

МИНОБРАЗОВАНИЯ РОССИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ П.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра физиологии человека и животных

**ПРИМЕНЕНИЕ ЗОЛОТЫХ НАНОЧАСТИЦ И ОПТИЧЕСКОЙ
КОГЕРЕНТНОЙ ТОМОГРАФИИ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ
ДРЕНАЖНОЙ ФУНКЦИИ ЛИМФАТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ
ГОЛОВНОГО МОЗГА**

АВТОРЕФЕРАТ

Студентки 4 курса 421 группы
Направления 06.03.01 Биология
Биологического факультета
Аргандесовой Виктории Андреевны

Научный руководитель

к. б. н., доцент



Т. Д. Искра

Зав. кафедрой

д.б.н., доцент



О.В. Семячкина-Глушковская

Саратов 2019

ВВЕДЕНИЕ

Лимфатическая система – это биологическая система, которая своей функцией поддерживает постоянство внутренней среды организма путем дренажа и детоксикации.

Лимфатическая система головного мозга является труднодоступной для ее изучения. Самыми важными проблемами при изучении лимфатики являются исследование лимфатических сосудов, так как они прозрачны; слабая изученность использования маркеров для визуализации.

Изучение физиологии лимфатической системы в оболочках мозга чрезвычайно актуально и важно. Открываются новые перспективы в появлении новых знаний об иммунных процессах в тканях мозга, механизмах его очищения от токсинов и метаболитов.

В настоящее время идет активная борьба с тяжелыми заболеваниями мозга, такими как опухоль и исходящее от нее метастазы, для этого разрабатываются методы для их диагностики и лечения. Учитывая тот факт, что лимфатическая система имеет важные функции для организма и то, как мы мало знаем об этой системе, следовательно, исследования в области лимфатики являются важными для организма.

В связи с этим целью нашего исследования стало исследование дренажной функции головного мозга при помощи метода оптической когерентной томографии и золотых наночастиц.

Задачи:

1. Применить метод оптической когерентной томографии для определения пути очищения головного мозга от ЗНЧ.
2. Определить эффективность использования золотых наночастиц для изучения дренажной функции лимфатической системы головного мозга.

1 Основная часть

Открытие лимфатической системы имеет длительную историю. Изучению анатомии и физиологии тканевого лимфодренажа не уделялось особого внимания.

История изучения лимфатической системы и формирование современного взгляда на ее клиническую анатомию и физиологию чрезвычайно захватывающая и занимающая длительный промежуток времени, что обусловлено научно-техническим прогрессом и возможностями ученых и исследователей разных эпох.

В настоящее время никто не оспаривает того факта, что кровеносная система человека имеет замкнутый характер, а лимфатическая система открытая. Лимфатическая система является важной составляющей нашего организма, которая еще до конца не изучена. Существует много различных методов, а так же маркеров для ее изучения.

В последние годы золотые наночастицы стали активно применяться в различных областях наномедицины в диагностических и терапевтических целях. Однако практически одновременно с началом медицинских применений золотых наночастиц возникли вопросы об их возможной токсичности как на уровне целого организма, так и на уровне цито- и генотоксичности. Сегодня установлено, что биологические и токсические свойства наночастиц зависят от нескольких показателей, главными из которых являются размер и форма частиц, поверхностная функционализация, доза и способы введения и другие.

2 Материалы и методы

Работа выполнена на 16 самцах белых беспородных мышей на базе кафедры физиологии человека и животных Саратовского национального исследовательского государственного университета имени Н.Г.Чернышевского. Животных содержали в стандартных лабораторных условиях, с доступом к пище и воде. Все процедуры были выполнены в соответствии с «Руководством по уходу и использованию лабораторных животных». Протокол эксперимента был одобрен комитетом по уходу и использованию лабораторных животных в Саратовском государственном университете (протокол Н-147, 07.02.2018).

Экспериментальные животные содержались в стандартных условиях (12 часовой период освещения, комнатная температура 18 – 22°C) вивария Саратовского национального исследовательского государственного университета имени Н. Г. Чернышевского.

В начале нашего исследования были сформированы 2 группы животных: 1 группа контрольная и 2 группа опытная по 8 животных. В каждой группе были белые беспородные мыши массой 20-25 грамм.

Для решения поставленных нами задач, было проведено две серии экспериментов.

Для наркотизации животных использовался рометар 2% – обладающий мирелаксантным, анестезирующим действием, и золетил 100 – порошок лиофилизированный для инъекций, оказывающий диссоциативное действие с выраженным обезболивающим эффектом.

Золетил разводили физраствором (1 мл физраствора на 10 мг золетила). Рометар использовался в дозе 10 мг на мышь. Животное взвешивали перед анестезией и вводили наркоз в расчете на 100 г веса 100 мкл раствора.

Введение золотых наностержней

1. Наркотизация животных;

2. Фиксация животного на стереотаксической установке;
3. Подготовка поверхности головы к трепанации (удаление шерсти, обеззараживание, рассечение кожи);
4. Выставление координат стереотаксической установки (для введения наночастиц и физраствора в паренхиму мозга: 1 мм вниз от брегмы, 1,5 вправо, 1,5 вглубь);
5. Просверливание отверстия в отмеченном месте с помощью дрели для трепанации;
6. Разведение золотых наночастиц страна фирма (40 нм) в расчете 1:1 в 1,8% хлорид натрия.
7. Введение разведенных наночастицы (7 мкл) опытным животным и физраствора контрольным животным в головной мозг с помощью Гамильтона в течение 5 минут. Золотые наночастицы предоставлены ИБФРМ РАН. Они приготовлены по методу Френса, путем восстановления золотохлористо-водородной кислоты цитратом натрия, средний диаметр составил 50 нм. Концентрация золота в растворе 57 мкг/мл.

Оптическая когерентная томография

Запись на ОКТ проводили в лаборатории на базе кафедры оптики и лазерной физике СГУ. Оптическую когерентную томографию лимфатических сосудов осуществляли коммерческой системой ОКТ (Thorlabs Ganymede), дающей продольное и поперечное разрешение 6,2 мкм и 8 мкм. Основная длина волны ОКТ 930 нм.

Для исследования на томографе нами проводились следующие действия:

1. ОКТ-визуализация менингеальных сосудов в течении 20 мин. (1 серия экспериментов).
2. Извлечение глубокого шейного лимфатического узла со стороны введения наночастиц на поверхность для записи на ОКТ (2 серия

экспериментов). Для поднятия глубокого шейного узла с поверхности шеи животного удалялась шерсть, кожа обеззараживалась. Затем проводился продольный разрез кожи и осуществлялось поднятие слюнных желез. Глубокий шейный лимфатический узел находится под грудинно-ключично-сосцевидной мышцей со стороны гортани. Для того чтобы не повредить лимфоузел его подвязывали лигатурой.

3. ОКТ-визуализация глубоких шейных узлов (2 серия экспериментов). Запись глубокого шейного лимфатического узла происходила в течение 1 часа. Каждые 5 мин для того, чтобы оценить степень накопление золотых наночастиц во времени, осуществляли фиксацию количества ЗНЧ в лимфоузле. В результате мы получили серию изображений, из которой складываются данные о скорости накопления наночастиц.

4. Анализ ОКТ-изображений.

5. Извлечение глубокого шейного узла и их последующая заморозка для исследования с помощью атомно-абсорбционной спектрофотометрии.

Атомно-абсорбционная спектроскопия для определения содержания ионов золота и анализ полученных данных

Атомно-абсорбционная спектроскопия

Атомно-абсорбционная спектроскопия основана на поглощении электромагнитного излучения свободными атомами (Алемасова, 2003).

В присутствии трудноокисляемых соединений пробу взбалтывают, отбирают 100 мл в термостойкий стакан, приливают 3 мл азотной кислоты пл. 1,42 г/см³ и выпаривают на электроплитке почти досуха, следя за тем, чтобы раствор не кипел. После охлаждения вносят еще 3 мл этой же кислоты, накрывают стакан часовым стеклом и снова нагревают, повысив температуру, до полного растворения всех растворимых в этих условиях соединений, на что указывает получение светлоокрашенного осадка. Нагревание прекращают, обмывают стенки стакана и часовое стекло

дистиллированной водой и отфильтровывают кремнекислоту и другие нерастворимые вещества. Объем фильтрата разбавляют количественно до определенного объема. Фильтрат должен быть прозрачным.

3 Результаты исследования

Для изучения дренажной функции лимфатической системы головного мозга мы использовали ОКТ, так как данный метод позволяет прижизненно контролировать различные процессы.

В качестве маркера мы применили золотые наночастицы, так как самое ценное свойство золота – это его химическая стойкость, оно не окисляется на воздухе, устойчиво к влаге и не реагирует с щелочами и кислотами.

Золотые наночастицы являются фотосенсибилизатором, то есть способны к повышенной чувствительности ультрафиолета, тем самым повышается эффективность визуализации в спектре. Важными достоинствами золотых наночастиц являются их многофункциональность, компактный размер и простота процедуры использования. Данный материал может применяться как *in vitro* так и *in vivo*. Размеры наночастиц составляют диапазон от 20 до 500 нм.

Наночастицы как фотоактивные соединения представляют собой фотосенсибилизаторы.

Для решения поставленных нами задач, было проведено две серии экспериментов.

В первой серии мы изучили роль менингеальной лимфатической системы в очищении мозга от ЗНЧ. Для этого ЗНС вводили в паренхиму мозга (рисунок 6) и в течение 20 минут проводили ОКТ-визуализацию.

С целью визуализации лимфатических сосудов нами были использованы ЗНЧ размером 50 нм, так как лимфа является оптически прозрачной в широком спектре волн и лимфатические сосуды возникают на ОКТ изображении в виде полостей. В норме их почти не видно на ОКТ

изображениях, что подтвердили полученные данные для мышей контрольной группы.

ОКТ-визуализация головного мозга мышей из опытной группы показало, что используемый нами маркер в течение 20 минут после введения обнаруживается в менингеальных лимфатических сосудах, следовательно, менингеальная лимфатика является частью процесса очищения мозга. Следовательно, менингеальная лимфатика является связующим звеном между выведением спинномозговой и интерстициональной жидкостей из мозга в периферическую лимфатику.

Вторая серия эксперимента была направлена на изучение дальнейшего пути выведения маркера из менингеальной лимфатической системы.

Для этого было сформировано две группы животных по 8 мышей в каждой группе. Контрольную группу составили интактные животные. Опытным животным вводили ЗНС по приведенной выше схеме. После введения маркера нами проводилась ОКТ-визуализация глубокого шейного узла, так как глубокие шейные лимфатические узлы являются главной станцией выхода спинномозговой жидкости из мозга, что было показано в ходе различных исследований.

ОКТ – запись глубокого шейного узла осуществляли в течении 60 минут, для оценки интенсивности заполнения узла ЗНЧ.

Изображение лимфатического узла контрольного животного (снимки всех мышей в контроле идентичны ($n = 8$)) в В-режиме. Белый прямоугольник указывает на область глубокого шейного узла, которая представлена пустой полостью.

ОКТ-изображения у опытных животных ($n = 8$) показывают, что через 20 минут после инъекции золотых наночастиц в паренхиму мозга, они накапливались в глубоком шейном лимфатическом узле, который собирает лимфу из головного мозга (схожи). Следовательно, мы можем отметить, что в головном мозге происходит очищение и выведение различных токсинов и веществ с помощью дренажной функции.

ОКТ-анализ показывает, что введение золотых наночастиц в паренхиму головного мозга дало сильное увеличение обратного рассеянного сигнала уже через 20 мин после инъекции, что свидетельствует об активном перемещении золотых наночастиц. Этот факт позволяет представить динамику накопления золотых наночастиц в глубоком шейном лимфатическом узле.

На данной схеме представлена линейная зависимость средней интенсивности сигнала. Это число указывает скорость, с которой лимфатическая жидкость течет из точки инъекции в глубокий шейный узел. Повышение интенсивности ОКТ сигнала, обусловлено увеличением количества золотых наночастиц в полости узла. Атомно-абсорбционная спектроскопия показала, что после инъекции концентрация золота в паренхиме головного мозга составляла $1,04 \pm 0,07$ мкг/г ткани, тогда как у контрольных животных ионов золота в тканях мозга не обнаружено. Через 30 мин после инъекции уровень золота в головном мозге уменьшался в 1,7 раза ($0,61 \pm 0,03$ мкг / г, $p < 0,05$) с значительным накоплением золота в глубоком шейном лимфатическом узле ($14,5 \pm 3,7$ мкг/ г, $p < 0,05$). До инъекции в глубоком шейном узле нет.

Выводы

1. С помощью оптической когерентной томографии нами изучен путь очищения лимфатической системы головного мозга от золотых наночастиц и установлено, что при введении золотых наночастиц в паренхиму мозга они переходят в глубокий шейный лимфатический узел по менингеальным лимфатическим сосудам.

2. Мы использовали золотые наночастицы для изучения дренажной функции лимфатической системы головного мозга и определили эффективность использования данного маркера.

A handwritten signature in blue ink, consisting of stylized, overlapping loops and strokes, likely representing the initials of the author.