

Министерство образования и науки Российской Федерации
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г.ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра физиологии человека и животных

**МИКРОКАПСУЛЫ КАК ТРАНСПОРТНАЯ СИСТЕМА, СПОСОБНАЯ
ПРОХОДИТЬ ЧЕРЕЗ ГЕМАТО-ЭНЦЕФАЛИЧЕСКИЙ БАРЬЕР У
НОВОРОЖДЕННЫХ КРЫС С ЦЕРЕБРАЛЬНЫМИ ГЕМОМРАГИЯМИ**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 4 курса 421 группы
направления 06.03.01 – Биология
Биологического факультета
Бодровой Анастасии Алексеевны

Научный руководитель

ассистент

_____ О.А. Синдеева

Заведующий кафедрой

д. б. н., доцент

_____ О.В. Семячкина-Глушковская

Саратов 2016

Введение. Острые нарушения мозгового кровообращения являются одной из малоизученных проблем детской неврологии, актуальность которой определяется высокой степенью инвалидизации и смертности. Принято считать, что развитие острого нарушения мозгового кровообращения является прерогативой лишь людей пожилого возраста. Однако современная статистика отмечает значительное омоложение этого патологического состояния и увеличение его случаев у новорожденных и детей. Около 40% всех случаев инсульта приходится на возраст до года [1].

Кровоизлияние в головной мозг у новорожденных является одной из основных причин развития когнитивных дисфункций, которые встречаются у 42%-85% выживших детей с диагностированными церебральными гемorragиями [2]. Нарушения работы центральной нервной системы определяются не только типом и тяжестью кровоизлияний, но и их последующим воздействием на процессы развития и созревания мозга. Механизмы и причины, лежащие в основе церебральных гемorragий трудно определить в силу сложности постановки диагноза и недостатка клинических данных, связанных с частым бессимптомным течением данного заболевания [3].

Проблемой таких инсультов является не только, что они бессимптомно протекают, но и в лечении, в настоящее время не существует эффективных методики лечения детского инсульта. Лекарства, которые направлены на лечения церебральных инсультов, не доходят до органа-мишени. Причиной не прохождения лекарственных средств является гемато-энцефалический барьер (ГЭБ), который существует преградой между лекарством и мозгом [4].

Одно из решений данной проблемы являются разработка дистанционно управляемых систем доставки к органам-мишеням. С их помощью возможно проникновение лекарственных средств через ГЭБ [5].

К таким системам можно отнести микрокапсулы. Они обладают рядом преимуществ: уменьшение реакционной способности лекарственных

препаратов, пролонгирование сроков годности лабильных лекарственных веществ, снижение токсичности препарата, придание ему новых физических свойств (снижение летучести, изменение плотности), пролонгирование действия активных веществ [6].

Выше изложенное определило цель и задачи исследования.

Целью исследования явилось изучение проницаемости гемато-энцефалического барьера для флуоресцентных композитных микрокапсул у новорожденных крыс с церебральными геморрагиями.

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

1. оценить состояние композитных микрокапсул, полученных на основе синтетических биodeградируемых полиэлектролитов, в физиологическом растворе и плазме здоровых новорожденных крыс и новорожденных крыс с мозговыми геморрагиями с применением светового микроскопа;

2. исследовать возможность доставки в мозговую ткань флуоресцентных композитных микрокапсул разного размера, полученных на основе синтетических и биodeградируемых полиэлектролитов, у здоровых новорожденных крыс и новорожденных крыс с церебральными геморрагиями с применением конфокальной микроскопии.

Исследования были выполнены на новорожденных белых беспородных крысах 9 дневного возраста со средней массой тела 10–12 гр, так как анатомическое и функциональное состояние ГЭБ у крыс 9 дневного возраста соответствует развитию ГЭБ у детей на 40 недели гестации [7].

Выпускная квалификационная работа состоит из сокращения, введения, основной части, заключения, выводов, списка использованных источников. Основная часть включает в себя: обзор литературы, материал и методы, результаты исследования.

Основное содержание работы. В исследованиях использовалась *модель развития мелкоочаговых мозговых геморрагий в коре головного мозга у новорожденных крыс*. Новорожденные крысы 9 дневного возраста помещались в звукоизоляционную плексигласовую камеру объемом 2000 см³. Затем, в течение 2 часов, на крыс воздействовали прерывистым звуком силой 120 дБ, 17 Гц (10 секунд - звук, 60 секунд - перерыв). Интракраниальные геморрагии развиваются через 24 часа после отмены стресса.

Наличие кровоизлияний и предшествующих им изменений в тканях головного мозга подтверждалось при помощи *гистологического исследования*. Новорожденных крыс декапитировали, затем аккуратно извлекался головной мозг для проведения в дальнейшем гистологического исследования. Извлеченный образец для фиксации помещался в 10% забуференный раствор формалина, на срок не менее суток. Затем образец подвергался стандартной спиртовой гистологической проводке и заливался жидким парафином. Толщина срезов не превышала 4-5 мкм. Для окрашивания срезов мозговой ткани применялись гистологические красители: гематоксилин и эозин.

Изучение поведения композитных микрокапсул (средний диаметр 5мкм, краситель Evans Blue) в физиологическом растворе и плазме новорожденных крыс проводилось с использованием *световой микроскопии*. Суспензию капсул с физиологическим раствором или плазмой, в соотношении 10 мкл - суспензии капсул, 100 мкл - физиологического раствора / плазмы крови, помещали на предметное стекло с помощью микропипетки для проведения исследования.

Плазму новорожденных крыс получали *стандартным методом получения плазмы крови*. В ходе проведения данного метода были взяты новорожденные крысы со стресс-индуцированным церебральным геморрагическим инсультом, а именно кровоизлиянием в головной мозг для проведения декапитации и дальнейшего сбора крови, чтобы в дальнейшем произвести центрифугирование. Ротор вращался 15 минут со скоростью - 3000 об/мин, вследствие чего создавались значительные по величине

центробежные силы, под действием которых происходило разделение плазмы крови от форменных элементов.

Для дальнейших исследований прохождения композитных флуоресцентных микрокапсул синтезированных на основе синтетических и биodeградируемых полиэлектролитов в головной мозг через ГЭБ, использовали *метод конфокальной микроскопии*. Для этого новорожденным крысам с церебральными гемorragиями и здоровым новорожденным крысам в хвостовую вену вводилась суспензия микрокапсул в объеме 0,1 мл, через 10 минут после введения суспензии микрокапсул животных декапитировали, аккуратно извлекали мозг и помещали в 10% раствор формалина на срок не менее суток. Далее образцы мозга исследовались на конфокальном микроскопе серии Leica TCS SP8 X, для этого задавалась определенная длина волны, в зависимости от вида композитных микрокапсул (от максимума поглощения и максимума испускания красителя). Для магнитных микрокапсул содержащих краситель - TRITC (поглощение 557 нм, испускание 576 нм) использовалась длина волны 550-580 нм, краситель FITC (поглощение 492 нм, испускание 518 нм) длина волны - 490-520 нм, краситель Cy7 (поглощение 750 нм, испускание 773 нм) длина волны - 750-800 нм.

Для оценки содержания капсул в слое мозговой ткани (70 мкм) в последнем эксперименте с применением капсул, содержащих 2 красителя - FITC, Cy7, во флуоресцентном режиме устанавливался куб N 2.1 с фильтрами возбуждения в диапазоне 515-560 нм, дихроичное зеркало с длиной волны среза 580 нм и фильтр детектора, пропускающий длины волн более 590 нм.

Конфокальный микроскоп создаёт чёткое изображение образца, которое при использовании обычного микроскопа представляется размытым. Это достигается путём отрезания апертурой фонового света идущего из глубины образца, то есть того света, который не попадает на фокальную плоскость объектива микроскопа. В результате изображение получается с контрастом лучшим, чем в обычном оптическом микроскопе [8].

Капсулы синтезировались на базе Лаборатории "Дистанционно управляемых систем для тераностики" Саратовского национально исследовательского государственного университета им. Чернышевского. Для исследования были синтезированы следующие типы микрокапсул:

1. микрокапсулы на основе синтетических полиэлектролитов:
[CaCO₃+BSA(EBD)]/[ПАН/PSS/(ПАН/BSA(EBD))₂/ПАН/PSS] и
[ПАН/PSS/ПАН/FeNP/(ПАН/PSS)₃ПАН/BSATRITC/ПАН/PSS]
2. микрокапсулы на основе биodeградируемых полиэлектролитов:
[CaCO₃+BSA(EBD)]/[pArg/DS/pArg/BSA (EBD)/pArg/DS],
[pArg/FeNP/{pArg/DsS}₂{pArg(Cy7)/BSA(Cy7)}₂/pArg/Ds] и
[CaCO₃+BSA(TRITC)]/[pArg/DS/pArg/BSA (Cy7)/pArg/DS].

На первом этапе эксперимента *in vitro* изучались особенности поведения композитных микрокапсул (краситель Evans Blue) в физиологическом растворе и плазме новорожденных крыс с использованием световой микроскопии. Результаты исследования свидетельствуют о том, что микрокапсулы, синтезированные на основе синтетических полиэлектролитов в физиологическом растворе практически не подвержены агрегации. Аналогичный результат был получен в опыте с плазмой здоровых новорожденных крыс и крыс с церебральными гемorragиями.

Микрокапсулы, синтезированные на основе биodeградируемых полиэлектролитов, в физиологическом растворе также практически не агрегируют. Однако в плазме здоровых новорожденных крыс и крыс с церебральными гемorragиями наблюдались достаточно крупные агрегаты этого типа микрокапсул.

На втором этапе эксперимента исследовалась проницаемость ГЭБ у здоровых и стрессированных новорожденных крыс с использованием конфокальной микроскопии.

Эксперимент показал, что микрокапсулы, полученные на основе синтетических полиэлектролитов, присутствовали в мозговой ткани как стрессированных, так и здоровых новорожденных крыс в небольшом количестве, аналогичный результат мы получили и в опыте с микрокапсулами, полученными на основе биodeградируемых полиэлектролитов.

Микрокапсулы, синтезированные на основе синтетических и биodeградируемых полиэлектролитов, проходили в небольшом количестве через ГЭБ. Однако, несмотря на положительный результат, синтетические микрокапсулы для дальнейшего использования *in vivo* не подходят, так как после их введения в организм, они оседают в тканях и не биodeградируют, что может в дальнейшем сказаться на состоянии организма в целом. Поэтому дальнейшие эксперименты были проведены с микрокапсулами, синтезированными на основе биodeградируемых полиэлектролитов.

На третьем этапе эксперимента исследовалась проницаемость ГЭБ для биodeградируемых микрокапсул, содержащих два красителя (TRITC, Cy7). Такой тип микрокапсул был синтезирован для более достоверной идентификации микрокапсул в срезе мозговой ткани новорожденной крысы, кроме того он был значительно меньше микрокапсул, которые мы использовали ранее на втором этапе эксперимента ($d = 4 \pm 1$ мкм, $d = 5 \pm 1$ мкм).

Результаты исследования показали, что композитные микрокапсулы диаметром $1 \pm 0,3$ мкм, содержащие два красителя (TRITC, Cy7), присутствовали в срезе коры больших полушарий в значительном количестве. Однако, у новорожденных крыс с церебральными геморрагиями отмечалось гораздо больше композитных микрокапсул в мозговой ткани, чем у здоровых новорожденных крыс.

На конфокальном изображении отчётливо видна локализация микрокапсул в мозговой ткани как новорожденных крыс с церебральными геморрагиями, так и у здоровых новорожденных крыс.

Таким образом, на основании полученных результатов можно говорить о том, что композитные микрокапсулы, синтезированные на основе

биodeградируемых ($d = 5 \pm 1$ мкм) и синтетических ($d = 4 \pm 1$ мкм) полиэлектролитов способны проходить через ГЭБ в небольшом количестве. Однако, как уже было изложено выше, микрокапсулы, синтезированные на основе синтетических полиэлектролитов, не могут быть использованы в клинической практике, даже, несмотря на меньшую агрегацию в плазме крови, показанную в нашем эксперименте, так как они не способны к биodeградации, и оседают в тканях организма. Микрокапсулы, полученные на основе биodeградируемых полиэлектролитов размером $1 \pm 0,3$ мкм способны проходить через ГЭБ в значительном количестве. Кроме того их способность к биodeградации дает им значительное преимущество для использования в клинике и эксперименте [9].

Заключение. В ходе исследований было изучено несколько видов микрокапсул синтезированных на основе биodeградируемых и синтетических полиэлектролитов разного размера. Все виды микрокапсул способны проходить в небольшом количестве в мозговую ткань. Развитие церебральных геморрагий усиливают проницаемость ГЭБ для микрокапсул. Однако, как известно из литературных данных, синтетические микрокапсулы не подходят для дальнейших исследований *in vivo*, так как, дойдя до органа-мишени, они оседают в тканях и не растворяются, что может губительно сказаться на состоянии организма. В то время как микрокапсулы, синтезированные на основе биodeградируемых полиэлектролитов, дойдя до органа-мишени, растворяются, не причиняя вреда организму, высвобождая лекарственный препарат.

В результате исследования были сделаны следующие выводы:

1. микрокапсулы, полученные на основе синтетических полиэлектролитов, подвержены меньшей агрегации в физиологическом растворе, а так же плазме здоровых новорожденных крыс и крыс с церебральными геморрагиями в сравнении с микрокапсулами, синтезированными на основе биodeградируемых полиэлектролитов;

2. композитные флуоресцентные микрокапсулы, синтезированные на основе синтетических ($d = 4 \pm 1$ мкм) и биodeградируемых ($d = 5 \pm 1$ мкм) полиэлектролитов способны в небольшом количестве проходить через ГЭБ, как у здоровых, так и у новорожденных крыс с церебральными геморрагиями;

3. развитие церебральных геморрагий приводит к усилению проницаемости ГЭБ для композитных флуоресцентных микрокапсул ($d = 1 \pm 0,3$ мкм), синтезированных на основе биodeградируемых полиэлектролитов, благодаря чему они способны в значительном количестве проходить в мозговую ткань.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Ишемические и геморрагические инсульты у недоношенных детей / Е.Г. Амос [и др.] // Всероссийский съезд неврологов. Казань, 2010. С. 193-194.
2. Intracranial hemorrhage in full-term newborns: a hospital-based cohort study / A.J. Brouwer [et al.] // *Neuroradiology*. 2010. Vol. 520. P. 567-576.
3. Ballabh, P. Anatomic analysis of blood vessels in germinal matrix, cerebral cortex, and white matter in developing infants / P. Ballabh, A. Braun // *Journal Pediatr. Res*. 2004. Vol. 56. P. 117-124.
4. Joob, F. Endothelial cells of the brain and other organ systems: some similarities and differences / F. Joo // *Journal ProgNeurobiol*. 1996. № 48. P. 255-273.
5. Nanoparticles as Blood–Brain Barrier. Permeable CNS Targeted Drug Delivery Systems / M. Grabrucker [et al.] // *Journal Top Med Chem*. 2013. P. 72-85.
6. Крикова, А.В. Технология приготовления таблеток с микрокапсулами диосмина / А.В. Крикова // *Вестник новых медицинских технологий*. 2006. Т. 13, № 2. С. 144-145.
7. Modeling transformations of neurodevelopmental sequences across mammalian species / A.D. Workman [et al.] // *Journal Neurosci*. 2013. Т. 33. P. 7368-7383.
8. *Handbook of Biological Confocal Microscopy* / J.B. Pawley [et al.]. Berlin: Springer, 2006. 340 p.
9. Бородина, Т.Н. Биodeградируемые полиэлектролитные микрокапсулы / Т.Н. Бородина, Е.А. Марквичева. LAP LAMBERT Academic Publishing, 2013. 108 с.