

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

**ДИНАМИКА МОЗГОВОГО КРОВотоКА У КРЫС В ПЕРВЫЕ ДНИ  
ПОСЛЕ РОЖДЕНИЯ**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студента 4 курса 422 группы

Направления 06.03.01 Биология

Биологического факультета

Телегина Алексея Анатольевича

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

Стресс, как мощный неспецифический фактор, сопровождающий процесс родов, рассматривается как ведущая причина появления мозговых катастроф у новорожденных детей. Однако, механизмы данного феномена остаются малоизученными. Исследования в этой области носят преимущественно феноменологический характер без детального изучения физиологических процессов стресс-устойчивости церебральных сосудов в первые критические дни после рождения.

Таким образом, представляется весьма актуальным развитие новых методов изучения воздействия стресса на сосуды мозга, а также особенностей стрессорного поведения мозговой гемодинамики в первые дни после рождения. Это позволит существенно продвинуться в понимании механизмов адаптации и резервных возможностей на уровне системы регуляции мозгового кровообращения у новорожденных детей.

Вышеизложенное определило цель и задачи исследования.

**Целью исследования** явилось изучение стресс-реактивности и стресс-устойчивости церебральных сосудов у новорожденных крыс, а также механизмов стресс-индуцированных изменений в мозговом кровотоке и их вклада в развитие интракраниальных геморрагий.

### **Задачи исследования:**

1. Изучение влияния стресса на диаметр сагиттального синуса и скорость кровотока в нем при развитии интракраниальных геморрагий у новорожденных крыс с помощью ДОКТ.
2. Исследование влияния стресс-индуцированных изменений на перфузию в сосудах головного мозга с применением лазерной спекл-визуализации.
3. Изучение продукции бета-аррестина-1, как ко-фактора стрессорной активации адренорецепторов, у здоровых и стрессированных новорожденных крыс.

### **Краткая характеристика материалов.**

Во введении сформулирована актуальность работы, поставлены цель и задачи исследований. Первая глава включает в себя обзор литературы по теме исследования. Она рассматривает общие особенности и причины возникновения интракраниальных геморрагий. Во второй главе «Материалы и методы» описываются методы, использованные при проведении работы и объект исследования. В третьей главе «Результаты исследования» представлен анализ результатов собственных исследований. На основании проделанной работы сделаны выводы.

### **Структура и объем работы.**

Работа состоит из введения, трех глав, заключения, выводов, списка использованных источников. Работа изложена на 43 страницах, содержит 1 таблицу, 5 рисунков. Список использованной литературы содержит 69 источников.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **1. Обзор литературы**

#### **1.1 Стресс-индуцированные сосудистые катастрофы мозга.**

#### **Феномен их развития в первые дни после рождения.**

Процесс появления на свет является одним из самых сильных стрессов в жизни человека. Механизмы адаптации к новым условиям жизни, заложенные эволюцией, начинают работать с чистого листа и их эффективность во многом зависит от тех условий, в которых появляется организм. Процессы адаптации новорожденных к стрессам изучены крайне мало. В последнее время остро встал вопрос о стресс-индуцированных сосудистых катастрофах, происходящих в мозге у новорожденных детей. Известно, что число неонатальных инсультов мозга не уступает таковому среди взрослых пациентов. При этом данная патология включает в себя целый ряд особенностей.

Если для взрослых пациентов известны факторы риска инсульта мозга, такие как атеросклероз, повышенное артериальное давление, диабет и другие, то для новорожденных детей данные факторы неактуальны. Очевидные на первый взгляд причины, такие как родовые травмы, не вошли в число официальных факторов риска развития интракраниальных геморрагий в первые дни после рождения.

Является ли стресс ключевой причиной развития мозговых катастроф, как реагируют церебральные сосуды на стресс в первые дни после рождения, каковы механизмы неонатального стресс-индуцированного инсульта мозга? Поиск ответов на эти вопросы является принципиальным в понимании фундаментальных процессов адаптации и резервных возможностей организма на первых этапах его развития, а также является необходимым для формирования научных знаний об особенностях проявления процессов сосудистой стресс-реактивности и стресс-устойчивости в первые дни после рождения.

## **1.2 Стресс-индуцированные интракраниальные геморрагии у новорождённых крыс, как модель изучения резервных и адаптационных возможностей организма в ранний неонатальный период.**

В данной работе была разработана модель индуцирования интракраниальных геморрагий у новорожденных крыс, основанная на повреждающем воздействии звукового стресса (120 дБ, 17 Гц) на ткани и сосуды мозга. Прототипом данной модели явился способ возникновения мозговых кровоотечений у гипертензивных крыс, склонных к инсульту мозга. Повреждающее воздействие звука на церебральные сосуды обусловлено его высокой проникающей способностью и гиперактивацией гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы как одной из первых вовлекаемых в стрессорную реакцию, что сопряжено с критическими сдвигами в работе вегетососудистых центров мозга. Одной из важных особенностей развития ИГ у новорожденных детей является его проявление через 1-2 дня после рождения. Повреждающие эффекты звука на сосуды мозга проявляются

также с латентным периодом. Как было отмечено выше, интракраниальные геморрагии у доношенных новорожденных детей проявляются преимущественно в коре и подкорковых зонах мозга. Кора больших полушарий наиболее подвержена повреждающему воздействию звука. Поэтому, несмотря на неадекватность звука как стимула для развития интракраниальных геморрагий, вышеприведенные факты позволяют использовать данный стрессорный фактор для неинвазивного моделирования ИГ у новорожденных крыс.

### **1.3 Роль адренергической системы в регуляции мозгового кровотока.**

Сосуды головного мозга богато иннервируются симпатическими нервами, которые выполняют важнейшую роль в ауторегуляции мозгового кровообращения. Однако, вопрос о том, какую роль играет адренергическая нервная регуляция в церебральной гемодинамике остается открытым.

Считается, что контроль тонуса церебральных сосудов, осуществляемый за счёт симпатической нервной системы гораздо слабее, чем в сосудах периферического кровоснабжения. Однако, ряд авторов утверждает, что симпатическая нервная система играет важнейшую роль в регуляции мозгового кровотока на ранних этапах развития организма.

Таким образом, чувствительность церебральных сосудов к адренергическим влияниям определяется физиологическим состоянием организма и возрастом. Однако, каковы механизмы адренергических эффектов в отношении регуляции мозговой гемодинамики и как они развиваются на разных этапах онтогенеза, какой вклад вносят в поддержание ауторегуляции мозгового кровоснабжения на ранних этапах развития остается неизвестным, что делает актуальным проведение детальных исследований в этом направлении.

## **2 Материалы и методы**

### **2.1 Объект исследования**

Исследования выполнены на 142 новорожденных белых беспородных крысах 2-3 дневного возраста. Все экспериментальные процедуры проводились в соответствии с принципами Руководства по уходу и использованию лабораторных животных Национального института здравоохранения США (NIH Publication No. 85-23, revised 1996). Крысы содержали при  $25 \pm 2$  ° С, 55% влажности и 12/12 часовом цикле свет / темнота.

### **2.2 Методы исследования**

*Способ моделирования развития мелкоочаговых мозговых геморрагий в коре головного мозга у новорожденных крыс (Патент РФ 2505865)*

Суть предложенного способа заключается в том, что новорожденные крысы 2-3 дневного возраста помещаются в звукоизоляционную плексигласовую камеру объемом 2000 см<sup>3</sup>. Затем, в течение 2 часов, на крыс воздействуют прерывистым звуком силой 110 дБ, 370 Гц (10 секунд – звук, 60 секунд – перерыв). Преимущество предлагаемого способа в том, что он позволяет моделировать развитие интракраниальных геморрагий (ИГ) в динамике. ИГ развиваются только через 24 часа после отмены стресса.

*Измерение гемодинамических параметров (диаметр, скорость кровотока, перфузия) сосудов головного мозга новорожденных крыс*

Гемодинамические параметры измерялись у новорожденных крыс через небольшой разрез кожи в области родничка под изофлурановым ингаляционным наркозом, при этом целостность черепа не была нарушена.

Объектами исследования был сагиттальный синус, собирающий кровь со всех церебральных вен, и сосуды микроциркуляции, расположенные вокруг него.

Измерения скорости кровотока и диаметра сагиттального синуса производили с помощью системы оптической когерентной томографии (ДОКТ). Также, в экспериментах по изучению гемодинамических параметров

использовалась система лазерной спекл-визуализации на базе физического факультета Саратовского государственного университета. Данная система позволяет измерять перфузию в сосудах головного мозга.

#### *Определение содержания бета-аррестина-1 в крови и тканях мозга*

Содержание бета-аррестина-1 изучали стандартным авидин-биотиновым методом иммуноферментного анализа с использованием специфических антител (ИФА набор Beta-arrestin-1 (ARRB1) ELISA kit, 96, CSB EL002134 RA) на фотометре микропланшетного формата Multiskan Ascent (Thermo Labsystems, Финляндия) на базе ИБФРМ РАН.

### **3 Результаты исследования**

#### **3.1 Исследование гемодинамики мозгового кровотока у новорожденных крыс с помощью методов лазерной спекл-визуализации и ДОКТ.**

Эксперименты проводились на новорожденных крысах (n=87) 2-3 дневного возраста в трех группах:

- 1) контроль (n=17), группа включала в себя здоровых нестрессированных крыс;
- 2) предгеморрагии (n=33), включающая в себя стрессированных крыс через 4 часа после отмены стресса с начальными патологическими изменениями в мозговом кровотоке;
- 3) постгеморрагии (n=37), которая включала стрессированных крыс через 24 часа с интракраниальными геморрагиями.

*Изучение влияния стресса на диаметр сагиттального синуса и скорость кровотока в нем при развитии интракраниальных геморрагий у новорожденных крыс с помощью ДОКТ.*

В условиях нормы по данным ДОКТ сагиттальный синус имел средний диаметр  $0.30 \pm 0.03$  мм, скорость кровотока в нём –  $6.00 \pm 0.09$  мм/сек.

Результаты ДОКТ исследований показали, что диаметр сагиттального синуса (основного ствола) у стрессированных крыс через 4 часа после отмены



воздействия был в 1,7 раза больше, а скорость кровотока была в 1,9 раза ниже по сравнению со здоровыми особями.

Стресс-индуцированные изменения в сагитальном синусе у новорожденных крыс

| Параметры  | Контроль    | Предгеморрагии<br>(4 часа после<br>стресса) | Постгеморрагии<br>(через 24 часа<br>после стресса) |
|--|-------------|---|--|
| Диаметр<br>основного ствола<br>сагитальной<br>вены, мм | 0,30 ± 0,03 | 0,51 ± 0,04 *                               | 1,11 ± 0,02 * †                                    |
| Диаметр правой<br>ветви<br>сагитального<br>синуса, мм  | 0,22 ± 0,01 | 0,27 ± 0,01 *                               | 0,36 ± 0,04 * †                                    |
| Диаметр левой<br>ветви<br>сагитального<br>синуса, мм   | 0,20 ± 0,03 | 0,28 ± 0,02 *                               | 0,38 ± 0,03 * †                                    |
| Скорость<br>кровотока мм/сек                           | 6,00 ± 0,09 | 3,11 ± 0,04 *                               | 2,09 ± 0,03 * †                                    |

\* -  $p < 0,05$  по сравнению с контрольной группой, † - между стрессированными крысами

Данные ДОКТ показали, что диаметр сагитального синуса (основного ствола) у крыс через 24 часа после стресса был в 2,2 раза больше, чем у крыс через 4 часа после звонка, и в 3,7 раза больше, чем у здоровых животных. Данные ДОКТ также выявили более выраженное падение скорости кровотока в сагитальном синусе у крыс в постгеморрагическом состоянии по



сравнению с предгеморрагической группой, и особенно, по сравнению с контролем. Так, через 24 часа после стресса скорость кровотока была меньше в 1,5 раза по сравнению с группой, взятой в исследование через 4 часа после стресса и в 2,9 раза меньше, чем в контроле.

*Исследование влияния стресс-индуцированных изменений на перфузию в сосудах головного мозга с применением лазерной спекл-визуализации.*

Применение метода лазерной спекл-визуализации позволило выявить значительные изменения в ЦК у новорожденных крыс через 4 часа после стрессирования. В предгеморрагической группе изменения наблюдались только в сагиттальном синусе, но не в сосудах микроциркуляторного русла. Действительно, если перфузия в сагиттальном синусе повышалась на 25% ( $p < 0,05$ ) то в области микроциркуляции этот показатель не изменялся.

Падение скорости потока крови на фоне релаксации сосуда и повышения перфузии в нём свидетельствует о развитии венозной недостаточности и снижения оттока крови из полости черепа. Важно отметить, что указанные изменения предшествуют развитию стресс-индуцированных интракраниальных геморрагий у новорожденных крыс и являются показателем ранних патологических изменений мозгового кровотока и снижения стресс-устойчивости церебральных сосудов.

Наши данные также показали, что вены более чувствительны к стрессу по сравнению с сосудами микроциркуляторного звена. Полученные данные согласуются с клиническими наблюдениями, свидетельствующими о том, что интракраниальные геморрагии у новорожденных детей, в основном, венозные.

Таким образом, начальные стадии стресс-индуцированных изменений в мозговом кровотоке у новорожденных крыс сопровождаются релаксацией сагиттального синуса и увеличением перфузии в нём на фоне снижения скорости кровотока, что свидетельствует о венозной недостаточности и снижении оттока крови из головного мозга. Указанные изменения

проявляются более ярко по мере прогрессирования стресс-индуцированных патологических сдвигов в церебральной гемодинамике, вовлекая, при этом, сосуды микроциркуляторного русла, которые, очевидно, изменяются в ответ на формирование венозного застоя. Полученные результаты подтверждают данные о развитии венозной недостаточности и снижении оттока крови из мозга, как важного прогностического звена и информативного критерия в изучении механизмов стресс-индуцированных изменений мозгового кровотока в первые дни после рождения.

### **3.2 Изучение продукции бета-аррестина-1 как одного из ключевых механизмов локальной регуляции сосудистого гомеостаза**

В открытиях последних лет показано, что развитие стресс-индуцированных сосудистых катастроф происходит в значительной степени за счет чрезмерной активации адренергических механизмов регуляции сосудистого тонуса, среди которых ведущую роль отводят гиперпродукции бета-аррестина-1. Семейство белков бета-аррестина являются ко-факторами в передаче возбуждения сосудистых адренорецепторов при их взаимодействии с адреналином. На основе проанализированной информации, было выдвинуто предположение, что бета-аррестин-1, как мессенджер в передаче возбуждения с адренорецепторов на процессы специфического фосфорилирования белков в клетках сосудов, может играть важную роль в сопровождении стресс-индуцированных критических изменений в мозговом кровотоке у новорожденных крыс.

Для решения поставленной задачи изучали содержание бета-аррестина-1 в тканях мозга и крови, после стресса. Первые часы после отмены стресса рассматривались как предгеморрагическое состояние; 24 часа постгеморрагическое состояние.

Концентрацию бета-аррестина-1 изучали иммуноферментным методом с использованием специфических антител (ИФА набор Beta-arrestin-1 (ARRB1) ELISA kit, 96, CSB EL002134 RA) в следующих группах:

- 1) контроль (n=10);
- 2) предгеморрагия (1 часа после стресса, n=10);
- 3) предгеморрагия (4 часа после стресса, n=10);
- 4) предгеморрагия (8 часов после стресса, n=10);
- 5) постгеморрагия (24 часа после стресса, n=15).

Результат исследования выявил стойкое повышение продукции бета-аррестина-1 в тканях мозга и крови на фоне стресс-индуцированных интракраниальных геморрагий у новорожденных крыс. Так, уровень бета-аррестина-1 увеличивался в 1,9 раза ( $p < 0,05$ ) в мозге и 2,8 раза ( $p < 0,05$ ) в крови уже через 1 час после стресса. В остальные сроки наблюдения (через 4, 8 и 24 часа после стресса) уровень бета-аррестина-1 сохранялся на высоком уровне.

В целом, результаты исследования данного эксперимента показали, что повышенная секреция бета-аррестина-1 является важным механизмом в стресс-индуцированных изменениях мозгового кровотока у новорожденных крыс. Тот факт, что подобные изменения предшествуют критическим сдвигам в церебральной гемодинамике и появляются за несколько часов до интракраниальных геморрагий, дает основание сделать заключение об их важной прогностической значимости.

## ВЫВОДЫ

1. Стресс-реактивность церебральных вен выше, чем сосудов микроциркуляторного русла у новорожденных крыс.
2. Начальные этапы стресс-индуцированных поражений мозга (прединсультное состояние) сопровождаются релаксацией сагиттального синуса и снижением скорости потока крови в нём, что свидетельствует о развитии венозной недостаточности и нарушении оттока крови из головного мозга.
3. Сосуды микроциркуляции не изменяются в предгеморрагический период наблюдения. Эти результаты позволяют заключить, что релаксация церебральных вен на фоне снижения скорости потока крови в них является системным маркером риска развития стресс-индуцированных сосудистых катастроф в мозге у новорожденных крыс.
4. Выявлено, что в предгеморрагическом состоянии существенно возрастает в мозге и крови продукция бета-аррестина-1 - ко-фактора стрессорной активации  $\beta_2$ -адренорецепторов. Это свидетельствует о том, что бета-аррестин-1 является важным молекулярным маркером критических сдвигов в венозной гемодинамике при развитии стресс-индуцированных геморрагий мозга, и его определение может использоваться в качестве прогностического маркера риска появления сосудистых мозговых катастроф в первые дни после рождения.

*Итез*