

*На правах рукописи*



**Синдеева Ольга Александровна**

**МЕХАНИЗМЫ СТРЕСС-ИНДУЦИРОВАННОГО НАРУШЕНИЯ  
МОЗГОВОЙ ГЕМОДИНАМИКИ И ИХ РОЛЬ В РАЗВИТИИ  
ИНТРАКРАНИАЛЬНЫХ ГЕМОРРАГИЙ У НОВОРОЖДЕННЫХ КРЫС**

*03.03.01 – физиология*

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Астрахань – 2016

Работа выполнена на кафедре физиологии человека и животных биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Саратовский государственный национальный исследовательский университет имени Н.Г. Чернышевского»

Научный руководитель: доктор биологических наук, доцент  
**Семячкина-Глушковская Оксана Валерьевна**

Официальные  
оппоненты: **Нестеров Юрий Викторович**, доктор биологических наук, доцент, ФГБОУ ВО «Астраханский государственный университет», кафедра физиологии, морфологии, генетики и биомедицины, профессор

**Мурашев Аркадий Николаевич**, доктор биологических наук, профессор, ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук, лаборатория биологических испытаний, руководитель

Ведущая организация: ФГАОУ ВО «Волгоградский государственный университет», Институт естественных наук

Защита состоится « 17 » июня 2016 года в 14:00 часов на заседании объединенного диссертационного совета ДМ 212.009.01 при ФГБОУ ВО «Астраханский государственный университет» по адресу: 414000, г. Астрахань, пл. Шаумяна, 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО «Астраханский государственный университет» по адресу: 414056, г. Астрахань, ул. Татищева, 20а, и на сайте: <http://www.asu.edu.ru>

Автореферат разослан «    »    2016 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета



Курьянова Евгения Владимировна

## 1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность.** Стресс является независимым фактором риска развития сосудистых заболеваний (Musselman, 1998; Feldman, 1999). Самой распространенной стресс-индуцированной патологией является инсульт головного мозга, который в детском возрасте в 20-30% случаев проходит под разнообразными ошибочными диагнозами, а в 1/3 случаев причину не удается установить в силу стрессорного происхождения данного феномена (Чучин, 2000). Рождение сопряжено с сильными эмоциональными и физиологическими нагрузками не только для матери, но и для плода (Потребич, 2009). В последние годы проблема стресса во время рождения приобретает новое виденье и особую актуальность в современной медицине. Активные исследования в этой области начались около 10 лет назад благодаря открытию феномена бессимптомного стресс-индуцированного неонатального инсульта мозга (Whitby, 2004; Looney, 2007). Сегодня стало очевидно, что неонатальные инсульты у детей развиваются с такой же частотой, что и у взрослых (Fullerton, 2003; Jones, 2004). Только, если для взрослых пациентов известны факторы риска, такие как высокое артериальное давление, атеросклероз, диабет и другие, то для новорожденных детей данные факторы неактуальны. И даже очевидные на первый взгляд причины, такие как родовые травмы, не вошли в число официальных факторов риска для развития интракраниальных геморрагий в первые дни после рождения (Towner, 1999; Benedetti, 1999).

Стресс, как мощный неспецифический фактор, сопровождающий процесс родов, рассматривается как ведущая причина появления мозговых катастроф у новорожденных детей (Bruno, 2014; Craft, 2006; Barker, 2000). 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.

Очевидно, что вызванные стрессом нарушения мозгового кровообращения и сосудистого гомеостаза несут в себе важную информацию о механизмах регуляции васкулярной стресс-реактивности и стресс-устойчивости. Существует достаточно большое количество работ, в которых показана прямая взаимосвязь между критическими сдвигами в церебральной гемодинамике и развитием интракраниальных геморрагий у новорожденных детей (Ballabh, 2010; Pryds, 1996; Van Bel, 1987; Perlman, 1983, 1985).

Следует отметить, что данные по нарушениям мозгового кровотока, сопровождающим неонатальный инсульт, весьма противоречивые (Ballabh, 2010). Считается, что флуктуации мозгового кровотока предшествуют интракраниальным геморрагиям (Pryds, 1996; Van Bel, 1987). Новорожденные дети со стабильной церебральной гемодинамикой более устойчивы к развитию инсульта мозга (Perlman, 1983, 1985). Тем не менее, эти данные единичные, не имеющие под собой достаточно экспериментальных и

клинических доказательств. В силу этих причин лечение неонатальных инсультов вынужденно осуществляется средствами «взрослой» терапии, которая во многих случаях оказывается неэффективной и даже губительной для маленьких пациентов. Лечение неонатальных инсультов зачастую представляет собой счастливую случайность, но не заранее спланированную тактику врача. Отражением данной ситуации являются факты, свидетельствующие о неблагоприятном неврологическом прогнозе для последующего развития детей, перенесших в младенчестве инсульт мозга. 85% таких детей имеют когнитивные расстройства, проблемы с адаптацией к высоким ритмам современного общества и нуждаются в специальной облегченной школьной программе (Bruno, 2014; Kirton, 2013, Brouwer, 2010; Vohr, 2003).

Очевидно, что для решения данной проблемы необходимы фундаментальные знания о механизмах регуляции стресс-реактивности и стресс-устойчивости мозговых сосудов в первые дни после рождения. Однако, существующие на сегодняшний день экспериментальные модели геморрагического инсульта не могут быть использованы для этих целей. Все эти методы основаны на стереотаксическом введении крови непосредственно в мозг, что делает их пригодными только для изучения постинсультного состояния (MacLellan, 2012).

Таким образом, представляется весьма актуальным развитие новых методов изучения воздействия стресса на сосуды мозга, а также особенностей стрессорного поведения церебральной 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.

Среди механизмов регуляции стрессорной реакции церебральных сосудов важно уделить внимание симпатической системе, которая густо иннервирует сосуды мозга, активно вовлекается в механизмы поддержания сосудистого тонуса уже с первых дней после рождения и одна из первых вовлекается в стрессорную реакцию (McCalden, 1981; Bevan, 1981; Busija, 1984; Edvinsson, 1993, 2002).

Молекулярные мембранные факторы стимуляции адренорецепторов в процессе стресса адреналином рассматриваются как ведущие причины развития стресс-индуцированных патологий (Hara, 2013). Нарушения эндотелиальных процессов релаксации сосудов также тесно связано с уровнем адренергического доступа к сосудам (Ferro, 1999; Dawes, 1997). Однако, данных относительно того, как указанные процессы проявляются на ранних этапах онтогенеза остаются малоизученными.

Вышеизложенное определило цель и задачи исследования.

**Цель исследования** – изучить стресс-реактивность и стресс-устойчивость церебральных сосудов у новорожденных крыс, а также механизмы стресс-индуцированных изменений в мозговом кровотоке и их вклад в развитие интракраниальных геморрагий.

### **Задачи исследования:**

1. Изучить влияния запредельного стресса на устойчивость церебральных сосудов к развитию интракраниальных геморрагий у новорожденных крыс с применением гистологического анализа состояния тканей и сосудов мозга.

2. Исследовать стресс-индуцированные изменения в церебральной гемодинамике, предшествующие и сопровождающие развитие мозговых сосудистых катастроф, с применением лазерной оптической визуализации и оптической когерентной томографии.

3. Определить вклад симпатической нервной системы в стресс-индуцированные изменения мозгового кровотока у новорожденных крыс на основе применения фармакологического тестирования адренергических механизмов регуляции церебральной гемодинамики.

4. Выявить вклад системы генерации оксида азота в механизмы стресс-устойчивости церебральных сосудов к запредельному стрессу у новорожденных крыс на основе определения содержания оксида азота в тканях мозга и крови на разных стадиях стресс-индуцированного развития интракраниальных геморрагий.

5. Установить молекулярные маркеры, предшествующие критическим изменениям мозгового кровотока в условиях стресса у новорожденных крыс на основе изучения продукции бета-аррестина-1, как ко-фактора стрессорной активации адренорецепторов и кислородной сатурации тканей мозга, как ключевого фактора регуляции сосудистого гомеостаза в мозге.

**Научная новизна.** Разработана оригинальная модель стресс-индуцированного развития интракраниальных геморрагий у новорожденных крыс (Патент РФ 2505865), которая представляет собой информационную платформу, позволяющую изучать стресс-реактивность и стресс-устойчивость церебральных сосудов в первые дни после рождения. Впервые установлено, что стресс-реактивность церебральных вен выше, чем артерий и сосудов микроциркуляции у новорожденных крыс. Получены новые данные о том, что стресс-индуцированная релаксация церебральных вен, лежащая в основе венозной недостаточности и снижения оттока крови из головного мозга, является прогностическим маркером риска развития неонатального геморрагического инфаркта мозга. Впервые выявлено, что в условиях стресса адренергические механизмы вазорелаксации, реализуемые через гуморальную (адреналин) активацию сосудистых неиннервируемых  $\beta_2$ -адренорецепторов, играют важную роль в критических изменениях венозной гемодинамики, сопровождающих интракраниальные геморрагии в первые дни после рождения. Важным новым результатом явился факт, что высокая активность NO-ергической системы в условиях воздействия запредельного стресса у новорожденных крыс является следствием, но не причиной стресс-индуцированных нарушений мозгового кровотока. Впервые обнаружено, что бета-аррестин-1 является важным молекулярным механизмом критических сдвигов в венозной гемодинамике при развитии стресс-индуцированного

инфаркта мозга и может явиться прогностическим маркером риска появления сосудистых мозговых катастроф в первые дни после рождения.

**Теоретическая и практическая значимость.** Результаты исследований, представленные в диссертационной работе, существенно расширяют научные представления об адаптационных и резервных возможностях организма в первые дни после рождения на примере эффектов запредельного стресса в отношении церебральных сосудов новорожденных крыс. Разработанная оригинальная модель стресс-индуцированных интракраниальных геморрагий является важной научной платформой для дальнейших исследований механизмов регуляции стресс-реактивности и стресс-устойчивости церебральных сосудов на начальных стадиях онтогенеза, а также для выявления маркеров преинсультного состояния мозга на этом этапе развития организма.

Установленные гемодинамические критерии нарушения венозной гемодинамики, предшествующие стресс-индуцированным мозговым катастрофам у новорожденных крыс, несут в себе важную прогностическую информацию, требующую дальнейших детальных клинических исследований.

Инверсия сосудистых эффектов адреналина на фоне стресс-индуцированных поражений церебральных сосудов у новорожденных крыс имеет принципиальное значение для уточнения терапии постинсультного состояния в первые дни после рождения.

Повышение концентрации бета-аррестина-1 в крови предшествует критическим изменениям церебрального кровотока у новорожденных крыс, что дает основание предполагать важное значение скринингового определения уровня бета-аррестина-1 в крови, как дополнительного параметра для оценки состояния здоровья новорожденных.

## **Методология и методы исследования**

**Объект исследования.** Исследования выполнены на 359 новорожденных белых беспородных крысах. Все экспериментальные процедуры проводились в соответствии с принципами Хельсинской декларации о гуманном отношении к животным.

**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 120 дБ, 17 Гц (10 секунд – звук, 60 секунд – перерыв). Преимущество предлагаемого способа состоит в том, что он позволяет моделировать развитие интракраниальных геморрагий в динамике, благодаря чему возможно изучение преинсультных стадий, кровотечения развиваются через 24 часа после отмены стресса.

Наличие кровоизлияний и предшествующие им патологические изменения в тканях головного мозга подтверждались при помощи гистологического исследования. Для этого животных декапитировали, затем

аккуратно извлекали головной мозг и помещали в 10% забуференный раствор формалина для фиксации на срок не менее суток. Затем образец подвергался стандартной спиртовой гистологической проводке и заливался жидким парафином. Толщина срезов составляла 4-5 мкм. Для окрашивания срезов мозговой ткани применялись гистологические красители гематоксилин и эозин. Фотографии были сделаны с помощью медицинского микровизора проходящего света  $\mu$ Vizo-101 (ЛОМО).

**Регистрация 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 были сагиттальный синус, собирающий кровь со всех церебральных вен, и сосуды микроциркуляции, расположенные вокруг него.

Измерения скорости кровотока и диаметра сагиттального синуса производили с помощью систем оптической когерентной томографии на установке OCS1300SS (США). Изменения в перфузии тканей мозга изучали с помощью системы лазерной спекл-визуализации. Подробное описание методов приведено в следующих публикациях (Semyachkina-Glushkovskaya, 2013 а, б; Pavlov, 2014; Abdurashitov, 2015).

**Фармакологическая модуляция активности адренорецепторов в сосудах головного мозга.** Для изучения активности адренергических механизмов регуляции мозгового кровотока применяли *адреналин* (0,1 мг/кг, iv) и *изопротеренол* (0,05 мкг/кг, iv).

**Определение экспрессии  $\beta$ 2адренорецепторов в сосудах головного мозга.** Определение экспрессии  $\beta$ 2адренорецепторов в сосудах головного мозга проводили с помощью стандартного иммуногистохимического метода с применением специфических антител поликлональных кроличьих к  $\beta$ 2-AR (H-73, Santa Cruz Biotech sc-9042).

**Определение содержания оксида азота в плазме крови и тканях мозга новорожденных крыс.** Содержание NO в плазме крови и тканях мозга (кора больших полушарий, мозжечок, гиппокамп, ствол мозга) крыс определяли по наличию нитрита модифицированным методом (Карпюк, 2000). Для этого ткани мозга гомогенизировали, а плазму для осаждения белка подвергали двойному центрифугированию. Окрашивание производили с использованием реактива Грисса-Илосвая. Интенсивность окраски определяли на спектрофотометре (СФ-2000 Био, Санкт-Петербург, Россия, 2002) при установленной длине волны 538 нм.

Расчет концентрации нитритов в исследуемых пробах производили по формуле:

$$C = \frac{d_{\text{п}} - d_{\text{x}}}{d_{\text{ф}} - d_{\text{x}}}$$

где:  $d_{\text{п}}$  - показатель экстинкции в исследуемой пробе;  $d_{\text{x}}$  - показатель экстинкции в холостой пробе;  $d_{\text{ф}}$  - показатель экстинкции фиксанала.

**Определение насыщения гемоглобина кислородом (SpO<sub>2</sub>) в головном мозге новорожденных крыс.** Уровень насыщения гемоглобина кислородом (SpO<sub>2</sub>) контролировали с помощью пульсоксиметра модели CMS60D (ConTeC Medical Systems Co., Ltd., Циньхуандао, Китай). Оксигенацию головного мозга измеряли с помощью датчика, закрепленного на голове у новорожденных крыс, который фиксирует показания SpO<sub>2</sub> с использованием двух длин волн (660 нм и 880 нм). Измерения проводили в течение 5 минут с шагом в 1 сек для каждого животного, затем данные усреднялись для уменьшения влияния случайных ошибок, которые могут появляться во время измерений.

**Определение содержания бета-аррестина-1 в крови иммуноферментным методом.** 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 (ThermoLabsystems, Финляндия) на базе Центра коллективного пользования научным оборудованием в области физико-химической биологии и нанобиотехнологии «Симбиоз» Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук (ИБФРМ РАН).

**Статистическая обработка** экспериментальных данных проводилась с помощью современного пакета анализа Statistica 10 (StatSoft, Inc., Талса, - США). Различия считались достоверными при критерии  $p < 0,05$ . Данные представлены как среднее  $\pm$  стандартная ошибка среднего.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Церебральные вены более чувствительны к стрессу по сравнению с артериями и сосудами микроциркуляции мозга у новорожденных крыс. Стресс-индуцированная релаксация церебральных вен, лежащая в основе венозной недостаточности и снижения оттока крови из головного мозга, является прогностическим маркером риска развития интракраниальных геморрагий у новорожденных крыс.

2. Адренергические механизмы вазорелаксации за счет повышения чувствительности сосудистых  $\beta_2$ -адренорецепторов к их стимуляции лежат в основе стресс-индуцированных процессов нарушения венозной гемодинамики, предшествующие и сопровождающие развитие интракраниальных геморрагий у новорожденных крыс.

3. Повышение в мозге и крови синтеза бета-аррестина-1 – ко-фактора в механизмах стрессорной активации сосудистых  $\beta_2$ -адренорецепторов, является ключевым процессом и маркером стресс-индуцированных сосудистых катастроф в мозге на примере стресс-индуцированного развития церебральных кровоизлияний у новорожденных крыс.



**Апробация работы.** Результаты исследования были представлены на 5-ой международной научно-практической конференции «Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине» (Санкт-Петербург, Россия, 20-21 ноября, 2013 г.); на 11-ой международной конференции по фотонике и визуализации в биологии и медицине (Ухань, КНР, 26-29 мая, 2013 г.); на 14-м международном симпозиуме 2014 г. Photonics Europe (Брюссель, Бельгия, 14-17 апреля 2014); на 2-м международном симпозиуме по оптике и биофотонике Saratov Fall Meeting 2014 г. (Саратов, Россия, 23-26 сентября, 2014 г.); на международном симпозиуме и конференции SPIE BIOS (Сан-Франциско, США, 7-12 февраля, 2015 г.); на 17-ом международном симпозиуме по церебральному кровотоку, метаболизму и функциям (Ванкувер, Канада, 27-30 июня, 2015 г.). Материалы диссертации докладывались и обсуждались на открытом заседании кафедры физиологии человека и животных федерального образовательного учреждения высшего профессионального образования «Саратовский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского».

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 19 научных работ, в том числе рекомендованных ВАК РФ - 13, 1 патент РФ на изобретение.

**Структура и объём работы.** Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, обсуждения результатов исследований и выводов. Общий объём диссертации 121 страница с 25 рисунками и 4 таблицами. Список цитированной литературы включает 220 источников, в том числе 40 отечественных и 180 иностранных.

**Декларация личного участия автора.** Экспериментальные исследования выполнялись автором лично, либо при его непосредственном участии в следующих коллективных работах: грант Президента РФ для молодых докторов наук МД-2216.2014.4., 2014-2015 гг.; грант РФФИ Соглашение № 14-15-00128, 2014-2016 гг., грант РФФИ а-11-02-00560, 2011-2013 гг.; грант ФЦП, государственный контракт НК-1063Р, программа «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009-2013 годы» мероприятие 1.2 «Проведение научных исследований научными группами под руководством кандидатов наук», соглашения 14.В37.21.0216, 2012-2013 гг.; грант Правительства Российской Федерации для государственной поддержки научных исследований, проводимых под руководством ведущих учёных в российских образовательных учреждениях высшего профессионального образования по теме «Дистанционно управляемые наноструктурированные системы для адресной доставки и диагностики» (договор №14.Z50.31.0004 от 4 марта 2014 г.). В совместных публикациях вклад автора составил 50-70%.

## 2. ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### 2.1 Стресс-индуцированные интракраниальные геморрагии у новорождённых крыс как модель изучения резервных и адаптационных возможностей организма в первые дни после рождения

Целью данных исследований явился поиск стресс-индуцированных изменений в тканях головного мозга у новорожденных крыс, предшествующих и сопровождающих развитие мозговых кровоизлияний. Для решения данного вопроса новорожденных крыс, в количестве  $n=30$ , подвергали звуковому стрессу. По окончании звукового стресса животных декапитировали и проводили гистологический анализ тканей головного мозга через 4 и 8 часов (прединсультные группы,  $n=10$  в каждой группе), а также через 24 часа (постинсультная группа,  $n=10$ ). Контролем служили здоровые нестрессированные новорожденные крысы ( $n=10$ ).

На рисунке 1 отражено нормальное строение коры и подкорковых структур мозга у здоровой новорожденной крысы, а также сосудов мягкой мозговой оболочки (рис.1).

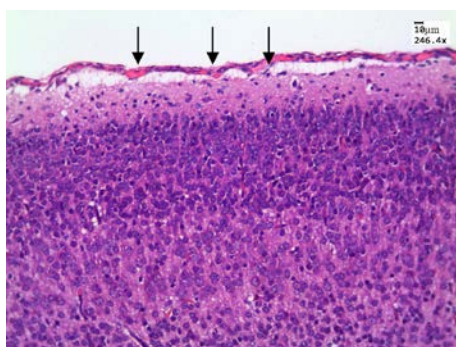


Рисунок 1 – Сосуды мягкой мозговой оболочки (указаны стрелками), кора и подкорковые структуры головного мозга здоровой новорожденной крысы

Через 4 часа после отмены стрессорного воздействия отмечалось полнокровие венозных, но не артериальных сосудов мягкой мозговой оболочки. На фоне скопления крови в венозном русле развивался перичеселлюлярный и периваскулярный отёк преимущественно в верхних слоях коры (рис. 2).

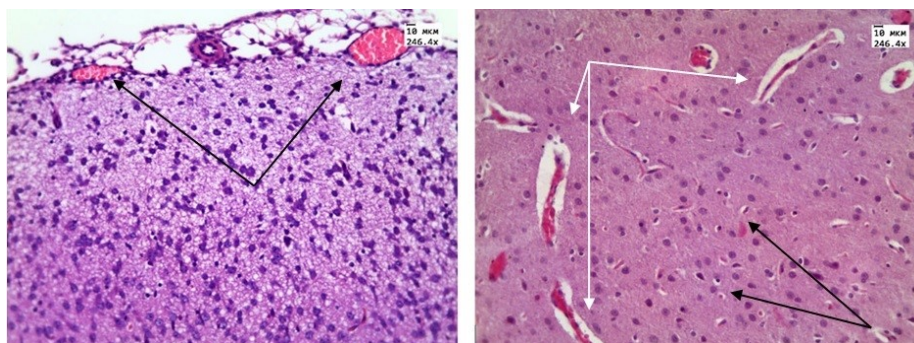


Рисунок 2 - Слева полнокровие венозных сосудов (указаны стрелками) мягкой мозговой оболочки. Справа - перичеселлюлярный (черные стрелки) и периваскулярный (белые стрелки) отёк у новорожденной крысы через 4 часа после звукового стресса (прединсультная группа)

Через 8 часов отмечалось полнокровие как венозных сосудов мягкой мозговой оболочки, так и непосредственно паренхимы головного мозга. Наблюдался умеренно выраженный отёк вещества головного мозга, но на протяжении всех слоев коры и структур белого вещества головного мозга. Обнаруживались участки ишемии в виде разрежения (рис. 3).

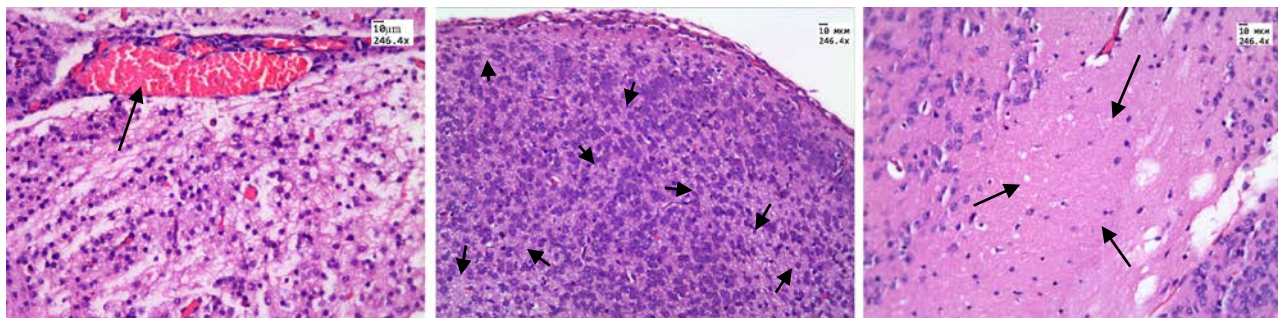


Рисунок 3 - Полнокровие венозных сосудов паренхимы головного мозга (указано стрелкой) (слева), умеренно выраженный отёк вещества головного мозга на протяжении всех слоев коры и структур белого вещества мозга (указан стрелками) (по центру) и участки ишемии в виде разрежения (указан стрелками) (справа) у новорожденной крысы через 8 часов после звукового стресса

Развитие множественных диффузных мелкоочаговых геморрагий в коре и подкорковых структурах мозга отмечалось через 24 часа после стресса (рис. 4). Средние размеры геморрагий были в пределах  $0,005 - 0,037 \text{ мм}^2$ . Отсутствие морфологических признаков разрыва церебральных сосудов и маленькие размеры геморрагий свидетельствуют о том, что стресс-индуцированные кровоизлияния происходили за счет критического повышения проницаемости сосудов, т.е. наблюдались диapedезные геморрагии.

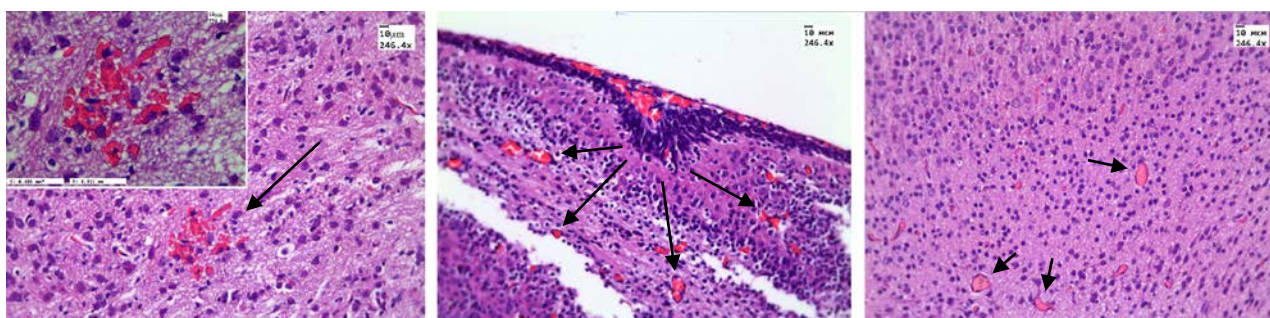


Рисунок 4 - Мелкоочаговая геморрагия (указана стрелкой) в подкорковых структурах головного мозга, площадью  $0,005 \text{ мм}^2$  с ярко выраженным отёком вещества головного мозга (слева); кровенаполнение сосудов микроциркуляторного звена в коре и подкорковых структурах мозга (по центру), а также в паренхиме мозга (справа) (указано стрелками) у новорожденной крысы через 24 часа после звукового стресса

У животных с мозговыми геморрагиями наблюдались те же патологические изменения, что и до развития кровоизлияний, т.е. кровенаполнение вен мягкой мозговой оболочки и глубоких слоев мозга. Однако, в этот период исследования, помимо венозного кровенаполнения наблюдалось кровенаполнение микроциркуляторного звена в коре и подкорковых структурах мозга (рис 4).

Результаты гистологического анализа позволяют заключить, что стресс-индуцированные патологические изменения мозгового кровотока начинаются с развития венозной недостаточности, которая влечет за собой процессы последующих нарушений в виде отёка, развивающегося вокруг сосудов и нейронов, а также аккумуляции крови в сосудах трофического звена микроциркуляции.

В целом, результаты гистологического анализа показали, что воздействие запредельного стресса вызывает существенные повреждения тканей и сосудов головного мозга у новорожденных крыс. Церебральные вены более чувствительны к повреждающему воздействию стресса по сравнению с артериями и сосудами микроциркуляторного звена. Уже через 4 часа после стресса отмечается кровенаполнение вен, которое прогрессирует по мере стресс-индуцированных критических сдвигов в церебральной гемодинамике. Скопление крови в мозговых венах сопровождается развитием перичеллюлярного и периваскулярного отека, который наблюдается в преинсультном состоянии преимущественно в коре головного мозга и, в последствии (в постинсультном состоянии), распространяется по всем зонам мозга. На этом фоне отмечается 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 отёка, развивающегося вокруг сосудов и нейронов, а также аккумуляции крови в сосудах трофического звена микроциркуляции.

## **2.2 Стресс-реактивность мозгового кровотока как индикатор стресс-устойчивости к развитию интракраниальных геморрагий у новорожденных крыс**

В предыдущей главе было показано, что запредельный стресс в виде сильного звукового воздействия, вызывает необратимые изменения в сосудах мозга, приводящие к развитию кровотечений. Первые работы, указывающие на тот факт, что нарушение кровотока головного мозга является одной из основных причин развития интракраниальных геморрагий у новорожденных детей были опубликованы в 80-х годах прошлого столетия (Van Bel, 1987; Perlman, 1983). Однако, вплоть до настоящего времени экспериментальных и клинических работ по изучению стресс-индуцированных изменений мозгового кровотока в неонатальный период крайне мало (Ballabh, 2004, 2010; Wong, 2012), что делает актуальным проведение детальных исследований в этой области.

На данном этапе исследований изучались стресс-индуцированные изменения в церебральном кровотоке у новорожденных крыс на разных этапах развития стресс-индуцированных интракраниальных геморрагий с использованием систем лазерной спекл-визуализации (ЛСВ) и оптической когерентной томографии (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) прединсульт (n=33), группа включала в себя стрессированных крыс через 4 часа после отмены стресса с начальными патологическими изменениями в мозговой кровотоке; 3) постинсульт (n=37), группа включала в себя крыс с интракраниальными геморагиями, взятых в эксперимент через 24 часа после стресса.

Поскольку спекл-анализ кровотока мозга отражает перфузию в условных единицах, то кровоток сагиттального синуса был принят за единицу, кровоток в микрососудах оценивали как изменение по отношению к 1 (рис. 5). Данные спекл-визуализации показали, что в прединсультной 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. Однако, через 24 часа после стресса отмечалось повышение перфузии как в области сагиттального синуса, так и в сосудах микроциркуляторного русла, что согласуется с данными гистологического анализа (глава 3.1). Действительно, у крыс со стресс-индуцированными мозговыми кровоизлияниями перфузия была выше в сагиттальном синусе на 33% ( $p < 0.05$ ), в сосудах микроциркуляторного русла на 25% ( $p < 0.05$ ) по сравнению с контролем (рис. 5).

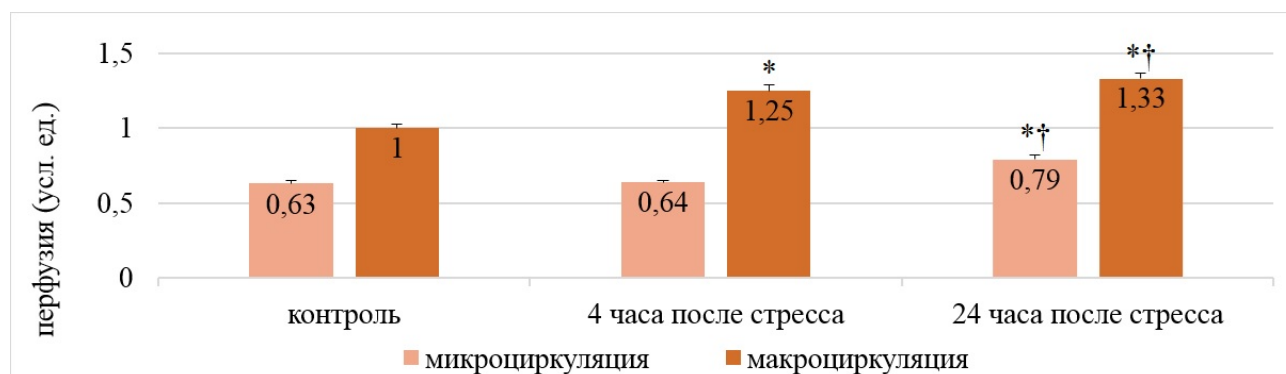


Рисунок 5 – Изменения кровотока мозга в сагиттальном синусе и в сосудах микроциркуляторного русла в нормальном состоянии, через 4 часа и 24 часа после стресса у новорожденных крыс;  $p < 0.05$  относительно: \* - контроля, † - между группами

В условиях нормы по данным ДОКТ сагиттальный синус имел средний диаметр  $0.30 \pm 0.03$  мм, скорость кровотока в нём –  $6.00 \pm 0.03$  мм/сек (табл. 1).

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 (табл. 1).

Через 24 часа после стресса патологические изменения прогрессировали, так диаметр сагиттальной вены у крыс с церебральными кровотечениями 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 сагиттальном синусе у крыс в постинсультном по сравнению с прединсультным состоянием, и особенно, по сравнению с

контролем. Так, у крыс через 24 часа после стресса скорость кровотока была меньше в 1,5 раза по сравнению с группой крыс, взятых в исследования через 4 часа после стресса, и в 2,9 раза меньше, чем у здоровых животных.

Таблица 1

**Стресс-индуцированные изменения в сагиттальном синусе у новорожденных крыс**

параметры	Контроль	Прединсульт (4 часа после стресса)	Постинсульт (через 24 часа после стресса)
диаметр основного ствола сагиттального синуса, мм	0,30 ± 0,03	0,51 ± 0,04 *	1.11 ± 0.02 * †
диаметр правой ветви сагиттального синуса, мм	0,22 ± 0,01	0,27 ± 0,01 *	0,36 ± 0,04 * †
диаметр левой ветви сагиттального синуса, мм	0,20 ± 0,03	0,28 ± 0,02 *	0,38 ± 0,03 * †
скорость 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

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 ранее сделанный вывод 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. Другие авторы также отмечают, что венозная недостаточность и формирование венозного застоя на фоне повышения давления в церебральных венах способствует развитию интракраниальных кровотечений у новорожденных детей (Ballabh, 2004, 2010). Некоторые исследования указывают, что снижение церебрального венозного кровотока связано с интракраниальными кровотечениями и неблагоприятными исходами после черепно-мозговых травм у детей (Gennaro, 2011; Wong, 2012).

### **2.3 Действие адреналина на церебральный кровоток в норме и на фоне стресс-индуцированных изменений в сосудах головного мозга у новорожденных крыс**

Симпатическая нервная система играет ключевую роль в регуляции мозгового кровообращения уже на ранних стадиях развития организма (Bevan, 1981; Busija, 1984; McCalden, 1981). Поскольку в главе 2.2 было показано, что релаксация церебральных вен, лежащая в основе развития венозной недостаточности, предшествует стресс-индуцированным критическим

сдвигам в мозговом кровотоке, далее был поставлен вопрос о том, как влияет адреналин на показатели кровотока мозга у новорожденных крыс в норме и на фоне развития стресс-индуцированных интракраниальных кровоизлияний.

Исследования гемодинамических параметров сагиттального синуса (скорость кровотока и диаметр сосуда) с использованием системы ДОКТ проводились в следующих группах: 1) контроль (n=21) - интактные новорожденные крысы; 2) прединсульт (n=19) - новорожденные крысы через 4 часа после стресса; 3) постинсульт (n=20) - новорожденные крысы через 24 часа после стресса.

В норме адреналин вызывал уменьшение диаметра сагиттального синуса ( $0,10 \pm 0,04$  мм против  $0,20 \pm 0,02$  мм,  $p < 0,05$ ), скорость кровотока при этом значительно не изменялась. Стрессированные новорожденные крысы продемонстрировали инвертированную реакцию на адреналин в латентный период развития интракраниальных кровотечений, введение адреналина сопровождалось увеличением диаметра сагиттального синуса ( $0,63 \pm 0,03$  мм против  $0,42 \pm 0,05$  мм), при этом скорость кровотока в сагиттальном синусе уменьшалась ( $2,75 \pm 0,04$  мм/сек против  $3,27 \pm 0,02$  мм/сек соответственно). У новорожденных животных в постинсультной группе адреналин не вызывал изменений в параметрах церебрального венозного кровотока, введение препарата не сопровождалось статистически значимыми изменениями в диаметре сагиттального синуса и скорости кровотока в нём ( $0,61 \pm 0,04$  мм против  $0,59 \pm 0,04$  мм - диаметр,  $2,59 \pm 0,08$  мм / с против  $2,48 \pm 0,07$  мм / с - скорость кровотока). Отметим, что введение физиологического раствора в том же объеме, что и адреналина, не сопровождалось какими-либо сдвигами в мозговом кровотоке.

Таблица 2

**Гемодинамические параметры сагиттального синуса у здоровых и стрессированных новорожденных крыс после инъекций адреналина и физиологического раствора**

	Контрольная группа	4 часа после стресса	24 часа после стресса
	<i>До инъекции адреналина</i>		
Диаметр, мм	$0.20 \pm 0.02$	$0.42 \pm 0.05$ *	$0.59 \pm 0.04$ *†
Скорость кровотока, мм/сек	$5.82 \pm 0.06$	$3.27 \pm 0.02$ *	$2.48 \pm 0.07$ *†
	<i>После инъекции физиологического раствора</i>		
Диаметр, мм	$0.21 \pm 0.01$	$0.40 \pm 0.03$ *	$0.57 \pm 0.04$ *†
Скорость кровотока, мм/сек	$5.84 \pm 0.04$	$3.25 \pm 0.02$ *	$2.49 \pm 0.06$ *†
	<i>После инъекции адреналина</i>		
Диаметр, мм	$0.10 \pm 0.04$ #	$0.63 \pm 0.03$ *#	$0.61 \pm 0.04$ *†
Скорость кровотока мм/сек	$6.11 \pm 0.05$	$2.75 \pm 0.04$ *#	$2.59 \pm 0.08$ *†

$p < 0,05$  по сравнению с: \* - контролем; † - между стрессированными животными (4 и 24 часа после стресса); # - эффект адреналина

В целом, результаты исследований показали, что в условиях нормы адреналин вызывает вазоконстрикцию церебральных сосудов, однако, на фоне ранних стресс-индуцированных изменений (прединсульт) мозгового кровотока он стимулирует вазорелаксацию, а в постинсультном состоянии его эффекты

полностью нивелируются. Эти данные позволяют заключить, что запредельный стресс, на фоне критических сдвигов в церебральной гемодинамике, повышает активность адренергических механизмов вазорелаксации. Для проверки данной гипотезы были проведены дальнейшие исследования.

## 2.4 Роль адренергической вазорелаксации в стресс-индуцированных нарушениях мозгового кровотока у новорожденных крыс

Активация адренергических механизмов вазорелаксации, показанная в эксперименте с адреналином может являться одной из причин, лежащих в основе критического расширения церебральных вен, на фоне стресс-индуцированных церебральных геморрагий у новорожденных. Известно, что адренергические механизмы вазорелаксации реализуются за счет активации сосудистых  $\beta_2$ -адренорецепторов (Lands, 1967; Wilffert, 1982). На основании этих данных, в представленной серии экспериментов изучали эффекты фармакологической стимуляции  $\beta_2$ -адренорецепторов путем введения изопротеренола в норме и на разных стадиях стресс-индуцированного развития церебральных кровотечений у новорожденных крыс.

У здоровых новорожденных крыс инъекция изопротеренола вызывала увеличение диаметра сагиттального синуса в 1,2 раза ( $p < 0,05$ ) и снижение скорости кровотока в нём на 22% ( $p < 0,05$ ). Однако, дилатация сагиттального синуса после введения агониста  $\beta_2$ -адренорецепторов была выражена значительно сильнее у животных в латентный период развития стресс-индуцированных мозговых кровотечений. Действительно, диаметр сагиттального синуса увеличился в 2,2 раза ( $p < 0,05$ ), а скорость кровотока уменьшилась на 56% ( $p < 0,05$ ) в сравнении с базальным значением контрольной группы (рис. 6). Отметим, что у новорожденных крыс в постинсультном состоянии введение изопротеренола не сопровождалось изменением диаметра сагиттального синуса. Однако, скорость кровотока в нём уменьшилась на 72% ( $p < 0,05$ ) в сравнении с базальным значением контрольной группы (рис. 6). Введение физиологического раствора не сопровождалось какими-либо изменениями в диаметре сагиттального синуса и скорости кровотока у всех групп новорожденных крыс.

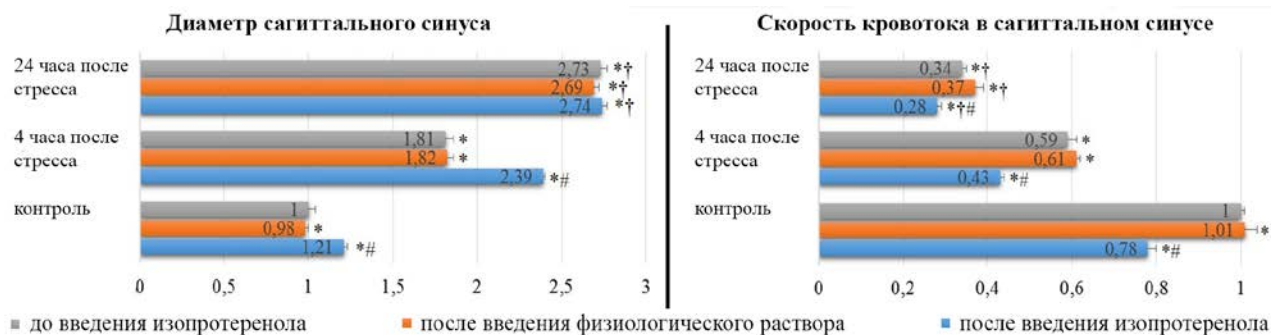


Рисунок 6 - Диаметр и скорость кровотока в сагиттальном синусе у здоровых и стрессированных новорожденных крыс до и после введения физиологического раствора и изопротеренола;  $p < 0,05$  по сравнению с: \* - контролем; † - между стрессированными животными (4 и 24 часа после стресса); # - эффект изопротеренола



Известно, что способность незрелых мозговых сосудов к расширению значительно ограничена (Cavazzutti, 1982). Существуют данные, свидетельствующие о том, что дофамин не вызывает дилатации церебральных сосудов у недоношенных эмбрионов ягнят с тяжелой гипоксией, сопровождающейся расширением сосудов головного мозга (Mayock, 2007). Этот факт частично объясняет причину нечувствительности расширенного сагиттального синуса новорожденных крыс с интракраниальными гемorragиями к воздействию изопротеренола.

Повышенная чувствительность сагиттального синуса к агонисту  $\beta$ 2-адренорецепторов у новорожденных крыс в латентный период развития стресс-индуцированных интракраниальных гемorragий может быть связана с повышением экспрессии указанного типа рецепторов, индуцированной воздействием запредельного стресса. Данное предположение возникло при анализе литературных данных, в которых описана высокая экспрессия других вазодилатирующих факторов, таких как сульфаниламидные рецепторы (Simand, 2012).

Для проверки данной гипотезы были проведены исследования по изучению экспрессии сосудистых  $\beta$ 2-адренорецепторов в мозге у новорожденных крыс с применением иммуногистохимического метода. Эксперименты проводили на здоровых крысах ( $n=17$ ) и стрессированных животных, взятых в эксперимент через сутки после стресса ( $n=15$ ), когда развивались интракраниальные гемorragии. Указанное время (24 часа) является наиболее оптимальным для прохождения биохимических и генетических процессов экспрессии рецепторов.

Однако, данные, полученные в результате проведенного исследования, не выявили изменений в экспрессии  $\beta$ 2-адренорецепторов в тканях мозга новорожденных крыс после действия запредельного стресса.

В целом, результаты исследований показали, что индуцированная стрессом релаксация сагиттального синуса, лежащая в основе развития венозной недостаточности и снижения оттока крови из головного мозга у новорожденных крыс, сочетается с высокой активностью адренергических механизмов вазорелаксации. Однако, экспрессия  $\beta$ 2-адренорецепторов, активация которых лежит в основе этих процессов, не изменяется. На основании полученных данных была выдвинута гипотеза, что повышение активности адренергической вазорелаксации в условиях запредельного стресса может быть связано с молекулярными процессами активации  $\beta$ 2-адренорецепторов, в частности увеличением продукции NO и бета-арестина-1 – мембранного ко-фактора в механизмах активации указанного типа адренорецепторов. Результаты тестирования данной гипотезы представлены в главах 2.5 и 2.6.

## 2.5 Продукция оксида азота в мозге и крови на фоне стресс-индуцированного развития интракраниальных геморрагий у новорожденных крыс

Адренергические механизмы вазорелаксации реализуются через активацию системы продукции NO. Во многих клинических работах было показано, что  $\beta$ 2-адренезависимая вазорелаксация ингибируется введением блокаторов синтеза NO (Dawes, 1997; Ferro, 1999).

Поскольку в предыдущих экспериментах было обнаружено, что стресс-индуцированное развитие интракраниальных геморрагий сопровождается повышением активности механизмов адренергической вазорелаксации за счет усиления чувствительности  $\beta$ 2-адренорецепторов к их фармакологической стимуляции, на данном этапе работ мы изучали роль NO, как одного из механизмов адренергической вазорелаксации, в этих процессах у новорожденных крыс.

С этой целью изучались изменения в содержании NO в тканях мозга и крови в условиях развития стресс-индуцированных интракраниальных геморрагий. Для этого были выбраны следующие группы: 1) интактные нестрессированные крысы (n=15), 2) прединсультная группа (n=15) и 3) постинсультная группа (n=15). Новорожденных крыс отнимали от самки в утренние часы после их кормления. Крысы находились в сонном состоянии на протяжении 2 часов для нивелирования повышения концентрации NO после приема молока. Отметим, что существуют работы, в которых выявлено быстрое восстановление NO в крови после стресса (Семякина-Глушковская, 2006, 2010). Употребление продуктов, являющихся источником NO, не сопровождается существенным повышением его концентрации в крови (Liu, 2009). Далее крыс декапитировали и проводили определение содержания NO в разных отделах мозга и крови с применением реактива Грисса- Илосвая.

У стрессированных новорожденных крыс в прединсультном состоянии не отмечалось изменений в содержании NO ни в тканях мозга, ни в крови. При этом уровень NO существенно не различался между разными отделами мозга (табл. 3).

Таблица 3

Содержание NO (мкг/мл) в крови в тканях различных зон мозга у новорожденных здоровых и стрессированных крыс

	контроль	4 часа после стресса	24 часа после стресса
Кора больших полушарий	0,23±0,02	0,24±0,03	0,36±0,03*†
Мозжечок	0,27±0,03	0,26±0,01	0,32±0,02*†
Гиппокамп	0,22±0,04	0,22±0,06	0,31±0,05*†
Ствол мозга	0,20±0,03	0,21±0,02	0,28±0,02*†
Кровь	0,30±0,07	0,30±0,03	0,48±0,05*†

p<0.05: \* - относительно группы контроля, † - между группами

На следующий день, когда развивались интракраниальные геморрагии у стрессированных крыс, продукция NO возрастала от 18% ( $p < 0.05$ ) до 40% ( $p < 0.05$ ) в разных отделах мозга. Наиболее высокая концентрация NO (увеличение на 56%,  $p < 0.05$ ) отмечалась в коре больших полушарий, там, где развивались интракраниальные геморрагии у новорожденных крыс, и в крови. В крови содержание NO повышалось на 60% ( $p < 0.05$ ).

Несмотря на значительное количество имеющейся информации о роли NO в регуляции тонуса сосудов, остается непонятным, является ли повышенная активация системы генерации NO защитным механизмом или, напротив, представляет собой часть патологического процесса. За последние 15 лет в научной литературе выросло число публикаций, свидетельствующих о стресс-лимитирующих эффектах NO (Малышев, 1998; Манухина, 2000; Марков, 2001). С другой стороны, существуют данные, где показано, что развитие геморрагического стресса сопровождается повышением продукции NO за счет высокой экспрессии индуцибельной NO-синтазы (Kelly, 1997).

Таким образом, результаты исследования показали, что содержание NO как в тканях мозга, так и в крови возрастает только на этапе стресс-индуцированных процессов развития интракраниальных геморрагий. Этап прединсультного состояния не характеризуется значимыми изменениями в концентрации NO в мозге и крови. Этот факт свидетельствует о том, что активация системы генерации NO происходит как следствие, но не причина развития указанного состояния.

## **2.6 Изучение продукции бета-аррестина-1 - ко-фактора стрессорной активации адренорецепторов и кислородной сатурации тканей мозга как ключевых механизмов локальной регуляции сосудистого гомеостаза**

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 (Nara, 2011). Семейство белков бета-аррестина является ко-фактором в передаче возбуждения сосудистых адренорецепторов при их взаимодействии с адреналином. Гипоксия является ведущей причиной смертности от критических изменений в мозговом кровотоке, сопровождающей развитие интракраниальных геморрагий у новорожденных детей (Volpe, 2001). При этом, это также мощный стимулирующий фактор в синтезе бета-аррестина-1 (Lombardi, 2004). На основании этих данных решались задачи по изучению корреляции в изменении кислородной сатурации тканей мозга в условиях стресс-индуцированного развития интракраниальных геморрагий и синтезе бета-аррестина-1.

Содержание бета-аррестина-1 измеряли в мозговой ткани и крови в следующих группах: 1) контроль ( $n=10$ ); 2) прединсульт (1ч после стресса,  $n=10$ ); 3) прединсульт (4ч после стресса,  $n=10$ ); 4) прединсульт (8ч после стресса,  $n=10$ ); 5) постинсульт (24ч после стресса,  $n=15$ ).

Кислородную сатурацию ( $SpO_2$ ) изучали на 10 новорожденных крысах в тех же временных промежутках. Каждая крыса являлась контролем для себя.

Результаты проведенных экспериментов показали, что существенное падение сатурации наступало уже через час после отмены запредельного стресса. В норме  $SpO_2$  составляла  $93,75 \pm 0,77\%$  через 1 час после отмены стресса данный показатель снижался 13,4% ( $80,35 \pm 2,52\%$ ), через 4 часа на 18,7% относительно базальных значений ( $75,03 \pm 3,28\%$ ), через 8 часов на 28% ( $66,83 \pm 1,53\%$ ). Через сутки после стрессорного воздействия уровень сатурации оставался без изменений по сравнению с прединсультным состоянием, наблюдаемым через 8 часов после стресса ( $69,23 \pm 1,49\%$  против  $66,83 \pm 1,53\%$ ).

Результаты проведенного эксперимента показали, что кислородная сатурация снижается на фоне стресс-индуцированных патологических изменений мозгового кровотока. Причем гипоксия предшествует развитию интракраниальных геморрагий, что дает основание судить о ее ведущей роли в механизмах развития сосудистых катастроф на фоне стресса. Предполагается, что снижение мозгового кровотока, вызванное нарушением регуляции тонуса церебральных сосудов после интракраниальных геморрагий приводит к ухудшению оксигенации тканей мозга (Hoffman, 2000).

Результаты исследований выявили положительную корреляцию между развитием гипоксии в мозге на фоне стресс-индуцированных интракраниальных геморрагий у новорожденных крыс и повышением продукции бета-аррестина-1 в тканях мозга и крови (рис. 7). 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.

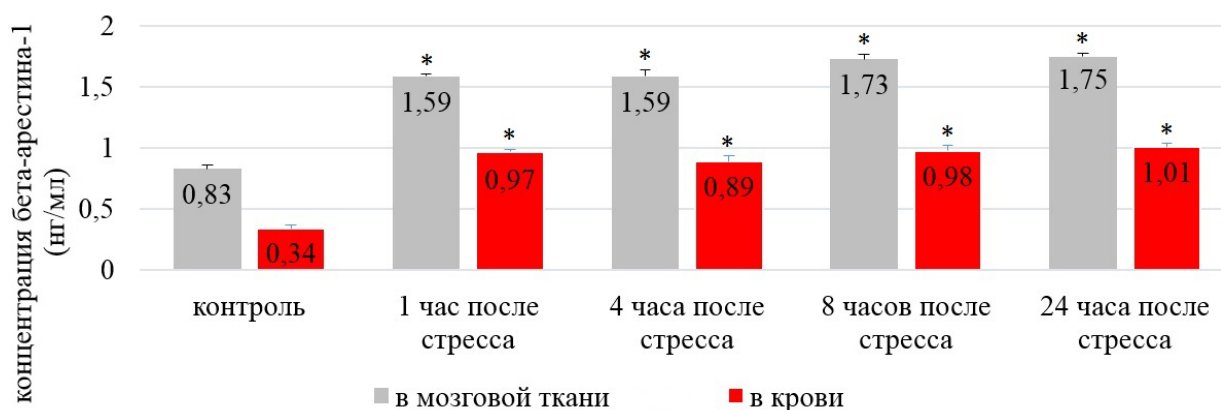


Рисунок - 7 Концентрация бета-аррестина-1 в крови и тканях головного мозга у здоровых и стрессированных новорожденных крыс; \* -  $p < 0,05$  по сравнению с контролем

В целом, результаты исследования данной серии экспериментов показали, что гипоксия и сопровождающая этот процесс 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, дают основание заключить об их важной прогностической значимости.

Полученные результаты согласуются с данными других исследователей, которые показали, что гипоксия является сильным стимулирующим фактором в синтезе бета-аррестина-1 (Lombardi, 2004). В ряде работ установлена высокая экспрессия мембранного G-белка, функционально связанного с бета-аррестином-1 и косвенно отражающего активность последнего при таких патологиях, как гипотензия (Gros, 1997), острая сердечная недостаточность (Ungerer, 1993), сердечная гипертрофия (Rockman, 1998).

## **ВЫВОДЫ**

1. Звуковое воздействие (120 дБ, 17Гц) является запредельным стрессом, вызывающим развитие интракраниальных геморрагий в коре и подкорковых структурах мозга у новорожденных крыс с латентным периодом, сроком 24 часа. Топография и время развития геморрагического инфаркта мозга у новорожденных крыс максимально приближено к естественной клинической картине указанной патологии. В силу отсутствия адекватных экспериментальных моделей по изучению механизмов, предшествующих стресс-индуцированному инфаркту мозга у новорожденных детей, модель звукового стресса у новорожденных крыс является новым и единственным методом, позволяющим изучать прединсультное состояние и процессы, сопровождающие его. Выделены две критические точки стресс-индуцированных поражений сосудов мозга у новорожденных крыс: начальные этапы изменения церебральной гемодинамики (прединсульт, 4 часа после стресса) и процессы развития интракраниальных геморрагий (постинсульт, 24 часа после стресса).

2. Стресс-реактивность церебральных вен выше, чем артерий и сосудов микроциркуляторного русла у новорожденных крыс. Начальные этапы стресс-индуцированных поражений мозга (прединсультное состояние) сопровождаются релаксацией сагиттального синуса (коллектор венозной крови со всех церебральных вен) и снижением скорости потока крови в нём, что свидетельствует о развитии венозной недостаточности и нарушении оттока крови из головного мозга. Церебральные артерии и сосуды микроциркуляции не изменяются в этот период наблюдения. Указанные патологические сдвиги в венозной гемодинамике прогрессируют на этапе развития интракраниальных геморрагий (постинсультное состояние), что сопровождается появлением кровенаполнения сосудов микроциркуляторного русла. Эти результаты позволяют заключить, что релаксация церебральных вен на фоне снижения скорости потока крови в них, лежащая в основе развития венозной недостаточности и нарушения оттока крови из головного мозга, является системным маркером риска развития стресс-индуцированных сосудистых катастроф в мозге на примере интракраниальных геморрагий у новорожденных крыс.

3. Стресс-индуцированная релаксация сагиттального синуса, предшествующая и сопутствующая развитию интракраниальных геморрагий у новорожденных крыс, сопровождается вазорелаксацией сосуда в ответ на введение адреналина и высокой чувствительностью к изопротеренолу, стимулирующему адренергические механизмы вазорелаксации за счет активации  $\beta_2$ -адренорецепторов. Эти данные позволяют сделать вывод о том, что в условиях стресса адренергические механизмы вазорелаксации, реализуемые через гуморальную (адреналин) активацию сосудистых неиннервируемых  $\beta_2$ -адренорецепторов, играют важную роль в критических изменениях венозной гемодинамики, сопровождающих интракраниальные геморрагии в первые дни после рождения.

4. Стресс-индуцированное повышение синтеза оксида азота в мозге и в крови сопровождает критические изменения в мозговом кровотоке только на стадии постинсульта, но не в начальные стадии патологических изменений в церебральных сосудах, предшествующих интракраниальным геморрагиям у новорожденных крыс. Это позволяет предположить, что высокая активность NO-ергической системы в этих условиях является следствием, но не причиной стресс-индуцированных нарушений мозгового кровотока.

5. Чувствительность сагиттального синуса к фармакологической активации сосудистых  $\beta_2$ -адренорецепторов существенно увеличивается на фоне стресс-индуцированного поражения церебральных сосудов при развитии интракраниальных геморрагий у новорожденных крыс. Однако, экспрессия  $\beta_2$ -адренорецепторов не изменяется на стадиях пред- и постинсульта. Но, уже в прединсультном состоянии существенно возрастает в мозге и крови продукция бета-аррестина-1 - ко-фактора стрессорной активации  $\beta_2$ -адренорецепторов. Эти данные свидетельствуют о том, что бета-аррестин-1 является важным молекулярным механизмом критических сдвигов в венозной гемодинамике при развитии стресс-индуцированного инсульта мозга, и его продукция может использоваться в качестве прогностического маркера риска появления сосудистых мозговых катастроф в первые дни после рождения.

### **Список работ, опубликованных по теме диссертации**

#### **Статьи в ведущих научных изданиях, рекомендованных ВАК РФ**

1. Sindeeva O. Optical monitoring of stress-related changes in the brain tissues and vessels associated with hemorrhagic stroke in newborn rats / O.Semyachkina–Glushkovskaya, A.Pavlov, J. Kurths, E. Borisova, A. Gisbrecht, O. Sindeeva, A. Abdurashitov, A. Shirokov, N. Navolokin, E. Zinchenko, A. Gekalyuk, M. Ulanova, D. Zhu, G. Luo, V. Tuchin // *Biomedical Optics Express*. – 2015. – Vol. 6, №. 10. – DOI:10.1364/BOE.6.004088.

2. Sindeeva O.A. Cerebral blood flow monitoring using histogram analysis of laser speckle contrast image / A.S. Abdurashitov, V.V. Lychagov, O.A Sindeeva, O.V. Semyachkina–Glushkovskaya, V.V. Tuchin // *Frontiers of Optoelectronics*. – 2015. – P.12200–015–0493–z.

3. Sindeeva O.A. Characterizing cerebrovascular dynamics with the wavelet-based multifractal formalism / A.N. Pavlov, A.S. Abdurashitov,

O.A. Sindeeva, S.S. Sindeev, O.N. Pavlova, G.M. Shihalov, O.V. Semyachkina–Glushkovskaya // *Physica A.* – 2015. – P. 1–7.

4. Sindeeva O.A. Changes in the cerebral blood flow in newborn rats assessed by LSCI and DOCT before and after the hemorrhagic stroke / O.V. Semyachkina–Glushkovskaya, V.V. Lychagov, A.S. Abdurashitov, O.A. Sindeeva, S.S. Sindeev, E.M.Zinchenko, E.I. Kajbeleva, A.N. Pavlov, M. Kassin, V.V. Tuchin // *Proc. SPIE 9305, Optical Techniques in Neurosurgery, Neurophotonics, and Optogenetics II.* – 2015. – P. 93051D.

5. Синдеева О.А. Роль сульфонилмочевинных рецепторов в развитии стресс–индуцированного геморрагического инфаркта мозга у новорождённых крыс / О.В. Семячкина–Глушковская, А.С. Гекалюк, О. А. Синдеева, А.С. Абдурашитов, В.В. Лычагов // *Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия Химия. Биология. Экология.* – 2015 – Т. 15, Вып. 2, – С. 80–86.

6. Sindeeva O.A. Cerebral venous dynamics in newborn mice with intracranial hemorrhage studied using wavelets / A.N. Pavlov, O.V. Semyachkina–Glushkovskaya, O.A. Sindeeva, O.N. Pavlova, E.P. Shuvalova, Q. Huang, D. Zhu, V.V. Tuchin, Q. Luo // *Proc. SPIE.* – 2015. – Vol. 9322. – P. 932214–1 – 932214–5.

7. Bibikova O.A. Detrended fluctuation analysis of cerebral venous dynamics in newborn mice with intracranial hemorrhage / A.N. Pavlov, O.V. Semyachkina–Glushkovskaya, O.A. Bibikova, O.N. Pavlova, Y.K. Mohammad, Q. Huang, D. Zhu, P. Li, V.V. Tuchin, Q. Luo // *Proc. SPIE 9448, Saratov Fall Meeting 2014: Optical Technologies in Biophysics and Medicine XVI; Laser Physics and Photonics XVI; and Computational Biophysics.* – 2015. – P. 94481I.

8. Bibikova O.A. Wavelet–based analysis of cerebrovascular dynamics in newborn rats with intracranial hemorrhages / A.N. Pavlov, A.I. Nazimov, O.N. Pavlova, V.V. Lychagov, V.V. Tuchin, O.A. Bibikova, S.S. Sindeev, O.V. Semyachkina–Glushkovskaya // *Journal of Innovative Optical Health Sciences.* – 2014. – Vol. 7, №. 1. – P. 1350055 – 1350065.

9. Bibikova O.A. Multiresolution analysis of pathological changes in cerebral venous dynamics in newborn mice with intracranial hemorrhage: adreno-related vasorelaxation / A.N. Pavlov, O.V. Semyachkina–Glushkovskaya, Y. Zhang, O.A. Bibikova, O.N. Pavlova, Q. Huang, D. Zhu, P. Li, V.V. Tuchin, Q. Luo // *Physiological measurement.* – 2014. – Vol. 35. – P. 1983–1999.

10. Bibikova O.A. Optical imaging of intracranial hemorrhage in newborns: modern strategies in diagnostics and direction for future research / A.N. Pavlov, O.V. Semyachkina–Glushkovskaya, O.A. Lychagov, O.A. Bibikova, S.S. Sindeev, O.N. Pavlova, E.P. Shuvalova, V.V. Tuchin // *Proc. SPIE.* – 2014. – Vol. 9129. – P. 91290P–1 – 91290P–5.

11. Бибикина О.А. Характеристика патологических изменений мозгового кровотока при развитии инсульта у гипертензивных крыс с помощью оптической когерентной томографии / С.С. Синдеев, В.В. Лычагов, О.А. Бибикина, М.В. Уланова, А.С. Гекалюк, В.И. Разубаева, И.М. Агранович, Л. Аль Хассани, Ф. Аль–Фатле, В.В. Тучин, О.В. Семячкина–Глушковская // *Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия Химия. Биология. Экология.* – 2014. – Т. 14, Вып. 3. – С. 76–80.

12. Bibikova O.A. The experimental study of stress–related pathological changes in cerebral bloodflow in newborn rats assessed by DOCT / O.V. Semyachkina–Glushkovskaya, V.V. Lychagov, O.A. Bibikova,

I.A. Semyachkin–Glushkovsky, S.S. Sindeev, E.M. Zinchenko, M.K. Mohhanad, F. Al–Fatile, L. Al Hassani, M.V. Ulanova, V.V. Tuchin // Journal of Innovative Optical Health Sciences. – 2013. – Vol. 6, № 3. – P. 1350023–1350033.

13. Bibikova O.A. The assessment of pathological changes in cerebral blood flow in hypertensive rats with stress induced intracranial hemorrhage using Doppler OCT: Particularities of arterial and venous alterations / O.V. Semyachkina–Glushkovskaya, V.V. Lychagov, O.A. Bibikova, I.A. Semyachkin–Glushkovsky, S.S. Sindeev, E.M. Zinchenko, M.K. Mohhanad, H.A. Braun, F. Al–Fatile, L. Al Hassani, V.V. Tuchin // Photonics & Lasers in Medicine. – 2013. – P. 109116.

#### **Патент**

14. Бибикова О.А. Способ моделирования развития мелкоочаговых мозговых геморрагий в коре головного мозга у новорожденных крыс / О.В. Семьячкина–Глушковская, В.В. Тучин, И.А. Семьячкин–Глушковский, О.А. Бибикова, Т.Г. Анищенко, С.С. Синдеев, Е.М. Зинченко, М. Кассим, Ф. Аль–Фатле, Л.Аль Хассани // Патент на изобретение № 2505865 зарегистрировано 27.01.2014 г. Заявка на патент № 2012145191/14 от 24.10.2012 г. Срок действия до 24.10 2032 г

#### **Статьи в сборниках материалов международных и российских научных конференций**

15. Sindeeva O. Pathological changes in the regulation of cerebral blood flow in adult and newborn rats under stress–inducing hemorrhagic stroke / O. Sindeeva // Poster Supplement, 27th International Symposium on Cerebral Blood Flow, Metabolism and Function, June 27–30, 2015, Vancouver, Canada. – № 204.

16. Sindeeva O.A. reproducible model of stress–induced neonatal hemorrhagic stroke in rat / O. Semyachkina–Glushkovskaya, O. Sindeeva, S. Sindeev, E. Zinchenko, A. Gekalyuk, M. Ulanova, I. Agranovich // Poster Supplement, 27th International Symposium on Cerebral Blood Flow, Metabolism and Function, June 27–30, 2015, Vancouver, Canada. – № 048.

17. Sindeeva O. Effect of adrenaline on cerebral blood flow in healthy rats and rats with intracranial hemorrhage / E. Zinchenko, O. Semyachkina–Glushkovskaya, O. Sindeeva, M. Kassim // Poster Supplement, 27th International Symposium on Cerebral Blood Flow, Metabolism and Function, June 27–30, 2015, Vancouver, Canada. – № 410.

18. Бибикова О.А. Патологические стресс–индуцированные изменения в церебральном венозном кровотоке у новорождённых крыс / О.А. Бибикова, Ф. Аль–Фатле, Л. Ал Хассани, О.В. Семьячкина–Глушковская // Сборник статей пятой международной научно–практической конференции «Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине». – 2013. – Т. 1. – С. 21–23.

19. Bibikova O. The experimental study of stress–related pathological changes in cerebral venous blood flow in newborn rats assessed by DOCT / O. Semyachkina–Glushkovskaya, V. Lychagov, O. Bibikova, S. Sindeev, I. Semyachkin–Glushkovsky // Book of Abstracts, 11th International Conference on Photonics and Imaging in Biology and Medicine, May 26–29, 2013, Wuhan, P.R. China. – P. 47.