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

Новый метод повышения проницаемости гематоэнцефалического барьера с помощью звука

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

Студента 2 курса 241 группы
направления 06.04.01 «Биология»,
биологический факультет, кафедра физиологии человека и животных
Гекалюка Артемия Сергеевича

Научный руководитель
Зав. кафедрой физиологии человека и животных,
д.б.н. профессор О. В. Семячкина-Глушковская
(подпись, дата)
15.06.17

Зав. кафедрой физиологии человека и животных,
д.б.н. профессор О. В. Семячкина-Глушковская
(подпись, дата)
15.06.17

Саратов 2017

Актуальность работы: Гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) - высокоорганизованная морфофункциональная система, выполняющая барьерную функцию, выполняемая эндотелиацитами церебральных капилляров, глией и астроцитами.

Существование ГЭБ влияет на функции всей центральной нервной системы (ЦНС). А именно барьер выполняет активное взаимодействие между кровотоком и ЦНС. Анатомические элементы, из которых складывается структура ГЭБ, не только защищает мозг, но и регулирует его жизнедеятельность, питание, выведение продуктов обмена веществ. Этими элементами являются функционально и анатомически связанные между собой эндотелиоциты капилляров головного мозга, астроциты, нейроны и перициты.

Наличие ГЭБ, с одной стороны, помогает ограничить транспорт из крови в головной мозг токсинов и некоторых метаболитов, проникающих в кровь или образовавшихся в самом организме, но с другой стороны препятствует транспорт лекарственных препаратов при различных видах патологий ЦНС (ишемия, гипоксия, опухоли и другие заболевания головного мозга), что в свою очередь является причиной неэффективности фармакотерапии, при лечении данных заболеваний

Среди 7000 препаратов, зарегистрированых в общей базе данных лекарственных препаратов, только 5% могут способствовать лечению неврологических заболеваний. Причиной этого является то, что до 95% фармацевтических веществ имеют крупные молекулы (антитела, рекомбинантные белки, генная терапия), а также и самые малые молекулы входящие в состав лекарственных препаратов, с трудом или вовсе не проходят через ГЭБ.

Заболевания ЦНС составляют до 30% от всех заболеваний, поэтому в последние четыре десятилетия исследователи активно занимаются решением данной проблемы.

В течение столетия изучения ГЭБ (1880-1980) была создана карта анатомического строения для физиологии барьера. Следующие 30 лет были направлены на понимание механизмов, лежащих в основе явления ГЭБ. В настоящее время началось развитие различных способов, для доставки лекарственных препаратов в ткань мозга через барьер. Используются такие методы для преодоления ГЭБ, как физические и химические подходы.

Тем не менее, исследования процесса открытия барьера, для лечения заболеваний ЦНС происходит очень медленно из-за инвазивности применяемых методов: фотодинамическое открытие на уровне ГЭБ со стереотаксической процедурой; сложности медицинских манипуляций: внутриартериальное введение маннитола; высокой стоимости препаратов: трансмукозная доставка лекарств, которые могут применяться только в низких концентрациях (интраназальный доставка препарата); а также в связи с небольшими размерами зон, на которые возможно безопасное воздействие при проводимом лечении, например при применении сфокусированного ультразвука зона воздействия составляет 1 мм.

Поэтому перед современными учеными стоит задача о безопасном «открытии» ГЭБ с целью доставки препаратов в ткани мозга.

Целью данной работы явилось изучение нового, альтернативного, неинвазивного метода, временного повышения проницаемости ГЭБ с помощью сильного звукового воздействия (110 дБ, 370 Гц).

Для реализации поставленной цели необходимо были сформулированы следующие задачи:

1) изучить временную проницаемость ГЭБ для низкомолекулярных веществ, после звукового воздействия.

2) изучить временную проницаемость ГЭБ для высокомолекулярных веществ, после звукового воздействия.

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

себя три раздела: обзор литературы, материалы и методы и результаты исследования. Раздел обзор литературы состоит из двух подразделов: гематоэнцефалический барьер строение и функции, методы открытия гематоэнцефалического барьера. Раздел материалы и методы представлен описанием исследуемых объектов и условий проведения эксперимента. Раздел результаты исследования включает четыре подраздела: результаты исследования проницаемости ГЭБ для высокомолекулярных веществ при помощи конфокальной микросокпии, результаты исследования проницаемости ГЭБ для высокомолекулярных веществ методом спектрофлуориметрии, результаты исследования проницаемости ГЭБ для низкомолекулярных веществ методом магнитно-резонансной томографии, результаты исследования проницаемости ГЭБ для низкомолекулярных веществ с помощью гистологического метода.

Объектом исследования служили особи белых половозрелых мышей.

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

Для временного повышения проницаемости ГЭБ, нами был разработан новый неинвазивный высоко-воспроизводимый метод, с целью дальнейшего использования данного подхода для доставки фармакологических препаратов и наноразмерных транспортных систем в ткани мозга.

Проницаемость ГЭБ изучали с помощью маркеров разного веса:

1) Для определения повышения проницаемости ГЭБ для высокомолекулярных веществ применялись методы:

А) Спектрофлуориметрический метод с использованием высокомолекулярного красителя Evans Blue, 68 кДа (2% раствор в объемной дозе 0,2 мл/100 гр мыши, Sigma, iv).

Б) Конфокальная микроскопия с применением Dextran, 70 кДа (1% раствор в объемной дозе 0,2 мл/100 гр/ мыши, iv, меченый тетраметилродамином).

2) Для определения проницаемости ГЭБ для низкомолекулярных веществ использовались следующие методы:

А) Гистологический метод, с помощью которого определялась временная проницаемость ГЭБ для воды в паренхиму мозга.

Б) Метод магнитно-резонансной томографии с внутривенным ведением контрастного вещества, а именно препарата Гадолиний (1.2 мл/кг, iv, Magnevist®Hitachi Medical Corporation, Japan, T2 взвешенный режим).

Для определения повышения проницаемости ГЭБ для высокомолекулярного вещества Dextran, 70 кДа (1% раствор в объемной дозе 0,2 мл/100 гр/мыши, iv, меченый тетраметилродамином), использовалась конфокальная микроскопия. Срезы мозга мышей, с толщиной среза 50-60 мкм изучались на конфокальном микроскопе 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.

Также для определения проницаемости ГЭБ для высокомолекулярных соединений, использовался краситель Evans Blue, 70 кДа (2% раствор в объемной дозе 0,2 мл/100 гр мыши, Sigma, iv).

Данный краситель весит 961 Да, но при попадании в кровь взаимодействует с альбуминами плазмы крови, за счет этого Evans Blue повышает свой вес до 68,5 кДа. Поэтому Evans Blue введенный внутривенно, не может пройти через ГЭБ в нормальном состоянии, но при этом достаточно легко может пройти через ГЭБ, после звукового воздействия.

Спектрофлуорометрию проводили на спектрофлуориметре Cary Eclipse, Agilent, США) 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.

Магнитно-резонансную томографию (МРТ) проводили на томографе ClinScan 7T (Bruker Biospin) под наркозом смеси рометара с золетилом (соотношение 1:3) 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. 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.

Постановка эксперимента

Животных разделили на четыре группы:

1) контрольную - интактные животные (n=30);

2) мыши через час после звукового воздействия (n=30); .

3) мыши через 4 часа после звукового воздействия (n=30);

4) мыши через 24 часа после звукового воздействия (n=30);

Три опытные группы были подвержены звуковому воздействию. Здоровые мыши помещались в звукоизолирующую плексигласовую камеру. В течении 2-х часов животные подвергаются прерывистому звуку (100 дБ, 370 Гц), с последующим алгоритмом: 10 сек. звук 60 сек. перерыв.

По окончании звукового воздействия, животным делали ретроорбитальную пункцию, с целью внутривенного введения низкомолекулярных и высокомолекулярных маркеров для изучения временной проницаемости ГЭБ.

С помощью конфокальной микроскопии были изучены проницаемость барьера для высокомолекулярных веществ.

Экспериментальные группы мышей (1ч., 4ч., 24ч.) помещались в плексигласовую камеру для дальнейшего звукового воздействия (10 сек. звук, 60 сек. перерыв). После звукового воздействия, применялась ретроорбитальная пункция для введения Dextran 70 кДа. Через определенное время (0ч., 1ч., 4ч., 24ч.) производилась декапитация животного, с последующей трепанацией черепа, для изъятия мозга. Мозг помещалась в 10% раствор формалина. После забора материала выполнялась заливка парафином и нарезка данных блоков на микротоме для парафиновых срезов МПС-2 с толщиной среза 50-60 мкм. Полученные парафиновые срезы наклеивались на предметное стекло, смазанное смесью белка с глицерином (1:1) и подсушивали в термостате при 37°C. Позже проводили депарафинизацию данных парафиновых срезов, для дальнейшего использования их на конфокальном микроскопе. Конфокальная микроскопия. Возбуждение: 550нм , Эмиссия: 577-587 нм.

С помощью спектрофлуориметрии была изучена проницаемость барьера для высокомолекулярных веществ.

Перед звуковым воздействием, группам животных применялась ретроорбитальная пункция для введения красителя Evans Blue, 68 кДа. Экспериментальные группы мышей (1ч., 4ч., 24ч.) помещались в плексиглазовую камеру для дальнейшего звукового воздействия (10 сек. звук, 60 сек. перерыв). Через определенное время (0ч., 1ч., 4ч., 24ч.) осуществляется перфузия изотоническим раствором с последующей предфиксацией органов in situ. Для этого грудная клетка мыши вскрывается, визуализируется сердце, надрезается верхушка левого желудочка и правое предсердие. Катетер перистальтического насоса (предварительно заполненный фосфатно-солевым буфером pH=7.4) вставляется в левый желудочек, включается прокачка (10 мл/мин) до обесцвечивания стекаемой жидкости (максимальное удаление крови из органов, примерно 50 мл/мышь).

Затем перфузируется нейтрализованный 4% параформалин (до состояния фиксации тканей) с такой же скоростью. После перфузии, проводится декапитация, с последующей трепанацией черепа животного, для изъятия мозга. Изъятый мозг гомогенизировали и добавляли 500 мкл физ.раствора Через час после гомогенизации центрифугировали на 3000 оборотах в течение 30 минут. После центрифугирования забирали надосадочную жидкость. К надосадочной жидкости добавляли 50% раствор трихлоруксусной кислоты в объеме 1:3. Данный раствор снова центрифугировали на 30000 оборотах в течение 30 мин. Отбирали надосадочную жидкость и добавляли 95% раствора этанола в объеме 1:3. Раствор распределялся по лункам, с последующим определением плотности на спектрофлуориметре с длинной волны возбуждения 620 нм и на длине волны излучения 680 нм.).

Для изучения проницаемость ГЭБ для низкомолекулярных веществ использовался метод МРТ

Перед звуковым воздействием все экспериментальные группы (контроль, 1ч., 4ч., 24ч.) наркотизировались с помощью раствора золетила и рометара (соотношение 1:3) и проводился МРТ анализ в Т1 и Т2 модах без введения контраста. После МРТ анализа экспериментальные группы мышей (1ч., 4ч., 24ч.) подвергались звуковому воздействию (10 сек. звук, 60 сек. перерыв). Всем экспериментальным группам вводился ретроорбитально контраст Гадолиний (1.2 мл/кг, iv, Magnevist®Hitachi Medical Corporation, Japan, Т2 взвешенный режим).и проводится повторное МРТ исследование в Т1 и Т2 модах.

Проницаемость барьера для низкомолекулярных веществ также использовался гистологический метод.

После забора материала выполняется его проб подготовка к исследованию, включающая в себя ряд этапов. Фиксация — фрагмент ткани выдерживают в 10% забуференном формалине в течение суток. Гистологически проводка — процесс дегидратации (обезвоживания)

фрагмента ткани и пропитки его парафином. Проводка осуществлялась путем последовательного погружения ткани в растворы ксилола и этилового спирта. Заливка —создание парафинового блока. Выполнялась путем заливания фрагмента ткани жидким парафином. Резка, или микротомирование. Толщина срезов, предназначенных для световой микроскопии, не превышала 4—5 мкм. Окрашивание срезов осуществлялась с помощью красителей, гемотакселина и эозина.

Обсуждение результатов исследования

Исследования проницаемости ГЭБ для высокомолекулярных веществ при помощи конфокальной микросокпии показали, что через час после звукового воздействия, отмечалось выраженное диффундирование флуоресцентного Dextran (70 кДа) за пределы сосудов в паренхиму мозга, через 4 и 24 часа после звукового воздействия наблюдалось нормализация работы ГЭБ. Это показывает, что данный метод позволяет временно повысить проницаемость ГЭБ.

Результаты конфокальной микроскопии, подтверждались спектрофлуориметрическим методом. Повышение накопления красителя в тканях мозга у опытной группы животных, связанного с альбумином крови (68 кДа), приходилось на 60 мин после звукового воздействия. Через 4 часа и 24 часа после звука, концентрация Evans Blue в тканях мозга приходила в норму и была как у контрольной группы животных. Спектрофлуориметрия еще раз подтверждает, что данный метод открытия барьера с помощью звука, имеет временный характер.

С помощью метода МРТ, были проведены исследования проницаемости барьера для низкомолекулярных веществ, а именно для гадолиния (552 Да). Через час после звукового воздействия происходила интенсивная экстравазация гадолиния в ткани мозга у опытной группы животных. Нормальная работа барьера восстанавливалась через 4 часа после звукового воздействия.

Результаты гистологического анализа показали, что через 1 час после звукового воздействия наблюдалось развитие умеренной периваскулярной эдемы. Через 4 часа после звука, происходило усиление динамики развития периваскулярной эдемы. На следующие сутки после звукового воздействия, отмечалась тенденция к нормализации гистологической картины тканей и сосудов мозга. Через 48 часов после звука, происходило полное восстановление тканей мозга. Образование кровоизлияний на фоне звука, не было выявлено.

Заключение: По результатам проведенной работы были сделаны следующие выводы:

1) Определение проницаемости ГЭБ для высокомолекулярных веществ с помощью конфокальной микроскопии и спектрофлуориметрии показали, что только через 1 час после звукового воздействия наблюдалась высокая проницаемость барьера для высокомолекулярных веществ. Через 4 и 24 часа проницаемость ГЭБ приходило в норму.

2) При помощи МРТ и гистологических исследований, были произведены определения проницаемости ГЭБ для низкомолекулярных веществ. Метод МРТ показал, что только через 1 час после звука, гадолиний диффундировал через сагиттальный синус. Через 4 и 24 часа каких либо изменений не было выявлено. Результаты гистологического анализа показали, что через 1 час после звукового воздействия наблюдалось развитие умеренной периваскулярной эдемы. Через 4 часа после звука, происходило усиление динамики развития периваскулярной эдемы. На следующие сутки после звукового воздействия, отмечалась тенденция к нормализации гистологической картины тканей и сосудов мозга. Через 48 часов после звука, происходило полное восстановление тканей мозга. Образование кровоизлияний на фоне звука, не было выявлено.