

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

**Изменения церебральной гемодинамики и деформации эритроцитов у
здоровых новорожденных крыс и с мозговыми геморрагиями**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 4 курса 421 группы
направления 06.03.01 Биология
биологического факультета
Гюлечовой Дианы Нурудиновны

Научный руководитель
ассистент кафедры физиологии
человека и животных _____ Е.М.Зинченко

Зав. кафедрой физиологии человека
и животных, д. б. н., доцент _____ О. В. Семячкина-Глушковская

Саратов 2016 год

Введение

Ещё недавно считалось, что мозговые геморрагии наиболее распространены только у взрослых пациентов, но в последнее время можно наблюдать изменения картины, по которым кровоизлияние встречается и у новорожденных.

Ежегодно в мире рождаются 130 миллионов младенцев, примерно 3,6 миллионов умирают в возрасте 1 месяца. И одной из причин смертности новорожденных является мозговые геморрагии.

Данное заболевание развивается в течение 28 дней после рождения и это является важной проблемой здравоохранения, поскольку высокий процент смертности (25%) и когнитивной инвалидности (около 45%-85%).

Мозговые геморрагии, как правило, представлены без каких-либо внешних клинических симптомов или с неспецифическими неврологическими симптомами в течение первых трёх дней после рождения. Следовательно, истинную распространенность геморрагий у новорожденных трудно диагностировать из-за «молчаливых» симптомов.

Для данного заболевания отсутствуют общепринятые стратегии для прогнозирования и лечения, так как эта проблема молодая с множеством скрытых механизмов, а наши знания о мозговых геморрагиях у новорожденных является весьма ограниченным. Однако, применение данных взрослых у новорожденных весьма сомнительна, поскольку традиционный фактор риска для взрослых является неконтролируемое высокое давление, что не характерно для новорожденных. Очевидно, что принципы лечения для взрослых не могут быть применимы для новорожденных.

Существуют важные различия между мозговыми геморрагиями у младенцев и взрослых. Новорожденные имеют более высокий риск развития этого заболевания, но смертность ниже и более благоприятный исход, чем у детей старшего возраста и взрослых. Такие тяжелые кровоизлияния в мозг у взрослых пациентов обычно приводит к смерти. Однако, механизмы, лежащие в основе этих возрастных различий, остаются неясными и требуют

изучения повышения нейровизуализации и оптимизировать лечение и реабилитацию новорожденных.

В последние годы активно обсуждается зависимость степени деформации эритроцитов в возникновении интракраниальных геморрагий.

Цель: изучить изменение церебральной гемодинамики и деформируемость эритроцитов у здоровых новорожденных крыс и с мозговыми геморрагиями.

Задачи исследования:

1) Изучить церебральную гемодинамику у здоровых новорожденных крыс с помощью оптических методов томографии (доплеровская оптическая когерентная томография, лазерная спекл-визуализация).

2) Оценить церебральную гемодинамику у новорожденных крыс с мозговыми кровотечениями с помощью оптических методов томографии.

3) Определить способность к деформации эритроцитов методом микропипеточной аспирации у контрольной группы.

4) Оценить способность к деформации эритроцитов у новорожденных крыс с интракраниальными геморрагиями.

Объект исследования. Исследования выполнены на 37 новорожденных белых беспородных крысах. Все экспериментальные процедуры проводились в соответствии с принципами Хельсинской декларации о гуманном отношении к животным.

Структура и объем работы. Бакалаврская работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, обсуждения результатов исследований и выводов. Общий объем бакалаврской работы 47 страниц с 11 рисунками. Список цитированной литературы включает 77 источников, в том числе 43 отечественных и 34 иностранных.

Основное содержание работы

Целью данных исследований явилось изучение церебральной гемодинамики и деформации эритроцитов у здоровых новорожденных крыс и с мозговыми геморрагиями. Для решения данного вопроса новорожденные крысы были разделены на экспериментальные группы:

1) интактные, нестрессированные новорожденные крысы (контрольная группа, n=10);

2) группа стрессированных крыс в пред-геморрагический период, то есть 2-4-6-8 часов после стресса (группа крыс с началом патологических изменений тканей мозга и мозгового кровообращения, n=10 в каждой группе);

3) стрессированные крысы через 24 часа после стресса (постгеморрагическая группа крыс с внутричерепными кровоизлияниями, n=12).

Мозговой кровоток в церебральных сосудах изучался в покое и после воздействия стресса. Мозговые геморрагии у крыс вызывали путём звукового воздействия (120 дБ, 370 Гц): 10 сек – звук, затем 60 сек – пауза, этот цикл повторялся в течение 2 ч.

После завершения звукового воздействия у животных проводили исследования церебральной гемодинамики с применением доплеровской оптической когерентной томографии (ДОКТ) и спекл-контрастной визуализации. Мозговой кровоток измерялся на иммобилизованных новорожденных крысах через небольшой разрез кожи в области родничка под изофлурановым ингаляционным наркозом, при этом целостность черепа не была нарушена.

Для оценки сопротивления к деформации и жесткости мембраны эритроцитов использовался метод микропипеточной аспирации. Он основан на измерении глубины аспирации эритроцитов путём создания отрицательного давления внутри микропипетки.

Результаты были представлены как среднее \pm стандартная ошибка среднего. Отличия от исходного уровня в той же группе оценивали с помощью критерия Вилкоксона. Межгрупповые различия были оценены с помощью критерия Манна-Уитни и ANOVA-2 (вторичный анализ с ранговым критерием Дункана). Различия считались достоверными при критерии $p < 0,05$ для всех результатов.

1 Результаты исследования мозгового кровотока методом доплеровской оптической когерентной томографии

По данным ДОКТ (рисунок 1) диаметр синуса у контрольной группы составил $0,32 \pm 0,02$ мм. После стрессирования мы наблюдали постепенное увеличение диаметра (через 2 часа – $0,55 \pm 0,04$ мм, 4 часа – $0,80 \pm 0,03$ мм, 6 часов – $0,98 \pm 0,02$ мм, 8 часов – $1,0 \pm 0,02$ мм, $p < 0,05$). Максимальное изменение данного параметра наблюдалось после стрессирования через 24 часа и составило $1,3 \pm 0,01$ мм ($p < 0,05$).

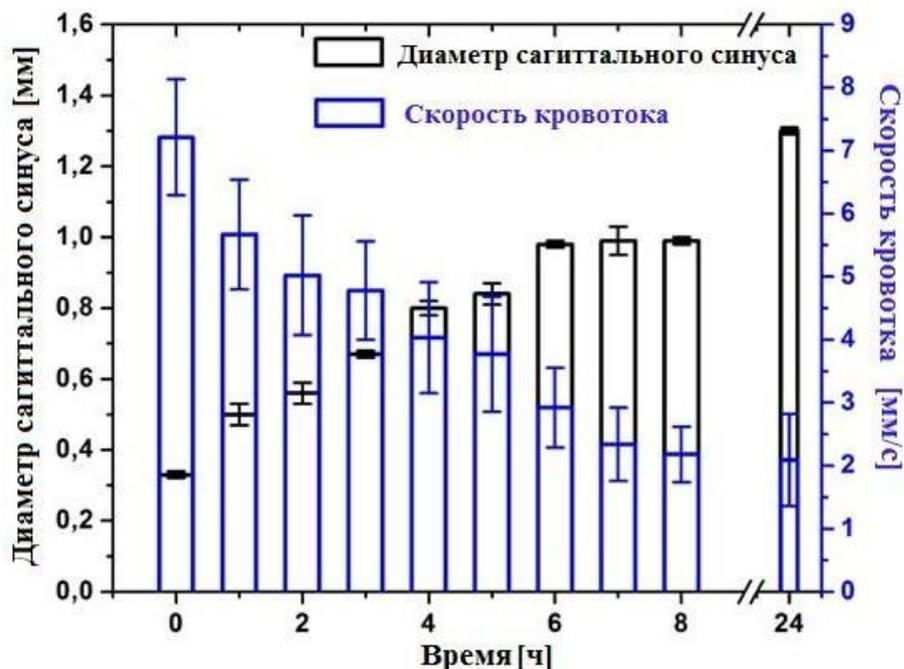


Рисунок 1 – Изменение параметров сагиттального синуса в пред-геморрагический и в пост-геморрагический период по сравнению с контрольной группой крыс; $p < 0,05$ относительно: * – контроля.

Таким образом, диаметр сагиттального синуса у стрессированных крыс увеличился в 1,5 раза ($p < 0,05$) в пред-геморрагический период (через 4 часа после стресса), а в пост-геморрагический период (через 24 часа) в 3 раза ($p < 0,05$) относительно животных из контрольной группы.

Также с помощью доплеровской оптической когерентной томографии была получены результаты (рисунок 1) по изменению скорости кровотока. У контрольной группы скорость составила $7,3 \pm 0,09$ мм/с. После звукового воздействия мы наблюдали постепенное снижение скорости кровотока в сагиттальном синусе. Через 2 часа скорость составила $5,1 \pm 0,08$ мм/с, а спустя еще два часа – $4,2 \pm 0,07$ мм/с. После 6 часов скорость снизилась до $3,0 \pm 0,05$ мм/с, а после 8 часов – до $2,3 \pm 0,04$ мм/с. Максимальное изменение этого параметра наблюдалось через одни сутки, и составило $2,1 \pm 0,07$ мм/с.

Таким образом, сагиттальный синус характеризуется чувствительными изменениями к вредоносным эффектам стресса, начиная с пред-геморрагического периода и заканчивая внутричерепным кровоизлиянием.

Снижение скорости кровотока в расширенных венозных сосудах свидетельствует о накоплении крови в венозной системе, это связано с уменьшением оттока крови от мозга. Таким образом, уменьшение кровотока в венозной системе головного мозга вследствие патологической релаксации церебральных вен является одним из механизмов, предшествующих и сопровождающих развитие стресс-индуцированных кровоизлияний в мозг

2 Результаты исследования мозгового кровотока методом лазерной спекл-визуализации

Результаты исследования мозгового кровотока методом лазерной спекл-визуализации подтверждают данные, полученные с помощью ДОКТ, представлены на рисунке 2.

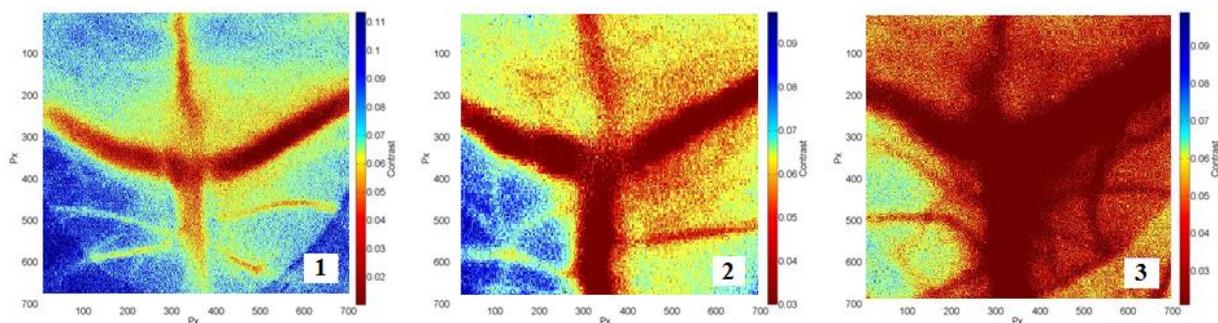


Рисунок 2 – оценка сагиттального синуса по результатам лазерной спекл-визуализации у новорожденных крыс: (1) – в нормальном состоянии, (2) – в пред-геморрагический период, 4 часа после стресса, (3) – в пост-геморрагический период, наследующий день после стресса.

У крыс контрольной группы патологических изменений сагиттального синуса не наблюдалось. Через 4 часа после стресса мы заметили увеличение размера синуса мягкой мозговой оболочки и скопление крови в нем. Через 24 часа после стресса происходили дальнейшие патологические изменения, которые сопровождалось: выраженным полнокровием сосуда мягкой мозговой оболочки; отёком вещества головного мозга преимущественно в верхних слоях коры.

Поскольку спекл-анализ кровотока мозга отражает перфузию в условных единицах, то кровоток сагиттального синуса был принят за единицу. Применение метода лазерной спекл-визуализации позволило выявить значительные изменения в церебральном кровотоке (ЦК) у новорожденных крыс через 4 часа после стрессирования. Перфузия в сагиттальном синусе повышалась на 25% ($p < 0,05$). Через 24 часа после стресса у крыс со стресс-индуцированными кровоизлияниями в мозге перфузия была выше в сагиттальном синусе на 33% ($p < 0,05$) (рисунок 3).



Рисунок 3 – Изменения кровотока мозга в сагиттальном синусе в нормальном состоянии, через 4 часа и 24 часа после стресса у новорожденных крыс; $p < 0,05$ относительно: * – контроля, • – между группами.

В пред-геморрагическом периоде изменения связаны с увеличением размера сагиттального синуса и с умеренным повышением перфузии тканей мозга. Пост-геморрагический период сопровождается прогрессивным повреждением сагиттального синуса, т. е. критическим расширением сосуда и гиперперфузией мозга, тканей, окружающих главный венозный синус.

Применение метода спекл-визуализации позволило определить, что развитие мозговых геморрагий у новорожденных крыс сопровождалось дилатацией сагиттального синуса, что подтверждено данными представленных на рисунке 2.

3 Результаты исследования степени деформации эритроцитов методом микропипеточной аспирации

В ходе нашего эксперимента были выявлены различия в деформации эритроцитов у новорожденных крыс в зависимости от периода развития внутримозговых кровотечений.

Рисунок 4 отражает глубину аспирации при давлении 30 Н/м^2 в пробах крови, взятых в разный интервал времени после стресса. Каждая точка соответствует среднему значению измерений, проведенных с 30 эритроцитами.

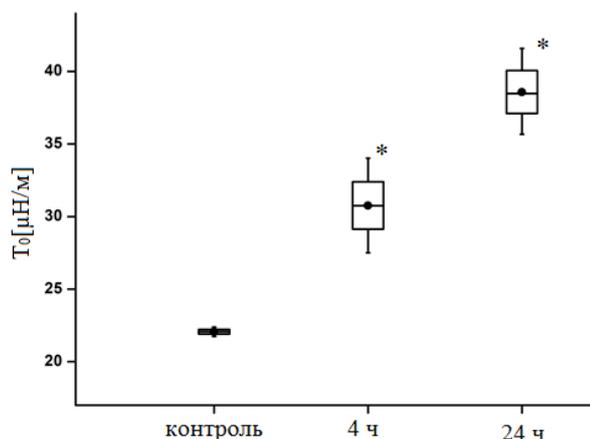


Рисунок 4– Глубина аспирации эритроцитов у новорожденных крыс в контрольной группе и в 2 часа и 24 часа после стресса; $p < 0,05$ относительно:

* – контроля.

Деформируемость эритроцитов у новорожденных белых крыс увеличилась на 36% ($p < 0,05$) в пред-геморрагический период (4 часа после стресса). По мере развития внутричерепных кровотечений в пост-геморрагический период (24 часа после стресса) деформируемость возросла на 40% ($p < 0,05$) по сравнению с контрольной группой (рисунок 3).

Эти результаты свидетельствуют о том, что патологические изменения параметров сагиттального синуса сопровождались увеличением упругости эритроцитов, которая предшествует и сопутствует кровоизлияниям в мозге у новорожденных крыс.

Увеличение деформируемости эритроцитов у стрессированных новорожденных крыс может быть одним из факторов, способствующих патологической релаксации мозговых вен вследствие высвобождения АТФ.

Заключение

Довольно часто у новорожденных развиваются мозговые кровотечения (геморрагии), причем происходит это бессимптомно, поэтому их сложно диагностировать. В большинстве случаев разрывы сосудов коры головного мозга у новорожденных сказываются впоследствии на физическом здоровье и интеллектуальное развитии таких детей.

Сосудистой система является одной из первых, которая реагирует на стресс, чтобы обеспечить соответствующий метаболизм во время мобилизации организма. В предыдущих исследованиях на новорожденных крысах было показано, что стресс-реактивность церебральных вен выше по сравнению с микрососудами. Мы сосредоточились на изучении динамических изменений венозного компонента мозгового кровообращения у новорожденных крыс. Для этой цели мы выбрали сагиттальный синус, который представляет собой одну из главных пазух сбора крови ото всех мелких вен головного мозга и направляет ее в периферическое кровообращение.

В ходе исследования с помощью оптических методов (доплеровская оптическая когерентная томография, лазерная спекл-визуализация) нами получены были следующие результаты. Во время пред-геморрагического периода (2-4-6-8 часов после стресса) мы наблюдали постепенное увеличение размеров синуса и уменьшение скорости кровотока. Максимальные изменения этих гемодинамических параметров были выявлены во время образования геморрагий (24 часа после стресса). Из этого следует, что для латентного (скрытого) периода было характерно постепенная релаксация сагиттального синуса и падение скорости кровотока в нем, а последние изменения были более выражены на фоне развития интракраниальных геморрагий у новорожденных крыс. Также мы отметили, что патологическое расслабление основной церебральной вены сопровождалось развитием венозного застоя. Снижение оттока крови от головного мозга ведёт к венозной недостаточности.

Выявленные изменения в церебральной гемодинамике сопровождались увеличением степени деформируемости эритроцитов. Следовательно, при патологических изменениях параметров сагиттального синуса происходит увеличение упругости эритроцитов. Это предшествует и сопутствует кровоизлияниям в мозге новорожденных крыс.

Результаты данного исследования могут помочь в разработках новых методов диагностирования и моделей лечения мозговых геморрагий у новорожденных детей.

Были сделаны следующие выводы:

1. Во время пред-геморрагического периода (2-4-6-8 часов после стресса) происходило постепенное увеличение размеров сагиттального синуса и уменьшение скорости кровотока в нём.

2. Пост-геморрагический период характеризовался усугублением патологических изменений церебрального кровотока: диаметр сагиттального синуса увеличился в 3 раза, скорость кровотока уменьшилась на 71%.

3. Перфузия в сагиттальном синусе повысилась на 25% в пред-геморрагический период относительно контрольной группы, а в пост-геморрагический период на 33%.

4. Выявленные изменения в церебральной гемодинамике сопровождались увеличением степени деформируемости эритроцитов. Через 4 часа после стресса, деформируемость увеличилась на 36%, а через 24 часа на 40 %.