

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

Кафедра физиологии человека и животных

**ВЛИЯНИЕ ГРОМКОГО ЗВУКА НА МОЛЕКУЛЯРНЫЕ СТРУКТУРЫ  
ГЕМАТОЭНЦЕФАЛИЧЕСКОГО БАРЬЕРА**

**АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ**

студентки 4 курса 424 группы  
направления 06.03.01 Биология  
Биологического факультета  
Амировой Асимы Амангельдыевны

Научный руководитель

доцент, канд. биол. наук \_\_\_\_\_ Т. Д. Искра

(подпись, дата)

Зав. кафедрой

человека и животных,

доцент, док. биол. наук \_\_\_\_\_ О. В. Семячкина – Глушковская

(подпись, дата)

Саратов 2023

**Введение.** Для всех живых организмов, в том числе и человека, звуки и шумы являются одним из внешних явлений воздействия окружающей среды. Легкий приятный шум дождя, приятное пение птиц, шум морского прибоя, всегда приятны человеку. Они успокаивают, снимают стресс, заряжают положительной энергией. В природе громкие звуки редки, шум относительно слаб и непродолжителен. Сочетание и длительность звуковых раздражителей дает время животным и человеку, которое необходимо для оценки их характера и формирования по отношению к ним определенной соответствующей ответной реакции. Звуки и шумы большой и продолжительной мощности поражают слуховой аппарат, нервные центры, могут вызвать болевые ощущения, шок и даже смерть. Так действует шумовое загрязнение. Длительный шум неблагоприятно влияет на орган слуха, понижая чувствительность к звуку. Он приводит к расстройству деятельности сердца, печени, других органов, к истощению и перенапряжению нервных клеток человеческого организма. Ослабленные нервные клетки не могут достаточно четко и равномерно координировать работу определенных или даже всех систем организма.

В биологическом аспекте звуковая нагрузка может вызвать разные процессы в органах и тканях человека, как положительные, так и отрицательные: изменения пульса, дыхания, обмена веществ, гипертонические кризы, сердечно-сосудистые заболевания.

Известно, что почти во всех системах и органах возникают изменения в ответ на акустический раздражитель. Степень выраженности воздействия зависит от уровня звука, распределения его по частотам, времени действия и индивидуальных особенностей организма. Воздействие звуков влияет на сон и восприимчивость к обучению.

Применение звуков необходимого диапазона и частоты может иметь положительный эффект на открытие гематоэнцефалического барьера и повышение эффективности терапии.

Цель работы – изучить влияние звука на проницаемость гематоэнцефалического барьера, как следствие терапии.

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

1. Изучить проницаемость гематоэнцефалического барьера к высокомолекулярным соединениям под воздействием повторяющегося слышимого звука у мышей в *ex vivo* и *in vivo* экспериментах с применением флуоресцентной микроскопии, спектрофлуориметрического определения экстравазации ЕВАС.

2. Изучить молекулярные и системные механизмы звуко-зависимого повышения проницаемости гематоэнцефалического барьера к низкомолекулярным соединениям на основе исследования магнитно-резонансной томографии тканей, установлением проницаемости открытого звуком гематоэнцефалического барьера для низкомолекулярных соединений на примере гадолиния.

3. Изучить время восстановления гематоэнцефалического барьера и повреждающие эффекты звука на основе морфологического анализа тканей мозга, на основе исследования изменений церебрального кровотока в до и после воздействия звуком, под воздействием лазерной спекл-визуализации, а также роли органа слуха в звуко-зависимом изменении барьерной функции мозга.

Эксперименты выполняли на 78 половозрелых самках крыс 7-ми месячного возраста (весом 250-280 г). Животных содержали в стандартных лабораторных условиях, с доступом к пище и воде. Все процедуры были выполнены в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных». Протокол эксперимента был одобрен комитетом по уходу и использованию лабораторных животных в Саратовском государственном университете (протокол Н-147, 07.02.2018).

Исследования проводились на следующих группах животных:

1 группа, состоящая из интактных мышей (без анестезии и без воздействия звука);

2 группа включающая мышей под наркозом в течение 2 часов без воздействия звука;

3 группа, включающая анестезированных мышей, и получающих звуковое воздействие в течение 2 часов;

4 группа, в которую вошли бодрствующие мыши, подверженные звуковому воздействию в течение 2 часов без анестезии.

Все процедуры были выполнены в соответствии с Международными руководящими принципами биомедицинских исследований с участием животных.

Для изучения проницаемости гематоэнцефалического барьера к высокомолекулярным соединениям под воздействием повторяющегося слышимого звука у мышей проводили спектрофлуориметрический анализ экстравазации ЕВАС, флуоресцентную микроскопию в реальном режиме времени.

Для исследования проницаемости гематоэнцефалического барьера к низкомолекулярным соединениям выполняли магнитно-резонансную томографию тканей, на примере гадолиния. Качественный и количественный анализ был выполнен при помощи конфокальной визуализации.

Морфологические исследования мозговых изменений у мышей после звуко-зависимого открытия гематоэнцефалического барьера были направлены на изучение тех последствий, которые громкий звук может оказывать на мозг. Особое внимание уделили исследованию церебрального кровотока в до и после воздействия звуком, под воздействием лазерной спекл-визуализации. Результаты исследований выявили отсутствие влияния звука на состояние ГЭБ у мышей. Таким образом, результаты позволили установить важную роль органа слуха в повышении проницаемости ГЭБ к высокомолекулярным соединениям под влиянием звука.

Бакалаврская работа включает содержание, список сокращений, введение, 3 главы (обзор литературы, материалы и методы, результаты исследований), выводы и список использованных источников, включающий

56 источников на русском и английском языках. Работа изложена на 41 странице машинописного текста. Работа проиллюстрирована 11 рисунками.

**Основное содержание работы.** В ходе первой серии экспериментов исследований было продемонстрировано, что воздействие частотой 100 дБ и продолжительностью 1 час эффективно повышает проницаемость ГЭБ для ЕВАС, как высокомолекулярного соединения. Результаты спектрофлуориметрического анализа показали, что через 1 час после воздействия звука (100 дБ) концентрация ЕВАС в тканях мозга у всех мышей (100%) была увеличена в 18,6 раз (звук),  $p < 0,001$  по сравнению с контрольной группой. Аналогичные результаты были выявлены у мышей, подвергшихся воздействию звука (90 дБ): уровень ЕВАС был увеличен в 14,6 раз,  $p < 0,001$  по сравнению с контрольной группой у 60% мышей. При воздействии звука (70 дБ) не наблюдалось изменений в проницаемости гематоэнцефалического барьера.

Дополнительно было проведено исследование проницаемости гематоэнцефалического барьера к высокомолекулярным соединениям с помощью флуоресцентной микроскопии для подтверждения эффективного открытия ГЭБ в реальном режиме времени.

Для выявления результативного времени экстравазации ЕВАС из церебральных сосудов в ткани мозга использовали *in vivo* флуоресцентную микроскопию у 10 мышей для звука.

Для *ex vivo* исследований экстравазации красителя ЕВd его вводили внутривенно в объеме 200 мкл на 25 г веса мыши и давали циркулировать 30 мин, поскольку это время было зафиксировано как оптимальное для максимальной экстравазации ЕВАС. После этого проводили перфузию мозга путем введения физиологического раствора в левый желудочек сердца и далее животных декапитировали.

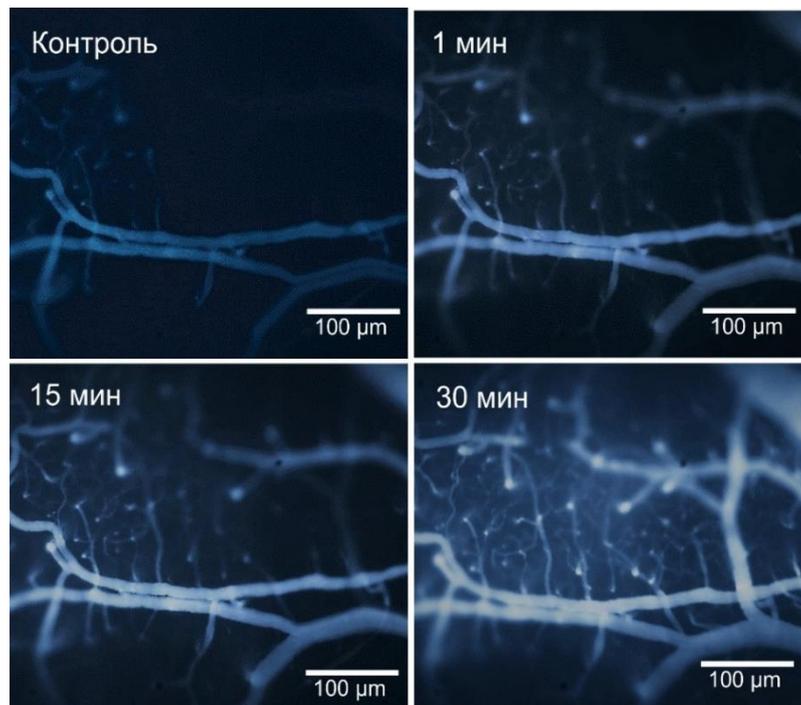


Рисунок 1 – Флуоресцентная микроскопия в реальном режиме времени экстравазации ЕВАС (показана в виде яркого свечения вокруг церебральных микрососудов) из церебральных сосудов в ткани мозга

Было установлено, что повторяющийся громкий звук повышает проницаемость ГЭБ к высокомолекулярным соединениям, таким как ЕВАС (68,5 кДа), которая наблюдается через 1 час после звукового воздействия с быстрым восстановлением барьерной функции мозга. Экстравазация ЕВАС увеличивалась во времени, начиная проявляться с 1 мин введения красителя с максимальным выходом ЕВАС в ткани мозга через 30 мин после его попадания в кровь.

Было изучено установление проницаемости открытого звуком ГЭБ для низкомолекулярных соединений на примере гадолиния.

Для решения данной задачи мы проводили МРТ сканирование с гадолинием на 7 мышах до воздействия звуком (под 2% изуфлурановой анестезией  $N_2O/O_2 - 70:30$ ). Исследование проводили в следующих группах: I - без звука (контрольная группа); II, III и IV - экспериментальные группы, включающие мышей через 1, 4 и 24 часа после воздействия звука. На рисунке

2 показаны время-зависимые изменения проницаемости ГЭБ у мышей, подвергнутых воздействию звука.

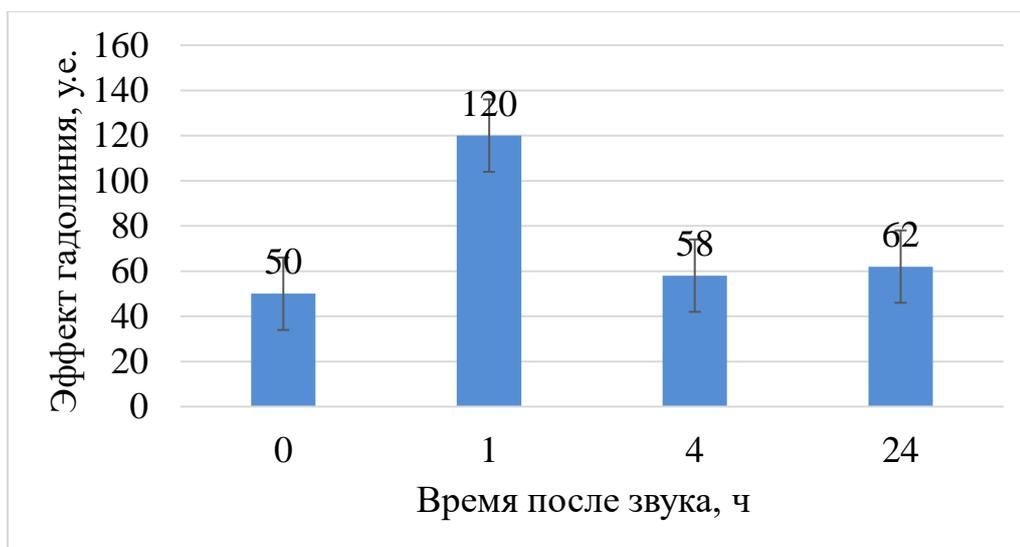


Рисунок 2 - Магнитно-резонансный анализ проницаемости ГЭБ для гадолиния под воздействием звука

Результаты МРТ анализа показали, что через 1 час после воздействия звуком, значение гадолиния увеличивалось в 2,8 раза относительно контроля ( $119,3 \pm 5,6$  усл. ед против  $42 \pm 3,8$  усл. ед.,  $p < 0,05$ ). Через 4 и 24 часа после воздействия звуком, существенные изменения значений гадолиния не наблюдались по сравнению с контрольной группой (без звука) (рисунок 7), что говорит о эффективном повышении проницаемости ГЭБ, как низкомолекулярного соединения.

Для подтверждения установления проницаемости открытого звуком ГЭБ для низкомолекулярных соединений использовали количественный и качественный МРТ анализ экстравазации гадолиния из сосудов мозга в его ткани.

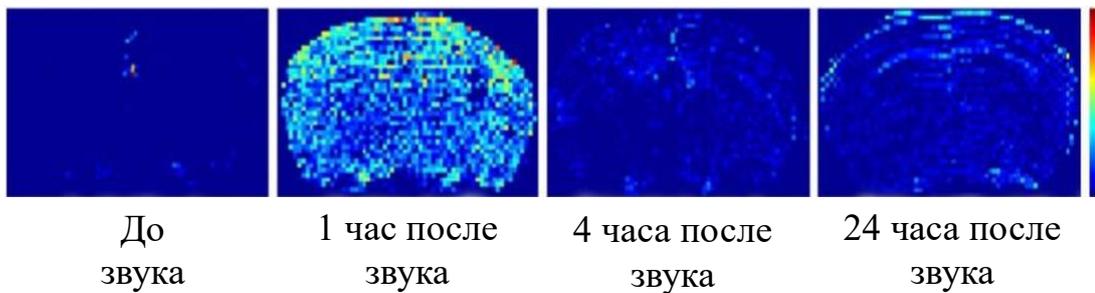


Рисунок 3 - Количественный и качественный МРТ анализ экстравазации гадолиния из сосудов мозга в его ткани

Визуальная демонстрация также подтверждает, что максимальная проницаемость гематоэнцефалического барьера к гадолинию наблюдается через 1 час после воздействия звука (яркое свечение означает экстравазацию гадолиния).

Таким образом, повторяющийся звук индуцирует временное открытие ГЭБ для гадолиния, которое наблюдается через 1 час после воздействия звуком с последующим быстрым восстановлением барьерной функции мозга.

Следующее исследование было направлено на изучение тех последствий, которые громкий звук может оказывать на мозг. Особое внимание уделили исследованию церебрального кровотока в до и после воздействия звуком, под воздействием лазерной спекл-визуализации.

Результаты показали, что через 1 час после звукового воздействия, когда ГЭБ открывался, отмечалась тенденция к снижению кровотока мозга, который, однако, оставался высоким по сравнению с нормой ( $1,69 \pm 0,03$  усл. ед. против  $1,03 \pm 0,06$  усл. ед.,  $p < 0,001$  для сагиттального синуса и  $0,80 \pm 0,02$  усл. ед. против  $0,52 \pm 0,01$  усл. ед,  $p < 0,001$ ) для микрососудов. После звуковых эффектов (через 2 часа воздействия звуком) церебральный кровоток был высоким как на уровне венозного, так и микроциркуляторного уровня ( $1,69 \pm 0,04$  усл. ед. против  $1,03 \pm 0,06$  усл. ед.,  $p < 0,001$  для сагиттального синуса и  $0,91 \pm 0,07$  усл. ед. против  $0,52 \pm 0,01$  усл. ед,  $p < 0,001$ ). Через 4 часа в момент нормализации ГЭБ отмечалась восстановление кровотока мозга ( $1,08 \pm 0,07$

усл. ед. против  $1,03 \pm 0,06$  усл. ед.,  $p < 0,01$  для сагиттального синуса и  $0,56 \pm 0,09$  усл. ед. против  $0,52 \pm 0,01$  усл. ед,  $p < 0,001$ ) для микрососудов.

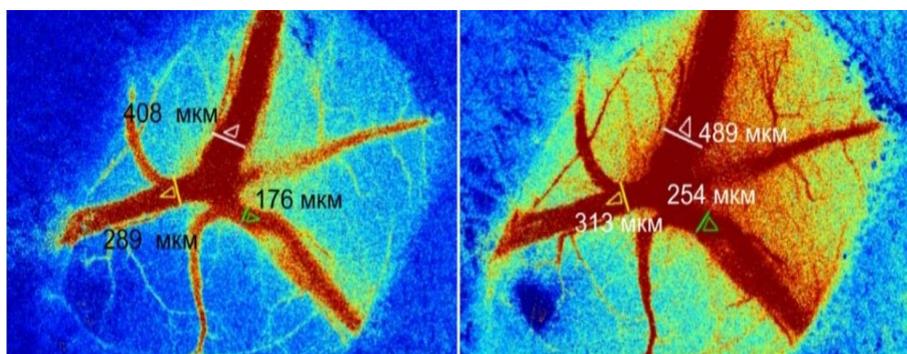
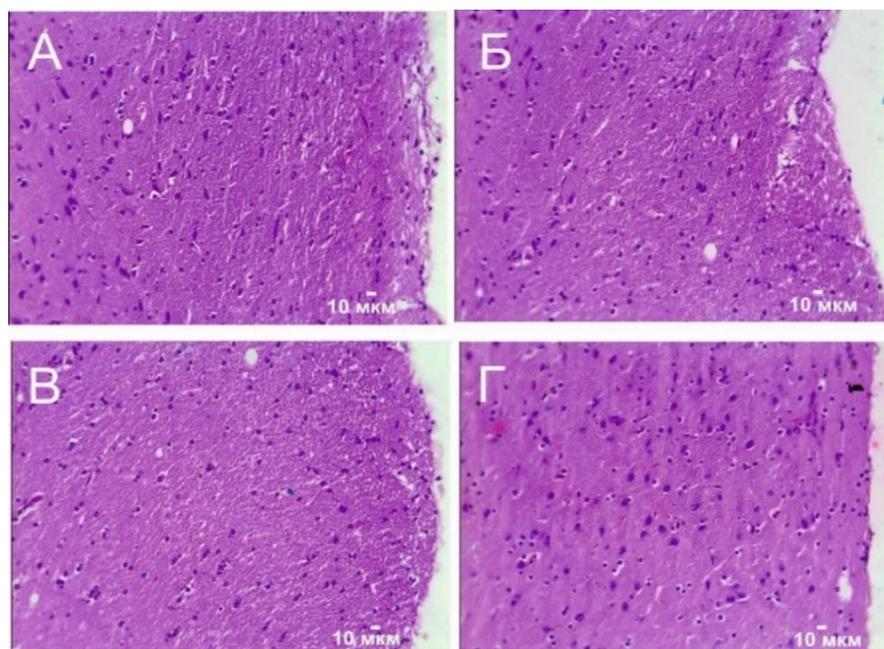


Рисунок 4 -Лазерная спекл-визуализация мозгового кровотока у мышей под воздействием звука на венозном и микроциркуляторном уровнях: \*\*\* -  $p < 0,001$  по сравнению с исходным уровнем мозгового кровотока (перед воздействием звуком)

Таким образом, звук вызывает обратимое повышение церебрального кровотока на микро- и макроциркуляторном уровнях за счет релаксирующих эффектов на сосуды мозга. Наши результаты согласуются с данными, полученными как на людях, так на морских свинках, где наблюдалась повышение кровотока мозга за счет дилатации церебральных сосудов.

На заключительном этапе исследования проводили гистологический анализ. Ткани мозга изучали в контроле (без звука), а также в экспериментальных группах (1, 4 и 24 часа после звукового открытия ГЭБ). Гистологический анализ не выявил каких-либо изменений в морфологических структурах тканей мозга во всех указанных группах.



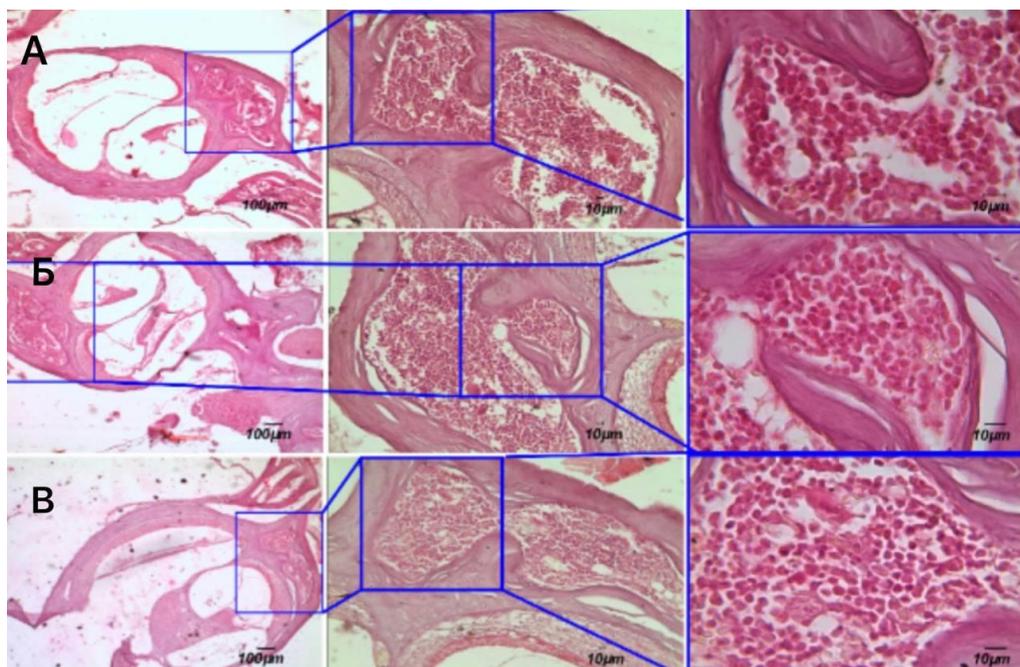
А - контроль, без звука; Б - 1 час после воздействия звука; В - 4 часа после воздействия звука; Г - через 24 часа после воздействия звука. Окрашивание гематоксилин – эозином, 246,4х

Рисунок 5 - Гистологический анализ тканей головного мозга до и после воздействия звука

В момент открытия ГЭБ звуком (через 1 час после воздействия) и в процессе восстановления барьерной функции мозга (4 и 24 часа после открытия ГЭБ) не наблюдается изменений со стороны морфологических показателей тканей мозга и развитием апоптозных клеток в его структурах.

Таким образом, эти данные позволяют заключить о том, что звук открывает ГЭБ, не повреждая ткани мозга.

Было проведено исследование морфологических изменений слухового нерва у мышей через 3 и 14 дней после звуко-зависимого открытия ГЭБ. Отметим, что снижение числа ганглиев слуховом нерва и синапсов является признаком повреждения слуха, которые проявляются, как правило, во времени. В силу чего были выбраны 3 и 14 дней после звуко-зависимого открытия ГЭБ в качестве двух экспериментальных групп



А - до воздействия звука; Б - через 3 дня после воздействия звука; В - 14 дней после воздействия звука

Рисунок 6 - Морфологические показатели внутреннего уха у мышей до и через 3 и 14 дней после открытия гематоэнцефалического барьера:

После звуко-зависимого открытия ГЭБ звуком (до воздействия звуком) и в процессе (3 и 14 дней после открытия ГЭБ), не сопровождаются изменениями в ганглиях слухового нерва.

Результаты выявили отсутствие влияния звука на состояние ГЭБ у мышей. Таким образом, результаты позволили установить важную роль органа слуха в повышении проницаемости ГЭБ к высокомолекулярным соединениям под влиянием звука.

### **Выводы:**

1. Изучение проницаемости гематоэнцефалического барьера к высокомолекулярным соединениям под воздействием повторяющегося слышимого звука у мышей в *ex vivo* и *in vivo* экспериментах с применением флуоресцентной микроскопии, спектрофлуориметрического определения экстравазации ЕВАС, показало, что воздействие частотой 100 дБ и

продолжительностью 1 час эффективно повышает проницаемость гематоэнцефалического барьера.

2. Исследование проницаемости гематоэнцефалического барьера к низкомолекулярным соединениям на основе исследования магнитно-резонансной томографии тканей, установлением проницаемости открытого звуком гематоэнцефалического барьера на примере гадолиния демонстрирует, что повторяющийся звук индуцирует временное открытие ГЭБ для гадолиния, которое наблюдается через 1 час после воздействия звуком с последующим быстрым восстановлением барьерной функции мозга.

3. Морфологические исследования мозговых изменений у мышей после звуко-зависимого открытия гематоэнцефалического барьера были направлены на изучение тех последствий, которые громкий звук может оказывать на мозг. Особое внимание уделили исследованию церебрального кровотока в до и после воздействия звуком, под воздействием лазерной спекл-визуализации. Результаты исследований выявили отсутствие влияния звука на состояние ГЭБ у мышей. Таким образом, результаты позволили установить важную роль органа слуха в повышении проницаемости ГЭБ к высокомолекулярным соединениям под влиянием звука.