Степанов, Г.В. Алексеева. – Омск, Омская областная типография, 1999. – 448 с.
5. Сорокина М.Н. Вирусные энцефалиты и менингиты у детей. [Текст] / М.Н. Сорокина, Н.В. Скрипченко. – М.: Медицина, 2004. – 416 с.
6. Хэм А. Гистология в 5 т. [Текст] / А. Хэм, Д. Кормак. – М.: Мир, 1983. – Т. 5. – 293 с.
7. Цинзерлинг В.А., Перинатальные инфекции [Текст] / В.А. Цинзерлинг, В.Ф. Мельникова. – СПб.: Элби-СПб, 2002. – 352 с.
8. Цинзерлинг В.А. Инфекционное поражение нервной системы: вопросы этиологии, патогенеза и диагностики [Текст] / / В.А. Цинзерлинг, М.Л. Чуховина. – СПб.: ЭЛБИ-МПб, 2011. – 584 с.
9. Ballabh P. Intraventricular hemorrhage in premature infants: mechanism of disease [Text] / P. Ballabh // *Pediatr. Res.* – 2010. – V. 67, N 1. – P. 1-8.
10. Belvindrah R., Lazarini F., Lledo P.M. Postnatal neurogenesis: from neuroblast migration to neuronal integration [Text] / R. Belvindrah, F. Lazarini, P. M. Lledo // *Rev Neurosci.* – 2009. – V. 20, N. 5-6. – P. 331-346.
11. Bozoyan L. Astrocytes control the development of the migration-promoting vasculature scaffold in the postnatal brain via VEGF signaling [Text] / L. Bozoyan, J. Khlgatyan, A. Saghatelian // *J. Neurosci.* – 2012. – V. 1, N 32(5). – P. 1687-1704.
12. Barkho B.Z. Identification of astrocyte-expressed factors than modulate neuronal stem/progenitor cell differentiation [Text] / B.Z. Barkho [et al.] // *Stem Cells Dev.* – 2006. – V. 15, № 3. – P. 407-421.
13. Koehler R.C. Role of astrocytes in cerebrovascular regulation [Text] / R.C. Koehler, D. Gebremedhin, D.R. Harder // *J. Appl. Physiol.* – 2006. – V. 100, N. (1). – P. 307-317.
14. GFAP-expressing cells in the postnatal subventricular zone display a unique glial phenotype intermediate between radial glia and astrocytes [Text] / X. Liu, A.J. Bolteus, D.M. Balkin [et al.] // *Glia.* – 2006 – V. 54, N 5. – P. 394-410.



15. Johansson S. Effect of inflammatory cytokines on major histocompatibility complex expression and differentiation of human neural stem/progenitor cells [Text] / S. Johansson, J. Price, M. Modo // *Stem Cells*. – 2008. – V. 26, № 9. – P. 2444-2454.

16. Neural progenitor cells regulate capillary blood flow in the postnatal subventricular zone [Text] / B. Lacar, P. Herman, J. C. Platel [et al.] // *J. Neurosci.* – 2012. – V. 14, N 32(46). – P. 16435-16448.

17. Neurogenesis continues in the third trimester of pregnancy and is suppressed by premature birth [Text] / S. Malik, G. Vinukonda, L.R. Vose [et al.] // *J Neurosci.* – 2013. – V. 9, N 33(2). – P. 411-423.

18. Systemic inflammation induces apoptosis with variable vulnerability of different brain regions [Text] / A. Semmler, T. Okulla, M. Sastre [et al.] // *J. Chem. Neuroanat.* – 2005. – V. 30, № 2-3. – P. 144-157.

19. Taga T. Role of IL-6 in the neural stem cell differentiation [Text] / T. Taga, S. Fukuda // *Clin. Rev. Allergy Immunol.* – 2005. – V. 28, № 3. – P. 249-256.

20. Zhang Y.W. Effects of hypoxia-ischemia on different neural cells in subventricular zone of human fetus [Text] / Y.W. Zhang, Y.H. Chen // *Zhonghua Er Ke Za Zhi.* – 2008. – V. 46, № 9. – P. 644-647.

VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR AND DIFFERENT CELLS IN SUBVENTRICULAR ZONE OF BRAIN OF HUMAN FETUS WITH CONGENITAL ENCEPHALITIS

**A.P. NADEEV
O.V. PEROVA
M.A. TRAVIN**

*Novosibirsk State Medical
University*

e-mail: nadeevngma@mail.ru

Peculiarities of cellular differentiation and migration neural cells subventricular zone of the fetus with congenital encephalitis. Studied subventricular zone thalamus of the brain 47 of the fetus of the signs of congenital encephalitis with a duration of gestation 24-27 weeks and 10 fetus with a duration of gestation 26-27 weeks. It is shown that the pathomorphological changes in the brain of the fetus with congenital encephalitis was characterized by productive and productive-necrotic inflammation, and were in most cases, the manifestation of the generalized intrauterine infection. With congenital encephalitis decrease cellularity subventricular zone, the increase in the number of neurons and glial cells in thalamic region, an increase in the number of cells expressing GFAP, increased proliferative activity of cells subventricular zone indicates the accelerated differentiation cells subventricular area, however, with the decline in the it education of vessels, caused by a decrease in the expression of vascular endothelial growth factor in the cells subventricular zone.

Keywords: subventricular zone, fetus, congenital encephalitis, vascular endothelial growth factor