

МИНОБРНАУКИ РОССИИ

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования

«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра теоретической и социальной философии

**Повышение проницаемости гематоэнцефалического барьера
во время сна**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

студента 4 курса 421 группы направления 06.03.01 Биология

биологического факультета

Крупновой Валерии Васильевны

Научный руководитель

кандидат биологических наук, доцент  Е.И. Саранцева

Заведующий кафедрой

доктор биологических наук, доцент  О.В. Семячкина-Глушковская

Саратов 2023

Актуальность работы. Гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) является высокоорганизованной морфофункциональной системой, которая выполняет барьерную функцию между кровеносной системой и центральной нервной системой, за счет эндотелиоцитов церебральных капилляров, астроцитов и глии. Гематоэнцефалический барьер является основным препятствием для эффективной доставки терапевтических соединений в мозг.

Эндогенный циркадный ритм в ГЭБ контролирует функцию транспортера, регулируя проницаемость ГЭБ. Кроме того, сон способствует клиренсу метаболитов по ГЭБ, а также эндоцитозу по ГЭБ.

Последние данные показывают, что эндоцитоз возникает через ГЭБ во время сна, и ингибирование этого процесса увеличивает потребность во сне. Сон регулирует движение молекул не только вдоль ГЭБ, но и через него, так что во время сна увеличивается очистка побочных продуктов отходов в периваскулярном пространстве.

Таким образом, неинвазивный подход, который используется для повышения проницаемости ГЭБ, может улучшить результаты лечения пациентов и минимизировать нежелательные побочные эффекты. Понимание роли изменений, связанных со сном и ГЭБ может улучшить доставку лекарственных препаратов в мозг и повысить качество лечения заболеваний человека.

Целью работы является изучение повышения проницаемости гематоэнцефалического барьера во время сна.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Исследовать проницаемость гематоэнцефалического барьера во время бодрствования
2. Изучить состояние гематоэнцефалического барьера во время сна
3. Дать характеристику проницаемости гематоэнцефалического барьера во время сна с помощью электроэнцефалограммы

Структура бакалаврской работы. Выпускная квалификационная работа состоит из четырех частей: введения, основной части, 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 четырех подразделов: строение гематоэнцефалического барьера; функции гематоэнцефалического барьера; транспорт веществ через гематоэнцефалический барьер; повышение проницаемости гематоэнцефалического барьера во время сна. Раздел материалы и методы представлен описанием исследуемых объектов и условий проведения эксперимента. Раздел результаты исследования включает три подраздела: нелинейный анализ электроэнцефалограммы во время сна, бодрствования и открытого ГЭБ; анализ пропускающей способности гематоэнцефалического барьера во время сна; волновой анализ электроэнцефалограммы во время сна и открытого гематоэнцефалического барьера.

Гематоэнцефалический барьер регулирует проникновение из крови в мозг биологически активных веществ, метаболитов, химических веществ, воздействующих на чувствительные структуры мозга, препятствует поступлению в мозг чужеродных веществ, микроорганизмов, токсинов.

Главным компонентом ГЭБ являются эндотелиальные клетки (ЭК) капилляров головного мозга, астроцитами, перицитами и окончаниями нейронов.

Эндотелиальные клетки мозга обладают уникальными характеристиками. В них содержится больше митохондрий, чем в эндотелиальных клетках других органов. Между эндотелиоцитами капилляров головного мозга отсутствуют фенестры.

Плотные контакты являются участками видимой интеграции внешних частей клеточных мембран смежных эндотелиальных клеток. При рассмотрении плотных контактов под электронным микроскопом они выглядят как вытянутые анастомозы с выступающими фибриллами и углублениями в соответствующих местах на противоположной мембране.

Плотные контакты образованы тремя типами мембранных белков – окклюдинами, клаудинами и молекулы клеточной адгезии.

Еще одним компонентом ГЭБ является базальная мембрана. Она выполняет механическую поддержку клеток, которые она окружает, отделяя эндотелиоциты капилляров от клеток ткани мозга. Также она является субстратом для миграции клеток и барьером для макромолекул. Окружая эндотелиоциты сплошным слоем, базальная мембрана является последней преградой для транспорта крупномолекулярных веществ.

Астроциты, нейроглиальные клетки звездчатой формы, выстилают своими отростками базальную мембрану со стороны ткани мозга. Отростки астроцитов покрывают базальную мембрану не сплошным слоем, а формируют своеобразные розеткообразные структуры на поверхности. Отростки астроцитов окружают порядка 95% аблюминальной поверхности базальной мембраны. Нейроны, в отличие от астроцитов, не являются частью ГЭБ. Питание нейронов и удаление продуктов метаболизма происходит именно с участием астроцитов. Помимо трофической функции астроциты также выполняют регуляторные функции для плотных контактов эндотелиальных клеток, играя, таким образом, важную роль в формировании ГЭБ.

Еще одним важным элементом ГЭБ являются перициты. Морфологически перициты – это округлые клетки с выступающим ядром, их цитоплазма богата первичными и вторичными лизосомами, что указывает на большое количество различных процессов, проходящих в клетке. Основная функция перицитов заключается в обеспечении структурной поддержки и участии в вазодинамике. Перициты играют определенную роль в ангиогенезе: за счет селективного ингибирования они регулируют пролиферацию, развитие, перемещение и дифференцировку эндотелиальных клеток. Также перицитам свойственна фагоцитарная активность и, следовательно, они могут вовлекаться в нейроиммунные процессы.

Основной функцией, характеризующей гематоэнцефалический барьер, является проницаемость клеточной стенки. Необходимый уровень физиологической проницаемости, адекватный функциональному состоянию организма, обуславливает динамику поступления в нервные клетки мозга физиологически активных веществ.

Регуляция функций гематоэнцефалического барьера осуществляется высшими отделами ЦНС и гуморальными факторами. Значительная роль в регуляции отводится гипоталамо-гипофизарной системе. В нейрогуморальной регуляции гематоэнцефалического барьера важное значение имеют обменные процессы. При различных видах церебральной патологии, например травмах, различных воспалительных поражениях ткани мозга, возникает необходимость искусственного снижения уровня проницаемости гематоэнцефалического барьера. Фармакологическими воздействиями можно увеличить или уменьшить проникновение в мозг различных веществ, вводимых извне или циркулирующих в крови.

Для основных водорастворимых питательных веществ и метаболитов, необходимых нервной ткани, ГЭБ обеспечивает низкую пассивную проницаемость. Напротив, для других питательных веществ, которые не могут пройти, в ГЭБ экспрессируются особые транспортные системы, обеспечивающие адекватное снабжение этими веществами. Селективная и регионспецифичная экспрессия этих транспортеров придает нормальную полярность эндотелия ГЭБ.

Центральная и периферическая нервные системы используют одни и те же нейротрансмиттеры, поэтому ГЭБ помогает разделять резервуары центральных и периферических медиаторов, сводя к минимуму «перекрестные помехи» и защищая мозг от неожиданных изменений их уровней в плазме.

В физиологических условиях ГЭБ предотвращает попадание многих макромолекул в мозг нормальными парацеллюлярными или диффузионными путями. Утечка этих высокомолекулярных белков сыворотки в мозг через

поврежденный ГЭБ может иметь серьезные патологические последствия. Например, выход белков плазмы, таких как альбумин, протромбин и пламиноген, губительно влияет на нервную ткань, вызывая клеточную активацию, что может привести к апоптозу.

Многие потенциальные нейротоксины циркулируют в крови. Функция ГЭБ заключается в регулировании поступления различных циркулирующих веществ в зависимости от потребностей ЦНС. Транспортный барьер, представленный множественными АВС – энергозависимыми транспортерами, занимает просветную поверхность ГЭБ. Он активно выкачивает многие из этих агентов из мозга.

Одним механизмов открытия ГЭБ является простая диффузия липофильных веществ сквозь эндотелиоциты. Например, такими веществами могут быть стероидные гормоны, морфин и т.д.

В целом широкий спектр жирорастворимых молекул может пассивно диффундировать через ГЭБ и проникать в головной мозг. Считается, что растворимые в липидах низкомолекулярные соединения пересекают ГЭБ посредством временного образования пор в двойном слое фосфолипидов. Поскольку поры имеют конечный размер, они ограничивают движение небольших молекул, объем которых превышает объем пор.

Существует другой способ транспорта, получивший название «Троянский конь». Периваскулярные макрофаги, находящиеся рядом с астроцитами первоначально происходят от циркулирующих в крови моноцитов, которые способны пересекать интактный гематоэнцефалический барьер.

Помимо естественных механизмов, существуют способы насильственного проведения лекарственных веществ через ГЭБ.

Одним из таких методов является введение в сосуды мозга мелких пузырьков газа и воздействие на нужные области ультразвуком под контролем томографа. Клетки эндотелия раздвигаются, под механическим

воздействием пузырьков и ультразвуковых волн, и в образующиеся щели могут проникать лекарственные вещества.

Еще один способ основан на введении маннитола, который обезвоживает клетки эндотелия, благодаря чему между ними также появляются щели. В течение 1 – 2 ч можно вводить необходимые препараты, пока клетки не пришли в исходное состояние и пространства между ними не затянулись.

Еще одним способом транспорта веществ через ГЭБ является активный отток. Несколько белков АТФ – связывающей кассеты (АВС) экспрессируются на люминальной, обращенной к крови эндотелиальной плазматической мембране ГЭБ. Они представляют собой АТФ – управляемые насосы оттока ксенобиотиков и эндогенных метаболитов, которые ограничивают проницаемость множества токсинов, включая терапевтические агенты. Фармакорезистентные характеристики ЦНС объясняются их высокой экспрессией.

Существует два типа везикулярных транспортных систем; один основан на рецептор-опосредованном трансцитозе (РОТ), а другой на адсорбционно-опосредованном трансцитозе (АОТ).

При РОТ макромолекулы связываются со специфическими рецепторами на клеточной поверхности, что запускает эндоцитоз. Оба рецептора и связанный с ними лиганд собираются вместе, образуя впячивание, которое отщепляется в везикулу. И лиганд, и рецепторы интернализуются в ЭК и направляются через цитоплазму для экзоцитоза на противоположной стороне клетки. Наконец, лиганд и рецептор диссоциируют во время клеточного транзита или экзоцитоза.

При АОТ положительно заряженные большие молекулы взаимодействуют со специфическими сайтами связывания на клеточной поверхности, что вызывает эндоцитоз и последующий трансцитоз.

Сон является генетически детерминированным состоянием организма, характеризующееся закономерными последовательными изменениями в

регистрации нескольких физиологических показателей: электрической активности головного мозга (электроэнцефалограмма, ЭЭГ), глазных яблок (электроокулограмма, ЭОГ) и мышц затылка (электромиограмма, ЭМГ).

Сон состоит из двух последовательных фаз – медленной и быстрой. Фазы сна строго различаются по характеру ЭЭГ и активности различных медиаторных систем мозга.

Проницаемость ГЭБ не всегда одинакова. Исследования показали, что его проницаемость меняется в зависимости от времени суток. Как и многие клетки в организме, клетки ГЭБ контролируются циркадными ритмами, биологическими процессами, которые повторяются примерно каждые 24 часа. Эти ритмы управляются молекулярными «часами» внутри каждой клетки, а клетки по всему телу синхронизируются «главными часами», расположенными в мозге.

Исследования на мышах показывают, что количество гормонов, воспалительных белков и других молекул, которые попадают из крови в мозг, колеблется в течение дня, при этом пик проницаемости ГЭБ приходится на ночь.

Циркадные ритмы — не единственный ежедневный процесс, влияющий на целостность ГЭБ. Известно также, что сон — или, точнее, недостаток сна — влияет на защиту мозга со стороны ГЭБ. Эта взаимосвязь между сном и ГЭБ становится все более важной, поскольку ограничение сна становится все более и более распространенным явлением в нашем современном обществе.

Сон и гематоэнцефалический барьер являются двумя важными составляющими гомеостаза ЦНС. Сон необходим для поддержания здоровья ЦНС посредством выведения метаболитов и нейротоксических отходов из мозга.

Сон и открытие ГЭБ взаимосвязаны с активацией клиренса макромолекул и токсинов из головного мозга. Таким образом, ожидается, что неврологическая активность во время сна будет аналогична таковой во время

открытия ГЭБ. Действительно, и сон, и открытие ГЭБ сопровождаются клиренсом Аβ из мозга. Сон характеризуется сопряженными колебаниями медленноволновой активности и спинномозговой жидкости, которые очищают мозг от продуктов метаболизма, что усиливается при более низкочастотных колебаниях ЭЭГ. Медленноволновая активность в динамике ЭЭГ также ассоциируется с открытием ГЭБ у человека и животных, а нарушение ГЭБ вызывает активацию клиренса макромолекул из головного мозга.

Объектами исследования служили взрослые крысы – самцы, породы линии Вистар (массой 250–280 г или 8–10-недельного возраста). Все процедуры выполняли в соответствии с «Руководством по уходу и использованию лабораторных животных».

Группы животных.

Исследования проводились на следующих группах животных:

- 1) группа крыс в бодрствующем состоянии;
- 2) группа крыс, у которых регистрировали сон;
- 3) группа крыс с открытым ГЭБ;

n = 30 в каждой группе во всех сериях экспериментов.

Материалы исследования.

В данной работе использовалось следующее оборудование: конфокальный микроскоп (Leica TCS SP8 Leica, Германия); электроэнцефалограф (Pinnacle Technology, Тайвань); стереотаксическая установка для закрепления крыс (RWD Life Science (Китай)).

Запись электроэнцефалограммы и электромиограммы у крыс проводилась под ингаляционной анестезией с 1 % изофлуран при 1 л/мин N₂O/O₂ – 70:30, была установлена головная пластина и просверлены небольшие отверстия. Затем в трепанационные отверстия на одной стороне от средней линии между черепом и подлежащей твердой мозговой оболочкой вставляли провода ЭЭГ. Отведения ЭЭГ фиксируются стоматологическим акрилом. Отведение ЭМГ было введено в мышцу шеи. Ибупрофен (15 мг/кг)

для купирования послеоперационной боли обеспечивал их водоснабжение за два-три дня до операции и в течение трех и более дней после операции. Крысам давали 10 дней на восстановление после операции перед началом эксперимента.

Поскольку стандартные правила определения стадии сна для крыс в настоящее время недоступны, мы использовали критерии визуальной оценки из этих исследований. Бодрствование определяли как десинхронизированную ЭЭГ с низкоамплитудной и высокочастотной динамикой и относительно высокоамплитудной ЭМГ. NREM-сон был расценен как синхронизированная активность с высокой амплитудой, в которой преобладали низкочастотные дельта-волны, составляющие $> 30\%$ волн ЭЭГ и ЭМГ с меньшей амплитудой. Открытие ГЭБ определяли по наличию тета-волн, составляющих $> 20\%$ волн ЭЭГ и низкую амплитуду ЭМГ.

При конфокальной микроскопии *in vivo* в режиме реального времени экстравазацию Evans blue из сосудов головного мозга в ткани головного мозга проводили через оптическое окно с использованием адаптированного протокола для двухфотонной визуализации сосудов коры у грызунов в состоянии бодрствования. Открытый таким образом ГЭБ контролировали у неанестезированных крыс, чтобы избежать возможного влияния анестезии на проницаемость барьера. За десять дней до визуализации было подготовлено хроническое оптическое окно в координатах 4 мм латеральнее брегмы и 3 мм медиальнее на акриловой платформе для электродов ЭЭГ. Параллельно в правую бедренную вену вводили полиэтиленовый катетер для внутривенной инъекции красителя однократной болюсной дозой. Изображения были получены с помощью конфокального микроскопа в течение 60 минут с интервалом в 1 минуту. В каждый момент времени фиксировался пакет изображений из 25 срезов в диапазоне 120 мкм, затем рассчитывалась Z-проекция максимальной интенсивности.

Для анализа ритмов использовался спектральный анализ для обнаружения частотных диапазонов, перспективных для дальнейшего анализа

другими методами. Был выбран подход Уэлча для оценки спектральной плотности мощности. Сигналы были разделены на 100-секундные окна с 50-секундным перекрытием. Была рассчитана когерентность между парами сигналов ЭЭГ. Для оценки когерентности сигналы ЭЭГ были разделены на 100-секундные окна с 50-секундным перекрытием. Затем результаты для каждого окна усреднялись по методу Даниэля с окнами усреднения 0,13 Гц. Для анализа коллективной динамики сигналов ЭЭГ использовался кросс-рекуррентный анализ (КРА) – известный метод анализа динамики x -систем, который также показывает хорошие результаты применительно к сигналам вариабельности сердечного ритма. Для оценки характера колебаний в сигнале ЭЭГ, возникающих в различных частотных диапазонах, использовался метод непрерывного вейвлет-преобразования.

Обсуждение результатов исследования.

Используя функциональные модели исследования повышения проницаемости ГЭБ *in vivo*, сравнивалась динамика ЭЭГ в группах сна, открытого ГЭБ и бодрствования с использованием спектрального анализа, рассчитанного с помощью перекрестного рекуррентного анализа (CRA). Результаты показали, что ЭЭГ-активность в θ -ритме (4-8 Гц) очень сходна между сном и открытым ГЭБ. Однако как открытый ГЭБ, так и сон, значительно отличались от бодрствования. Таким образом, при когерентном анализе динамики ЭЭГ установлено, что θ -диапазон в активности ЭЭГ, опосредованный открытым ГЭБ, имеет сходство со сном.

Двухфотонный мониторинг сосудов головного мозга в режиме реального времени показал повышение проницаемости ГЭБ с увеличением утечки красителя Evans blue в течение 1 часа у спящих крыс. После этого в экспериментах *ex vivo* был проведен качественный и количественный анализ открытия ГЭБ. Спектрофлуориметрическим методом выявлен высокий уровень красителя в тканях головного мозга крыс с открытым ГЭБ по сравнению с интактным барьером. Конфокальная визуализация открытого ГЭБ показала проникновение красителя за эндотелиальную стенку микрососудов головного мозга и его распределение между концами астроцитарных ножек.

астроцитарных ножек. Таким образом, данные *in vivo* и *ex vivo* ясно показывают проникающую способность ГЭБ во время сна.

Для более детального изучения параметров ЭЭГ была рассчитана длительность T существования колебательных паттернов в θ частотных диапазонах. Для каждой крысы рассчитывали продолжительность T колебательных паттернов для трех состояний (сон, бодрствование и открытый ГЭБ) в θ -диапазоне. Анализ длительности T показал сходство для сна и открытого ГЭБ в θ -диапазоне колебательной активности и достоверные различия между бодрствованием, сном и открытым ГЭБ.

Заключение. По результатам проведённой работы были сделаны следующие выводы:

1. Сведения, полученные в ходе исследования, показали некоторое различие в группах сна и бодрствования. Пропускающая способность гематоэнцефалического барьера во время бодрствования отсутствует. Это доказывает результаты динамики ЭЭГ-активности в θ -ритме во время бодрствования ($0,68 \pm 0,01$) против открытого барьера ($0,53 \pm 0,02$).

2. Мониторинг сосудов головного мозга с помощью конфокального микроскопа показал повышение проницаемости гематоэнцефалического барьера во время сна. Большинство применяемых методов повышения проницаемости барьера являются инвазивными. Данный метод может оказаться перспективным и безопасным способом доставки лекарственных препаратов во время глубокого сна к месту поражения.

3. Результаты, полученные в ходе волнового анализа, показали сходство в продолжительности колебательных паттернов во время сна ($1,18 \pm 0,12$) и открытого барьера ($1,16 \pm 0,12$). Мониторинг повышения проницаемости гематоэнцефалического барьера в режиме реального времени и параллельная регистрация электроэнцефалограммы показали, активность θ -ритма в моменты открытия барьера.

