

*На правах рукописи*

**ОКУНЕВА ОЛЕСЯ СЕРГЕЕВНА**

**РОЛЬ АДФ-РИБОЗИЛЦИКЛАЗЫ/CD38 В ПАТОГЕНЕЗЕ  
ПЕРИНАТАЛЬНОГО ГИПОКСИЧЕСКИ-ИШЕМИЧЕСКОГО  
ПОРАЖЕНИЯ ГОЛОВНОГО МОЗГА**

**14.00.16 – патологическая физиология  
14.00.09 - педиатрия**

**АВТОРЕФЕРАТ**  
**диссертации на соискание ученой степени**  
**кандидата медицинских наук**

**Томск – 2009**

Работа выполнена в ГОУ ВПО «Красноярская государственная медицинская академия имени профессора В.Ф.Войно-Ясенецкого Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию РФ»

**Научные руководители:**

доктор медицинских наук,  
профессор

**Салмина Алла Борисовна**

доктор медицинских наук,  
профессор

**Таранушенко Татьяна Евгеньевна**

**Официальные оппоненты:**

доктор медицинских наук,  
профессор

**Рязанцева Наталья Владимировна**

доктор медицинских наук,  
профессор

**Ковалев Игорь Александрович**

**Ведущая организация:**

ГОУ ВПО «Новосибирский государственный медицинский университет Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию РФ».

Защита состоится “ \_\_\_ ” \_\_\_\_\_ 2009 г. в \_\_\_ часов.

на заседании диссертационного совета Д 208.096.01 при ГОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию РФ» по адресу: г.Томск, Московский тракт, 2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию РФ».

Автореферат разослан 14 января 2009г.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
доктор биологических наук, профессор

**Суханова Г.А.**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность проблемы

Гипоксически-ишемическое поражение головного мозга новорожденного занимает одну из лидирующих позиций в структуре перинатальной заболеваемости и оказывает существенное влияние на многие индивидуальные особенности физической и интеллектуальной сфер развивающегося организма (Чехонин В.П. с соавт., 2004, Барашнев Ю.И. с соавт., 2006, Пальчик А.Б., Шабалов Н.П., 2006). В последние годы внимание исследователей привлекает изучение роли нейрон-астроглиальных взаимодействий в патогенезе ишемического поражения головного мозга (Fellin T. et al., 2004). В числе факторов, определяющих характер таких взаимодействий и чувствительность клеток к действию индукторов апоптоза (в том числе при ишемии), - метаболизм никотинамидадениндинуклеотида (НАД<sup>+</sup>) (Самуилов В.Д. с соавт., 2000, Virag L., 2002, Chinopoulos C. et al., 2006). Одним из НАД<sup>+</sup>-конвертирующих ферментов является АДФ-рибозилциклаза/НАД<sup>+</sup>-гликогидролаза/CD38 - трансмембранный гликопротеин, катализирующий образование циклической АДФ-рибозы (цАДФР) из НАД<sup>+</sup> и гидролиз цАДФР. CD38 экспрессируют как нейроны, так и астроциты. В ЦНС активность АДФ-рибозилциклазы обнаруживается уже в периоде эмбрионального развития млекопитающих (Ceni C. et al., 2003). К настоящему моменту достигнут прогресс в идентификации ключевых особенностей и основных регуляторов экспрессии этого фермента. Изучены различные аспекты регуляции его ферментативной активности, структурных свойств молекулы фермента, а также роли продукта каталитической активности – циклической АДФ-рибозы - как вторичного посредника в клетках головного мозга и других тканей (Higashida H. et al., 2001, Bruzzone S., 2004). Роль АДФ-рибозилциклазной активности в регуляции нейрон-астроцитарных взаимодействий пока не исследована.

Имеются данные, подтверждающие возможность разработки нейропротективной стратегии, базирующейся на направленной модуляции активности или экспрессии АДФ-рибозилциклазы/CD38 в клетках головного мозга, однако не изученным остается вопрос о закономерностях изменения экспрессии и субклеточной локализации АДФ-рибозилциклазы в клетках нейрональной и глиальной природы в динамике раннего постнатального периода (Cohen-Armon M. et al., 2004, Салмина А.Б. с соавт., 2006).

Для изучения патогенеза перинатального гипоксически-ишемического поражения головного мозга разработаны экспериментальные модели, основанные на снижении церебральной перфузии, и набор методик для определения неврологического дефицита, позволяющие *in vitro* исследовать особенности воздействия гипоксии/ишемии на незрелую ЦНС (Rice J. et al., 1981, Hattori H. et al., 1989, Lubek V. et al., 1997, Renolleau S. et al., 1998, Hampl V. et al., 2003). Определение в сыворотке крови маркеров гибели клеток нейрональной и астроглиальной природы (NSE и GFAP) позволит оценить характер нейрон-астроглиальных взаимоотношений *in vivo* и использовать данные белки для диагностики степени перинатального поражения ЦНС (Володин Н.Н., 2004, Van Den Tweel E.R.W. et al., 2006).

Изучение роли CD38 в повреждении нейронов и глии при гипоксически-ишемическом перинатальном поражении позволит разработать принципиально новый подход к нейропротекции и коррекции нейродегенеративного процесса, индуцированного перинатальным повреждением ЦНС. Разработка этого направления экспериментальной патофизиологии, нейрохимии и нейрофармакологии может иметь существенное значение в решении как фундаментальных, так и прикладных задач неврологии, неонатологии и нейрофармакологии.

### **Цель исследования**

Изучить зависимость между изменением активности и экспрессии АДФ-рибозилциклазы/CD38, степенью повреждения клеток нейрональной и глиальной природы и развитием неврологической дисфункции при перинатальном гипоксически-ишемическом поражении головного мозга.

### **Задачи исследования**

1. Изучить экспрессию и активность АДФ-рибозилциклазы/CD38 в клетках головного мозга в раннем постнатальном периоде в физиологических условиях и при гипоксически-ишемическом перинатальном поражении головного мозга в эксперименте.
2. Оценить вклад НАД<sup>+</sup>-конвертирующей активности АДФ-рибозилциклазы/CD38 в поддержание гомеостаза НАД<sup>+</sup> в клетках нейрональной и глиальной природы при гипоксически-ишемическом перинатальном поражении ЦНС в эксперименте.
3. Определить роль АДФ-рибозилциклазы/CD38 в регуляции чувствительности клеток головного мозга к апоптогенному действию гипоксии/ишемии в раннем постнатальном периоде, в развитии неврологического дефицита после перенесенного перинатального поражения в эксперименте.
4. Определить особенности функционального сопряжения АДФ-рибозилциклазы и коннексина 43 в клетках астроглиальной природы в физиологических условиях и при гипоксии/ишемии в эксперименте.
5. Оценить нейрон-астроглиальные взаимодействия при разной выраженности структурных изменений ткани головного мозга новорожденных детей (по данным нейросонографии) и определить диагностическую значимость маркеров повреждения клеток нейрональной и астроглиальной природы в периферической крови при гипоксически-ишемическом перинатальном поражении головного мозга у детей.

### **Научная новизна**

Впервые обнаружены закономерности изменения экспрессии и активности АДФ-рибозилциклазы/CD38 в клетках коры головного мозга в раннем постнатальном периоде в физиологических условиях и после перенесенного гипоксически-ишемического поражения. В эксперименте показана зависимость между интенсивностью апоптотической гибели клеток головного мозга и динамикой развития неврологического дефицита при гипоксически-ишемическом перинатальном поражении ЦНС в остром и отсроченном постишемическом периодах.

Новыми являются данные о том, что АДФ-рибозилциклаза/CD38 в клетках нейрональной и глиальной природы участвует в поддержании внутриклеточного гомеостаза НАД<sup>+</sup> и определяет чувствительность клеток к апоптогенному действию гипоксии/ишемии. Выявлен механизм реализации астроцит-нейронального метаболического сопряжения, заключающийся в одновременном увеличении экспрессии АДФ-рибозилциклазы/CD38 и коннексина 43 в астроцитах с целью поддержания оптимального уровня внутриклеточного НАД<sup>+</sup> и, соответственно, сохранения жизнеспособности клеток астроглиальной природы в остром постишемическом периоде.

В сыворотке крови новорожденных детей установлено разнонаправленное изменение содержания маркеров повреждения клеток нейрональной (NSE) и астроглиальной (GFAP) природы, отражающее особенности нейрон-астроглиальных взаимодействий клеток ЦНС при разной выраженности структурных изменений ткани головного мозга по данным нейросонографического исследования.

### **Практическая значимость работы**

Уровень апоптоза клеток нейрональной и глиальной природы и его динамика коррелируют с выраженностью неврологической дисфункции после перенесенного перинатального поражения ЦНС. АДФ-рибозилциклаза/CD38 регулирует поддержание гомеостаза НАД<sup>+</sup> в клетках головного мозга, что определяет их резистентность к апоптогенным воздействиям и характер развития неврологического дефицита. Это позволяет рассматривать фермент в качестве молекулярной мишени для фармакологической коррекции перинатального гипоксически-ишемического поражения ЦНС. Механизмы нейрон-астроглиальных взаимоотношений, опосредованные активностью АДФ-рибозилциклазы и коннексина 43, являются важным компонентом патогенеза гипоксически-ишемического поражения головного мозга.

Повышение концентрации нейронспецифической енолазы и снижение содержания глиального фибриллярного кислого белка в сыворотке периферической крови новорожденных с разной выраженностью структурных изменений головного мозга при гипоксии/ишемии характеризуют нейрон-астроглиальные взаимоотношения, что может быть использовано для диагностики степени тяжести гипоксически-ишемического поражения ЦНС.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Уровень запрограммированной гибели клеток нейрональной и глиальной природы напрямую коррелирует с выраженностью неврологической дисфункции в постнатальном периоде.
2. Изменение экспрессии и активности АДФ-рибозилциклазы/CD38 в клетках нейрональной и глиальной природы обеспечивает поддержание адекватного уровня внутриклеточного НАД<sup>+</sup> и ассоциировано с реализацией программы апоптоза.
3. Острый период гипоксически-ишемического поражения головного мозга сопровождается реактивным астроглиозом, при этом нарастание экспрессии CD38 и коннексина 43 в клетках астроглиальной природы является маркером

нарушения нейрон-астроглиальных взаимодействий при перинатальном поражении ЦНС.

4. Определение маркеров повреждения клеток нейрональной (NSE) и астроглиальной (GFAP) природы в сыворотке периферической крови отражает нейрон-астроглиальные взаимодействия у новорожденных с перинатальным гипоксически-ишемическим поражением головного мозга, поэтому рассмотренные лабораторные показатели можно использовать в оценке тяжести структурных изменений ЦНС.

#### **Апробация работы**

Основные положения диссертационного исследования доложены на заседании НИИ молекулярной медицины и патобиохимии, заседании кафедры биохимии с курсами медицинской, фармацевтической и токсикологической химии, кафедры детских болезней №1 с курсом ПО, ГОУ ВПО КрасГМА им. проф. В.Ф.Войно-Ясенецкого Росздрава (2008г.), на всероссийской конференции с международным участием «Структурно-функциональные, нейрохимические и иммунохимические закономерности асимметрии и пластичности мозга» (с устным докладом, г. Москва, 2007г.), на II Российско-японском семинаре по нейронаукам (с устным докладом, г. Красноярск, 2007г.), на XII Конгрессе педиатров России «Актуальные проблемы педиатрии» (с постерным докладом, г. Москва, 2008г.), на III Российско-японском семинаре по нейронаукам (с устным докладом, г. Красноярск, 2008г.).

#### **Публикации**

По материалам диссертационного исследования опубликовано 5 печатных работ, из них 2 - в изданиях, рекомендованных ВАК РФ.

#### **Структура и объем диссертации**

Диссертация изложена на 166 страницах машинописного текста, иллюстрирована 33 таблицами и 15 рисунками и состоит из введения, 5 глав, выводов, практических рекомендаций, списка литературы, содержащего 230 источников (62 отечественных и 168 иностранных).

#### **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Диссертационная работа включает в себя экспериментальную и клиническую части.

#### **Экспериментальная часть**

Объектом экспериментальной части исследования явились белые беспородные крысята (n=120) обоего пола средней массой 10-18г. Опытную группу составили животные (n=80), которым проводилось моделирование перинатального гипоксически-ишемического поражения головного мозга. Забор материала для исследования (лобная и затылочные области головного мозга) производился через 4, 8, 72 часа, 10 суток, 3, 4, 5 и 6 недель (1 раз в неделю) после моделирования. Таким образом были сформированы 8 опытных подгрупп (n=10 в каждой подгруппе): P7", P7, P10, P17, P28, P35, P42, P49, соответственно, где P – день постнатального развития.

Контрольную группу, включающую, соответственно, подгруппы P7", P7, P10, P17, P28, P35, P42, P49 (n=5 в каждой подгруппе), составили ложно-оперированные животные (n=40). Образцы ткани головного мозга, полученные от

животных после декапитации, использовались для приготовления замороженных фиксированных тонких срезов и гомогенатов. Все исследования проводились с соблюдением правил гуманного обращения с животными.

*Моделирование гипоксически-ишемического поражения головного мозга* животным осуществлялось на 7 сутки постнатального развития путем экстравазальной окклюзии правой общей сонной артерии под общей анестезией кетаминном (5 мг/кг) (Rice J. et al., 1981) с последующим помещением крысят в атмосферу с низким содержанием кислорода (8%) при температуре 28-30°C на 1 ч.

*Оценка степени выраженности неврологической симптоматики* у экспериментальных животных осуществлялась с использованием международной шкалы NSS (Neurological Score System) для лабораторных животных (Speiser Z. et al., 2007).

Микроскопия тонких замороженных срезов головного мозга проводилась с помощью люминесцентного микроскопа «Люмам Р8», ОМО, Россия, при увеличении  $\times 900$ . Результаты архивировались и анализировались с помощью видеосистемы для анализа изображений “Nikon Coolpix 4500”, США.

*Регистрация апоптоза* проводилась методом TUNEL (TdT-mediated dUPT nick end labeling) при помощи набора Merbstain Apoptosis Detection kit (Immunotech, France) согласно протоколу фирмы-производителя. Участки специфической межнуклеосомной фрагментации ДНК, соответствующие местам включения меченых нуклеотидов в цепочку ДНК, регистрировались при микроскопии среза. Количество апоптотических клеток выражалось на 300 клеток в образце при анализе не менее 10 полей зрения.

*Регистрация экспрессии CD38* осуществлялась согласно стандартному протоколу иммуногистохимического исследования с использованием первичных антител к CD38 («Сорбент», Москва) и вторичных антител (FITC-меченные овечьи антитела к IgG мыши (Сорбент, Москва)). Подсчет относительного количества клеток, экспрессирующих антиген, производился на 300 клеток в образце при анализе не менее 10 полей зрения.

*Оценка коэкспрессии CD38 с маркером глиальных клеток – GFAP - и коннексина Cx43* в клетках головного мозга осуществлялась по стандартному протоколу двойного последовательного иммуногистохимического исследования. На первом этапе осуществлялось мечение клеток моноклональными мышиными антителами к GFAP (Santa Cruz Biotechnology, США) или к Cx43 (Chemicon International, США). В качестве вторичных антител использовались FITC-меченные овечьи антитела к IgG мыши (Сорбент, Москва). На втором этапе производилось мечение антигена CD38 с помощью фикоэритрин-меченных антимышиных антител к антигену CD38 (Caltag Laboratories, США). Считалось относительное количество клеток, экспрессирующих каждый из видов антигенов,  $CD38^+Cx43^+$  клетки,  $CD38^+GFAP^+$  клетки на 300 клеток в образце при анализе не менее 10 полей зрения. При обработке результатов учитывалось относительное количество всех клеток, несущих метку на Cx43 и GFAP, и выраженное от этого количества в % количество клеток, несущих сразу две метки ( $Cx43^+CD38^+$  или  $GFAP^+CD38^+$ ).

*Определение АДФ-рибозилциклазной активности CD38* проводилось флуориметрическим методом (Graeff R.M. et al., 1994). Гомогенизация образцов ткани осуществлялась при 4°C, в полученном гомогенате определялось содержание белка по стандартному протоколу (набор «Total Protein Kit, Micro Lowry, Peterson`s Modification», Sigma-Aldrich, США) и активность фермента путем инкубации 100 мкл гомогената ткани с реакционной смесью, содержащей 60 мкМ НГД (Sigma Aldrich, USA), 100 мМ KCl, 10 мкМ CaCl<sub>2</sub> в 50 мМ трис-HCl (pH 6,6). Регистрация флуоресценции осуществлялась в течение 20 минут при 37°C при постоянном перемешивании на спектрофлуориметре CM2203 (ЗАО «СОЛАР», Беларусь) при длине волны возбуждения 300 нм и длине волны испускания 410 нм. По кривой кинетики обнаруживалось максимальное значение флуоресценции (x) и соответствующее ему время (y) и значение флуоресценции, соответствующее 0 минуте. Активность фермента вычислялась по разнице амплитуды флуоресценции на 0 и Y минутах инкубации, отнесенной к мг белка ткани в минуту в ед/мин\*мг белка.

*Определение уровня внутриклеточного НАД<sup>+</sup>* в гомогенатах ткани мозга проводилось спектрофотометрическим ультрамикрометодом (Nisselbaum J.S. et al., 1969). Реакционная смесь содержала 0,08 мг тиазолила синего, 0,3 мг феназина метасульфата, 0,25 мг алкогольдегидрогеназы, 0,065 М глицилглицинового буфера, 0,065 М никотинамида, 0,33 М этанола, 0,1 мл гомогената ткани при pH 7,4. Оптическая плотность продукта реакции измерялась при поглощении на длине волны 556 нм в течение 30 минут при температуре 37°C и постоянном перемешивании. Результат реакции выражался в ммоль НАД<sup>+</sup> на мг белка ткани.

### **Клиническая часть**

Объектом исследования были новорожденные дети в возрасте от 0 до 28 дней жизни (74 человека). Целевую группу составили 53 ребенка с диагностированной церебральной ишемией I-III степени. Гестационный возраст детей целевой группы варьировал от 32 до 40 (38,4±0,4) нед. (доля недоношенных детей - 20,7±5,6% (11 человек)), масса тела при рождении варьировала от 1130 до 4550 (3083±98,9) гр. Контрольную группу составил 21 здоровый новорожденный ребенок с гестационным возрастом от 37 до 40 (41±2,1) нед. и массой тела при рождении – от 2800 до 3930 (3192±96,2) гр.

Критерии включения в целевую группу: новорожденные дети, находившиеся в условиях стационара с диагнозом «Церебральная ишемия» разной степени тяжести, подписание родителем согласия на госпитализацию, диагностику и лечение. Критерии исключения: родовая травма ЦНС, внутриутробная инфекция, наследственные заболевания, метаболические и токсические поражения головного мозга, грубые пороки развития, билирубиновые энцефалопатии.

Детям целевой группы на 1 неделе жизни проводилось нейросонографическое исследование на ультразвуковом сканере ALOCA 500, датчик 3,5 МГц. Учитывая нейросонографические данные, пациенты целевой группы были разделены на три подгруппы: I (n=7) – дети с легкими структурными изменениями ткани головного мозга, имеющие следующие

нейросонографические признаки: легкий отек перивентрикулярной области, отсутствие или слабо повышенная эхогенность субкортикальной зоны, кровоизлияния в сосудистые сплетения боковых желудочков; II ( $n=24$ ) – новорожденные со среднетяжелыми структурными изменениями ткани головного мозга, имеющие по данным нейросонографии умеренный отек перивентрикулярной области, фокально или диффузно умеренно повышенная эхогенность в субкортикальной зоне, внутрижелудочковые кровоизлияния I-II степени; III ( $n=22$ ) - новорожденные с тяжелыми структурными изменениями ткани головного мозга с выраженным перивентрикулярным отеком, резким повышением эхогенности субкортикальных структур фокального или диффузного характера, внутрижелудочковыми кровоизлияниями III-IV степени.

Обследуемым детям на 5 – 24 сутки жизни проводилось исследование образцов плазмы венозной крови с целью определения концентрации нейронспецифической енолазы (NSE), глиального фибриллярного кислого белка (GFAP) и солюбилизированной формы маркера апоптоза Fas-лиганда методом иммуноферментного анализа по стандартному протоколу с использованием набора реактивов фирмы-производителя (Bender Medsystems, CanAg, Швеция, Human Fas L ELISA, Bender Med Systems GmbH, Vienna, Austria). Концентрация маркеров выражалась в нг/мл.

Статистическая обработка результатов осуществлена методами вариационной статистики. Для количественных показателей использовалась описательная статистика (среднее арифметическое и стандартная ошибка, при уровне значимости -  $p<0,05$ ). Результаты исследования оценивались с помощью методов непараметрической статистики (различия количественных показателей между двумя группами оценивались по критерию Колмогорова-Смирнова, сравнение трех и более групп осуществлялось с использованием критерия Крускала-Уоллиса, сравнение групп в динамике проводилось с использованием критерия Уилкоксона и Friedman ANOVA&Kendall's concordance) при уровне значимости -  $p<0,05$ . Для оценки различий между долями, не имеющих нормального распределения применялся критерий  $\chi^2$ . Корреляционная связь оценивалась методом Спирмена с определением силы корреляции: слабая –  $r \leq 0,25$ , умеренная  $0,25 \leq r \leq 0,75$ , сильная  $r \geq 0,75$ , при уровне значимости -  $p<0,05$  (Флетчер Р. С соавт., 2004, Реброва О.Ю., 2006).

## **РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ**

### **Особенности клеточно-молекулярных взаимодействий при гипоксии/ишемии в ЦНС экспериментальных животных**

При оценке апоптоза, экспрессии CD38, GFAP, Cx43, активности АДФ-рибозилциклазы, содержания НАД<sup>+</sup> в лобной и затылочной областях коры головного мозга в контрольной группе и после перенесенного поражения ЦНС статистически значимых отличий не зарегистрировано, поэтому в дальнейшем для упрощения представления полученных результатов данные по изучаемым областям мозга объединены. Сравнение результатов, полученных в группе ложно-оперированных и животных негативной группы контроля (не оперированных) не обнаружило статистически значимых различий.

Анализ выраженности неврологической дисфункции у экспериментальных

животных доказывает эффективность примененной методики моделирования перинатального гипоксически-ишемического поражения головного мозга. Выраженность неврологического дефицита (по шкале NSS) у наблюдаемых животных соответствует повреждению средней степени тяжести и сопровождается прежде всего нарушением сенсорной ( $0,8 \pm 0,133$  баллов,  $p < 0,001$  в сравнении с контрольным значением) и рефлекторной ( $1,7 \pm 0,153$  баллов,  $p < 0,005$  в сравнении с контролем) функций. Статистически значимое повреждение головного мозга средней степени тяжести сохраняется в течение первых 3 суток после гипоксически-ишемического повреждения ( $7,4 \pm 0,7$  баллов,  $p = 0,041$  в сравнении с контролем), после чего состояние наблюдаемых стабилизируется и регистрируется постепенное снижение выраженности неврологического дефицита до умеренной степени на 17 сутки жизни ( $3,2 \pm 0,5$  баллов,  $p = 0,009$  в сравнении с контролем) (табл. 1). Статистически значимое сохранение неврологической дисфункции у животных опытной группы сохраняется на протяжении 4 недель наблюдения. На 35 сутки постнатального развития неврологический статус животных с гипоксически-ишемическим поражением головного мозга достигает уровня ложно-оперированных (4 недели после поражения:  $0,9 \pm 0,314$  баллов, в контрольной группе 0 баллов). Однако, на 42 сутки жизни крысят (5 недель после операции) вновь наблюдается статистически значимое нарастание выраженности неврологической дисфункции по сравнению с контрольной группой ( $p = 0,015$ ). После этого уровень неврологического статуса животных контрольной и опытной групп вновь статистически не отличается друг от друга.

Таблица 1

Неврологический статус животных по шкале Neurological Score System и апоптоз клеток коры головного мозга животных

Подгруппы	Относительное количество апоптотических клеток, %			Неврологический статус, баллы		
	опыт, n=10	контроль, n=10	p	опыт, n=10	контроль, n=5	p
	M±m	M±m		M±m	M±m	
P7" (4 ч)	$1,6 \pm 0,8$	$1,8 \pm 0,7$	0,3	$9,9 \pm 0,4$	$6,8 \pm 0,583$	0,001
P7 (8 ч)	$3,5 \pm 0,5$	$2,4 \pm 0,4$	<b>0,03</b>	$9,7 \pm 0,7$	$7,4 \pm 0,4$	<b>0,05</b>
P10 (3 сут)	$5 \pm 0,9$	$3,6 \pm 1,3$	<b>0,03</b>	$7,4 \pm 0,7$	$5,0 \pm 0,548$	<b>0,041</b>
P17 (10 сут)	$2 \pm 0$	$1,6 \pm 0,4$	0,1	$3,2 \pm 0,5$	$0,8 \pm 0,374$	<b>0,009</b>
P28 (3 нед)	$1,6 \pm 0,6$	$0,7 \pm 0,3$	<b>0,01</b>	$2,0 \pm 0,4$	$0 \pm 0$	<b>0,007</b>
P35 (4 нед)	$1 \pm 0,3$	0	<b>0,001</b>	$0,9 \pm 0,3$	$0 \pm 0$	0,1
P42 (5 нед)	$1,1 \pm 0,3$	$2,5 \pm 0,5$	<b>0,01</b>	$1,3 \pm 0,2$	$0,6 \pm 0,4$	<b>0,015</b>
P49 (6 нед)	$2,5 \pm 0,6$	$2,8 \pm 1$	0,2	$0,9 \pm 0,3$	$0,4 \pm 0,245$	0,1

Примечание: здесь и далее результаты представлены в виде M±m, где M – среднее значение, m – стандартная ошибка среднего, p – уровень значимости по сравнению с контрольным значением (ложно-оперированные животные) (критерий Колмогорова-Смирнова), P – возраст постнатального развития, P7" – седьмые сутки жизни животных, 4 часа после операции, P7 - седьмые сутки жизни животных, 8 часов после операции, P10 – десятые сутки жизни животных и т.д.

В ходе исследования обнаружено, что динамика восстановления неврологического статуса животных, перенесших перинатальное поражение ЦНС,

соответствует характеру изменения выраженности апоптоза в коре головного мозга крысят (см. табл. 1). У животных контрольной группы в период с 7 по 10 сутки жизни уровень запрограммированной гибели клеток максимальный ( $3,6 \pm 1,3\%$  на 10 сутки), после которого наблюдается снижение числа апоптотических клеток в период с 10 по 35 сутки развития ( $0\%$  на 35 сутки жизни,  $p < 0,05$  в сравнении с подгруппами P7", P7, P10, P17), однако к 42-49 суткам жизни молодых животных вновь регистрируется значимое нарастание апоптоза клеток мозга до  $2,8 \pm 1\%$  ( $p < 0,01$  в сравнении с подгруппой P35). После поражения ЦНС в течение первых 8 часов уровень апоптоза клеток значительно превышает контрольные значения ( $p = 0,03$ ) и остается таким в течение 3 суток. После 10 дня постнатального развития регистрируется снижение выраженности запрограммированной гибели клеток, как и в группе здоровых животных ( $p < 0,05$  в сравнении с подгруппами P7, P10). В течение последующих недель наблюдения уровень энергозависимой гибели клеток значительно превышает контрольные значения ( $p = 0,01$ ), а к 49 суткам происходит его достоверное нарастание в ткани мозга животных ( $p < 0,05$  в сравнении с подгруппами P35, P42), как и в группе контроля.

Таким образом, постнатальный период развития ЦНС характеризуется волнообразным течением выраженности запрограммированной гибели клеток, что, вероятно, составляет основу гармоничного развития мозга в онтогенезе. Гипоксически-ишемическое поражение ЦНС приводит к повышению интенсивности апоптоза клеток нейрональной и глиальной природы в ранний и отсроченный период после гипоксии/ишемии, однако, динамика процесса в условиях поражения головного мозга и физиологических условиях носит однотипный характер. Прогрессивно снижающаяся интенсивность апоптоза, сопровождающаяся редуцированием неврологической симптоматики, отражает хорошие компенсаторные возможности незрелого головного мозга.

Одним из компонентов механизма сигнальной трансдукции, опосредующей регуляцию процессов запрограммированной клеточной гибели, может быть НАД<sup>+</sup>-конвертирующий фермент – АДФ-рибозилциклаза/CD38, ответственный за генерацию циклической АДФ-рибозы – мобилизатора кальция из внутриклеточных депо.

Анализ экспрессии CD38 в клетках головного мозга показал, что в контрольной группе животных уровень относительного количества клеток, экспрессирующих CD38 остается стабильным в течение 17 суток постнатального развития ( $4,1 \pm 0,7\%$  у 10-суточных животных), далее в период с 28 по 35 сутки жизни происходит статистически значимое снижение экспрессии фермента до  $1,1 \pm 0,5\%$  ( $p = 0,001$  в сравнении с подгруппами P7", P7, P10, P17), а затем вновь регистрируется подъем CD38-иммунопозитивных клеток до прежних цифр на 6-7 неделе развития крысят ( $p < 0,005$  в сравнении с подгруппами P28 и P35) (табл. 2А). Динамика изменения экспрессии фермента схожа с динамикой изменения уровня апоптоза и выраженности неврологической дисфункции на ранних и поздних этапах наблюдения (42-49 суток). Десятые сутки жизни крысят характеризует прямая умеренная корреляционная взаимосвязь ( $r = 0,59$ ) между уровнем апоптотической гибели клеток и уровнем экспрессии CD38. При

гипоксически-ишемическом поражении головного мозга наблюдается пик экспрессии фермента через 8 часов после повреждения ЦНС ( $7,7 \pm 1\%$ ,  $p=0,001$  в сравнении с контрольным значением), сохраняющийся в течение трех суток, далее уровень экспрессии CD38 значимо снижается до контрольных значений ( $p=0,001$  в сравнении с подгруппами P7 и P10) в течение всего оставшегося периода наблюдения. На 4-ой неделе после поражения ЦНС вновь регистрируется нарастание относительного количества CD38-экспрессирующих клеток головного мозга до  $3,4 \pm 0,7\%$  ( $p=0,02$  в сравнении с контролем), продолжающееся к 42 и 49 ( $p=0,001$  в сравнении с подгруппой P28) суткам жизни экспериментальных животных. Полученные данные отражают возможность участия гликопротеида CD38 в реализации процесса запрограммированной гибели клеток головного мозга в ранний и отсроченный период постнатального развития в физиологических условиях и при гипоксически-ишемическом поражении ЦНС.

Таблица 2А

Экспрессия CD38, активность АДФ-рибозилциклазы и содержание НАД<sup>+</sup> в клетках коры головного мозга экспериментальных животных

Подгруппы	Относительное количество CD38 <sup>+</sup> клеток, %			Активность АДФ-рибозилциклазы, ед.мин*мг		
	опыт, n=10	контроль, n=10	p	опыт, n=10	контроль, n=10	p
	M±m	M±m		M±m	M±m	
P7" (4 ч)	2,9±0,7	4,4±0,9	<b>0,04</b>	0,26±0,15	0,03±0,005	0,1
P7 (8 ч)	7,7±1	4,1±0,7	<b>0,001</b>	0,15±0,05	0,1±0,01	<b>0,005</b>
P10 (3 сут)	7,1±1,1	4,1±0,7	0,095	0,08±0,03	0,2±0,07	<b>0,025</b>
P17 (10 сут)	3,3±0,6	3,6±0,5	0,5	0,06±0,02	0,05±0,01	<b>0,025</b>
P28 (3 нед)	2±1	1,1±0,5	0,3	0,02±0,01	0,09±0,009	<b>0,001</b>
P35 (4 нед)	3,2±0,9	1,1±0,5	<b>0,02</b>	0,009±0,002	0,08±0,003	<b>0,001</b>
P42 (5 нед)	3,4±0,7	4,6±0,5	0,6	0,03±0,004	0,09±0,009	<b>0,001</b>
P49 (6 нед)	4,4±0,9	4,2±0,5	0,8	0,012±0,002	0,03±0,01	<b>0,01</b>

Таблица 2Б

Подгруппы	Содержание НАД <sup>+</sup> , ммоль/мг ткани		
	Контроль, n=10	Опыт, n=10	p
	M±m	M±m	
P7"	2291,6±881,2	12037,6±952,3	<b>0,001</b>
P7	8385±730,2	2517,6±1092	<b>0,001</b>
P10	8702,6±947,7	3344,4±762,8	<b>0,001</b>
P17	2445,6±964,5	2255,2±989	>0,05
P28	1150,2±598,8	1463,2±638,9	>0,05
P35	952,2±503,6	2023,8±936,4	<b>0,05</b>
P42	3800±933,5	1115,1±333,3	<b>0,025</b>
P49	2646,6±820,5	151,4±104,2	<b>0,01</b>

Примечание: p – уровень значимости по сравнению с контрольным значением (ложно-оперированные животные) (критерий Колмогорова-Смирнова).

При исследовании активности АДФ-рибозилциклазы/CD38 у здоровых животных регистрируется пик активности в клетках головного мозга на 10 сутки после рождения ( $0,2 \pm 0,07$  ед/мин\*мг ткани), сопровождающийся самым высоким содержанием НАД<sup>+</sup> в ткани мозга ( $8702,6 \pm 947,7$  ммоль/мг ткани) (табл. 2Б). Эти данные подтверждаются наличием между ферментом и субстратом сильной прямой корреляционной взаимосвязи на 10 сутки постнатального периода ( $r=0,84$ ). Более того, 10 сутки развития характеризуются умеренной прямой корреляционной зависимостью между выраженностью неврологической дисфункции и активностью фермента ( $r=0,54$ ), а также содержанием НАД<sup>+</sup> ( $r=0,55$ ). В свою очередь, между активностью и экспрессией фермента в этот период отмечена сильная обратная связь ( $r=-0,77$ ).

На 6-7 неделе жизни животных регистрируется повышение содержания НАД<sup>+</sup> ( $3800 \pm 933,5$  ммоль/мг ткани,  $p=0,01$  в сравнении с подгруппой P35) (см. табл. 2Б) в ткани головного мозга наряду с усилением экспрессии фермента CD38, причем между уровнем экспрессии и уровнем активности фермента в этот отдаленный период развития регистрируется прямая корреляционная взаимосвязь ( $r=0,59$ ). Можно заключить, что каждый этап развития головного мозга характеризуется определенным способом регулирования содержания уровня внутриклеточного НАД<sup>+</sup> - либо путем усиления экспрессии фермента, либо путем усиления активности, либо путем одновременного усиления обоих процессов.

Таким образом, эти данные подтверждают справедливость гипотезы о том, что НАД<sup>+</sup>-гликогидролазе/CD38 принадлежит значительная роль в регуляции внутриклеточного уровня НАД<sup>+</sup> в электровозбудимых клетках, однако это не единственный фермент класса НАД<sup>+</sup>-гликогидролаз в клетках мозга, обеспечивающий поддержание гомеостаза НАД<sup>+</sup>, что впервые было продемонстрировано на CD38-нокаутных животных (Aksoy P. et al., 2006). В физиологических условиях динамические изменения функциональной активности АДФ-рибозилциклазы в раннем постнатальном периоде имеют своей целью поддержание адекватного уровня внутриклеточного НАД<sup>+</sup>, необходимого для обеспечения ряда метаболических путей и, в случае действия апоптогенных факторов, для реализации программы апоптоза (Ran Z.H. et al., 1999), что подтверждается наличием корреляционной связи между уровнем апоптоза клеток и содержанием НАД<sup>+</sup> ( $r=-0,49$ ) и активностью АДФ-рибозилциклазы ( $r=-0,62$ ) на 10 сутки развития животных.

При гипоксически-ишемическом перинатальном поражении ЦНС нами впервые обнаружено, что динамика активности АДФ-рибозилциклазы на 7-10 сутки постнатального развития инвертируется, что приводит к отсутствию пика активности на 10 сутки жизни. Увеличение активности фермента в ткани головного мозга происходит к 4 часу перинатального поражения ЦНС (до  $0,26 \pm 0,15$  ед/мин\*мг ткани) и сопровождается максимальным повышением концентрации НАД<sup>+</sup> (до  $12037,6 \pm 952,3$  ммоль/мг ткани,  $p=0,001$  в сравнении с контролем). При этом уже к 8 часу происходит резкое снижение активности АДФ-рибозилциклазы до  $0,15 \pm 0,05$  ед/мин\*мг ткани ( $p=0,005$  в сравнении с контрольным значением -  $0,1 \pm 0,01$  ед/мин\*мг ткани) наряду со снижением уровня субстрата фермента до  $2517,6 \pm 1092$  ммоль/мг ткани ( $p=0,001$  в сравнении с

контролем -  $8385 \pm 730,2$ ). На протяжении всего остального периода наблюдения активность фермента и концентрация его субстрата в ткани головного мозга остаются на низком уровне, статистически значимо ниже контрольных значений. При этом сохраняется сильная прямая корреляционная связь между активностью фермента и содержанием его субстрата ( $r=0,81$ ), а также прямые взаимосвязи между активностью АДФ-рибозилциклазы, уровнем  $\text{НАД}^+$  и выраженностью неврологической дисфункции. Спад активности АДФ-рибозилциклазы может быть следствием отсутствия достаточного уровня ее субстрата в ткани головного мозга молодых животных, а снижение содержания  $\text{НАД}^+$  - гиперактивацией поли(АДФ-рибозил)полимеразы. Вклад других  $\text{НАД}^+$ -конвертирующих ферментов в обнаруженные изменения внутриклеточной концентрации субстрата в физиологических условиях следует считать минимальным, поскольку было показано, что уровень  $\text{НАД}^+$  в клетках мозга у PARP-/-животных не отличается от контроля (Endres M. et al., 1997). Нарушение динамики изменения активности АДФ-рибозилциклазы в клетках головного мозга в период с 7 по 17 сутки постнатального развития, возникающее в результате перенесенного перинатального гипоксически-ишемического поражения ЦНС, может определять особенности реализации запрограммированной клеточной гибели и поддержания внутриклеточного гомеостаза  $\text{НАД}^+$ .

Далее, исходя из полученных результатов, представлена предполагаемая схема молекулярных взаимоотношений при перинатальном гипоксически-ишемическом поражении ЦНС (рис. 1).

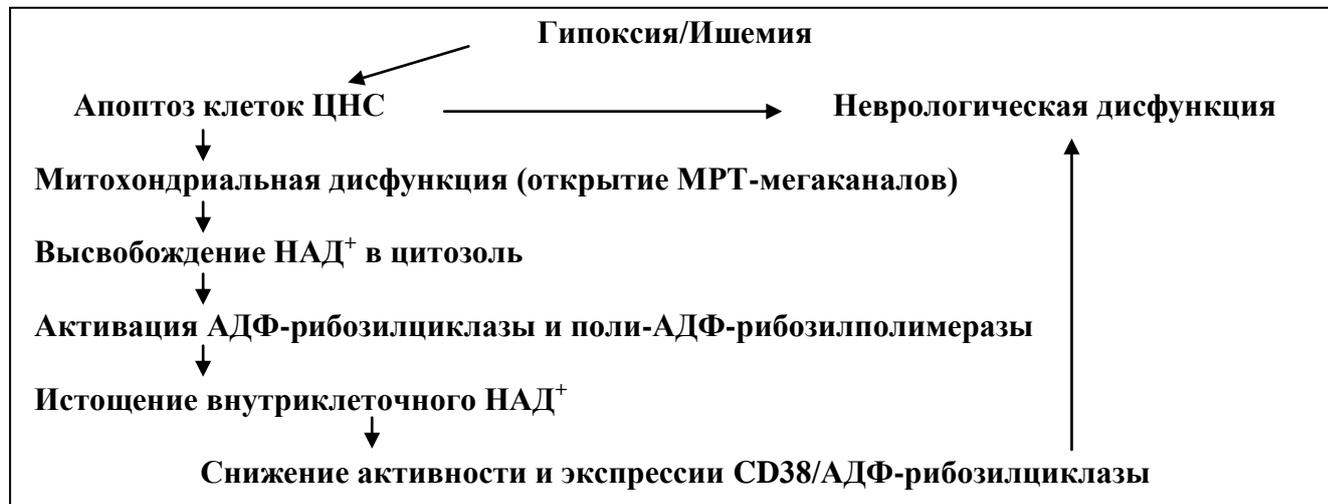


Рис. 1. Внутриклеточные молекулярные взаимодействия при гипоксически-ишемическом поражении ЦНС

Одним из наиболее вероятных механизмов увеличения активности АДФ-рибозилциклазы в раннем ишемическом периоде является увеличение доступности  $\text{НАД}^+$  в качестве субстрата для каталитической конверсии с целью образования цАДФР, выступающей в качестве мобилизатора кальция из внутриклеточных депо (Zocchi E. et al., 1999). Вход кальция в астроциты определяется также активностью натрий-кальциевого обменника и коннексинов, образующих щелевые контакты между клетками астроглиальной природы, но не

нейронами. Эти каналы ответственны за перераспределение ионов кальция, калия, НАД<sup>+</sup>, глутамата между астроцитами. С целью оценки вклада Сх43 в механизм нейрон-астроцитарных взаимодействий, определен характер экспрессии этой молекулы в динамике раннего периода гипоксически-ишемического повреждения головного мозга у новорожденных животных. На 10 сутки жизни крысят регистрируется значимое снижение количества Сх43<sup>+</sup>-клеток в ткани головного мозга ( $p < 0,05$  в сравнении с контрольной подгруппой P7), а гипоксически-ишемическое поражение ЦНС приводит, наоборот, к усилению экспрессии коннекина 43 астроцитами ( $p < 0,05$  в сравнении с контрольным значением) (табл. 3). Большинство Сх43<sup>+</sup>-клеток одновременно являются CD38-иммуннопозитивными (более 75%) как в головном мозге здоровых животных, так и в мозге животных, перенесших гипоксию/ишемию в перинатальном периоде. Однако, 10 сутки жизни крысят опытной группы характеризуются значимым преобладанием клеток, коэкспрессирующих Сх43 и CD38 ( $p < 0,05$  в сравнении с контролем).

Таблица 3

Сх43<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> и Сх43<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> клетки в препаратах головного мозга животных контрольной группы и после перенесенного гипоксически-ишемического поражения ЦНС

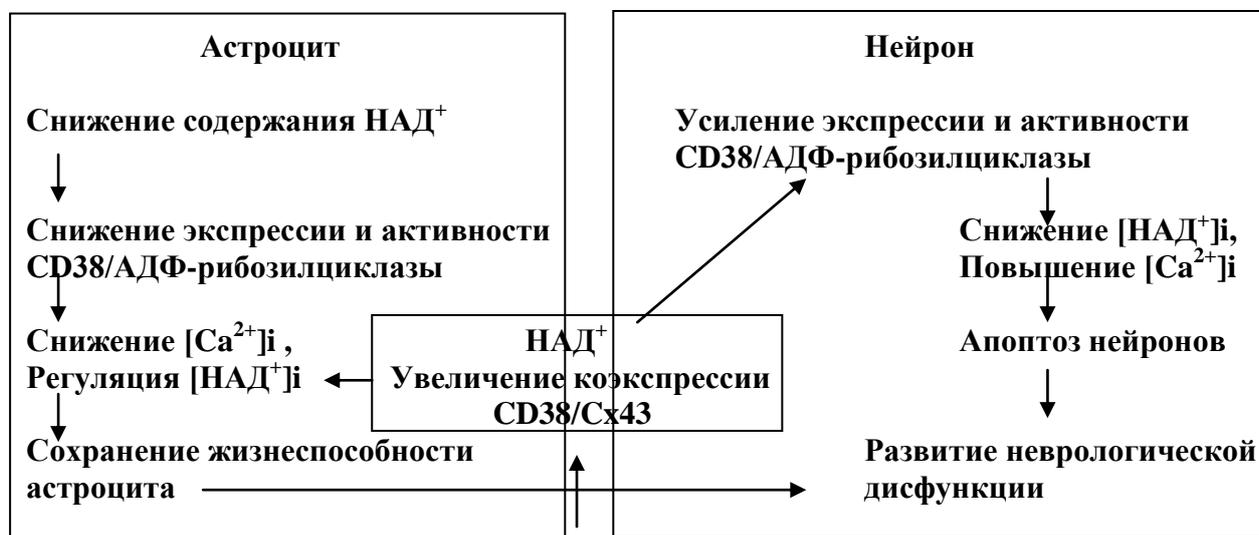
Подгруппы	n	Относительное количество Сх43 <sup>+</sup> клеток (%)	Относительное количество Сх43 <sup>+</sup> клеток, экспрессирующих CD38 (%)		
			M±m		
			Коэкспрессия Сх43 <sup>+</sup> CD38 <sup>+</sup> клеток	в % от всех Сх43 <sup>+</sup> клеток	
P10	Контроль	4	7,7±1,8	6,2±1,9	75,9±9,0%
	Опыт	6	<b>13,1±1,0*</b>	<b>10,1±1,3*</b>	76,0±6,9%

Примечание: p – уровень значимости по сравнению с контрольным значением (ложно-оперированные животные): \* $p < 0,05$  (критерий Колмогорова-Смирнова).

Таким образом, экспериментальные данные доказывают, что основными клетками, экспрессирующими CD38 в раннем периоде после перинатального поражения ЦНС, являются астроциты. Увеличение коэкспрессии Сх43 и CD38 в этих клетках свидетельствует о функциональной взаимосвязи между активностью АДФ-рибозилциклазы, катализирующей конверсию НАД<sup>+</sup> в циклическую АДФ-рибозу, и коннексинов, регулирующих доступность НАД<sup>+</sup> в качестве субстрата реакции. В связи с тем, что увеличение экспрессии CD38 на астроцитах характерно для развития т.н. «глутаматного удара», когда глутамат, высвобождающийся из нейронов, стимулирует экспрессию фермента на глиальных клетках, можно предположить, что изменение экспрессии CD38 и Сх43 на клетках головного мозга является маркером нарушения нейрон-глиальных взаимодействий при перинатальном поражении ЦНС (рис. 2).

Специфическим маркером клеток астроглиального происхождения является глиофибрилярный кислый протеин GFAP, поэтому нами применялась иммуногистохимическая детекция коэкспрессии CD38 и астроглиального антигена. Результаты исследования показывают, что 10 сутки постнатального

развития животных характеризуются максимальным числом GFAP<sup>+</sup>-клеток (14,5±5,9%), а также относительным числом астроцитов, экспрессирующих CD38 (14,4±2,4%) (табл. 4). К 17 суткам общее количество астроцитов, в том числе CD38-иммунопозитивных достоверно снижается (p<0,05 в сравнении с подгруппой P10).



Эксайтотоксичность, ассоциированная с супрафизиологическими концентрациями глутамата во внеклеточном пространстве

Рис. 2. Астроцит-нейрональные взаимодействия с участием гликопротеина CD38 и коннексина 43

Таблица 4

Распределение GFAP<sup>+</sup> клеток и GFAP<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> клеток в препаратах головного мозга животных контрольной группы и после перенесенного гипоксически-ишемического поражения ЦНС

Подгруппы	n	Относительное количество GFAP <sup>+</sup> клеток (%)	Относительное количество GFAP <sup>+</sup> клеток, экспрессирующих CD38 (%)		
			M±m		
			Коэкспрессия GFAP <sup>+</sup> CD38 <sup>+</sup>	в % от всех GFAP <sup>+</sup> клеток	
P7	Контроль	6	5,8±1,0	0,7±0,2	15,3±6,4%
	Опыт	6	9,8±0,9 **	1,5±0,7	13,8±6,4%
P10	Контроль	5	14,5±5,9	1,7±0,4	14,4±2,4%
	Опыт	7	11,4±1,9 *	3,6±0,8 *	31,8±5,9%
P17	Контроль	9	4,8±1,0	0,7±0,3	9,2±4,8%
	Опыт	10	6,0±0,9 *	2,5±0,5 ****	42,0±8,3%

Примечание: p – уровень значимости по сравнению с контрольным значением (ложно-оперированные животные): \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,005, \*\*\*\*p<0,001 (критерий Колмогорова-Смирнова).

При гипоксически-ишемическом поражении головного мозга максимальное относительное число астроцитов зарегистрировано уже через 8 часов после поражения ЦНС на 7 сутки жизни животных (9,8±0,9%, p≤0,01 в

сравнении с контролем), количество же GFAP<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>-клеток не отличается от контрольного уровня (13,8±6,4% от всех астроцитов). Далее в течение трех суток уровень общего числа астроцитов в препаратах головного мозга не меняется, отражая выраженность реактивного астроглиоза в ранний постишемический период, но среди них происходит значимое нарастание клеток, экспрессирующих CD38 (до 31,8±5,9%, p<0,05 в сравнении с контролем), а к 17 суткам жизни практически половина клеток астроглиального происхождения является CD38-иммунопозитивной (42,0±8,3%, p=0,001 в сравнении с контрольным значением) при достоверном снижении общего числа GFAP<sup>+</sup>-клеток (p=0,01 в сравнении с подгруппой P10). Увеличение числа клеток астроглиальной природы в головном мозге сопровождается нарастанием выраженности неврологической дисфункции у животных, что подтверждается зарегистрированной умеренной прямой взаимосвязью (r=0,46) между этими параметрами в опытной группе. Кроме того, число астроцитов коррелирует с содержанием НАД<sup>+</sup> в ткани мозга (r=0,5).

Таким образом, обнаруженные изменения активности АДФ-рибозилциклазы в раннем периоде перинатального гипоксически-ишемического поражения головного мозга, совпадающие по времени с развитием реактивного астроглиоза и коэкспрессией CD38 и Сх43 в кортикальных астроцитах, представляют собой компонент нейропротективного механизма, индуцируемого на начальных этапах ишемического повреждения. Можно заключить, что клеткам астроглиального происхождения принадлежит ведущая роль в развитии основных событий в патогенезе гипоксически-ишемического поражения головного мозга, направленных на поддержание функционирования нейронов, поскольку астроциты определяются в ближайшем окружении синапсов и способны регулировать синаптическую трансмиссию, пластичность, генерирование нервных импульсов. Растет число литературных данных, описывающих наличие функциональной структуры в головном мозге - нейро-вазкулярной единицы, состоящей из функционально взаимодействующих нейрона, астроцита и эндотелиоцита сосуда головного мозга. Одна астроглиальная клетка одновременно взаимодействует посредством отростков с сотнями синапсов и в то же время с капиллярами и артериолами. Вследствие наличия рецепторов ко многим нейротрансмиттерам в астроцитах постоянно происходит изменение концентрации внутриклеточного Ca<sup>2+</sup>, приводящее к синтезу и накоплению в клетках метаболитов арахидоновой кислоты, D-серина, АТФ и глутамата. Высвобождение этих субстанций из астроцитов, совпадающее по времени со степенью нейрональной активности, приводит к локальной вазодилатации, либо вазоконстрикции, что обеспечивает в физиологических условиях нормальный тонус церебральных сосудов, соизмеримый с активностью регионов мозга. Однако существует и обратная регуляция, когда изменение кровенаполнения сосудов, снижение концентрации глюкозы и парциального давления кислорода в крови приводит к изменению степени нейрональной активности (Hatton G.I, 2002, Giordano H., Iadecola C., 2006, Koehler R.C. et al., 2006). Очевидно, что в условиях гипоксии/ишемии астроцитам должна принадлежать решающая регулирующая роль в функционировании нейрона в условиях кислородной и субстратной (глюкозной) недостаточности. Понимание этих процессов позволит разработать

новые нейропротективные методы коррекции патологических состояний головного мозга.

### Особенности нейрон-астроглиальных взаимодействий в ЦНС у детей с церебральной ишемией

Для выяснения диагностической и прогностической значимости оценки нарушений нейрон-астроглиальных взаимодействий при перинатальном поражении ЦНС у детей мы изучили особенности структурных изменений ткани головного мозга по данным нейросонографии и появления в периферической крови маркеров повреждения клеток нейрональной и астроглиальной природы, а также маркера апоптотической гибели клеток sFasL у новорожденных, перенесших гипоксически-ишемическое поражение. Анализ состояния ликворопроводящих путей показывает, что более выраженные структурные повреждения ткани головного мозга при гипоксически-ишемическом поражении сопровождаются увеличением доли детей с сужением передних рогов боковых желудочков (табл. 5).

Таблица 5

Распределение детей с различной выраженностью структурных изменений ткани головного мозга по основным параметрам ликворопроводящих путей

Данные нейросонографии		Легкие структурные изменения (n=7)		Среднетяжелые структурные изменения (n=24)		Тяжелые структурные изменения (n=22)	
		абс.	% (M±m)	абс.	% (M±m)	абс.	% (M±m)
Передние рога боковых желудочков	Норма	5	71,4±17,1	10	41,7±10,1	8	36,4±10,3
	Сужение	<b>2</b>	<b>28,6±17,1</b>	<b>13</b>	<b>54,2±10,2</b>	<b>13</b>	<b>59,1±10,5</b>
	Расширение			1	4,2±4,1	1	4,5±4,4
Задние рога боковых желудочков	Норма	6	85,7±13,2	15	62,5±9,9	5	22,7±8,9*#
	Сужение					<b>12</b>	<b>54,5±10,6*#</b>
	Расширение	1	14,3±13,2	9	37,5±9,9	5	22,7±8,9
III желудочек	Норма	7	100	18	75±8,8	9	40,9±10,5#
	Сужение			<b>5</b>	<b>20,8±8,3</b>	<b>12</b>	<b>54,5±10,6*#</b>
	Расширение			1	4,2±4,1	1	4,5±4,4
IV желудочек	Норма	7	100	11	45,8±10,2*	8	36,4±10,3*
	Сужение			1	4,2±4,1		
	Расширение			12	50±10,2	14	63,6±10,3*
Затылочная цистерна мозга	Норма	6	85,7±13,2	21	87,5±6,8	18	81,8±8,2
	Сужение			1	4,2±4,1	1	4,5±4,4
	Расширение	1	14,3±13,2	2	8,3±5,6	3	13,6±7,3
Наличие эховзвеси в ликворопроводящих путях				1	4,2±4,1	5	22,7±8,9

Примечание: \* p<0,05 в сравнении с первой подгруппой детей, # p<0,05 в сравнении со второй подгруппой детей (критерий хи-квадрат).

При нарастании тяжести появляется отек стенок задних рогов боковых желудочков и значимо возрастает доля детей с измененными размерами III и IV желудочков.

Дети с диагнозом «Церебральная ишемия» характеризуются значимо низкой в сравнении с контрольной оценкой по шкале Апгар на первой и пятой минуте жизни, а также наличием неврологической дисфункции разной выраженности. У детей с легкими и среднетяжелыми структурными изменениями ткани мозга преобладают синдром церебральной возбудимости и врожденный гипертонус, у детей с тяжелым поражением ЦНС – синдром церебральной депрессии. Эти данные подтверждают наличие перинатального гипоксически-ишемического поражения ЦНС и, вследствие этого, ограниченные адаптационно-компенсаторные возможности головного мозга.

Для определения вклада повреждения клеток нейрональной и астроглиальной природы в патогенез повреждения головного мозга детей с перинатальным гипоксически-ишемическим поражением ЦНС оценен уровень нейронспецифической енолазы (NSE) и глиального фибриллярного кислого белка (GFAP) в плазме периферической крови новорожденных детей контрольной и целевой групп (табл. 6).

Таблица 6

Содержание маркеров у здоровых новорожденных и у новорожденных с гипоксически-ишемическим поражением ЦНС (нг/мл)

Маркер	n	Целевая группа	n	Контрольная группа
		M±m		M±m
NSE	53	<b>9,68±1,13*</b>	21	4,27±2,12
GFAP	51	<b>0,362±0,15*</b>	21	0,032±0,15
sFasL	51	0,062±0,001	21	0,06±0,02

Примечание: \* p=0,002 в сравнении с контрольным значением (критерий Колмогорова-Смирнова).

Среднее значение NSE в сыворотке крови у детей с гипоксически-ишемическим поражением ЦНС значимо превышает контрольный уровень (в 2 раза) и составляет 9,68±8,25 нг/мл, против 4,27±2,12 (p=0,002). Перцентильное распределение уровня NSE в контрольной группе определяет значения менее 3,1 нг/мл как низкие, от 3,2 до 4,4 нг/мл - как средние и от 4,5 нг/мл - как высокие; последние регистрируются у 67,9% детей с перинатальным поражением ЦНС (рис. 3).

С нарастанием выраженности структурных изменений ткани головного мозга статистически значимо уменьшается доля детей, имеющих средний уровень концентрации NSE (p=0,05), отмечается тенденция к увеличению новорожденных с высоким уровнем концентрации маркера гибели нейрональных клеток, при неизменной доли детей с низкими значениями NSE в каждой подгруппе (рис. 3).

Среднее значение GFAP в целевой группе статистически значимо (p=0,032) превышает среднее контрольное значение и составляет 0,362±0,15 нг/мл. Среди всех новорожденных с гипоксически-ишемическим повреждением головного

мозга 32 новорожденных (63%) имеют нулевые значения GFAP, а 19 (37%) - положительные значения GFAP.

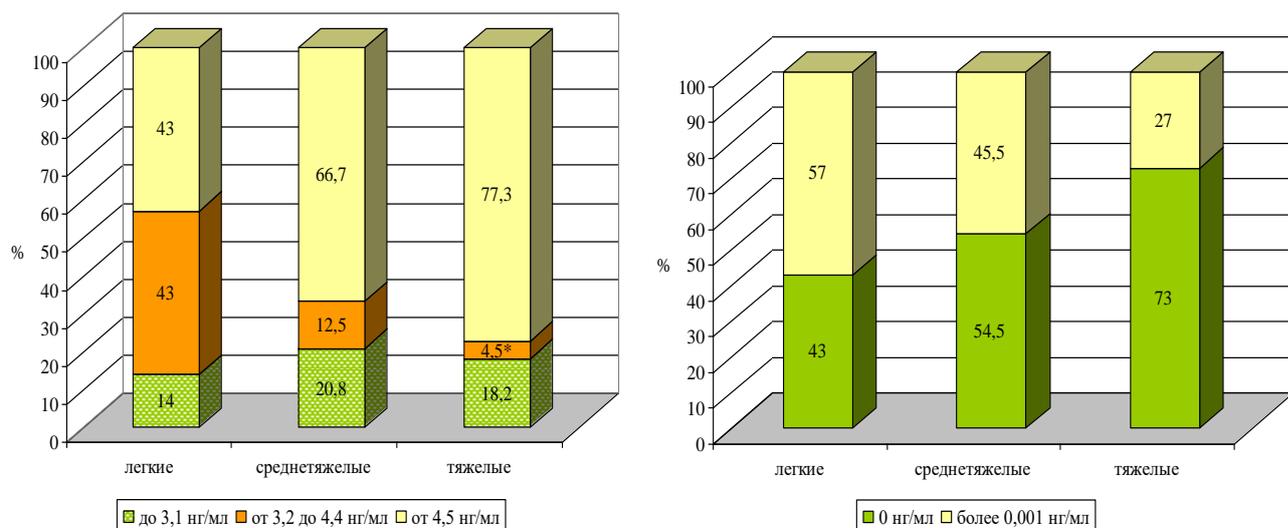


Рис. 3. Распределение детей с разной выраженностью структурных изменений ткани головного мозга с учетом нормативных значений NSE и GFAP

Примечание: \* $p=0,05$  при сравнении с группой детей с легким поражением мозга, имеющих средние (3,2-4,4 нг/мл) значения маркера (критерий хи-квадрат).

С нарастанием признаков поражения мозга отмечается тенденция к снижению относительной численности детей с положительными значениями астроглиального маркера в сыворотке крови (см. рис. 3). Уровень GFAP имеет прямую корреляционную взаимосвязь со степенью сужения основных структур ликворопроводящих путей, и, соответственно, со степенью отека ткани головного мозга, который приводит к сдавлению передних и задних рогов боковых желудочков и III желудочка (табл. 7).

Таблица 7

Корреляционные взаимосвязи между размерами структур ликворопроводящих путей и маркером повреждения клеток астроглиальной природы

Размер по данным НСГ	Подгруппа детей	GFAP	
		r	p
Передние рога боковых желудочков	I	0,777	0,039
	II	0,448	0,037
	III	0,656	0,001
Задние рога боковых желудочков	I	0,83	0,028
	II		
	III	0,451	0,036
III желудочек	I		
	II	0,426	0,048
	III	0,696	0,000
IV желудочек	I	0,777	0,039
	II	0,489	0,022
	III	0,613	0,003

Примечание: r – коэффициент ранговой корреляции Спирмена, p – уровень значимости.

Таким образом, установлена взаимосвязь маркера повреждения астроглиальных клеток с выраженностью отека ткани головного мозга вследствие гипоксически-ишемического состояния, т.е. при нарастании тяжести гипоксически-ишемического повреждения ткани головного мозга по данным нейросонографии имеется снижение содержания астроцитарного маркера GFAP в сыворотке периферической крови новорожденных.

При определении sFasL в плазме периферической крови как маркера апоптоза не отмечается достоверного увеличения этого показателя в группе новорожденных, перенесших перинатальное гипоксически-ишемическое поражение ЦНС (см. табл. 6). При перцентильном распределении низким определяется уровень sFasL менее 5,1 нг/мл, средним – от 5,2 до 6,7 нг/мл и высоким – более 6,8 нг/мл. Среди детей с перинатальным поражением ЦНС более половины (54,9%) имеют средний уровень sFasL в сыворотке крови, статистически значимо отличается доля детей с высокими (24%) и низкими (22%) показателями маркера апоптотической гибели клеток. При нарастании структурных изменений ткани головного мозга вследствие гипоксически-ишемического воздействия наблюдается тенденция к увеличению доли детей, имеющих средние значения маркера апоптотической гибели клеток в сыворотке периферической крови (рис. 4).

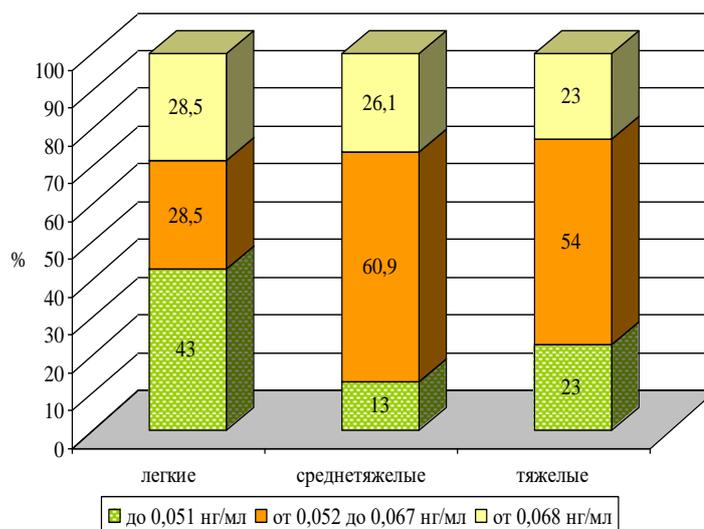


Рис. 4. Распределение детей с разной выраженностью структурных изменений ткани головного мозга с учетом нормативных значений FasL

Резюмируя, результаты клинического исследования позволяют считать, что усиление выраженности структурных изменений ткани головного мозга вследствие гипоксического поражения у новорожденных сопровождается увеличением концентрации маркера повреждения нейрональных клеток (NSE) и снижением концентрации маркера астроглиальной природы (GFAP) в плазме периферической крови; определение уровня sFasL (маркера апоптоза) не является специфическим (диагностическим или прогностическим) критерием степени тяжести повреждения головного мозга у новорожденных с церебральной ишемией.

В экспериментальной части исследования обнаружено увеличение числа астроцитов в острый постишемический период, характеризующийся наиболее выраженными структурными изменениями ткани мозга. Этим данным не противоречат результаты клинической части исследования, когда при максимальном нарушении структур головного мозга отмечается наименьшая концентрация маркера гибели астроцитарной глии в периферической крови, отражая повышенную резистентность астроцитов к действию гипоксии/ишемии, в отличие от нейронов, наиболее уязвимых в данных условиях. При этом дополнительным признаком повышенной чувствительности нейронов к гипоксии/ишемии может быть установленное повышение концентрации маркера апоптотической гибели клеток в сыворотке крови у детей с тяжелыми структурными изменениями ткани головного мозга, а также данные экспериментального исследования, зарегистрировавшие нарастание уровня апоптоза клеток в острый постишемический период.

На основе представлений о строении и функционировании нейроваскулярной единицы и результатов выполненного исследования предлагается следующая гипотеза особенностей взаимодействий астроцитарных и нейрональных клеток при церебральной ишемии: в физиологических условиях нейрон-глиальный показатель, характеризующий число астроцитов, функционально связанных с одним нейроном, равен 1,5-1,6. Возможно, в условиях нарастающей кислородной и субстратной недостаточности происходит снижение этого показателя, т.е. сохранение и накопление астроцитарной глии (реактивный астроглиоз) и вынужденная элиминация нейронов в условиях гипоксии/ишемии, что может быть приспособительной реакцией головного мозга при гипоксическом воздействии. Наряду с этим существуют данные о способности астроцитов в физиологических условиях трансформироваться в нейроны, либо принимать на себя их функцию (Seri B. et al., 2001). Исследования в этом направлении смогут подтвердить или опровергнуть эти предположения.

Таким образом, полученные в ходе экспериментального и клинического исследования данные позволяют сформулировать принципиально новые представления о механизмах повреждения клеток нервной системы, ассоциированных с измененной активностью и экспрессией НАД<sup>+</sup>-конвертирующего фермента – АДФ-рибозилциклазы, и, в более широком смысле, - с нарушением метаболизма НАД<sup>+</sup> в клетках, а также о вкладе повреждения клеток нейрональной и глиальной природы в указанные события в физиологических условиях и при гипоксически-ишемическом воздействии.

## **ВЫВОДЫ**

1. Постнатальный период развития ЦНС характеризуется повторными подъемами запрограммированной гибели клеток головного мозга экспериментальных животных. Гипоксически-ишемическое поражение ЦНС приводит к повышению уровня апоптоза (в 1,5 раза) клеток нейрональной и глиальной природы в ранний и отсроченный период после гипоксии/ишемии, при этом динамика процесса в условиях поражения головного мозга и физиологических условиях носит однотипный характер.

2. Динамика восстановления неврологического статуса животных, перенесших перинатальное поражение ЦНС, соответствует характеру изменения выраженности апоптоза в коре головного мозга экспериментальных животных. Прогрессивно снижающаяся интенсивность запрограммированной гибели клеток, сопровождающаяся редуцированием неврологической симптоматики, отражает хорошие компенсаторные возможности незрелого головного мозга.
3. В острый постишемический период поражения ЦНС наблюдается увеличение относительного количества клеток, экспрессирующих CD38 (в 2 раза), сохраняющееся в течение трех суток и совпадающее по времени с интенсификацией апоптоза клеток головного мозга. Прямая умеренная корреляционная взаимосвязь ( $r=0,59$ ) между уровнем апоптотической гибели клеток и относительным количеством клеток, экспрессирующих CD38 отражает участие гликопротеида CD38 в реализации процесса запрограммированной гибели клеток головного мозга в физиологических условиях и при гипоксически-ишемическом воздействии.
4. В физиологических условиях до 10 суток постнатального развития происходит увеличение активности АДФ-рибозилциклазы/CD38. Наличие между ферментом и субстратом ( $\text{НАД}^+$ ) сильной прямой корреляционной взаимосвязи ( $r=0,84$ ) в этот период указывает на первостепенное участие АДФ-рибозилциклазы в регуляции внутриклеточного уровня  $\text{НАД}^+$ . Гипоксически-ишемическое перинатальное поражение ЦНС приводит к смещению пика активности АДФ-рибозилциклазы в ранний постишемический период (через 4 часа в 8,7 раз) наряду с максимальным повышением концентрации  $\text{НАД}^+$  (в 5,7 раз).
5. Основными клетками, экспрессирующими CD38 в условиях гипоксии/ишемии являются астроциты. Максимальное число астроцитов наблюдается в ранний постишемический период в течение трех суток, отражая выраженность реактивного астроглиоза, при этом происходит значимое нарастание клеток, экспрессирующих CD38. Увеличение коэкспрессии в клетках астроглиальной природы коннексина 43 и АДФ-рибозилциклазы/CD38 свидетельствует о наличии функциональной взаимосвязи между этими двумя молекулами в условиях гипоксии/ишемии, направленной на поддержание уровня внутриклеточного  $\text{НАД}^+$  и, в целом, выживаемость астроцитов.
6. Гипоксически-ишемическое поражение ЦНС новорожденных сопровождается разнонаправленными изменениями концентраций маркеров клеток нейрональной и астроглиальной природы: увеличением уровня нейронспецифической енолазы (доля пациентов с высокими значениями данного показателя достигает 67% и увеличивается по мере нарастания структурных изменений ткани мозга по данным нейросонографии) и снижением уровня глиального фибриллярного кислого белка, для которого доказана прямая зависимость со степенью сужения структур ликворопроводящих путей ( $r=0,83-0,43$ ) вследствие гипоксически-ишемического отека ткани головного мозга (при нарастании тяжести гипоксии/ишемии установлено снижение содержания астроцитарного маркера в сыворотке периферической крови новорожденных).
7. Доказана зависимость между степенью выраженности структурных

изменений головного мозга у новорожденных с церебральной ишемией (по данным нейросонографии) и концентрацией маркеров повреждения клеток нейрональной и глиальной природы (нейронспецифическая енолаза и глиофибрилярный кислый белок); определение уровня sFasL (маркера апоптоза) не является специфическим (диагностическим или прогностическим) критерием степени тяжести повреждения головного мозга у новорожденных с церебральной ишемией.

### **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

1. Направленная модуляция экспрессии и активности АДФ-рибозилциклазы/CD38 может быть использована как основа для разработки новой стратегии терапии перинатального гипоксически-ишемического поражения ЦНС.
2. Механизмы взаимодействия нейронов и астроцитов, обусловленные сопряженной работой АДФ-рибозилциклазы и коннексина 43 являются таргетными для направленной коррекции перинатального гипоксически-ишемического поражения головного мозга.
3. Разнонаправленные изменения маркеров гибели нейронов и астроцитов (повышение уровня нейронспецифической енолазы и снижение концентрации глиального фибриллярного кислого белка) в сыворотке периферической крови новорожденных рекомендуется использовать как диагностический критерий для диагностики степени тяжести гипоксически-ишемического поражения ЦНС.

### **Список работ, опубликованных по теме диссертации:**

1. Роль АДФ-рибозилциклазы и циклической АДФ-рибозы в регуляции электровозбудимости и жизнеспособности клеток головного мозга / А.Б.Салмина, Х.Хигашида, С.В.Михуткина, А.А.Фурсов, Т.Е.Таранушенко, Р.Я.Оловянникова, Н.А.Малиновская, О.С.Окунева // Структурно-функциональные, нейрохимические и иммунохимические закономерности асимметрии и пластичности мозга: сб. тр. конф. – М., 2007. – С.540-544.
2. Маркеры повреждения нейронов и астроцитов в плазме крови новорожденных при церебральной ишемии разной степени тяжести / И.М.Демьянова, Т.Е.Таранушенко, А.Б.Салмина, О.С.Окунева и др. // Сиб. мед. обозрение. - 2008. - №2. – С.27-31.
3. НАД<sup>+</sup>-зависимые механизмы нарушения жизнеспособности клеток головного мозга в остром периоде гипоксически-ишемического перинатального поражения / А.Б.Салмина, О.С.Окунева, Н.А.Малиновская и др. // Нейрохимия. - 2008. - №3. – С.1-8.
4. Особенности запрограммированной клеточной гибели, опосредованной АДФ-рибозилциклазой, при перинатальном гипоксически-ишемическом поражении головного мозга / О.С.Окунева, О.В.Фролова, Г.А.Тагаева и др. // Актуальные вопросы современной медицинской науки и здравоохранения: матер. 63-й всерос. науч.-практ. конф. молодых ученых и студентов с междунар. участием. - Екатеринбург, 2008. – С.391-392.
5. Особенности течения беременности у женщин, дети которых перенесли церебральную ишемию разной степени тяжести / И.М.Демьянова, Т.Е.Таранушенко, Л.А.Шароглазова, С.И.Устинова, О.С.Окунева // Матер.

юбилейной сибирской конференции, посвященной 10-летию Красноярского краевого общества клинических нейрофизиологов. - Красноярск, 2008. – С.38-40.

### Список основных сокращений

НАД<sup>+</sup> – никотинамидадениндинуклеотид;  
НГД<sup>+</sup> - никотинамидгуаниндинуклеотид;  
НСГ – нейросонография;  
цАДФР/цГДФР – циклическая аденозиндифосфат/гуаниндифосфат-рибоза;  
ЦНС – центральная нервная система;  
CD – cluster of differentiation;  
Cx – Connexin;  
FasL – Fas-лиганд;  
FITC (ФИТЦ) – fluorescein isothiocyanate (флюоресцеинизотиоционат);  
GFAP – Glial Fibrillary Acidic Protein;  
IgG – Immunoglobulin G;  
MPT - Mitochondrial Pore Transition;  
NSE – Neuron Specific Enolase;  
NSS - Neurological Score System;  
PARP – Poly(ADP-Ribose)Polymerase;  
sFasL – растворимая форма Fas-лиганда;  
TdT – Terminal Deoxynucleotidyl Transferase;  
TUNEL – TdT-mediated dUPT nick end labeling.