14

Министерство образования и науки РФ

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования

«КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

ИНСТИТУТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ И БИОЛОГИИ

КАФЕДРА ФИЗИОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ

Направление: 06.04.01 Биология

Программа «Нейробиология

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

Магистерская диссертация

ТКАНЕВЫЕ МЕХАНИЗМЫ ГЕНЕРАЦИИ ВНУТРЕННЕГО ОПТИЧЕСКОГО СИГНАЛА В БОЧОНКОВОЙ КОРЕ НОВОРОЖДЕННЫХ КРЫС *in vivo*

Работа завершена:
"6" июня 2018 г. _____ (Л.С.Шарипзянова)

Работа допущена к защите:

Научный руководитель
н.с. НИЛ “Нейробиология”, к.м.н.

"6" июня 2018 г. _____ (М.Г.Минлебаев)

Заведующий кафедрой
профессор, д.б.н.
"25" июня 2018 г. _____ (Г.Ф. Ситдикова)

Казань–2018

СОДЕРЖАНИЕ

стр.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	3
Введение	4
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	7
1. ВНУТРЕННИЙ ОПТИЧЕСКИЙ СИГНАЛ	7
1.1. Гемоваскулярная и гемодинамическая составляющие ВОС	13
1.2. Вклад тканевой компоненты в формировании ВОС	16
1.2.1. Катион-хлорные котранспортеры в нейрональных клетках	18
1.2.1.1. NKCC1	23
1.2.1.2. KCC2	24
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	26
2.1 Хирургия	26
2.2 Перфузионная камера	27
2.3. Регистрация внутреннего оптического сигнала	29
2.4. Сенсорная стимуляция	31
2.5. Аппликация веществ	33
2.6 Анализ данных	34
3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	39
ВЫВОДЫ	50
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	52

Введение

Метод внутреннего оптического сигнала (ВОС) - является простым, но мощным неинвазивным методом изучения активности головного мозга. Метод успешно используется для изучения функциональной топографии сенсорной коры [Bonhoeffer and Grinvald, 1991; Grinvald et al., 1986; Rubin and Katz, 1999], а также гемодинамических и метаболических процессов головного мозга [Jones et al., 2001; Malonek and Grinvald, 1996; Sheth et al., 2004].

Функциональным аналогом, использующим схожие механизмы, в клинических исследованиях человеческого мозга является функциональная спектроскопия в ближнем инфракрасном диапазоне (БИКС, *fNIRS - functional near infared spectroscopy*) [Obrig, 2014; Villringer et al., 1993; Wyatt et al., 1986].

В основе генерации ВОС лежат несколько механизмов. Гемодинамическая компонента, связанная с переходом оксигемоглобина (HbO) в дезоксигемоглобин (HbR) [Grinvald et al., 1991], гемоваскулярная компонента, обусловленная изменениями мозгового кровообращения [Malonek and Grinvald, 1996; Vanzetta and Grinvald, 1999] и тканевая компонента (ТК), связанная с изменением светорассеивающей (СР) способности нейрональной ткани, вызванным увеличением объема клеток [Federico et al., 1994; Grinvald et al., 1986, 1991; MacVicar and Hochman, 1991; Malonek and Grinvald, 1997;].

БИКС и ВОС рассматриваются как эффективные аналоги функциональной магнитно-резонансной томографии (фМРТ) [Cui et al., 2011; Huppert et al., 2006; Strangman et al., 2002], хотя методы значительно отличаются по разрешению и маркерам внутриклеточной активности.

На формирование оптического сигнала могут влиять не только гемодинамические и гемоваскулярные изменения. Также имеется широкий диапазон маркеров - внутриклеточных хромофоров (гемоглобин, цитохром,

вода, *NADH*/*FADH*2) способных к поглощению света определенных длин волн [Grinvald et al., 1986; Jobsis, 1977; Matcher et al., 1994] и флюоресценции [Aitken et al., 1999; MacVicar and Hochman, 1991; Mayevsky and Chance, 1982; Mayevsky and Rogatsky, 2007].

Незрелое нейроваскулярное взаимодействие и недостатоточное развитие механизма саморегуляции сосудов головного мозга [Greisen, 2005; Harris et al., 2011] у новорожденных животных может являться причиной ВОС с меньшей амплитудой и большей длительностью [Allievi et al., 2016; Arichi et al., 2012]. Это делает интерпретацию результатов нейровизуализации на основе гемодинамичекого и гемоваскулярного ответа (ГО и ГВО, соответственно) менее надежной. Более того, во время нейрональной активности у взрослых особей наблюдается положительный ГО. Однако, у новорожденных крыс можно увидеть негативный или двухфазный ГО [Born et al., 2000; Kozberg et al., 2013; Yamada et al., 2000] и ухудшение кровообращения мозга в ответ на сенсорную стимуляцию [Zehendner et al., 2013].

Таким образом, в отличие от взрослого мозга, где в основе ВОС лежит гемодинамические и гемоваскулярные компоненты, а тканевая компонента имеет незначительный вклад, в незрелой развивающейся нервной системе ВОС главным образом обусловлен изменениями со стороны нейрональной ткани. Однако мало что известно о механизмах лежащих основе формирования тканевой компоненты ВОС.

Целью данной работы являлось охарактеризовать тканевые механизмы генерации внутреннего оптического сигнала в бочонковой коре у новорожденных крыс *in vivo*.

В соответствии с целью были поставлены следующие задачи исследования:

1. Разработка методологического подхода для исследования фармакологического профиля внутреннего оптического сигнала *in vivo*.

2. Определение места генерации тканевой компоненты внутреннего оптического сигнала в развивающейся соматосенсорной системе у новорожденного крысенка.

3. Выявление механизмов лежащих в основе тканевой компоненты генерации внутреннего оптического сигнала в развивающемся мозге *in vivo*.

4. Оценить роль гемодинамической и гемоваскулярной компонент в генерации внутреннего оптического сигнала у новорожденных крыс.

Неинвазивность исследований, низкая себестоимость и удобство измерений [Greisen et al., 2011; Grinvald, A, 2016] делают оптические исследования перспективным методом для функциональных исследований головного мозга новорожденных детей, особенно недоношенных. В связи с этим, разработка методов регистрации и интерпретации оптических сигналов у новорожденных на основе гемодинамического ответа и других маркеров активности имеет важное значение в том числе и для клинической диагностики.

ВЫВОДЫ

Мы проводили мультиспектральную визуализацию внутреннего оптического сигнала, вызванную сенсорной стимуляцией, в бочонковой коре у новорожденных крыс *in vivo* с 4 по 7 день после рождения.

1. Использование перфузионной камеры для исследования фармакологического профиля внутреннего оптического сигнала показало ее высокую эффективность.

2. Использование блокаторов глутаматной постсинаптической передачи НМДА (dAPV) и АМПА-каинантных (CNQX) рецепторов приводило к значительному падению амплитуды внутреннего оптического сигнала. Таким образом, в развивающейся соматосенсорной системе у новорожденного крысенка тканевая компонента внутреннего оптического сигнала имеет постсинаптическую природу.

1. Использование селективных антагонистов катион-хлорных котранспартеров (NKCC1 и KCC2) приводило к изменениям амплитудно-временных характеристик внутреннего оптического сигнала. Эти изменения свидетельствует о том, что в основе тканевой компоненты внутреннего оптического сигнала в развивающейся бочонковой коре у новорожденных крыс лежат преходящие нарушения водно — солевого баланса.

2. Малая выраженность эффекта сужения сосудов(результаты экспериментов с использованием донора NO) свидетельствует о том, что в развивающейся соматосенсорной системе у новорожденных крыс гемоваскулярная и гемодинамическая компоненты не являются доминирующими механизмами в генерации внутреннего оптического сигнала.

Эти результаты имеют большое значение для оптической функциональной нейровизуализации и при интерпретации клинических

данных, полученных в педиатрических и неонатологических исследованиях с помощью методики БИКС (регистрация внутреннего оптического сигнала в ближнем инфракрасном диапазоне) у детей грудного возраста, особенно у недоношенных детей.

По результатам дипломной работы готовится статья к публикации в рецензируемом журнале.