

Министерство образования и науки Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования
«Саратовский национальный исследовательский
государственный университет имени Н.Г. Чернышевского»

На правах рукописи



ЗИНЧЕНКО ЕКАТЕРИНА МИХАЙЛОВНА

**ВЛИЯНИЕ ГИПОКСИИ НА СТРЕСС-УСТОЙЧИВОСТЬ
ЦЕРЕБРАЛЬНЫХ СОСУДОВ И БАРЬЕРНУЮ ФУНКЦИЮ
МОЗГА У НОВОРОЖДЕННЫХ КРЫС**

03.03.01 – физиология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

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

Саратов 2017

| | |
|--|----|
| ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ | 4 |
| ВВЕДЕНИЕ | 5 |
| ГЛАВА I ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ | 12 |
| 1.1 Церебральная гипоксия и ее причины возникновения | 12 |
| 1.2 Гипоксия как фактор нарушения церебрального кровотока в неонатальный период развития | 22 |
| 1.3 Влияние церебральной гипоксии и нарушений мозгового кровотока на проницаемость ГЭБ | 28 |
| 1.4 Изменения клеток коры головного мозга под действием низкой кислородной сатурации | 32 |
| ГЛАВА II МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ | 36 |
| 2.1 Объект исследования | 36 |
| 2.2 Методы исследования | |
| ГЛАВА III РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ | 36 |
| 3.1 Изучение роли гипоксии в устойчивости церебральных сосудов к повреждающему воздействию стресса и развитию интракраниальных геморрагий в первые дни после рождения | 50 |
| 3.2 Исследование влияния гипоксии на стресс-реактивность церебральных сосудов у новорожденных крыс | 56 |
| 3.3 Изучение вклада стресс-индуцированного нарушения кислородного снабжения тканей мозга и его кровообращения на барьерную функцию мозга новорожденных крыс | 62 |
| 3.4 Изучение механизмов нарушения барьерной функции мозга в условиях стресс-индуцированного развития гипоксии и интракраниальных геморрагий у новорожденных крыс | 71 |
| 3.5 Исследование последствий воздействия стресс- индуцированного развития гипоксии и интракраниальных геморрагий на состояние коры больших полушарий у новорожденных крыс | 76 |

| | |
|--|----|
| ГЛАВА IV ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ | 81 |
| ВЫВОДЫ | 90 |
| СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | 92 |

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ

ГЭБ – гематоэнцефалический барьер

ДОКТ – доплеровская оптическая когерентная томография

МДА – малоновый диальдегид

МРА – магнитно-резонансная ангиография

МРТ – магнитно-резонансная томография

НИРС – ближняя инфракрасная спектроскопия

ПОЛ – перекисное окисление липидов

ПЦР – полимеразно-цепная реакция

ЦНС – центральная нервная система

eNOS – эндотелиальная NOS

LSCI – лазерная спекл-визуализация

nNOS – нейронная NOS

NO – оксид азота

NOS – NO- синтазы

PaO₂ – парциальное давление кислорода в артериальной крови

PaCO₂ – парциальное давление углекислого газа в артериальной крови

SpO₂ – насыщение кислородом артериальной крови

SvjO₂ – кислородная сатурация венозной крови мозга

SWI – susceptibility weighted imaging – изображения, взвешенные по неоднородности магнитного поля

ВВЕДЕНИЕ

Одним из основных факторов, определяющих комплекс физиологических и патофизиологических изменений в неонатальный период является стресс, с которым сталкиваются новорожденные дети во время эмбрионального развития из-за различных негативных состояний беременной женщины в период родов и в первые дни после рождения (Карасева, 2005; Потребич, 2009). В результате стресса возникают бессимптомные геморрагии с отсутствием явных признаков сосудистой патологии (Whitby, 2004; Looney, 2007; Gupta, 2009; Semyachkina-Glushkovskaya et al., 2016). Последствия таких нарушений проявляются в когнитивной дисфункции и снижении физической работоспособности (Fischer et al., 1999; 2000; Зарубина и Павлова, 2007; Латышева и Лемешков, 2008; Раимкулов, 2014).

Известно, что родовой стресс может быть причиной развития церебральной гипоксии, которая сопровождает развитие стресс-индуцированных мозговых кровоизлияний (Shankaran, 2000; Thoresen et al., 2001; Иржак и др., 2011; Созаева и Бержанская, 2014; Alderliesten et al., 2013; Hsieh et al., 2016). Однако, взаимосвязь между гипоксией, стрессом и устойчивостью церебральных сосудов к развитию интракраниальных геморрагий остается неизвестной. Поэтому актуальным является изучение кислородной сатурации тканей мозга при развитии стресс-индуцированных интракраниальных геморрагий у новорожденных.

Важно отметить, что изменения в кислородной сатурации тканей мозга, особенно снижение кислорода в артериальной крови, оказывает влияние на церебральный кровоток (Tomiyama et al., 1999; Sanborn et al., 2014; Semyachkina-Glushkovskaya et al., 2015, 2016). Так, М.-С. Hsieh на модели ишемического инсульта у половозрелых крыс обнаружил существенное снижение значения кислородной сатурации венозной крови мозга (Sv_jO_2). Е. Mc Connell на взрослых мышцах с субарахноидальным кровоизлиянием показал капиллярную дисфункцию, которая сопровождалась тяжелой гипоксией мозга и гибелью нейронов (McConnell et al., 2015). Однако, вопрос, какое воздействие оказывает

гипоксия на устойчивость церебральных сосудов к повреждениям, предшествующим «мозговым катастрофам», остается малоизученным и актуальным для детальных исследований.

Обмен веществ между кровью и тканями мозга обеспечивается гематоэнцефалическим барьером (ГЭБ), который представляет собой подвижную морфофункциональную структуру (Hawkins et al, 2005; Чехонин и др., 2012; Blinov and Terent'ev, 2013; van der Meer et al., 2015). ГЭБ является важным показателем сосудистого гомеостаза, определяющим устойчивость клеток мозга к повреждающему воздействию стресса. В настоящее время существует множество работ по направлению изучения барьерной функции мозга *in vivo* и *in vitro* (Чехонин и др., 1989, 2000, 2003; Babu et al., 1994; Eng et al., 1994; Gasse et al., 1995; Abel et al., 2000; Блинов, 2004; Кувачева и др., 2013). Установлено, что на фоне различных патологических процессов, таких как мозговые геморрагии, барьерная функция мозга может нарушаться. Так, в ряде работ, выполненных на животных и людях, была обнаружена высокая проницаемость ГЭБ в пост-геморрагический период (Hamann et al., 1995; Dirnagl et al., 1999; Kirsch et al., 2001; Wolburg et al., 2005; Deli et al., 2005; Hall et al., 2014; Zhao et al., 2015). Но важно отметить, что, в основном, все исследования ГЭБ выполнены на взрослых, а не новорожденных. На данный момент функциональное состояние ГЭБ у новорожденных крыс было отображено только в одной известной нам работе D. Fernández-López при развитии ишемического инсульта, в которой отмечалось, что устойчивость ГЭБ в таких условиях выше у новорожденных, чем у взрослых животных (Fernández-López, 2012). Это делает необходимым изучение изменений в барьерной функции мозга в первые дни после рождения с целью лучшего понимания роли изменений в проницаемости ГЭБ в стресс-устойчивости церебральных сосудов.

Во многих экспериментальных и клинических работах показано, что интракраниальные геморрагии на фоне церебральной гипоксии в неонатальный период сопровождаются необратимыми последствиями в функциях центральной

нервной системы. Однако, каковы механизмы, лежащие в основе этих патологических изменений, остаются малоизученными и актуальными для углубленного изучения.

Вышеизложенное определило цель и задачи исследования.

Целью исследования явилось изучение роли гипоксии в устойчивости церебральных сосудов в первые дни после рождения к стрессу и повреждениям ГЭБ в этих условиях у новорожденных крыс.

Задачи исследования:

1. Изучить роль гипоксии в устойчивости церебральных сосудов к повреждающему воздействию стресса и развитию интракраниальных геморрагий в первые дни после рождения на основе применения пульсоксиметрии и метода МРТ в SWI режиме.

2. Исследовать влияние гипоксии на стресс-реактивность церебральных сосудов у новорожденных крыс с помощью лазерной спекл-визуализации и оптической когерентной томографии.

3. Выявить вклад стресс-индуцированного нарушения кислородного снабжения тканей мозга и его кровообращения на барьерную функцию мозга новорожденных крыс по показателям проницаемости ГЭБ с применением флуоресцентных сосудистых маркеров и методов конфокальной и двух-фотонной микроскопии, флуориметрии и гистологического анализа.

4. Изучить механизмы нарушения барьерной функции мозга в условиях стресс-индуцированного развития гипоксии и интракраниальных геморрагий у новорожденных крыс с применением метода флуоресцентной гибридизации ДНК *in situ*.

5. Установить последствия воздействия стресс-индуцированного развития гипоксии и интракраниальных геморрагий на состояние коры больших полушарий у новорожденных крыс на основе гистологического анализа морфологии молекулярного слоя коры, а также числа и диаметра пирамидальных нейронов.

Научная новизна

Впервые в экспериментах на новорожденных крысах показано, что стресс провоцирует развитие церебральной гипоксии, которая сопровождается выраженными сдвигами в мозговом кровотоке. Получены новые данные о том, что стресс-индуцированная гипоксия в неонатальный период и связанные с ней нарушения церебральной гемодинамики у новорожденных крыс являются важными механизмами, лежащими в основе стресс-устойчивости сосудов мозга. Степень выраженности этих изменений коррелирует с устойчивостью сосудов мозга к развитию интракраниальных геморрагий. Впервые установлено, что нарушение проницаемости гематоэнцефалического барьера за счет увеличения экспрессии структурных белков является также важным механизмом, отражающим устойчивость сосудов мозга к развитию церебральной гипоксии и нарушению мозгового кровотока. Три взаимосвязанных фактора, такие как стресс, гипоксия и мозговые геморрагии, определяют степень нарушения барьерной функции мозга. Важным новым результатом явился тот факт, что стресс-индуцированное снижение церебрального снабжения кислородом и нарушение мозговой гемодинамики на фоне ослабления барьерной функции мозга приводят к необратимым патологическим изменениям в нейронах коры больших полушарий, отвечающих за когнитивные функции организма.

Научно-практическая значимость

Результаты исследований, представленные в диссертационной работе, значительно расширяют научные представления о роли стресса и церебральной гипоксии в устойчивости сосудов мозга к повреждениям в неонатальный период развития. Важным моментом является тот факт, что церебральная гипоксия оказывает существенное влияние на морфологическое состояние зон коры головного мозга, ответственных за мыслительную функцию, необратимые поражения которых ведут к когнитивным нарушениям. Таким образом, оценка

насыщения артериальной крови кислородом в первые дни жизни может помочь избежать патоморфологических изменений в центральной нервной системе, а также предотвратить развитие «сосудистых катастроф», учитывая, что гипоксия предшествует стресс-индуцированным кровоизлияниям в мозге.

Тот факт, что вены являются более чувствительным компонентом церебральной гемодинамики к гипоксии, чем сосуды микроциркуляторного русла, может служить важным прогностическим маркером в период предшествующий развитию мозговых кровотечений у новорожденных в первые дни жизни.

Нарушение барьерной функции мозга в пред-геморрагический период на фоне умеренной гипоксии и выраженных изменений со стороны венозного компонента церебральной гемодинамики имеет важное значение, так как в этот период возможна фармакологическая коррекция вышеуказанных патологических нарушений у новорожденных детей с учетом, что ГЭБ становится «открытым» как для низко-, так и высокомолекулярных соединений.

Положения, выносимые на защиту

1. Стресс играет пусковую роль в развитии церебральной гипоксии, интенсивность развития которой определяет устойчивость к развитию интракраниальных геморрагий и необратимых последствий в коре больших полушарий в первые дни после рождения.

2. Степень стресс-индуцированного развития гипоксии в венозной и артериальной системе кровообращения мозга определяют профиль патологических изменений кровотока мозга в неонатальный период развития.

3. Венозный, но не микроциркуляторный компонент церебральной гемодинамики чувствительно отражает начальные стресс-индуцированные изменения в кислородном снабжении мозга и проницаемости гематоэнцефалического барьера, что является важными механизмами и системными маркерами риска развития интракраниальных геморрагий в первые дни после рождения.

Апробация работы

Результаты исследования были представлены 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.); на 3-м международном симпозиуме по оптике и биофотонике Saratov Fall Meeting 2015 г. (Саратов, Россия, 21 – 25 сентября, 2015 г.); на 5-й всероссийской неделе науки с международным участием (Саратов, Россия, 4 – 7 апреля, 2016 г.); на 17-ой международной конференции «Лазерная оптика 2016» (Санкт-Петербург, Россия, 27 июня – 1 июля, 2016 г.); на 10-м FENS Форум по нейронаукам (Копенгаген, Дания, 2 – 6 июля, 2016 г.); на 4-м международном симпозиуме по оптике и биофотонике Saratov Fall Meeting 2016 г. (Саратов, Россия, 26-30 сентября, 2016 г.). Материалы диссертации докладывались и обсуждались на открытом заседании кафедры физиологии человека и животных федерального образовательного учреждения высшего образования «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского».

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 18 научных работ, в том числе рекомендованных ВАК РФ – 10, 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 117 страница с

25 рисунками и 2 таблицами. Список цитированной литературы включает 235 источников, в том числе 92 отечественных и 143 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 № 14.Z.56.14.2216-МД , 2014 – 2015 гг.; грант РНФ Соглашение № 14-15-00128, 2014 – 2016 гг., грант РФФИ № 14-02-00526-14, 2014-2016 гг.; грант РНФ № 16-15-10252, 2016 – 2018 гг. В совместных публикациях вклад автора составил 50–70%.

ГЛАВА I

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Церебральная гипоксия и ее причины возникновения

Несмотря на относительно небольшой размер по отношению ко всему организму, мозг требует около 20% от всего кислорода, поступающего в кровь при вдохе. При этом мозг не имеет запасов кислорода, поэтому постоянно нуждается в его поступлении (Блум и др., 1988; Никифоров и Гусев, 2013). Весь запас кислорода, который поступает в мозг с кровью, потребляется нервными клетками за 1 с, а за 1 мин в состоянии покоя человеку необходимо 60–70 новых порций насыщенной кислородом крови (Потапов и др., 2003). Общее потребление мозгом кислорода, то есть скорость церебрального метаболизма кислорода, составляет 3,3–3,5 мл/100 г/мин. Таким образом, головной мозг в минуту потребляет около 45 мл кислорода (Никифоров и Гусев, 2013). У детей эта величина существенно больше по сравнению со взрослыми и составляет 65–95 мл на 100 г ткани головного мозга (Гельфанд и Салтанов, 2011).

Известно, что снижение поступления кислорода имеет последствия, отражающиеся на морфологическом и функциональном состоянии мозга. Так, 8–12 с без кислорода приводят к резким изменениям в тканях мозга, сопровождающиеся потерей сознания. При отсутствии достаточного поступления кислорода в мозг уже через 20–30 с наступают необратимые явления в его тканях, исчезает активность коры головного мозга и человек впадает в кому. Через 2–3 мин после полного прекращения снабжения кислородом в коре возникают очаги некроза (Miyamoto and Auer, 2000; Новиков и Катунина, 2002).

Это связано с тем, что кислород играет ключевую роль в процессах окислительного фосфорилирования, то есть в синтезе АТФ. Таким образом, дефицит кислорода вызывает нарушение процессов, протекающих в нервной ткани, которые зависят от энергии АТФ: работа мембранных насосов, транспортирующих ионы против градиента, синтез медиаторов и

высокомолекулярных соединений – ферментов, рецепторов для гормонов и медиаторов, нормальном протекании процессов возбуждения и передачи нервного импульса (Арабова и др., 2012).

Парциальное давление кислорода в артериальной крови (P_{aO_2} , мм рт.ст.) является обязательным физическим фактором насыщения гемоглобина кислородом. Так, степень связывания гемоглобина с кислородом находится в прямой зависимости от парциального давления кислорода в крови. В свою очередь, парциальное давление кислорода в артериальной крови зависит от парциального давления кислорода во вдыхаемом воздухе, диффузной способности лёгких и взаимного распределения вентиляции и кровотока в лёгочной ткани (Лешкова и др., 2012). Чем меньше кислорода связано с гемоглобином, тем большая часть его молекул находится в конформации T, которая характеризуется сниженным сродством к кислороду. И наоборот, чем больше гемоглобин оксигенирован, тем больше его молекул находится в конформации R, которая обладает значительным сродством к кислороду (Иржак, 2013). Нарушение доставки кислорода к тканям при его потреблении связано с развитием тканевой гипоксии и, как следствие, усилением процессов анаэробного окисления (Лукашев и др., 2010). В норме насыщение кислородом артериальной крови равно 96-98%.

В случае снижения кислорода в тканях запускается компенсаторный механизм, который направлен на увеличение выхода кислорода из артериальной крови, что отражается на снижении его содержания в венозной крови. Но важно отметить, что компенсаторный механизм истощается в критических состояниях, и потребление кислорода начинает зависеть от его доставки, что приводит к сценарию анаэробного метаболизма, в результате которого гликоген расщепляется до молочной кислоты. При этом образуется небольшое количество молекул АТФ. Помимо этого окисляется внутренняя среда организма молочной кислотой и другими недоокисленными метаболитами. Сдвиг pH еще более ухудшает условия работы высокомолекулярных структур, которые

функционируют в узком диапазоне рН и быстро теряют активность при увеличении концентрации H^+ -ионов (Арабова и др., 2012).

Таким образом, вследствие гипоксии происходит смена аэробного окисления глюкозы на анаэробное, результатом чего является накопление в тканях значительного количества лактата и некоторых других кислых продуктов обмена. Это приводит к повышению проницаемости капилляров, и значительному выходу циркулирующей плазмы за пределы сосудистого русла, обеспечивая уменьшение объема циркулирующей крови, или гиповолемию (Паршин и др., 2006). Так, изменения концентраций натрия и хлора, основных ионов внеклеточного пространства, приводят к резким нарушениям водного баланса, что вызывает дегидратацию или отек органов и тканей (Арабова и др., 2013).

Учитывая, что гипоксия представляет собой мощный стрессовый фактор, большинство исследователей показывают, что гипоксия, перенесенная в перинатальный период, провоцирует клеточную смерть, включая как апоптотический, так и некротический процессы, что зависит от типа клеток (Hitomi et al., 2004).

Известно, что апоптоз есть активный и высокорегулируемый процесс, чем отличается от некроза, и для его реализации необходимо взаимодействие различных молекул в определенной последовательности (Cande et al., 2002; Hausenlou and Yellon, 2003; Заднипряный и др., 2014). В результате клетка и ее ядро сморщиваются, фрагментируется ДНК, конденсируется хроматин и происходит формирование «апоптозных телец», которые представляют собой скопления конденсированного содержимого клетки, покрытые мембраной. В дальнейшем клетка претерпевает апоптоз, распадаясь на отдельные составляющие – «апоптозные тельца», которые затем фагоцитируются или деградируют, не приводя к воспалительной реакции (Залесский и др., 2003; Казначеева, 2004; Shen et al., 2005; Bialik et al., 2007).

В условиях гипоксии в клетке развивается следующая цепь событий:

- 1.Пониженное содержание кислорода приводит к нарушению синтеза АТФ.

2. Снижение содержания АТФ приводит к нарушению работы K^+/Na^+ -ионного насоса.

3. В результате происходит накопление ионов Na^+ и воды в клетке и ее органеллах, что выражается в набухании митохондрий (зернистая дистрофия), расширении цистерн шероховатого эндоплазматического ретикулума и набухании клетки (гидропическая дистрофия). Если на этом этапе восстановлено поступление кислорода, то вышеуказанные процессы обратимы, в противном случае наступают необратимые изменения (Vennekens and Nilius, 2007).

4. Открепление полирибосом от шероховатого эндоплазматического ретикулума и их диссоциация приводит к нарушению биосинтеза белка, включая ферменты, необходимые для жизнедеятельности клетки.

5. На фоне микроразрывов кариолеммы, сопровождающие набухание ядра, происходит выход части кариоплазмы в цитоплазму, что выражается в конденсации хроматина и складчатостью кариолеммы (кариопикноз).

6. Пикнотичное ядро распадается на глыбки (кариорексис).

7. В цитоплазму выходят ферменты из-за разрыва оболочек лизосом, переваривая остатки ядра (кариолизис) и других органелл (Cerbo et al., 2015).

Механизм развития гипоксемии обусловлен неспецифичностью и универсальностью при различных состояниях (Александрович, 2011). Даже небольшие нарушения работы легких и сердца постепенно приводят к развитию хронического недостатка кислорода в организме (гипоксии), которая отрицательно сказывается практически на всех органах и системах организма.

Гипоксическое состояние развивается вследствие нарушения доставки кислорода из внешней среды к клетке, в которой он участвует в процессах аэробного окисления с выработкой молекул АТФ (Скулачев, 2001; Луценко и Надточий, 2009). Одним из главных признаков гипоксии является снижение содержания АТФ, так как во всех жизненноважных процессах они принимают участие. Метаболические процессы клетки снижаются при участии внутриклеточного процесса окислительного фосфорилирования на 15-20%. Это имеет принципиальное значение для жизнедеятельности клетки в условиях

дефицита кислорода, так как энергетический обмен является мишенью для гипоксии (Лукьянова и др., 2000; Малышев и др., 2000; Геха и др., 2005).

Среди механизмов развития церебральной гипоксии выделяют три теории.

Церебральная гипотеза утверждает, что дефицит кислорода является пусковым механизмом «метаболических катастроф», а продукты нарушенного метаболизма непосредственно повреждают ткани мозга. Наступающие цереброваскулярные сдвиги обусловлены сбоями в механизмах ауторегуляции мозгового кровотока. Эта гипотеза также полагается на то, что мозговой кровоток непосредственно связан с метаболизмом мозга. При этом одна из предлагаемых схем нейрональных потерь такова: повреждение гематоэнцефалического барьера → нарушение метаболизма глюкозы (гексозомонофосфатный путь) → нарушение синтеза липидов и нуклеиновых кислот → снижение pH тканей (в перинатальном пространстве) → накопление молочной кислоты и повышения парциального давления углекислого газа в артериальной крови (P_aCO_2) → снижение артериального давления и скорости мозгового кровотока → нарушение гомеостаза кальция и снижение высокоэнергетических фосфатных соединений → повышение уровня лактата в тканях мозга → накопление жирных кислот (арахидоновой кислоты) → изменение проницаемости нейронов → гиперпродукция оксида азота (NO) → утрата церебральной ауторегуляции мозгового кровотока (Одинак и Цыган, 2005; Marro, 2007; Bassan, 2007; Созаева и Бержанская, 2014).

Глутаматная гипотеза основана на том, что асфиксия является активатором клеточных биохимических процессов и обуславливает непродолжительные или же продолжительные нарушения функции клеток, приводящее к их гибели. Это связывают с тем, что гипоксия и ишемия тканей мозга ведут к деполяризации нейронных мембран, нарушению ионного гомеостаза в клетках и изменениям энергетического метаболизма, что сопровождается повышенным выделением и сниженным повторным захватом нейротрансмиттеров, включая возбуждающую аминокислоту глутамат. Механизмы реализации этих процессов, по мнению последователей,

осуществляются через гиперстимуляцию глутаматных рецепторов и каскад внутриклеточных реакций (Volpe, 2005; Perlman, 2006). Особое значение в этой гипотезе придается накапливанию в мозге глутамата. Это объясняется тем, что на долю глутаматных рецепторов (α -метил-D-аспартат рецепторов) приходится около 80% синапсов и нейронов в коре и гиппокампе. Являясь основными возбуждающими факторами в мозге, они участвуют в интегративных процессах центральной нервной системы, регуляции сенсорной и моторной функций, дыхания и сердечно-сосудистой деятельности. Повреждение или гибель нейронов, согласно этой гипотезе, при токсическом воздействии глутамата сопровождается повышением комплекса Ca^{2+} и зависимых от него процессов. Это приводит к чрезмерной активности протеаз, киназ, эндонуклеаз и, как следствие, к изменениям генетического аппарата, фрагментации ДНК, необратимой деструкции внутриклеточных структур мембран. В свою очередь, повышенная концентрация внутриклеточного Ca^{2+} способствует усилению свободно-радикального окисления. Аномальное накопление кальция в нейронах объясняется при этом рядом причин: активацией ионных каналов через возбуждающую аминокислоту, уменьшением выхода свободного Ca^{2+} из эндоплазматического ретикула и ослаблением работы кальциевого «насоса». Повышенные «внутриклеточные» уровни Ca^{2+} способствуют гибели клеток из-за активации протеаз, липаз, протеинкиназы C, а также вследствие формирования свободных радикалов. Все перечисленные факторы оказывают синергическое действие и способны вызывать некроз клетки в течении нескольких минут или часов (Walgen, 2004). При этом нейрональные потери могут быть обусловлены не только некрозом, но и апоптозом. Разница состоит в том, что при дегенерации нейрона вследствие некроза морфологическая картина представлена явлениями отека и набухания, вакуолизацией, распадом и лизисом внутриклеточных его структур. При гибели нейронов вследствие апоптоза речь идет о запрограммированной клеточной смерти. Считается, что основная масса клеточных структур гибнет в результате апоптоза. Гибель нейрона осуществляется под контролем системы функционально связанных генов.

Исследователи утверждают, что помимо генов, провоцирующих процессы апоптоза, в нейронах функционируют и гены, предупреждающие и подавляющие их «смертный приговор» (своеобразная служба безопасности). Программа смерти, запускаемая «суицидными» генами реализуется через внутриклеточные белки p53, p54, получившие название «танантины». Принципиальным отличием гибели нейронов при некрозе и апоптозе является то, что процесс гибели нейронов путем апоптоза растянут во времени. В этой связи гипоксические повреждения мозга носят проградентный характер, а обнаружение психоневрологических дефектов на протяжении постнатального развития следует рассматривать как феномен отсроченных страданий (Самуилов, 2001; Chamnanvanakij et al., 2002; Фильченков и Каспазы, 20010; Гомазков, 2013; Созаева и Бержанская, 2014).

Гипотеза, связанная с гиперпродукцией оксида азота (NO). При повторных гипоксических воздействиях, в условиях хронической внутриутробной гипоксии плода, повышается устойчивость организма к последующей гипоксической атаке. Эту своеобразную «тренировку», повышающую адаптацию к гипоксии и ее следует рассматривать как чрезвычайно важный феномен самозащиты мозга. В этом механизме адаптации, как полагают, наиболее важную роль могут играть универсальные факторы регуляции таких физиологических систем, как нервная, эндокринная, сердечно-сосудистая, дыхательная, мышечная, а также экспрессия генов. Причем при адаптации к периодической гипоксии в органах и тканях происходят, как утверждают авторы, изменения экспрессии генов, кодирующих разные изоформы NO-зависимых реакций (Fukuda et al., 2006). В то же время в этом механизме участвуют ингибиторы NO- синтазы (NOS), препятствующие развитию адаптации к гипоксии. Очень существенно и то, что защитный эффект предварительной адаптации к периодически возникающей гипоксии может быть связан с механизмами ограничения апоптоза. Из этого логично вытекает, что при адаптации к гипоксии NO может выступать как фактор эндогенной защиты, ограничивающей клеточные повреждения, наступления и развитие апоптоза. Более того, NO может играть две прямо противоположные роли: активации процесса апоптоза и защиты от него.

NO-синтаза содержится в эндотелиальных клетках, астроцитах, нейронах. Существует 3 изоформы NOS: nNOS (нейронная NOS) регулирует синаптогенез и ремоделирование и зависит от Ca^{2+} , eNOS (эндотелиальная NOS) регулирует сосудистый тонус, особенно вазодилатацию, и зависит от Ca^{2+} , iNOS (индуцируемая NOS) присутствует в макрофагах и астроцитах, индуцируется цитокинами, независима от Ca^{2+} , NOS продуцирует свободный радикал NO^+ (Flison, 2000; Armengou et al., 2003; Созаева и Бержанская, 2014).

В норме существуют компенсаторные механизмы, направленные на улучшение мозгового кровообращения. Такие механизмы запускаются с целью восстановления или замещения структур и функций на фоне возникшего патологического процесса в результате нарушенного равновесия между системами, органами, тканями и клетками организма, либо вследствие нарушения равновесия организма с внешней средой.

В основе реакций адаптации к гипоксии лежит каскад регуляторно-компенсаторных процессов, которые происходят на разных уровнях организации и позволяют уменьшить эффект недостатка кислорода (Кривошеков и др., 2010).

Установлено, что на фоне гипоксии улучшается мозговое кровообращение. В основе этого процесса лежит не только стимулирование синтеза NO, но также метаболическая адаптация, клеточная пролиферация и увеличение плотности сосудов, которое наблюдается при адаптации к гипобарической гипоксии во многих органах, включая головной мозг, и наиболее выражено это в коре, стриатуме и гиппокампе (Крыжановский, 2002). В ходе адаптации усиливается биосинтез нуклеиновых кислот и белка в нейронах, увеличивается активность ферментов и возрастает количество митохондрий.

Происходит активизация различных по скорости и энергоемкости физиологических процессов энергопродукции и энергопотребления в нервных клетках. Об энергопродукции нейронов *in vivo* можно судить по динамике PaO_2 , а биоэлектрические потенциалы являются показателями энергопотребления: для нейронов. Также на фоне гипоксии в качестве адаптационного механизма увеличивается синтез мелатонина. Этот эффект связан со структурными

изменениями в эпифизе. Мелатонин сокращает повреждения нервных клеток, вызванные окислительными процессами, и стимулирует различные антиоксидантные ферменты. Таким образом, адаптация к гипоксии оказывает существенное влияние на центральную нервную систему, центральную гемодинамику, микроциркуляцию крови в различных органах, кислородный метаболизм, свободнорадикальное окисление липидов, основные ферменты детоксикационных систем и иммунитет (Лифшиц и Сидельникова, 2004).

Нормой сатурации артериальной крови считаю 95-100%, а венозной – 75%. При 94% развивается гипоксия и требуются меры по ее предотвращению, менее 90% – ситуация критическая, пациент нуждается в экстренной медицинской помощи.

При этом компенсаторные реакции при гипокситерапии направлены в основном на:

1. Снижение артериальной гипоксемии и удержание скорости поступления кислорода в легкие и альвеолы на уровне, близком к нормоксическому, за счет увеличения минутного объема дыхания, повышения доли альвеолярной вентиляции, возрастания диффузионной способности легких, уменьшения шунтирования крови в легких.

2. Увеличение скорости массопереноса кислорода артериальной кровью от легких к тканям путем повышения кислородной емкости крови и объемного кровотока.

3. Обеспечение клеток необходимым количеством кислорода путем усиления микроциркуляции крови в тканях, укорочения расстояния диффузии кислорода из крови микрососудов в клетки и увеличения запасов кислорода за счет прироста содержания миоглобина в мышцах.

4. Повышение способности утилизировать кислород путем увеличения количества митохондрий, их дыхательных ансамблей, активности дыхательных ферментов и антиоксидантной системы (Солкин и др., 2012).

Учитывая, что мозг ребенка еще только развивается, он очень чувствителен к кислородному содержанию в крови. В случае гипоксии включается ряд

защитных механизмов, направленных на компенсацию недостатка кислорода. Так, увеличивается уровень потребления кислорода у новорожденных и грудных детей за счёт увеличения сердечного индекса на 30–60%. Фетальный гемоглобин, который присутствует во время внутриутробного развития и первые три месяца после рождения, не способен столь же эффективно доставлять кислород к тканям, как нормальный гемоглобин. У новорожденных выше концентрация гемоглобина (17 г/мл) и больше объем крови. Эти факторы вместе с увеличенным сердечным выбросом компенсируют сниженный уровень диссоциации оксигемоглобина в тканях (Потапов и др., 2003; Никифоров и Гусев, 2013).

Хроническая внутриутробная гипоксия является одной из основных причин наиболее распространенных нозологических форм перинатальной патологии (Софронов и др., 2010). Ребенок до рождения находится в условиях ограниченного обеспечения кислородом, не препятствующих органогенезу, пока нормально функционирует система «мать-плод», фетоплацентарный комплекс. Нарушения работы этих систем провоцируют развитие внутриутробной гипоксии плода, относящейся к числу наиболее распространенных видов перинатальной патологии (Иржак и др., 2011).

Известно, что в мозге новорожденных, перенесших гипоксию в перинатальном периоде, в силу метаболических расстройств происходит накопление, а реже – дефицит тех или иных биохимических субстратов, которые можно расценить как маркеры мозговых повреждений, являющихся свидетелями происшедшей биохимической катастрофы в обмене веществ. Так, наблюдается усиление липопероксидации на фоне недостаточной компенсации антиоксидантной системы, что может являться результатом окислительного стресса в перинатальном периоде (Курбаш, 2009; Блинов и Терентьев, 2013).

Таким образом, пониженная оксигенация в детском возрасте приводит к ослаблению сердечно-сосудистой и иммунной системы, а также замедлению работы мозга. В результате это отражается как на физическом состоянии, так и на умственном развитии ребенка.

1.2 Гипоксия как фактор нарушения церебрального кровотока в неонатальный период развития

Уровень кислорода в крови является важным фактором регуляции церебральной гемодинамики и даже незначительные сдвиги в оксигенации ткани мозга сопровождаются существенными изменениями в мозговом кровотоке с целью адаптации перфузии тканей (Bodin et al., 1995; Tomiyama et al., 1999; Sanborn et al., 2014). Однако, несмотря на интенсивные исследования в этой области, остается неизвестным как изменения в кислородном снабжении мозга влияют на церебральную микро- и макроциркуляцию в первые дни после рождения. Научные работы по эффектам сдвигов в кислородной сатурации тканей мозга на церебральную гемодинамику у новорожденных крайне малочисленны. Связано это, в первую очередь, с техническими трудностями измерения кислорода в мозге.

Из современных методов, которые нашли свое воплощение как в экспериментах на животных, так и в клинике является НИРС – ближняя инфракрасная спектроскопия (near infrared spectroscopy – NIRS). Впервые исследования кислородной сатурации в мозге у новорожденных предложил Wolf в 90-х годах (Wolf et al., 1997; 2000; 2002). Эта система является идеальным кандидатом для новорожденных, так как НИРС является неинвазивным, портативным методом, менее уязвимым для артефактов движения, а также обладает более глубоким проникновением в мозг новорожденных с более тонким черепом. Кроме того, НИРС может легко интегрироваться с другими методами нейровизуализации, такими как магнитно-резонансной томографии (МРТ), позитронно-эмиссионной томографией, УЗИ, электроэнцефалографией. Однако, несмотря на почти 20-ти летнюю историю развития этой технологии, широкое распространение ее в клинике ограничено отсутствием четкой корреляции между приборами разных фирм (Nicklin et al., 2003).

Другой метод, позволяющий оценить церебральную оксигенацию у новорожденных является МРТ в SWI режиме (Nathaniel et al, 2004;

Hsieh et al., 2016). Однако, для проведения МРТ-сканов требуется общая анестезия для новорожденных. Хотя в западной практике применяется МРТ без седатии у маленьких испытуемых, используя специальные наушники, кормление грудью перед процедурой, тем не менее, это малоэффективно. Новорожденные подвижны, особенно при наличии нарушения мозгового кровотока в условиях недостаточного кислородного снабжения тканей мозга, что делает МРТ-сканирование непригодным для анализа (Semyachkina-Glushkovskaya, 2016).

Некоторые авторы сочетают МРТ с магнитно-резонансной ангиографией (МРА). МРА является высокочувствительным методом диагностики кровоизлияния в мозг (Al-Jarallah et al., 2000; Liu et al., 2006). Этот метод полезен для оценка изменений динамики и анализа множественных параметров гемодинамики, включая церебральный кровоток и объем головного мозга (Wang and Licht, 2006). В исследовании Al-Jarallah показано, что чувствительность МРА для определения интракраниальных еморрагий составляет 97% (Al-Jarallah et al., 2000). Однако, этот метод не является столь часто применимым для новорожденных из-за потенциального вредного воздействия контрастных веществ. Кроме того, МРА требует использование внутривенного катетера для инъекции контрастного вещества, что технически затруднительно для новорожденных.

В отношении церебральной гемодинамики у новорожденных стоит сказать, что оценка мозгового кровотока представляет собой еще более трудную техническую проблему (Semyachkina-Glushkovskaya, 2016).

В настоящий момент существует только один точный метод анализа мозгового кровотока у людей – это перфузионная МРТ, которая показывает кровоток мозга в физиологических единицах (мл/мин) (Wang et al., 2003). Однако, здесь сохраняются те же проблемы применения МРТ к новорожденным, что были отмечены выше.

Еще один метод, который часто применяется для оценки церебрального кровотока у новорожденных, является сонография, поскольку она неинвазивная и имеет низкую стоимость. Но точность измерения мозгового кровотока сильно

зависит от угла между ультразвуковым лучом и осью потока, что существенно снижает эффективность захвата очень высоких скоростей и ограничивает пространственное разрешение. Кроме того, краниальное ультразвуковое исследование дает оценку мозгового кровотока в глубоких центральных внутричерепных сосудах и пропускает важную информацию о поверхностной церебральной гемодинамике и микроциркуляции, что является критическим для прогноза кровоизлияний в мозг в первые дни жизни (Semyachkina-Glushkovskaya et al., 2015). Существует доказательство того, что краниальное ультразвуковое исследование не является эффективным для идентификации малого субарахноидального кровоизлияния, что характерно для новорожденных (Siegel et al., 1983).

В экспериментах хорошо себя зарекомендовали два метода – это лазерная спекл-визуализация (LSCI) и доплеровская оптическая когерентная томография (ДОКТ) (Semyachkina-Glushkovskaya et al., 2016).

Преимуществом ДОКТ перед другими методами потоковой визуализации на основе применения оптического излучения является то, что они являются либо инвазивными (флуоресцентная ангиография), либо не позволяют получить достаточно хорошее разрешение по глубине (лазерная доплеровская флуометрия, лазерная спекл флуография) (Петров и Проскурин, 2015).

LSCI позволяет оценить церебральный кровоток в широком поле зрения, анализируя его одновременно на уровне макро- и микроциркуляции (Abdurashitov et al., 2015). Однако метод LSCI дает условные единицы кровотока мозга, в то время как ДОКТ отражает этот показатель в физиологических единицах (Виленский и др., 2012; Гришанов, 2015).

Применение данных методов на новорожденных животных в исследованиях церебрального кровотока позволили установить принципиально важные факты (Semyachkina-Glushkovskaya, 2016). Церебральные вены более чувствительны к вредоносному воздействию стресса по сравнению с церебральными артериями и микрососудов. Экспериментальные данные LSCI позволили понять, что обширное накопление крови в венозной сети является решающим фактором для

критических изменений, вызванных стрессом в сосудах незрелого мозга, связанного с развитием интракраниальных геморрагий (Pavlov et al., 2014; 2015; Semyachkina-Glushkovskaya, 2015). Вены головного мозга новорожденных более чувствительны к адренергической стимуляции при нормальном состоянии и при стрессе. Полномасштабная визуализация церебральных сосудов новорожденных крыс представляют собой важное новое понимание, как мозг новорожденного реагирует на стресс: после развития стресс-индуцированных мозговых геморрагий, новорожденные крысы демонстрируют нетипичное венозное расслабление (Pavlov et al., 2014).

Для оценки оксигенации мозга применяют метод, основанный на определении насыщения гемоглобина кислородом в оттекающей от головного мозга венозной крови ($SvjO_2$). Датчик для измерения $SvjO_2$ устанавливают ретроградно в луковицу внутренней яремной вены. Использование постоянного мониторинга глобальной церебральной оксигенации позволяет выявлять эпизоды десатурации (снижения сатурации в луковице яремной вены), улучшает выявляемость эпизодов ишемии головного мозга, позволяет проводить направленную интенсивную терапию, улучшая качество лечения больных с внутричерепными кровоизлияниями. Показатель $SvjO_2$ отражает взаимоотношения между доставкой и потреблением кислорода в головном мозге. Нормальными считают показатели $SvjO_2$, находящиеся в пределах 55%-75% при условии достаточной оксигенации артериальной крови. Таким образом, нормальные значения коэффициента экстракции кислорода для головного мозга составляют 25-45%. Снижение насыщения гемоглобина кислородом в оттекающей от мозга крови является одним из первых признаков развивающейся церебральной ишемии. Уровень $SvjO_2$ ниже 55% считается проявлением выраженной ишемии головного мозга. При снижении $SvjO_2$ ниже 45% появляются симптомы спутанности сознания, а при уровне 24% и менее происходит утрата сознания (углубление уровня бодрствования до комы). Наиболее частыми причинами эпизодов десатурации являются низкое церебральное перфузионное давление, внутричерепная гипертензия,

гипервентиляция, церебральный ангиоспазм, анемия и гипоксемия (Есьман и Мамилов, 2010).

В экспериментах также применяют двух-фотонную микроскопию. В данном случае используется свет в дальнекрасном и инфракрасном диапазоне, обладающий лучшей способностью проникать в ткани, чем ультрафиолетовый или видимый свет. Действительно, если конфокальная микроскопия может давать изображение на глубине 50-60 мкм, то для двухфотонной микроскопии этот диапазон может быть увеличен до 300 мкм, что особенно важно для тканей с низким рассеянием, таких как мозга (Кучмий и др., 2012).

Е. McConnell, используя на мышах модель субарахноидального кровоизлияния и двух-фотонную микроскопию, показал капиллярную дисфункцию (McConnell et al., 2015). Субарахноидальное кровоизлияние сопровождалось тяжелой гипоксией мозга, гибелью нейронов, снижением скорости кровотока на 30% и снижением капиллярной пульсации на 50% по сравнению со значениями контрольной группы.

Применение данных методов другими исследователями на взрослых животных позволили также установить, что гипоксия оказывает вазорелаксирующий эффект на сосуды мозга (Bodin and Burnstock, 1995; Tomiyama et al., 1999).

Одним из возможных механизмов церебральной вазорелаксации в условиях гипоксии может быть повышение активации eNOS и, как следствие, увеличение концентрации NO в церебральных сосудах (McQuillan et al., 1994; Huong et al., 1994; Prabhakar et al., 1996; Шило и др., 2005).

Исследования на новорожденных детях также отражают значительные изменения мозгового кровотока в условиях церебральной гипоксии. Панина с соавторами с помощью доплерометрии сосудов головного мозга обнаружили снижение скорости кровотока в бассейнах всех мозговых артерий у новорожденных детей, перенесших гипоксию (Панина и др., 2014).

Установлено нарушение становления церебральной и центральной гемодинамики у детей, перенесших перинатальную гипоксию. Причем,

новорожденные, которые подверглись хронической внутриутробной гипоксии, имеют в раннем неонатальном периоде признаки церебральной гипоперфузии, в то время как церебральная гиперперфузия выявлена у новорожденных, перенесших острую и сочетанную асфиксии (Зедгенизова и др., 2006).

В своей работе Е.Ю. Брыксина отмечает, что у недоношенных детей на фоне гипоксии в условиях фетоплацентарной недостаточности наблюдалось развитие церебральной гипоперфузии, что приводило к вазоконстрикции сосудов головного мозга и последующему сбою ауторегуляции мозгового кровотока. Автор также обращает внимание на отеочно-деструктивные процессы эндотелия сосудов, что объясняется снижением концентрации внеклеточного кальция (Брыксина, 2003).

Последствия нарушений мозгового кровотока у новорожденных в условиях гипоксии могут быть критическими для их дальнейшего развития. За счет высокого окислительного метаболизма и малого содержания антиоксидантов гипоксия приводит к нарушению процессов энергообеспечения, синтеза нейротрансмиттеров, медиаторов, а также целостности клеточных мембран (Тумаева и др., 2011). Каскад ишемически-опосредованных патологических процессов запускается в органах и тканях не только в момент гипоксии, но и в восстановительный период оксигенации (Fanafoff and Martin, 2002; Пальчик и Шабалов, 2004).

Гипоксия приводит к нарушению двигательных и психических функций, что в последующем может стать причиной трудностей обучения, а также социальной и профессиональной адаптации (Fisher et al., 2000; Зарубина и Павлова, 2007; Латышева и Лемешков, 2008; Раимкулов, 2014). Основой этих последствий служат нарушения системной и церебральной гемодинамики (Van Bel et al., 1987; Зедгенизова и др., 2006).

1.3 Влияние церебральной гипоксии и нарушений мозгового кровотока на проницаемость ГЭБ

Состояние ГЭБ имеет важное значение для нервной системы (Goldman, 1982; Бредбери, 1983;). Он выполняет защитную функцию, ограждая нервную систему от поступления из крови чужеродных веществ, регуляторную функцию, обеспечивая переход в мозговое вещество и спинномозговую жидкость субстратов, принимающих участие в биохимических процессах (Hawkins et al, 2005; Abbott et al., 2002; 2006; 2010; Чехонин и др., 2012). Анатомической единицей для ГЭБ являются микрососуды головного мозга (Abbott et al., 2002; 2006; 2010). Поэтому острое нарушение церебральной гемодинамики приводит к быстрым изменениям барьерной функции мозга.

Так, в ряде исследований показано, что нарушения кровотока мозга, такие как ишемия, сопровождаются изменениями проницаемости ГЭБ.

Нарушение целостности ГЭБ происходит мгновенно или в течение нескольких минут после церебральной ишемии (Saper and Petito, 1982). Другие придерживаются противоположной точки зрения, говоря об отсроченном во времени феномене разрушения барьера (Raichle, 1983). Объяснение указанных противоречий можно найти в предложенной Т. Kuroiwa и соавторами теории о двух фазах «открытия» ГЭБ при острой ишемии. Авторы в экспериментах неоднократно воспроизводили модель острой церебральной ишемии посредством окклюзии каротидного бассейна в течение одного часа с последующим восстановлением мозгового кровотока и развитием реактивной гиперемии в ишемической ткани мозга (Kuroiwa, et al., 1985). Было показано, что первая фаза прорыва ГЭБ в направлении кровь – мозг связана с реперфузией крови и резким повышением гидродинамического давления в дилатированных ацидозом и лишенных ауторегуляции церебральных сосудах.

В своей работе U. Ito и его коллеги показали, что чем продолжительнее васкулярная окклюзия, тем короче период до прорыва ГЭБ при восстановлении мозгового кровотока (Ito et al., 1979). Продолжая эксперимент, Т. Kuroiwa с

коллегами отметил, что барьер мозга вновь «закрывался» в течение трех часов после восстановления мозгового кровообращения. Вторая фаза нарушения проницаемости ГЭБ наблюдалась через пять часов после рециркуляции мозгового кровотока и сохранялась, по крайней мере, 72-часа. По-видимому, повторный прорыв барьера мозга связан с тотальным ишемическим поражением нейрональных структур (Kuroiwa, et al., 1985). Вопрос о механизме замедленного нарушения проницаемости ГЭБ продолжает оставаться дискуссионным. Возможно, этот феномен обусловлен развитием патобиохимического каскада реакций (лактат – ацидоз, глутамат – кальцевая токсичность, выброс кининов, образование вторичных продуктов перекисного окисления липидов), которые приводят к «открытию» барьера со стороны нервной ткани в результате гибели клеток и сопутствующего отека (Baethmann, 1988; Pousset, 1993).

В других работах также показано, что повышение проницаемости ГЭБ можно наблюдать при острой ишемии головного мозга, при генерализованных судорожных приступах, при травмах, в месте формирования очага демиелинизации и при ряде других расстройств центральной нервной системы ЦНС (Рябухин и др., 2003; Блинов, 2004). В практике детского невролога нарушение резистентности ГЭБ сопровождает перинатальное гипоксически-ишемическое поражение ЦНС с соответствующими исходами (Чехонин и др., 2003; Блинов, 2004, 2010, 2011).

Существует представление, что в случаях ишемического инсульта и травматического повреждения ЦНС повышение проницаемости ГЭБ является следствием этих патологий (Kondo et al., 1996; Mark and Davis, 2002). В других случаях нарушении барьерной функции является первопричиной развития различных нарушений ЦНС (de Vries and Dijkstra, 2004).

В настоящее время существуют доказательства того, что тромбоцитарно-сосудистое взаимодействие играет важную роль в патогенезе нарушения проницаемости ГЭБ при ишемической травме мозга. В физиологических условиях тромборезистентность сосудистой стенки, синтезирующей и секретирующей атромбогенные вещества с целью

предотвращения чрезмерной активации гемостатической системы, преобладает над тромбогенным потенциалом, необходимым для гемостатического ответа. Кроме того, вещества с атромбогенной активностью влияют не только на гемостаз, но и на базальный тонус сосудов, их проницаемость, чувствительность к вазоактивным препаратам, то есть на состояние ГЭБ. Таким образом, изменение существующего в норме баланса тромбогенного потенциала и тромборезистентность сосудистой стенки лежат в основе механизма обмена между внутренней средой организма и микросредой мозга (Яхно и др., 1995; Одинак и др., 1997; Grbavac, 1989).

Другим важным фактором, влияющим на проницаемость ГЭБ, является гипоксия, которая обладает модулирующим влиянием на сосуды мозга (Bodin et al., 1995; Tomiyama et al., 1999; Hyun and Jung, 2014).

Под влиянием гипоксии и метаболических расстройств нарушается энергетический баланс мозга, снижается активность ферментных систем (Макарова и Молочный, 2009). На ультраструктурном уровне из-за гипоксии нарушаются функции биомембран и увеличивается их проницаемость из-за активации процесса перекисного окисления мембранных липидов (Софронов и др, 2010). Накопление продуктов пероксидации может привести к образованию в мембранах своеобразных пор, что обуславливает повышенную проницаемость. В результате активации окисления липидов происходит избыточное накопление малонового диальдегида (МДА), коррелирующее с уровнем перекисного окисления липидов (ПОЛ).

В работе Софронова и его коллег было установлено, что проницаемость мембран у новорожденных, перенесших хроническую внутриутробную гипоксию, оказалась выше, чем у контрольных, что может быть связано с большим содержанием МДА у них на 20% относительно группы условно здоровых детей.

Повышение сосудистой и клеточной проницаемости, наряду с лабильностью водно-солевого обмена и тенденцией к развитию внутримозговой гиперосмолярности, приводит к отеку и набуханию головного мозга (Макарова и Молочный, 2009). Известно, что при гипоксии происходит

нарушение «плотных контактов» между эндотелиоцитами, сопровождаемое отеком и набуханием концевых отростков астроцитов, что приводит к нарушению парацеллюлярного транспорта (Abbruscato and Davis, 1999; Fischer et al., 1999, 2000; Mark and Davis, 2002). В митохондриях нервных клеток накапливаются свободные радикалы, инактивирующие фосфолипиды, и, следовательно, блокируется одно из ведущих звеньев энергопродукции. Повреждаются также клеточные (митохондриальные) мембраны и из-за нарушения ионного насоса – внутриклеточный калий заменяется натрием. Это связано с тем, что ГЭБ регулирует ионный баланс мозга, и фактически формирование эдемы после инсульта связано с неспособностью ГЭБ поддерживать необходимые ионные градиенты (Чехонин и др., 2000). При подъеме артериального давления в эндотелиальных клетках образуются микроканалы, через которые может осуществляться перенос большого количества жидкости из крови в мозг, то есть создаются условия для развития его отека.

Касательно структурных белков ГЭБ известно, что в условиях *in vivo* гипоксия оказывает влияние на экспрессию структурных белков ГЭБ. Так, в работах Witt и его коллег отмечено снижение экспрессии окклюдина и увеличение проницаемости ГЭБ (Witt et al., 2003, 2005). Такой же эффект гипоксии обнаружен и в работах Hyun и Koto (Hyun and Jung, 2014; Koto et al., 2007).

Таким образом, совокупность клинических патоморфологических и экспериментальных исследований дает возможность утверждать, что одним из важнейших патогенетических звеньев острой церебральной ишемии является дезорганизация составляющих ГЭБ. Наиболее уязвимой структурой является эндотелий сосудов, степень повреждения которого определяет выраженность морфологических изменений базальной мембраны и прилежащих астроцитов (Одинак и Вознюк, 2003).

1.4 Изменения клеток коры головного мозга под действием низкой кислородной сатурации

Ткань головного мозга отличается высоким потреблением кислорода. В связи с этим головной мозг характеризуется высокой чувствительностью к окислительному стрессу (Зарубина и Павлова, 2007; Левин и др., 2013). Острое снижение или полное прекращение поступления кислорода к головному мозгу является наиболее вероятной причиной гибели людей во время геморрагического шока и клинической смерти, а также плодов у беременных женщин во время патологических родов (Уракова и др., 2012; Ураков и др., 2014).

Чаще всего гипоксия мозга связана с недостаточностью мозгового кровообращения (Антипенко и Густов, 2008). Гипоксия мозговой ткани сопровождается необратимые процессы в области мозга с выраженным снижением кровотока уже меньше чем через 10 минут с момента возникновения гемодинамических нарушений (Hossmann, 1994).

На различных моделях, таких как модель гипоксической энцефалопатии и окклюзия левой общей сонной артерии, было выявлено органическое поражение тканей мозга, что проявлялось в образовании перичеллюлярного и периваскулярного отека (Вокина и Титов, 2010; Данилова, 2013). Во время гипоксии наблюдается дистрофия клеток Пуркинье и глиоз. Глиальные клетки являются основной составной частью гематоэнцефалического барьера, поражение которых проявляется в нарушении барьерной функции мозга (Вокина и Титов, 2010; Данилова и Шумихина, 2015).

Касательно областей мозга, страдающих от церебральной гипоксии, стоит сказать, что в ряде исследований было выявлено, что у животных с частичной перевязкой сонных артерий наиболее яркие изменения регистрировались в перивентрикулярном белом веществе, а при дальнейшем сужении просвета сосудов – в коре больших полушарий (Shibata et al., 2004; Scharder et al., 2005).

Известно, что наиболее чувствительными к гипоксии являются верхние слои коры головного мозга, это может быть связано с высокой степенью их

васкуляризации, а также активностью ферментов энергетического обмена. В работе Муратова и его коллег на модели окклюзии левой сонной артерии у крыс было отмечено, что различные типы клеток также имеют неодинаковые повреждения, а именно пирамидные клетки страдают меньше, чем звездчатые нейроны. Нейроны при окклюзии увеличиваются в размерах за счет вакуолизации цитоплазмы и характеризуются нечеткими клеточными границами (Муратов, 2013; Данилова, 2013). Также имеет место кариорексис, прогрессирование которого приводит к появлению клеток-теней (Данилова, 2013).

По результатам стереологического анализа McConnell в своей работе отмечает, что количество нейронов у мышей существенно уменьшается на фоне тяжелой гипоксии (McConnell et al., 2015).

Установлено, что в результате сочетанного воздействия гипоксии и ишемии в веществе мозга новорожденного возникает ряд нейрохимических процессов, которые заключаются в анаэробном метаболизме глюкозы, дефиците АТФ и АТФ-зависимых насосов, образовании свободных радикалов, потере внутриклеточного K^+ и деполяризации пресинаптических нейронов, выбросе в синаптическую щель возбуждающих аминокислот (глутамата и аспартата), которые активируют соответствующие рецепторы с открытием на мембране нейрона каналов Na^+ , Cl^- и Ca^{2+} , аккумуляции воды и приводят к его гибели. Кроме того, накопление внутриклеточного Ca^{2+} способствует активации фосфолипазы и окиси азота, потенцируя перекисное окисление липидов с распадом липидной составляющей мембраны, и также приводит к гибели нервной клетки (Гусев и др., 1999; Макаренко и Карандеева, 2013; Созаева и Бережанская, 2014; Шустов и др., 2014).

Таким, образом, клеточная гибель в условиях церебральной гипоксии является следствием реализации нескольких механизмов: увеличение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} , отека сосудистого происхождения, усугубляемого лактатным ацидозом, активации свободнорадикального окисления (Christensen et al., 1994; Stoll et al., 1995).

Интересно отметить, что В.А. Вокина с коллегами отмечали наличие апоптических телец у крыс только на модели токсической энцефалопатии, но не гипоксической (Вокина и Титов, 2010). В ряде других работ признаки апоптоза отмечались и при гипоксии (Berger, 2002; McConnell et al., 2015).

В результате возникающая энцефалопатия на фоне церебральной гипоксии приводит к формированию различных психических нарушений, включая задержки интеллектуального развития и невротические расстройства, что приводит к значительному снижению качества жизни (Fisher et al., 2000; Зарубина и Павлова, 2007; Латышева и Лемешков, 2008; Раимкулов, 2014). Страдает логика, внимание, способность адаптироваться к высоким ритмам жизни современного общества. 75% таких детей имеют проблемы в когнитивном развитии и более 80% не справляются с обычной школьной программой (Долгих, 2005; Александрович и др., 2012).

Для доношенных новорожденных при гипоксии мозга характерно парасагитальное поражение коры головного мозга и подкоркового белого вещества, закономерным исходом которого при неблагоприятном течении может быть спастическая тетраплегия и интеллектуальная недостаточность. Другим специфическим морфологическим паттерном гипоксического поражения мозга у доношенных является *status marmoratus* базальных ганглиев и таламуса, приводящий к развитию хориоатетоза и задержки психического развития (Berger, 2002; Clancy, 2006). У крыс с окклюзией левой сонной артерией было отмечено снижение двигательной активности и ориентировочной исследовательской деятельности (Данилова, 2013; Созаева и Бережанская, 2014).

Степень и качество восстановления функций высшей нервной деятельности после перенесенной гипоксии зависит от индивидуальных особенностей организма, которые определяют адаптационные резервы головного мозга (Зарубина и Павлова, 2007; Антипенко и Густов, 2008). Так, в некоторых работах было отмечено, что более эмоциональные крысы, перенесшие ишемию, гибнут чаще, по сравнению с неэмоциональными, так как их мозг обильнее снабжается

кровью, что и определяет их большую чувствительность к гипоксии (Зарубина и др., 2003; 2004).

Таким образом, анализ литературных данных показывает, что гипоксия играет решающую роль в развитии когнитивных функций, которые неотъемлемо связаны с физиологическим состоянием нервной ткани, а именно с состоянием нервных клеток коры больших полушарий.

ГЛАВА II

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1 Объект исследования

Исследования выполнены на 270 новорожденных крысах трехдневного возраста. Содержание и манипуляции над животными проводили в соответствии с международными правилами гуманного отношения с экспериментальным животным (NIH Publication, 2011).

Крыс содержали при температуре 25 ± 2 °С, 55% влажности и 12/12 часовом цикле свет / темнота.

Во всех исследованиях животные были разделены на три группы, выделенные по следующим состояниям:

1) норма или контрольные группы, которые включали в себя нестрессированных новорожденных крыс;

2) стресс-индуцированный период, эта группа объединяла крыс через 1 – 2 – 4 – 6 – 8 часов после стресса, когда отмечались начальные патологические изменения тканей мозга и мозгового кровообращения, предшествующие мозговым гемorragиям у новорожденных животных;

3) стресс-индуцированный период, здесь рассматривались группы, включающие стрессированных крыс, у которых наблюдались интракраниальные гемorragии через 24 часа после стресса.

2.2 Методы исследования

Экспериментальное моделирование интракраниальных гемorragий у новорожденных крыс

Мозговые гемorragии у крыс вызывали с помощью разработанной нами модели (Патент РФ 2505865), которая основана на применении сильного

шумового стресса (110 дБ, 370 Гц) (Semyachkina-Glushkovskaya et al., 2016; Sindeeva et al., 2015). Для этого новорожденных крыс в возрасте 3-х дней помещали в звукоизолирующую камеру и подвергали звуковому воздействию на протяжении 120 минут: 10 сек – звук, затем 60 сек – пауза (Semyachkina-Glushkovskaya, 2015, 2016).

В данной модели выделяют два периода стресс-индуцированного развития интракраниальных геморрагий:

- пред-геморрагический (в течение 20-22 часов после стресса, исследования проводились в световой период суток, то есть в первые 8 часов после воздействия), когда отмечаются начальные патологические изменения в сосудах и тканях мозга без развития интракраниальных геморрагий;
- пост-геморрагический (24 часа после стресса), когда развиваются интракраниальные геморрагии.

Экспериментальная установка представлена на рисунке 1.



Рисунок 1 – Стрессирование новорожденной крысы путем воздействия сильного звука.

Оценка уровня насыщения кислородом (SpO_2) артериальной крови мозга

Для оценки насыщения кислородом артериальной крови мозга использовали пульсоксиметр модели CMS60D.

Пульсоксиметрия – неинвазивный метод измерения сатурации (процентного насыщения) кислородом гемоглобина в пульсирующих артериолах (Есьман и др., 2010; Созаева и др., 2014).

Пульсоксиметр измеряет насыщение кислородом артериальной крови мозга при помощи двух источников света, которые имеют разную длину волны (красный свет 660 нм и инфракрасный свет 880 нм), а также фотодатчика, улавливающего световые волны, отраженные от тканей или проходящие через них. Степень поглощения света зависит от содержания кислорода в крови.

Измеряя разницу между количеством света, абсорбируемого во время систолы и диастолы, пульсоксиметр определяет величину артериальной пульсации. Сатурация рассчитывается, как соотношение количества HbO_2 к общему количеству гемоглобина, выраженное в процентах:

$$SpO_2 = (HbO_2 / HbO_2 + Hb) \times 100\%,$$

где HbO_2 - насыщенный кислородом гемоглобин,

Hb - общий гемоглобин (Гринько и др., 2010; Шулькина и др., 2015).

Оксигенацию головного мозга измеряли с помощью датчика, закрепленного на голове у новорожденных. Измерения проводили в течение 5 минут с шагом в 1 сек для каждого животного, затем данные усреднялись, чтобы уменьшить влияние случайных ошибок, которые могут появиться во время измерений.

Уровень оксигенации измеряли в норме (до стрессорного воздействия), в пред-геморрагический период (через 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 часов после стресса) и в пост-геморрагический период (24 часа после стресса).

Оценка уровня насыщения кислородом (SpO_2) венозной крови мозга методом магнитно-резонансной томографии

МРТ-исследования проводили на томографе ClinScan 7T (Bruker Biospin) под ингаляционным наркозом смеси изофлурана с кислородом (соотношение 2:98) на базе кафедры медицинских биотехнологий Российского национального исследовательского медицинского университета имени Н.И. Пирогова Минздрава России (рис.2).



Рисунок 2 – Томограф ClinScan 7T.

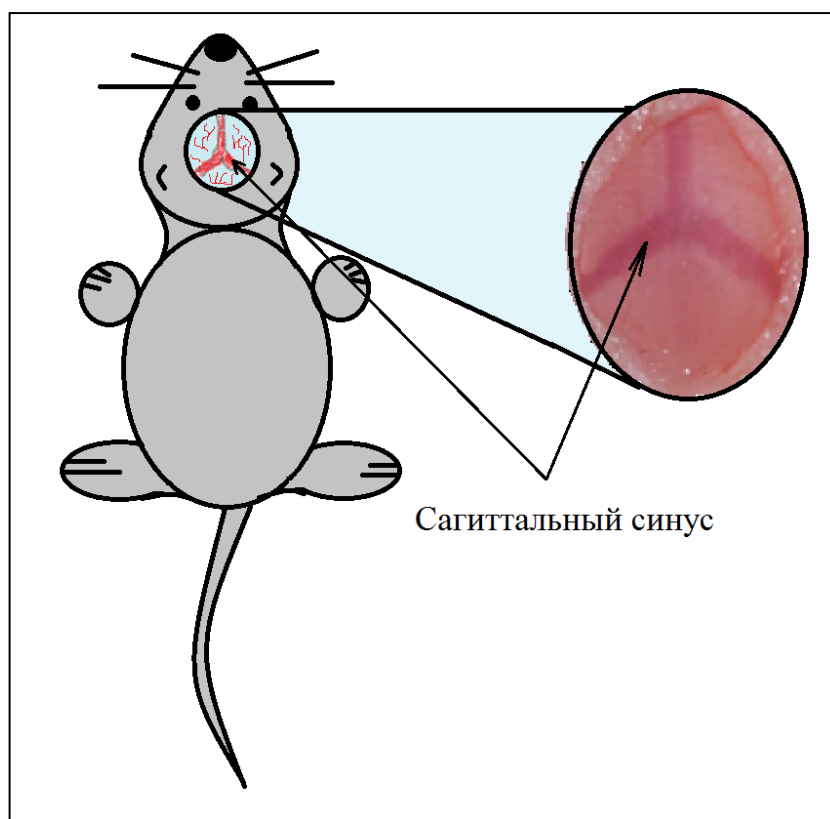
Для изучения кислородного насыщения венозных сосудов мозга использовали режим SWI (susceptibility weighted imaging – изображения, взвешенные по неоднородности магнитного поля), который представляет собой трехмерной (3D) метод визуализации венозно-сосудистой архитектуры с высоким разрешением. Этот режим чувствителен к локальным полям неоднородности венозной крови, он более чувствителен для обнаружения магнитных веществ, таких как дезоксигемоглобин, железо и т.д. (Nathaniel et al., 2004; Hsieh et al., 2016).



Рисунок 3 – Запись МРТ- изображения мозга новорожденной крысы в SWI режиме.

Оценка кровотока мозга у новорожденных крыс

Мозговой кровоток измерялся на новорожденных крысах через небольшой разрез кожи в области родничка (2 мм x 2 мм) под изофлурановым ингаляционным наркозом, при этом целостность черепа не была нарушена. Глубину анестезии оценивали с помощью периодического мониторинга рефлекса на сгибание задней конечности. Измерения были сосредоточены на сагиттальном синусе, отражающем изменения в макроциркуляции мозгового кровотока, а также на микрососудах, представляющих микроциркуляторное звено (Semyachkina-Glushkovskaya et al., 2015, 2016). Сагиттальный синус может быть легко обнаружен невооруженным глазом и поэтому является хорошей мишенью для оптических измерений (рис. 4).



Рисинок 4 – Изображение сагиттального синуса у новорожденной крысы через небольшой разрез кожи в области родничка.

Мозговой кровоток в церебральных сосудах изучался в покое и после воздействия стресса.

Оценку параметров мозгового кровотока проводили 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.

Исследования церебральной гемодинамики методом ДОКТ

Доплеровская оптическая когерентная томография работает на центральной длине волны 1325 нм в полосе 100 нм. Объект исследования располагался перпендикулярно оптической оси, таким образом, максимальный вклад в доплеровский сигнал вносили лучи, идущие под апертурным углом ($7,5^\circ$).

Продольное и поперечное разрешение установки составляло 12 и 25 мкм соответственно. Пакет программного обеспечения, поставляемый вместе с томографом, был использован для восстановления доплеровской фазы в комплексной форме из интерференционного сигнала интерферометра, посредством Фурье преобразования. Доплеровская фаза кодирует пространственное распределение движущихся клеток в сосуде и их скорость. Таким образом, наличие доплеровского сдвига в сигнале является индикатором наличия сосуда, а величина этого сдвига характеризует распределение скорости движения клеток в сосуде. Из-за особенностей записи и обработки интерферометрического сигнала, данная ДОКТ система реализует «phase-resolved» подход для измерения доплеровской частоты сдвига, таким образом, значения фазы завернуты по модулю π . Для развертки фазы и последующей обработки использовалось программное обеспечение, собственной разработки, написанное на языке программирования NILabView.

Метод лазерной спекл-визуализации

Так же для оценки церебральной гемодинамики у новорожденных крыс использовалась лазерная спекл-визуализация (LSCI). Данный метод является неинвазивным и бесконтактным, позволяет получать и анализировать изображения кровотока в режиме реального времени.

Измерение и расчет контраста проводились с помощью специально созданной программы LabVIEW 8.5 (National Instruments, США), позволяющей в режиме реального времени с частотой до 100 кадров в секунду регистрировать распределения интенсивности спекл-поля. Для обработки спекл-изображений использовался алгоритм расчета пространственного распределения контраста в скользящем окне с последующим усреднением по нескольким изображениям. Размер окна и число изображений спекл-контраста, по которым выполнялось усреднение, оставались неизменными. Размер скользящего окна брался равным

5×5 пикселей, усреднение проводилось по 50 изображениям спекл-контраста. Контраст внутри скользящего окна рассчитывался как отношение:

$$K = \frac{\sigma}{\langle I \rangle}$$

где I - среднее значение интенсивности;

σ - стандартное отклонение.

Для сокращения времени обработки использовалась параллелизация вычислений и методы обработки дискретных изображений. В рамках данного подхода пространственное распределение контраста спекл-изображения можно представить как поэлементную операцию отношения пространственного распределения σ к пространственному распределению I .

В связи с тем, что в конечном итоге объектом исследований является кровоток, для спекл-визуализации применялся одномодовый гелий-неоновый лазер ГН-5П с длиной волны 632,8 нм, для которой наблюдается существенное рассеяние зондируемого излучения эритроцитами. Спекл-модулированные изображения поверхности анализируемого участка регистрировались монохромной КМОП-камерой (Basler a602f, число пикселей в матрице 656×491, размер пикселя 9,9×9,9 мкм; 8 бит/пиксель), оснащенной микро-объективом ЛОМО. Запись данных проводилась в двух конфигурациях: проходящего через исследуемый объект сигнала и отраженного от исследуемого объекта сигнала. Схема установки представлена на рисунке 5.

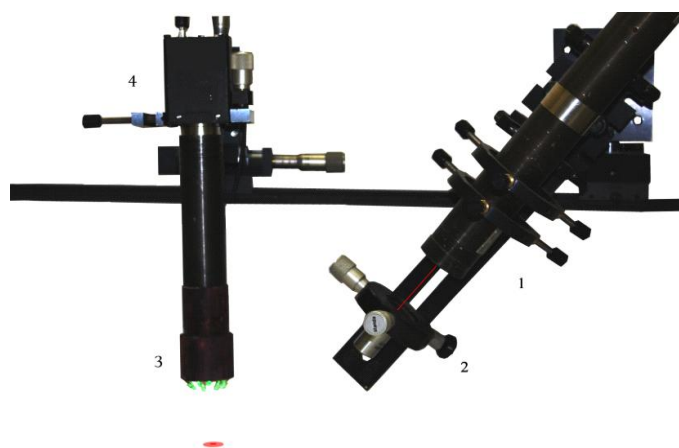


Рисунок 5 – Схема экспериментальной установки. 1 – He-Ne лазер ГН-5П, длина волны – 633 нм; 2 – объектив (10x) с закрепленным на нем фильтром; 3 – тубус микроскопа с микрообъективом (ЛОМО, 10×) и с 8-элементный светодиодный осветитель (центральная длина волны ~517 нм; 4 – детектор (КМОП камера Basler A602f).

Оценка проницаемости ГЭБ

Проницаемость ГЭБ изучали с помощью «сосудистых меток» разного веса:

1) для исследования проницаемости ГЭБ для низкомолекулярных соединений или ионной проводимости использовали:

- ✓ Гадолиний, 552 Да, 1.2 мл/кг, iv, Magnevist®. Определение экстравазации гадолиния (контрастного вещества) проводили на МРТ томографе ClinScan 7T (BrukerBiospin) под ингаляционным наркозом смесью воздух изофлуран 98:2 по объёму в T1 и T2 взвешенном режимах.

Исследование выполнено на базе кафедры медицинских биотехнологий Российского национального исследовательского медицинского университета имени Н.И. Пирогова Минздрава России.

- ✓ Гистологический метод применяли для изучения диффузии воды из плазмы крови в ткани мозга по анализу развития периваскулярной эдемы. Также этот метод применяли для оценки

морфологии пирамидальных клеток коры головного мозга новорожденных крыс. Для этого образцы мозга фиксировали в 10% забуференном растворе формалина. Затем образцы заливали парафином, делали срезы (4 мкм) и окрашивали гематоксилином и эозином.

Исследование выполнено на базе кафедры патологической анатомии Саратовского государственного медицинского университета имени В.И. Разумовского.

2) Для исследования проницаемости ГЭБ для высокомолекулярных соединений или белковой проницаемости применяли:

- ✓ Декстран, 70 кДа (1% раствор в объемной дозе 0,2 мл/100 гр/крысы, iv, меченый тетраметилродамином). Для детектирования декстрана в сосудах/тканях мозга использовали конфокальную микроскопию срезов мозга крыс толщиной 50-60 мкм с использованием конфокального микроскопа TCS SP5 (Leica-microsystems, Германия) 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 (ЦКП «Симбиоз» ИБФРМ РАН) г. Саратова.
- ✓ Краситель Evans Blue, 68 кДа (2% раствор в объемной дозе 0,2 мл/100 гр крысы, Sigma, iv). Прохождение красителя Evans Blue через ГЭБ оценивали спустя 30 мин после внутривенного введения с помощью спектрофлуориметрического метода на длине волны возбуждения 620 нм и длине волны излучения 680 нм. Спектрофлуориметрию проводили на спектрофлуориметре Cary Eclipse, Agilent, США) на базе ЦКП «Симбиоз» ИБФРМ РАН г. Саратова (Nag, 2003; Hoffmann et al., 2011).

Систему фотоакустики использовали для оценки состояния сосудов в области сагиттального синуса на фоне изменения барьерной функции мозга при развитии интракраниальных геморрагий (Yanyan et al., 2013; American National Standard for Safe Use of Lasers ANSI, 2000). Данные исследования проводили в центре биомедицинской фотоники «Britton Chance» Хуачжунского университета науки и технологий в г. Ухань (Китай).

Оценка экспрессии структурных элементов ГЭБ

Для изучения экспрессии структурных элементов ГЭБ использовали флуоресцентную гибридизацию ДНК и ПЦР (полимеразно-цепная реакция).

С помощью методов флуоресцентного и иммуногистохимического анализа изучали экспрессию белков плотных щелевых контактов ГЭБ с помощью специфических антител к клаудину (claudin-5 (H-52): sc-28670) и окклюдину (Occludin (H-279): sc-5562).

Выделение тотальной РНК из тканей мозга проводили при помощи коммерческого набора «RNeasy Mini Kit» (Qiagen, США), согласно инструкциям производителя. Концентрацию РНК определяли спектрофотометрически на приборе NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA); нативность РНК оценивали при помощи электрофореза в 1% агарозном геле. Для получения кДНК использовали 1,5 мкг тотальной РНК, предварительно обработанной 0,1 ед/мкл ДНКазой (Fermentas, Литва) при 37С в течение 30 мин. Реакцию обратной транскрипции проводили в реакционной смеси объемом 25 мкл, содержащей 1 мкМ случайных нуклеотидных гексамеров (Random 6) или 0,4 мкМ специфичных праймеров, а также 300 мкМ дезоксирибонуклеотидфосфатов, 100 ед обратной транскриптазы M-MuLV, с соответствующим буфером (Силекс, Москва). На первой стадии раствор РНК в присутствии праймеров прогревали при 70⁰С в течение 5 мин., а затем помещали на лед. На второй стадии добавляли остальные компоненты и инкубировали в амплификаторе DNA Engine thermocycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) при

следующем температурном режиме: 37С (60мин), 70С (10мин). 2 мкл полученной кДНК использовали в качестве источника матриц для ПЦР.

Для амплификации участков ДНК нами были ранее сконструированы праймеры, комплементарные фрагментам генов клаудин-5, окклюдин, ламинин и коллаген- IV. Конструирование праймеров проводили при помощи пакета программ Vector NTI версия 9 на основе последовательности генома *Rattus norvegicus*. Праймеры и флуоресцентные зонды синтезировали в НПО «Синтол» (Москва). С разработанными нами праймерами были проведены эксперименты по проверке их специфичности. В ходе ПЦР с различными праймерами и ДНК *Rattus norvegicus* наблюдали образование продуктов, соответствующих по молекулярной массе теоретически ожидаемым. ПЦР проводили в реакционной смеси, в состав которой входили 5-кратный буфер (335 мМ трис-НСl, рН8,8; 83 мМ (NH₄)₂SO₄; 12,5мМMgCl₂; 10,5% Tween 20), смесь дезоксирибонуклеозидтрифосфатов, 2-5 мкл ДНК-матрицы (от 0,001 до 10 нг), 0,4 мкМ каждого праймера, 0,4 мкМ флуоресцентных зондов TaqMan. 0,04 ед. Taq-полимеразы (Силекс, Москва) добавляли в реакционную смесь непосредственно перед реакцией. Конечный объем реакционной смеси составлял 25 мкл. Температурно-временной режим реакции и изменение флуоресценции контролировали с помощью термоциклера с оптическим модулем ICycler IQ-4 (Bio-Rad, США).

Относительный уровень экспрессии исследуемых генов в тканях мозга определяли по соотношению количества копий кДНК, соответствующих транскриптам целевых генов (клаудин-5, окклюдин) и НКГ гена. Количество копий кДНК каждого гена определяли относительно соответствующих калибровочных кривых, построенных по результатам ПЦР с использованием ДНК-мишеней в известной концентрации. Каждый образец оценивали в двух повторностях ПЦР, при этом отсутствие значимых количеств геномной ДНК подтверждали, проводя ПЦР без предварительного этапа обратной транскрипции.

Исследования проводили на базе ЦКП «Симбиоз» ИБФРМ РАН г. Саратова.

Оценка деформации эритроцитов методом микропипеточной аспирации

Для оценки сопротивления к деформации и жесткости мембраны эритроцитов использовался метод микропипеточной аспирации (рис. 6).

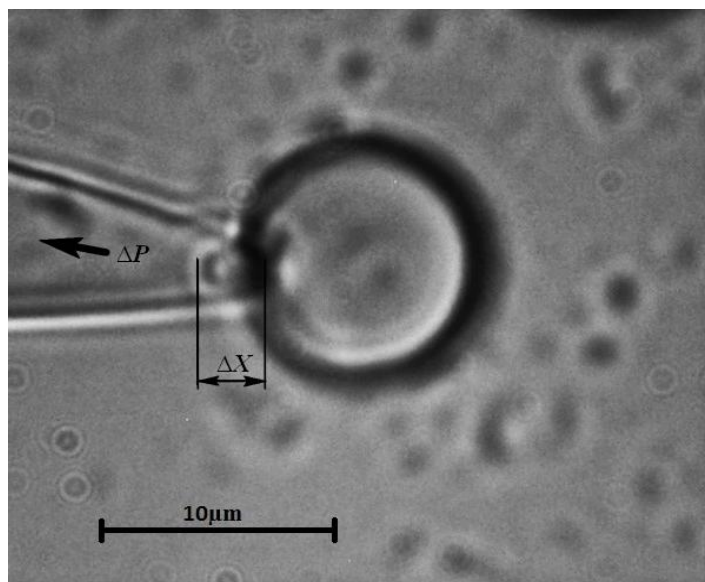


Рисунок 6 – Метод микропипеточной аспирации: ΔX – глубина аспирации, ΔP – давление при аспирации.

Этот метод основан на измерении глубины аспирации эритроцитов путём создания отрицательного давления внутри микропипетки. В эксперименте были использованы самодельные стеклянные пипетки с внутренним диаметром 2 мкм.

Пипетки изготовляли из 0,93 мм боросиликатных стеклянных капилляров. Для очистки заготовок использовали продувку потоком воздуха, промывку изопропиловым спиртом, затем продувку сжатым воздухом и промывку дистиллированной водой. Сушку заготовки осуществляли на протяжении одного дня, устанавливали ее в горизонтальном положении для стекания. Изображения аспирации эритроцитов получали на инвертном микроскопе с использованием иммерсионных масляных линз ($100\times\text{NA}=1,25$) и цветной камеры CMOS (DCC1615C, Throlabs, Germany). Давление создавалось с помощью U-образного манометра, заполненного буферным раствором и соединенного с пипеткой. Образцы крови для данного метода разводили в 400 раз буферным раствором.

Глубину аспирации ΔX измеряли в условиях равновесия (через 2-3 минуты после создания отрицательного давления). Преимущество этого метода состоит в относительной простоте и достаточно высокой надежности полученных результатов.

Статистическая обработка экспериментальных данных

Результаты были представлены как среднее \pm стандартная ошибка среднего. Отличия от исходного уровня в той же группе оценивали с помощью критерия Вилкоксона. Межгрупповые различия были оценены с помощью критерия Манна-Уитни и ANOVA-2 (вторичный анализ с ранговым критерием Дункана). Различия считались достоверными при критерии $p \leq 0,05$ для всех результатов.

ГЛАВА III

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1 Изучение роли гипоксии в устойчивости церебральных сосудов к повреждающему воздействию стресса и развитию интракраниальных геморрагий в первые дни после рождения

Стресс, который переносят новорожденные дети в период родов и во время интенсивной адаптации к окружающей среде в первые дни после рождения, является одним из ключевых факторов, определяющих комплекс физиологических и патофизиологических изменений в этот период (Карасев, 2005; Потребич, 2009). В частности родовой стресс может провоцировать развитие церебральной гипоксии у новорожденных (Shankaran, 2000; Софронов и др., 2010; Иржак и др., 2011; Созаева и Бержанская, 2014). Это, в свою очередь, сопровождается неонатальными интракраниальными геморрагиями, которые в дальнейшем приводят к необратимым последствиям в функционировании центральной нервной системы (Tomiyama et al., 1999; Thoresen et al., 2001; Alderliesten et al., 2013; Hsieh et al., 2016). Однако, как взаимосвязаны три указанных фактора – гипоксия, стресс и устойчивость церебральных сосудов к развитию интракраниальных геморрагий – остается неизученным.

Для ответа на поставленный вопрос была проведена серия экспериментов по изучению как меняется уровень кислородной сатурации тканей мозга на модели стресс-индуцированных интракраниальных геморрагий у новорожденных крыс.

Для этого изучали уровень кислородного насыщения артериальной крови методом пульсоксиметрии (Almendros et al., 2010; Kawauchi et al., 2011) и венозной крови - методом MPT в SWI режиме (Nathaniel et al, 2004; Hsieh et al., 2016).

Рассмотрим результаты исследований, полученных методом пульсоксиметрии.

Уровень SpO_2 артериальной крови мозга в норме у нестрессированных новорожденных крыс составил 96% (рис. 7), что соответствует нормальным значениям (Semyachkina-Glushkovskaya et al., 2016). Отметим, что в других работах, выполненных на взрослых крысах с применением метода пульсовой оксиметрии, выявлен также высокий уровень оксигенации тканей мозга в пределах $95 \pm 0,5\%$ (Almendros et al., 2010; Kawauchi et al., 2011).

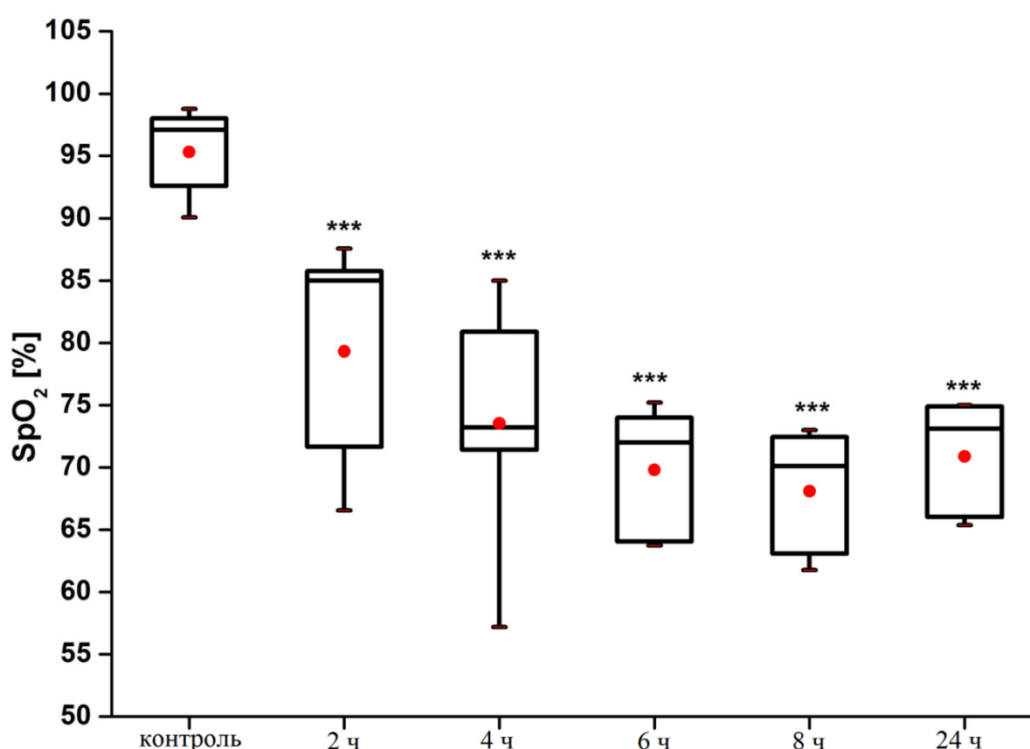


Рисунок 7 – Изменение насыщения кислородом артериальной крови мозга после воздействия звукового стресса у новорожденных крыс: 2 – 4 – 6 – 8 – 24 часа – время после прекращения стресса; * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$ относительно контроля.

Период до момента развития стресс-индуцированных мозговых геморрагий (2 – 4 – 6 – 8 часов после стресса) характеризовался постепенным снижением уровня SpO_2 . На рисунке 7 видно, что уже через 2 часа после звукового стресса наблюдалось снижение оксигенации артериальной крови на 17% ($p < 0,05$). Далее

показатель SpO₂ продолжал прогрессивно уменьшаться на протяжении 8 часов вплоть до момента появления геморрагий в мозге. Так, через 4 часа после отмены стресса оксигенация снизилась на 23%, через 6 часов – на 27%, через 8 часов – на 29%, ($p < 0,05$).

В пост-геморрагический период (24 часа после стресса) уровень SpO₂ снизился в 1,4 раза и составил 71%, ($p < 0,05$). То есть у животных с интракраниальными геморрагиями показатель SpO₂ оставался низким.

В таблице 1 представлены индивидуальные значения насыщения кислородом артериальной крови мозга новорожденных крыс.

Таким образом, сразу после звукового стресса у всех животных выявлена гипоксемия различной тяжести. Через 2 часа после прекращения стресса дефицит O₂ тканей мозга усиливается, что говорит о прогрессировании нарушения снабжения мозга кислородом. Через 4 часа после отмены звукового воздействия и далее на протяжении всего пред-геморрагического периода у всех новорожденных крыс выражена тяжелая гипоксемия и появляются животные, у которых уровень насыщения кислородом крови ниже 60%, то есть ниже ишемического порога, что свидетельствует о развитии ишемического повреждения в бассейне кровоснабжения (Трофимов и др., 2013). Животные пост-геморрагического периода так же характеризуется тяжелой гипоксемией.

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

Индивидуальные значения SpO₂ у новорожденных крыс (%)

| № | контроль | Количество часов после стресса | | | | | | | | | |
|--------------|----------------|--------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| | | 0 ч | 1 ч | 2 ч | 3 ч | 4 ч | 5 ч | 6 ч | 7 ч | 8 ч | 24 ч |
| 1 | 95,47 | 82,28 | 87,35 | 86,32 | 72,52 | 84,94 | 80,74 | 70,44 | 65,00 | 61,78 | 72,85 |
| 2 | 95,76 | 71,65 | 77,66 | 87,57 | 79,03 | 85,00 | 59,00 | 74,00 | 59,99 | 69,44 | 71,44 |
| 3 | 97,46 | 86,75 | 93,51 | 83,83 | 74,63 | 71,43 | 61,35 | 64,06 | 70,68 | 70,50 | 65,38 |
| 4 | 97,87 | 71,87 | 73,97 | 85,20 | 56,05 | 70,10 | 74,00 | 75,20 | 68,12 | 66,17 | 66,01 |
| 5 | 94,81 | 74,69 | 85,92 | 66,57 | 71,11 | 80,89 | 54,16 | 69,91 | 63,40 | 70,00 | 72,50 |
| 6 | 96,78 | 84,19 | 75,92 | 73,73 | 89,85 | 72,38 | 66,41 | 71,81 | 72,66 | 63,09 | 68,82 |
| 7 | 97,65 | 88,27 | 72,57 | 69,60 | 81,78 | 78,38 | 81,29 | 63,73 | 69,31 | 68,79 | 70,25 |
| 8 | 94,90 | 89,35 | 83,88 | 84,89 | 89,42 | 57,18 | 79,13 | 65,17 | 66,24 | 67,37 | 77,95 |
| 9 | 94,54 | 73,15 | 72,36 | 82,00 | 81,05 | 64,12 | 67,02 | 65,82 | 62,82 | 61,75 | 69,83 |
| Ср. знач. | 96,14± 0,37 | 80,24± 1,99 * | 80,35± 2,38 * | 79,98± 2,36 * | 77,27± 3,80 * | 73,82± 3,13 * | 69,23± 3,05 * | 68,90± 1,29 * | 66,47± 1,42 * | 66,54± 0,98 * | 70,56± 1,41 * |

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

Для исследования изменений в содержании кислорода в венозной крови использовали магнитно-резонансную томографию (МРТ) в режиме SWI в 3х точках: в контрольной группе, через 4 часа после стресса (в соответствие с первыми яркими предгеморрагическими изменениями в кислородном насыщении тканей мозга) и через 24 часа после стресса (геморрагический период).

Режим SWI предназначен для визуализации венозно-сосудистой архитектуры. Этот режим чувствителен к локальным полям неоднородности венозной крови, он более чувствителен для обнаружения магнитных веществ, таких как дезоксигемоглобин, железо и т.д. (Nathaniel et al, 2004; Hsieh et al., 2016). Кроме того, SWI также широко используется в клинике для визуализации и диагностики венозно-сосудистых катастроф, как инсульт, травматических повреждений головного мозга.

На рисунке 8 представлены результаты магнитной резонансной томограммы в режиме SWI у новорожденных крыс.

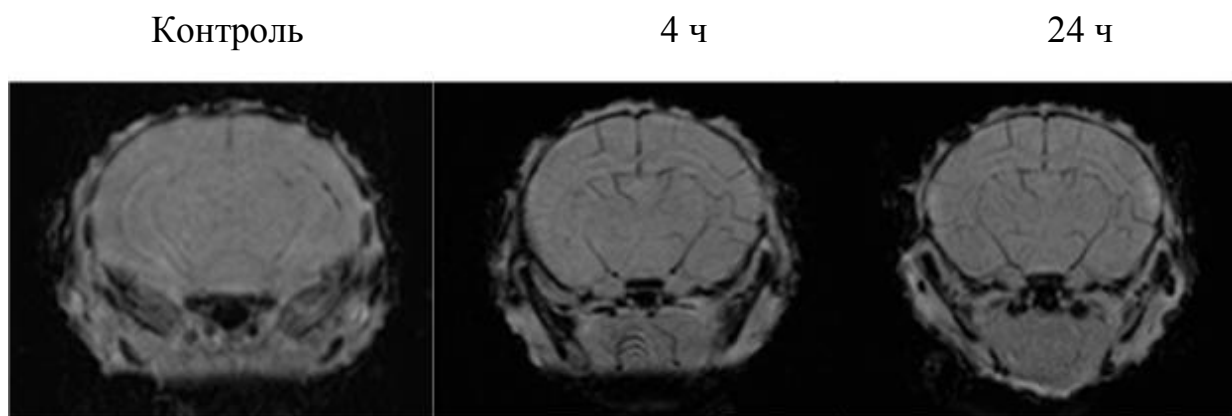


Рисунок 8 – МРТ- SWI изображение мозга новорожденных животных в норме (контроль), в пред-геморрагический (4 часа после стресса) и пост-геморрагический (24 часа после стресса) периоды.

Так, пред-геморрагический период характеризовался гипоинтенсивным контрастированием сосудов головного мозга, которое усиливалось в пост-геморрагический период. Гипоинтенсивное контрастирование связано с

ослаблением сигнала и, как следствие, обнаруживает себя в виде более четко прорисованных сосудов на МРТ-изображениях. Данные изменения вызваны повышением уровня дезоксигемоглобина, который является следствием гипоксии, приводящей к снижению уровня насыщения крови кислородом.

Таким образом, снижение уровня кислорода в мозге является одним из механизмов, предшествующих и сопровождающих стресс-индуцированные кровоизлияния в мозг у новорожденных крыс. Это связано с тем, что гипоксия является одной из главных причин патологических изменений в мозговой кровотоке (Bodin et al., 1995; Tomiyama et al., 1999; Qiao et al., 2007; Ветчинкина и др., 2013; Созаева и др., 2014; Sanborn et al., 2014; Cerbo et al., 2015; Hsieh et al., 2016). Полученные данные согласуются с результатами ряда работ, в которых гипоксию рассматривают как потенциальный фактор риска развития внутричерепных кровотечений в неонатальный период (Michoulas et al., 2001; van der Aa et al., 2014; Luo et al., 2014).

3.2 Исследование влияния гипоксии на стресс-реактивность церебральных сосудов у новорожденных крыс

Известно, что церебральный кровоток подчиняется различным системным и гуморальным регуляторным механизмам, в частности, остро реагирует на изменения содержания кислорода в артериальной крови (Bodin et al., 1995; Tomiyama et al., 1999; Sanborn et al., 2014; Semyachkina-Glushkovskaya et al., 2015, 2016).

Научная литература, отражающая влияние снижения кислородной сатурации тканей мозга на церебральный кровоток, весьма обширна, включая исследования гипоксических явлений в постинсультный период (Thoresen et al., 2001; McConnell, 2015). Однако, вопрос, какое воздействие оказывает гипоксия на устойчивость церебральных сосудов к повреждениям, предшествующим «мозговым катастрофам», остается малоизученным и актуальным для детальных исследований.

Для решения поставленной задачи были выбраны группы:

- 1) контроль или здоровые новорожденные крысы (n=25);
- 2) группа, состоящая из стрессированных новорожденных крыс в пред-геморрагический период (2 – 4 – 6 – 8 часов послед звукового стресса, n=25 в каждой группе);
- 3) группа, включающая стрессированных новорожденных крыс в пост-геморрагический период (24 часа послезвукового стресса, n=27).

Исследования церебрального кровотока проводили на уровне микроциркуляторного русла, как основного компонента перераспределения кровотока, и на уровне венозного компонента, как емкостного звена церебральной гемодинамики. Для этого объектом исследований был выбран сагиттальный синус, который собирает кровь из всех вен мозга и направляет ее в периферическое русло.

Рассмотрим результаты исследования. Рисунок 9 показывает зависимость диаметра сагиттального венозного синуса от времени, то есть до и после стресс-

индуцированных кровоточений в мозге новорожденных крыс. У крыс контрольной группы диаметр синуса составил $0,32 \pm 0,02$ мм. После стрессирования наблюдалось постепенное увеличение диаметра сосуда (через 2 часа – $0,55 \pm 0,04$ мм, 4 часа – $0,80 \pm 0,03$ мм, 6 часов – $0,98 \pm 0,02$ мм, 8 часов – $1,0 \pm 0,02$ мм, $p < 0,05$). Максимальное изменение данного параметра наблюдалось через 24 часа после стрессирования и составило $1,3 \pm 0,01$ мм ($p < 0,05$).

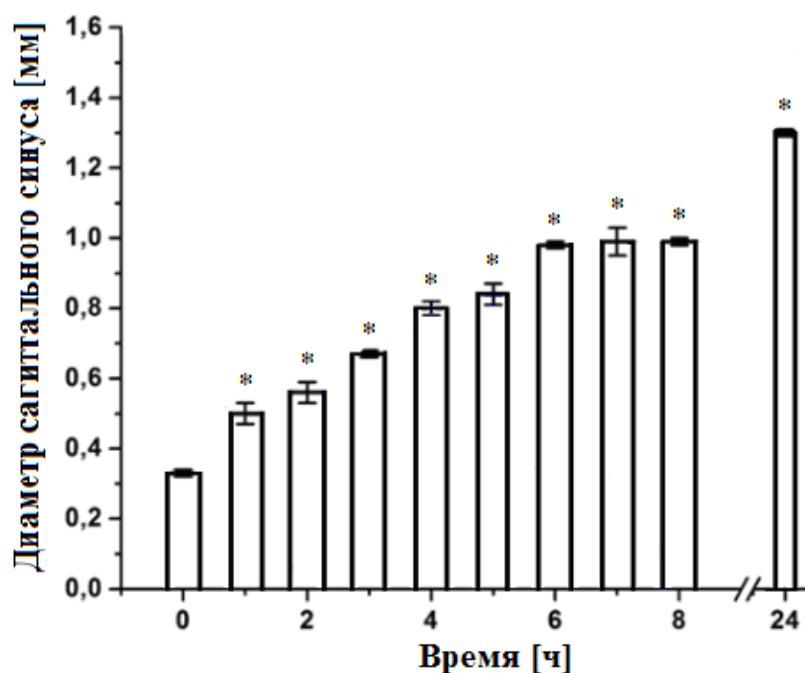


Рисунок 9 – Изменение диаметра сагиттального синуса в пред-геморрагический и в пост-геморрагический периоды по сравнению с контрольной группой крыс; $p < 0,05$ относительно: * – контроля.

Таким образом, диаметр сагиттального синуса увеличивался в 1,7 – 2,5 – 3,1 – 3,1 – 4,1 раза ($p < 0,05$) через 2 – 4 – 6 – 8 – 24 часа соответственно после стресса по сравнению с контрольной группой.

Рисунок 10 демонстрирует зависимость от времени скорости кровотока в сагиттальном синусе до и после стресс-индуцированных кровоточений в мозге новорожденных крыс. Скорость кровотока измеряли с помощью ДОКТ в физиологических единицах (мм/сек) У контрольной группы скорость кровотока мозга составила $7,3 \pm 0,09$ мм/с. После звукового воздействия наблюдалось

постепенное снижение скорости кровотока в сагиттальном синусе. Через 2 часа скорость составила $5,1 \pm 0,08$ мм/с, а спустя еще два часа – $4,2 \pm 0,07$ мм/с. После 6 часов скорость снизилась до $3,0 \pm 0,05$ мм/с, а после 8 часов – до $2,3 \pm 0,04$ мм/с. Максимальное изменение этого параметра наблюдалось через одни сутки, и составило $2,1 \pm 0,07$ мм/с.

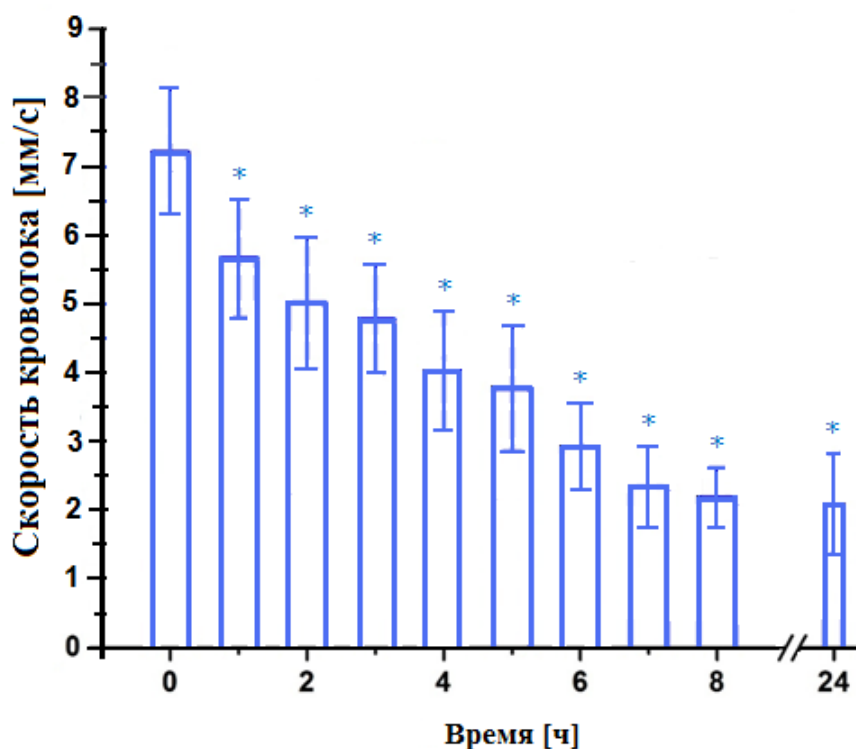


Рисунок 10 – Изменение скорости кровотока в сагиттальном синусе в пред- и пост-геморрагические периоды относительно контрольной группы крыс; $p < 0,05$ относительно: * – контроля.

Таким образом, скорость кровотока в сагиттальном синусе уменьшалась на 31% – 43% – 59% – 69% – 72% ($p < 0,05$) через 2 – 4 – 6 – 8 – 24 часа соответственно после стресса по сравнению с животными из контрольной группы.

Результаты исследования мозгового кровотока в сагиттальном синусе, измеренного методом ДОКТ, подтверждают данные, полученные с помощью лазерной спекл-визуализации (рис. 11). Измерения с помощью этого метода проводили как в сагиттальном синусе, так и в окружающих его микрососудах мозга.

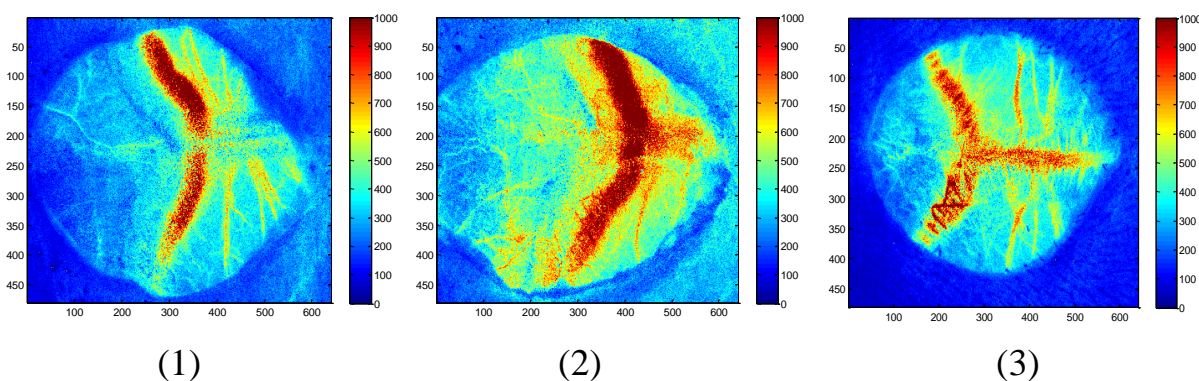


Рисунок 11– Лазерная спекл-визуализация изменений в сагиттальном синусе и окружающих его сосудах микроциркуляторного русла у новорожденных крыс: (1) – в нормальном состоянии, (2) – в пред-геморрагический период, 4 часа после стресса, (3) – в пост-геморрагический период, наследующий день после стресса.

Поскольку спекл-анализ кровотока мозга отражает перфузию в условных единицах, то кровоток сагиттального синуса был принят за единицу. Применение метода лазерной спекл-визуализации позволило выявить значительные изменения в церебральном кровотоке у новорожденных крыс через 4 часа после стрессирования. Перфузия в сагиттальном синусе повышалась на 25% ($p < 0,05$). Через 24 часа после стресса у крыс со стресс-индуцированными кровоизлияниями в мозге перфузия была выше в сагиттальном синусе на 33% ($p < 0,05$) (рис. 12).

Стоит отметить, что не было выявлено никаких изменений со стороны микроциркуляции в пред-геморрагический период. Перфузия в микрососудах оставалась на уровне нормы и была равна 0,70 усл.ед. (в норме – 0,67 усл.ед.). Через сутки после отмены стресса было выявлено переполнение микрососудов кровью и перфузия в них уже составила 0,78 усл.ед., то есть возросла на 16% ($p < 0,05$) по сравнению со значениями контроля и пред-геморрагического состояния.

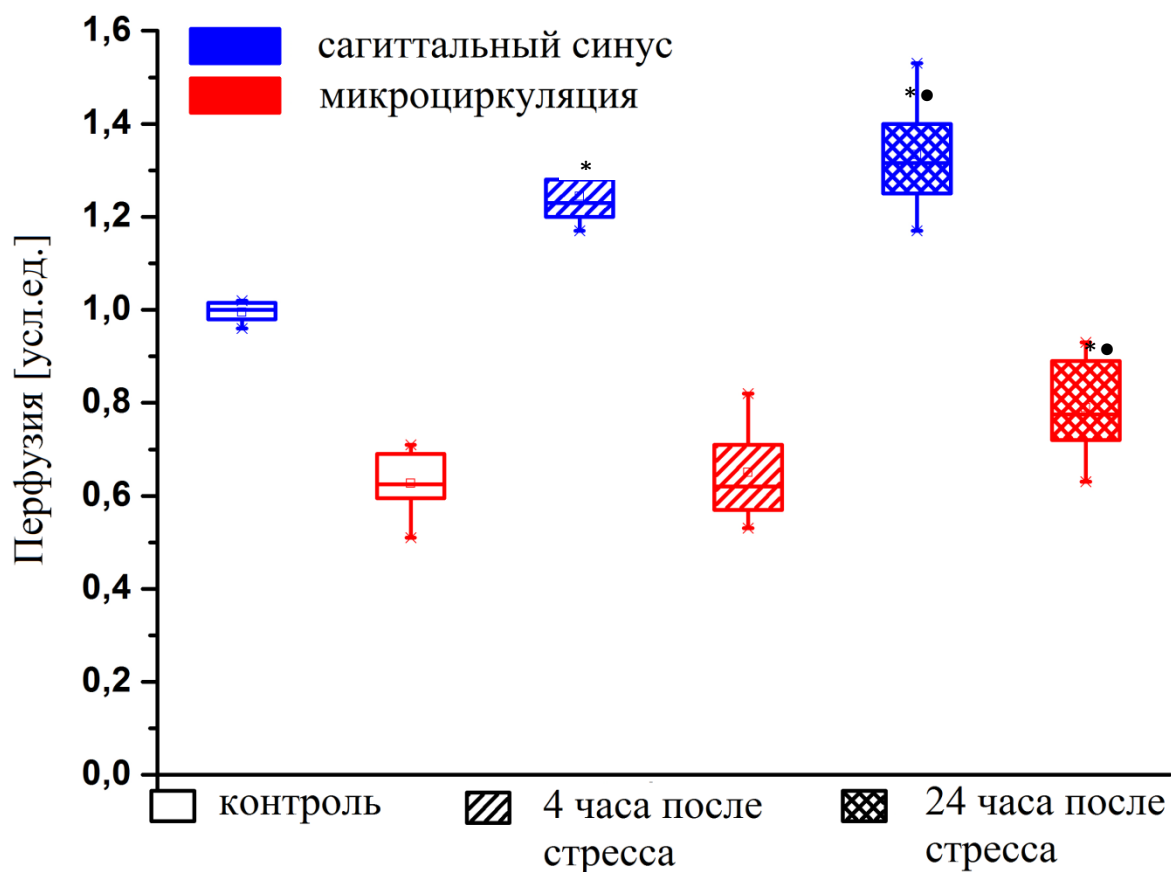


Рисунок 12 – Изменения кровотока мозга в нормальном состоянии, через 4 часа и 24 часа после стресса у новорожденных крыс; $p < 0,05$ относительно: * – контроля, • – между группами.

Таким образом, результаты показывают, что в пред-геморрагическом периоде отмечалось 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.

В целом, результаты двух серий экспериментов, отраженных в главах 3.1 и 3.2, позволяют заключить, что вены являются более чувствительным компонентом церебральной гемодинамики к гипоксии, чем сосуды микроциркуляторного русла. Уже в пред-геморрагический период отмечается релаксация сагиттального синуса и снижение скорости кровотока в нем. Пост-геморрагический период характеризуется прогрессированием указанных

изменений на фоне подключения изменений микрососудов мозга, которые также становятся переполненными кровью в силу снижения венозного оттока.

Гипоксия является одной из основных причин критических патологических изменений вен мозга, связанных с интракраниальными гемorragиями. Наши результаты свидетельствуют о том, что снижение кислородной сатурации тканей мозга сопровождается релаксацией церебральных вен. Вазорелаксирующие эффекты гипоксии на сосудистую систему мозга и связь гипоксии с гиперперфузией описаны также в других исследованиях (Bodin et al., 1995; Tomiyama et al., 1999). Нормальной физиологической реакцией на снижение доставки кислорода является релаксация сосудов головного мозга, что активизирует обмен веществ в тканях мозга через увеличение церебрального кровотока. Особенностью мозговых вен является то, что у них нет клапанов, и в их тонкой стенке отсутствуют мышцы, поэтому они имеют низкую устойчивость к критическим растяжениям во время накопления крови в них (Kiliç et al., 2007). Незрелые сосуды головного мозга новорожденных имеют ограничение в способности растягиваться. Расширение сосудов мозговых вен, вызванное гипоксией, является причиной повышения церебрального венозного давления (Volpe, 2008). Высокое давление может легко вызвать разрыв тонких стенок незрелых мозговых вен новорожденных (Hambleton et al., 1976).

3.3 Изучение вклада стресс-индуцированного нарушения кислородного снабжения тканей мозга и его кровообращения на барьерную функцию мозга новорожденных крыс

Гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) представляет собой подвижную морфофункциональную структуру, контролирующую обмен веществ между кровью и тканями мозга (Hawkins et al, 2005; Чехонин и др., 2012; Блинов, 2013; van der Meer et al., 2015). Известно, что барьерная функция мозга зависит от функционального состояния организма и быстро меняется при различных сосудистых патологиях, в частности, на фоне инсульта головного мозга. Так, существуют работы на людях и взрослых животных, где выявлена высокая проницаемость ГЭБ в постинсультный период (Hamann et al., 1995; Dirnagl et al., 1999; Kirsch et al., 2001; Wolburg et al., 2002; Deli et al., 2005; Hall et al., 2014; Zhao et al., 2015). Но стоит отметить, что в основном все работы в этой области касаются изучения проницаемости ГЭБ у взрослых, а не у новорожденных. Из известных нам работ существует только одна, проведенная американской группой, в которой приведены данные исследования состояния ГЭБ при развитии ишемического инсульта у новорожденных крыс (Fernández-López, 2012). В этой работе было показано, что устойчивость ГЭБ к повреждениям, связанных с инсультом, у новорожденных крыс, выше, чем у взрослых животных. Однако, отметим, что 85% неонатального инсульта является геморрагическим, поэтому данные исследования, полученные на модели церебральной ишемии, соответствуют только 15% случаям ишемического инсульта в первые дни после рождения (Semyachkina-Glushkovskaya et al., 2016).

Вышеперечисленные факты позволяют понять, что влияние таких факторов как гипоксия и нарушения мозгового кровотока, могут явиться важными факторами, определяющими стресс-устойчивость церебральных сосудов к повреждениям за счет модуляции проницаемости ГЭБ.

В наших предыдущих главах (3.1. и 3.2) мы показали сосудистые изменения церебрального кровотока в условиях гипоксии, включая микроциркуляторное

звено, которое является анатомической структурой локализации ГЭБ (Abbott et al., 2009; 2010; 2011). На основании этих собственных результатов и анализа литературных данных нами была выдвинута гипотеза о влиянии гипоксии и, связанных с этим нарушений церебрального кровотока, на барьерную функцию мозга.

Исследования состояния ГЭБ проводили на стрессированных новорожденных крысах с учетом степени гипоксии в пред- и пост-геморрагический периоды. Было выделено 3 группы животных: 1 группа – интактные или контрольные животные (n=27), 2 группа – животные с умеренной гипоксией в пред-геморрагический период (4 часа после стресса), n=36), 3 группа – животные с выраженной гипоксией в пост-геморрагический период (24 часа после стресса, n=36).

Проницаемость ГЭБ у новорожденных крыс оценивали с введением сосудистых меток. Для оценки проницаемости ГЭБ для низкомолекулярных веществ использовали внутривенное введение гадолиния (552 Да) с последующей оценкой результатов на МРТ, а также гистологический метод для анализа экстравазации воды из крови в ткани мозга. Для высокомолекулярных соединений применяли внутривенное введение декстрана (70 кДа) и красителя Evans Blue (68 кДа). Результаты для декстрана оценивали методом конфокальной микроскопии, для Evans Blue – флуорометрическим методом.

На рисунках 13А представлены МРТ изображения тканей мозга новорожденных крыс в контрольной группе с введением гадолиния. В условиях нормы гадолиний не проникает через ГЭБ и остается в пределах церебральных сосудов.

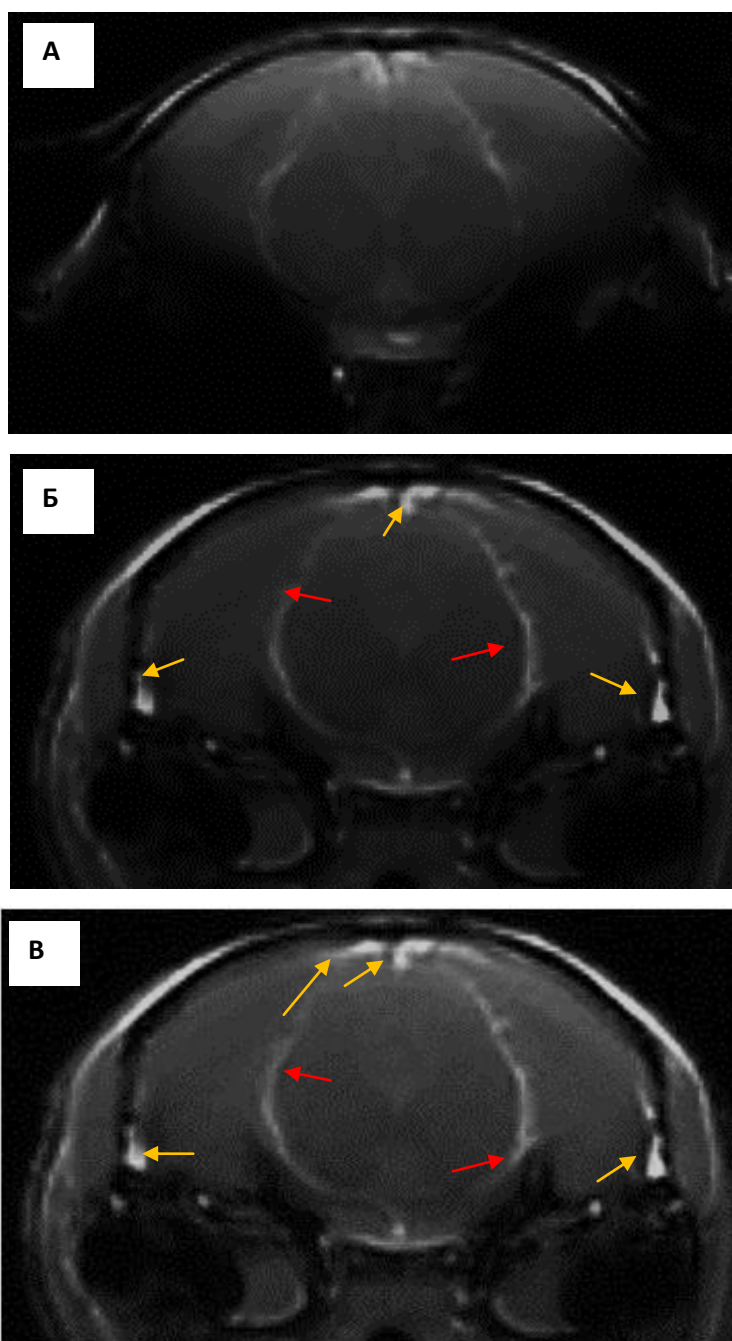


Рисунок 13 – МРТ-изображение интенсивности сигнала после внутривенного введения гадолиния: А — норма с введением гадолиния до звонка (неяркое свечение, гадолиний в пределах сосудов), Б – через 4 часа после стресса (пред-геморрагический период, выраженное свечение в области сосудов, умеренная экстравазация гадолиния), В – через 24 часа после стресса (пост-геморрагический период, яркое свечение, прогрессирование выхода гадолиния из сосудов в паренхиму мозга).

На рисунке 13Б отражено состояние ГЭБ в пред-геморрагический период, когда наблюдается умеренная гипоксия и венозный застой без каких-либо изменений в области микроциркуляции. Важно отметить, что по результатам МРТ анализа было обнаружено повышение проницаемости ГЭБ к гадолинию уже на стадии пред-инсульта в условиях отсутствия видимых сдвигов на уровне функциональной платформы для ГЭБ (микрососуды). Как видно из рисунка 13Б в области сагиттального синуса (объекта оптического исследования венозного компонента церебрального кровотока, глава 3.2) отмечался повышенный МРТ сигнал, являющийся признаком открытого ГЭБ.

Отметим, что на момент развития интракраниальных геморрагий (24 после стресса) указанные нарушения барьерной функции мозга усугублялись, что проявлялось в более выраженном МРТ сигнале в той же области (рис. 13В). Необходимо сказать, что эти изменения уже сопровождалось застоем в области микроциркуляции (повышение перфузии, глава 3.2).

Аналогичные результаты были получены по данным гистологии в отношении проницаемости ГЭБ к воде.

Рассмотрим результаты гистологического анализа. На рисунке 14 показано состояние тканей мозга новорожденной крысы в нормальном состоянии без какого-либо воздействия.

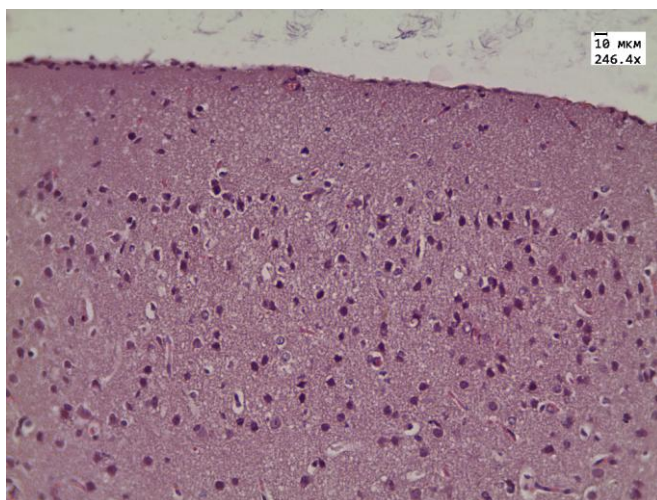


Рисунок 14 – Ткани мозга здоровой новорожденной крысы.

Отметим, что через 4 часа после отмены звукового стресса наблюдалась умеренная периваскулярная эдема, что свидетельствует о выходе жидкости из крови в окружающее церебральные сосуды пространство (рис. 15А). На следующие сутки после звукового воздействия наблюдалось прогрессирование указанных изменений, то есть периваскулярная эдема становилась более выраженной (рис. 15Б).

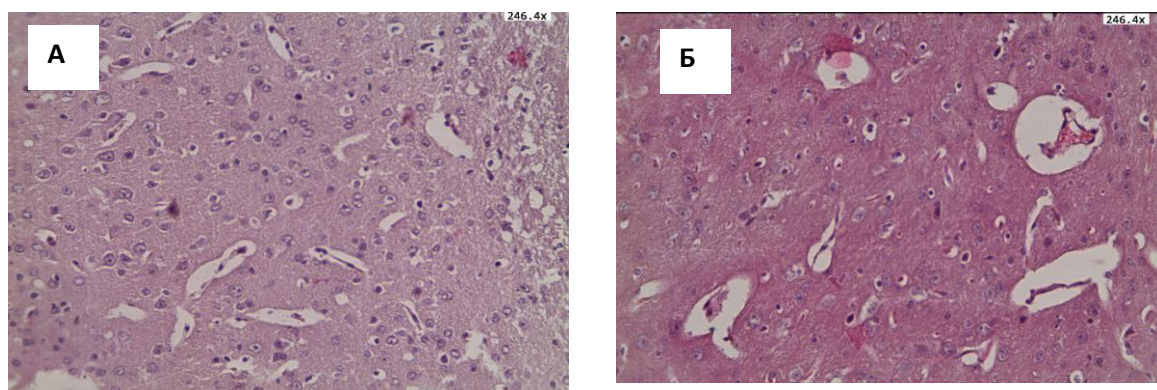


Рисунок 15 – Данные гистологического исследования формирования периваскулярной эдемы (диффузия воды из сосудов мозга в его ткани) в пред- и постгеморрагический периоды: А – 4 часа после стресса (пред-геморрагический период, умеренный вазогенный отек мозга), Б – 24 часа после стресса (пост-геморрагический период, выраженный вазогенный отек мозга).

На следующем этапе изучали проницаемость ГЭБ к высокомолекулярным соединениям с помощью внутривенного введения краски Evans Blue (68,5 кДа) и декстрана(70 кДа).

Краситель Evans Blue имеет молекулярный вес 961 Да, но при попадании в кровь быстро вступает во взаимодействие с альбуминами плазмы крови, за счет чего увеличивает свой вес до 68,5 кДа (Gregersen et al., 1935; Rawson et al., 1943). Поэтому введенный внутривенно Evans Blue не проходит через ГЭБ в нормальном состоянии, но легко проникает через него при мозговых нарушениях

(Goldmann, 1982; Saria et al., 1983; Belayev et al., 1996; Chen et al., 2012; Wang et al., 2014).

Процедура проведения исследования проницаемости ГЭБ к Evans Blue представлена на рисунке 16.

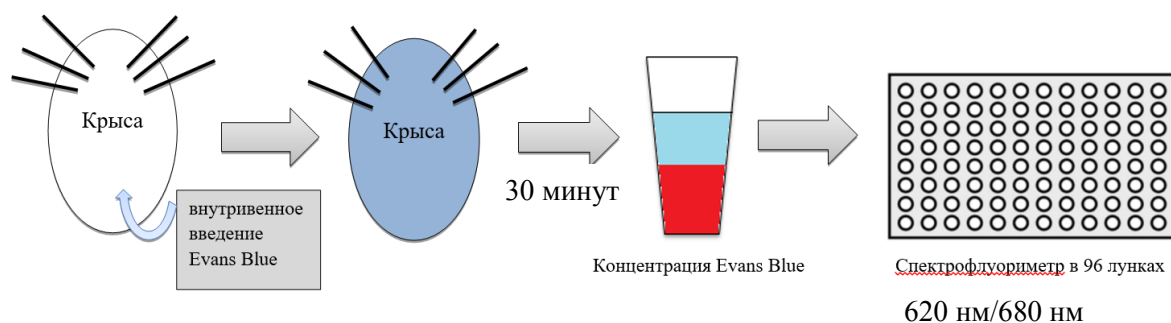


Рисунок 16 – Дизайн эксперимента с Evans Blue: схема определения концентрации Evans Blue флуориметрическим методом.

По результатам исследования было выявлено, что в норме после внутривенного введения Evans Blue не выходит за пределы церебральных сосудов. Но проницаемость ГЭБ к Evans Blue возрастала уже через 4 часа после отмены стресса, то есть в пред-геморрагический период, что отражалось в увеличении содержания краски в тканях мозга новорожденных крыс (рис. 17). Так, на данный период экстравазация Evans Blue составляла 0,98 мкг/г веса ткани мозга, что превышало нормальные значения на 98% ($p \leq 0,05$).

Из рисунка 17 видно, что через сутки после отмены стресса нарушение функции ГЭБ прогрессировало. Так, в условиях выраженной гипоксии, когда отмечалось переполнение микроциркуляторного русла кровью на фоне развития интракраниальных геморрагий, содержание Evans Blue в тканях мозга возросло на 190% по сравнению с интактными животными ($p \leq 0,05$) и составляло 1,9 мкг/г веса ткани мозга.

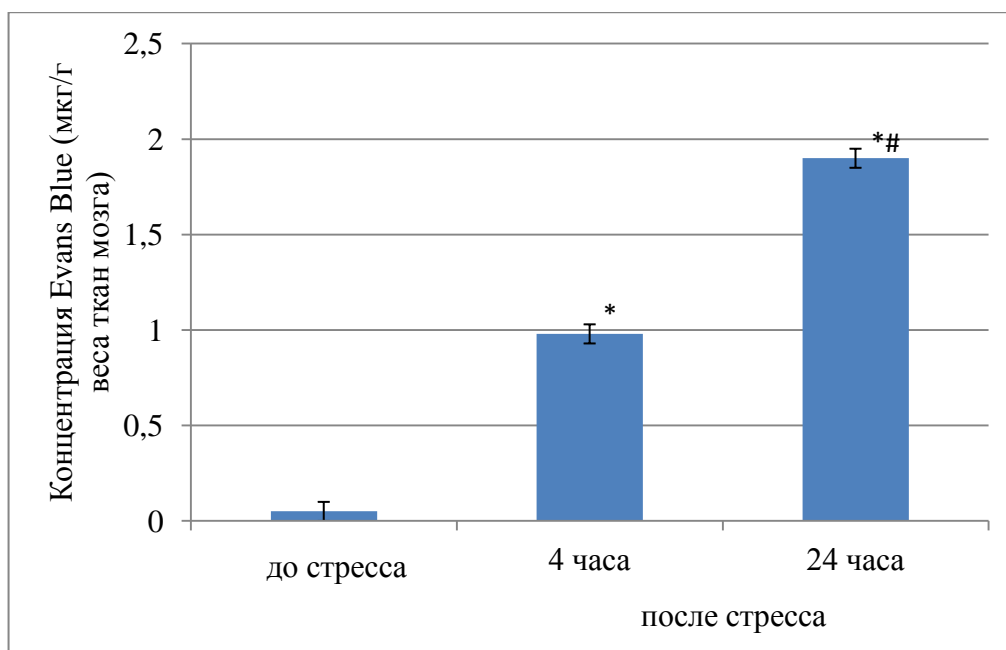


Рисунок 17 – Содержание Evans Blue в мкг/г веса ткани мозга новорожденных крыс в пред- (4 часа после стресса) и пост- (24 часа после стресса) геморрагическом состоянии, $p \leq 0,05$ относительно: * – до стресса, # – 4 часа после стресса.

Результаты данных о введении декстрана (70 кДа) *in vitro* представлены на рисунках 18. Как видно из рисунка 18 в условиях нормы декстран находился в церебральных сосудах. Однако через 4 часа после отмены стресса, отмечалось проникновение флуоресцентного декстрана, меченного родамином, из крови в ткань мозга, что проявлялось в виде красных «облаков» (вышедший за пределы декстран) вокруг капилляров. Это говорит об умеренном открытии ГЭБ. Через сутки после воздействия звуком декстран выходил за пределы не только сосудов микроциркуляторного русла, но и более крупных сосудов (артериолы, венулы), что свидетельствовало о значительном открытии ГЭБ.

Важно отметить, что экстравазация декстрана имела диффузный характер. То есть в разных областях мозга, преимущественно в коре больших полушарий, отмечались очаги из нескольких церебральных сосудов, вокруг которых наблюдалось повышение флуоресцентного сигнала или «облака», что свидетельствует о прохождении декстрана через ГЭБ.

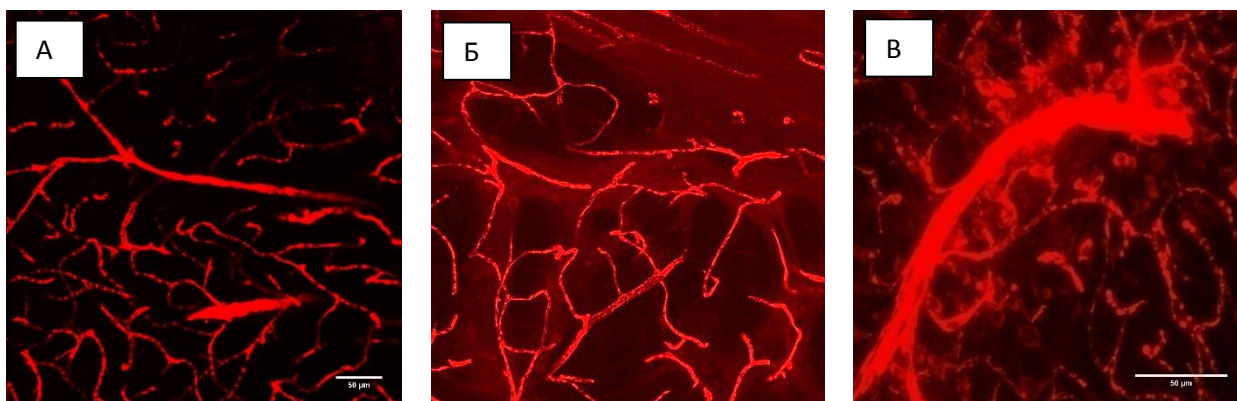


Рисунок 18 – Конфокальная микроскопия проницаемости гематоэнцефалического барьера для декстрана 70 кДа (0,5% раствор, iv, 30 мин после введения) у новорожденных крыс: А – контроль (до стресса), декстран внутри сосудов; Б – 4 часа после стресса, декстран за пределами капилляров в виде облака (умеренное открытие ГЭБ); В – 24 часа после стресса – декстран за пределами как капилляров, так и крупных сосудов мозга (значительное открытие ГЭБ).

Рисунок 19 отражает вклад каждого из изучаемых компонентов регуляции проницаемости ГЭБ в его нарушения.

Как видно из рисунка 19 в пред-геморрагический период в нарушении барьерной функции мозга играют роль только два фактора – стресс-индуцированные гипоксия и венозный застой, в то время как на уровне микрососудов, то есть анатомической локализации ГЭБ, не отмечалось видимых изменений по показаниям ДОКТ и LSCI. Роль микрососудов мозга прослеживается на пост-геморрагической стадии, когда за счет компенсаторного перераспределения церебрального кровотока отмечается переполнение микроциркуляторной сети мозга кровью. В этих условиях на фоне сохраняющейся гипоксии нарушения в барьерной функции мозга усугубляются.

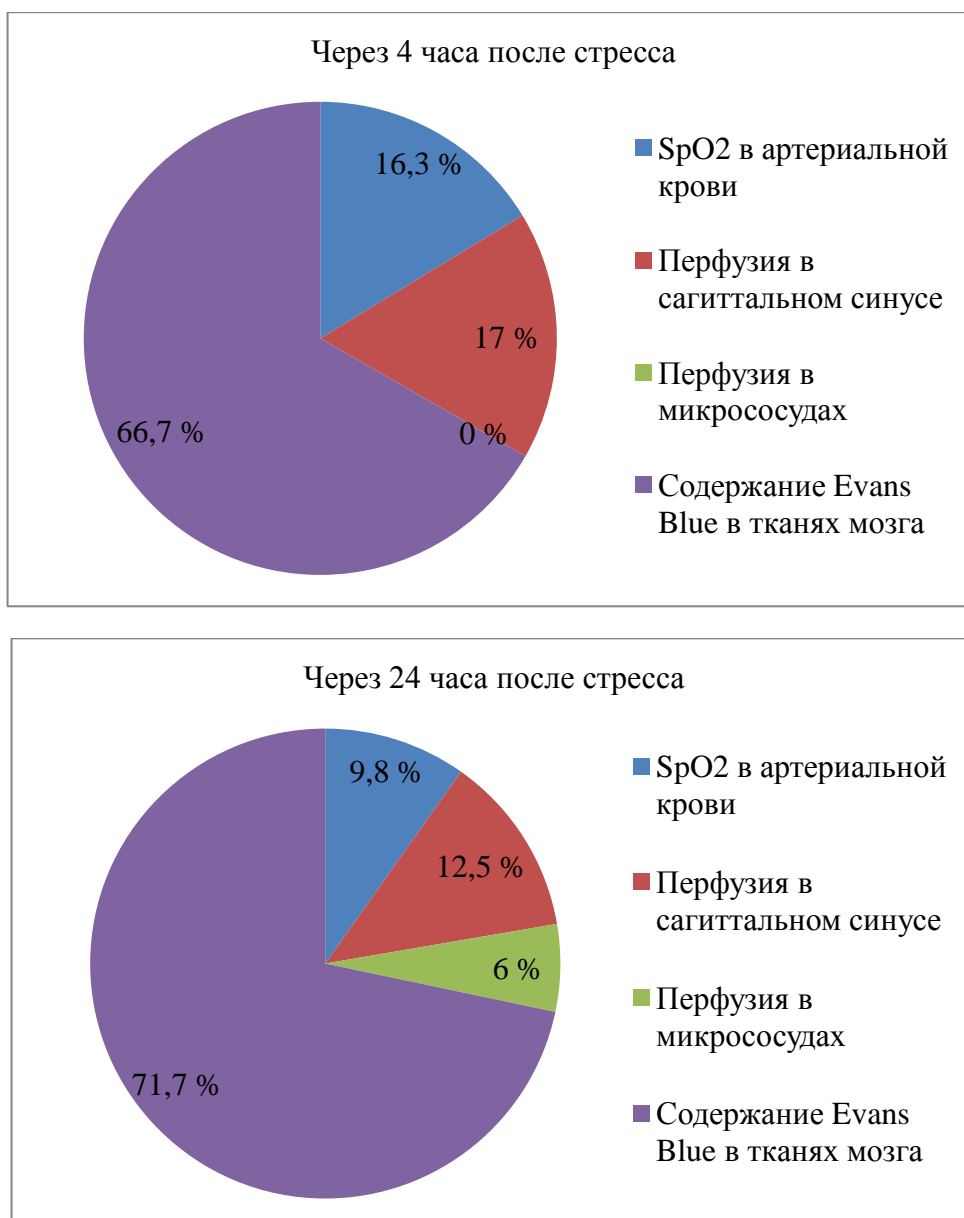


Рисунок 19 – Схематическое отображение интенсивности изменений в % со стороны показателей: кислородной сатурации; макро-и микроциркуляции в тканях мозга, проницаемости ГЭБ к Evans Blue под воздействием звукового стресса в пред- и пост-геморрагический периоды у новорожденных крыс.

Таким образом, вены на фоне гипоксии по сравнению с микроциркуляторным звеном церебрального кровообращения вносят более существенный вклад в повышение проницаемости ГЭБ, очевидно, за счет нарастания церебрального давления в сосудах мозга (Mayhan et al, 1986; Semyachkina-Glushkovskaya et al., 2015).

3.4 Изучение механизмов нарушения барьерной функции мозга в условиях стресс-индуцированного развития гипоксии и интракраниальных геморрагий у новорожденных крыс

Важную роль в работе ГЭБ играют плотные межклеточные контакты. Каждый контакт сформирован трансмембранными и цитоплазматическими белками, объединяющими белки цитоскелета и плотных контактов в жесткий клеточный каркас. К трансмембранным белкам относятся окклюдин и клаудин-5, которые характеризуют барьерный фенотип эндотелиальных клеток (Чехонин и др., 2012; Моргун, 2012; Блинов, 2013; 2014). Неклеточным компонентом ГЭБ является базальная мембрана, в состав которой входят ламинин и различные типы коллагена. Базальная мембрана, окружая эндотелиоциты сплошным слоем, является последней физической преградой транспорту крупномолекулярных веществ в составе ГЭБ (Чехонин и др., 2000; Ballabh et al., 2004).

В настоящее время существует множество работ по направлению изучения барьерной функции мозга *in vivo* и *in vitro* (Чехонин и др., 1989, 2003; Abel et al., 1993; Babu et al., 1994; Eng et al., 1994; Gasse et al., 1995; Блинов, 2004; Кувачева и др., 2013). Но как работает ГЭБ в условиях формирования стресс-индуцированных сосудистых катастроф у новорожденных на фоне развития гипоксии до сих пор остается неизученным.

В связи с этим на следующем этапе наших исследований мы оценивали экспрессию структурных элементов ГЭБ у стрессированных новорожденных крыс на разных стадиях гипоксии, сопровождаемой формированием интракраниальных геморрагий, а именно в норме, через 4 и 24 часа после стресса. Выборка каждой группы составила по 9 животных.

На рисунке 20А представлены результаты по экспрессии окклюдина и клаудина-5, полученные методом флуоресцентной гибридизации ДНК *in situ*, в мозге здоровых новорожденных крыс.

Развитие интракраниальных геморрагий сопровождается повышением экспрессии клаудина-5, но не окклюдина, что, возможно, связано с особенностями созревания структурных элементов ГЭБ (рис. 20Б).

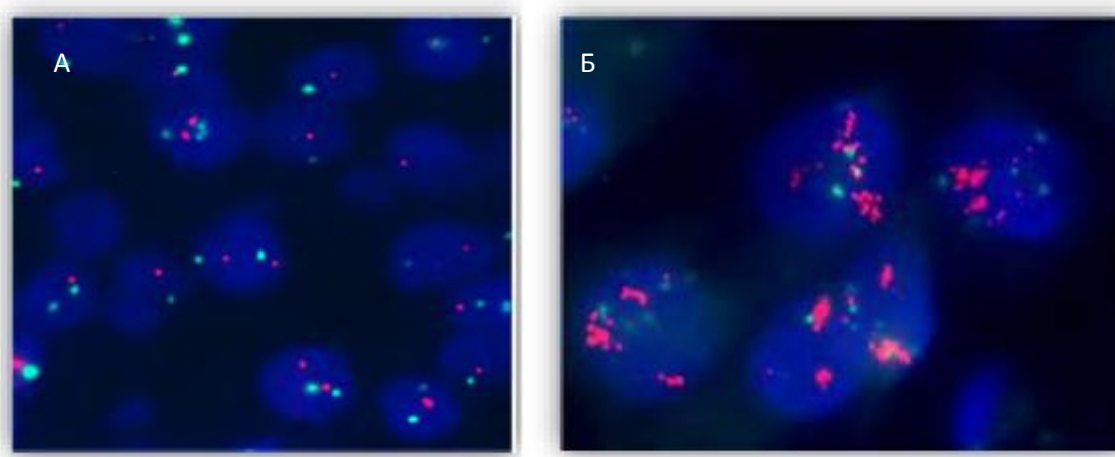


Рисунок 20 – Экспрессия клаудина-5 (розовый цвет) и окклюдина (голубой цвет) у новорожденной крысы в норме (А) и после интракраниальных геморрагий (Б), определенная методом флуоресцентной гибридизации ДНК *in situ*.

С помощью количественного ПЦР-анализа в реальном времени были охарактеризованы особенности экспрессии генов клаудина-5 и окклюдина в тканях мозга в норме и после перенесённого инсульта. Показано, что ген клаудина-5 по сравнению с окклудином имеет более высокий уровень экспрессии (в 3,3 раза) при стресс-индуцированных геморрагиях и равную экспрессию при обычных условиях.

Таким образом, выраженная гипоксия у новорожденных крыс в пост-геморрагический период сопровождалась изменением экспрессии белков первой линии защиты ГЭБ, а именно повышением экспрессии клаудина-5 по сравнению с окклудином.

Дополнительными результатами наших исследований явились данные фотоакустики, которые позволили обнаружить в период повышенной проницаемости ГЭБ на фоне интракраниальных геморрагий также его проницаемость к эритроцитам.

Рисунок 21 показывает, что эритроциты без повреждения микрососудов проходили через стенки и оседали в тканях мозга.

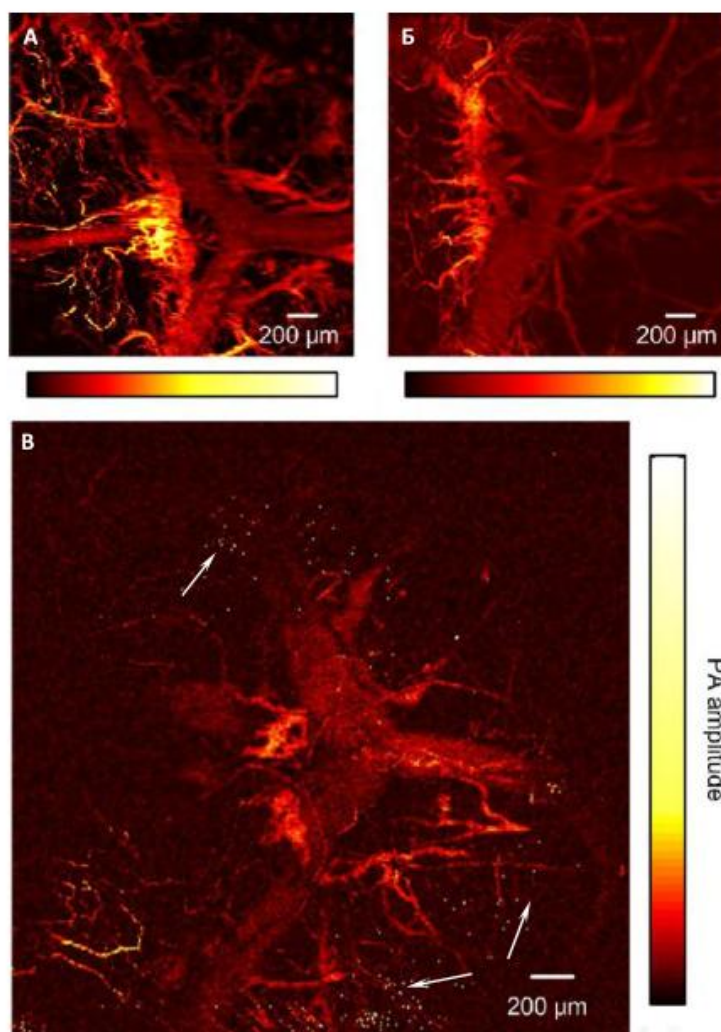


Рисунок 21 – Фотоакустическая визуализация сагиттального синуса и окружающих его сосудов у новорожденной крысы: А – в состоянии нормы; Б и В – в пред- и пост-геморрагический периоды. Стрелками показаны эритроциты за пределами кровеносного русла (белые точки).

Это может быть связано с повышением деформации эритроцитов. Эритроциты являются датчиками кислорода, позволяя локально управлять сосудами. В ответ на гипоксию эритроциты высвобождают главный вазорелаксант, такой как аденозин 5'-трифосфат (АТФ). Исследования показывают, что воздействие пониженного напряжения кислорода (~ 35 мм рт.ст.) достаточно, чтобы стимулировать высвобождение АТФ из

эритроцитов хомячков, кроликов, крыс и людей. Таким образом, АТФ освобождается из эритроцитов в образцах крови, подвергнутых гипоксии. АТФ высвобождается и способствует регуляции кровотока и доставки O_2 к тканям, чтобы удовлетворить метаболические потребности клеток. АТФ высвобождается при активации сигнального пути, который срабатывает, когда эритроциты входят в область, в которой потребность в кислороде выше. Таким образом, АТФ оказывает паракринный эффект, чтобы увеличить просвет сосудов и привести к увеличению подачи кислорода. Деформация эритроцитов является ключевым фактором к высвобождению АТФ (Черницкий, Воробей, 1981).

В ходе нашего эксперимента были выявлены различия в деформации эритроцитов у новорожденных крыс в зависимости от периода развития стресс-индуцированных внутримозговых кровотечений.

Рисунок 22 отражает глубину аспирации при давлении 30 Н/м^2 в пробах крови, взятых в разный интервал времени после стресса. Каждая точка соответствует среднему значению измерений, проведенных с 30 эритроцитами.

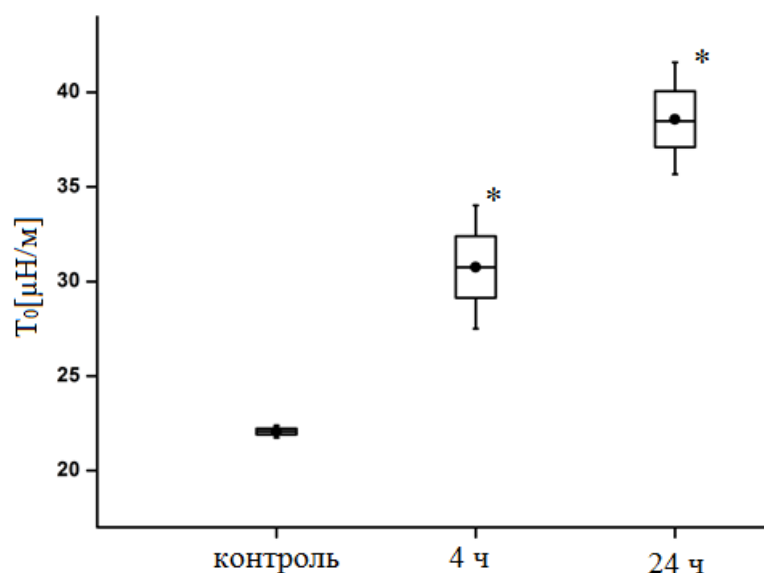


Рисунок 22 – Глубина аспирации эритроцитов у новорожденных крыс в контрольной группе и через 4 и 24 часа после стресса; $p < 0,05$ относительно:

* – контроля.

Деформируемость эритроцитов у новорожденных белых крыс увеличилась на 36% ($p < 0,05$) в пред-геморрагический период (4 часа после стресса). По мере развития внутричерепных кровотечений в пост-геморрагический период (24 часа после стресса) деформируемость возросла на 40% ($p < 0,05$) по сравнению с контрольной группой (рис. 22).

Эти результаты свидетельствуют о том, что умеренная и выраженная гипоксия, а также патологические изменения параметров сагиттального синуса сопровождались увеличением упругости эритроцитов, которая предшествует и сопутствует стресс-индуцированным кровоизлияниям в мозге у новорожденных крыс.

3.5 Исследование последствий воздействия стресс-индуцированного развития гипоксии и интракраниальных геморрагий на состояние коры больших полушарий у новорожденных крыс

Кора головного мозга представляет собой специальную зону мозга, которая включает в себя высокоорганизованные районы, играющие ключевую роль в памяти, внимании, восприятии, осознании, мышлении, речи и понимании. Учитывая, что область, отвечающая за когнитивные функции, содержит наибольшее количество капилляров по сравнению с другими мозговыми областями, то когнитивный дефицит тесно взаимодействует с критическими изменениями кислородной сатурации артериальной крови и мозгового кровотока, связанных с кровоизлияниями мозга у новорожденных (Elston et al., 2003; Rooks, 2008; Jhavar et al., 2013;). Однако, как именно влияют эти патологические процессы на кору головного мозга до конца не известно. Чтобы ответить на этот вопрос, на заключительном этапе нашей работы, мы изучали морфологические изменения в молекулярном слое коры и пирамидальных нейронов, которые имеют решающее значение для «обратной связи» взаимодействий в коре головного мозга (Gilbert and Sigman, 2007), участвующих в ассоциативном обучении и внимании, на разных стадиях развития интракраниальных геморрагий у новорожденных крыс.

Гистологический анализ тканей мозга для оценки морфометрических показателей пирамидальных клеток коры новорожденных крыс проводили в 3 этапа: в нормальном состоянии (n=9), через 2 – 4 – 6 – 8 часов после отмены звукового стресса (пред-геморрагический период, n=9 в каждой группе), через 24 часа (пост-геморрагический период, n=9).

Наши результаты, представленные в таблице 2, ясно показывают, что на фоне умеренной гипоксии в пред-геморрагический период постепенно уменьшалась толщина молекулярного слоя коры головного мозга, а также снижалось количество пирамидальных клеток, связанное с редукцией их диаметра.

Морфометрические параметры пирамидальных нейронов коры больших полушарий мозга

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

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

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

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

Относительно диаметра пирамидальных клеток наблюдалась та же картина. Так вовремя предгеморрагического периода (2 – 4 – 6 – 8 часов после стресса)

диаметр пирамидальных клеток уменьшался на 19% – 20% – 29% – 39%, $p < 0,05$, соответственно (табл. 2).

На рисунках 23 и 24 представлены изображения гистологического анализа, иллюстрирующие диаметр пирамидальных клеток и толщину молекулярного слоя коры головного мозга новорожденной крысы в предгеморрагический (2 – 4 – 6 – 8 часов после стресса) и постгеморрагический периоды (24 часа после стресса).

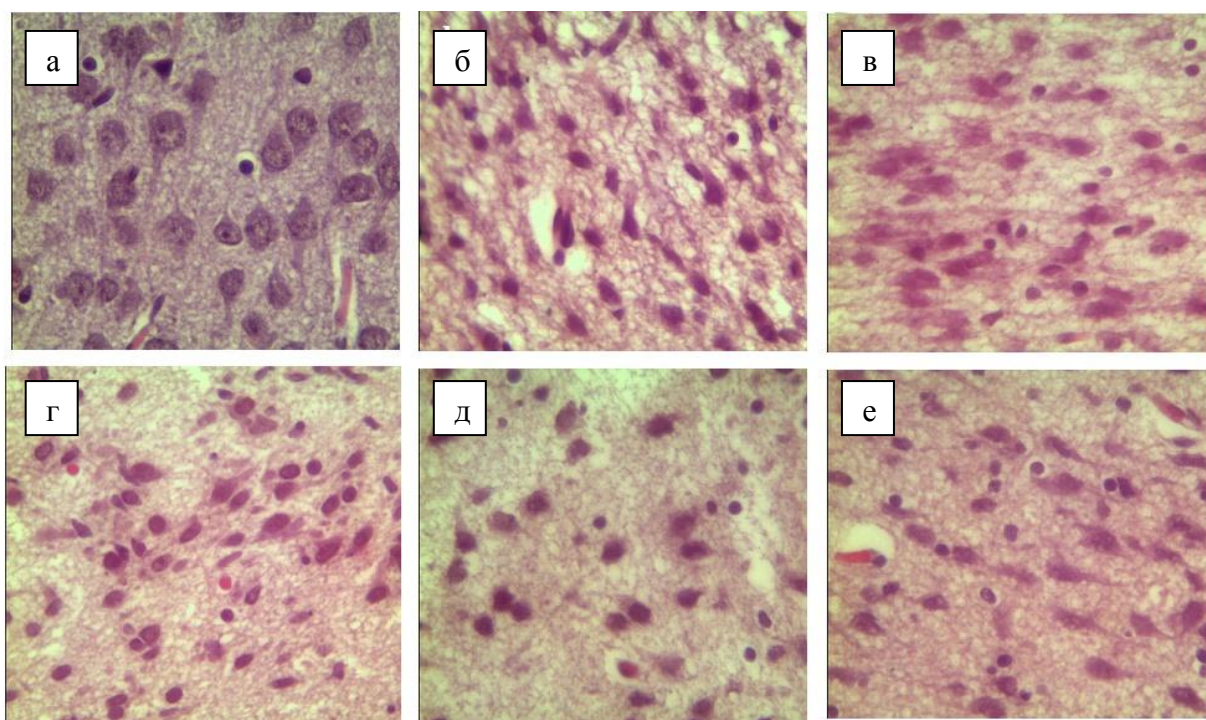


Рисунок 23 – Изображение диаметра пирамидальных нейронов новорожденных крыс в норме (а) и 2 ч (б), 4 ч (в), 6 ч (г), 8 ч (д), 24 (е) после стресс. Окраска гематоксилином и эозином. Толщина среза 10 μm (774X).

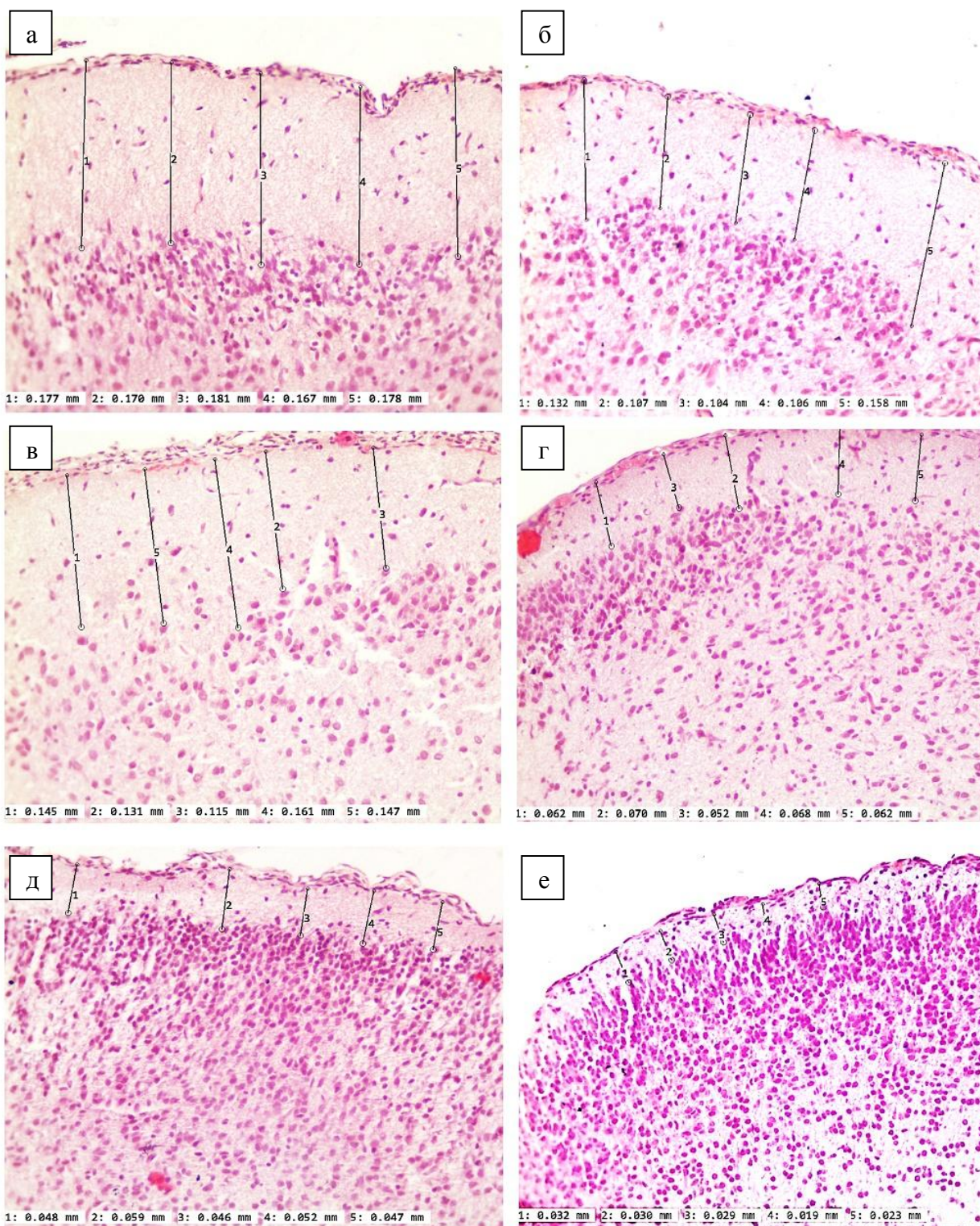


Рисунок 24 – Толщина молекулярного слоя коры больших полушарий новорожденных крыс в номе (а) и 2 ч (б), 4 ч (в), 6 ч (г), 8 ч (д), 24 (е) после стресс. Окраска гематоксилином и эозином. Толщина среза 10 μ m (774X).

Образование мозговых геморрагий сопровождалось более выраженным истончением толщины молекулярного слоя коры, которая уменьшилась на 73% ($p < 0,05$) по сравнению с нормальным состоянием. Количество пирамидальных клеток и их диаметр снизились на 34% ($p < 0,05$) и 38% ($p < 0,05$) соответственно, т.е. оставались на низком уровне (табл. 2). Эти патологические изменения в коре сопровождались апоптозом пирамидальных клеток (рис. 25).

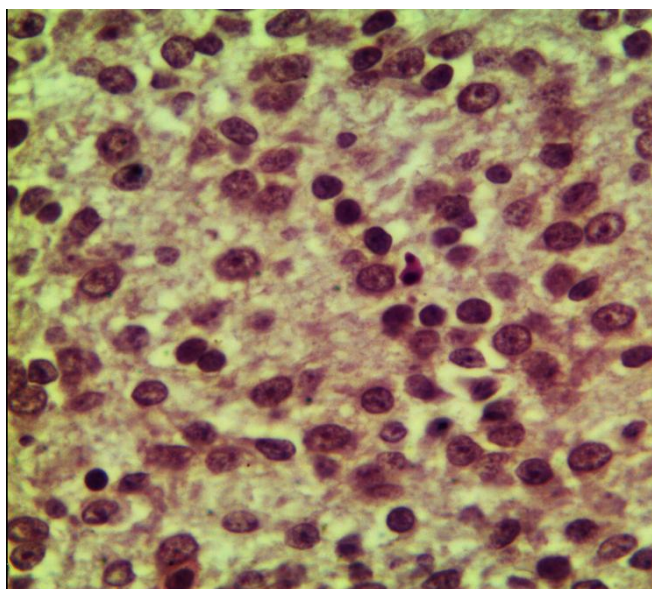


Рисунок 25 – Апоптические тельца в коре больших полушарий мозга новорожденной крысы через 24 часа после стресса (признаками апоптоза является конденсация и фрагментация ядер в эозинофильной цитоплазме). Окраска гематоксилином и эозином. Толщина среза 10 μm (774X).

Результаты этой серии экспериментов показывают, что гипоксия и снижение кровообращения в церебральной венозной системе являются важными факторами для появления нарушений в функциональной платформе интеграции мозговых центров, таких как молекулярного слоя коры и пирамидальных нейронов.

ГЛАВА IV

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Целью исследования явилось изучение роли гипоксии в устойчивости церебральных сосудов в первые дни после рождения к стрессу и повреждениям ГЭБ в этих условиях у новорожденных крыс.

Мотивацией для проведения исследований явился тот факт, что развитие стресс-индуцированных повреждений сосудов мозга у новорожденных детей представляет актуальную, но малоизученную проблему в фундаментальной и клинической физиологии. В последние 15 лет активно обсуждается тот факт, что на фоне родового стресса в 50% случаев у новорожденных возникают бессимптомные мелкоочаговые геморрагии (Whitby, 2004; Looney, 2007; Semyachkina-Glushkovskaya et al., 2016). На диагностируемых случаях установлено, что у таких детей, несмотря на отсутствие явных признаков сосудистой патологии на момент развития интракраниальных геморрагий, последствия данного состояния значительные и проявляются в развитии когнитивной недостаточности, нарушении концентрации внимания, логики, снижении физической работоспособности (Fisher et al., 2000; Зарубина и Павлова, 2007; Латышева и Лемешков, 2008; Раимкулов, 2014).

Существует предположение, что одним из основных факторов риска развития мозговых кровоизлияний у новорожденных в первые дни жизни является стресс, которому дети подвергаются во время эмбрионального развития из-за различных негативных состояний беременной женщины, а также критические физиологические изменения во время родов и в период интенсивной адаптации к новым условиям жизни. Первые 3 дня жизни наиболее критические. Смертность в эти сроки составляет около 75% всех случаев смерти новорожденных (Paul, 2006; Lawn et al., 2010).

В большинстве случаев неонатальные интракраниальные геморрагии связаны с гипоксией. Так, в работе Y. Tomiyama было установлено, что из

250 новорожденных с мозговыми кровоизлияниями, у 35% эти нарушения были связаны с тяжелой гипоксией (Tomiyama et al., 1999).

Однако остается неизвестным, является ли гипоксия следствием или причиной стресс-индуцированных мозговых геморрагий, поскольку кровь токсична и само геморрагическое состояние может быть причиной гипоксии (Michoulas et al., 2001; Jhavar et al., 2003; Luo et al., 2014). Данная проблема определила задачи диссертационного исследования.

На первом этапе исследований была поставлена задача изучения взаимосвязи между стрессом, гипоксией и интракраниальными геморрагиями на модели стресс-индуцированных мозговых кровотечений у новорожденных крыс (Патент РФ 2505865).

Выбор данной модели обусловлен следующими фактами. Повреждающее воздействие звука на церебральные сосуды объясняется 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 (McCalden, 1981; Bevan, 1981; Busija, 1984; Edvinsson, 1993, 2002). Одной из важных особенностей развития мозговых геморрагий у новорожденных детей является их появление через 1-2 дня после рождения. Повреждающие эффекты звука на сосуды мозга выявляются также в латентный период. Как было отмечено выше, интракраниальные кровоизлияния у доношенных новорожденных детей обнаруживаются преимущественно в коре и подкорковых зонах мозга. Кора больших полушарий наиболее подвержена повреждающему воздействию звука. Поэтому, несмотря на неадекватность звука как стимула для развития мозговых геморрагий, вышеприведенные факты позволяют использовать данный стрессорный фактор для моделирования внутричерепных кровоизлияний у новорожденных крыс.

В соответствии с моделью звукового стресса новорожденных крыс в возрасте 3-х дней помещали в плексигласовую камеру и подвергали звуковому

воздействию (110 дБ, 370 Гц), на протяжении 120 минут: 10 сек – звук, затем 60 сек – пауза.

Данная модель мозговых геморрагий имеет преимущества перед аналогами, такими как окклюзия средней мозговой артерии или введение крови непосредственно в ткани мозга (MacLellan, 2012). Во-первых, разработанная нами модель позволяет изучать развитие стресс-индуцированных нарушений в тканях мозга в динамике от пред-геморрагического состояния до развития сосудистых «катастроф» мозга. Отметим, что на других моделях может быть изучено лишь пост-геморрагическое состояние, что существенно ограничивает возможности исследования и понимания процессов, предшествующих стресс-индуцированным критическим сдвигам в механизмах регуляции церебрального гомеостаза. Во-вторых, модель звукового стресса наиболее приближенно отражает клиническую картину неонатальных геморрагий, которые развиваются преимущественно в коре больших полушарий бессимптомно (Whitby, 2004; Looney, 2007; Gupta, 2009). Данная модель была выбрана с целью фокусировки исследований на сопоставлении сценария событий, индуцированных стрессом, на момент пред- и пост-геморрагического состояния.

Результаты исследований на основе применения методов пульсоксиметрии и МРТ в SWI-режиме выявили, что звуковой стресс провоцирует развитие мозговых геморрагий на фоне церебральной гипоксии, которая предшествует появлению критических изменений в сосудах мозга у новорожденных крыс.

Тот факт, что гипоксия предшествует возникновению мозговых геморрагий согласуется с другими экспериментальными и клиническими данными. Thoresen и др. в опытах на новорожденных поросятах показали, что сама по себе тяжелая гипоксия может вызвать самопроизвольное кровоизлияние в мозг (Thoresen et al., 2001). Alderliesten и др. в своих клинических наблюдениях установили более низкое кислородное насыщение тканей мозга у новорожденных до тяжелого инсульта (Alderliesten et al., 2013). Так, М.-С. Hsieh и др. отмечают, что насыщение крови кислородом сосудов мозга является критическим признаком инсульта (Hsieh et al., 2016).

Известна тесная взаимосвязь между гипоксией и устойчивостью сосудов мозга к повреждениям, в частности к церебральным кровоизлияниям. Например, существуют научные работы, где показано, что повреждения сосудов мозга сопровождаются острой гипоксией.

Так, М.-С. Hsieh на модели ишемического инсульта у половозрелых крыс обнаружил существенное снижение значения кислородной сатурации венозной крови (Hsieh et al., 2016). Е. Mc Connell на взрослых мышах с субарахноидальным кровоизлиянием показал капиллярную дисфункцию, которая сопровождалась тяжелой гипоксией мозга и гибелью нейронов (McConnell et al., 2015).

Однако, научные сведения о влиянии гипоксии на состояние церебральных сосудов, определяющих мозговую гемодинамику, в настоящий момент крайне малочисленны и противоречивы.

В связи с этим на втором этапе исследований была поставлена задача изучить как изменяется мозговой кровоток и устойчивость церебральных сосудов к стресс-индуцированным повреждениям на фоне гипоксии у новорожденных крыс.

В связи с поставленной задачей проводилась оценка состояния церебрального кровотока под воздействием звукового стресса у новорожденных крыс. Визуализацию мозгового кровотока осуществляли с применением 2-х оптических методов: когерентная томография и лазерная спекл-визуализация, которые требуют полной иммобилизации животного для избегания артефактов в записях. Для этого был выбран метод ингаляционной изофлурановой анестезии, который применяется в клинике у новорожденных детей (Бунятян, 2013; Мохорт и др., 2016).

Выбор изофлурановой анестезии основан также на анализе литературных источников, которые указывают, что изофлуран не влияет на артериальную оксигенацию, системную и церебральную гемодинамику (Бунятян, 2013; Афонасьев и др., 2014). Для изофлурана характерна минимальная токсичность и достаточная терапевтическая широта для обеспечения высокой управляемости анестезии и быстрого выхода из него.

По результатам оценки церебрального кровотока на разных стадиях формирования стресс-индуцированных интракраниальных геморрагий методом лазерной спекл-визуализации было установлено, что мозговые вены более чувствительны к повреждающему воздействию стресса по сравнению с сосудами микроциркуляторного русла. Так, на фоне умеренной гипоксии (4 часа после стресса) повышалась перфузия в сагиттальном синусе, чего не было обнаружено в микрососудах. Через сутки после отмены стресса патологические процессы прогрессировали со стороны указанных венозных сдвигов, к которым подключалось переполнение кровью микрососудов в силу снижения венозного оттока из мозга и развитие венозного застоя.

Развитие венозной недостаточности и появление венозного застоя было доказано в наших ранних исследованиях (Semyachkina-Glushkovskaya et al., 2016).

Это заключение согласуется с клиническими наблюдениями, в которых показано, что неонатальные внутричерепные кровоизлияния изначально представляют собой венозный инфаркт из-за слабых стенок мозговых вен у новорожденных (Hambleton and Wigglesworth 1976; Ghazi-Birry et al., 1997; Bruno et al., 2014).

Нормальная физиологическая реакция на снижение доставки кислорода проявляется в расслаблении сосудов головного мозга, что активизирует обмен веществ в тканях мозга с помощью увеличения церебрального кровотока. Особенностью мозговых вен является отсутствие гладких мышц и клапанов в их тонких стенках, поэтому они имеют низкую устойчивость к критическим растяжениям, возникающим в процессе накопления крови в них (Kiliç and Akakin, 2008). Незрелые сосуды головного мозга новорожденных имеют ограничения в увеличении своих размеров. Гипоксия, индуцирующая расширение венозных сосудов головного мозга, вызывает увеличение церебрального венозного давления (Volpe, 2008). Это высокое давление может легко вызвать разрыв тонких стенок незрелых мозговых вен новорожденных (Hambleton, 1976).

ГЭБ является важным показателем сосудистого гомеостаза, определяющим устойчивость клеток мозга к повреждающему воздействию стресса. Поскольку в

наших предыдущих главах 3.1 и 3.2 было установлено, что стресс провоцирует развитие гипоксии на фоне выраженных изменений в церебральных сосудах и гемодинамического включения микроциркуляторного звена – анатомической платформы ГЭБ, нами сделано предположение, что нарушение проницаемости ГЭБ может быть одним из механизмов, связанных с этими изменениями.

Для проверки данной гипотезы оценивали нарушение барьерной функции мозга на фоне присутствия трех факторов, таких как стресс, гипоксия и связанных с этим мозговых кровотоков у новорожденных крыс. С этой целью применяли классические тесты, определяющие проницаемость ГЭБ, включая внутривенное введение гадолиния (552 Да), Evans Blue (68 кДа), флуоресцентного декстрана (70 кДа) с последующей оценкой экстравазации этих веществ из церебральных сосудов в ткани мозга.

Результаты выявили, что умеренная гипоксия, которая развивалась в пред-геморрагический период (4 часа после стресса) вызывала изменения в проницаемости ГЭБ как для низкомолекулярных (гадолиний), так и для высокомолекулярных (декстран и Evans Blue) соединений.

Более глубокая гипоксия на фоне стресс-индуцированных мозговых геморрагия сопровождалась усугублением нарушений в барьерной функции мозга. Это проявлялось в более выраженной интенсивности экстравазации указанных сосудистых меток из кровеносного русла в ткани мозга.

Следующим этапом исследований явилось изучение механизмов, лежащих в основе указанных изменений. Для этого изучали экспрессию ключевых белков, регулирующих барьерную функцию мозга, таких как клаудин-5 и окклюдин, а также белков базальной мембраны, которые дополняют структуру, определяющую устойчивость ГЭБ к повреждениям.

Анализ экспрессии структурных белков ГЭБ выявил повышение экспрессии клаудина-5, но не окклюдина при стресс-индуцированных сдвигах в проницаемости ГЭБ. Однако в работах других исследований показано, что в условиях *in vivo* гипоксия на взрослых грызунах вызывает снижение экспрессии окклюдина и увеличение проницаемости ГЭБ (Witt et al., 2003, 2005;

Koto et al., 2007; Hyun and Jung, 2014). Возможно, расхождение результатов связано с созреванием структур ГЭБ (Delorme et al., 1970; Risau et al., 1986; Saunder, 1992; Volbrodt and Dobrogowska, 1994; Stewaet and Hayakawa, 1994). Считается, что основная роль в формировании барьерной функции принадлежит, по-видимому, клаудину, так как у нокаутных по окклюдину мышей барьерная функция сохраняется, в то время как мыши, нокаутные по клаудину, не жизнеспособны (Аляутдин, 2012).

Одной из причин нарушения проницаемости ГЭБ на фоне стресс-индуцированной церебральной гипоксии и венозной недостаточности может быть увеличение деформируемости эритроцитов. В условиях гипоксии эритроциты образуют АТФ на фоне активации β 2-адренергических рецепторов, находящихся на их поверхности (Olearczyk et al., 2002). АТФ является мощным вазорелаксантом, приводящим к повышению проницаемости сосудистой стенки (Nelson, 1995; Brayden, 2002).

Наши результаты согласуются с данными М.Т. Луценко и Е.В. Надточий. В своей работе авторы при изучении бронхиальной астмы, установили, что по мере развития гипоксического состояния в артериальной и венозной крови прогрессируют деструктивные изменения в эритроцитах периферической крови, которые проявляются в увеличении количества дегенеративных форм эритроцитов (Луценко и Надточий, 2009).

Анализ корреляции трех взаимосвязанных факторов: гипоксии, церебральной гемодинамики и проницаемости ГЭБ показал, что при умеренном снижении кислородной насыщенности тканей мозга отмечается умеренное повышение проницаемости ГЭБ на фоне венозного застоя. В то время как усиление гипоксии приводит к выраженному нарастанию проницаемости ГЭБ в условиях переполнения как венозного, так и микроциркуляторного звеньев мозгового кровотока.

Заключительным этапом наших исследований являлось изучение последствий стресс-индуцированной гипоксии и связанных с этим нарушениями сосудистого гомеостаза.

Для этого проводили морфологические исследования молекулярного слоя и пирамидальных клеток коры больших полушарий, как важных структур, участвующих в когнитивных функциях мозга.

По результатам наших исследований были получены следующие данные. Стресс-индуцированное снижение насыщения мозга кислородом и снижение скорости кровотока сопровождалось постепенными патологическими изменениями в зонах, отвечающих за когниции, затрагивая молекулярный слой коры головного мозга и пирамидальные клетки, которые играют ключевую роль в ассоциативном внимании и обучении (Gilbert and Sigman, 2007). Тяжесть стрессовых расстройств на уровне церебрального венозного кровообращения и оксигенации тканей мозга положительно коррелирует с уменьшением толщины молекулярного слоя коры, а также с уменьшением числа пирамидальных нейронов и их диаметра. Формирование периваскулярного отека, который мы наблюдали в пред- и пост-геморрагические периоды, может быть одной из причин, ответственной за уменьшение диаметра пирамидальных нейронов вследствие накопления жидкости в сосудах головного мозга и механического давления. Стоит обратить внимание, что появление кровоизлияний в головном мозге сопровождалось прогрессированием патоморфологических изменений в коре головного мозга, достигая апоптоза пирамидальных нейронов, то есть необратимых изменений, сопровождающих гибель церебральных клеток.

Подобные результаты были получены А.Ю. Алмабаевой и ее коллегами при гипоксии на модели пульмонэктомии. Так, патологические изменения нейронов коры больших полушарий коррелируют со степенью выраженности венозного застоя в церебральных венах. Установлено, что прогрессирование указанных патологических изменений связано с уменьшением площади пирамидальных клеток в наружном и внутреннем слоях коры больших полушарий (Алмабаева и др., 2016).

Результаты нашего исследования ясно показывают, что даже латентная стадия стресс-индуцированных мозговых кровоточений связана со значительными морфологическими поражениями зон коры, ответственных за мыслительную

деятельность, что сопровождается необратимым процессом апоптоза на фоне развития интракраниальных геморрагий. Таким образом, процессы, вызванные стрессом, предшествующие и сопровождающие кровоизлияния мозга в неонатальном периоде способствуют серьезным нарушениям в областях мозга, ответственных за когнитивные функции.

В целом результаты исследования позволили заключить, что стресс играет первостепенную роль в развитии гипоксии мозга, тем самым определяя его устойчивость к появлению интракраниальных геморрагий у новорожденных крыс в этих условиях. Острая недостаточность кислорода провоцирует развитие патологических изменений как со стороны сагиттального синуса – венозного компонента церебральной гемодинамики, так и со стороны микрососудов – анатомической платформы ГЭБ. Вызванные стрессом необратимые сдвиги в кислородной сатурации тканей мозга, а также церебральной гемодинамике сопровождаются повышением проницаемости ГЭБ как для низкомолекулярных, так и высокомолекулярных соединений, что в свою очередь связано с изменениями в экспрессии белков, определяющих барьерную функцию мозга. Вышеуказанные стресс-индуцированные патологические процессы оказывают существенное влияние на кору полушарий головного мозга, что выражается в изменении морфологии молекулярного слоя и пирамидальных клеток.

ВЫВОДЫ

1. Стресс у новорожденных крыс провоцирует развитие церебральной гипоксии, которая сопровождается выраженными сдвигами в мозговом кровотоке, проявляющимся в условиях умеренной гипоксии в виде релаксации вен мозга, при выраженной гипоксии – подключением микроциркуляторного звена в виде гиперперфузии с целью оптимизации кислородного снабжения тканей мозга.
2. Стресс-индуцированная гипоксия у новорожденных крыс и связанные с ней нарушения церебральной гемодинамики являются важными механизмами, лежащими в основе стресс-устойчивости сосудов мозга. Степень выраженности этих изменений коррелирует с устойчивостью сосудов мозга к развитию интракраниальных геморрагий. При умеренной церебральной гипоксии и венозном застое, наблюдаются первичные признаки развития мозговых геморрагий. Выраженная гипоксия в условиях переполнения кровью сосудов мозга на уровне макро- микроциркуляции, сопровождается интракраниальными геморрагиями.
3. Нарушение проницаемости гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) является также важным механизмом, отражающим устойчивость сосудов мозга к развитию церебральной гипоксии и нарушению мозгового кровотока. Три взаимосвязанных фактора, такие как стресс, гипоксия и мозговые геморрагии, определяют степень нарушения барьерной функции мозга. Повышение проницаемости ГЭБ к низко- и высокомолекулярным соединениям на стадии пред-геморрагий усугубляются в пост-геморрагический период.
4. Исследование экспрессии белков клаудина-5 и окклюдина, которые образуют плотные контакты ГЭБ и регулируют его проницаемость, выявило повышение экспрессии первого, но не второго в условиях развития стресс-индуцированных мозговых геморрагий на фоне отсутствия различий в

базальной экспрессии указанных структурных белков ГЭБ у новорожденных крыс.

5. Стресс-индуцированное снижение снабжения тканей мозга кислородом и нарушение церебральной гемодинамики на фоне ослабления барьерной функции мозга приводят к необратимым патологическим изменениям в нейронах коры больших полушарий, отвечающих за когнитивные функции организма.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Александрович Ю.С. Особенности kilosродного статуса у новорожденныхдетей в зависимости от этиологии критического состояния / Ю. С. Александрович, К. В. Пшениснов, Л. А. Кушнерик и др. // Вестник анестезиологии и реаниматологии. – 2011. – Т. 8, №6. – С. 41–47.
2. Александрович Ю.С. Прогнозирование ранних исходов критических состояний у новорожденных / Ю.С. Александрович, Е. В. Паршин, К.В. Пшениснов // Вестник анестезиологии и реаниматологии. – 2012. – Т. 9, № 4. – С. 36–42.
3. Алмабаева А.Ы. Динамика морфологических изменений сосудов и клеток коры полушарий большого мозга при пульмонэктомии /А.Ы. Алмабаева Ы.А. Алмабаев, А.Т. Мусаев и др. // Med. Sci. – 2016. – № 4. – С. 548–552.
4. Аляутдин Р.Н. Транспорт лекарственных веществ через гематоэнцефалический барьер: линия Мажино или Волшебный Сезам? / Р.Н. Аляутдин // Молекулярная медицина. – 2012. – № 3. – С. 3–12.
5. Антипенко Е.А. Неспецифическая резистентность организма при хронической ишемии головного мозга / Е.А. Антипенко, В.В. Трошин, А.В. Дерюгина и др. // Медицинский альманах. – 2011. – №1. – С.60 – 62.
6. Арабова З.У. Изменение концентраций электролитов в условиях гипоксии / З.У. Арабова, Е.В. Невзорова, Ф.А. Шукуров и др. // Вестник ТГУ. – 2013. – Т. 18, № 6. – С. 3283–3285.
7. Арабова З.У. Оценка параметров оксигенации в условиях высокогорья / З.У. Арабова, Ф.А. Шукуров, Е.В. Малышева и др. // Вестник ТГУ. – 2012. – Т. 17, № 4. – С. 1282–1284.
8. Афонасьев М.Г. Сравнительная характеристика результатов применения изофлурана, севофлурана и пропофола в целевой концентрации при реконструктивных операциях на сонных артериях / М.Г. Афонасьев, Е.В. Кислухина, А.В. Макаревич и др. // Анестезиология и реаниматология. – 2014. – № 4. – С. 14–19.

9. Блинов Д.В. Современные представления о роли нарушения резистентности гематоэнцефалического барьера в патогенезе заболеваний ЦНС. Часть 2: функции и механизмы повреждения гематоэнцефалического барьера / Д.В. Блинов // Эпилепсия и пароксизмальные состояния. – 2014. – №1. – С.70–84.

10. Блинов Д.В. Современные представления о роли нарушения резистентности гематоэнцефалического барьера в патогенезе заболеваний ЦНС. Часть 1: Строение и формирование гематоэнцефалического барьера / Д.В. Блинов // Эпилепсия и пароксизмальные состояния. – 2013. – №3. – С.65–75.

11. Блинов Д.В. Белковые маркеры гипоксически-ишемического поражения ЦНС в перинатальном периоде / Д.В. Блинов, С.С. Терентьев // Нейрохимия. – 2013. – Т.30, № 1. – С. 22–26.

12. Блинов Д.В. Иммуноферментный анализ нейроспецифических антигенов в оценке проницаемости гематоэнцефалического барьера при перинатальном гипоксически-ишемическом поражении ЦНС (клинико-экспериментальное исследование): дисс. ...канд. мед. наук: 03.00.04 / Блинов Дмитрий Владиславович. – М. – 2004. –153 с.

13. Блинов Д.В. Объективные методы определения тяжести и прогноза перинатального гипоксически-ишемического поражения ЦНС / Д.В. Блинов // Акушерство, гинекология и репродукция. – 2011. – № 2. – С. 5– 12.

14. Блинов Д.В. Статистико-эпидемиологическое исследование заболеваемости неврологического профиля на примере детского стационара / Д.В. Блинов, С.И. Сандуковская // Эпилепсия и пароксизмальные состояния. – 2010. – № 4. – С. 12– 22.

15. Блум Ф., Лейзерсон А., Хофстедтер Л. Мозг, разум и поведение: Пер. с англ. – М.: Мир, 1988. – 248 с.

16. Бредбери М. Концепция проницаемости гематоэнцефалического барьера / М. Бредбери. - М.: Медицина, 1983. – 316 с.

17. Брыксина Е. Ю. Патогенетические аспекты перинатальных поражений центральной нервной системы недоношенных детей / Е.Ю.Брыксина // Вестник

Тамбовского университета. Серия: Естественные и технические науки. –2013. – №6, № 2.– С.3312–3314.

18. Бунятына А.А., Мизикова В.М. Анестезиология: национальное руководство(ред.) – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013. – 1104 с.

19. Ветчинкина Ю.В. Поиск биомаркеров церебральной гипоксии у новорожденных / Ю. В. Ветчинкина, А. П. Скоромец // Известия Коми научного центра УрО РАН. – 2013. – Т. 1, № 13. – С. 56–62.

20. Виленский М.А. Лазерная спекл-визуализация микроциркуляции крови в коре головного мозга лабораторных крыс при стрессе / М.А. Виленский, О.В. Семячкина-Глушковская, П.А. Тимошина, Я.В. Кузнецова, И.А. Семячкин-Глушковский, Д.Н. Агафонов, В.В. Тучин // Квант. Электроника. – 2012. – Т. 42, № 6. – С. 489–494.

21. Вокина В.А. Морфофункциональное состояние нервной системы белых крыс при энцефалопатии гипоксического и токсического генеза / В.А. Вокина, Е. А. Титов // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2010. – Т. 4, № 74 – С. 13–16.

22. Гельфанд Б.Р., Салтанов А.И. (ред.) Интенсивная терапия: национальное руководство: в 2 т. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011. – Т. 2. – 784 с.

23. Геха Р.С. Регуляция механизма рекомбинации переключения на синтез иммуноглобулина Е / Р.С. Геха // Аллергология и иммунология. – 2005. – Т.6, № 1. – С. 23 – 37.

24. Гомазков О.А. Нейрогенез как адаптивная функция мозга. – 2013. – 136 с.

25. Гринько С.С. Современные технологии оптоэлектронной диагностики в медицине / С.С. Гринько, А.И. Денисенко // Восточно-Европейский журнал передовых технологий. – 2010. – Т. 5, № 47. – С. 17–20.

26. Гришанов В.Н. Оптическая когерентная томография в медицинской диагностике Самара: Изд-во СГАУ. – 2015. – 1.

27. Гусев Е.И. Механизмы повреждения ткани мозга на фоне острой фокальной ишемии мозга / Е.И. Гусев, В.И. Скворцова, А.В. Коваленко и др. // Журн.невропатол. и психиатр.им. С.С.Косакова. – 1999. – Т.99, №2. – С.65 – 70.

28. Данилова Т.Г. Морфология лобной коры больших полушарий крыс при пережатии общей сонной артерии / Т.Г. Данилова // Вестник Новгородского государственного университета. – 2013. – Т. 1, № 71. – С. 101–105.

29. Данилова Т.Г. Реакция нейроглии в лобном отделе коры больших полушарий и головке хвостатого ядра крыс при хроническом пережатии левой общей сонной артерии / Т.Г. Данилова, Г.В. Шумихина // Вестник Новгородского государственного университета. – 2015. – № 86 №1. – С. 47–50.

30. Долгих Г.Б. Венозные церебральные дистонии в структуре цереброваскулярной патологии у детей / Г.Б. Долгих // Неврологический вестник. – 2005. – Т. 37, № 1. – С. 54–59.

31. Есьман С.С. Неинвазивные измерения величины насыщения венозной крови кислородом / С.С. Есьман, С.А. Мамилов, В.А. Трушина // Физика живого. – 2010. – Т. 18, № 2. – С. 121–126.

32. Заднипряный И.В. Перинатальная гипоксия как индуктор апоптоза кардиомиоцитов у новорожденных / И.В. Заднипряный, О.С. Третьякова, Т.П. Сатаева // Світ медицини та біології. – 2014. – Т. 1, № 43. – С. 169–176.

33. Залесский В.Н. Апоптотический и аутофагический пути гибели клетки при гипертрофии ремоделировании миокарда / В.Н. Залесский, Л.А. Стаднюк, Н.В. Великая // Журнал АМНУ Украины. – 2003. – Т.9, № 4. – С.699 – 712.

34. Зарубина И. В. Функционально-метаболические нарушения в головном мозге при хронической ишемии и их коррекция нейропептидами / И.В Зарубина., Т.В.Павлова // Обзоры по клинич. фармакол. и лек.терапии. – 2007. – №2. – С.20 – 33.

35. Зарубина И.В. Поведенческие и метаболические изменения мозга различных по устойчивости к гипоксии крыс после перенесенной черепно-мозговой травмы / И.В.Зарубина, Н.А. Курицина, П.Д.Шабанов // Механизмы

функционирования висцеральных систем. Всерос. конф. с межд. Участием. – СПб. – 2003. – С. 117 – 118.

36. Зарубина И.В. Фармакотерапия гипоксии и ее последствий при критических состояниях / И.В. Зарубина, С.А. Ходченков, Л.А. Павленко // Всерос. Научн. Конф. СПб. – 2004. – С. 26 – 28.

37. Зарубина И.В. Молекулярная фармакология антигипоксантов / И.В. Зарубина, П.Д. Шабанов. – СПб.: Н-Л, 2004.– 368 с.

38. Зедгенизова Е.В. Особенности церебрального кровотока и центральной гемодинамики у новорожденных, перенесших перинатальную асфиксию / Е.В.Зедгенизова, Д.О.Иванов, Ю.С.Александровичи др. // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН.– 2006. –№5.– С.85–89.

39. Иржак Л.И. Исследование оксигенации крови новорожденных детей до начала легочного дыхания / Л.И. Иржак, Т.А. Потапова, О.И. Жадова // Фундаментальные исследования. – 2011. – № 11. – С. 508–510.

40. Иржак Л.И. Насыщенность кислородом венозной крови человека при старении / Л.И. Иржак // Журнал медико-биологических исследований. – 2013. – №4.– С. 38–43.

41. Казначеева К.С. Механизмы развития цитокининдуцированного апаптоза/ К.С. Казначеева // Гематол. Итранфузиол. – 2004. – Т. 44, №1. – С. 40 – 43.

42. Карасева А.Э. Психологические особенности женщин со слабостью сократительной деятельности матки в родах / А.Э. Карасева // Психотерапия и медицинская психология. – 2005. – № 1. – С. 24 – 29.

43. Кривошеков С.Г. Реакция кардиореспираторной системы здоровых людей на гипоксическое воздействие в зависимости от психикофизиологических характеристик / С.Г. Кривошеков и др. // Бюллетень СО РАМН.– 2010. – №4. – С.14 – 19.

44. Крыжановский Г.Н. Дизрегуляционная патология / Г.Н. Крыжановский. – М.: Медицина, 2002. – 632 с.

45. Кувачева Н.В. Проницаемость гематоэнцефалического барьера в

норме , при нарушении развития головного мозга и нейродегенерации / Н.В. Кувачева, А.Б. Салмина, Ю.К. Комлева и др. // Журнал неврологии и психологии. – 2013. – № 4. – С. 80–85.

46. Курбаш М.Н. L-глутамат: современный взгляд на известную аминокислоту / М.Н. Курбаш // Нейрохимия. – 2009. – Т.26. - №3. – С. 202-207.

47. Кучмий А.А. Методы молекулярной визуализации *in vivo* / А.А. Кучмий, Г.А. Ефимов, С.А. Недоспасов // Биохимия. – 2012. – Т. 77, № 12. – С. 1603 – 1620.

48. Латышева В.Я. Современные воззрения на проблему хронической ишемии мозга / В.Я. Латышева, Л.А. Лемешков // Проблемы здоровья и экологии. – 2008. – С. 11–16.

49. Левин С.Г. Роль фоновых 2Р калиевых каналов TASK-1/TASK-3 типов в индуцируемых кратковременными эпизодами гипоксии изменениях в активности пирамидных нейронов поля СА1 гиппокампа / С.Г. Левин, М.В. Конаков, О. В. Годухин // Фундаментальные исследования. – 2013. – № 11. – С. 104–107.

50. Лешкова В.Е. Диагностика острой дыхательной недостаточности. Пульсоксиметрия: Учебное пособие для студентов, обучающихся по специальности «лечебное дело / В.Е. Лешкова, Ш.З. Загидуллин, М.А. Садритдинов и др. // Гизатуллин Р.Х. – Уфа: Изд-во ГБОУ ВПО БГМУ Минздравсоцразвития России. – 2012. – 42 с.

51. Лифшиц В.М. Лабораторные тесты у здоровых людей. Референтные пределы / В.М. Лифшиц, В.И. Сидельникова // М.: «Триада-Х», 2004. – 56 с.

52. Лукашев К.В. Особенности транспорта кислорода в остром периоде ишемического инсульта / К.В. Лукашев, А.З. Валиахмедов, Ю.А. Чурляев и др. // Общая реаниматология. – 2010. – Т. 1, № 2. – С. 30–33.

53. Лукьянова Л.Д. Современные проблемы гипоксии / Л.Д. Лукьянова // Вестник РАМН. – 2000. – Т. 3. – С. 3 – 11.

54. Луценко М.Т. Морфофункциональные изменения в эритроцитах периферической крови при гипоксии у больных с бронхиальной астмой /

М.Т. Луценко, Е.В. Надточий // Бюллетень. – 2009. – № 31. – С. 12–15.

55. Макаренко А.Н. Адаптация к гипоксии как защитный механизм при патологических состояниях / А.Н. Макаренко, Ю.К. Карандеева // Вісник проблем біології і медицини. – 2013. – Т. 2, № 100. – С. 27–32.

56. Макарова Т.Е. Состояние проницаемости гематоэнцефалического барьера у детей с судорожным синдромом при острой респираторной вирусной инфекции / Т.Е. Макарова, В.П. Молочный // Дальневосточный медицинский журнал. – 2009. – № 2. – С. 20 – 23.

57. Малышев И.Ю. Гипоксия и оксид азота / И.Ю. Малышев // Вестник РАМН. – 2000. – Т. 9. – С. 44 – 48.

58. Моргун А.В. Основные функции гематоэнцефалического барьера / А.В. Моргун // Сибирский медицинский журнал. – 2012. – № 2. – С. 5-8.

59. Мохорт Т.В. Феохромоцитома: современные подходы к диагностике и лечению / Т.В. Мохорт, Е.И.Велесевич, Е.Г.Мохорт // Международные обзоры клиническая практика и здоровье. – 2016. – № 1.– С. 4–23.

60. Муротов О.У. Лечение антиоксидантами экспериментального инсульта: морфологические изменения в тканях головного мозга / О.У. Муротов // Вестник Новосибирского государственного педагогического университета. – 2013. – № 5. – С. 95–100.

61. Никифоров А.С. Частная неврология / А.С. Никифоров, Е.И. Гусев. – Изд-во ГЭОТАР-Медиа, 2013. – 768 с.

62. Новиков В.Е. Фармакология и биохимия гипоксии / В.Е. Новиков, Н.П. Катунина // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2002. – Т. 1, № 2. – С. 73–87.

63. Одинак М.М. Повреждение и защита гематоэнцефалического барьера при ишемии / М.М. Одинак, И.А. Возняк // СПб.: СПбГУ. – 2003. –146–171 с.

64. Одинак М.М. Сосудистые заболевания головного мозга / М.М. Одинак, А.А Михайленко, Ю.С. Иванов и др. – СПб.: Гиппократ, 1997.– 160 с.

65. Одинак М.М. Факторы роста нервной ткани в центральной нервной системе / М.М. Одинак, Н.В. Цыган. – СПб.: Наука, 2005. – 157 с.
66. Пальчик А.Б. Гипоксически-ишемическая энцефалопатия новорожденных / А.Б. Пальчик, Н.П. Шабалов. – 4-е изд., испр. и доп. – М.: МЕД-пресс-информ, 2013. – 288 с.
67. Панина О.С. Комплексная физиотерапевтическая реабилитация новорожденных детей с поражением центральной нервной системы / О.С. Панина, Ю.В. Черненко, Ю.М. Райгородский // Физиотерапия, бальнеология и реабилитация. – 2014. – №1 – С.13–16.
68. Паршин Е.В. Значение исследования глубокой картины кислородного статуса в неонатальном отделении реанимации и интенсивной терапии / Е.В. Паршин, Л.А. Кушнерик, С.А. Блинов // Клиническая нестезиология и реаниматология. – 2006. – Т. 3, № 6. – С. 37 – 45.
69. Петров Д.А. Определение скорости потока по доплеровскому сдвигу в оптической когерентной томографии / Д.А. Петров, С.Г. Проскурин // *Juvenisscientia*. – 2015. – №1. – С.3–5.
70. Потапов А.А. Доказательная нейротравматология / А.А. Потапов, Л.Б. Лихтерман (ред.). – М.: ПБОЮЛ Андреева ТМ, 2003. – 517 с.
71. Потребич Ю.П. Исследование эмоциональной сферы детей младенческого и раннего возраста в зависимости от способа родовспоможения / Ю.П. Потребич, Н.А. Кравцова, А.В. Катасонова // Сибирский психологический журнал. – 2009. – №32. – С. 71–73.
72. Раимкулов Б.Н. Цереброваскулярные расстройства (обзор литературы) / Б. Н. Раимкулов // Вестник КазНМУ. – 2014. – Т. 2, № 1. – С. 185–188.
73. Рябухин И.А. Эмбриоморфогенез, клеточная и субклеточная биология плотных контактов эндотелиоцитов / И.А. Рябухин, Т.Б. Дмитриева, В.П. Чехонин // *Нейрохимия*. – 2003. – № 20. – С. 12–23.

74. Самуилов В.Д. Биохимия программируемой клеточной смерти (апоптоза) у животных / В.Д. Самуилов // Соровский образовательный журнал. – 2001. – Т.7, №10.– С. 18 – 25.

75. Скулачев В.П. NO – сенсоры лёгких и кровеносных сосудов и их роль в антиоксидантной защите организма / В.П. Скулачев // Пульмонология. – 2001. – Т. 2. – С. 6 – 8.

76. Созаева Д.И. Патогенетические механизмы формирования церебральных нарушений у детей раннего возраста, перенесших гипоксию в перинатальном периоде / Д.И. Созаева, С.Б. Бережанская // Современные проблемы науки и образования. – 2014. – № 4. – С. 329–338.

77. Солкин А.А. Основные механизмы формирования защиты головного мозга при адаптации к гипоксии / А.А. Солкин, Н.Н. Белявский, В.И. Кузнецова и др. // Вестник ВГМУ. – 2012. – Т. 11, № 1 – С. 6–14.

78. Софронов В.В. Изменение проницаемости мембран эритроцитов у новорожденных, перенесших внутриутробную гипоксию / В.В. Софронов, Н.О. Туаева, Т. Е. Анисимова и др. // Казанский медицинский журнал. – 2010. – Т. 91, № 1 – С. 62–64.

79. Трофимов А.О. К вопросу о мониторинге мозгового кровотока при черепно-мозговой травме: сопоставление данных церебральной оксиметрии и перфузионной компьютерной томографии головного мозга / А.О. Трофимов, М.Ю. Юрьев, О.В. Военнов и др. // Вестник Ивановской медицинской академии. – 2013. – Т. 18, № 3. – С. 77–78.

80. Тумаева Т.С. Фармакологическая коррекция гипоксически-опосредованных нарушений центральной нервной и сердечно-сосудистой систем у детей, рожденных путем кесарева сечения / Т.С. Тумаева, Л.А. Балыкова, А.В. Герасименко и др. // Современные проблемы науки и образования. –2011. – № 6.–С.35.

81. Ураков А.Л. Инфракрасная диагностика гипоксии / А.Л. Ураков, Н.А. Уракова, А.А. Касаткин и др. // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2014. – № 11. – С. 855–858.

82. Уракова Н.А. Инновационные возможности оценки устойчивости плода к гипоксии / Н.А. Уракова, А.Л. Ураков, М.Ю. Гаускнехт // Современные проблемы науки и образования. – 2012. – № 1. – С. 12.
83. Хетагурова Ю.Ю. Качество жизни недоношенных детей, перенесших церебральную ишемию / Ю.Ю. Хетагурова, И.В.Винярская, М.Д. Митиш // Вестник ВолГМУ. – 2010. – Вып. 2, № 34. – С.61–63.
84. Черницкий Е.А. Структура и функции эритроцитарных мембран / Е.А. Черницкий, А.В. Воробей // Минск: Наукаитехника, 1981. –216 с.
85. Чехонин В.П. Иммуноферментный анализ NSE и GFAP, как критерий динамической оценки проницаемости гематоэнцефалического барьера крыс при перинатальном гипоксически-ишемическом поражении ЦНС / В.П.Чехонин, С.В. Лебедев, Т.Б. Дмитриева и др. // Бюлл. эксп. биол. мед. – 2003. – Т. 136, № 9. – С. 299– 303.
86. Чехонин В.П. Фундаментальные и прикладные аспекты изучения гематоэнцефалического барьера / В.П. Чехонин, В.П. Баклаушев, Г.М. Юсубалиева и др. // ВестникРАМН. – 2012. – № 8. – С. 66–78.
87. Чехонин В.П. Иммунохимический анализ нейроспецифических антигенов / В.П. Чехонин, Т.Б. Дмитриева, Ю.А. Жирков // Медицина М. – 2000. – С. 416– 422.
88. Чехонин В.П. Иммунохимическое изучение механизмов аутоиммунной агрессии антител к нейроспецифическим белкам у крыс с экспериментальным прорывом ГЭБ / В.П. Чехонин, Р.Ц. Лирджиева, Е.А. Коротева // Нейрохимия. – 1989. –Т.9, № 2. – С. 241– 246.
89. Шило А.В. Конечные продукты метаболизма оксида азота при искусственном гипометаболизме у крыс и хомяков / А.В. Шило, В.В. Ломако, Т.Н. Бондарь и др. // Теоретическая и экспериментальная криобиология. – 2005. – Т. 15, № 1. – С. 3–13.
90. Шулькина С.Г. Использование пульсоксиметра для ранней диагностики нарушений сатурации крови кислородом у боьных с ХСН / С.Г. Шулькина, А.Э. Коротаева, А.В. Овсяникова // Международный научно-

исследовательский журнал. – 2015. – Т. 8, № 39 -Ч.3. – С. 128–130.

91. Шустов Е.Б. Гипоксия физической нагрузки у спортсменов и лабораторных животных / Е.Б. Шустов, Г.Д. Капанадзе // Биомедицина. – 2014. – № 4. – С. 4–16.

92. Яхно Н.Н. О состоянии медицинской помощи больным с нарушениями мозгового кровообращения / Н.Н. Яхно, В.А. Валенкова // Неврологический журн. – 1999. – №4. – С. 44–45.

93. Abbott N.J. Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability / N.J. Abbott // J Anat. – 2002. – Vol. 200. – P. 629–638.

94. Abbott N.J. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier / N.J. Abbott, L. Ronnback, E. Hansson // Nat Rev Neurosci. – 2006. – Vol. 7. – P. 41 – 53.

95. Abbott N.J. Structure and function of the blood-brain barrier / N.J. Abbott, A.A.K. Patabendige, D.E.M. Dolman et al. // Neurobiology of Disease. – 2010. – Vol. 37. – P. 13–25.

96. Abbruscato T.J., Combination of hipoxia/aglycemia compromises in vitro blood-brain integrity / T.J. Abbruscato, T.P. Davis // J. Pharmacol. Exp. Ther. – 1999. – Vol. 289. – P. 668 – 675.

97. Abdurashitov A.S. Cerebral blood flow monitoring using histogram analysis of laser speckle contrast image / A.S. Abdurashitov, V.V. Lychagov, O.A. Sineeveva et al. // Frontiers of Optoelectronics. – 2015. – P.12200–015–0493–z.

98. Abel H.T. Intracerebral hemorrhage and neuronspecificenolase in premature and full-term infants - a clinical study.Padiatr.Al-Jarallah A. Nontraumatic brain hemorrhage in children: Etiology and presentation / H.T. Abel, L.Von-Rohden, W. Lammeet al. // Child Neurol. – 2000. – Vol. 15. – P. 284–289.

99. Alderliesten T. Cerebral oxygenation, extraction, and autoregulation in very preterm infants who develop peri-intraventricular hemorrhage / T. Alderliesten, P. Lemmers, M. Smarius et al. // J Pediatr. – 2013. – Vol. 162, № 4. – P. 698-704.

100. Al-Jarallah A. Nontraumatic brain hemorrhage in children: Etiology and presentation / A. Al-Jarallah, M.T. Al-Rifai, A.R. Riela et al. // *Child Neurol.* – 2000. – Vol. 15. – P. 284–289.
101. Almendros I. Changes in oxygen partial pressure of brain tissue in an animal model of obstructive apnea / I. Almendros, J.M. Montserrat, M. Torres et al. // *RespirRes.* – 2010. – Vol. 11, № 3. – doi: 10.1186/1465-9921-11-3.
102. Armengou A.U. L-arginine levels in blood as a marker of nitric oxide-mediated brain damage in acute stroke: a clinical and experimental study / A.U. Armengou et al. // *J.Cerebral Blood Flow Metab.* – 2003.– Vol. 23, № 8. – P. 978 – 984.
103. Babu P.P Differential changes in cell morphology, macromolecular composition and membrane protein profiles of neurons and astrocytes in chronic ethanol treated rats / P.P. Babu, L.R. Kumari, M.C. Vemuri // *Mol. Cell. Biochem.*– 1994. – Vol. 12, № 130-1.–P. 29 – 40.
104. Baethmann A. Mediators of brain edema and secondary brain damage / A. Baethmann, K. Maier-Hauff, O. Kempfski et al. // *Crit Care Med.* – 1988. – Vol. 16, № 10. – P. 972-978.
105. Ballabh P. Anatomic analysis of blood vessels in germinal matrix, cerebral cortex, and white matter in developing infants / P. Ballabh, A. Braun, M. Nedergaard // *Pediatr. Res.* – 2004. – Vol. 56, № 1. – P. 117–124.
106. Bassan N.F. Neurodevelopmental outcome in survivors of periventricular hemorrhagic infarction / N.F. Bassa // *Pediatrics.* – 2007. – Vol. 120, №4. – P. 785 – 792.
107. Belayev L Quantitative evaluation of blood brain barrier permeability following middle cerebral artery occlusion in rats / L. Belayev, R. Busto, W. Zhao et al. // *Brain Res* –1996. – Vol. 739. – P. 88 –96.
108. Berger R.I. Perinatal brain damage underlying mechanisms and neuroprotective strategies / R.I. Berger // *Reprod.Sci.* – 2002. – Vol. 9, №6. – P. 319 – 328.

109. Bevan J.A. Adrenergic regulation of vascular smooth muscle / J.A. Bevan, R.D. Bevan, S.P. Duckles // *The Handbook of Physiology*, Am. Physiol. Soc. Bethesda. – 1981. – Vol. 2. – P. 515–566.
110. Bialik S. Myocyte apoptosis during acute myocardial infarction in the mouse localizes to hypoxic regions but occurs independently of p53 / S. Bialik, D.L. Geenen, I.E. Sasson et al. // *J. Clin. Invest.* – 2007. – Vol. 100. – P. 1363 – 1372.
111. Blinov D.V. Protein markers of hypoxic–ischemic lesions of the CNS in the perinatal period / D.V. Blinov, S.S. Terent'ev // *Neurochemical Journal.* – 2013. – Vol. 7, № 1. – P. 16– 22.
112. Bodin P. Synergistic effect of acute hypoxia on flow-induced release of ATP from cultured endothelial cells / P. Bodin, G. Burnstock // *Experientia.* – 1995. – Vol. 51. – P. 256-259.
113. Brayden J.E. Functional roles of KATP channels in vascular smooth muscle / J.E. Brayden // *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* – 2002. – Vol. 29. – P. 312–316.
114. Bruno C.J. Haemorrhagic stroke in term and late preterm neonates / C.J. Bruno, L.A. Beslow, C.M. Witmer et al. // *Arch. Dis. Child Fetal Neonatal Ed.* – 2014. – Vol. 99. – P. 48–53.
115. Busija D.W. Factors involved in the physiological regulation of cerebral circulation / D.W. Busija, D.D. Heistad // *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* – 1984. – Vol. 101. – P. 161–211.
116. Cande C. Apoptosis-inducing factor (AIF): key to the conserved caspase-independent pathways of cell death / C. Cande, F. Cecconi, P. Dessen et al. // *J. Cell Sci.* – 2002. – Vol. 115. – P. 4727 – 4734.
117. Cerbo R.M. Cerebral oxygenation, superior vena cava flow, severe intraventricular hemorrhage and mortality in 60 very low birth weight infants / R.M. Cerbo, L. Scudeller, R. Maragliano et al. // *Neonatology.* – 2015. – Vol. 108, № 4. – P. 246–252.
118. Chamnanvanakij S.A. Apoptosis and white matter injury in preterm infants / S.A. Chamnanvanakij et al. // *Pediatr. Dev. Pathol.* – 2002. – Vol. 5, № 2. – P. 184–189.

119. Chen K.B. Increase in Evans blue dye extravasation into the brain in the late developmental stage / K. B.Chen et al. // *Neuroreport*. – 2012. – Vol. 23. – P. 699–701. – doi:10.1097 / WNR.0b013e3283556dcc.
120. Christensen T. Detection of hydroxyl radicals in global cerebral ischemia by salicylate trapping and microdialysis / T. Christensen, T. Bruhn, T. Balchen et al. // *Pharmacology of cerebral ischemia* // Ed. by J. Kriglstein, H. OberpichlerSchwenk. Stuttgart: Medpharm. – 1994. – P.265 – 276.
121. Clancy R.R. Summary from the neurology group on neonatal seizures / R.R. Clancy // *Pediatrics*. – 2006. – Vol. 117, №3. – P. 23– 27.
122. Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, Institute for Laboratory Animal Research, Division on Earth and Life Studies, National Research Council of the National Academies. Guide for the care and use of laboratory animals. Eighth edition. Washington: The National Academies Press, 2011. <http://oacu.od.nih.gov/regs/guide/guide.pdf>. (2011).
123. De Vries H.E., Mononuclear phagocytes at the blood-brain barrier in multiple sclerosis. In *Blood-Spinal Cord and Brain Barriers in Health and Disease* / H.E. de Vries, D.D. Dijkstra, H.S. Sharma et al. // Elsevier, San Diego. – 2004. – P. 409 – 417.
124. Deli M.A. Permeability studies on in vitro blood – brain barrier models: physiology, pathology, and pharmacology / M.A. Deli, C.S. Abraham, S. Csonoret al.– 2005. – Vol. 25, № 1. – P.59 – 127.
125. Delorme P. Ultrastructural study on transcapillary exchanges in the developing telencephalon of the chicken / P. Delorme, J. Gayet, G. Grinon // *Brain res*. – 1970. –Vol. 22, №3. – P.269–283.
126. Dirnagl U. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view / U. Dirnagl, C. Ladecola, M.A. Moskowitz // *Trends Neurosci*. – 1999. – P. 391 – 397.
127. Edvinsson L. Adrenergic mechanisms In: *Cerebral Blood Flow and Metabolism* / L. Edvinsson, E.T. MacKenzie, J. McCulloch // New York: Raven Press.– 1993. – P. 213.

128. Edvinsson L. Perivascular nerves in brain vessels. In: *Cerebral Blood Flow and Metabolism* / L. Edvinsson, E. Hamel. – Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins, 2002. – 410 p.
129. Elston G.N. Cortex, cognition and the cell: new insights into the pyramidal neuron and prefrontal function / G.N. Elston // *Cereb. Cortex.* – 2003. Vol. 13, № 11. – P. 1124–38.
130. Eng L.F. GFAP and astrogliosis / L.F. Eng, R.S. Ghimikar // *Brain Pathol.* – 1994. – Vol. № 4. – P. 229 – 237.
131. Fanafoff A.A. Neonatal-Perinatal Medicine (Diseases of the Fetus and Infant) / A.A. Fanafoff, R.J. Martin // Mosby, – 2002. – P. 732 – 740.
132. Fernandez-Lopez D. Blood–brain barrier permeability is increased after acute adult stroke but not neonatal stroke in the rat / D. Fernandez-Lopez, J. Faustino, R. Daneman et al. // *The Journal of Neuroscience.* – 2012. – Vol. 32, № 28. – P. 9588 – 9600.
133. Fischer S. Hypoxia induces permeability in brain microvessel endothelial cells via VEGF and NO / S. Fischer, M. Clauss, M. Wiesten, // *Am. J. Physiol.* – 1999. – Vol. 276. – P. 812 – 820.
134. Fisher S. Effect of astroglial cells on hypoxia – induced permeability in PBMEC cells / S. Fisher, M. Woobem, J. Kleinstuck et al. // *Am. J. Physiol.* – 2000. – Vol. 279. – P. 935 – 944.
135. Flison B.A. Nitric oxide regulation of free radical and enzyme-mediated lipid and lipoprotein oxidation / B.A. Flison // *Arteriosclerosis, thrombosis and Vasc. Biol.* – 2000. – Vol. №7. – P. 1707 – 1715.
136. Fukuda S.A. Hemodynamics of cerebral arteries of infants with periventricular leukomalacia / S.A. Fukuda et al. // *Pediatrics.* – 2006. – Vol. 117. – №1. – P. 1 – 8.
137. Gasse H. Neuron-specific enolase as a marker of hypothalamoneurohypophyseal development in postnatal *Monodelphis domestica* (Marsupialia) / H. Gasse, W. Meyer // *Neurosci. Lett.* – 1995. – Vol. 189, № 1. – P. 54– 56.

138. Ghazi–Birry H.S. Human germinal matrix: venous origin of hemorrhage and vascular characteristics / H.S. Ghazi–Birry, W.R. Brown, D.M. Moody et al. // *Am. J. Neuroradiol.* – 1997. – Vol. 18. – P. 219–229.
139. Gilbert C.D. Brain states: top-down influences in sensory processing / C.D. Gilbert, M. Sigman // *Neuron.* – 2007. – Vol. 54, №5. – P. 677–696.
140. Goldman J.E. An immune-cytochemical study of intraneuronal inclusions of the caudate nucleus and substantia nigra. Reaction with an anti-actin antiserum / J.E. Goldman, D.S. Horoupian // *Acta Neuropathol.* – 1982. – № 53. – P. 300-302.
141. Grbavac Z. The role of thrombocytes in the development of ischemic cerebrovascular insult / Z. Grbavac // *Neurologija.* – 1989. – Vol. 38, № 2. – P. 95-110.
142. Gregersen M.I. Plasma volume determination with dyes: errors in colorimetry; use of the blue dye T-1824 / M.I. Gregersen, J.J. Gibson, E.A. Stead, // *Am J Physiol*– 1935. – Vol. 113. – P. 54–55.
143. Gupta S.N. Intracranial hemorrhage in term newborns: management and outcomes / S.N. Gupta, A.M. Kechli, U.S. Kanamalla // *Pediatr. Neurol.* – 2009. – Vol. 40. – P. 1–12.
144. Hall C.N. Capillary pericytes regulate cerebral blood flow in health and disease / C.N. Hall, C. Reynell, B. Gessleinet al. // *Nature.* – 2014. – Vol. 508. – P. 55 – 60.
145. Hamann G.F. Microvascular basal lamina antigens disappear during cerebral ischemia and reperfusion /G.F. Hamann, Y.Okada, R. Fitridgeet al. // *Stroke.* – 1995. – Vol. 26. – P. 2120 – 2126.
146. Hambleton G. Origin of intraventricular hemorrhage in the preterm infant / G. Hambleton, J.S. Wigglesworth // *Arch Dis Child.*– 1976. – Vol. 51.– P. 651– 659.
147. Hausenloy D.J. The mitochondrial permeability transition pore: its fundamental role in mediating cell death during ischaemia and reperfusion / D.J. Hausenloy, D.M. Yellon // *J. Mol. Cell. Cardiol.*– 2003.– Vol. 35.–P. 339–341.
148. Hawkins B.T. The Blood-Brain Barrier Neurovascular Unit in Health and Disease/ B.T. Hawkins, T.P. Davis // *Pharmacol. Rev.* – 2005. – Vol. 57, № 2. – P. 173–185.

149. Hitomi J. Involvement of caspase-4 in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and Abeta-induced cell death / J.Hitomi, T. Katayama, Y. Eguchi et al. // *J. Cell. Biol.*– 2004.– Vol. 165.– P. 347– 356.
150. Hoffmann A. High and Low Molecular Weight Fluorescein Isothiocyanate (FITC)–Dextrans to Assess Blood-Brain Barrier Disruption /A. Hoffmann et al. // *Technical Considerations. Transl. StrokeRes.* – 2011. – Vol. 2. – P. 106–111.
151. Hossman K.A. Viability threshold sand the penumbra off ocalischemia /K.A. Hossman// *Ann. Neurol.* – 1994. – Vol. 36. – P.557 – 565.
152. Hsieh M.C. Quantitative susceptibility mapping-based microscopy of magnetic resonance venography (QSM-mMRV) for in vivo morphologically and functionally assessing cerebromicrovasculature in rat stroke model / M.C. Hsieh, C.Y. Tsai, M.C. Liao et al. // *PLoS One.* – 2016. – Vol. 11, № 3. – P. 22 – 34.
153. Huong Z. Effect of cerebral ischemia in mice deficient in neuronal oxide synthase / Z. Huong, P.L. Huong, N. Panahian // *Science.* – 1994. – Vol. 265. – P. 1883 – 1885.
154. Hyun S.W. Hypoxia induces FoxO3a-mediated dysfunction of blood – brain / S.W. Hyun, Y.S. Jing // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2014. – Vol. 405, No. 4. – P. 1638 – 1642.
155. Ito T. Design method for the stability analysis of slope with landing pier / T. Ito, T. Matsui, W. P. Hong // *Soils and Foundations.* – 1979. – Vol. 19, № 4. – P. 21–33.
156. Jhawar B.S. Risk factors for intracranial hemorrhage among full-term infants: a case-control study / B.S. Jhawar // *Neurosurgery.* – 2013. – P. 581 – 590.
157. Kawauchi S. Light-scattering signal may indicate critical time zone to rescue brain tissue after hypoxia / S. Kawauchi, S. Sato, Y. Uozumi et al. // *J Biomed Opt.* – 2011. – Vol. 16, № 2. – doi: 10.1117/1.3542046.
158. Kiliç T, Anatomy of cerebral veins and sinuses /T. Kiliç, A. Akakin // *Front Neurol Neurosci.*– 2008. – Vol. 23.– P. 4 – 15.

159. Kirsch T. Altered gene expression in cerebral capillaries of stroke – prone spontaneously hypertensive rats / T. Kirsch, M. Wellner, H. Halleret al. // *Brain Res.* – 2001. – Vol. 910. – P. 106 – 115.
160. Kondo T., Astroglial cells inhibit the increasing permeability of brain endothelial cell monolayer following hypoxia reoxygenation / T. Kondo, H. Kinouchi, M. Kawase et al.// *NeurosciLett.*– 1996.– Vol. 208.– P.101– 104.
161. Koto T. Hypoxia disrupts the barrier function of neural blood vessels through changes in the expression of claudin – 5 in endothelial cells / T. Koto, K Takubo, S Ishida et al. // *Am. J. Patjol.* – 2007. – Vol. 170, № 4. – P. 1389 – 1397.
162. Kuroiwa T. The biphasic opening of the blood-brain barrier to proteins following temporary middle cerebral artery occlusion / T. Kuroiwa, P. Ting, H. Martinez et al. // *Acta Neuropathol (Berl).* – 1985. – Vol. 68. – P. 122–129.
163. Laser Institute of America, American National Standard for Safe Use of Lasers ANSI Z136.1-2000, American National Standards Institute, Inc., Orlando (2000).
164. Lawn J. E. 3.6 million neonatal deaths – what is progressing and what is not? /J.E. Lawn, K. Kerber, C. Enweronu-Laryea et al. // *Semin Perinatol.* –2010.– Vol. 34, № 6. –P. 371–386.
165. Liu C. Is there a role for magnetic resonance imaging in the evaluation of non-traumatic intraparenchymalhaemorrhage in children? / C. Liu, N. Segaren, T.S. Cox et al. // *Pediatr. Radiol.* – 2006. – Vol. 36, № 9. – P. 940–946.
166. Looney C.B. Intracranial hemorrhage in asymptomatic neonates: prevalence on MR images and relationship to obstetric and neonatal risk factors / C.B. Looney, J.K. Smith, L.H. Merck et al. // *Radiology.* – 2007. – Vol. 242. – P. 535–541.
167. Luo L. Association between Hypoxia and Perinatal Arterial Ischemic Stroke/ L.Luo, D. Chen, Y.Qu et al. // *A Meta-Analysis.*– 2014.– Vol. .9, № 2. – P. 90106.

168. MacLellan C.L. A critical appraisal of experimental intracerebral hemorrhage research / C.L. MacLellan, R. Paquette, F. Colbourne et al. // *Blood Flow Metab.* – 2012. – Vol. 32, №4. – P. 612–727.
169. Mark K.S. Cerebral microvascular changes in permeability and tight junctions induced by hypoxia – reoxygenation / K.S. Mark, T.P. Davis // *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* – 2002. – Vol. 282. – P. 1485 – 1494.
170. Marro P.J. The etiology and pharmacologic approach to hypoxic-ischemic encephalopathy in the newborn / P.J. Marro // *Neoreviews.* – 2007. – Vol. 3, №6. – P. 99.
171. Mayhan W.G. Role of veins and cerebral venous pressure in disruption of the blood-brain barrier / W.G. Mayhan, D.D. Heistad // *Circ. Res.* – 1986. – Vol. 59, № 2. – P. 216–220.
172. McCalden T.A. Sympathetic control of the cerebral circulation / T.A. McCalden // *J. Auton. Pharmacol.* – 1981. – Vol. 1. – P. 421–431.
173. McConnell E.D. Cerebral microcirculatory failure after subarachnoid hemorrhage is reversed by hyaluronidase / E.D. McConnell, H.S. Wei, K.M. Reitz et al. // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* – 2015. – P. 1–16.
174. McQuillan L.P. Hypoxia inhibits eNOS via transcriptional and posttranscriptional mechanisms / G.K. Leung, P.A. Marsden // *Am. J. Physiol.* – 1994. – Vol. 267. – P. 1921 – 1927.
175. Michoulas A. The role of hypoxia-ischemia in term newborns with arterial stroke / A. Michoulas, S. N. Basheer, E. H. Roland et al. // *Pediatr Neurol* – 2011. – Vol. 44, № 4. – P. 254 – 258.
176. Miyamoto O. Hypoxia, hyperoxia, ischemia and brain necrosis / O. Miyamoto, R.N. Auer // *Neurology.* – 2000. – Vol. 54, № 2. – P. 362–371.
177. Nag S. Blood-brain barrier permeability using tracers and immunohistochemistry / S. Nag // *Meth Mol Med.* – 2003. – Vol. 89. – P. 133–44.
178. Nathaniel D. Reliability in detection of hemorrhage in acute stroke by a new three-dimensional gradient recalled echo susceptibility-weighted imaging technique compared to computed tomography: A retrospective study / D. Nathaniel,

N. D. Wycliffe, J. Choe et al. // *J. Magn. Reson. Imaging.* – 2004. – Vol. 20, № 3. – P. 372–377.

179. Nelson M.T. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle / M.T. Nelson, J.M. Quayle // *Am. J. Physiol.* – 1995. – Vol. 268. – P. 799–822.

180. Nicklin S. The light still shines, but not that brightly? The current status of perinatal near infrared spectroscopy / S. Nicklin, I. Hassan, Y. Wickramasinghe et al. // *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* – 2003. Vol. 88. – P. F263–F268.

181. Olearczyk J.J. Receptor-mediated activation of the heterotrimeric G-protein G_s results in ATP release from erythrocytes / J.J. Olearczyk, A.H. Stephenson, A.J. Lonigro et al. // *Med Sci Monit.* – 2001. Vol. 7, № 4. – P. 669 – 674.

182. Paul V. K. The current state of newborn health in low income countries and the way forward / V. K. Paul // *Semin Fetal Neonatal Med.* –2006.– Vol. 11, № 1. – P. 7– 14.

183. Pavlov A.N. Cerebral venous dynamics in newborn mice with intracranial hemorrhage studied using wavelets / A. N. Pavlov, O.V. Semyachkina-Glushkovskaya, O.A. Sindeeva et al. // *Proc. SPIE.* – 2015. – Vol. 9322. – P. 932214–1.

184. Pavlov A.N. Multiresolution analysis of pathological changes in cerebral venous dynamics in newborn mice with intracranial hemorrhage: Adrenorelatedvasorelaxation / A. N. Pavlov, O.V. Semyachkina-Glushkovskaya, Y. Zhang et al. // *Physiol. Meas.* – 2014. – Vol. 35. – P. 1983–1999.

185. Pavlov A.N. Optical imaging of intracranial hemorrhage in newborns: modern strategies in diagnostics and direction for future research / A.N. Pavlov, O.V. Semyachkina-Glushkovskaya, V.V. Lychagov et al. // *Proc. SPIE.* – 2015. – Vol. 9448. – P. 9129P-1–9129P-5.

186. Pavlov A.N. Wavelet-based analysis of cerebrovascular dynamics in newborn rats with intracranial hemorrhages / A.N. Pavlov, A.I. Nazimov, O.N. Pavlova et al. // *J. Innovative Opt. Health Sci.* – 2014. – Vol. 7, № 1. – P.1350055–1–1350055-10.

187. Perlman J.M. Summary proceedings from the neurology group on hypoxic-ischemic encephalopathy // *Pediatrics*. – 2006. – Vol.117. – №3. – P. 28 – 33.
188. Pousset F. Cytokines and the brain / F. Pousset // *Eur Cytokine Netw.* – 1993. – Vol. 4, № 1. – P. 57-61.
189. Prabhakar N.R. Activation of nitric oxide synthase gene expression by hypoxia in central and peripheral neurons /N.R. Prabhakar, S.F. Pieramici, D.R. Premkumar et al. // *Mol. BrainRes.* –1996. – Vol. 43. – P. 341 – 346.
190. Qiao M. Blood-oxygen-level-dependent magnetic resonance signal and cerebral oxygenation responses to brain activation are enhanced by concurrent transient hypertension in rats. / M. Qiao, D. Rushforth, R. Wang et al. // *J Cereb Blood Flow Metab.* – 2007. – Vol. 27, № 6. – P. 1280–1289.
191. Raichle M.E. The pathophysiology of brain ischemia / M.E. Raichle // *Ann Neurol.* – 1983. – Vol. 13, № 1. – P. 2-10.
192. Rawson R.A. The binding of T-1824 and structurally related diazodyes by the plasma proteins / R.A. Rawson // *Am J Physiol*–1943. – Vol. 138. – P. 708–717.
193. Risau W. Differentiation-dependent expression of proteins in brain endothelium during development of the blood-brain barrier / W. Risau // *Dev.biol.* – 1986. – Vol. 117. – P.537–545.
194. Rooks V.J. Prevalence and evolution of intracranial hemorrhage in asymptomatic term infants / V.J. Rooks, J.P. Eaton, L.Ruess et al. // *AJNR Am J Neuroradiol.* – 2008. Vol. 29, № 6. – P. 1082-1089.
195. Sanborn M.R. Cerebral Hemodynamics at Altitude: Effects of Hyperventilation and Acclimatization on Cerebral Blood Flow and Oxygenation / M. R. Sanborn, M. E. Edsell, M. N. Kim et al. // *Wilderness Environ. Med.* – 2015. – Vol. 26, № 2. – P. 133–141.
196. Saper C.B. Correspondence of melanin-pigmented neurons in human brain with A1-A14 catecholamine cell groups / C.B. Saper, C.L. Petito // *Brain.* – 1982. – № 105. – P. 87-101.

197. Saria A. Evans blue fluorescence: quantitative and morphological evaluation of vascular permeability in animal tissues / A. Saria, J.M. Lundberg // *J. Neurosci Methods* –1983. – Vol. 8. – P. 41–49.

198. Sauder N.R. Ontogenetic development of brain barrier mechanisms / N.R. Sauder // *Handbook of Experimental Pharmacology*. – 1992 – Vol. 78. – P.328 – 369.

199. Schrader J. Morbidity and Mortality After Stroke, Eprosartan Compared With Nitrendipine for Secondary Prevention Principal Results of a Prospective Randomized Controlled Study (MOSES) / J. Schrader, S.Luders, A. Kulschewski et al. // *Stroke*. – 2005. – №36. – P. 1218 – 1226.

200. Semyachkina-Glushkovskaya O. Blood-brain barrier and cerebral blood flow: age differences in hemorrhagic stroke / O. Semyachkina-Glushkovskaya, O. Sindeeva, A. Abdurashitov et al. // *Journal of Innovative Optical Health Sciences*. – 2015. – Vol. 9, № 4. – 1550045 (10 pages).

201. Semyachkina-Glushkovskaya O. Hypoxia and neonatal haemorrhagic stroke: experimental study of mechanisms / O. Semyachkina-Glushkovskaya, E. Borisova, A. Namikin et al. // *The advances in Experimental Medicine and Biology*. – 2016. – Vol. 923. –P. 173 – 179.

202. Semyachkina–Glushkovskaya 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 et al. // *Journal of Innovative Optical Health Science. Rev.* – 2013b. – Vol. 3, № 3. – P. 1350023–1350033.

203. Semyachkina-Glushkovskaya O.V. 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 et al. // *Photonics & Lasers in Medicine*.– 2013. – P. 109–116.

204. Semyachkina-Glushkovskaya O. Cerebral venous circulatory disturbance as an informative prognostic marker for neonatal hemorrhagic stroke /

O. Semyachkina-Glushkovskaya, A. Pavlova, N. Navolokin et al. // Proc. of SPIE. – 2016. – Vol. 9887 – P. 98872I-1.

205. Semyachkina-Glushkovskaya O. 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 et al. // Proc. SPIE 9305, Optical Techniques in Neurosurgery, Neurophotonics, and Optogenetics II. – 2015. – P. – 93051D.

206. Semyachkina-Glushkovskaya 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 et al. // Biomed Opt Express. – 2015. – Vol. 6, № 10. – P. 4088–4097.

207. Semyachkina-Glushkovskaya O. The stress and vascular catastrophes in newborn rats: mechanisms preceding and accompanying the brain hemorrhages / O. Semyachkina-Glushkovskaya, E. Borisova, L. Avramov et al. // FrontiersinPhysiology. – 2016. – Vol. 7. – doi:10.3389/fphys.2016.00210

208. Shankaran S. Hemorrhagic lesions of the central nervous system / S. Shankaran // Oxford university Press. – 2000. – P. 151 – 164.

209. Shen J.G. Chinonin, a novel drug against cardiomyocyte apoptosis induced by hypoxia and reoxygenation / J.G. Shen, X.S. Quo, B. Jiang et al. // Biochim. Biophys.Acta.– 2005. – Vol. 1500. – P. 217 – 226.

210. Shibata M. White matter lesions and glial activation in a novel mouse model of chronic cerebral hypoperfusion /M. Shibata, R. Ohtani, M. Ihara et al. // Stroke. – 2004. – Vol.35, №11. – P.2598 – 2603.

211. Siegel M. Cranial computed tomography and real-time sonography in full-term neonates and infants / M. Siegel, J. Patel, M. Gado et al. // Radiol. – 1983. – Vol.149. – P. 111–116.

212. Sindeeva O. The stress-related changes in the cerebral blood flow in newborn rats with intracranial hemorrhage: metabolic and endothelial mechanisms / O. Sindeeva, E. Borisova, A. Abdurashitov et al. // Journal of Biomedical Photonics and Engineering. – 2016. Vol. 1, № 4. – P. 248– 254.

213. Stewaet P.A. Early ultrastructural changes in blood-brain barrier vessels of the rat embryo / P.A. Stewaet, K. Hayakawa // *Brain Res. Dev. BrainRes*– 1994. – Vol. 78, №1. – P. 25 – 34.
214. Stoll G. Inflammation and glial responses in ischemic brain lesions / G. Stoll, S. Jander, M. Schroeter // *Progr. In Neurobiol.* – 1995. – Vol.46. – P. 607 – 636.
215. Thoresen M. Twenty-four hours of mild hypothermia in unsedated newborn pigs starting after a severe global hypoxic-ischemic insult is not neuroprotective / M. Thoresen, S. Satas, E.M. Løberg et al. // *Pediatr Res.* – 2001. – Vol. 50, № 3. – P. 405-411.
216. Tomiyama Y. Cerebral blood flow during hemodilution and hypoxia in rats: role of ATP-sensitive potassium channels / Y. Tomiyama, J.E. Brian, M.M. Todd // *Stroke.* – 1999. – Vol.30, № 9. –P.1942 – 1947.
217. van Bel F. Aetiological role of cerebral blood-flow alterations in development and extension of peri-intraventricular haemorrhage / F. Van Bel, M. Van de Bor, T Stijnen et al. // *Dev. Med. Child. Neurol.* – 1987. – Vol. 29. – P. 601–614.
218. van der Aa N.E. Neonatal stroke: a review of the current evidence on epidemiology, pathogenesis, diagnostics and therapeutic options / N.E. van der Aa, M. Benders, F. Groenendaal et al. // *ActaPædiatrica.* – 2014. Vol. 103. – P. 356 – 364.
219. van der Meer A.D. Blood-brain Barrier (BBB): An Overview of the Research of the Blood-brain Barrier Using Microfluidic Devices / A.D. van der Meer, F. Wolbers, I. Vermes et al. // *RSC Nanosci. Nanotechnol.* – 2015. – № 36. – P. 40–56.
220. Vennekens R. Insights into TRPM4 function, regulation and physiological role / R. Vennekens, B. Nilius // *Pharmacol.* – 2007. – № 5. – P. 269–285.
221. Volbrodt A.W. *Folia Histochem* / A.W. Volbrodt, D.H Dobrogowsky// *Cytobiol.* – 1994. –Vol. №32. – P. 63 – 70.
222. Volpe J. Intracranial hemorrhage: Germinal matrix hemorrhage / J. Volpe // *In: Neurology of the Newborn, 5th.* Philadelphia, PA: Saunders Elsevier. – 2008. – P. 403– 463.

223. Volpe J.J. Encephalopathy of prematurity includes neuronal abnormalities / J.J. Voipe // *Pediatrics*. – 2005. – Vol. 116, №1. – P.221 – 225.
224. Walgen N.G. Neuroprotection in cerebral ishaemia: facts and fancies-the needfor new approaches /N.G. Walgen, N.A Ahmed. // *Cerebrovasc.Dis.* – 2004. – Vol. 1 – P. 153 – 166.
225. Wang J. Pediatric perfusion MR imaging using arterial spin labeling / J. Wang, D.J. Licht // *Neuroimag. Clin.* – 2006. – Vol. 16. – P. 149–167.
226. Wang J. Pediatric perfusion imaging using pulsed arterial spin labeling / J. Wang, D. Licht, G. Jahng et al. // *J MagnReson Imaging*. – 2003. – Vol. 18. – P. 404–413.
227. Whitby E.H. Frequency and natural history of subdural hemorrhages in babies and relation to obstetric factor / E.H. Whitby, P.H. Griffiths, S. Rutter et al. // *Lancet*. – 2004. – Vol. 363. – P. 846–851.
228. Witt K.A Hypoxia – inducible factor and nuclear factor kappa – activation on blood – drain barrier endothelium hypoxic reoxygenation stress / K.A. Witt, K.S. Mark, T.P. Davis, J. Huber // *J. Neurochem.* – 2005. – Vol. 92. – P. 203 – 214.
229. Witt K.A. Effects of hypoxia – reoxygenation on rat blood – brain permeability and tight junctions protein exsression / K.A. Witt, K.S.Mark, S.Hom et al. // *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* – 2003. – Vol. 285. – P. 2820 – 2831.
230. Wolburg H. Tight junctions of the blood – brain barrier: development, composition and regulation / H. Wolburg, A. Lippoldt // *Vascular Pharmacology Cellural and Molecular Neurobiology*. – 2005. – Vol. 25, № 1. – P. 323 – 337.
231. Wolf M. Tissue oxygen saturation measured by near infrared spectrophotometry correlates with arterial oxygen saturation during induced oxygenation changes in neonates / M. Wolf, K. von Siebenthal, M. Keel et al. // *Physiol. Meas.* – 2000. – Vol. 24. – P. 481–491.
232. Wolf M. Comparison of three methods to measure absolute cerebral hemoglobin concentration in neonates by near-infrared spectrophotometry / M. Wolf, K. von Siebenthal, M. Keel et al. // *J. Biomed. Opt.* – 2002. – Vol. 7, № 2. – P. 221–227

233. Wolf M. Continuous noninvasive measurement of cerebral arterial and venous oxygen saturation at the bedside in mechanically ventilated neonates / M. Wolf, G.Duc, M. Keel et al. // Crit. Care Med. – 1997. – Vol. 25, № 9. – P. 1579–1582.

234. Yanyan L. Assessing the effects of norepinephrine on single cerebral microvessels using optical-resolution photoacoustic microscope / L. Yanyan, X. Yang, H. Gong et al. // J. Biomed. Opt. – 2013. – Vol. 18, № 7.– P. 076007.

235. Zhao Z. Establishment and dysfunction of blood – brain barrier / Z. Zhao, A.R. Nalson, C. Betsholz et al. // Department of physiology and biophysics and the ZikhaNeurogenetic Institute, Keck Schol of Medicine of the University of Southern California. – 2015. – Vol. 163, № 5. – P. 1064–1078.