

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

Механизмы развития инсульта головного мозга у взрослых и новорожденных  
крыс

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

студентки 4 курса 421 группы  
направления 06.03.01 – Биология  
Биологического факультета

Улановой Марии Васильевны

Научный руководитель  
д.н.б., профессор

О.В Семячкина-Глушковская

Заведующий кафедрой  
д.б.н., профессор

О.В Семячкина-Глушковская

Саратов 2016

## **ВВЕДЕНИЕ**

В современной России одним из распространенных заболеваний, приводящим к смертности и инвалидизации населения, является геморрагический инсульт, который занимает второе место после инфаркта миокарда. Раньше считалось, что геморрагический инсульт типичен только для взрослых людей и не возникают у новорожденных детей. Однако за последние годы, благодаря развитию оптических технологий визуализации мозга стало очевидно, что инсульт головного возникает с такой же частотой в первые дни после рождения, как и среди взрослого населения.

Причины и механизмы развития геморрагического инсульта у новорожденных детей и у взрослых существенно отличаются друг от друга. Основная проблема заключается в том, что в отличие от взрослых, развитие кровотечений в мозге у новорожденных протекает бессимптомно. Этот факт существенно осложняет развитие эффективных методов ранней диагностики и терапевтической коррекции устойчивости сосудов мозга к повреждениям у маленьких пациентов.

В последние годы активно обсуждаются способы диагностики и лечения таких пациентов, но врачи сталкиваются с невозможностью лечить инсульт у новорожденных детей из-за непроницаемости гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) ко многим фармакологическим препаратам. Гематоэнцефалический барьер представляет собой нейроваскулярную единицу, обеспечивающую барьерную функцию мозга, которая заключается в контроле проникновения веществ из крови в ткани мозга.

Для решения указанной проблемы была поставлена цель - изучить возрастные особенности развития геморрагического инсульта и механизмы, лежащие в основе этих процессов.

Для достижения цели были сформулированы следующие задачи:

1. Изучить особенности развития (локализации, тяжести) геморрагического инсульта у взрослых и новорожденных крыс с помощью МРТ и гистологического анализа.
2. Изучить изменения в проницаемости гематоэнцефалического барьера на фоне развития геморрагического инсульта у взрослых и новорожденных крыс с помощью классического теста при внутривенном введении красителя Evans blue и оценки окрашивания тканей мозга.
3. Изучить механизмы изменения барьерной функции мозга при развитии геморрагического инсульта у взрослых и новорожденных крыс на основе исследования экспрессии структурных белков гематоэнцефалического барьера — окклюдина и клаудина-5.

#### Материалы исследования

В эксперименте использовали 25 взрослых особей белых беспородных крыс и 27 особей белых беспородных крыс 2-3 дня после рождения. Животных разделили на две группы:

- 1) контрольную - интактные животные взрослые особи (n=10) и новорожденные крысы (n=10)
- 2) крысы со стресс-индуцированными мозговыми кровотечениями – взрослые особи (n = 15) и новорожденные крысы (n=17)

Все процедуры были выполнены в соответствии с «Руководством по уходу и использованию лабораторных животных». Крыс содержали при  $25 \pm 2$  °С, 55% влажности и 12/12 часовом цикле свет / темнота.

## ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

С целью изучения возрастных особенностей геморрагического инсульта на первом этапе исследований изучали локализацию геморрагического инсульта у взрослых и новорожденных крыс с помощью метода МРТ.

На рисунке 1 показаны МРТ изображения головного мозга у взрослых и новорожденных крыс. В условиях нормы МР-сигналы однородные, что свидетельствует об отсутствии каких-либо изменений в тканях головного мозга (рисунок 1 А, В).

У всех крыс при развитии геморрагического инсульта наблюдались повышенные МР-сигналы, что является признаком паренхиматозного геморрагического пропитывания исследуемых тканей (рисунок 1 Б, Г).

По данным МРТ изображений развития геморрагического инсульта у взрослых крыс отличались от такого у новорожденных животных (Таблица 1). Так, у взрослых крыс геморрагии имели локальный характер, преимущественно в зоне мозжечковых ядер (Рисунок 1 Б). У новорожденных крыс геморрагии развивались в коре и подкорковых зонах мозга и носили диффузный характер (Рисунок 1 Г).

Таблица 1 – Локализация внутричерепных кровоизлияний в разных анатомических структурах головного мозга у взрослых и новорожденных крыс

Внутричерепные виды кровоизлияний	Локализация	Комментарий	
		Взрослые крысы (n=15)	Новорожденные крысы (n=17)
<b>Кровоизлияния вне мозга</b>			
Эпидуральное кровоизлияние	Кровь между черепом и твердой мозговой оболочкой	-	-
Субдуральное кровоизлияние	Кровь между твердой мозговой оболочкой и паутинообразной мембраной	-	-
Субарахноидальное кровоизлияние	Кровь между паутинообразной мембраной и мягкой материей	-	-
<b>Внутричерепные кровоизлияния</b>			
Корковое и подкорковое кровоизлияние	Кровь в пределах мозговых корковых тканей	Наблюдался редко, этот вид кровоизлияния сопровождался мозжечковым кровотечением (n=1)	Распространенный тип, все новорожденные крысы показали наличие инсульта в коре головного мозга
Мозжечковое кровоизлияние	Кровь в пределах мозжечка	Самый распространенный тип инсульта головного мозга у 14 крыс наблюдалось мозжечковое кровоизлияние	-
Кровоизлияние внутри желудочка	Кровь в мозговых желудочках (второй, третий и четвертый)	-	-

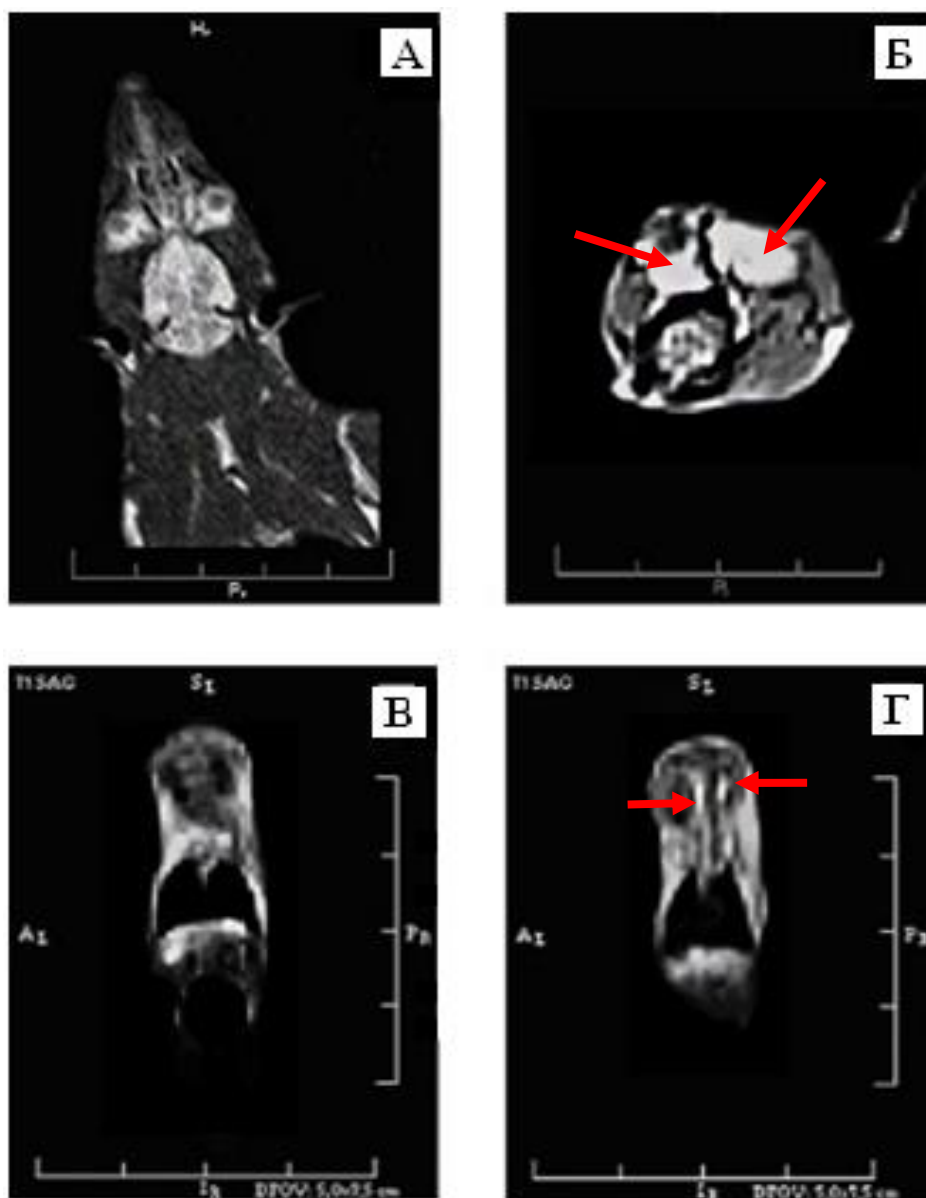


Рисунок 1 – МРТ изображение головного мозга у половозрелых(сверху) и новорожденных (снизу) крыс в состоянии нормы (А, В) и после воздействия тяжелого стресса, вызывающего развитие геморрагического инсульта (Б, Г). Стрелками показаны участки головного мозга крыс с повышенными МР-сигналами (признаки паренхиматозного геморрагического пропитывания).

В ходе гистологического анализа было выявлено, что размер геморрагического инсульта различается у взрослых и новорожденных крыс. Так, у взрослых крыс отмечались более тяжелые геморрагические поражения

тканей мозга по сравнению с новорожденными животными. Средний размер геморрагических кровоизлияний у новорожденных крыс составлял 0,04 мм<sup>2</sup>, у взрослых крыс 1,73 мм<sup>2</sup>(рисунок 2).

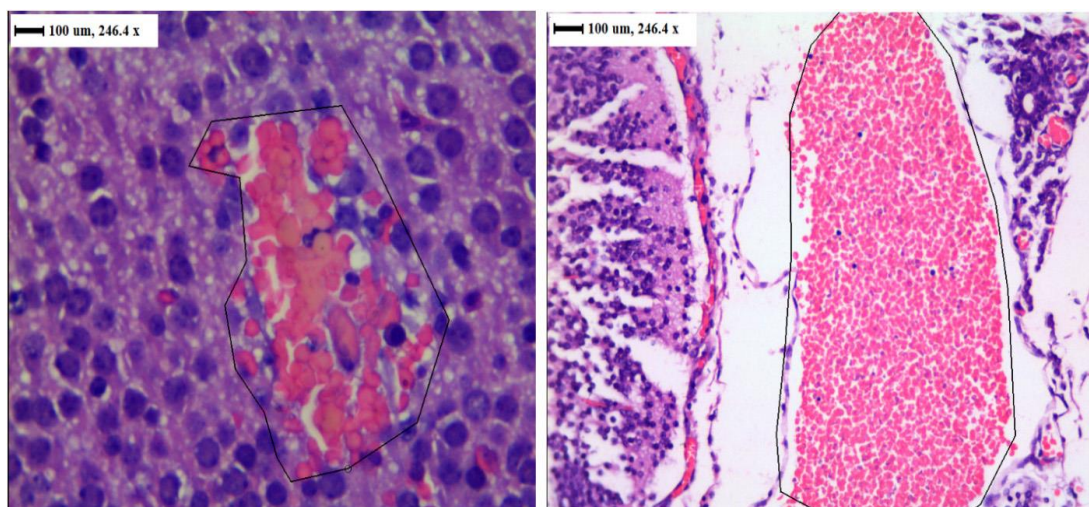


Рисунок 2 – Размеры стресс-индуцированных кровоизлияний в мозге новорожденных (слева) и взрослых (справа) крыс

Таким образом, по результатам МРТ и гистологического анализа взрослые животные менее устойчивы к развитию геморрагического инсульта по сравнению с новорожденными крысами, о чем свидетельствует большие размеры геморрагий в глубоких зонах мозга (преимущественно в области мозжечка) и их локализованность у первых и поверхностный (кора и подкорковые зоны) мелко-диффузный характер у вторых.

Для того, чтобы понять как изменяется проницаемость гематоэнцефалического барьера при развитии геморрагического инсульта использовали классический метод внутривенного введения красителя Evans blue (961 дальтон), который в норме не проходит гематоэнцефалический барьер за счет быстрого связывания с белками крови и существенного увеличения его веса до 68.5 кило-дальтон.

В нормальном состоянии введение Evans blue не сопровождалось какими-либо изменениями в тканях головного мозга. Внутривенное введение красителя животным с геморрагического инсульта сопровождался

появлением голубой окраски тканей мозга только у взрослых крыс, но не у новорожденных животных (Рисунок 3).

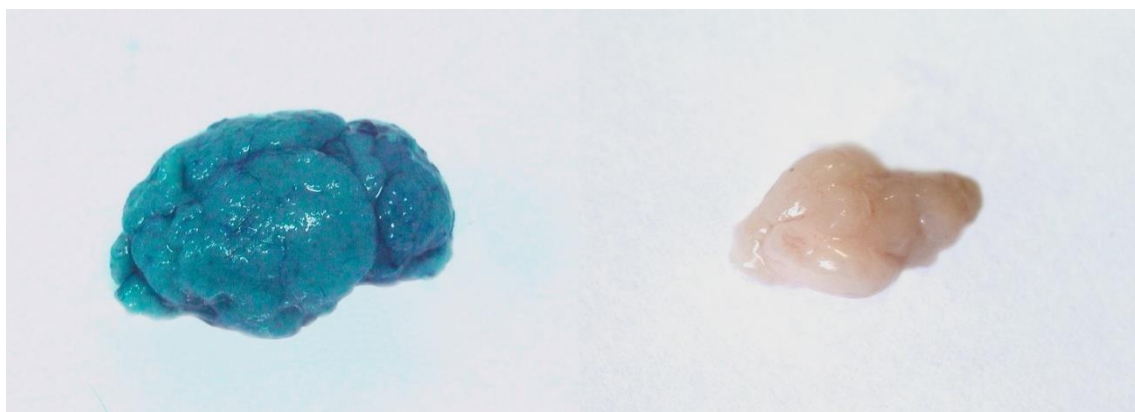


Рисунок 3 – Головной мозг взрослой крысы (слева) и новорожденной крысы (справа) на фоне введения красителя Evans blue после развития геморрагического инсульта. Появление голубого окрашивания тканей мозга свидетельствует об «открытии» гематоэнцефалического барьера для Evans blue.

Таким образом, по результатам трех серий экспериментов, включающих данные МРТ, гистологического анализа и теста с Evans blue, можно заключить, что более тяжелая форма геморрагического инсульта у взрослых крыс по сравнению с новорожденными животными в значительной степени связана с высокой проницаемостью гематоэнцефалического барьера у первых, но не у вторых. Отметим, другими исследователями также было показано, что инертность гематоэнцефалического барьера у новорожденных животных обеспечивает более высокую их устойчивость к ишемическому инсульту по сравнению со взрослыми крысами.

В четвертом этапе эксперимента был поставлен вопрос, каковы механизмы высокой устойчивости гематоэнцефалического барьера к повреждениям при развитии геморрагического инсульта у новорожденных крыс по сравнению со взрослыми животными?



Для ответа на этот вопрос, мы изучали экспрессию структурных белков гематоэнцефалического барьера, которые обеспечивают барьерную функцию мозга за счет создания плотных щелевых контактов специальными белками, в частности, окклудином и клаудином-5.

Для исследования экспрессии структурных белков (окклудином и клаудином-5) гематоэнцефалического барьера использовали специфические антитела к этим белкам и методы иммуноблоттинга и иммуногистохимии.

Метод иммуноблоттинга показал, что экспрессия белков окклюдина и клаудина-5 выше у новорожденных крыс по сравнению со взрослыми особями (рисунок 4).

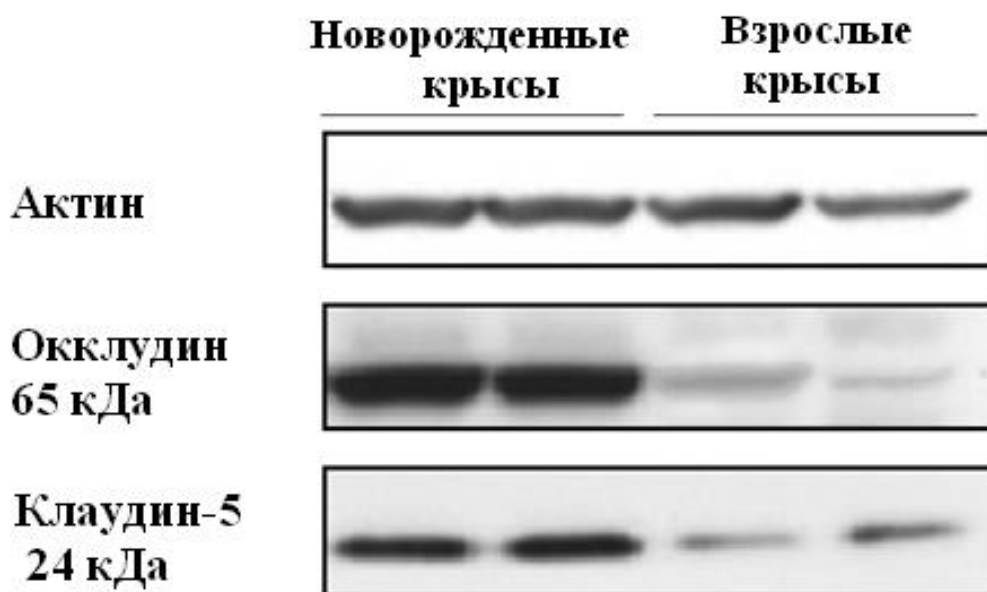


Рисунок 4 – Экспрессия структурных белков гематоэнцефалического барьера – окклюдина и клаудина-5 у новорожденных и взрослых крыс (более темные полосы отражают более высокую экспрессию)

Результаты иммуноблоттинга подтверждались данными иммуногистохимии. Как видно из рисунка 5 экспрессия окклюдина и клаудина-5 была выше у новорожденных крыс по сравнению со взрослыми животными. Рисунок 6 отражает, что экспрессия указанных белков

наблюдалась на внутренней мембране капилляров, т.е. со стороны эндотелиоцитов, являющихся структурными единицами гематоэнцефалического барьера.

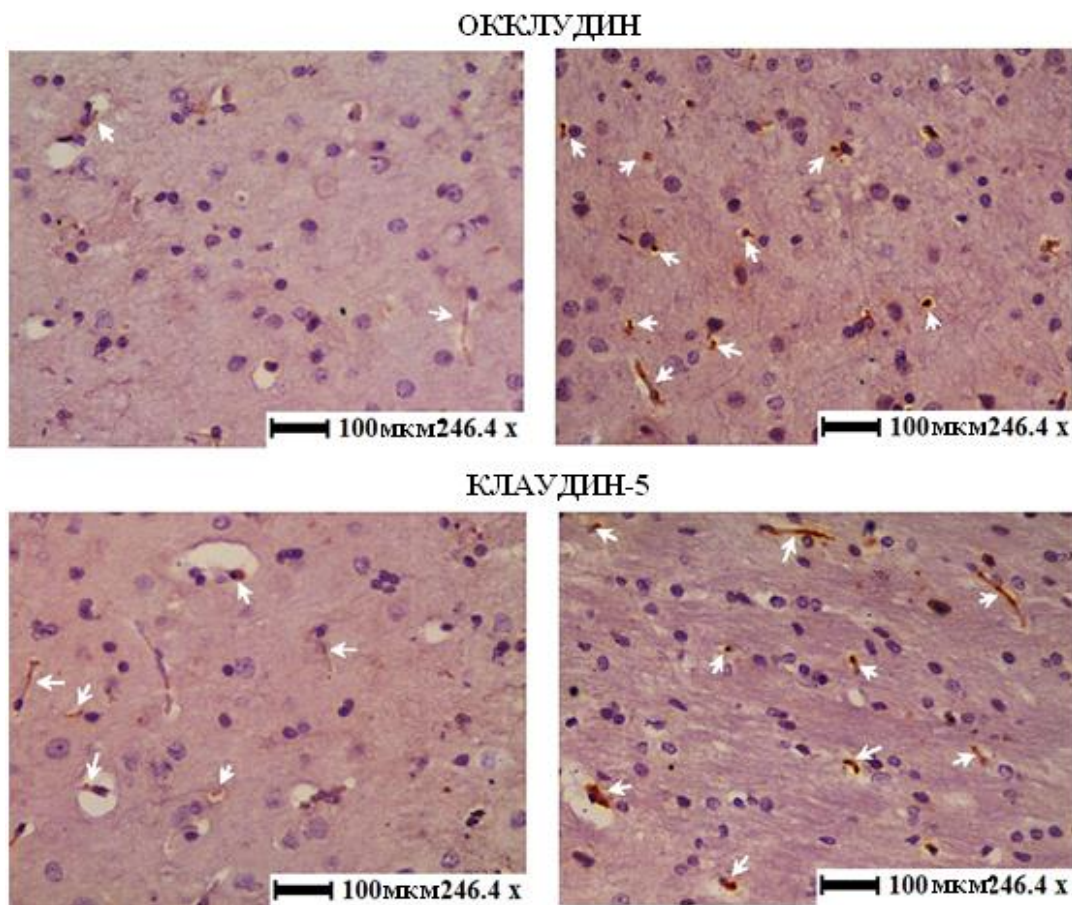


Рисунок 5 - Иммуногистохимический метод определения экспрессии белков – окклюдина и клаудина-5 у взрослых крыс (слева), у новорожденных крыс (справа). Экспрессия белков отражена коричневым цветом.

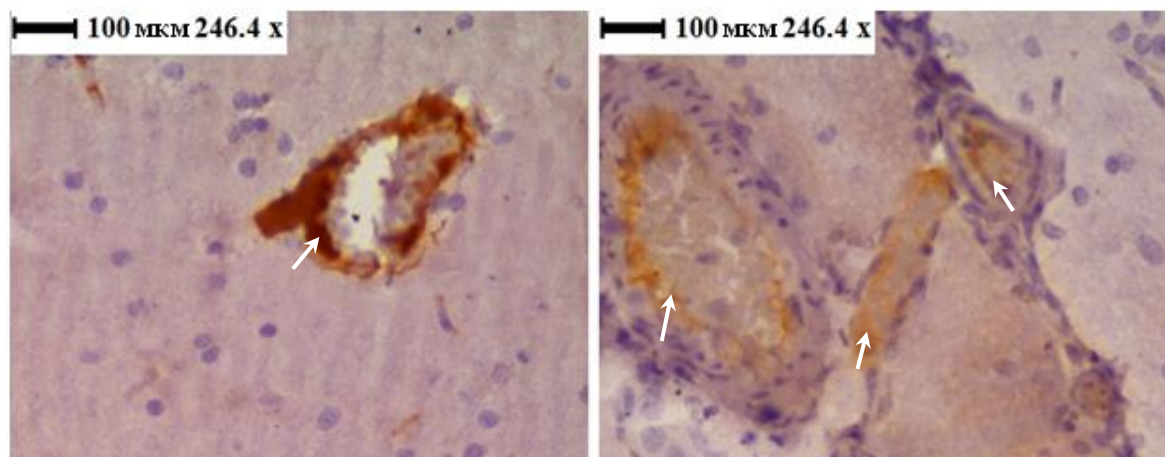


Рисунок 6 – Высокая экспрессия клаудина-5 (коричневый цвет) в церебральных капиллярах (показаны стрелками) у новорожденных (слева) и взрослых (справа) крыс.

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

В ходе исследования были проведены эксперименты по изучению возрастных особенностей развития геморрагического инсульта с применением методов оценки тяжести геморрагического поражения тканей мозга и процессов, обеспечивающих барьерную функцию мозга. Данные МРТ и гистологического анализа, а также тест с красителем Evans Blue показали, что тяжесть развития геморрагического инсульта выше у взрослых крыс по сравнению с новорожденными животными. Одним из механизмов возрастных особенностей развития геморрагического инсульта является высокая устойчивость гематоэнцефалического барьера у новорожденных крыс к повреждениям, чем у взрослых особей. В основе этих механизмов лежит более высокая экспрессия белков – структурных элементов гематоэнцефалического барьера (окклюдина и клаудина-5) у новорождённых крыс по сравнению со взрослыми животными.

Таким образом, устойчивость гематоэнцефалического барьера к повреждениям является важным механизмом устойчивости к развитию геморрагического инсульта.