

МОРФОМЕТРИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА РЕАКТИВНОСТИ АСТРОЦИТОВ У НЕДОНОШЕННЫХ И ДОНОШЕННЫХ ДЕТЕЙ ПРИ ИНФЕКЦИОННОЙ ПАТОЛОГИИ

С.В. Барашкова

Научно-исследовательский институт детских инфекций, Санкт-Петербург, Россия
Детская городская больница № 19 им. К.А. Раухфуса, Санкт-Петербург, Россия

Morphometric evaluation of the astrocytes reactivity in preterm and term infants with infectious diseases

S.V. Barashkova

Science Research Institute of Children's Infections, Saint-Petersburg, Russia
Children's City Hospital № 19 named after K.A. Raukhfus, Saint-Petersburg, Russia

Резюме

Цель: дать характеристику состояния астроцитарной глии в белом веществе головного мозга у недоношенных и доношенных детей при инфекционной патологии.

Материалы и методы: исследование перивентрикулярного белого вещества головного мозга было выполнено на материале от 56 умерших детей, из них 35 родилось недоношенными (24–36 недель гестации). Различные инфекционные заболевания были диагностированы у 25 детей, у остальных детей в клинической картине преобладали гипоксически-ишемические повреждения головного мозга. В качестве иммуногистохимического маркера реактивных астроцитов использовали антитела к глиальному кислом белку астроцитов. Выраженность реактивных изменений астроцитов оценивали по разработанной морфометрической шкале в зависимости от показателя среднего процента экспрессии маркера в цитоплазме астроцитов в переднем и заднем рогах боковых желудочков от общей площади исследованных участков: степень 0 – до 1,4%, I степень – 1,5–6%, II степень – 6,1–15%, III степень – свыше 15,1%.

Результаты: сравнение иммуноморфометрических показателей белого вещества не выявило значимых различий в группах с инфекциями и гипоксическими состояниями. У детей, родившихся на 24–33-й неделях гестации, в 54,84% случаев определяются слабые реактивные изменения астроглии, тогда как у детей, родившихся после 34-й недели гестации, чаще наблюдаются умеренная и выраженная степени (в совокупности 69,6%), что обусловлено созреванием астроцитов. Выраженные реактивные изменения астроцитов в 64,3% случаев сопровождаются развитием некротических очагов в перивентрикулярной области белого вещества, по нашим данным, в результате прогрессирующих дегенеративных изменений в астроцитах наиболее чувствительных к инфекционной патологии или гипоксии-ишемии. Остальные случаи относятся к тяжелому телэнцефальному глиозу, возможно, часть из них имеют недиагностированные очаги некрозов за пределами изучаемых нами участков мозга.

Заключение: морфометрическое исследование белого вещества перивентрикулярной области головного

Abstract

Objective: the aim of our work is to describe a condition of the reactive astrocytes in the white matter in preterm and term infants with infectious diseases.

Materials and methods: postmortem investigation of periventricular white matter performed on material from 56 children, 35 of them were born preterm (24–36 weeks gestation). Twenty-five children diagnosed with various infectious diseases, other have had clinical signs of hypoxic-ischemic brain injury. Immunohistochemical expression of glial fibrillary acidic protein was used as a marker for reactive astrocyte. We estimated the degree of the astrocytes reactivity, according to the mean percentage of the marker expression in anterior and posterior horns of the lateral ventricles: stage 0 – 0–1,4%, I stage – 1,5–6%, II stage – 6,1–15%, III stage – above 15,1%.

Results: comparison of the morphometric marks of the white matter showed no significant differences between groups with infections and hypoxic pathology. In 54.84% of children born at 24–33 weeks gestation determined weak stage of astroglial reactivity. Whereas due to maturation of astrocytes in children born after 34 weeks of gestation more common moderate and severe stages of astrocytes reactivity (collectively, 69,6%) was detected. Severe stage of the reactive astrocytes accompanied by the development of necrotic lesions in the periventricular white matter in 64,3% of cases, in our opinion, as a result of progressive degenerative process in glial cells. The remaining cases relates to the severe telencephalic leukoencephalopathy, perhaps some of them may contain undiagnosed necrosis outside of the white matter regions estimated in our study.

Conclusion: morphometric study of the periventricular white matter using a marker of astrocytes allows to assess their reactive changes and to perform differential diagnosis of main forms of white matter injury in infants.

мозга с использованием маркера астроцитов позволяет оценить их реактивные изменения и провести дифференциальную диагностику основных форм поражений нервной ткани.

Ключевые слова: повреждение белого вещества, морфометрия, GFAP, реактивные астроциты, недоношенные дети, доношенные дети, инфекционная патология, гипоксия-ишемия.

Введение

Астроциты являются самыми многочисленными глиальными клетками как в белом, так и в сером веществе головного мозга (ГМ), выполняющими разнообразные функции. Благодаря своей тесной связи со всеми компонентами нервной ткани и с сосудистым руслом, астроглия одна из первых принимает на себя различные неблагоприятные воздействия, становясь реактивной. В результате происходит гипертрофия тел клеток, утолщение и удлинение их отростков, обусловленные дисрегуляцией отдельных генов, отвечающих за синтез нейрофибрилл, таких как GFAP (glial fibrillary acidic protein), виментин и др. [1 – 3]. Данные морфологические проявления реактивного астроглиоза наблюдаются при многих видах повреждения ткани ГМ, например, при механической травме, нейродегенеративных заболеваниях, гипоксии-ишемии и инфекционном процессе [2, 4 – 6]. Многими исследователями реактивные астроциты рассматриваются в качестве маркеров различного патологического процесса в ткани мозга [2, 5, 7]. При этом меняются как морфология, так и функция астроцитов, что отражается на состоянии всех контактирующих с ними клеток и сосудов мозга и приводит к комплексным сложным нейропатологическим нарушениям.

Иммуногистохимическое окрашивание (ИГХ) ткани мозга сывороткой к глиальному фибриллярному кислом белку астроцитов (GFAP) широко используется для специфического выявления реактивных астроцитов [2, 5, 8]. При отсутствии патологии мозга GFAP не обнаруживается в астроцитах на иммуногистохимически определяемом уровне [5, 9].

Несмотря на то, что в последние десятилетия проведены многочисленные и разноплановые исследовательские работы, посвященные различным аспектам астроцитарной глии в норме и при патологии, до настоящего времени остаются мало изученными многие вопросы, касающиеся механизмов и времени формирования, биологического значения, обратимости реактивного астроцитоза, а также критериев диагностики и возрастных особенностей данного состояния [5].

На протяжении многих лет существовала распространённая точка зрения, что реактивный астроглиоз является биологическим феноменом,

Key words: white matter injury, morphometry, GFAP, reactive astrocytes, preterm, term, infections, hypoxia-ischemia.

приводящим только к неблагоприятным последствиям [5]. В последние годы появилось много работ, посвященных изучению нейропротекторной функции реактивных астроцитов, способных, например, захватывать потенциально нейротоксичный глутамат, способствовать восстановлению гематоэнцефалического барьера и снижению вазогенного отека [9], ослаблять воздействие оксидативного стресса посредством синтеза глутатиона [10] и другими путями. На моделях у трансгенных мышей с полной или частичной абляцией генов, отвечающих за синтез GFAP и виментина, различные исследовательские группы показали отчетливую протективную роль реактивных астроцитов при различных видах повреждения центральной нервной системы (ЦНС) [1, 4]. Многие авторы указывают на способность реактивных астроцитов синтезировать как противовоспалительные, так и провоспалительные цитокины, что зависит от различных сроков после воздействия повреждающего фактора, удаленности от центра очага и от характера самого триггерного сигнала [11, 12]. Кроме того, астроциты при выраженной степени реактивных изменений формируют глиальные рубцы, тем самым ограничивая распространение воспалительного инфильтрата, проникновение инфекционных агентов в здоровые участки мозга, а также отграничивая зоны некрозов и аутоиммунного воспалительного процесса [12, 13]. В то же время глиальные рубцы препятствуют регенерации аксонов, что было отмечено еще в начале XX в. (Ramon y Cajal S., 1928).

Реактивный астроглиоз не является стационарным состоянием. Так, M.V. Sofroniew (2009) указывает на возможность обратного развития слабого и умеренного астроглиоза при устранении повреждающего фактора [12]. D.J. Myer et al. (2006) в своей экспериментальной работе показали, что активированные астроциты могут сохраняться в течение 28 дней после повреждения, способствуя сохранению коркового вещества при воздействии травматических повреждающих факторов средней силы [4].

До настоящего времени отсутствуют определенные критерии диагностики глиоза как у взрослых, так и у детей. F.H. Gilles и S.F. Murphy (1969) при выявлении гипертрофированных астроцитов и остро поврежденной глии в гистологических

срезах белого вещества (БВ) больших полушарий головного мозга новорожденных, окрашенных рутинными методами, применяли термин «Перинатальная телэнцефальная лейкоэнцефалопатия» [7]. В.В. Власюк (2013) определяет телэнцефальный глиоз (ТГ) как неполный некроз БВ ГМ [14]. M.V. Sofroniew (2009) предполагает, что реактивный астроглиоз – это спектр возможных молекулярных, клеточных и функциональных изменений в астроцитах, возникающих в ответ на все виды и тяжести повреждений ЦНС, и заболевания, включающие тонкие перестройки [12]. При этом он выделяет легкую, умеренную и тяжелую стадии развития данного процесса на основании степени дисрегуляции экспрессии GFAP и перекрытия отростков соседствующих клеток [5].

Для количественного анализа морфологических изменений, в том числе в реактивных GFAP-положительных астроцитах, используется морфометрический метод. Проведенные за последнее десятилетие морфометрические исследования выявили наиболее характерные признаки реактивных астроцитов в виде гипертрофии тела клеток и утолщения их отростков [3, 6], отмечена зависимость изменения морфометрических параметров, относящихся к отросткам астроцитов, от вида повреждения, его тяжести и расположения клетки по отношению к центру повреждения, выделены отличия реактивных изменений в фибриллярных и протоплазматических астроцитах при механической травме зрительного нерва [3]. Большинство доступных в литературе работ посвящено исследованиям реактивных астроцитов на моделях повреждений ткани мозга у животных. При этом область исследования охватывает преимущественно кору мозга [4], гиппокамп [15], зрительный нерв и мозолистое тело [3]. Морфометрический анализ астроглиоза в БВ при этом освещен скудно, а данные по астроцитарному глиозу у детей, родившихся раньше срока или в срок, недостаточны.

Цель исследования – дать характеристику состояния реактивных изменений астроцитарной глии в белом веществе головного мозга у доношенных и доношенных детей при инфекционной патологии.

Материалы и методы

Исследование проведено на аутопсийном материале от 56 детей со сроком гестации от 24 до 42 недель (масса тела от 320 г до 5100 г), отобранных случайным образом из текущего материала патолого-анатомических бюро и отделений города Санкт-Петербурга и Ленинградской области с 2010 по 2014 г. Критериями включения в исследование являлось наличие инфекционного заболевания и/или гипоксического состояния на момент

смертельного исхода, возраст до 1 года жизни, отсутствие аутолитических изменений секционного материала, подтвержденной наследственной патологии, врожденных аномалий ГМ, нейродегенеративных и опухолевых процессов.

Из медицинской документации умерших детей регистрировались срок гестации и антропометрические данные при рождении, оценка по шкале Апгар, заключение по гистологическому исследованию последа, возраст на момент смертельного исхода, длительность и нозология основного заболевания, макро- и микроскопические изменения внутренних органов, результаты прижизненных и посмертных бактериологических и вирусологических исследований, также учитывались клинико-anamnestические данные по беременности и родам, возраст и патология матери.

Во всех случаях выполнялось гистологическое исследование фиксированных в забуференном формалине фрагментов БВ со стенкой боковых желудочков ГМ из области угла переднего рога (ПР) на уровне отверстия Монро, а также из области начала заднего рога (ЗР) с той же стороны. Гистологическая проводка материала проводилась с использованием автоматического процессора замкнутого типа Shandon Excelsior ES, Thermo (Англия). С готовых гистологических блоков, залитых в гомогенизированный парафин, изготавливали срезы толщиной 4–5 мкм, депарафинизировали в ксилоле, дегидратировали в спиртах и окрашивали по стандартной методике гематоксилин-эозином. После просмотра материала на световом микроскопе Nikon Eclipse E200 при увеличениях $\times 40$, $\times 100$, $\times 400$ (окуляр Nikon CFI 10 \times /20, объективы Nikon E Plan 4 \times /0.10 WD 30, Nikon E Plan 10 \times /0.25 WD 7.0, Nikon E Plan 40 \times /0.65 WD 0.65) с тех же парафиновых блоков изготавливались срезы, помещенные на предметные стекла с поли-L-лизиновым покрытием для проведения ИГХ. Процедура ИГХ-окрашивания на GFAP проводилась ручным методом на предметных стеклах после предварительной депарафинизации и дегидратации. Эндогенную пероксидазу блокировали готовым раствором Peroxidase-Blocking Reagent, Dako, тщательно промывали в буфере с pH 7,4. Затем наносили первичные моноклональные мышиные антитела anti-Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP), GA-5, BioGenex (США) в разведении 1:200, инкубировали при комнатной температуре 30 мин. После промывочного буфера инкубировали с системой детекции Envision Flex/HRP, Dako (Германия) в течение 20 мин. Для визуализации продукта реакции применяли DAB + Chromogen, Dako (Германия) с инкубацией 3 мин. После промывания докрашивали гематоксилином, дегидратировали, проводили по ксилолу и заключали срезы под покровные стекла. В качестве положительного кон-

троля использовались срезы с астроцитомой мозжечка. Кроме того, в 55 случаях было выполнено ИГХ-исследование ткани БВ на наличие антигенов возбудителей (вируса герпеса 1-го и 2-го типов, цитомегаловируса, хламидии трахоматис, микоплазмы, токсоплазмы гондии, энтеровируса, вируса Эпштейна – Барр, вируса ветряной оспы, аденовируса).

Для морфометрического исследования с микропрепаратов, окрашенных иммуногистохимически на GFAP, выполнялось микрофотографирование на цифровой камере Nikon DS-Fi1 с программным обеспечением Nis-Elements F 3.2 с постоянными параметрами. Морфометрическая обработка снимков с шести произвольно выбранных участков БВ при увеличении $\times 400$ на расстоянии 1–2 мм от стенки желудочка, не захватывающих подкорковые ядра и матричную зону, проводилась в программе ВидеоТест 5.0 (Россия) при постоянных настройках. Регистрировались следующие параметры GFAP-положительно окрашенных клеток: площадь экспрессии положительного сигнала, площадь ядра (мкм^2). В программе MMSCatalog (Россия) на микрофотографиях измерялся процент площади экспрессии GFAP сигнала от общей площади, охватывающей 6 снимков ($209\ 100\ \text{мкм}^2$). На основании результатов гистологического исследования БВ и иммуноморфометрического анализа микрофотографий с GFAP-окрашиванием выраженность реактивных изменений астроцитов была подразделена на легкую, умеренную и тяжелую степени. В зависимости от показателя среднего процента экспрессии GFAP в ПР и ЗР боковых желудочков от общей площади исследованных участков легкая степень (I) реактивного астроцитоза устанавливалась при 1,5–6%, умеренная (II степень) – при 6,1–15% и выраженная (III степень) – при экспрессии свыше 15,1%. Экспрессия до 1,5% принята нами за нормальный уровень в связи с минимальными изменениями со стороны астроглии.

Кроме реактивных астроцитов, в нашей работе будут упомянуты повреждения олигодендроглии, анализ изменений которой выходит за рамки данного исследования. Стоит отметить лишь, что наибольшая чувствительность олигодендроцитов (ОД) к повреждающим воздействиям отмечается на стадии предшественников ОД в период с 23-й по 32-ю неделю гестации. Более подробные сведения по патологии ОД можно найти в работах J.J. Volpe [16], S.A. Back et al. [17–19] и др.

Сравнительный анализ регистрируемых показателей проведен в двух группах по преобладающей в клинике основной патологии: 1) с инфекционной патологией (25 детей); 2) с преобладающими гипоксическими состояниями (29 детей).

В соответствии со сроком гестации при рождении дети были разделены на 2 группы: 1) дети

с гестационным сроком при рождении от 24 до 33 недель (31 ребенок, 55,4%); 2) дети со сроком гестации от 34 до 42 недель (23 ребенка, 41%). Критерием распределения детей по перечисленным группам послужили критические сроки наибольшей чувствительности олигодендроглии и астроглии соответственно [16].

По результатам рутинного гистологического исследования белого вещества головного мозга и ИГХ-исследования были сформированы 3 группы: 1) отечно-геморрагическая лейкоэнцефалопатия (ОГЛ), которая характеризовалась выраженным отеком мозга с острым повреждением глии, преимущественно олигодендроцитов, и кровоизлияний (12 детей, 21,4%); 2) телэнцефальный глиоз (ТГ), где преобладали реактивно-пролиферативные изменения астроцитов (28 случаев, 50%); 3) перивентрикулярная лейкомаляция (ПВЛ) в виде коагуляционных некрозов в белом веществе перивентрикулярной области в сочетании с ОГЛ или ТГ (16 детей, 28,6%).

Статистическая обработка полученных результатов осуществлялась в программе STATISTICA 7.0 с применением непараметрических методов статистики, поскольку при анализе параметров выборки установлено несоответствие большинства количественных показателей закону нормального распределения. Оценка значимости различий показателей в группах оценивалась с использованием метода Манна – Уитни для двух групп и метода дисперсионного анализа Крускала – Уоллиса для трех и более групп. Значимость различий между группами считали при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Медиана гестационного возраста при рождении детей составила 30,75 недель (25 и 75 проценты – 26 и 38,5 недель соответственно), масса тела при рождении – 1502 г (945 г; 3000 г), длина тела 39 см (34 см; 50 см). Из 56 детей родилось недоношенными 35 человек (64,8%, 24–36 недель гестации), в том числе пятеро детей погибли во время родов, доношенными – 19 детей (35,2%, 37–42 недели гестации), в том числе 5 детей погибли в интранатальном периоде. В двух случаях данные о показателях массы, длины тела и срока гестации при рождении отсутствовали. В исследование вошло 29 мальчиков и 27 девочек. Медиана продолжительности жизни детей, родившихся живыми, составила 0,19 месяца (6 суток) (25 и 75 проценты – 0,03 месяца (1 сутки) и 2,26 месяца (70 суток) соответственно), при этом в 51 случае (91,1%) основное заболевание, приведшее к летальному исходу, имелось с рождения.

При анализе этиологических факторов инфекционных заболеваний возбудителя, непосредственно вызывающего реактивные изменения

астроцитов в БВ ГМ у детей, вошедших в исследование, выявлено не было. При ИГХ-окрашивании БВ перивентрикулярной области на антигены различных возбудителей выявлены 2 случая с экспрессией антигенов вируса простого герпеса 1-го и 2-го типов с клинико-морфологическими проявлениями некротического менингоэнцефалита и в 1 случае с нарушением мозгового кровообращения выявлена экспрессия антигенов цитомегаловируса.

Инфекционная патология в качестве основной причины смерти зарегистрирована у 25 детей (44,6%) – I группа, из них 13 детей (52%) умерли от генерализованных форм различных инфекций, 8 человек – от пневмонии различной этиологии (32%) и 4 ребенка – от инфекционных поражений ЦНС (16%). Патология, сопровождавшаяся преобладающим в клинике гипоксическим состоянием, была отмечена на момент смертельного исхода у 29 детей (51,8%) – II группа, из них 25 новорожденных (86,2%) перенесли асфиксию в родах различной степени тяжести, 4 ребенка (13,8%) страдали от тяжелых пороков сердечно-сосудистой системы. Еще 2 детей не вошли в сравниваемые группы в связи с внезапной смертью (3,6%): у одного ребенка, умершего на 5-е сутки жизни, установлен синдром внезапной смерти, у второго, прожившего 1 сутки, обнаружена врожденная смешанная кардиопатия с проявлениями хронической сердечной недостаточности.

Большинство клинических и иммуноморфометрических параметров имели схожие значения в сравниваемых группах. Кроме того, не отмечено различий по патологии БВ ГМ у детей с инфекционными заболеваниями и гипоксическими состояниями ($p > 0,05$). Тем не менее, при сравнении анамнестических сведений выявлено, что в группе с гипоксическими состояниями дети чаще, чем в группе с инфекциями, рождались от первой и второй беременности (18 детей, 62% и 10 детей, 40% соответственно, $p = 0,037$). Оценка по шкале Апгар на 3-й и 5-й минутах у новорожденных с инфекционной патологией была значимо выше, чем у детей, родившихся в гипоксии ($p = 0,005$ и $p = 0,01$ соответственно). Продолжительность жизни детей с инфекционной патологией была больше по сравнению с детьми, страдавшими гипоксическими состояниями ($Me = 1,26$ месяца (0,19; 3,52) и 0,07 (0; 0,65) соответственно, $p = 0,000$). На момент смертельного исхода основное заболевание также имело более длительное течение в I группе, чем во второй ($Me = 0,39$ мес. (0,19; 2,26) и 0,07 (0; 0,65) соответственно, $p = 0,005$). Пневмонию в качестве основного заболевания или смертельного осложнения чаще регистрировали в группе с инфекционной патологией, чем с гипоксическими состояниями (17 детей против 8, 68% и 27,6% соответ-

ственно, $p = 0,01$). Попытка выявления какого-либо преобладающего инфекционного возбудителя у детей с поражениями БВ головного мозга не дала результатов.

При статистической обработке морфометрических параметров статистически значимое различие выявлено лишь по показателю площади ядер GFAP-положительных астроцитов в БВ, взятом из области ПР боковых желудочков мозга (в I группе $Me = 29,5$ мкм² (25,9; 37,9), во II – 41,8 мкм² (32,2; 47,6) соответственно, $p = 0,002$), что, вероятно, связано с чувствительностью ядер к гипоксии, но требует дальнейшего изучения и анализа. При сравнении групп по остальным параметрам, а также по степени выраженности реактивного глиоза значимых различий выявлено не было ($p = 0,42$).

Учитывая особенности нейроонтогенеза, были выделены две группы сравнения в соответствии со сроком гестации при рождении. В I группу были включены дети, родившиеся на 24–33-й неделе беременности (31 ребенок, 55,4%), во II группу были объединены доношенные новорожденные и дети, родившиеся близко к доношенному сроку гестации, от 34 до 42 недель (23 ребенка, 41%). У двоих детей (3,6%) отсутствовали антропометрические данные при рождении. Причины смерти не имели статистически значимых различий в сравниваемых группах. При сравнении по данному критерию выявлены закономерно значимые различия по гестационному сроку, массе и длине тела при рождении, представленные в таблице 1.

Таблица 1

Антропометрические показатели в сравниваемых группах

Показатель	I группа (Me, 25 и 75 перцентили)	II группа (Me, 25 и 75 перцентили)
Гестационный возраст, нед.	26 (25; 29,5)	40 (36,5; 40)
Масса тела при рождении, г	960 (800; 1370)	3050 (2600; 3676)
Длина тела при рождении, см	34 (31; 37)	50,5 (47; 53)

$p = 0,000$.

В I группе 6 детей родилось от многоплодных беременностей, в то время как во второй группе все беременности были одноплодные. У 20 (64,5%) новорожденных, родившихся до 33-й недели беременности, были диагностированы внутрочерепные кровоизлияния различной степени тяжести и локализации, тогда как во второй группе – лишь у 4 детей (17,4%).

При анализе иммуноморфометрических показателей групп детей, родившихся на 24–33-й неделе гестации и 34–42-й неделе выявлены ста-

статистически значимые различия по степени выраженности реактивного астроглиоза (табл. 2).

Таблица 2

Распределение степени выраженности реактивного астроглиоза среди недоношенных и доношенных детей

Группа	Степень выраженности реактивного астроглиоза, абс. число (%)			
	0	1	2	3
I группа, n=31	5 (16,13)	17 (54,84)	4 (12,9)	5 (16,13)
II группа, n=23	2 (8,7)	5 (21,74)	8 (34,78)	8 (34,78)

p=0,012.

При этом в I группе большинство случаев приходится на легкую степень (54,84%), тогда как у новорожденных из II группы чаще выявляются умеренные и выраженные реактивные изменения (в совокупности 69,6%), что обусловлено, в первую очередь, морфофункциональной зрелостью астроцитарной глии у детей, родившихся после 34-й недели гестации.

Соответственно, ожидаемая закономерность отмечена по показателям процента экспрессии GFAP-сигнала в ПР, ЗР и их средних значениях, а также площади (S) цитоплазмы GFAP-положительных клеток в обеих локализациях (табл. 3).

Таблица 3

Основные морфометрические параметры в сравниваемых группах (Me, 25; 75 перцентили)

Показатель	Группа I	Группа II	Значение p
Экспрессия GFAP ПР, %	3,57 (1,94; 11,07)	13,27 (3,2; 18,18)	0,015
Экспрессия GFAP ЗР, %	2,73 (1,2; 8,55)	12,64 (6,11; 16,0)	0,009
Средний % экспрессии GFAP (ПР + ЗР)	3,55 (1,77; 11,12)	12,2 (4,66; 17,8)	0,008
S GFAP цитоплазмы ПР, мкм ²	55,14 (44,5; 75,3)	100,29 (48,2; 157,1)	0,024
S GFAP цитоплазмы ЗР, мкм ²	54,11 (44,2; 81,7)	92,8 (55,7; 111,06)	0,046

При анализе патологии БВ ГМ у детей статистически значимых различий в сравниваемых группах не выявлено (p=0,2). В то же время у недоношенных детей в 32,3% случаев против 8,7% во II группе обнаруживались морфологические критерии ОГЛ.

При сравнительном анализе по группам патологии белого вещества ГМ у детей выявлены статистически значимые различия по сроку гестации и массе тела при рождении (табл. 4). Остальные антропометрические показатели имели схожие значения в группах.

Таблица 4

Основные антропометрические показатели в сравниваемых группах (Me, 25; 75 перцентили)

Показатель	ОГЛ	ТГ	ПВЛ	Значение p
Гестационный возраст, нед.	26 (25; 27,75)	35,5 (28; 40)	30,5 (27; 38,5)	0,045
Масса тела при рождении, г	905 (802,5; 1018,5)	2150 (1130; 3050)	1573 (1000; 3050)	0,027

В распределении степени выраженности реактивных изменений астроцитов отмечена закономерность в зависимости от патологии белого вещества головного мозга (рис. 1).

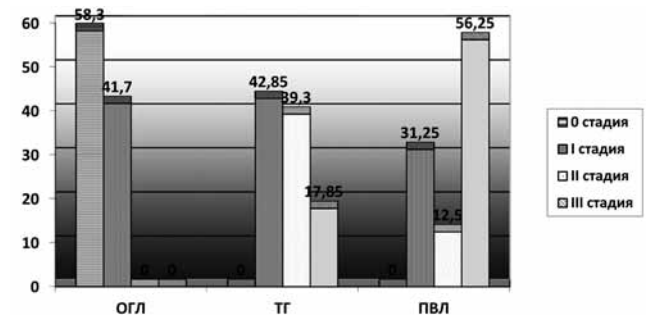


Рис. 1. Степень выраженности реактивного астроцитоза при патологии БВ (p=0,000)

В группе ОГЛ в большинстве случаев проявления реактивного астроглиоза отсутствовали (58,3% случаев) или определялись на уровне до 6% экспрессии GFAP (41,7% случаев). При этом анализируемые анамнестические признаки у детей в этой группе при наличии реактивных астроцитов и их отсутствии не имели статистически значимых различий. Основные морфометрические параметры, имеющие значимые различия при отсутствии или наличии реактивных изменений, приведены на рисунке 2.

В гистологической картине у детей с ОГЛ преобладали отек БВ полушарий головного мозга с нарушениями гемодинамики различной степени выраженности, а также выявлялась остро поврежденная олигодендроглия с кариопикнозом, иногда кариорексисом. Гипертрофия цитоплазмы астроцитов обнаруживалась только при ИГХ-окрашивании в виде единичных GFAP-положительных клеток с небольшим телом, тонкими длинными отростками или гипертрофией сосудистой ножки. Увеличение числа ядер в астроцитах во всех случаях отсутствовало.

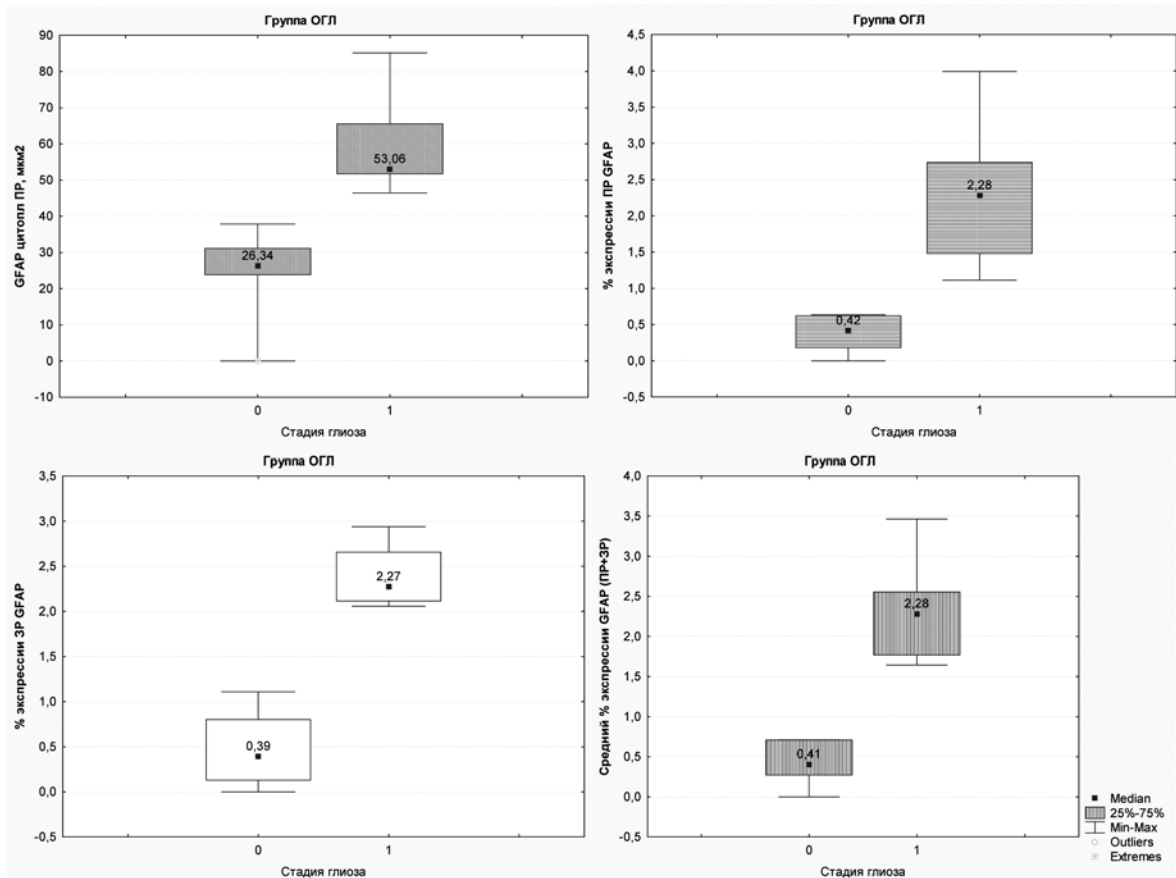


Рис. 2. Морфометрические показатели у детей с ОГЛ в зависимости от наличия (1) или отсутствия (0) реактивных астроцитов ($p < 0,05$)

У детей с ТГ в 42,85% случаев отмечались легкие проявления реактивных изменений астроцитов, у 11 детей (39,3%) была умеренная степень и в 5 случаях (17,85%) был обнаружен тяжелый реактивный глиоз. Легкая степень реактивного астроглиоза, в отличие от группы с ОГЛ, только в 25% случаев против 100% сопровождалась геморрагическим повреждением ГМ ($p = 0,02$). В морфологической кар-

тине в меньшей степени имелись проявления отека БВ и повреждений олигодендроцитов по сравнению с ОГЛ, в отдельных астроцитах была видна гипертрофированная цитоплазма при обычной окраске гематоксилином-эозином. При ИГХ-исследовании регистрировался более высокий средний процент экспрессии GFAP-цитоплазмы (ПР + ЗР) и отдельно в ПР, чем в группе с ОГЛ и ПВЛ (рис. 3).

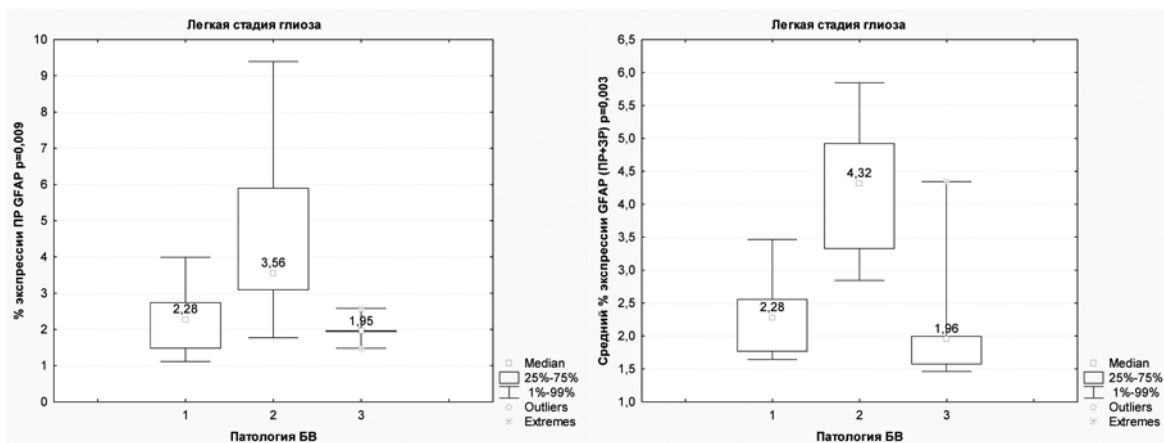


Рис. 3. Морфометрические показатели астроцитов при легкой степени реактивного глиоза в зависимости от патологии БВ (1 – ОГЛ, 2 – ТГ, 3 – ПВЛ)

При II степени реактивных изменений выявлялись двуядерные формы астроцитов, а также периваскулярные амфотильные шарики, свидетельствующие о хронической повышенной проницаемости сосудистых стенок. В связи с малым числом случаев умеренной степени в группе ПВЛ (2 случая) провести сравнение морфометрических показателей не представляется возможным.

Тяжелые реактивные изменения со стороны астроцитов сопровождались нарушением компартментализации клеток в виде перекрытия их отростков, формирующих в отдельных случаях густую сеть GFAP-положительных волокон, или сближением тел реактивных астроцитов с ретракцией их отростков. В большем количестве реактивных астроцитов наблюдалось увеличение числа ядер, нарастание дистрофических и дегенеративных изменений. При сравнении морфометрических показателей при тяжелой степени в группе ТГ и ПВЛ статистически значимые различия не обнаружены.

В группе с ПВЛ у 5 детей (31,25%) очаги некрозов сопровождались легкими реактивными изменениями астроцитов, при этом в 3 случаях фоновой морфологической картиной служили проявления отечно-геморрагического поражения БВ. Остальные случаи с некротическими очагами в перивентрикулярной области встретились на фоне ТГ с реактивными изменениями астроцитов от легкой до выраженной степени, на последнюю из них пришлось большинство случаев (56,25%). При сравнении стадий течения ПВЛ и реактивного астроцитоза статистически значимые различия отсутствовали. Однако у троих детей, умерших на 2-е, 4-е и 5-е сутки жизни, очаги некроза белого вещества в острой стадии развития обнаруживались в сочетании с тяжелыми проявлениями реактивного астроглиоза, что свидетельствует в пользу внутриутробного происхождения последнего, служащего в качестве фонового состояния БВ для развития некротических поражений в перивентрикулярной области.

Выводы

1. Морфологические изменения в белом веществе перивентрикулярной области полушарий головного мозга, а также иммуногистохимические и морфометрические показатели реактивной астроцитарной глии в группах детей с инфекционными заболеваниями и гипоксическими состояниями различий не имеют. Полученные результаты соответствуют литературным данным о схожих патогенетических механизмах при повреждении белого вещества головного мозга у детей [20].

2. У детей, родившихся на 24–33-й неделях гестации, в 54,84% случаев определяются иммуноморфометрические показатели слабой степени

реактивного астроглиоза, тогда как у доношенных детей и детей, родившихся близко к доношенному сроку гестации, реактивные изменения астроцитов чаще соответствуют умеренной и выраженной степени (в совокупности 69,6%), что обусловлено, в первую очередь, морфофункциональным созреванием астроцитов.

3. При выраженном реактивном астроглиозе определяются прогрессирующие дегенеративные изменения со стороны астроцитов (кариопикноз, сморщивание GFAP-положительной цитоплазмы и ретракция отростков), которые в 64,3% случаев сопровождаются развитием некротических очагов в перивентрикулярной области белого вещества. Остальные 35,7% случаев приходятся на морфологические проявления тяжелого телэнцефального глиоза, часть детей из этой группы, возможно, имеют недиагностированные очаги некрозов за пределами изучаемых нами участков мозга. На возможные неблагоприятные последствия астроцитов указывают многие исследователи, но механизм развития этого феномена до конца не ясен [12].

4. Иммуногистохимическое исследование ткани головного мозга с применением маркера GFAP с высокой точностью позволяет проводить дифференциальную диагностику между различными формами поражений белого вещества.

Литература

- Li, J. Tumor Necrosis Factor α mediates lipopolysaccharide-induced microglial toxicity to developing oligodendrocytes when astrocytes are present / J. Li [et al.] // *J Neurosci.* — 2008. — V. 28 (20). — P. 5321–5330.
- Sun, D. Structural remodeling of astrocytes in the injured CNS / D. Sun, T.C. Jakobs // *Neuroscientist.* — 2012. — V. 18 (6). — P. 567–588.
- Sun, D. Structural remodeling of fibrous astrocytes after axonal injury / D. Sun [et al.] // *J Neurosci.* — 2010. — V. 30 (42). — P. 14008–14019.
- Myer, D.J. Essential protective roles of reactive astrocytes in traumatic brain injury / D.J. Myer [et al.] // *Brain.* — 2006. — V. 129. — P. 2761–2772.
- Sofroniew, M.V. Astrocytes: biology and pathology / M.V. Sofroniew, H.V. Vinters // *Acta Neuropathol.* — 2010. — V. 119. — P. 7–35.
- Wilhelmsson, U. Absence of glial fibrillary acidic protein and vimentin prevents hypertrophy of astrocytic processes and improves post-traumatic regeneration / U. Wilhelmsson [et al.] // *J Neurosci.* — 2004. — V. 24 (21). — P. 5016–5021.
- Gilles, F.H. Perinatal telencephalic leucoencephalopathy / F.H. Gilles, S.F. Murphy // *Neurol Neurosurg Psychiatry.* — 1969. — V. 32 (5). — P. 404–413.
- Eng, L.F. Glial fibrillary acidic protein: GFAP thirty-one years (1969–2000) / L.F. Eng, R.S. Ghimikar, Y.L. Lee // *Neurochem Res.* — 2000. — V. 25 (9–10). — P. 1439–1451.
- Bush, T.G. Leukocyte infiltration, neuronal degeneration, and neurite outgrowth after ablation of scar-forming, reactive astrocytes in adult transgenic / T.G. Bush [et al.] // *Neuron.* — 1999. — V. 23. — P. 297–308.
- Chen, Y. Astrocytes protect neurons from nitric oxide toxicity by glutathione-dependent mechanism / Y. Chen [et al.] // *J Neurochem.* — 2001. — V. 77. — P. 1601–1610.

11. Lau, L.T. Astrocytes produce and release Interleukin-1, Interleukin-6, Tumor Necrosis Factor Alpha and Interferon-Gamma following traumatic and metabolic injury / L.T. Lau, C.-H. Yu // *J Neurotrauma*. — 2001. — V. 18 (3). — P. 351–359.

12. Sofroniew, M.V. Molecular dissection of reactive astroglial scar formation / M.V. Sofroniew // *Trends Neurosci*. — 2009. — V. 32 (12). — P. 638–647.

13. Drögemüller K. Astrocyte gp130 expression is critical for the control of Toxoplasma encephalitis / K. Drögemüller [et al.] // *J Immunol*. — 2008. — V. 181 (4). — P. 2683–2693.

14. Власюк, В.В. Патология головного мозга у детей — при инфекциях, гипоксически-ишемических поражениях и пороках развития / В.В. Власюк. — СПб.: ЛЕМА, 2012. — 160 с.

15. Wilhelmsson, U. Redefining the concept of reactive astrocytes as cells that remain within their unique domains upon reaction to injury / U. Wilhelmsson [et al.] // *PNAS*. — 2006. — V. 103 (46). — P. 17513–17518.

16. Volpe, J.J. *Neurology of the newborn* / J.J. Volpe — Philadelphia: Elsevier Health Sciences, 2008. — 1094 p.

17. Back, S.A. Maturation-dependent vulnerability of perinatal white matter in premature birth / S.A. Back, A. Riddle, M.M. McClure // *Stroke*. — 2007. — V. 38 (2). — P. 724–730.

18. Back, S.A. Selective vulnerability of late oligodendrocyte progenitors to hypoxia-ischemia / S.A. Back [et al.] // *J Neurosci*. — 2002. — V. 22 (2). — P. 455–463.

19. Back, S.A. Late oligodendrocyte progenitors coincide with the developmental window of vulnerability for human perinatal white matter injury / S.A. Back [et al.] // *J Neurosci*. — 2001. — V. 21 (4). — P. 1302–1312.

20. Khwaja, O. Pathogenesis of cerebral white matter injury of prematurity / O. Khwaja, J.J. Volpe // *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. — 2008. — V. 93 (2). — P. F153–F161.

References

1. Li J, Ramenaden R, Peng J, Koito H, Volpe JJ, Rosenberg PA. Tumor Necrosis Factor α mediates lipopolysaccharide-induced microglial toxicity to developing oligodendrocytes when astrocytes are present. *J Neurosci*. 2008 May; 28(20): 5321–30.

2. Sun D, Jakobs TC. Structural remodeling of astrocytes in the injured CNS. *Neuroscientist*. 2012 Dec; 18(6): 567–88.

3. Sun D, Lye-Barthel M, Masland RH, Jakobs TC. Structural remodeling of fibrous astrocytes after axonal injury. *J Neurosci*. 2010 Oct; 30(42): 14008–14019.

4. Myer DJ, Gurkoff GG, Lee SM, Hovda DA, Sofroniew MV. Essential protective roles of reactive astrocytes in traumatic brain injury. *Brain*. 2006 Jul; 129: 2761–2772.

5. Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol*. 2010 Dec; 119: 7–35.

6. Wilhelmsson U, Li L, Pekna M, Berthold C-H, et al. Absence of glial fibrillary acidic protein and vimentin prevents hypertrophy of astrocytic processes and improves post-traumatic regeneration. *J Neurosci*. 2004 May; 24(21): 5016–5021.

7. Gilles FH, Murphy SF. Perinatal telencephalic leukoencephalopathy. *Neurol Neurosurg Psychiatr*. 1969; 32(5): 404–413.

8. Eng LF, Ghirnikar RS, Lee YL. Glial fibrillary acidic protein: GFAP thirty-one years (1969–2000). *Neurochem Res*. 2000 Oct; 25(9-10): 1439–51.

9. Bush TG, Puvanachandra N, Horner CH, et al. Leukocyte infiltration, neuronal degeneration, and neurite outgrowth after ablation of scar-forming, reactive astrocytes in adult transgenic. *Neuron*. 1999 Jun; 23: 297–308.

10. Chen Y, Vartiainen NE, Ying W, Chan PH, Koistinaho J, Swanson RA. Astrocytes protect neurons from nitric oxide toxicity by glutathione-dependent mechanism. *J Neurochem*. 2001 March; 77: 1601–1610.

11. Lau LT, Yu C-H. Astrocytes produce and release Interleukin-1, Interleukin-6, Tumor Necrosis Factor Alpha and Interferon-Gamma following traumatic and metabolic injury. *J Neurotrauma*. 2001; 18(3): 351–359.

12. Sofroniew MV. Molecular dissection of reactive astroglial scar formation. *Trends Neurosci*. 2009 Dec; 32(12): 638–647.

13. Drögemüller K, Helmuth U, Brunn A, et al. Astrocyte gp130 expression is critical for the control of Toxoplasma encephalitis. *J Immunol*. 2008; 181(4): 2683–2693.

14. Vlasyuk V.V. The pathology of children's brain — in infections, hypoxic-ischemic injury and malformations. Saint-Petersburg; 2012 (in Russian).

15. Wilhelmsson U, Bushong EA, Price DL, et al. Redefining the concept of reactive astrocytes as cells that remain within their unique domains upon reaction to injury. *PNAS*. 2006 Nov; 103(46): 17513–17518.

16. Volpe JJ. *Neurology of the newborn*. Philadelphia: Elsevier Health Sciences; c 2008. 1094 p.

17. Back SA, Riddle A, McClure MM. Maturation-dependent vulnerability of perinatal white matter in premature birth. *Stroke*. 2007 Nov; 38(2): 724–730.

18. Back SA, Han BH, Luo NL, et al. Selective vulnerability of late oligodendrocyte progenitors to hypoxia-ischemia. *J Neurosci*. 2002 Jan; 22(2): 455–463.

19. Back SA, Luo NL, Borenstein NS, et al. Late oligodendrocyte progenitors coincide with the developmental window of vulnerability for human perinatal white matter injury. *J Neurosci*. 2001 Feb; 21(4): 1302–1312.

20. Khwaja O, Volpe JJ. Pathogenesis of cerebral white matter injury of prematurity. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2008 March; 93(2): F153–F161.

Автор:

Барашкова Светлана Валерьевна — заочный аспирант отдела тканевых и патоморфологических методов исследования Научно-исследовательского института детских инфекций, заведующая патолого-анатомическим отделением, врач-патологоанатом Детской городской больницы № 19 им. К.А. Раухфуса; тел.: 8(812)578-75-64, e-mail: patanatomdgb19@yandex.ru