

Rozsvit'me mozek

N.Hrobařová, První soukromé jazykové gymnázium, Hradec Králové, hrobarova.nela@psjg-hk.cz

B.Pobijaková, Masarykovo gymnázium, Příbor,

K. Vítečková, Gymnázium Nad Kavalírkou, Praha 5,

Abstrakt:

Práce se zabývá zkoumáním cév na uspaném laboratorním zvířeti za použití fluorescenční mikroskopie. Cílem bylo rozlišit podle několika mikroskopických metod a matematických parametrů cévy v mozku na žíly, tepny a kapiláry. Dále se v práci zmiňujeme o souvislosti této problematiky s epilepsií.

1 Úvod

Cílem naší práce bylo navržení metodiky pro rozdělení cév v mozku na žíly, tepny a kapiláry. Účelem bylo stanovení normy u zdravého zvířete pro budoucí porovnání se zvířetem postiženým epilepsií, která může být vyvolána např. mozkovou mrtvicí.

Epilepsie

Epilepsie jsou opakované záchvaty přechodné mozkové dysfunkce podmíněné výboji mozkových neuronů, což způsobuje depolarizaci více neuronů. Při záchvatech dochází ke ztrátě vnímání okolí, které se může projevit konvulzivně nebo nekonvulzivně. Nekonvulzivní záchvat se zpravidla vyznačuje ustrnutím na místě bez motorických projevů, po dobu přibližně jedné minuty. Tento průběh podle dosavadních poznatků může vést k rozvinutí záchvatů konvulzivních, které postihují i mozkovou kůru, což má za následek křeče, zmatenost, EEG změny... (1)

Fluorescence

Fluorescence je fyzikální jev, při kterém molekuly některých látek absorbují světelné záření určité vlnové délky (excitace) a část energie, kterou tímto způsobem získá ve velmi krátkém čase, opět vyzáří (emise) v podobě světla o delší vlnové délce, tj. s nižší energií a jinou barvou. (2)

Fluorescein je syntetická organická látka obvykle ve formě tmavooranžového až červeného prášku. Běžně se používá ve fluorescenční mikroskopii, v barvivových laserech jako aktivní médium, k detekci krve v soudnictví a sérologii, a jako stopovač pro odhalování toků kapalin. Fluorescein absorbuje modré světlo a emituje světlo zelené. (3)

2 Postup

Práci jsme prováděly na myši anesteziované isofluranem, které byla předem ztenčena lebka na nejnížší vrstvu (spodní kompakty), aby se zprůhlednila vaskulatura. Dále měla zavedený port do vene jugularis. Pod mikroskop jsme myš upevnily pomocí speciálního duralového zařízení, abychom zamezily vzniku pohybových artefaktů (tep, dech uspané myši).

V prvním pokusu jsme použily metodu BOLD (blood oxygen level dependence), která spočívá v nasvícení cév střídavě červeným, zeleným a modrým světlem. Různé vlnové délky

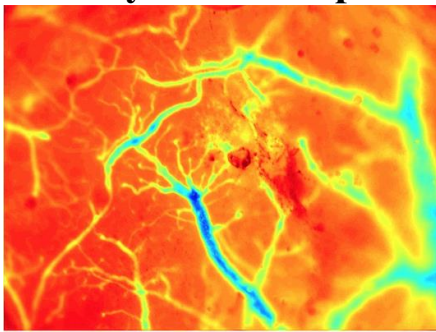
se v krvi absorbují různým způsobem a ze vzájemného poměru těchto absorbancí lze následně určit saturaci hemoglobinu kyslíkem. Tak lze například pozorovat aktivitu tkání, která se při epilepsii výrazně zvyšuje oproti normálu.

V druhém pokusu jsme využívaly metod fluorescenční mikroskopie. Myši jsme injektovaly bolus (jednorázová dávka látky) sodium fluoresceinu 100 μ ml/30 g její hmotnosti. Poté jsme sledovaly průtok látky mozkovými cévami. Přes ztenčenou lebku jsme svítily modrým světlem a následně jsme zachytávaly fluorescenci v zeleném světelném spektru. Zároveň jsme pořizovaly snímky s frekvencí 5 Hz po dobu 380 sekund.

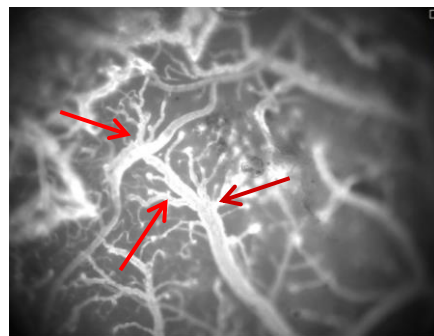
Získané hodnoty jsme zanesly do grafů a na počítači jsme provedly segmentace získaných snímků.

3 Výsledky

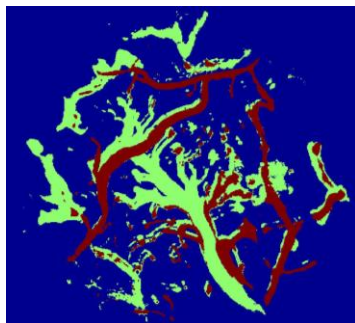
Snímky získané v průběhu pokusu



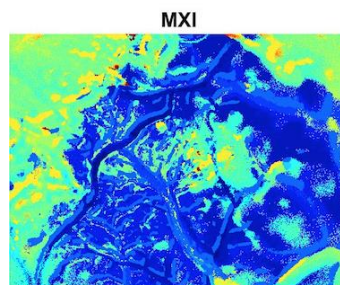
Obr. č. 1: BOLD signál vyjadřující míru saturace hemoglobinu kyslíkem



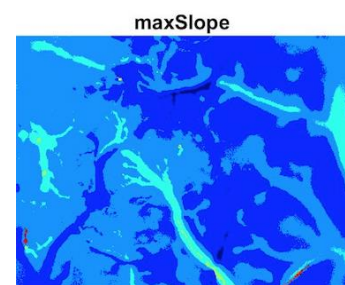
Obr. č. 2: Průchod fluorescenční látky cévami, šipky ukazují místa vybraná pro sestavení grafů



Obr. č. 4: Segmentace cév (nástroj interpretace obrazu pomocí čísel – rozdělení na žílu, tepnu a kapiláry)



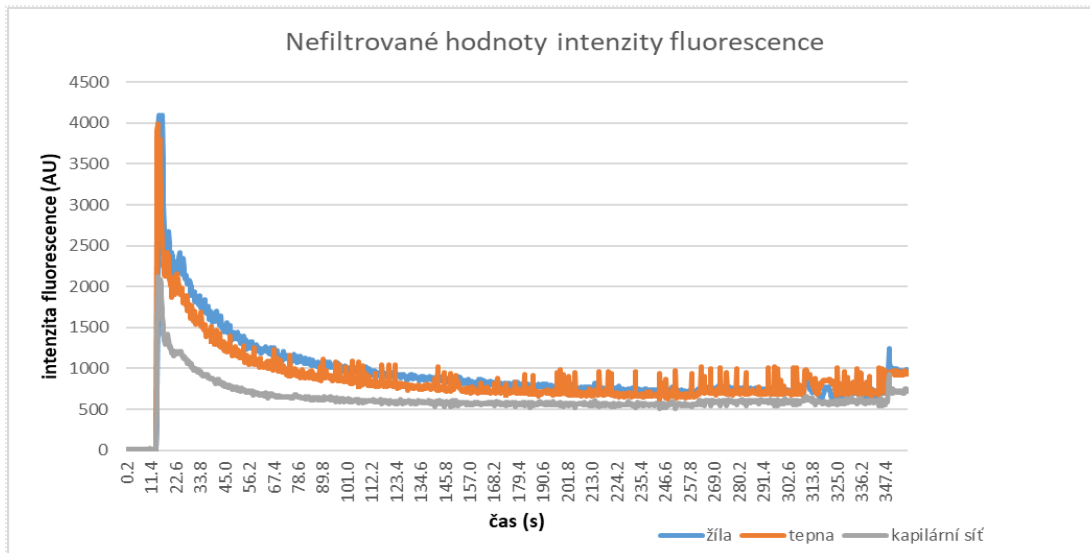
Obr. č. 5: Doba, kdy nastala max. intenzita



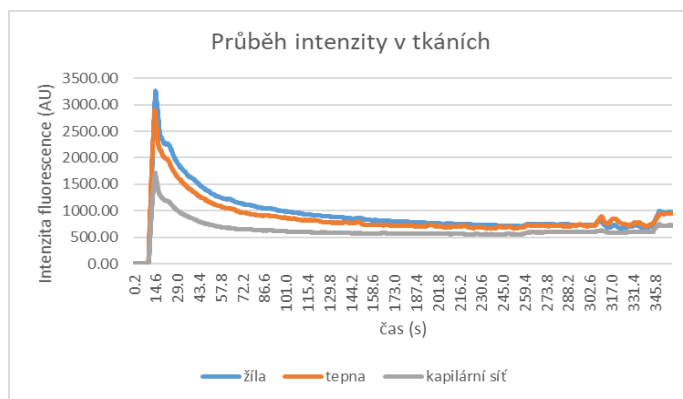
Obr. č. 6: Doba, kdy nastala max. diference

Grafy

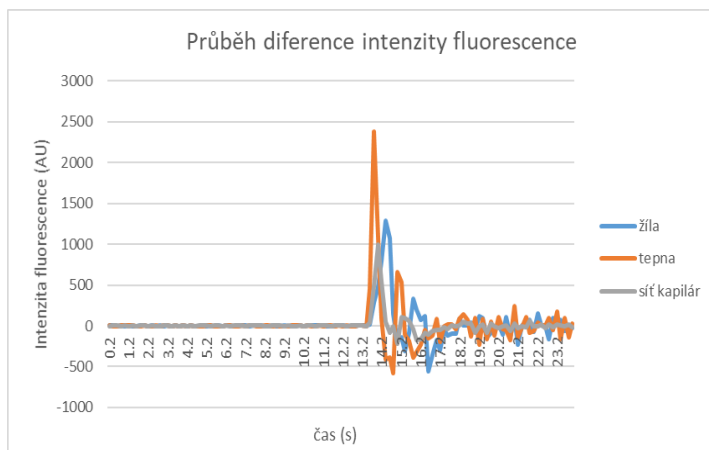
Graf 1 zobrazuje hrubé výsledky před úpravou do podoby grafu 2. Díky této úpravě jsme mohly lépe pozorovat intenzitu fluorescence v jednotlivých cévách. Graf 3 poté ukazuje nejmarkantnější diferenci intenzity fluorescence žíly a tepny.



Graf 1: Naměřené hodnoty intenzit fluorescence v čase pro tři regiony



Graf 2: Průběh intenzity (viz graf 1) filtrovaný plovoucím průměrem (20 vzorků)



Graf 3: Změna intenzity (diference) fluorescence ve třech regionech.

4 Diskuze

Na snímcích získaných metodou BOLD je vidět různá reakce tkáně na nasvícení světly o různých vlnových délkách. V barevném provedení nasvícení modrým světlem snímek ukazuje saturaci hemoglobinu kyslíkem. Je zde snadné rozpoznat okysličené arterie (červená barva) a

odkysličené žíly (modrozelená barva). Zobrazení je však zkresleno viditelností dalších vrstev tkáně, což je zapříčiněno samotným principem fungování mikroskopu.

Na základě dat získaných z grafu jsme jasně rozlišily mozkové cévy, a to podle času náběhu sodium fluoresceinu do zkoumaných oblastí. K rozlišení cév nám pomohly také jednotlivé segmentace (viz obr. 4). Pro účely pozorování změn vlastností tkáně u mrtvicí postižených zvířat byl tento způsob zkoumání však málo přesný z důvodu nízké frekvence snímání.

Tab. 1: Posouzení relevantnosti parametru

Matematický parametr	Relevantnost
MXI (doba, kdy nastalo maximum intenzity)	✘
maxSlope (čas, kdy je diference maximální)	Adekvátní
maxSlopeVal (hodnota maximální diference)	Adekvátní

5 Shrnutí

Hlavní myšlenkou této práce bylo zjistit, zda lze pomocí fluorescenční metody odlišit jednotlivé cévy v mozku. Cévy se nám podařilo rozlišit, nicméně pro hlubší výzkum změn vlastností mozkové tkáně vlivem mrtvice, nebo epilepsie by bylo vhodnější použít vyšší snímací frekvenci mikroskopu a tak zvýšit rozlišovací schopnost použité metody.

Poděkování

Za odborné vedení práce bychom chtěly poděkovat Fyziologickému ústavu AV ČR, jmenovitě doc. MUDr. Jakubovi Otáhalovi, Ph.D., Ing. Davidu Kalovi, Mgr. Janu Svobodovi a Ing. Janu Kudláčkovi.

Reference:

1. Epilepsie. Wikiskripta [online]. MEFANET, 2018 [cit. 2018-06-19]. Dostupné z: <https://www.wikiskripta.eu/w/Epilepsie>
2. Fluorescenční mikroskopie. Katedra experimentální biologie rostlin [online]. 2018 [cit. 2018-06-19]. Dostupné z: <http://kfrserver.natur.cuni.cz/studium/prednasky/mikro/mscope/fluor/fluor.htm>
3. Fluorescein. Wikipedie [online]. 2017 [cit. 2018-06-19]. Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Fluorescein>