

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

Кафедра физиологии человека и животных

**ПРИМЕНЕНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ПРОСВЕТЛЕНИЯ ТКАНЕЙ ЧЕРЕПА
ДЛЯ IN VIVO ОПТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ СОСУДОВ МОЗГА**

АВТОРЕФЕРАТ

Студента 2 курса 241 группы
Специальности 06.04.01 Биология
Биологического факультета
Сагатовой Мдины Магазовны

Научный руководитель:
доцент, док.биол.наук



О. В. Семячкина-Глушковска

Зав. кафедрой:
доцент, док.биол.наук



О. В. Семячкина-Глушковская

Саратов 2019

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время мониторинг состояния микроциркуляции сосудов головного мозга является одной из главных проблем современной медицинской диагностики. Это происходит из-за того, что заболевания сердечно-сосудистой системы, хроническая венозная недостаточность, атеросклероз и другие, вызывают как функциональные, так и морфологические изменения микроциркуляторного русла. В основе развития стресс-индуцированных заболеваний (мозговые геморрагии, артериальная гипертония, инсульты и т.д.) лежат повреждения на уровне микро- и макроциркуляции. Поэтому, очень важно выявить такие заболевания на самых ранних этапах развития, тем самым, предотвратив их прогрессирование. На данный момент, изучение микроциркуляции сочетает как традиционные, так и новые морфологические методы диагностики. Но в большинстве случаев, морфологические исследования мониторинга микроциркуляции кровотока проводятся биопсийным путем только в конкретной точке и не отражают динамические параметры.

Методы оптической когерентной томографии (ОКТ) и методы, которые основаны на динамическом рассеивании света (спекл-визуализации, диффузно-волновая спектроскопия, методы лазерной доплеровской флоуметрии др.) являются наиболее эффективными диагностическими методами, определяющие основные параметры микроциркуляции. А для того чтобы увеличить глубину проникновения оптического излучения и снизить рассеивание света, используются оптические просветляющие агенты (ОПА). ОПА снижают светорассеяние за счет временного частичного замещения внутритканевой жидкости оптическим просветляющим агентом. Это приводит к согласованию показателей преломления рассеивателей биоткани и окружающей их среды.

Целью данной работы является развитие метода неинвазивного мониторинга сосудов мозга для *in vivo* оптических исследований с применением просветляющих агентов (ПА).

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

1. исследовать состояние венозных сосудов мозга у новорожденных мышей с применением различных ОПА и лазерной спекл-визуализации.
2. исследовать качество визуализации церебральных сосудов с помощью оптической когерентной томографии до и после применения ОПА.
3. изучить влияние водного 60%-раствора глицерина на гемодинамические параметры мышей (диаметр сагиттального синуса и скорость кровотока в нем) с помощью ДОКТ.

Основная часть

Твердая мозговая оболочка (лат. *dura mater*, греч. *rachymeninx*) – это фиброзная мембрана, покрывающая головной и спинной мозг. Она образует ряд отростков, которые внедряются в отдельные части: малый серповидный отросток, большой серповидный отросток, диафрагму турецкого седла, намет мозжечка (палатка мозжечка).

Кожа – это сложный многокомпонентный орган, содержащий как фиброзные, так и клеточные компоненты и выполняющий функции физиологического барьера. Она содержит сосудистую и потовыделительную системы, которые уникально приспособлены к тепловой регуляции организма.

Твердая мозговая оболочка и кожа относятся к фиброзным тканям. Из-за чего они частично поглощают и частично рассеивают свет. Для того чтобы снизить светорассеивание и без операционного вмешательства увеличить глубину проникновения света, используют оптические просветляющие агенты (ОПА). Снижение рассеяния света происходит за счет временного частичного замещения внутритканевой жидкости оптическим просветляющим агентом, что приводит к согласованию показателей преломления рассеивателей биоткани и окружающей их среды

Доплеровская оптическая когерентная томография (ДОКТ) – метод исследования, который позволяет отображать структуру биологической ткани с высоким уровнем разрешения. Действие ДОКТ основано на принципе низкокогерентной интерферометрии. Метод позволяет оценить величину и глубину светового сигнала, отраженного по оптическим свойствам тканей.

Чэнг и др. разработали методику **лазерной спекл-визуализации (ЛСВ)**, в которой контраст спекл-изображения рассчитывается на основе одного пикселя во временной последовательности. По динамике спеклов можно

оценивать характер движения исследуемого объекта, а также судить о его внутренних свойствах, таких как концентрация рассеивающих частиц. Благодаря этому спеклы используют для измерения скорости кровотока и исследуют патологию микрососудов головного мозга.

Материалы исследования

Исследования проводились в районе родничка белых беспородных новорожденных мышей, возрастом 2–3 дней и на взрослых особях. В эксперименте было задействовано 50 мышей. Эксперимент проводился в соответствии с принципами Хельсинской декларации о гуманном отношении к животным. Протокол эксперимента одобрен Комитетом по уходу и эксплуатации лабораторных животных Саратовского государственного университета (Протокол 7, 07.02.2018).

Методы исследования

В качестве оптических просветляющих агентов (ОПА) были использованы следующие агенты:

- инновационный оптический агент, который называется USOCA. USOCA состоит из раствора S1 (показатель преломления $n=1.399 \pm 0.003$) и раствора S2 (показатель преломления $n=1.367 \pm 0.005$), оба являются бесцветными, как на рисунке. Раствор S1 – это насыщенный раствор супернатанта – 75% - раствор этанола и мочевины. Для приготовления раствора S1, этанол медленно осаждают при 25°C и смешивают с мочевиной. Смесь должна постоять 15 мин для того, чтобы мочевина полностью растворилась, после этого супернатант удаляют. Объемное соотношение этанола и мочевины $\approx 10:3$. Раствор S2 – это раствор додецилбензолсульфоната натрия (ДДБСН) высокой концентрации, приготовленный путем смешивания 0.7 мл раствора NaOH с додецилбензолсульфоновой кислотой (ДДБСК). Объемное соотношение = 24:5, а pH поддерживается на уровне 7.2–8.

- водный 60%- раствор глицерина (показатель преломления $n=1.415$), который обладает хорошей эффективностью просветления, биологической

совместимостью и небольшой вязкостью (10.8 сП при 20°C). В качестве двух других ОПА были выбраны

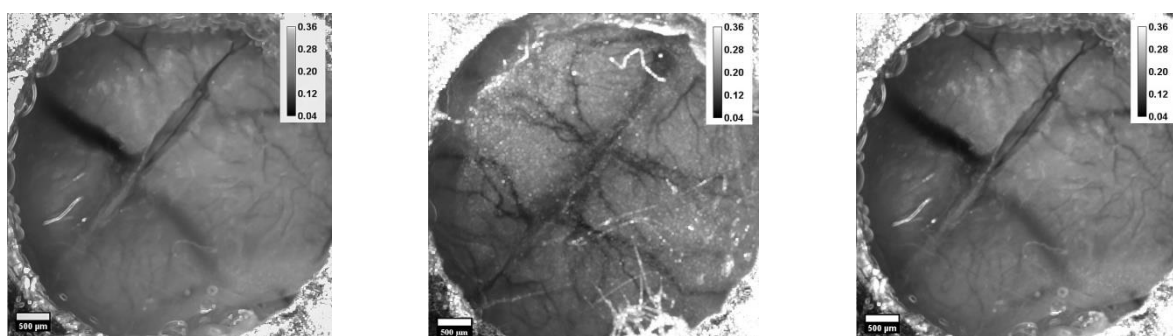
- водный 70%-раствор Омнипака (300 мг йода/мл) (n=1.407), Омнипак является рентгеноконтрастным средством – биосовместимым осмотически активным раствором для инъекций. Вязкость Омнипака (11.8 сП при 20°C) снизили путем добавления воды.

- водный 70%-раствор Омнипака с добавлением ДМСО (диметилсульфоксид 5%) (n=1.414). Для усиления эффективности ОП к раствору Омнипака был добавлен ДМСО, который часто используется в качестве химического усилителя проницаемости ОПА.

Результаты исследования

3.1 Оценка качества визуализации сосудов с помощью инновационного ПА USOCA методом лазерной спекл-визуализации

На рисунке 5 представлены спекл-изображения кортикальных сосудов головного мозга мыши при воздействии на поверхность твердой мозговой оболочки инновационного агента USOCA.



А) до нанесения

Б) через 15 мин воздействия

В) после удаления

Рисунок 5 – Спекл-изображение кортикальных сосудов головного мозга мыши, рассчитанные распределением контраста спеклов (0.04–0.36) (черно-белый) при воздействии оптического агента USOCA: а) до воздействия, б) через 15 мин воздействия, в) после удаления просветляющего агента.

Из полученных результатов видно, что просветляющий агент USOCA обладает высоким просветляющим эффектом. При его нанесении на твердую мозговую оболочку, наблюдается увеличение глубины проникновения оптического излучения. А после его удаления USOCA с поверхности черепа, наступает полное восстановление твердой мозговой оболочки.

3.2 Оценка качества визуализации сосудов с помощью водных р-ров Омнипака и Омнипака с ДМСО методом лазерной спекл-визуализацией

На рисунке 6 изображены диаметры сосудов новорожденных мышей, сагиттального синуса в мозге: 1 – 550 ± 35 мкм, 2 – 680 ± 82 мкм, 3 – 497 ± 80 мкм.

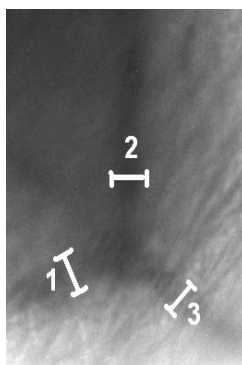


Рисунок 6 – Микроскопическое изображение исследуемых областей новорожденных мышей с диаметром сосуда: 1 – 550 ± 35 мкм, 2 – 680 ± 82 мкм, 3 – 497 ± 80 мкм

Сканирование кожи (рисунок 7), полученное с использованием ОКТ, использовалось для расчета средней толщины кожи новорожденной мыши (в возрасте 2 дней). Толщина скальпа в области родника составляет приблизительно 160 ± 15 мкм.

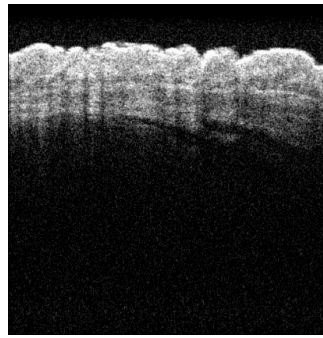


Рисунок 7 – ОКТ изображение кожи головы новорожденной мыши

На рисунках 8 и 9 представлены спекл-изображения сосудов головы мыши при воздействии на поверхность кожи водного 70%-раствора Омнипака и водного 70%-раствора Омнипака с добавлением ДМСО (5%), полученные при регистрации отраженного света от объекта.

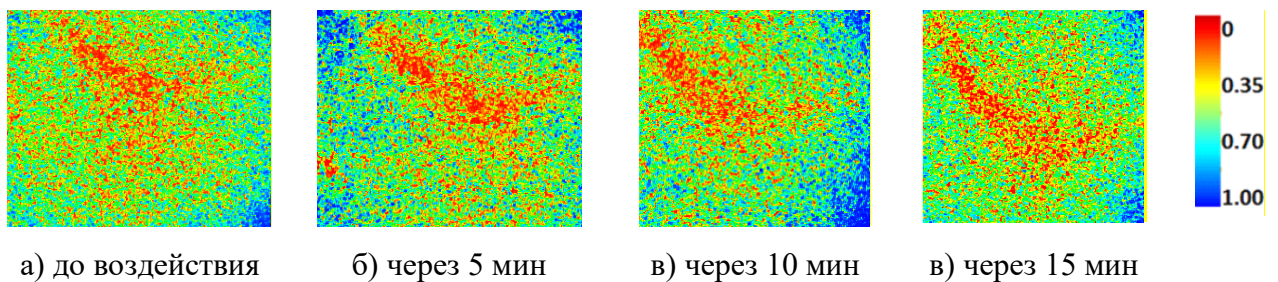


Рисунок 8 – Спекл-изображение сосудов головы исследуемого животного с рассчитанным распределением контраста спеклов (1–0) (цветной) при воздействии водного раствора 70% Омнипака: а) до воздействия, б) через 5, в) 10, г) 15 минут после нанесения агента

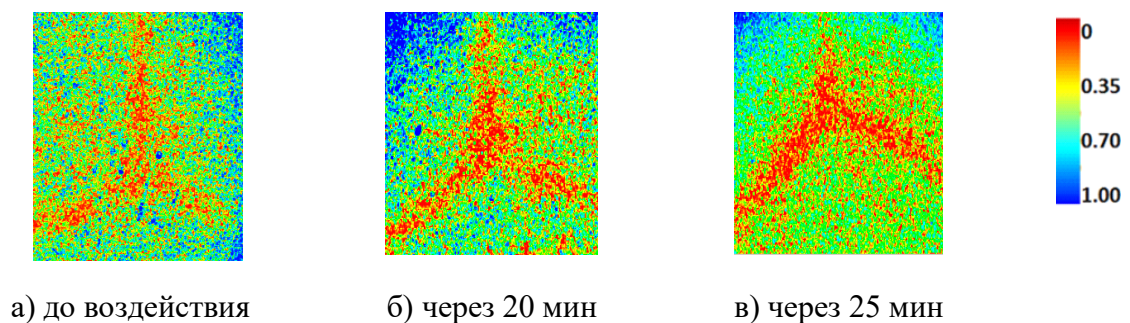


Рисунок 9 – Спекл-изображение сосудов головы исследуемого животного с рассчитанным распределением контраста спеклов (1–0) (цветной) при

воздействии водного 70%- раствора Омнипака с добавлением ДМСО(5%): а) до воздействия, б) через 20, в) 25 минут после нанесения агента

Полученные изображения демонстрируют, что р-р Омнипака с ДМСО дает лучший результат просветления, чем р-р Омнипака без ДМСО. Применение этих оптических просветляющих агентов способствует улучшению визуализации сосудов оптическими методами, в данном случае методом спекл-контрастной визуализации.

3.3 Оценка качества визуализации сосудов водным р-ром глицерина с помощью методов спекл-визуализации и ДОКТ

На рисунке 10 представлены контраст-изображения сосудов головного мозга исследуемой мыши до и при воздействии на кожу водного 60% р-ра глицерина.

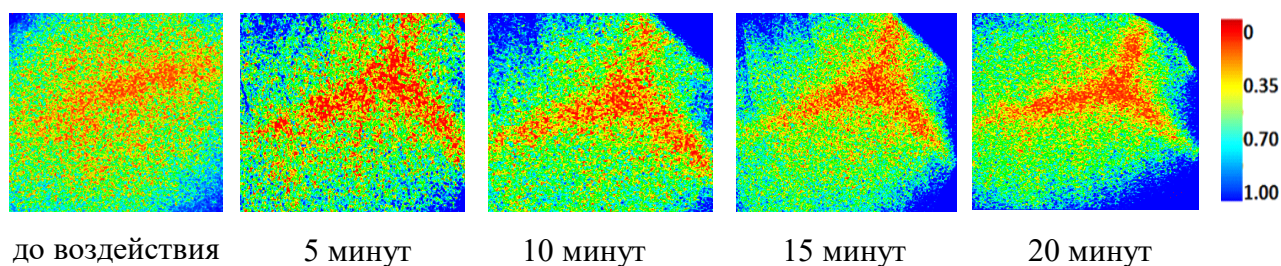


Рисунок 10 – Контраст-изображения сосудов головы при воздействии на поверхность кожи водного 60%-раствора глицерина

На рисунке 11 представлен доплеровский сигнал сосудов головного мозга мыши до и при воздействии на кожу исследуемого оптического просветляющего агента. Сигнал измерялся в течении 20 мин, регистрация изображений производилась каждые 5 минут. Оптимальное время воздействия на кожу водным 60%-раствором глицерина, составляет 15–20 мин. Так как после этого времени наступает набухание ткани и качество визуализации значительно ухудшается.

Из рисунков 10 и 11 видно, что 60%-раствор глицерина увеличивает качество визуализации уже через 5 минут воздействия его на кожу головы. А также увеличивается глубина проникновения оптического излучения.

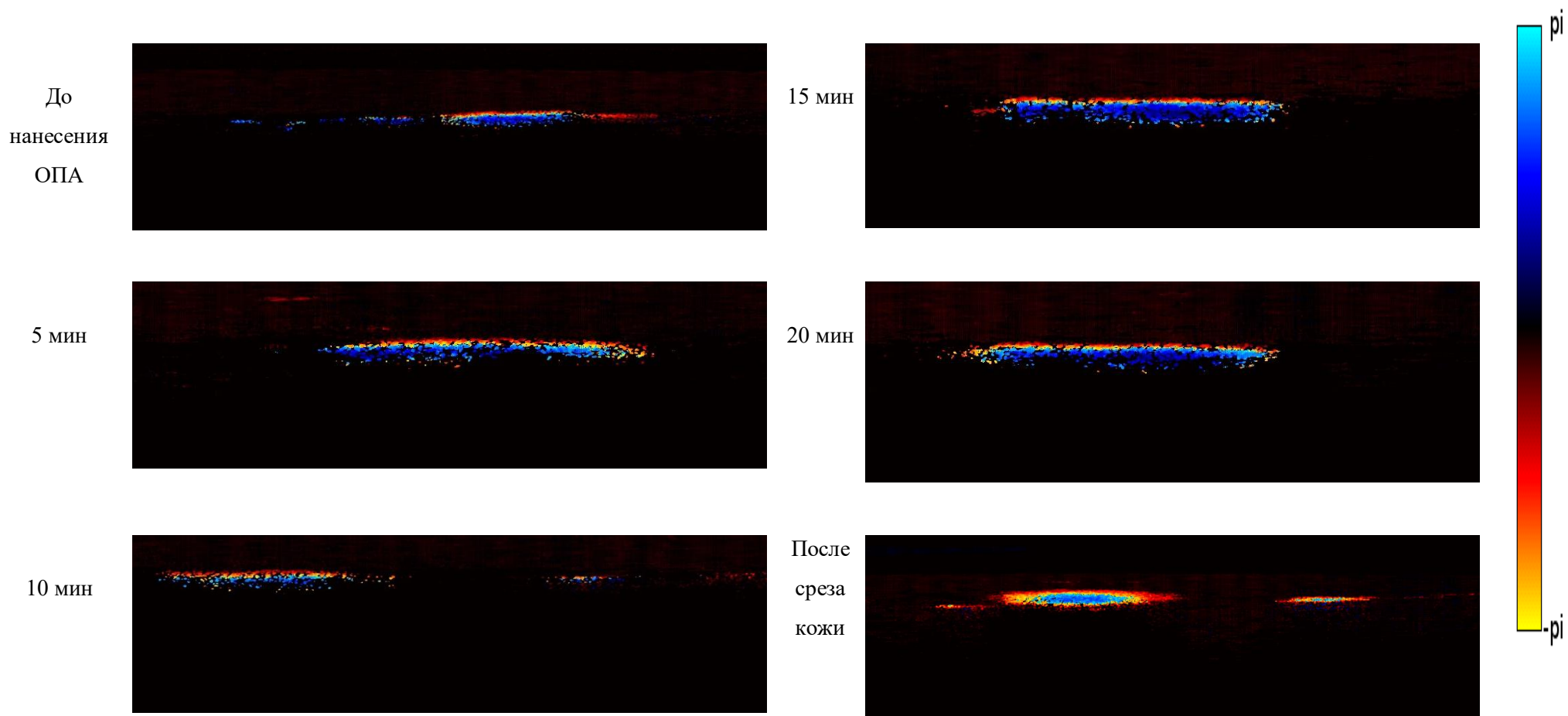


Рисунок 11 – Доплеровский сигнал сагиттального синуса новорожденный мыши.

3.4 Результаты воздействия водного р-ра глицерина, Омнипака и Омнипака с ДМСО на показатели церебральной гемодинамики с помощью метода ДОКТ

В таблицах 1 и 2 представлены индивидуальные значения скорости кровотока и диаметры сосудов в контрольной и экспериментальной группах, полученные с помощью ДОКТ. В контрольной группе диаметр сосудов с кожей составляет 0.18 ± 0.06 мм, а скорость кровотока 5.83 ± 2.61 мм/с, без кожи диаметр составил 0.32 ± 0.03 мм и скорость 6.03 ± 2.99 мм/с, соответственно. В экспериментальной группе до нанесения ОПА диаметр сосудов составил 0.25 ± 0.07 мм и сохранялся на таком уровне в течении всего эксперимента, после удаления кожи данный показатель равен 0.32 ± 0.05 мм. Скорость кровотока без нанесения водного 60% р-ра глицерина была 5.96 ± 2.38 мм/с, после нанесения она составила 6.03 ± 2.43 мм/с, без кожи результат был следующим: 6.74 ± 3.03 мм/с. Достоверных различий не наблюдалось.

Таблица 1 – Значения скорости кровотока и диаметры сосудов в контрольной группе, измеренные на ДОКТ

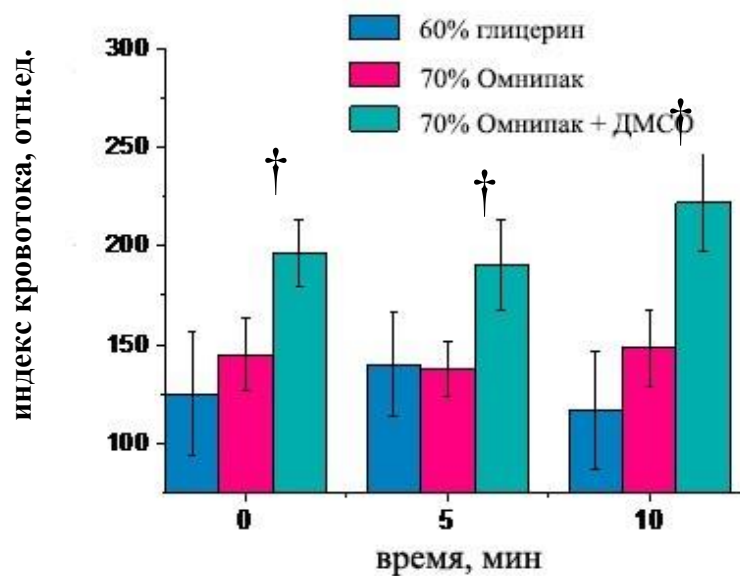
№	С кожей		Без кожи	
	Диаметр, мм	Скорость, мм/с	Диаметр, мм	Скорость, мм/с
1	0.25	1.78	0.32	5.81
2	0.25	2.25	0.29	10.70
3	0.19	6.66	0.35	3.07
4	0.22	8.74	0.37	3.59
5	0.11	5.70	0.29	5.83
6	0.10	6.56	0.31	2.61
7	0.23	6.22	0.36	5.74
8	0.12	8.74	0.30	11.07
Средние значения и среднеквадратические отклонения				
<V>	0.18	5.83	0.32	6.03
Sd	0.06	2.61	0.03	2.99

Таблица 2 – Значения скорости кровотока и диаметры сосудов до и при воздействии на кожу ОПА

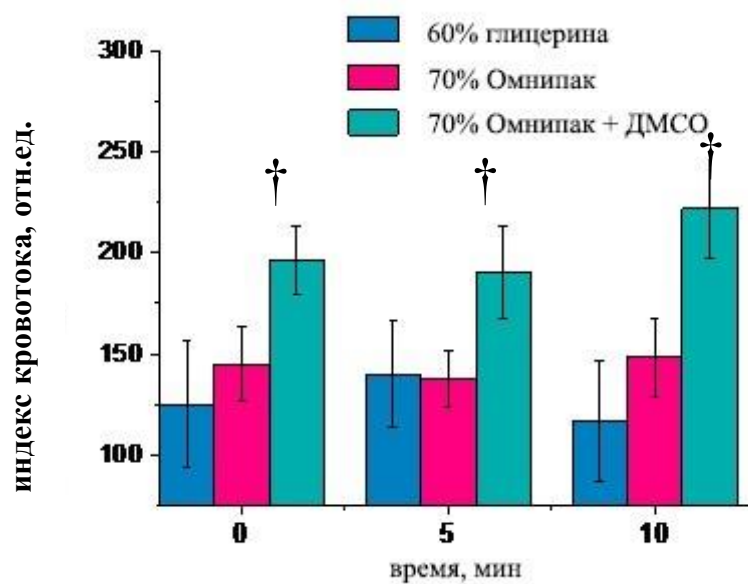
№	5 мин		10 мин		15 мин		20 мин	
	Диаметр	Скорость	Диаметр	Скорость	Диаметр	Скорость	Диаметр	Скорость
Ед.	Мм	мм/с	мм	мм/с	мм	мм/с	Мм	мм/с
1	0.32	8.91	0.40	6.08	0.30	4.17	0.43	4.51
2	0.18	5.81	0.19	6.39	0.27	5.40	0.22	4.10
3	0.28	8.61	0.27	6.76	0.29	8.30	0.29	7.79
4	0.25	2.39	0.23	3.76	0.27	2.97	0.21	2.73
5	0.23	4.78	0.19	2.42	0.28	3.76	0.28	4.10
6	0.33	4.61	0.31	2.70	0.23	3.55	0.23	4.20
7	0.35	5.70	0.30	8.8 1	0.35	3.48	0.30	4.85
8	0.29	5.36	0.23	7.21	0.28	8.74	0.32	8.74
9	0.22	8.74	0.20	4.78	0.25	6.11	0.25	8.74
10	0.15	5.53	0.18	6.35	0.23	7.44	0.21	8.74
Средние значения и среднеквадратические отклонения								
<V>	0.26	6.04	0.25	5.53	0.28	5.39	0.28	6.03
sd	0.06	2.11	0.07	2.06	0.04	2.15	0.07	2.43

Исходя из полученных данных, можно сделать вывод о том, что водный р-р глицерина не влияет на гемодинамические параметры у мышей.

На рисунке 12 представлена диаграмма изменений индекса кровотока, измеренная с кожей (А) и без кожи (В) в зависимости от времени.



А)



Б)

Рисунок 12 – Изменение индекса кровотока в зависимости от времени: А) с кожей, Б) без кожи: † - относительно группы с глицерином

Рисунок 11 не показывают статистически значимое изменение индекса кровотока при действии ОПА, таким образом, можно предположить, что ОПА не влияют на кровоток.

ВЫВОДЫ

- Просветляющий агент USOCA увеличивает качество визуализации твердой мозговой оболочки.
- Эффект просветления лучше выражен у водного 60%-раствора глицерина.
- Качество визуализации ОПА Омнипака выше с добавлением ДМСО, по сравнению с раствором без ДМСО.
- Максимальный эффект просветления кожи головы с помощью ОПА достигается через 5–10 мин.
- Водный 60%-раствор глицерина не оказывает воздействия на церебральную гемодинамику мышей.

