

Министерство образования и науки Российской Федерации
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н. Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра физиологии человека и животных

**ИЗМЕНЕНИЕ УРОВНЯ АРТЕРИАЛЬНОГО ДАВЛЕНИЯ У
НОВОРОЖДЕННЫХ КРЫС ПРИ РАЗВИТИИ ЦЕРЕБРАЛЬНЫХ
ГЕМОМРАГИЙ**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

студентки 4 курса 424 группы

направление подготовки бакалавриата 06.03.01 Биология

биологического факультета

Асадовой Лейлы Фамиловны

Научный руководитель

ассистент кафедры физиологии

человека и животных

_____ О.А. Синдеева

Зав. Кафедрой физиологии человека

и животных, д. б. н., доцент

_____ О.В. Семячкина-Глушковская

Саратов 2016

Введение. Актуальность темы. Проблема острой цереброваскулярной патологии у детей является на сегодняшний день особенно актуальной. Это обусловлено тем, что установление причин острых нарушений мозгового кровообращения в детском возрасте вызывает значительные затруднения, поэтому инсульты у детей в 20-30% случаев проходят под разнообразными ошибочными диагнозами, а в случае установленного диагноза не всегда удается выяснить причину возникновения инсульта, что негативно отражается на тяжести течения, прогнозе и искажает эпидемиологические показатели [1].

В последнее время отмечается увеличение числа случаев инсультов у детей, высоких показателей смертности и тяжелых неврологических исходов, приводящих к ранней детской инвалидности. Так, по некоторым данным частота инсультов у детей составляет: в Украине 2,5-4,2 на 100 тыс. детей; в г. Москвы 6,9:100000; США - 11,9 случая на 100 тыс. популяции; в Казахстане 188 случаев; в Сингапуре 26 случаев инсультов у детей. У новорожденных в отличие от взрослых чаще встречается геморрагический инсульт (50% всех зарегистрированных случаев) [2].

По данным разных авторов летальность при геморрагических и ишемических инсультах у детей составляет от 7 до 28%, общая смертность - 0,6 случаев на 100 тыс. детей в год. Исходами инсультов, перенесенных в раннем детском возрасте, являются задержки психомоторного и психоречевого развития, грубые двигательные дефекты, симптоматическая эпилепсия. Тяжесть исходов детских инсультов обусловлена реализацией заболевания в важнейший, с точки зрения онтогенеза, период развития ребенка. Результаты научных исследований, проведенных в рамках Научно-технической программы по снижению детской неврологической инвалидности демонстрируют наибольшую заболеваемость инсультом у детей первого месяца жизни (перинатальный инсульт), в среднем, составившем 26,7% [3].

Предполагается, что стресс является не только основным фактором процесса адаптации к окружающей среде у новорожденных, но и одним из важнейших факторов риска развития мозговых кровоизлияний у новорожденных. Однако механизм влияния стресса на развитие острых нарушений мозгового кровотока у новорожденных до конца не изучен [4].

Многие исследования отмечают, что нарушения системного артериального давления, и его колебания, обеспечивают значительный вклад в развитие церебральных кровоизлияний у новорожденных [5]. Оценка уровня артериального давления, а также необходимость коррекции его аномалий до сих пор вызывает множество споров в клинической практике [6]. Точная роль системного артериального давления у новорожденных в развитии мозговых кровоизлияний, особенно в условиях стресса, сопровождающего процесс рождения, еще не установлена и должна быть тщательно изучена.

Цели и задачи исследования. В связи с этим целью данной работы является изучение роли артериального давления в развитии геморрагического инсульта.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. подтвердить развитие стресс-индуцированных мозговых кровоизлияний у новорожденных крыс 9 дневного возраста с применением конфокальной микроскопии;
2. измерить уровень среднего артериального давления у стрессированных и интактных новорожденных крыс данного возраста прямым способом и оценить его вариабельность.

Материалы и методы. Экспериментальные исследования были проведены на 16 новорожденных белых беспородных крысах 9-дневного возраста, которых разделили на 2 группы по 8 животных. В первую группу вошли интактные животные (n=8), во вторую животные со стресс-индуцированными мозговыми гемorragиями (n=8).

В эксперименте были задействованы 9-дневные крысы по двум причинам:

1. стадия развития мозга 9-дневных новорожденных крыс по многим параметрам соответствует стадии развития мозга у рожденных в срок новорожденных детей [7];

2. в этой возрастной группе возможно измерение среднего артериального давления напрямую. Прямое измерение давления, осуществляемое при помощи имплантации катетера в артерию, является самым точным и представляет собой «золотой стандарт» для измерения уровня АД у новорожденных [8];

Экспериментальные исследования выполняли в соответствии с требованиями Федерального закона от 01.01.1997 г. «О защите животных от жестокого обращения» и положениями Европейской конвенции по защите позвоночных животных (Страсбург, 18.03.1986 г.). Животных содержали в стандартных условиях вивария: 12-часовой период освещения, температура 20°C, корм и вода *ad libitum*.

Для моделирования мозговых кровоизлияний у новорожденных крыс использовался звуковой стресс в течение 2 часов. Эксперимент осуществлялся по следующему протоколу воздействия звукового стресса (120 дБ, 17 Гц): 10 сек - звук, а затем 60 секунд - перерыв. Этот цикл повторялся в течение 2 дней перед измерением среднего артериального давления. Стрессорное воздействие осуществлялось в утренние часы на 7 и 8 день после рождения, на 9 день новорожденных крыс брали в эксперимент.

Измерение САД проводили на наркотизированных обездвиженных новорожденных крыс. Операция была выполнена под глубоким общим наркозом (0,4 мл / кг, Janssen Saunderton, Бакингемшир, Англия), разведенного в стерильной воде (Gothelf Наркоз вводился внутривентриально). Контроль глубины наркоза оценивался путем периодического контроля рефлекса задней конечности.

Для измерения САД анестезированным крысам имплантировали полиэтиленовый катетер, состоящий из 2 спаянных между собой катетеров разного диаметра (PE-50 - основной и PE-10 тонкий, Commodities INC., Лейк-Хавасу-Сити, штат Аризона). Тонкая часть катетера соединялась с иглой из нержавеющей стали (наружный диаметр 0,33 мм), которая имплантировалась в левую общую сонную артерию. Имплантированная игла была надёжно зафиксирована лигатурами во избежание повреждения сосуда, например, острой стальной кромкой при возможных мельчайших движениях животного. Животное было также надёжно иммобилизовано во время проведения имплантации катетера и измерения САД. Перед введением катетер заполнялся физиологическим раствором, а затем соединялся с датчиком, который преобразует колебания давления в электрические сигналы (PowerLab, ADInstruments, Австралия). Затем в течение 10 мин крыс лежала в состоянии покоя, чтобы стабилизировать уровень АД. После достижения устойчивого состояния записывались значения САД в течение 5 минут, для достоверности измерение САД проводилось по 3 раза для каждого животного.

Развитие мозговых геморрагий у новорожденных крыс подтверждалось с использованием конфокального микроскопа серии Leica TCS SP8 X, настроенного на длину волны в диапазоне от 550 до 750 нм. Для проведения этого эксперимента после измерения САД животных декапитировали, извлекали мозг и помещали его в 10% забуференный раствор формалина на срок не менее суток. Далее срезался верхний слой мозга (в области коры), помещался на предметное стекло и подвергался анализу.

Статистический анализ экспериментальных данных проводился с помощью современного пакета программ для анализа - Statistica 10 (StatSoft, Inc., Талса, - США) с использованием коэффициента Стьюдента. Различия считались достоверными при критерии $p < 0,05$. Данные представлены как $\text{среднее} \pm \text{стандартная ошибка среднего}$.

Структура и объем работы. Диплом изложен на 40 страниц, включает в себя введение, 2 главы, заключение, выводы, список использованных источников. Работа включает 4 рисунка. Список использованных источников включает в себя 62 наименования.

Основное содержание работы. На первом этапе исследования изучались стресс-индуцированные изменения в коре головного мозга у новорожденных крыс с применением конфокальной микроскопии. Эксперимент показал, что стресс вызывает развитие мозговых геморрагий в тканях коры головного мозга у новорожденных крыс 9-дневного возраста, которые отмечаются через 48 часов после первого и через 24 часа после повторного воздействия звука.

В ходе эксперимента были получены данные, где четко видно скопление эритроцитов в ткани головного мозга. Данный результат согласуется с данными гистологического анализа тканей головного мозга новорожденных крыс разного возраста со стресс-индуцированными церебральными геморрагиями, полученными ранее на кафедре физиологии человека и животных Саратовского национального исследовательского государственного университета имени Н.Г. Чернышевского. Эти данные также свидетельствуют о том, что звуковой стресс способен вызывать развитие церебральных геморрагий [9]

У здоровой группы животных не наблюдались аналогичные изменения в коре головного мозга, при этом однократное воздействие звукового стресса также не приводило к развитию церебральных кровоизлияний у новорожденных крыс 9 дневного возраста.

Отметим, что звуковой стресс не приводит к летальному исходу у новорожденных животных. Новорожденные дети с мозговыми геморрагиями также демонстрируют высокую выживаемость после таких травм головного мозга. Тем не менее, подобные повреждения головного мозга, связанные с долгосрочными когнитивными расстройствами, которые могут не проявляться в течение многих лет [10]. Во многом это связано с локализацией мозговых

геморрагий у новорожденных в коре головного мозга. У доношенных новорожденных кровоизлияния редко локализуется в глубоких мозговых центрах, контролирующие жизненно-важные функции [11].

На втором этапе нашей работы, мы проанализировали вызванные звуковым стрессом изменения АД, связанные с мозговыми кровоизлияниями у новорожденных крыс с использованием системы PowerLab. У здоровых новорожденных крыс САД в левой сонной артерии в среднем примерно составляло $19,5 \pm 3,5$ мм рт. Следует отметить, что отдельные значения для каждого животного показали высокую вариабельность сигнала САД (диапазон составляет 16 - 23 мм рт.ст., $p < 0,05$). Точно также мы наблюдали высокую вариабельность значений САД у новорожденных со стресс-индуцированными церебральными геморрагиями (диапазон: 28 - 36 мм рт.ст., $p < 0,05$). Тем не менее, наблюдалась общая тенденция к увеличению уровня САД у крыс с церебральной геморрагией (среднее значение: 32 ± 4 мм рт.ст., увеличение на 64%). Стоит ещё раз отметить, что уровень САД измерялся трижды для каждого животного.

В целом результаты по изучению динамики САД показывают, что стресс-индуцированное развитие мозговых геморрагий у новорожденных крыс связано с увеличением АД. Клинические данные также показали, что увеличение САД рассматриваются в качестве важного фактора в патогенезе церебральных кровоизлияний у детей раннего возраста [12]. Наши результаты согласуются с другими экспериментальными данными, которые указывают, что внезапное увеличение САД способствует развитию церебральных кровоизлияний у новорожденных собак [13] и овец [14]. Известно, что высокое кровяное давление может легко вызвать разрыв тонких стенок незрелых мозговых вен новорожденных. Известно, что повышение артериального давления является общей тенденцией в течение первых 24 часов после геморрагического инсульта у взрослых. Тем не менее, соответствующее лечение гипертензии в остром периоде остается спорным даже для этой группы пациентов. Разногласия

основаны прежде всего на том, что искусственное понижение артериального давления приведет к снижению мозгового кровотока и, следовательно к уменьшению поступления кислорода к мозгу [15].

В неонатологии этот вопрос исследован еще хуже. Последствия коррекции значений системного артериального давления для адекватной церебральной доставки кислорода активно обсуждаются в неонатальной терапии [16]. Тем не менее, на сегодняшний день нет определения порогового значения САД, ниже которого повреждения становятся необратимыми. Измерение САД, таким образом, в настоящее время не обеспечивает безопасного руководства в клинике для больных детей [17].

Заключение. В последние годы возросло количество случаев кровоизлияний в мозг у новорожденных. Вместе с этим увеличилась смертность и развитие различных патологий, которые приводят к ранней детской инвалидности.

Анализ литературных данных позволяют сделать заключение, что развитие кровоизлияний в мозг, связаны с изменениями в мозговом кровотоке. Так же можно сделать вывод, что давление в сосудах головного мозга напрямую зависит от давления крови в периферических сосудах. Однако исследований, описывающих изменение давления в периферических сосудах во время инсульта у доношенных новорожденных крайне мало. Но даже имеющиеся данные противоречивы и неоднозначны.

В наших исследованиях показано, что развитие мозговых кровоизлияний сопровождается повышением значений САД, однако изменчивость параметров АД у новорожденных крыс, показанная в нашем эксперименте, а также различия в устойчивости этих параметров к повреждающим факторам, таким как стресс, отмечаемые многими авторами, делают необходимыми дальнейшие детальные исследования этого вопроса в клинике и эксперименте.

ВЫВОДЫ

1. Дистресс приводит к развитию множественных церебральных геморрагий в коре головного мозга у новорожденных крыс 9 дневного возраста.

2. Стресс-индуцированные мозговые кровоизлияния у новорожденных крыс, в этом возрасте, связаны с увеличением среднего артериального давления.

3. Высокая вариабельность уровня среднего кровяного давления, характерная для этой возрастной группы затрудняет диагностику риска развития церебральных геморрагий.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Мырзалиева Б. Д. Перинатальные инсульты у детей с внутриутробной герпесвирусной инфекцией / Б. Д. Мырзалиева М.М. Лепесова // Журнал Нейрохирургия и неврология Казахстана. 2010. №3 С. 3-4.
2. Fullerton H.J. Risk of stroke in children: ethnic and gender disparities / H.J. Fullerton, Y.W. Wu, S. Zhao // Neurology Rev. 2003. Vol. 61. P. 189–194.
3. Wong F.Y. Cerebral oxygenation is highly sensitive to blood pressure variability in sick preterm infants / F.Y. Wong, R. Silas, S. Hew // PLoS One. 2012. Vol. 7. P. 123-137.
4. Maccari S. Prenatal stress and longterm consequences: implications of glucocorticoid hormones / S. Maccari, M. Darnaudery, S. Morley-Fletcher// Neurosci. Biobehav 2003. Vol. 27. P. 119–127.
5. Vutskits L. Cerebral blood flow in the neonate / L. Vutskits // Pediatric Anesthesia ISSN 2014. Vol. 22. P.155- 245.
6. Judy L. Clinical Factors Influencing Blood Pressure in the Neonate // L. Judy D. William / NeoReviews 2002. Vol. 3 P. 145-150.
7. Semple B. D Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species/ B.D. Semple, K. Blomgren, K. Gimlin // Progress in neurobiology. 2013. Vol 1. P. 106-107.
8. Judy L. Clinical Factors Influencing Blood Pressure in the Neonate /L. Judy, LeFlore, D. William // NeoReviews. 2002. Vol.3. №.8, P. 145-150.
9. Semyachkina-Glushkovskaya O. Optical monitoring of stress-related changes in the brain tissues and vessels associated with hemorrhagic stroke in newborn rats/ O. Semyachkina-Glushkovskaya, A. Pavlov, J. Kurths [и др.] // Biomedical Optics Express. 2015. P. 4088-4097.
10. Takenouchi T. Changing pattern of perinatal brain injury in term infants in recent years /T. Takenouchi, E. Kasdorf, and M. Engel // Pediatr Neurol. 2012. Vol. 46(2), P. 106-110.

11. Gupta S. N. Intracranial hemorrhage in term newborns: management and outcomes / S. N. Gupta, A. M. Kechli, and U. S. Kanamalla // *Pediatr Neurol*. 2009. Vol. 40. P. 1-12.
12. Ann-Mar Atropine Prevents Increases in Brain Blood Flow during Hypertension in Newborn Piglets / Ann-Mar Brubakk, Dag Bratlid, William O.H. // *Pediatric research*. 1984. Vol. 1. P. 12-17.
13. Goddard J Moderate, rapidly induced hypertension as a cause of intraventricular hemorrhage in the newborn beagle model / J. Goddard R. M Lewis, D. L. Armstrong, R. S. Zeller // *J Pediatr* 1980 Vol. 96 P. 1056.
14. Reynolds M. L Intracranial hemorrhage in the preterm sheep fetus / M. L. Reynolds, C. N Evans. E. R Reynolds, N. R Saunders, G. M Durbin// *Early Hum Dev*. 1979. Vol. 3. P. 163.
15. Ballabh P. Intraventricular hemorrhage in premature infants: mechanism of disease / P. Ballabh // *Pediatr. Res. Rev*. 2010. Vol. 67. P. 1 – 8.
16. Лапатухин В. Г. Нейрохирургическая помощь больным с нарушениями мозгового кровообращения в системе противоинсультной службы областного города/ В. Г. Лапатухин // автореф. дис.канд. мед. наук.- М., 2004. С. 22.
17. Pryds O. Cerebral blood flow in the newborn infant./ O. Pryds, A. D. Edwards // *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 1996. Vol. 74(1). P. 63–69.