

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

**МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПИРАМИДАЛЬНЫХ
НЕЙРОНОВ ПРЕФРОНТАЛЬНОЙ ЗОНЫ КОРЫ ГОЛОВНОГО
МОЗГА ПРИ ЦЕРЕБРАЛЬНОЙ ГИПОКСИИ У НОВОРОЖДЕННЫХ
КРЫС**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

по направлению 06.03.01 Биология
студентки 4 курса биологического факультета
Морозовой Екатерины Андреевны

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 2017

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Рождение связано с эмоциональными и физиологическими нагрузками, как для матери, так и для ребёнка. Стресс, сопровождающий процесс родов является ведущей причиной появления сосудистых катастроф. Нарушения мозгового кровообращения характеризуются системными нарушениями гемодинамики (дисфункция работы сердца и сосудистого тонуса) и транспорта кислорода.

Гипоксия предшествует развитию интракраниальных геморрагий на фоне стресса. Гипоксия – это интегральное понятие, отражающее состояние всех звеньев транспорта кислорода. В клинических условиях она, как правило, возникает вторично, но, развившись, усугубляет течение основного заболевания, что ведет к утяжелению уже имеющейся кислородной недостаточности и снижению функциональных резервов ее коррекции.

Нейроны переднего отдела головного мозга являются наиболее чувствительными клетками организма к различным повреждающим воздействиям, в частности гипоксии или ишемии. В итоге дефицит кислорода приводит к гибели нервных клеток по типу некроза или апоптоза.

Последствия перенесённой гипоксии отмечаются нарушением обработки информации, снижение внимания и ухудшение когнитивных процессов.

Цель данной работы: изучение действия гипоксии на кору головного мозга и на изменение пирамидальных нейронов у новорождённых крыс.

Задачи исследования:

1. Оценка насыщения артериальной крови кислородом методом пульсоксиметрии и МРТ.

2. Оценить дефицит кислорода артериальной крови мозга у новорожденных крыс в предгеморрагический и постгеморрагический периоды.

3. Изучить уровень деформации эритроцитов по мере развития гипоксии.

4. Провести гистологический анализ мозговых тканей для выявления мозговых нарушений вызванных гипоксией.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

В литературном обзоре рассмотрены механизмы развития гипоксии у новорожденных, а также последствия недостатка кислорода в артериальной крови в организме. Представлены материалы о влиянии гипоксии на морфологическую составляющую коры головного мозга.

Материалы и методы исследования

Объекты исследования. Эксперименты были проведены на новорожденных беспородных крысах в возрасте 3 дней. Общее число крыс участвовавших в экспериментах составило 152 особи. Крыса является оптимальным животным объектом для изучения развития цереброваскулярных катастроф в течение первых дней жизни из-за схожей динамики созревания мозга с человеком.

В ходе исследования было выделено 3 группы:

- 1) Контрольная группа, состоящая из 25 нестрессированных крыс.
- 2) Группа крыс в пред-геморрагическом состоянии (2-4-6-8 часов после стресса) в количестве 25 особей.
- 3) Крысы в пост-геморрагическом состоянии (24 часа после стресса) в количестве 27 особей.

Все экспериментальные процедуры были выполнены в соответствии с «Руководством по уходу и использованию лабораторных животных». Экспериментальный протокол был одобрен Комитетом по уходу и использованию лабораторных животных при Саратовском государственном университете (протокол Н-147, 17.04.2001).

Методы исследования. Для создания мозговых геморрагий использовали акустическое воздействие силой 120Дб 370Гц в течение 2 часов по схеме 10 сек. звук, 60 сек. перерыв.

Для оценки насыщения артериальной крови кислородом у новорожденных крыс использовали метод пульсоксиметрии и МРТ-анализ.

Для измерения устойчивости к деформации или жесткости мембран эритроцитов использовали метод микропипеточной аспирации.

Для анализа мозговых нарушений, вызванных стрессом и для подтверждения образования геморрагий, все новорожденные крысы были декапитированы для проведения гистологических исследований мозговой ткани. Образцы фиксировали в 10% забуференном растворе формалина. Затем образцы заливали парафином, делали срезы (4 мкм) и окрашивали гематоксилином и эозином.

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.

Структура и объем работы.

Работа состоит из введения, основной части, включающей, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты исследования, выводов, заключения, списка использованных источников. Бакалаврская работа изложена на 40 страницах, содержит 1 таблицу и 10 рисунков. Список литературы включает 41 источник.

Результаты исследования

Оценка насыщения кислородом мозговой ткани у здоровых новорожденных крыс и у крыс в разные периоды развития интракраниальных геморрагий методом пульсоксиметрии. У интактных животных уровень кислородной сатурации тканей мозга составил 96 % , что соответствует нормальным значениям (рис.1).

Уже через 2 часа после звукового стресса наблюдалось снижение насыщения тканей кислородом на 16 % ($p < 0,05$) и составило 80%.

Снижение кислородного насыщения мы наблюдали на протяжении всего времени до образования геморрагий с максимальным падением SpO₂ на 4-8 часах в латентный период (на 27%, 28% 30%, $p < 0,05$, соответственно).

Уже сразу после звукового стресса не было обнаружено ни одного животного с нормальными значениями оксигенации, у всех выявлена гипоксемия различной тяжести. Для большинства новорожденных крыс характерно значение в пределах от 70 до 79%. Через 4 часа после отмены стресса и далее на протяжении всего пред-геморрагического периода у всех новорожденных крыс выражена тяжелая гипоксемия и появляются животные, у которых уровень насыщения кислородом тканей ниже 60%.

В пост-геморрагический период уровень SpO₂ упал на 27% ($p < 0,05$), т.е. оставался низким.

Пост-геморрагический период также характеризуется животными с тяжелой гипоксемией.

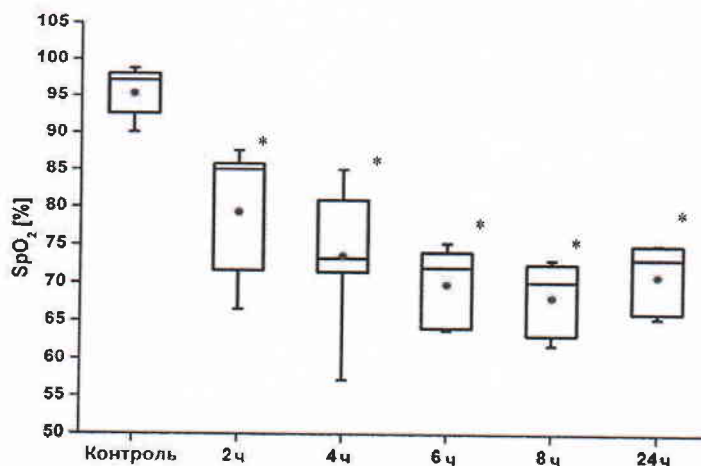


Рисунок 1 - Время-зависимые изменения в кислородной сатурации тканей мозга у новорожденных крыс в пред- (через 2-4-6-8 ч после стресса) и пост- (через 24 ч после стресса) геморрагический периоды, $p < 0,05$ относительно контроля.

Таким образом, можно сказать, что звуковой стресс сразу вызывает резкое снижение кислородной сатурации артериальной крови мозга, приводя к развитию гипоксемии.

Результаты МРТ исследования сосудов головного мозга. По результатам МРТ-анализа пред-геморрагический период характеризуется гипоинтенсивным контрастированием сосудов головного мозга, которое усиливается в постгеморрагический период (рис.2). Данные изменения могут быть вызваны повышением уровня дезоксигемоглобина, который является следствием гипоксии, приводящей к снижению уровня насыщения крови кислородом.

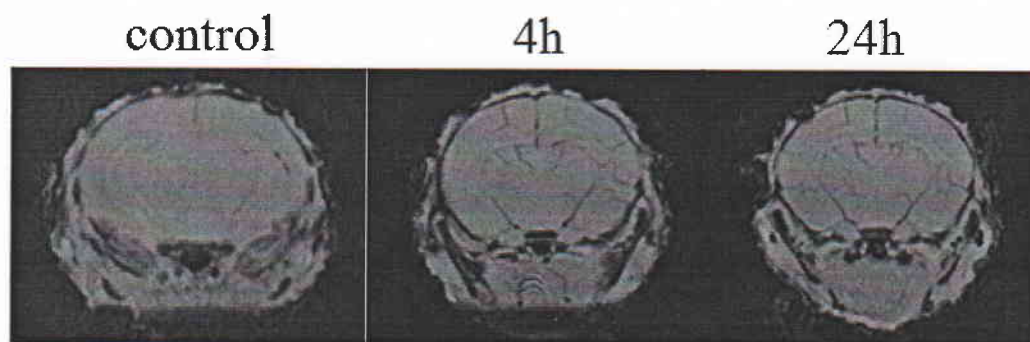


Рисунок 2 – МРТ- SWI изображение мозга новорожденных животных в норме (контроль), в пред-геморрагический период (4 часа после стресса) и пост-геморрагический период (24 часа после стресса).

Было обнаружено, что гипоксия мозга является одним из механизмов, предшествующих появлению мозговых кровотечений у новорождённых крыс.

Результаты анализа деформации эритроцитов методом микропипеточной аспирации. Снижение поступления кислорода в мозг в ответ на гипоксию может быть связано с изменениями механических свойств эритроцитов. Являются ли изменения в эластичности эритроцитов связаны с гипоксией в пред- и пост-геморрагический периоды у новорожденных крыс?

Для ответа на этот вопрос мы провели анализ по деформации эритроцитов у новорожденных крыс до и после стресс-индуцированных геморрагий с помощью метода микропипеточной аспирации (рис.3).

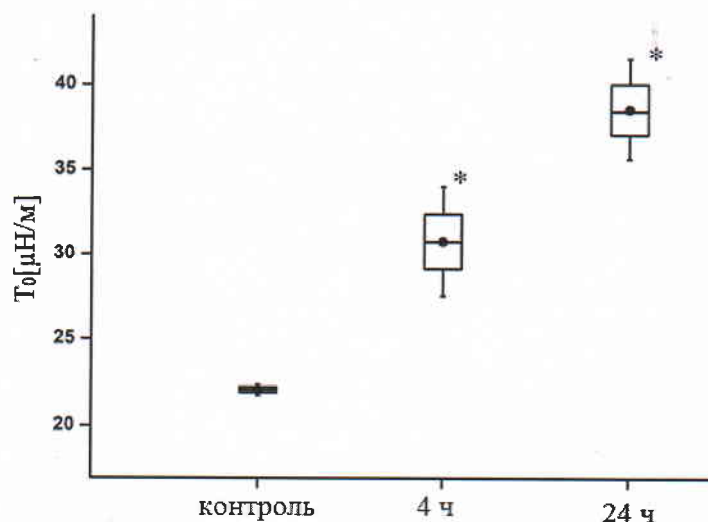


Рисунок 3 - Глубина аспирации эритроцитов у новорожденных крыс в контрольной группе и через 2 часа и 24 часа после стресса. На рисунке показана глубина аспирации при давлении $30 \text{ Н} / \text{ м}^2$, измеренная в образцах крови, взятых в разном временном интервале после стресса. Каждая точка соответствует значению, усредненному по измерениям, выполненным с 30 различными эритроцитами.

Наши результаты показывают, что деформируемость эритроцитов увеличилась на 10% ($p < 0,05$) в пред-геморрагический период (2 часа после стресса) и на 40% ($p < 0,05$) в пост-геморрагический период (24 часа после стресса). Эти результаты свидетельствуют о том, что снижение стресс-индуцированной мозговой оксигенации сопровождается увеличением упругости эритроцитов, которая предшествует и сопутствует кровоизлияниям в мозге у новорожденных крыс.

Результаты полученные методом гистологического анализа оценки пирамидальных нейронов и состояния коры головного мозга. Наши результаты, представленные в таблице 1, ясно показывают, что на фоне умеренной гипоксии в пред-геморрагический период постепенно уменьшалась толщина молекулярного слоя коры головного мозга, а также снижалось количество пирамидальных клеток, связанное с редукцией их диаметра.

Таблица 1- Морфометрические параметры пирамидальных нейронов коры больших полушарий мозга

Экспериментальные группы	Количество пирамидальных нейронов в коре головного мозга	Диаметр пирамидальных клеток, мм	Толщина молекулярного слоя коры головного мозга, мм
До стресса			
Контрольная группа	26,16±0,4	0,0179±0,00086	0,158±0,034
После стресса			
2 ч	21,8±0,21*	0,0146±0,0065*	0,11±0,012*
4 ч	20,79±1,59*	0,0144±0,00064*	0,095±0,0025*
6 ч	20,8±2,1*	0,0128±0,00098*	0,0614±0,0031*
8 ч	17,65±0,71*	0,011±0,00032*	0,0507±0,0031*
24 ч	17,43±1,36*	0,0112±0,00016*	0,0435±0,0032*

* – $p \leq 0,05$ по сравнению с контрольной группой.

Так, уже через 2 часа после отмены стресса, толщина молекулярного слоя снизилась на 31% ($p < 0,05$). В дальнейшем этот процесс прогрессировал, и толщина слоя через 4 и 6 часов составила 0,095 мм и 0,0614 мм соответственно, то есть уменьшилась на 40% и 62% ($p < 0,05$). Максимальные изменения толщины молекулярного слоя в предгеморрагический период были зафиксированы через 8 часов после звукового стресса. На этот момент времени толщина слоя имела значение 0,0507 мм, что соответствовало ее истончению на 68% ($p < 0,05$) (табл. 1).

Касательно количества пирамидальных клеток стоит сказать, что в этот период данный морфометрический параметр снижался по мере прогрессирования патологических изменений кислородной сатурации артериальной крови. Так, через 2 – 4 – 6 – 8 часов после стресса количество пирамидальных нейронов уменьшилось на 17% – 21% – 21,5% – 33% соответственно, $p < 0,05$ (табл. 1).

Относительно диаметра пирамидальных клеток наблюдалась та же картина. Так в течение предгеморрагического периода (2 – 4 – 6 – 8 часов после стресса) диаметр пирамидальных клеток уменьшался на 19% – 20% – 29% – 39%, $p < 0,05$, соответственно (табл. 1).

Результаты показали, что период перед кровоизлиянием (2,4,6,8 ч после стресса) характеризуется постепенным снижением толщины молекулярного слоя коры и диаметра ряда пирамидальных нейронов (рис.4,5).

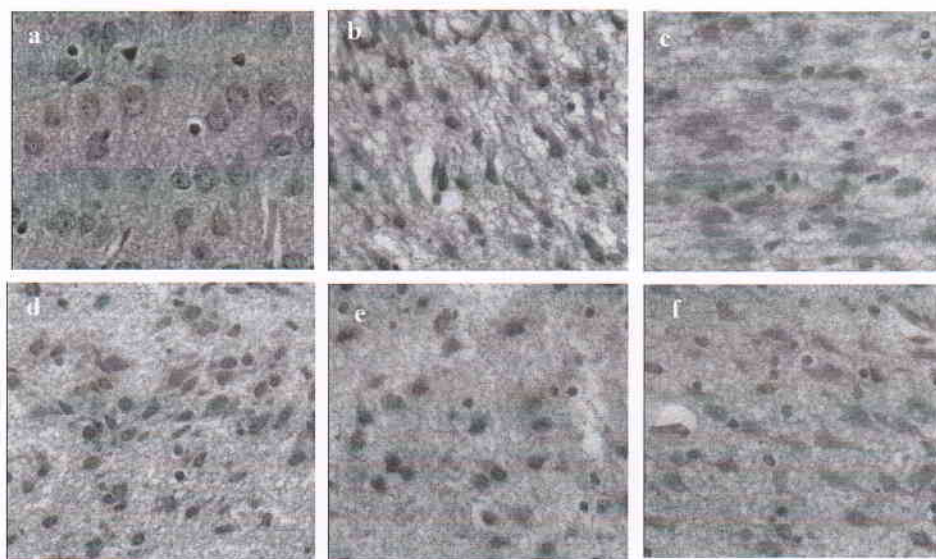


Рисунок 4- диаметр пирамидальных нейронов в контрольной группе.

а-2ч, б-4ч, с-6ч, д-8ч, е-24ч, ф-после стресса.

Так же наблюдалось развитие периваскулярного отёка в течение всего времени перед кровоизлиянием. Кровоизлияние мозга (24 ч после стресса) сопровождалось более выраженным уменьшением толщины молекулярного слоя коры и диаметра пирамидальных нейронов. Эти патологические

изменения в коре головного мозга сопровождались апоптозом пирамидальных нейронов (рис.6,7).

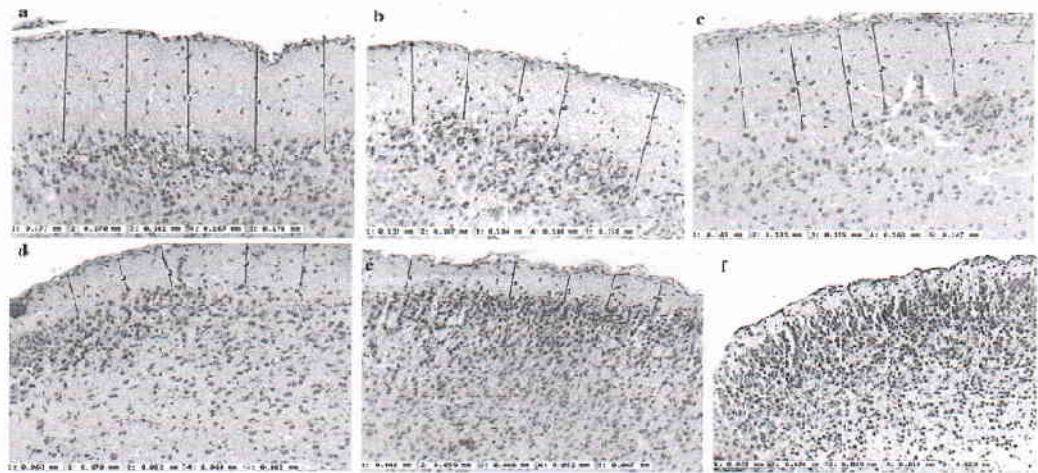


Рисунок 5-толщина молекулярного слоя коры в контрольной группе.

а-2ч, б-4ч, с-6ч, д-8ч, е-24ч, ф-после стресса.



Рисунок 6- периваскулярный отёк.

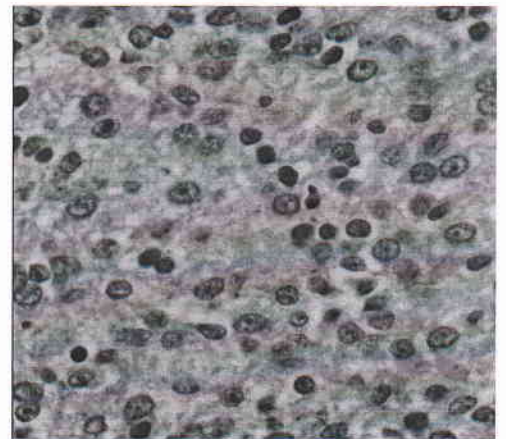


Рисунок 7- апоптические тела в коре головного мозга новорождённой крысы.

По результатам гистологического анализа мы можем с уверенностью говорить о том, что гипоксия приводит к необратимым изменениям в интеллектуальных зонах мозга, которые сопровождаются снижением числа пирамидальных клеток и толщины молекулярного слоя.

ВЫВОДЫ

- 1) Методом пульсоксиметрии было установлено, что звуковой стресс вызывает у здоровых новорожденных крыс резкое снижение кислородной сатурации артериальной крови мозга, приводя к развитию гипоксемии.
- 2) В латентный период кислородное насыщение тканей продолжало снижаться на протяжении всего времени до образования геморрагий с максимальным падением SpO₂ на 4-8 часах.
- 3) МРТ-изображение показывает, что пред-геморрагический период характеризуются гипоинтенсивным контрастированием сосудов головного мозга, которое усиливается в пост-геморрагический период.
- 4) Метод микропипеточной аспирации показывает, что возростание упругости эритроцитов предшествует и сопутствует возникновению гипоксии.
- 5) Гистологический анализ показал патологические морфологические изменения в коре головного мозга и пирамидальных нейронах.