

## ВЛИЯНИЕ ГИПОКСИИ НА ПРОЦЕСС ВАСКУЛОГЕНЕЗА В ТИМУСАХ У ДЕТЕЙ ПЕРВОГО ГОДА ЖИЗНИ

Логинова Н.П.<sup>1</sup>, Четвертных В.А.<sup>1</sup>, Хромцова Г.А.<sup>1</sup>, Даракчан Г.А.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ГБОУ ВПО «Пермский государственный медицинский университет им. академика Е.А. Вагнера» Минздрава России, г. Пермь, Россия, e-mail: natalitsa@yandex.ru

В тимусах детей 1 года жизни (n=77), на фоне гипоксии вызванной врожденным пороком сердца, с помощью маркеров - CD34 и CD31 изучили процесс неоваскулогенеза. Установлено, что независимо от степени выраженности гипоксии запускаются механизмы неоваскулогенеза проявляющиеся дифференцировкой прогениторных клеток (CD34<sup>+</sup>) в клетки сосудистой стенки с образованием примитивной капиллярной сети. На протяжении всего периода наблюдений (1 мес., 6 мес., 1 мес.) в поле зрения увеличивается площадь экспрессии CD34 и растет плотность сосудов. Интенсивность васкулогенеза зависит от степени выраженности гипоксии и наиболее активно проявилась в группе синего типа ВПС. Несмотря на это, экспрессия эндотелиального маркера CD31 в группе синего типа ВПС недостаточна, и появляется позднее, что формирует предпосылки слабой функциональной активности эндотелия. Таким образом, гипоксия, в зависимости от степени выраженности ВПС, запускает в тимусе адаптационные механизмы, при участии комплекса тканевых и клеточных взаимодействий, направленных на нормализацию кислородного дефицита. Но имеющиеся ресурсы не способны восстановить недостающий баланс.

Ключевые слова: тимус, гипоксия, васкулогенез, врожденный порок сердца, дети.

## EFFECT OF HYPOXIA ON THE PROCESS VASCULOGENESIS IN THE THYMUS IN INFANTS

<sup>1</sup>Loginova N.P., <sup>1</sup>Chetvertnykh V.A., <sup>1</sup>Kxromtsova G.A., Darakchan G.A.<sup>1</sup>

Perm State Medical University n.a. acad. E.A. Wagner, Perm, Russia, e-mail: natalitsa@yandex.ru

In the thymus, children 1 year of age (n = 77), against the background of hypoxia caused by a congenital heart defect, using markers - CD34 and CD31 studied neovaskulogeneza process. Irrespective of the degree of hypoxia triggers neovaskulogeneza manifested differentiation of progenitor cells (CD34 +) cells in the vascular wall to form a primitive capillary network. Throughout the entire period of observation (1 mo., 6 mo., 1 month.) In the field of increasing the area of ekspressii CD34 and increases the density of blood vessels. Vasculogenesis intensity depends on the severity of hypoxia and most actively manifested in a group of blue type PRT. Despite this, the expression of the endothelial marker CD31 in a group of blue such as the UPU is not sufficient, and appears later that forms the background of weak functional activity of the endothelium. Thus, hypoxia, depending on the severity of CHD in the thymus starts adaptation mechanisms involving complex tissue and cellular interactions aimed at the normalization of oxygen deficiency. However, the available resources are not able to recover the missing balance.

Keywords: thymus, hypoxia, vasculogenesis, congenital heart disease, children.

Врожденный порок сердца (ВПС) часто приводит к нарушению системной гемодинамики, формируя предпосылки для тканевой гипоксии. Известно, что в основе любой формы гипоксии лежит недостаточность ведущей клеточной энергопродуцирующей системы – митохондриального окислительного фосфорилирования с прогрессирующим дефицитом АТФ [3]. По мнению Лукьяновой Л.Д. (2011), гипоксия одновременно способна мобилизовать тканевые ресурсы организма, создавая условия для срочной и долгосрочной адаптации, которая контролируется межклеточными и внутриклеточными регуляторными механизмами. По мнению ряда исследователей гипоксия активизирует в физиологически важных местах регуляции кислородных путей гипоксия-индуцибельный фактор (hypoxia-

inducible factor – HIF). Он считается ведущим транскрипционным регулятором генов млекопитающих, ответственных за реакцию на недостаточность кислорода. HIF обеспечивает быстрые и адекватные ответы на гипоксический стресс. Кроме этого, он может стать причиной развития эндотелиальной дисфункции [2]. Недостаток кислорода является основным стимулом активации образования новых сосудов при физиологических и патологических состояниях [6].

**Цель работы:** изучить интенсивность процесса неоваскулогенеза в тимусе у детей первого года жизни при гипоксии, обусловленной ВПС разной степени выраженности.

**Материалы и методы.** Исследование проведено на биоптатах тимуса (n=77), полученных во время операций от детей, в возрасте до 11 мес., при коррекции врожденных пороков сердца. Тимэктомию проводились в соответствии с существующей хирургической практикой Федерального краевого центра сердечно-сосудистой хирургии г. Перми. Исследования проводили согласно Хельсинской Декларации ВМА 2000 г. и протоколу Конвенции Совета Европы о правах человека и биомедицине 1999 г. Критериями включения явилось наличие добровольного согласия на обследование со стороны законных представителей несовершеннолетних детей.

В патогенезе врожденных пороков сердца лежит механизм нарушения системной гемодинамики, зависящий от сложности сердечного порока, и вызывающий цианоз слизистых и кожных покровов. По наличию цианоза, было выделено 2 группы: 1-я – тимус (n=35) от детей с белыми пороками сердца, без цианоза слизистых и кожных покровов (дефект межжелудочковой перегородки; дефект межпредсердной перегородки). Возраст детей от 1 до 11 месяцев; 2-я – тимусы (n= 42) от детей с более выраженной патологией – синие пороки сердца, вызывающие цианоз (тетрада Фалло; аномалия Эбштейна; транспозиция магистральных сосудов), в возрасте от 1 до 11 месяцев. Исследование проводили в возрастной динамике: 1 мес., 6 мес. и 11 месяцев. В качестве группы сравнения, исследованы тимусы от случайно погибших детей (n=6) в возрасте от 9 до 12 месяцев.

Биоптаты тимуса фиксировали в 10 % нейтральном формалине на фосфатном буфере (pH 7,2). Иммуногистохимическое исследование проводили моноклональными антителами (Dako, США): 1) CD34 – маркер гемопоэтических клеток костномозгового происхождения используется для идентификации прогениторных клеток; 2) CD31 – для идентификации эндотелиальных клеток. Для визуализации результатов использовали системы детекции Ultra Vision ONE Detection System HRP Polymer. Для оценки качества реакции использовали стекла с позитивным контролем для каждого из антигенов (фирма Labvision, США).

Морфометрическое исследование и съемку препаратов проводили с использованием системы компьютерного анализа, с последующей обработкой полученных изображений в

программе Image PRO+ (free version). Экспрессию CD 31 и CD34 определяли измерением площади положительной реакции клеток в пикселях (pix) в каждом случае в десяти полях зрения. Плотность сосудов определяли с помощью открытой тестовой системы (программа Image J).

Полученные результаты обработаны с помощью пакетов MicrosoftExcel 2007 и Statistica 6,0. Для статистического анализа использовались непараметрические критерии. В результатах представлены средние значения со стандартными отклонениями. Различие оценивалось с помощью критерия Манна-Уитни. За статистически значимые результаты принималась величина ошибки  $p=0,05$ .

**Результаты исследования.** В группе с белым типом ВПС, в ранний срок наблюдения (1 месяц) прогениторные клетки ( $CD34^+$ ) в тимусе выявляются в междольковых перегородках вблизи крупных кровеносных сосудов. Экспрессия белка CD34 имеется и в клетках соединительной ткани, принадлежащих к фибробластическому дифферону. Они залегают вдоль междольковых и корковых перегородок. В субкапсулярной зоне под базальной мембраной  $CD34^+$  клетки расположены диффузно или группой по – 2-3 позитивно окрашенные клетки. В пределах коркового вещества  $CD34^+$  клетки присутствуют в стенке поперечно срезанных капилляров, часть из них обнаруживали в продольном срезе, в виде мелких трубочек.

К 6 месяцу наблюдения в корковом веществе растет численность капилляров, что увеличивает их плотность расположения ( $p=0,002$ ). Капилляры представлены трубчатыми структурами, их стенка выстлана позитивно окрашенными клетками к CD34.

В пределах коркового вещества и ближе к кортико-медулярной границе образование новых капилляров верифицируется в виде нежных сплетений из  $CD34^+$ .

Таблица 1

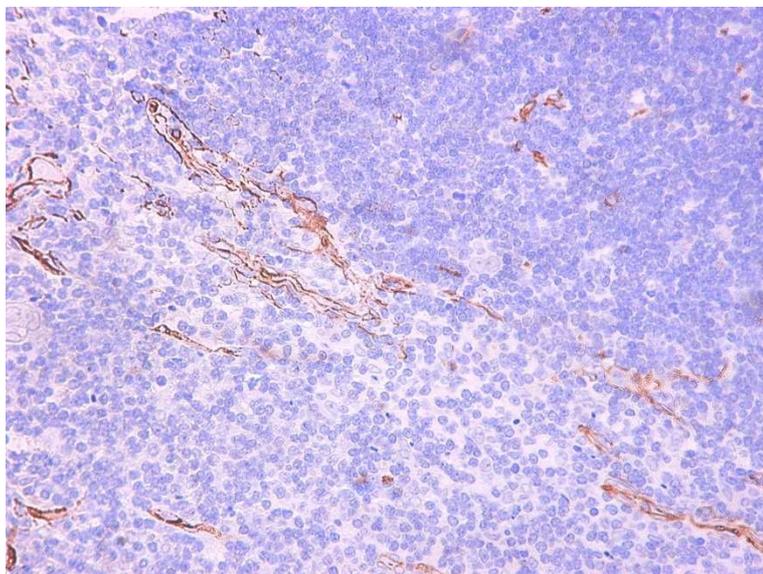
Экспрессия CD34 в корковом веществе дольки тимуса при ВПС белого типа  
(компьютерная морфометрия) pix

возраст / Группы	контроль	1 месяц	6 месяцев	11 месяцев
Плотность сосудов	9,58±0,59	9,96±0,64	11,11±0,76*	13,96±0,99*
Площадь экспрессии	1662,34±191,42	1430,68±122,88*	1732,83±153,65	1962,80±230,74*

*Примечание:* \* – значимые различия ( $p<0,05$ ) между группами по отношению к контролю по парному двухвыборочному t-тесту ( $M\pm m$ ).

К 11 месяцу количество сосудистых трубочек продолжает достоверно увеличиваться, что проявляется в плотности расположения сосудов в поле зрения ( $p=0,0001$ ) и, занимаемой общей площади экспрессии CD34, которая также вырастает (таблица 1).

Наиболее интенсивно неоваскулогенез идет в кортико-медуллярной зоне. В этой части доли тимуса формируются скопления продольно идущих линий, переходящие в трубчатые образования и, врастающие в мозговое вещество (рис. 1).



*Рис. 1. Образование сосудов (CD34<sup>+</sup>) в кортико-медуллярной зоне тимуса.*

*Белый тип ВПС. 11 месяцев. Увеличение X100*

Интенсивный процесс неоваскулогенеза в тимусе наблюдается и в группе синего типа ВПС. Во все сроки исследования (1мес., 6 мес., 11 мес.) в сосудах междольковых перегородок эндотелий имеет положительное окрашивание к CD34. Сосуды лежат в окружении клеток соединительной ткани, имеющих экспрессию CD34. В непосредственном контакте с сосудами и в местах скопления жировой ткани находятся позитивно окрашенные клетки, концентрируясь вдоль перегородок, и проникающих в субкапсульную зону доли.

При этом типе порока, в 1-й месяц васкулогенез идет в корковом веществе и особенно интенсивно в кортико-медуллярной зоне. К 6-му месяцу формируются цепочки из клеток, которые дифференцируются в клетки эндотелия, образуя новые сосуды, что достоверно повышает плотность расположения сосудов и увеличивает площадь экспрессии CD34 (таблица 2). В 11 месяцев в кортико-медуллярной зоне молодые сосуды формируют сеть или лежат в виде тонких линейных трубчатых образований, выстланных CD34 положительными клетками (рис. 2). В этот срок верифицируется развитие капилляров в мозговом веществе, что в предыдущем сроке исследования (6 мес.) наблюдалось только в единичных случаях. Интенсивность васкулогенеза существенно увеличила плотность расположения сосудов в

поле зрения. По сравнению с группой контроля она увеличилась в 2 раза ( $p=0,00007$ ). Общая площадь экспрессии CD34 к концу сроков наблюдения выросла в 1,7 раза (таблица 2).

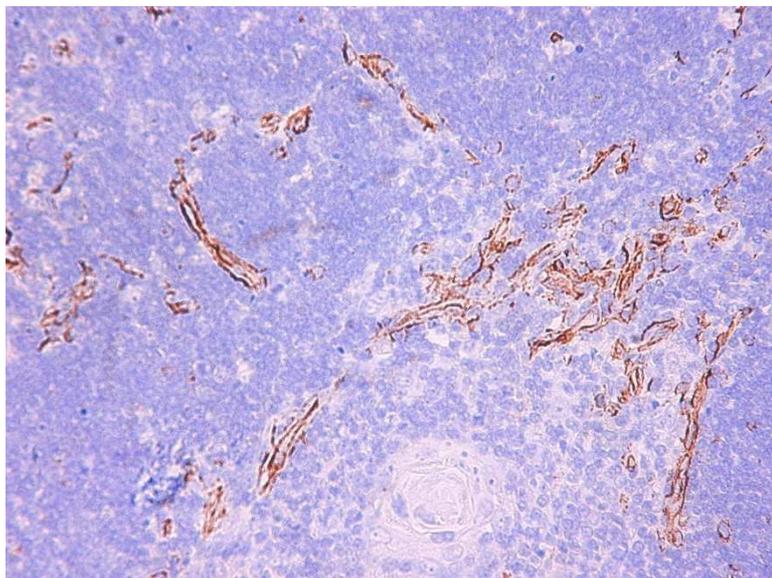


Рис. 2. Васкулогенез в кортико-медуллярной зоне. Экспрессия CD 34 в стенке новых сосудов. Синий тип ВПС. 11 месяцев. Увеличение: А - X100

Таблица 2

Экспрессия CD34 в корковом веществе дольки тимуса при ВПС синего типа  
(компьютерная морфометрия) рix

возраст	контроль	1 месяц	6 месяцев	11 месяцев
Группы				
Плотность сосудов	9,58±0,59	13,22±0,84*	13,89±1,25*	19,15±1,70*
Площадь экспрессии	1662,34±191,42	1489,84±52,64*	1872,38±209,17	2834,75±487,89*

Примечание:\* – значимые различия ( $p<0,05$ ) между группами по отношению к контролю по парному двухвыборочному *t*-тесту ( $M\pm m$ ).

Оценка площади CD 31<sup>+</sup> показала низкую экспрессию в тимусах обеих групп ВПС по отношению к группе контроля (рис. 3). При белом типе ВПС положительное окрашивание эндотелия регистрируется преимущественно в крупных сосудах междольковых перегородок, и в единичных случаях – в капиллярах коркового вещества и в кортико-медуллярной зоне. К 11 месяцу верифицируется рост экспрессии маркера CD31. Особенно интенсивно окрашиваются сосуды в кортико-медуллярной зоне и по периферии мозгового вещества.

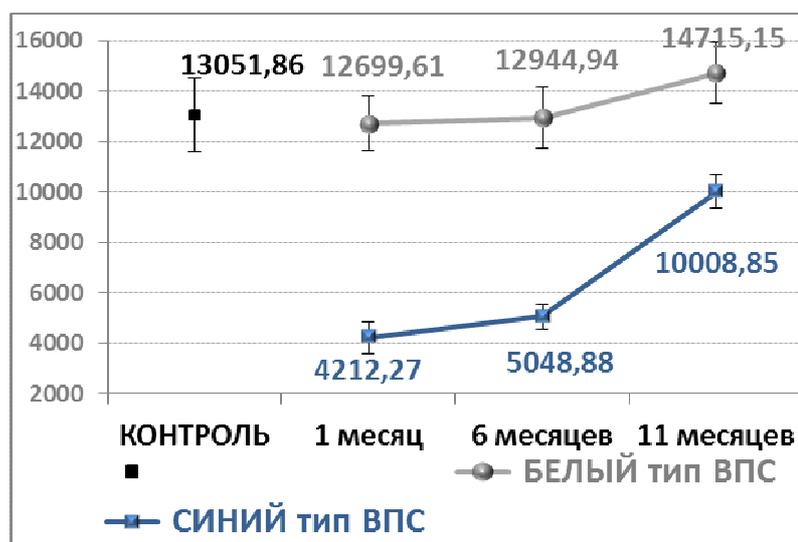


Рис. 3. Площадь экспрессии CD31 в тимусе при ВПС разного типа в сравнении с группой контроля. По результатам компьютерной морфометрии (pix) (динамика,  $M \pm m$ )

Увеличение занимаемой площади CD31 к 11 месяцу имеет прямую корреляцию по отношению к предыдущему сроку (6 мес.):  $r=0,459$  ( $p=0,007$ ), показатели которого уступали контрольной группе. К концу сроков исследования площадь экспрессии CD31, превысила показатели контрольной группы, но достоверной разницы не имела. В результате, к 11 месяцу имеется слабая динамика роста накопления CD31 в клетках эндотелия сосудов. Это определяет обратную корреляцию по отношению к площади экспрессии CD34 ( $r= - 0,594$ ;  $p=0,0003$ ) в тот же срок исследования.

При синем типе ВПС в 1-й и 6-й месяцы в пределах дольки экспрессия CD31 выявляется эпизодически. Имеющиеся сосуды редко реагируют на маркер. В результате, площадь экспрессии CD31 меньше, чем в группе контроля в 3 раза. К 11 месяцу эндотелиального маркера адгезии становится значительно больше, но общая его площадь всё ещё остается ниже уровня контрольной группы.

**Обсуждение.** Анализируя полученные результаты, можно говорить, что в тимусе независимо от степени выраженности гипоксии запускаются механизмы неоваскулогенеза проявляющиеся дифференцировкой прогениторных клеток ( $CD34^+$ ) в клетки сосудистой стенки с образованием примитивной капиллярной сети. Известно, что гипоксия разного генеза способствует увеличению плотности сосудов [7, 9]. В наших исследованиях, в обеих группах ВПС на протяжении всего периода наблюдений в поле зрения тимуса увеличивается площадь экспрессии CD34 и растет плотность сосудов. Образование сосудов в динамике имеет последовательность – от мелких разрозненно лежащих трубочек до капилляров формирующих нежную сеть. Степень выраженности гипоксии определяет интенсивность васкулогенеза, наиболее активно которая проявилась в группе синего типа ВПС.

Первоначально, в тимусах обеих групп неоваскулогенез проявляется за счет слияния клеток CD34<sup>+</sup> присутствующих диффузно в пределах коркового вещества. Пополнение резерва прогениторных клеток наблюдается со стороны сосудов междольковых перегородок и имеющейся в них скопления жировой ткани. Известно, что в жировой ткани находятся стволовые клетки, которые секретируют большой спектр проангиогенных факторов роста и могут участвовать в неоваскулогенезе *in vivo* [10]. Попадая в ткань CD34<sup>+</sup> клетки способны развиваться и в клетки сосудистой стенки – перициты [5]. По данным Банина В.В (2004), на ранних стадиях образования сосуда перициты формируют фронтальную зону почки роста капилляра, синтезируя компоненты межклеточного вещества перед миграцией эндотелиоцитов. В наших исследованиях в течение первых 6 месяцев активация прогениторных клеток (CD34<sup>+</sup>) верифицировалась в виде формирования скоплений продольно идущих линий, являющихся примитивным вариантом формирования стенки будущего сосуда. Подобный процесс в обоих случаях наиболее интенсивно верифицировали на границе коркового и мозгового вещества, места выхода тимоцитов в кровь.

По нашему мнению, на процесс миграции и дальнейшую дифференцировку прогениторных клеток (CD34<sup>+</sup>) в эндотелиоциты влияет гипоксия-индуцибельный фактор (hypoxia-inducible factor – HIF). HIF считается ведущим транскрипционным регулятором генов млекопитающих, ответственных за реакцию на недостаточность кислорода. [2, 8]. Наблюдаемая динамика васкулогенеза показала силу стимула гипоксии.

Оценка площади эндотелиального маркера CD31, независимо от степени выраженности гипоксии, показала низкий уровень его экспрессии в течение всего срока наблюдения. Особенно в группе с синим типом ВПС, где маркер CD31 в 1-й месяц исследования верифицировался в 3 раза меньше, чем в группе контроля, и это имеет отрицательную корреляцию с площадью экспрессии CD34. Уровень CD34<sup>+</sup> в этот срок уступал контролю только в 0,8 раз ( $R = -0,374$ ;  $p = 0,0318$ ). К концу наблюдений (11 месяц) площадь экспрессии CD31 хоть и вырос, но так и остался ниже уровня контроля, а уровень CD34<sup>+</sup> наоборот, значительно превысил показатели контрольной группы.

Исходя из этого, следует, что гипоксия стимулирует в тимусе процессы неоваскулогенеза. Но, не смотря на образование новых сосудов, экспрессия эндотелиального маркера CD31 в группе синего типа ВПС недостаточна, и появляется позднее, что формирует предпосылки слабой функциональной активности эндотелия. Как показали наши исследования, приобретение эндотелиоцитами положительного окрашивания к маркеру CD31 в течение всего периода наблюдений идет медленно.

Таким образом, гипоксия, в зависимости от степени её выраженности, запускает в тимусе адаптационные механизмы в виде имеющихся у него резервов, при участии

комплекса тканевых и клеточных взаимодействий, направленных на нормализацию кислородного дефицита. Но не всегда имеющиеся ресурсы способны восстановить недостающий баланс.

### Список литературы

1. Банин В.В. Роль перицитов в механизме новообразования сосудов регенерирующей соединительной ткани. //Морфология.- 2004.- №1. -С.45-50.
2. Замечник Т.В., Рогова Л.Н. Гипоксия как пусковой фактор развития эндотелиальной дисфункции и воспаления сосудистой стенки. //Вестник новых медицинских технологий. - 2012. - Т. XIX. - №2. -С 393-394.
3. Лукьянова Л.Д. Митохондриальная дисфункция типовой патологический процесс, молекулярный механизм гипоксии // Проблемы гипоксии: молекулярные, физиологические и клинические аспекты. М – Воронеж: Истоки. -2004. - С. 8-50.
4. Лукьянова Л.Д., Кирова Ю.И., Сукоян Г.В. Новое о сигнальных механизмах адаптации к гипоксии и их роли в системной регуляции. //Патогенез. – 2011. - т.9. - №3. - С. 4-14.
5. Farrington-Rock, C., Crofts, N.J., Doherty, M.J., Ashton, B.A., Griffin-Jones, C., Canfield, A.E. Chondrogenic and adipogenic potential of microvascular pericytes. //Circulation. - 2004. – vol.110 №5. P. 2226-32.
6. Grosjean, J., Kiriakadis, S., Reilly, K. et al. Vascular endothelial growth factor signalling in endothelial cell survival: a role for NFκB. //Biochem Biophys Res Commun. -2006. – Vol.340. - p.984-994.
7. Klock, B.L., Skuli, N., Simon, M.C. Hypoxia-induced angiogenesis: good and evil. //Genes Cancer. - 2011.- vol. 2. №12. P. 1117-33.
8. Lando, D., Gorman, J.J., White-law, M.L., Peet, D.J. Oxygen-dependent regulation of hypoxia-inducible factor by prolyl and asparaginyl hydroxylation //Eur J Biochem. – 2003. Vol.270. №5 – p. 781-790.
9. Nanka, O., Valasek, P., Dvorakova, M., Grim, M. Experimental hypoxia and embryonic angiogenesis. //Development dynamics. - 2006. Vol.235. P. 723-733.
10. Zuk, P.A. The adipose-derived stem cell: looking back and looking ahead. //Mol. Biol. Cell. - 2010. Vol.21. №11. P.1783.

### Рецензенты:

Баландина И.А., д.м.н., профессор, зав. кафедрой нормальной, топографической и клинической анатомии оперативной хирургии, ГБОУ ВПО «Пермский государственный

медицинский университет им. академика Е.А. Вагнера» Минздрава России, г. Пермь;  
Косарева П.В., д.м.н., зав. отдела морфологических и патофизиологических исследований  
ЦНИЛа ГБОУ ВПО «Пермский государственный медицинский университет им. академика  
Е.А. Вагнера» Минздрава России, г. Пермь.