

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

Кафедра физиологии человека и животных

РАЗРАБОТКА ПРОТОКОЛА МОНИТОРИНГА ПРОНИЦАЕМОСТИ
ГЕМАТОЭНЦЕФАЛИЧЕСКОГО БАРЬЕРА В РЕАЛЬНОМ РЕЖИМЕ
ВРЕМЕНИ С ПРИМЕНЕНИЕМ МУЛЬТИФОТОННОЙ
МИКРОСКОПИИ

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

студентки 4 курса 421 группы
направления 06.03.01 Биология
Биологического факультета
Манжаевой Марии Баходыровны

Научный руководитель:

доцент кафедры физиологии человека и животных,

к.б.н.

 Е. И. Саранцева

Зав. кафедрой физиологии человека и животных,

д.б.н., доцент

 О. В. Семячкина-Глушковская

Саратов 2023

Введение. На современном этапе развития биологии и медицины центральная нервная система занимает важное место при проведении лечения различных патологий. В связи с этим ведется разработка протоколов, позволяющих осуществлять диагностику и функционирование состояния ЦНС.

Исследования мозга широко признаны для продвижения нейробиологии. Возможность тщательного изучения индукции, прогрессирования и разрешения физиологического процесса предоставляет особый интерес в экспериментах по визуализации в бодрствующем состоянии. В частности, мультифотонная микроскопия предоставила важные данные о морфологии функционирования работы мозга. Было произведено большинство экспериментов ТПМ и вживления системы ЭЭГ на мышах. Тонкий череп обеспечивает легкое проникновение с минимальными травмами, но не позволяет производить успешную запись ЭЭГ.

Интерес к животным моделям растет из-за недавнего развития трансгенных крысиных линий, а также широкого спектра поведения. Хроническая трепанация черепа у крыс является сложной задачей и редко удовлетворяет требованиям визуализации. Проблемы с хирургической процедурой приводит к повреждениям, воспалениям, что ведет к помутнению окна и искажениям изображения на мультифотонном микроскопе. В 2013 году Б. Б. Скотт и др. смогли успешно провести имплантацию хронического окна, провели удаление твердой мозговой оболочки, что обеспечило успешную визуализацию ГМ животного.

В научном сообществе данная тема становится наиболее важной и обсуждаемой. Появляется все больше заболеваний, связанных с головным мозгом. Так, заболевания центральной нервной системы составляют 30% от всех заболеваний.

Российская и зарубежная наука стремится изучить проницаемость ГЭБ для различных молекул, патологических и лекарственных, в рамках изучения заболеваний и созданий способов таргетной доставки лекарств в мозг.

Началось развитие различных способов для доставки лекарственных препаратов в ткань мозга через барьер.

Целью данной работы является разработка протокола вживления системы регистрации электроэнцефалографии с, последующим, выпиливанием трепанационного окна для дальнейшей визуализации сосудов головного мозга под конфокальным микроскопом и мониторингом открытия гематоэнцефалического барьера в реальном режиме времени.

Для реализации поставленной цели были поставлены следующие задачи:

1. Вживление винтов на os temporale черепа лабораторного животного;
2. Установка системы регистрации электроэнцефалографии на os nasale;
3. Установка титановой пластины на теменную область черепа для фиксации бодрствующего животного под микроскопом.

Фиксация головы является распространенной техникой при подготовке испытуемых к экспериментам по неврологии для контроля стимулов, мониторинга поведения, а также для нейронной записи и экспериментов по возмущению, поскольку она сводит к минимуму движение между головой субъекта и записывающим или стимулирующим оборудованием. В экспериментах, которые включают повторное использование одного и того же субъекта, таких как исследования развития или хронические заболевания, используются механические удерживающие системы для облегчения выравнивания и стабильности между головой и экспериментальным аппаратом.

Для дальнейшего составления протокола было изучено несколько статей, благодаря которым были оценены плюсы и минусы работ и, в дальнейшем.

В статье «A miniature kinematic coupling device for mouse head fixation», 2022 года был представлен достаточно легкий головной убор, чтобы его могла носить мышь, но достаточно устойчивый для многофотонной визуализации во время измерения поведения, с точностью изменения положения в микронном масштабе.

В статье «The Head-fixed Behaving Rat - Procedures and Pitfalls» показан метод фиксации животного под микроскопом в бодрствующем состоянии. Предоперационная обработка должна начинаться за 2 недели до операции. Важно убедиться, что животное чувствует себя комфортно с экспериментатором и не связывает опыт операции с этим человеком. Наиболее важным является знакомство крысы с голосом и запахом экспериментатора. В данной статье показано, что животное могло принять удобную естественную позу. Подробно описанный здесь фиксатор, принципиальная геометрическая схема которого была разработана, позволяет крысам принимать естественную позу. Они способны приседать внутри ящика, сидя на задних лапах, при этом ростральная часть тела слегка приподнята, так что передние лапы свободно опираются на верхний край нижней передней пластины. Кроме того, он обеспечивает плотное ограждение, которое удовлетворяет потребность животного в безопасной и защищенной среде.

В статье «A three-photon head-mounted microscope for imaging all layers of visual cortex in freely moving mice», автором которой D. J. Wallace, был описан способ установки микроскопа на голову животного.

Животное переносили к миниатюрному микроскопу, который был установлен на навигационной платформе для определения подходящего положения для визуализации в черепном окне. Этап навигации состоял из микроманипулятора, к которому микроскоп крепился с помощью изготовленного на заказ крепления. Крепление включало в себя два угловых кинетических крепления, позволяющих регулировать наклон относительно покровного стекла и кортикальной поверхности. Как только целевая популяция нейронов была обнаружена, промежуточная пластина (уже установленная на миниатюрном микроскопе) была прикреплена к головной пластине с помощью стоматологического акрила, микроскоп убрали, и животному ввели анестезирующие препараты.

Для мониторинга проницаемости гематоэнцефалического барьера используют мультифотонную микроскопию. Данный вид микроскопии считается методом выбора для визуализации живых, неповрежденных

биологических тканей в масштабах длины от молекулярного уровня до всего организма. Кроме того, многофотонная микроскопия уникально подходит для проведения экспериментальных измерений с минимальной инвазией в течение длительных периодов времени, обеспечивая тем самым точную детализацию динамических биологических процессов, имеющих временные масштабы от микросекунд до дней или недель. В результате становится доступным огромное количество данных для дальнейшего углубления нашего понимания сложных биологических взаимодействий.

МФМ имеет ряд преимуществ:

1. Вследствие значительно меньшего поглощения тканями и клетками излучения в ИК-области по сравнению с УФ, уменьшается повреждение живых клеток фотоиндуцированными процессами.

2. По той же причине достигается большая глубина проникновения излучения в биологические объекты.

3. Отсутствие возбуждения и выцветания флуорохромов внешними условиями.

Однако, есть недостатки: МФМ не позволяет получать изображения очень высокого качества; также мультифотонный микроскоп сложен в настройке и достаточно дорогостоящей.

Основное содержание работы. Данная работа выполнена на базе лаборатории «Умного сна» кафедры физиологии человека и животных медицинского центра Саратовского Государственного Университета имени Н. Г. Чернышевского.

Объекты исследования

Эксперименты проводились на крысах линии Wistar (250-280 г). Исследования проводилось на 30 животных. Все процедуры выполняли в соответствии с «Руководством по уходу и использованию лабораторных животных». Протоколы экспериментов были одобрены Локальной комиссией по биоэтике Саратовского государственного университета и Институциональным комитетом по уходу и использованию животных Университета Нью-Мексико, США (№ 200247).

Хирургические методы. Животное закрепилось на стереотаксической установке, с помощью тупых стержней для ушей, которые не нарушают барабанные перепонки. Температуру тела измеряли ректальным датчиком и поддерживали постоянной на уровне 37°C. Во время операции глаза смазывали мазью для предотвращения пересыхания и инфицирования роговицы.

В области от носа до шеи удаляли волосяной покров, кожа, оболочки, зачищали череп. Важно на теменных и лобных костях убирали мышечные волокна. Это позволяло закрепить пластину таким образом, чтобы он обхватывал череп с обеих сторон, придавая дополнительную устойчивость. Во избежание послеоперационных проблем с жеванием удаление височной мышцы должно быть ограничено первыми 2–3 мм ниже латерального края черепа. Кровотечение останавливаем Капрамином;

С помощью бормашины проделываем 4 трепанационных отверстий на височных костях животного, по 2 с каждой стороны;

Вживление винтов: винты из нержавеющей стали, продезинфицированной 70–80% этанолом и высушенной в течение 30 с, ввинчивались в предварительно просверленные отверстия в височные кости. На винт следует наносить максимум два оборота, в противном случае кончик винта будет выступать в полость головы и потенциально может повредить поверхность головного мозга (вкручиваем на 1/3). Фиксировали винты стоматологическим акрилом;

На носовые кости на стоматологический акрил крепился датчик для записи ЭЭГ.

Электроды датчика и винтов скручивались между собой, спаивались и заливали акрилом.

Для фиксации головы на череп животного, с помощью стоматологического акрила крепилась пластина так, чтобы она была на одном уровне с черепом, а не возвышалась над ним. Пластина изготовлена из титана, так как он легкий и медленнее окисляется, чем другие металлы. Пластина

должна располагаться на черепе устойчиво, параллельно и соприкасаться по всей поверхности черепа.

С помощью бормашины выпиливали участок черепа в теменных областях, после чего, с помощью пинцета кость удаляли. Отверстие промывали физ. раствором и закрывали покровным стеклом, предварительно обработанное этанолом, которое фиксировалось на черепе, с помощью стоматологического акрила.

За 30 мин. до визуализации под мультифотонным микроскопом вводим краситель Evans blue в хвостовую вену крысы и даем проциркулировать.

Животное закрепляли на фиксаторе за счет титановой пластины под конфокальным микроскопом.

Флуоресцентная микроскопия. В реальном времени экстравазации ЕВАС из сосудов головного мозга в ткани головного мозга осуществляли через оптическое окно с использованием адаптированного протокола для двухфотонной визуализации коры крыс в бодрствующем поведении. Таким образом, ОГЭБ контролировали у неанестезированных крыс, чтобы избежать возможного влияния анестезии на проницаемость ГЭБ. За десять дней до визуализации хронического оптического окна, с координатами 4 мм латеральнее брегмы и 3 мм медиальнее, на акрил крепилась платформа для электродов ЭЭГ. Изображения были получены с помощью конфокального микроскопа Nikon A1R с сухим объективом 10 × 0,45 (CFI Plan Apo Lambda S 10X, MRD70100 Nikon Corp., Япония) в течение 60 минут с интервалом в 1 минуту.

Анализ ритмов ЭЭГ. Для анализа ритмов использовался спектральный анализ для выделения частотных диапазонов, перспективных для дальнейшего анализа другими методами. Мы использовали подход Уэлча для оценки спектральной плотности мощности. Сигналы были разделены на 100-секундные окна с 50-секундным перекрытием. Чтобы уменьшить эффект утечки, мы использовал оконную функцию Бартлетта. Для каждого окна рассчитывались периодограммы, которые усреднялись в частотной области по

методу Даниэля с окнами усреднения 0,03 Гц. Метод Даниэля применялся для подавления флуктуаций, вызванных шумами различного происхождения.

Ex vivo анализ ОГЭБ с использованием конфокальной микроскопии. Крыс декапитировали и быстро извлекали мозг, фиксировали 4% нейтральным забуференным формалином в течение 24 ч и разрезали на срезы толщиной 50 мкм на вибраторе (Leica VT 1000 S Microsystem, Германия). Срезы инкубировали в течение одной ночи с козьим антителом против мышинового NG2 (1:500; ab 50009, Abcam, Кембридж, Соединенное Королевство) и козьим антителом против кроличьего GFAP (1:500; ab 207165, Abcam, Кембридж, Соединенное Королевство). На следующий день после нескольких промываний в фосфатно-солевом буфере срезы инкубировали в течение 1 ч со 130 мкл вторичных антител, меченных флуоресцентной меткой (козьи антимышьиные IgG (H+L) Alexa Four 647; козьи антикроличьи IgG (H+L) Alexa Four 488; Invitrogen, Molecular Probes, Юджин, Орегон, США). Срезы анализировали с помощью конфокального микроскопа (Leica SP5, Германия).

Спектрофлуориметрический анализ экстравазации ЕВАС. Краситель Evans Blue вводили в бедренную вену и циркулировали в крови в течение 30 мин. Затем крыс декапитировали, мозг быстро извлекали и помещали на лед (при заборе крови антикоагулянты не применяли). Перед удалением мозга мозг перфузировали физиологическим раствором, чтобы вымыть оставшийся краситель в сосудах головного мозга.

В результате эксперимента был разработан протокол мониторинга повышения проницаемости гематоэнцефалического барьера в реальном режиме времени под мультифотонным микроскопом:

Первый этап эксперимента. На первом этапе для регистрации ЭЭГ необходимо вживление винтов. В основном вкручивание винтов происходит в лобной доле. В данном эксперименте вживление винтов происходило в височные кости, т.к. в других областях черепа должно располагаться трепанационное окно и датчик ЭЭГ. Это достаточно сложный шаг, поскольку данная часть черепа тонкая, что может привести к нежелательным последствиям. Каждому животному вживляли по 2 пары электродов.

Электроды изготавливали из нихромовой проволоки диаметром 0.5 мм, обрабатывали в этиловом спирте.

Платформа ЭЭГ крепилась на носовой кости (os nasale) на стоматологический акрил.

В данном эксперименте расположение платформы ЭЭГ и трепанационного окна на черепе крысы является уникальным решением.

Второй этап. Следующим шагом было определить оптимальные размеры и расположение пластины. Для успешной визуализации мониторинга проницаемости ГЭБ на бодрствующем животном под конфокальным микроскопом была изготовлена пластина из титана. Пластина имела высоту 2 мм, является очень легкой и большого дискомфорта не приносит крысе (может без затруднений передвигаться). Так же на ней имеется место для краниотомии окна в области сагиттального синуса. Закреплялась платформа в области теменных костей на стоматологический акрил.

Третий этап. Размер и место трепанации хронического окна имеет большое значение для успешного эксперимента. Окно выпиливалось в области сагиттального синуса, не затрагивая полушария. Данное место является наиболее сложным для проведения операции, т.к. череп в области синуса очень тонкий и легко повреждается, что ведет к кровотечению. Это место было выбрано в связи с тем, что там наибольшее количество кровеносных сосудов разных размеров, что отлично подходит для наших экспериментов. Размер окна около 0,8x0,8 см.

Спустя 10 дней после операции, животное закреплялось под конфокальным микроскопом, с помощью титановой пластины, на которой имеется 2 отверстия. Крыса помещалась на специальную платформу, имеющую круглую форму, на которой животное могло ходить, как на «беговой дорожке».

Двухфотонный мониторинг в реальном времени ОГЭБ к ЕВАС с увеличением утечки красителя в течение 1 часа у бодрствующих крыс с одновременной записью ЭЭГ. Конфокальная визуализация ОГЭБ с использованием маркеров перicyтов и астроцитов показала проникновение

ЕВАС за эндотелиальную стенку микрососудов головного мозга и его распространение между концами астроцитарных ножек.

Таким образом, данные *in vivo* ясно показывают, что динамика ЭЭГ была зарегистрирована у бодрствующих и не наркотизированных крыс с ОГЭБ. Составление протокола с данными методиками послужат важным шагом к успешной визуализации сосудов головного мозга и одновременной записи ЭЭГ, что позволит наблюдать за открытием гематоэнцефалического барьера в реальном режиме времени.

Выводы: 1. Разработали уникальную методику вживления 4 винтов в *os temporale* лабораторного животного. Электроды изготовили из нихромовой проволоки диаметром 0.5 мм;

2.Разработали уникальное расположение системы регистрации ЭЭГ на *os nasale*, что позволило считывать запись одновременно с визуализацией трепанационного окна под мультифотонным микроскопом;

3.Определили оптимальный размер (0,8 x 0,8 см), вес, месторасположение титановой пластины на *os parietale*, благодаря чему произвели установку платформы на *os parietale* черепа для фиксации бодрствующего животного под мультифотонным микроскопом.