

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

**Гистологический и оптический анализ состояния сосудов мозга под
влиянием звукового стресса**

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

Студента 2 курса 241 группы
направления 06.04.01 «Биология»,
биологический факультет, кафедра физиологии человека и животных
Разубаевой Виктории Игоревны

Научный руководитель

Зав. кафедрой физиологии человека и животных,

д.б.н, профессор

О. В. Семячкина-Глушковская

(подпись, дата)
15.06.2017

Зав. кафедрой физиологии человека и животных,

д.б.н, профессор

О. В. Семячкина-Глушковская

(подпись, дата)
15.06.2017

Саратов 2017

Актуальность работы: В структуре детской инвалидности такие заболевания, как поражения нервной системы составляют около 50%, при этом заболевания нервной системы, приводящие в 70-80% к инвалидизации и дезадаптации детей, зачастую обусловлены перинатальными факторами. Из этого следует, что большинство детей-инвалидов – это инвалиды вследствие перинатальных поражений нервной системы. Но, некоторые заболевания, которые не приводят к инвалидизации ребенка, но в значительной степени определяющие его биологическую и социальную дезадаптацию, также связаны с перинатальным поражением мозга.

Проблема мозговых кровотечений (МК) у новорожденных детей не является новой. У недоношенных новорожденных, как правило, развиваются обширные внутрижелудочковые и субарахноидальные кровотечения в течение первых 48 часов жизни, что часто приводит к летальному исходу. Так как обычно эта проблема звучит в контексте детей, рожденных раньше срока и имеющих низкую массу тела, исследования в области образования цереброваскулярных катастроф у доношенных новорожденных является актуальной.

Заболеваемость и распространенность внутричерепных кровоизлияний у доношенных детей изучена плохо, потому что чаще всего они протекают бессимптомно или с другой симптоматикой, именно поэтому их очень сложно идентифицировать. Чаще всего у доношенных детей развиваются мелкоочаговые МК в поверхностных зонах мозга – в коре и подкорковых структурах, что объясняет отсутствие яркой клинической картины кровотечений.

Однако, проведенное в Северной Калифорнии обширное исследование 88 новорожденных, родившихся без симптомов МК и прошедших обследование с применением магнитно-резонансной томографии (МРТ), обнаружило у 8 детей внутричерепные кровоизлияния. Такие данные появляются все чаще и позволяют предположить, что внутричерепные

кровоизлияния у доношенных новорожденных детей без симптомов – не такое редкое явление, как считалось раньше.

Родовспоможение, например, применение щипцов или вакуума, является одним из возможных факторов, приводящих к МК у новорожденного. Но основным фактором риска для новорожденных является стресс, который младенцы испытывают во время эмбрионального развития из-за различных стрессов матери, критических физиологических изменений во время родов и интенсивной адаптации к новым условиям жизни. Первые три дня жизни новорожденного являются наиболее важными для адаптации к новым условиям. В первые 24 часа жизни после рождения процент смертности наиболее высокий, до 50% умирают в течение первых трех дней жизни, а около 75% всех неонатальных смертей приходится на первую неделю жизни (ранняя неонатальная смертность). Факт, что неонатальная среда является основным фактором, определяющим стрессовые заболевания, является общепризнанным. Однако сам стресс и механизмы, лежащие в основе цереброваскулярных катастроф, связанными со стрессом, у новорожденных не изучены из-за методологических трудностей.

Целью данной работы стало изучение влияния запредельного стресса на состояние головного мозга (ГМ) у новорожденных крыс с применением оптического и гистологического анализа состояния сосудов мозга.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. оценить характер и площадь кровоизлияний у новорожденных крыс с помощью гистологических исследований.
2. изучить изменения в сосудах ГМ у новорожденных крыс с помощью оптической когерентной томографии и лазерной спекл-визуализации.

Структура магистерской работы. Выпускная квалификационная работа состоит из пяти частей: введения, основной части, заключения, выводов и списка использованных источников. Основная часть включает в

себя три раздела: обзор литературы, материалы и методы и результаты исследования. Раздел обзор литературы состоит из двух подразделов: стресс-индуцированные сосудистые катастрофы мозга, феномен их развития в первые дни после рождения и гипоксия, как причина развития интракраниальных геморрагий у новорожденных детей. Раздел материалы и методы представлен описанием исследуемых объектов и условий проведения эксперимента. Раздел результаты исследования включает три подраздела: исследование состояния сосудов мозга при развитии интракраниальных геморрагий у новорожденных крыс с помощью магнитно-резонансной томографии; гистологический анализ состояния сосудов мозга новорожденных крыс при развитии интракраниальных геморрагий; оптические методы исследования состояния сосудов мозга у новорожденных крыс с интракраниальными геморрагиями.

Объектом исследования служили особи белых новорожденных крыс в возрасте 7 дней.

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

Для воспроизведения кровоизлияний в мозг в эксперименте нами использовалась модель, разработанная на кафедре физиологии человека и животных НИУ СГУ им. Н.Г. Чернышевского . Животные помещаются в плексигласовую камеру объемом 2000 см³, где подвергаются воздействию низкочастотного шума. Камера служит для звукоизоляции, а в силу малой подвижности новорожденных крыс, фиксация не требуется. Прерывистый звук силой 100 дБ, 370 Гц подается на протяжении 120 мин. (60 секунд- звук, 60 секунд перерыв).

Характер и площадь кровоизлияний у новорожденных крыс определяли с помощью гистологических исследований на базе кафедры патологической анатомии СГМУ им. В.И. Разумовского.

Изменения в сосудах ГМ у новорожденных крыс изучали двумя методами: методом доплеровской оптической когерентной томографии (ДОКТ) и с помощью лазерной спекл-визуализации на базе кафедры оптики и биофотоники физического факультета Саратовского национального исследовательского государственного университета имени Н.Г. Чернышевского.

Наличие геморрагических кровоизлияний подтверждали методом магнитно-резонансной томографии

Магнитно-резонансную томографию (МРТ) проводили на томографе ClinScan 7T (Bruker Biospin) на базе кафедры медицинских биотехнологий Российского национального исследовательского медицинского университета имени Н.И. Пирогова Минздрава России.

Для изучения характера и площади кровоизлияний новорожденных крыс усыплялись эфиром и декапитировали, затем аккуратно извлекался ГМ для проведения в дальнейшем исследования. Извлеченный исследуемый образец для фиксации помещался в 10% забуференный раствор формалина, на срок не менее суток. Далее образец подвергался стандартной спиртовой гистологической проводке и заливался жидким парафином. Толщина срезов не превышала 4-5 мкм. Для окраски срезов мозговой ткани применялись гистологические красители: гематоксилин и эозин. Фотографии были сделаны с помощью Микровизора медицинского проходящего света μ Vizo-101 (ЛОМО). Исследование выполнено на базе кафедры патологической анатомии Саратовского государственного медицинского университета имени В.И. Разумовского.

Метод доплеровской оптической когерентной томографии (ДОКТ) и лазерную спекл-визуализацию проводили на базе кафедры оптики и биофотоники физического факультета Саратовского национального исследовательского государственного университета имени Н.Г. Чернышевского.

Постановка эксперимента

Животных разделили на шесть групп:

Контрольная группа- здоровые интактные животные, не подвергшиеся стрессу (n=20);

- 2) крысы через 2 часа после звукового воздействия (n=20);
- 3) крысы через 4 часа после звукового воздействия (n=20);
- 4) крысы через 6 часов после звукового воздействия (n=20);
- 5) крысы через 8 часов после звукового воздействия (n=20);
- 6) крысы через 24 часа после звукового воздействия (n=20).

Прединсультные группы включали крыс, взятых в эксперимент через 2, 4, 6 и 8 часов после стресса, а также постинсультная группа - крысы через 24 часа после стресса. В эксперимент отбирали новорожденных крыс возрастом до 7 дней.

Пять опытных групп были подвержены звуковому воздействию. Здоровые крысы помещались в звукоизолирующую плексигласовую камеру. В течении 2-х часов животные подвергаются прерывистому звуку (100 дБ, 370 Гц), с последующим алгоритмом: 60 сек. звук 60 сек. перерыв.

MPT исследование проводилось на крысах, входящих в следующие группы: контрольная группа, через 4 и 24 часа после звукового воздействия.

Через определенное время (2ч., 4ч., 6ч., 8ч., 24ч.) производилась декапитация животного, с последующей трепанацией черепа, для изъятия мозга. Мозг помещалась в 10% раствор формалина. После забора материала выполнялась заливка парафином и нарезка данных блоков на микротоме для парафиновых срезов толщиной не превышавших 4-5 мкм.. Для окраски срезов мозговой ткани применялись гистологические красители: гематоксилин и эозин. Фотографии были сделаны с помощью Микровизора медицинского проходящего света μ Vizo-101 (ЛОМО).

С помощью ДОКТ и лазерной спекл-визкализации исследовали изменения в сосудах головного мозга у новорожденных крыс

Обсуждение результатов исследования

MPT исследованием подтверждали наличие кровоизлияний мозга у новорожденных крыс.

Периоды до и после кровотечения характеризовались пониженной контрастностью сосудов головного мозга. Эти изменения могут быть вызваны накоплением дезоксигемоглобином из-за длительной гипоксии. Таким образом, эти результаты показывают, что снижение поступления кислорода в мозг, наряду с подавлением кровообращения в коре головного венозной системы, это еще один механизм, предшествующий и сопровождающий стресс-индуцированной геморрагии ГМ у новорожденных крыс.

Результаты гистологического анализа показали, что воздействие запредельного стресса вызывает существенные повреждения тканей и сосудов ГМ. Церебральные вены более чувствительны к повреждающему воздействию стресса по сравнению с артериями и сосудами микроциркуляторного звена. Уже через 4 часа после звукового стресса отмечалось кровенаполнение вен, которое в дальнейшем прогрессирует по мере развития патологического состояния. Скопление крови в мозговых венах сопровождается развитием перещеллюлярного и периваскулярного отека тканей, который наблюдается в прединсультном состоянии преимущественно в коре головного мозга и в последствии, в постинсультном состоянии, распространяется по всем зонам мозга. На фоне этих изменений отмечалось так же кровенаполнение сосудов микроциркуляторного звена. Таким образом, полученные данные позволяют заключить, что стресс-индуцированные патологические изменения мозгового кровотока начинаются с развития венозной недостаточности, которая влечет за собой процессы последующих нарушений в виде отека, развивающегося вокруг сосудов и нейронов, а также аккумуляции крови в сосудах трофического звена микроциркуляции.

Степень стрессовых расстройств на уровне церебрального венозного кровообращения прямо пропорционально с зависящим от времени

уменьшением толщины молекулярного слоя коры, а также с сокращением диаметра пирамидальных нейронов.

Постепенное снижение поступления кислорода в мозг и скорость кровотока в венозной системе головного мозга сопровождалось постепенным патологическим изменением в области молекулярного слоя и пирамидальных нейронов мозга, участвующих в высших когнитивных функциях, которые имеют решающее значение для ассоциативного обучения и формирования внимания. Тяжесть стрессовых расстройств на уровне мозгового венозного кровообращения связана с зависящим от времени уменьшением толщины молекулярного слоя префронтальной коры, а также с уменьшением числа пирамидальных нейронов и их диаметра. Образование периваскулярного отека, который наблюдался в пред- и пост-кровоизлиянии периодов, может быть одной из причин, ответственных за уменьшение диаметра пирамидных нейронов из-за выхода жидкости из сосудов головного мозга и их механического сжатия. Частота кровоизлияний в мозг сопровождалась прогрессирующим патоморфологическими изменениями в коре головного мозга вплоть до апоптоза пирамидных нейронов, то есть необратимых изменений, приводящих к гибели мозговых клеток.

Результаты оптического анализа состояний сосудов ГМ показывают, что в пред-геморрагическом периоде наблюдалось увеличение размера сагиттального синуса с умеренным повышением перфузии тканей мозга. Пост-геморрагический период сопровождался дальнейшими прогрессивными изменениями в сагиттальном синусе, то есть расширением сосуда и гиперперфузией тканей мозга, окружающих главный венозный синус.

Результаты экспериментов, позволяют сделать вывод, что вены являются более чувствительным компонентом церебральной гемодинамики к гипоксии, чем сосуды микроциркуляторного русла. Так как уже в пред-геморрагический период наблюдалась релаксация сагиттального синуса и снижение скорости кровотока в нем. Пост-геморрагический период характеризовался прогрессирующим этих изменений на фоне изменений

микрососудов мозга, которые также становятся переполненными кровью из-за снижения венозного оттока.

Заключение: По результатам проведенной работы были сделаны следующие выводы:

1. Гистологическим методом установлено, что развития ИГ в первые дни после рождения сопровождаются появлением вазогенного отека, что свидетельствует о повышении проницаемости сосудистой стенки к воде. Также показаны необратимые последствия (апоптоз) для пирамидальных нейронов после перенесенного геморрагического инсульта у новорожденных крыс;

2. Методом оптической когерентной томографии и лазерной спекл-визуализацией установлено, что снижение венозного кровотока мозга у новорожденных крыс предшествует развитию ИГ и отражает степень геморрагических повреждений тканей мозга.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Васильев'.