

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

Кафедра физиологии человека и животных

**ОЦЕНКА ПОВЕДЕНИЯ ЖИВОТНЫХ С ГЛИОМОЙ ДО И ПОСЛЕ
ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ**

АВТОРЕФЕРАТ

Студентки 4 курса 421 группы

Направление подготовки бакалавриата 06.03.01 Биология

Биологического факультета

Дружинкиной Марии Владимировны

Научный руководитель
доцент, к. б. н.



Е.И. Саранцева

Зав. кафедрой
д.б.н., доцент



О. В. Семячкина–Глушковская

Саратов 2019

ВВЕДЕНИЕ

Одним из наиболее распространенных (60% среди всех новообразований) онкологических заболеваний можно назвать глиому. Эта опухоль головного мозга развивается из частично зрелых глиальных клеток. Их функция заключается в поддержке жизнедеятельности нейронов путем поставки питательных веществ.

Размеры диагностируемых опухолей головного мозга более 3 см в диаметре составляют 40%, более 5 см — 42% случаев от всех выявляемых первичных опухолей. Средняя продолжительность жизни больных со злокачественными новообразованиями головного мозга составляет при анапластических астроцитомах 2 года, при глиобластомах — 1 год. За этот период некоторых больных оперируют до пяти раз. Сроки безрецидивного периода сокращаются с каждой операцией до нескольких недель, а выраженность неврологических нарушений обычно нарастает с каждым оперативным вмешательством. Прогноз излечения и выживаемости при первичных опухолях головного мозга напрямую зависит от возраста пациента, его общего состояния, а также типа раковых клеток и других факторов. Статистика выживаемости в течении 5 лет варьирует от 66% для молодого возраста (от новорожденности до 19 лет) и до 5% для пожилых (75 лет и старше).

Злокачественные новообразования влияют на когнитивные функции заболевших. Наблюдаются эпизодические изменения поведения, когда больной теряет осознанный контакт с окружающим миром. Приступы сопровождаются потерей сознания, часто на фоне неадекватности действий. Например, сновидений, автоматизмов (бесцельное хождение, потирание рук), обонятельные галлюцинации, жевательных или глотательных движений. Сложные парциальные припадки нередко сопровождаются также неосознанным совершением действий, требующих значительного мастерства, например управление автомобилем. По окончании приступа у больного обнаруживается

амнезия на события, имевшие место во время припадка. Такое поведение больных является тяжелым испытанием для окружающих его людей (родственников и знакомых).

Несмотря на активное развитие клинических и лабораторных методов лечения и исследований в области нейроонкологии, глиомы по-прежнему остаются самыми распространенными и в то же время плохо поддающимся диагностированию. Известно, что современные методы лечения онкологических заболеваний ориентированы на элиминацию всей совокупности опухолевых клеток лишь до стадии видимого повторного роста. В связи с этим необходимость поиска новых средств противоопухолевой терапии для корректировки поведения является крайне актуальной проблемой современной онкологии.

Поэтому цель данной работы заключалась в изучении поведения животных с глиомой до и после фотодинамического воздействия.

Для достижения этой цели решались следующие задачи:

1. Смоделировать заболевание глиомой у лабораторных животных;
2. Оценить поведение животных с опухолью до фотодинамического воздействия;
3. Оценить поведение животных с опухолью после фотодинамического воздействия.

Основная часть

Онкологические заболевания занимают третье место в мире в числе причин смертности, а распространенность глиом по данным мировой статистики – 5–10 случаев на 100 тыс. населения. Злокачественные новообразования головного мозга имеют ограниченную распространенность среди всех онкологических заболеваний, однако локализация и особенности течения заболевания обуславливают высокую смертность, инвалидизацию больных, психические нарушения и формирование стрессовых реакций, что определяет их медикосоциальную значимость. Эпидемиологическими исследованиями доказана относительная распространенность и выраженная в мире тенденция роста заболеваемости опухолями головного мозга.

Фотодинамическая терапия является современным, интенсивно развивающимся методом диагностики и лечения злокачественных новообразований. Метод ФДТ основан на избирательном накоплении в опухолевой ткани фотосенсибилизатора, способного при локальном воздействии света с длиной волны, соответствующей его максимуму поглощения, генерировать цитотоксические агенты, вызывающие гибель опухолевых клеток.

Материалы исследования

Во всех экспериментах использовались взрослые крысы (самцы, 250-280 г). Все эксперименты выполнялись в соответствии с Директивами 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 года по охране животных, используемых в научных целях, статья 27. Работа выполнялась на базе кафедры физиологии человека и животных Саратовского национально исследовательского государственного университета имени Н.Г. Чернышевского.

Методы исследования Имплантация клеток глиомы (С6) осуществлялась согласно стандартным методикам. Для сравнительной оценки поведения здоровых и больных крыс до и после фотодинамического воздействия проводились тесты на наличие нормальной моторики и реакции на

стрессирующие факторы (испытание в цилиндре, прогулка по балке, тест на моторику «Добыча кормовых гранул через узкую щель в камере», тест «Отчаяние»).

3 Результаты исследований

Первый этап работы заключался в *in vivo* анализе миграции глиомных клеток из основной массы опухоли мозга у крыс. Анализ осуществлялся с применением конфокальной микроскопии и гистологии. Гистологический анализ тканей мозга показал клеточный полиморфизм. То есть форма и размер клеток сильно варьирует. Ядра в основном крупные, резко полиморфные, гиперхромные, так же наблюдается высокое ядерно-цитоплазматическое соотношение. Как показано на рисунке 5. Эти перечисленные морфологические признаки характерны для глиомы.

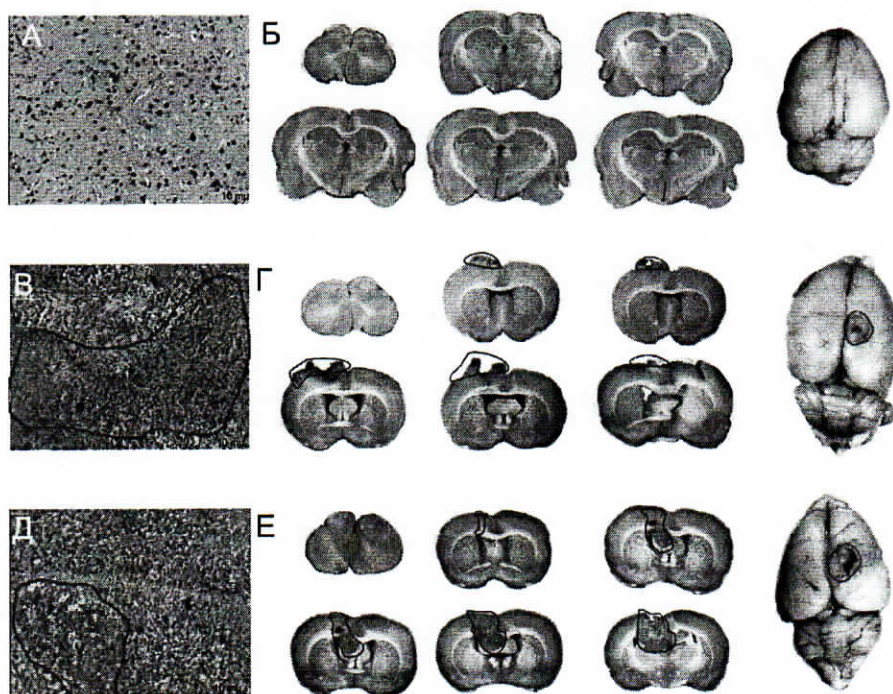


Рисунок 5 – Гистологические (А; В; Д) срезы и макрофотографии развития глиомы у крыс, где А и Б – контрольный мозг без вживления клеток Сб; В и Г – 14-18 день развития глиомы и Д и Е – 24-29 день развития глиомы

В результате проведенных экспериментов у животных с вживленными клетками С6 развилась опухоль, о чем свидетельствуют гистологические срезы (рисунок В; Д) и срезы головного мозга, выполненные на вибротоме (рисунок 5 Г; Е).

Следующим этапом нашего эксперимента была проверка когнитивных функций у животных с опухолью до и после ФДТ, а также у контрольной группы.

Первым этапом проводили тестирование экспериментальных животных в цилиндре (Цилиндр – тест (*Cylinder-Test*)). Находясь в тесном цилиндре и поднявшись на задние лапы, животное использует одну или обе передние конечности. Здоровые животные одинаково владеют двумя передними конечностями, а при травме они используют в основном только одну конечность. Во время эксперимента оценивали количество касаний стенок цилиндра передними конечностями, а также для правой и левой конечности оценивали до количества не менее 106 клеток и замораживали в среде для роста. По нашим наблюдениям, было выявлено, что у животных была нарушена координация движений в цилиндре (рисунок 6).

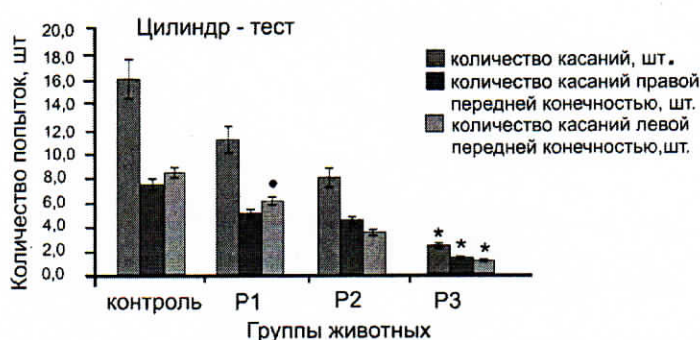


Рисунок 6 – Цилиндр тест. Контрольная группа; P1 и P2– животные с глиомой с лазерным воздействием; P3 – животные с глиомой без лазерного воздействия (* - по сравнению с контролем; • - по сравнению с P1; Δ - по сравнению с P2)

Во время эксперимента животное с глиомой без лазерного воздействия заваливалось на одну сторону. Оно могло сидеть на дне цилиндра, не проявляя интереса к замкнутому пространству, не пыталось найти возможности выхода наружу. Они были малоподвижны и малоактивны. Замечены крысы, которые касались цилиндра одной лапкой, в течение 5 мин. Следовательно, у них отмечалась нарушение мозговой деятельности. Так как, в здоровом состоянии животное должно касаться цилиндра обеими лапками. Кроме того наблюдалось уменьшение ориентировочно-исследовательского поведения. Также было замечено частое обильное мочеиспускание, приводящее к намоканию шерсти животного. Так проявляет себя симптом мышечной слабости.

У крыс после воздействия лазером наблюдалась положительная динамика, которая через 20 дней крысам возвращались симптомы с отрицательной динамикой (рисунок 6).

Вторым испытанием было «Хожение по перекладине и реакция на свет» (*Ledged tapered beam test*). В ходе эксперимента учитывалось количество остановок, падений и пройденных дистанций по балке за 5 минут (рисунок 7).

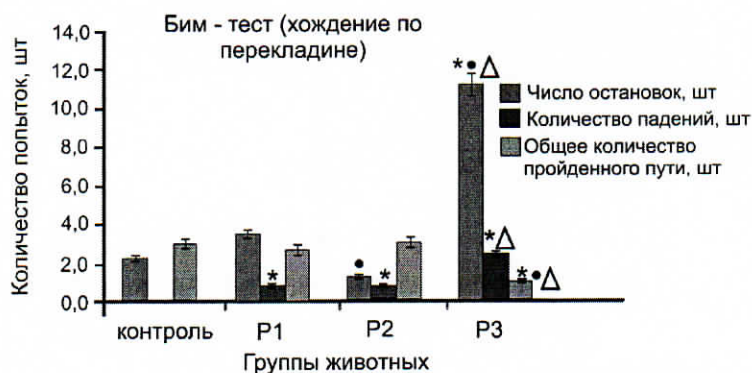


Рисунок 7 - Результаты Бим-теста (хождение по перекладине). Контрольная группа; P1 и P2 – животные с глиомой с лазерным воздействием; P3 – животные с глиомой без лазерного воздействия (* - по сравнению контролем; • - по сравнению с P1; Δ - по сравнению с P2)

В результате эксперимента крысы без лазерного воздействия теряли координацию, не реагировали на стрессовые факторы, были малоподвижны, вели

себя неадекватно (шли к ярко светящийся лампе) обжигались, не убегали от света . Отмечались частые падения и длительные остановки (рисунок 7).

С лазерным воздействием крысы были более адекватными. Отмечалась положительная динамика, крысы убегали от стрессующего фактора. Делали мало остановок и падений в отличии от крыс без лазерного воздействия. Но на 20 день после лазерного воздействия, наблюдалась снова отрицательная динамика. Результаты тестов показали , что лазер дал лишь временный эффект. Так же был замечен паралич на ранней стадии развития глиомы. В результате животное не могло цепко держаться за балку и падало с нее.

Следующий тест, который проводился в наших исследованиях, это – тест «Извлечение пищевых гранул из камеры» (*Reaching Chamber Pellet*)» Во время этого эксперимента фиксировалось количество попыток достать пищевые гранулы из отверстия в камере за 5 минут (рисунок 8).

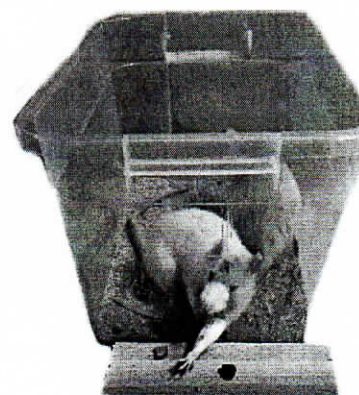
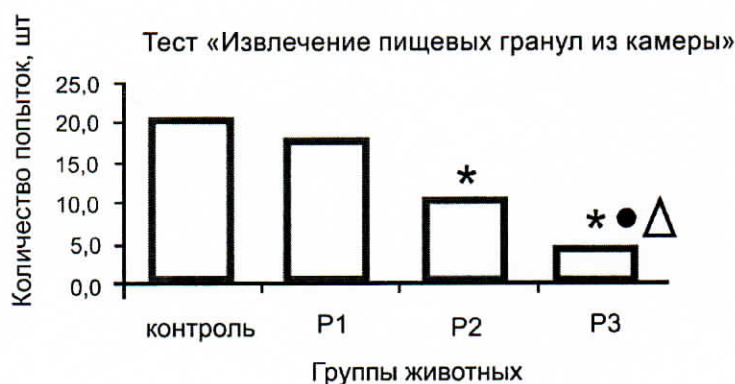


Рисунок 8 – Испытание «Извлечение пищевых гранул из камеры (*Reaching Chamber Pellet*)» Контрольная группа; P1 и P2– животные с глиомой с лазерным воздействием; P3 – животные с глиомой без лазерного воздействия (* - по сравнению с контролем; • - по сравнению с P1; Δ - по сравнению с P2)

Во время эксперимента мы наблюдали нарушения когнитивных и моторных функций у крыс, которые не подвергались лазерному воздействию. Среди этих симптомов отмечались вялость, потеря аппетита, истощение, шерсть взъерошена, наблюдаются очаги облысения, кожа теряет эластичность, появляются струпья,

нарушение актов опорожнения кишечника и мочеиспускания. С лазерной терапией была улучшена координация движений, повышался аппетит. Активно функционировали оба полушария головного мозга так как животное работало двумя лапками, т.е. пыталось достать еду и левой и правой конечностями. Крысы общались между собой, что не наблюдалось в группах, в которых животным не проводилось лазерного воздействия. Через 20 дней после лазерного воздействия, положительная динамика сменялась отрицательной. У крыс наблюдались те же симптомы, что и у группы без лазера: сначала слабели передние лапки, и крыса с трудом удерживала корм. Затем слабость распространялась и на задние конечности.

Заключительным был тест «Отчаяние» (*Despair*), который использовался для изучения уровня тревожности у экспериментальных животных. Фиксировали количество подъемов тела (когда морда животного достигает основания хвоста) и количество кручений тела (рисунок 9).

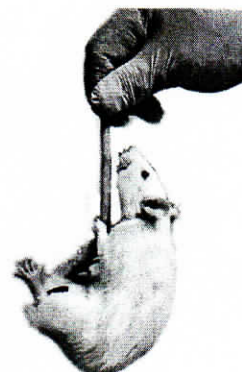


Рисунок 9 - Тест Отчаяние (*Despair*). Контрольная группа; P1 и P2 – животные с глиомой с лазерным воздействием; P3 – животные с глиомой без лазерного воздействия (* - по сравнению контролем; • - по сравнению с P1; Δ - по сравнению с P2)

У крыс без лазерного воздействия были замечены следующие симптомы: слабость, быстрая утомляемость, параличи, нарушение координации движений. Как показали наши исследования, подъемов в правую либо в левую сторону

было больше, что зависело от места поражений мозга глиомой в зависимости от полушария.

Животные, которые подвергались ФДТ оставались подвижными, старались избавиться от хвоста, чтобы освободиться от стрессирующего фактора. Было замечено кручение вокруг своей оси, в результате которого животное пыталось освободиться. Так же было замечено обильное мочеиспускание. Подъёмы туловища в обе стороны поочередно, говорят о том, что мозг работает нормально (слажено работают оба полушария). На 20 день снова отмечалась отрицательная динамика, что свидетельствует и рецидиве заболевания.

Выводы

1. Клетки злокачественной глиомы С6 приживались в период с 3 по 10 день после вживления глиомы. Активный рост опухоли наблюдался в течение 30 дней. В первую неделю после введения, злокачественное новообразование развивалось на поверхности мозга. После 20 дня опухолевые клетки начинали активно прорастать внутрь тканей мозга, изменяя их структуру.

2. У животных с глиомой по сравнению с контрольной группой было выявлено нарушение равновесия (количество падений увеличивалось в 12 раз), невозможность сохранения вертикального положения тела уменьшилась по сравнению с контролем в 5 раз. Наблюдалось неадекватное поведение - животное шло по балке к свету, что не характерно для здорового состояния (движение на раздражающий фактор), нарушение когнитивных функций (сократилось количество попыток достать пищу в 6 раз). Желание освободиться при проведении теста «Отчаяние» сократилось в 5 раз

3. После проведения фотодинамической терапии наблюдалось временное улучшение общего состояния животных по сравнению с животными с глиомой без лазерного воздействия: улучшилась координация движений (количество падений сократилось в 4 раза появлялась чувствительность к внешним раздражителям (не наблюдалось движение к раздражающему фактору), восстанавливались когнитивные функции и моторика конечностей (количество попыток достать пищу увеличивалось в 3 раза), нормализовался аппетит, восстанавливалась общая чувствительность. Желание освободиться при проведении теста «Отчаяние» увеличилось в 6 раз
Через 20 дней наблюдался рецидив заболевания.

