

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

Кафедра физиологии человека и животных

**ЛАЗЕРНАЯ СТИМУЛЯЦИЯ МЕНИНГЕАЛЬНОГО ЛИМФОТОКА**

**АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ**

Студентки 4 курса 421 группы  
Направления подготовки бакалавриата 06.03.01 Биология  
Биологического факультета  
Климовой Марии Максимовны

Научный руководитель:

д.б.н., доцент



О.В. Семячкина-Глушковская

Зав. кафедрой:

д.б.н., доцент



О.В. Семячкина-Глушковская

Саратов 2019

## ВВЕДЕНИЕ

Менингеальная лимфатическая система – довольно молодое открытие. Начало изучения было положено еще в 18 в., когда Паоло Маскагни описал прозрачные сосуды на поверхности головного мозга. Однако, долгое время ученые не могли подтвердить факт существования менингеальной лимфатики. Но с развитием оптических технологий появились методы для визуализации прозрачных и тонких структур на поверхности головного мозга. Так, в 2015 г. в свет вышли две фундаментальные статьи Louveau et al [1] и Aspelund et al [2], в которых авторы описывают архитектуру, строение и свойства менингеальных лимфатических сосудов, что послужило основой для дальнейших исследований в этой области.

Менингеальная лимфатическая система в головном мозге выполняет ту же функцию, что периферическая во всем теле – очистка тканей от вредных веществ, токсинов, метаболитов и патогенов и поддержание тканевого гомеостаза. Но это не единственная защита головного мозга от неблагоприятных факторов. Первой линией обороны является гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) – высоко избирательная структура в церебральных кровеносных сосудах, препятствующая попаданию вредных веществ и частиц в мозг. ГЭБ и менингеальная лимфатическая система связаны между собой: открытие ГЭБ сопровождается стимуляцией лимфатической системы (ЛС), что способствует выведению токсинов, вирусов и т.д. в шейную лимфатику, где они нейтрализуются благодаря иммунной функции периферической ЛС. Четкое взаимодействие этих процессов обеспечивает защиту головного мозга. Но нарушения могут случаться и в этой, казалось бы, надежной структуре, вследствие чего могут произойти серьезные патологические процессы, приводящие к таким заболеваниям как болезнь Альцгеймера, рассеянный склероз, инсульт, болезнь Паркинсона, эпилепсия. Именно поэтому исследование функций менингеальной лимфатической системы, ее связи с ГЭБ, механизмов выведения метаболитов из мозга сейчас набирает обороты. Ученые делают ставки на то, что менингеальная

лимфатическая система – ключ к разгадке многих процессов в головном мозге, в том числе патологических, поэтому понимание ее механизмов и функций даст нам преимущество в борьбе с фатальными заболеваниями мозга и центральной нервной системы.

Но не стоит забывать, что головной мозг – сложнейшая и очень хрупкая структура. Любое вмешательство требует большой осторожности и должно сводиться к минимуму. Поэтому в исследованиях и лечении мозга важным критерием методов является инвазивность. В век современных технологий, когда распространены различные виды сканирования систем органов и даже целого организма, лапароскопическая хирургия, лазерная нейрохирургия, разрабатываются наиболее безопасные методы диагностики и лечения с минимальным вмешательством в организм. В то же время идет бурное развитие оптических и лазерных технологий, что позволило создать новое направление исследований, как синтез оптической физики и клинической медицины – биофотонику. Отсюда берет начало оптическая когерентная томография, исследование лазерного воздействия на живую ткань и физиологические процессы. Метод фотобиомодуляции был открыт 50 лет назад и за последнее десятилетие стал широко применяемым методом изучения нейрофизиологических заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера, депрессивное расстройство, болезнь Паркинсона, инсульт и мозговые травмы.

Исходя из представленных рассуждений, целью дипломной работы является изучение воздействия фотобиостимуляции в отношении активации дренажной функции мозга и менингеальной лимфатической системы.

Для этого были поставлены следующие задачи:

- 1) Изучить стимулирующие эффекты лазерного излучения длиной волны 1268 нм в отношении очищения тканей мозга от золотых наночастиц по менингеальной лимфатической системе мозга;
- 2) Изучить фотомодулирующие эффекты в отношении выведения токсичного  $\beta$ -амилоида из тканей головного мозга у мышей с болезнью Альцгеймера и роль менингеальной лимфатической системы в мозге;

3) Изучить эффекты лазерного лечения на неврологический статус мышей с болезнью Альцгеймера.

## **Материалы**

Эксперименты проводили на взрослых белых беспородных самцах мышей весом 25-30 грамм.

Все процедуры были выполнены в соответствии с «Руководством по уходу использованию лабораторных животных». Мышей содержали в стандартных условиях вивария Саратовского Государственного Университета: температура -  $25 \pm 2$  ° С, влажность - 55% и 12/12 часовом цикле свет/темнота [21].

## **Структура работы**

Диплом изложен на 45 страницах и содержит такие структурные элементы: Содержание, Обозначения и сокращения, Введение, Основная часть, Заключение, Выводы и Список использованных источников. В свою очередь основная часть содержит такие главы:

1. Обзор литературы, который в себя включает: строение и функции периферической и менингеальной лимфатической системы, а также характеристику и патогенез нейродегенеративных заболеваний, включая болезнь Альцгеймера.
2. Материалы и методы исследований, в которых рассматривались материалы исследований, методы исследований соответственно.
3. Результаты исследований, в которых показаны эффекты лазерного воздействия на менингеальную лимфатическую систему. Было установлено, что фотобиомодуляция стимулирует лимфоток, и таким образом способствует ускорению выведения молекул и веществ из головного мозга по менингеальным лимфатическим сосудам. На мышах с болезнью Альцгеймера было продемонстрировано положительный эффект лазерной терапии для выведения бета-амилоида из тканей головного мозга.

## **Научная новизна**

Впервые была показана связь скорости выведения золотых наностержней из мозга при транскраниальном лазерном воздействии с анатомической зоной введения наностержней. Таким образом, скорость выведения наностержней из коры, желудочков и цистерны magna выше, чем из гиппокампа. Данные атомно-абсорбционной спектроскопии доказывают, что не только скорость зависит от места введения наностержней, но и степень их накопления в глубоких шейных лимфатических узлах. Введенные в кору, желудочки и цистерну magna наностержни, накапливаются в глубоких шейных лимфоузлах в большей степени, чем введенные в гиппокамп.

Также с помощью животной модели болезни Альцгеймер было доказано положительное влияние лазерной терапии на ткани мозга. У мышей с болезнью Альцгеймера, получавших лазерное облучение наблюдалось заметное улучшение когнитивных способностей и неврологического статуса по сравнению с нелечеными мышами. Результаты иммуногистохимии и конфокальной микроскопии показали уменьшение количества мелких скоплений бета-амилоида в тканях мозга облучавшихся мышей, что подтверждает эффективность данного лечения. Главное преимущество лазерной терапии в неинвазивности данного метода, что очень важно при диагностике и лечении заболеваний головного мозга и центральной нервной системы.

## **Положения, выносимые на защиту**

- 1) Лазерное воздействие длиной волны 1267 нм в оптимальной дозе (32 Дж/см<sup>2</sup>) стимулирует очищение тканей мозга от золотых наностержней и бета-амилоида по менингеальной лимфатической системе;
- 2) Лазерная стимуляция оказывает наиболее выраженные эффекты на менингеальный клиренс при воздействии на кору больших полушарий, а также на области мозга, содержащие спинномозговую жидкость, что связано с низкими проникающими свойствами лазера через кожу головы и череп;

3) Курс транскраниального лазерного воздействия на мышей с болезнью Альцгеймера оказывает значительные терапевтические эффекты в отношении неврологического статуса, поведения и процессов памяти;

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Лазерная стимуляция выведения наностержней из головного мозга

Мы исследовали эффект лазерной стимуляции на скорость выведения золотых наночастиц из мозга в глубокие шейные лимфатические узлы с помощью оптической когерентной томографии. На рисунке 5 изображен пример полученного с помощью ОКТ изображения лимфатического узла, правый и левый квадрат обозначают изображения ОКТ непосредственно после введения наночастиц и 60 мин после начала записи – более светлые участки показывают области накопления наностержней.

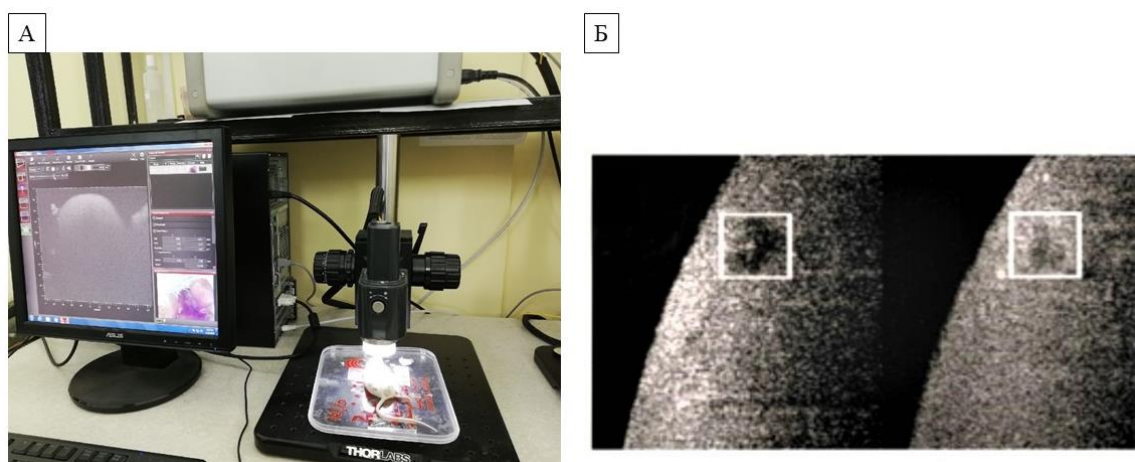


Рисунок 5 – Дизайн эксперимента (А), пример полученного с помощью ОКТ изображения (Б).

Для сравнения скорости выведения наностержней, мы ввели по 7 мкл разведенных в 1,8% физ. р-ре золотых наностержней в кору, желудочки, гипокамп и цистерна магна. Чтобы регистрировать скорость накопления наностержней в глубоком шейном лимфатическом узле, в течение 1 часа производилась запись ОКТ. Результаты исследования показали, что выведение наностержней из коры, правого желудочка и цистерны магна в глубокие

шейные лимфатические узлы происходило гораздо быстрее, чем из гипокампа:  $0.193 \pm 0.013$ ,  $0.159 \pm 0.062$ ,  $0.139 \pm 0.083$  и  $0.035 \pm 0.004$ ,  $p < 0.05$ , соответственно.

Чтобы проверить предположение о том, что лазерное воздействие стимулирует менингеальный лимфоток, таким образом ускоряя выведение метаболитов из головного мозга, мы провели тот же эксперимент с введением наночастиц в разные зоны мозга. Зная значения скорости выведения золотых наночастиц в обычных условиях, можно сравнить их со значениями, полученными при лазерной стимуляции. Результаты оптической когерентной томографии говорят о том, что после воздействия лазером скорость выведения частиц из мозга и их накопление в шейных лимфатических узлах на 3,7 выше по сравнению с данными группы мышей без лазера: из коры –  $0.707 \pm 0.014$  /  $0.193 \pm 0.013$ ,  $p < 0.01$ ; из желудочка – выше на 3,9:  $0.631 \pm 0.017$  /  $0.159 \pm 0.062$ ,  $p < 0.05$ ; из цистерны magna – на 6,7 выше:  $0.933 \pm 0.056$  /  $0.139 \pm 0.083$ ,  $p < 0.001$ ; из гипокампа – на 9,3 выше  $0.325 \pm 0.060$  /  $0.035 \pm 0.004$ ,  $p < 0.001$ ). На рисунке 6 показано, что уровень накопления наностержней в глубоком шейном лимфатическом узле увеличился вследствие лазерной стимуляции. Таким образом, гипотеза о том, что лазерное воздействие стимулирует выведение метаболитов из мозга экспериментально подтвердилась.

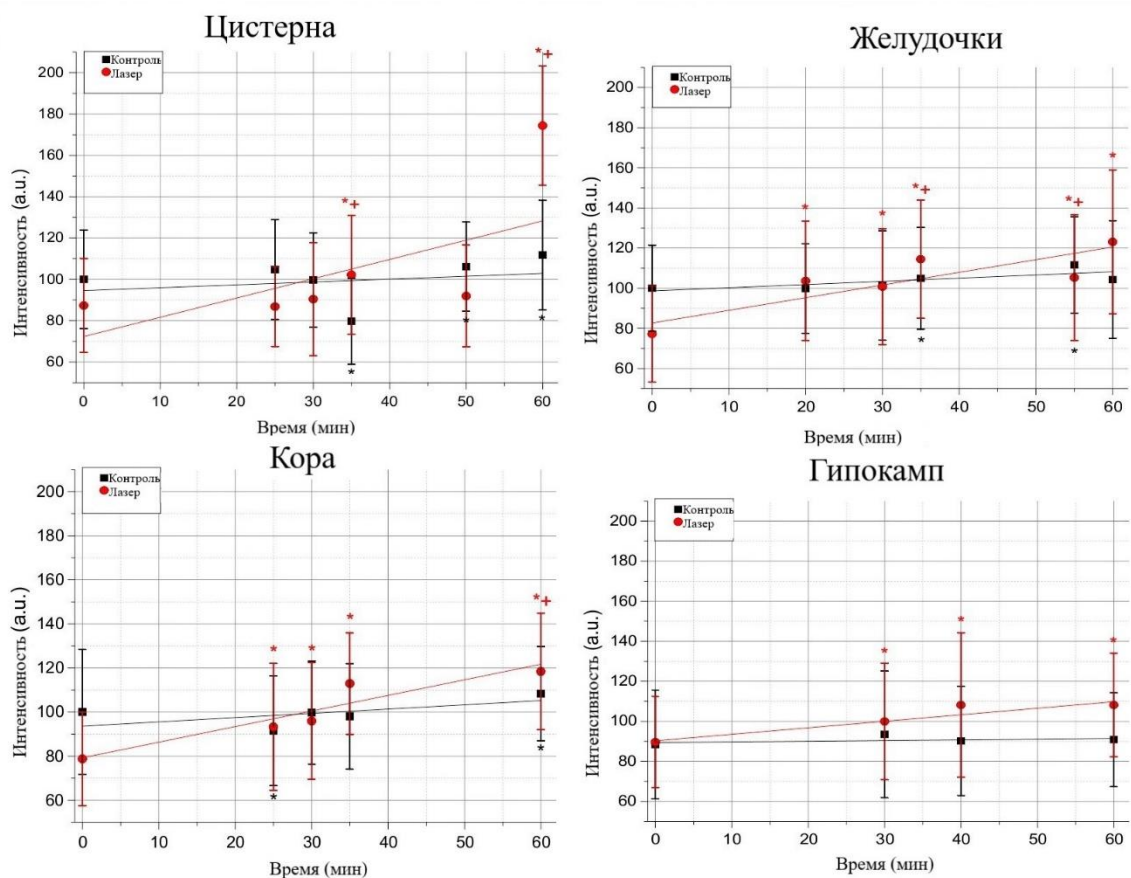


Рисунок 6 – Скорость выведения золотых наностержней из разных зон мозга под лазерным воздействием: \* -  $p < 0.05$  по сравнению с начальным уровнем; † -  $p < 0.05$  между группами.  $n=7$  в каждой группе.

Результаты атомно-абсорбционной спектроскопии коррелируют с данными ОКТ, подтверждая то, что степень выведения наностержней из мозга зависит от анатомической зоны их введения как для контрольной группы мышей без лазерного воздействия, так и для группы с лазером. Так, уровень золотых наностержней в глубоком шейном лимфатическом узле после введения в кору в группе с лазером на 3,7 выше, чем в контрольной группе  $5.8 \pm 1.1 \mu\text{г/г}$  ткани /  $21.5 \pm 1.6 \mu\text{г/г}$  ткани,  $p < 0.001$ ); после введения в правый желудочек – на 4.9 выше ( $4.9 \pm 1.2 \mu\text{г/г}$  ткани /  $22.0 \pm 1.8 \mu\text{г/г}$  ткани,  $p < 0.001$ ); после введения в цистерна магна – на 7.6 выше ( $3.3 \pm 0.7 \mu\text{г/г}$  ткани /  $25.3 \pm 1.9 \mu\text{г/г}$  ткани,  $p < 0.001$ ); после введения в гипокамп – на 16.8 выше ( $2.0 \pm 0.9$  /  $33.7 \pm 2.9$ ,  $p < 0.001$ )

## **Лазерная стимуляция выведения $\beta$ -амилоида из головного мозга**

Исходя из вышеизложенных результатов, можно предположить, что подобно наностержням  $\beta$ -амилоид можно вывести из мозга по менингеальным лимфатическим сосудам в глубокие шейные лимфатические узлы. Таким образом, можно проверить, улучшится ли состояние мышей, страдающих болезнью Альцгеймера, после лазерного воздействия.

Лазером с длиной волны 1267 нм через череп воздействовали на головной мозг трижды по 17 минут в течение часа. Доза лазерного облучения была выбрана случайным образом. Главными критериями были безопасное для тканей мозга воздействие, отсутствие значительного нагрева черепа и статистически значимое снижение уровня белка  $\beta$ -амилоида в мозге. Как видно из таблицы 2, воздействие лазера 1267 нм на мощности 39 Дж/см<sup>2</sup> – обеспечивает эффективное выведение  $\beta$ -амилоида из мозга, однако, отрицательный эффект данного воздействия в том, что он сопровождается повреждением твердой оболочки и арахноидальных мембран и при этом череп животного нагревался на 2°C. Дозы лазерного излучения 18 Дж/см<sup>2</sup> и 25 Дж/см<sup>2</sup> – неэффективны для выведения  $\beta$ -амилоида. Поэтому оптимальной дозой была выбрана 32 Дж/см<sup>2</sup>, так как она не вызывает повреждений тканей мозга и повышения температуры черепа и в то же время эффективна в борьбе с образованиями  $\beta$ -амилоида в мозге.

Таблица 2 – эффекты воздействия различных доз лазерного излучения на температуру на поверхности черепа, морфологические изменения тканей головного мозга, выведение  $\beta$ -амилоида из мозга

| Доза<br>излучения лазера<br>1267 на<br>поверхности мозга,<br>Дж/см <sup>2</sup> | Температу<br>ра на<br>поверхности<br>черепа | Морфологические<br>изменения/повреждения<br>оболочек головного<br>мозга | Выведение<br>$\beta$ -амилоида из<br>тканей мозга |
|---------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| 18                                                                              | -                                           | -                                                                       | -                                                 |
| 25                                                                              | -                                           | -                                                                       | -                                                 |
| 32                                                                              | -                                           | -                                                                       | +                                                 |
| 39                                                                              | +                                           | +                                                                       | +                                                 |

Примечания - + - позитивный эффект; - - отрицательный эффект; число подопытных мышей в каждой группе n=7.

Чтобы изучить развитие болезни Альцгеймер в результате введения  $\beta$ -амилоида в гипокамп, мы проанализировали ткани мозга с целью обнаружить места скопления белка.

Иммуногистохимия и конфокальная микроскопия мозговых тканей мышей, страдающих болезнью Альцгеймера, вследствие инъекции  $\beta$ -амилоида, показали амилоидные бляшки в разных зонах мозга (преимущественно в коре и гипокампе). С помощью конфокальной микроскопии удалось даже зафиксировать большие и маленькие амилоидные бляшки в тканях одной мыши (Рисунок 7 А-В). Важно, что лазерное излучение воздействовало преимущественно на мелкие скопления  $\beta$ -амилоида, в то время как крупные бляшки в группах животных с лазером и без лазера не отличаются (Рисунок 7). В тканях мозга мышей контрольной группы и ложнооперированных не наблюдалось скоплений  $\beta$ -амилоида.

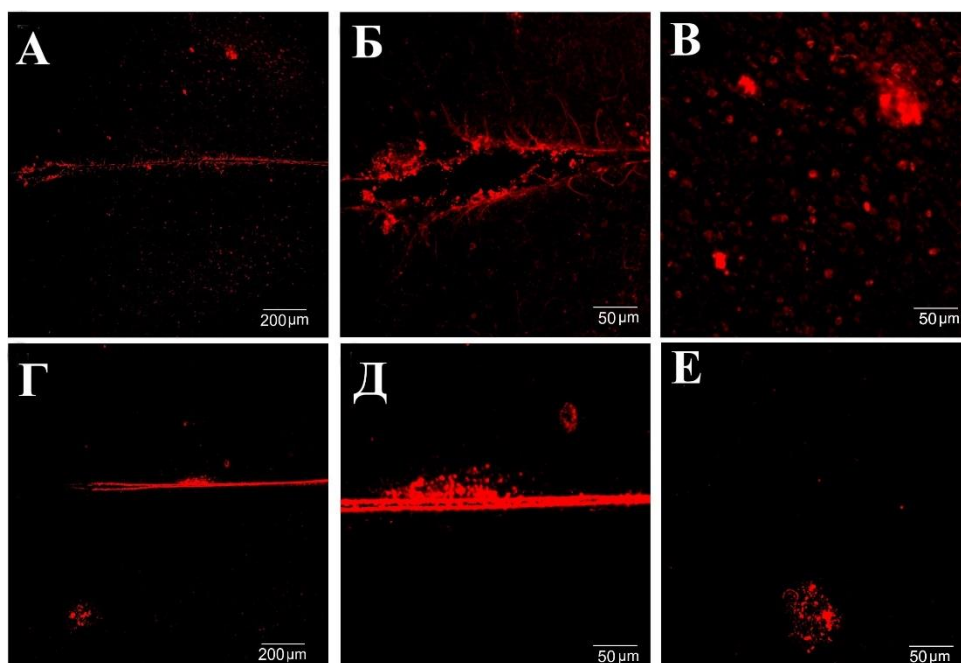


Рисунок 7 – Конфокальная микроскопия срезов головного мозга мышей с болезнью Альцгеймера

Иммуногистохимический анализ продемонстрировал положительный эффект лазерного воздействия на скопления  $\beta$ -амилоида, которые значительно уменьшились по сравнению с группой мышей без лазерного воздействия (Рисунок 8 А, Б).

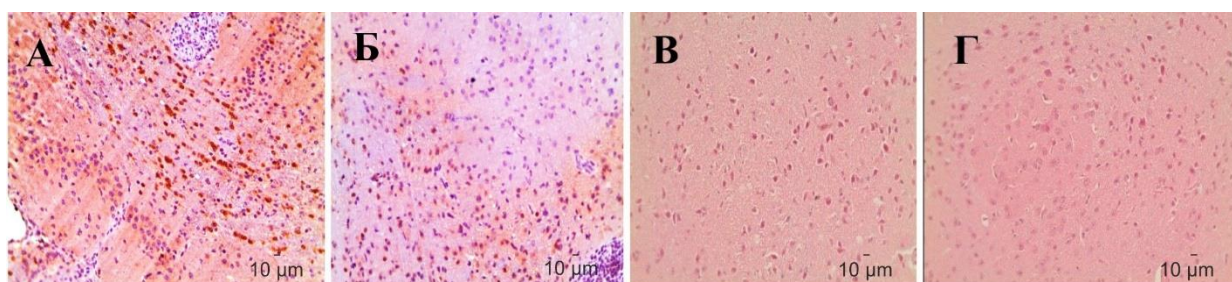


Рисунок 8 – Иммуногистохимия тканей головного мозга мышей с болезнью Альцгеймера

Накопление  $\beta$ -амилоида в глубоких шейных лимфатических узлах мышей, подвергавшихся облучению, значительно больше, чем у мышей с болезнью Альцгеймера, не получавших лазерное облучение (Рисунок 9 А, Б). А в контрольной группе и группе ложнооперированных мышей накопления  $\beta$ -

амилоида в глубоких шейных лимфатических узлах не наблюдалось (Рисунок 9 В, Г).

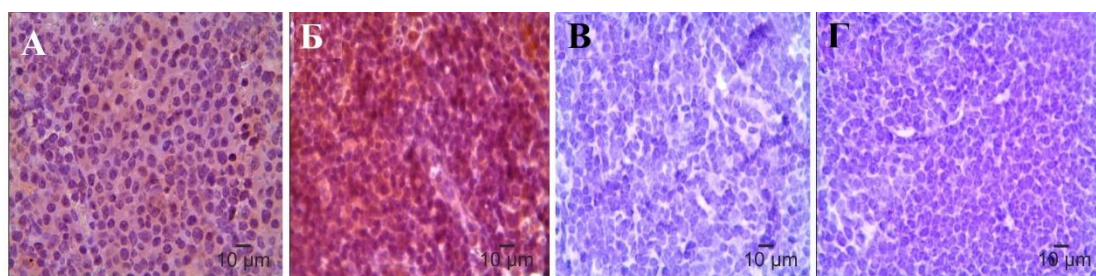


Рисунок 9 – Иммуногистохимия глубоких шейных лимфатических узлов мыши с болезнью Альцгеймера, не подвергавшейся лазерному воздействию (А), мыши с БА после лазерного воздействия (Б), ложнооперированной мыши (В), интактной мыши из контрольной группы (Г).

В каждой группе мышей  $n=7$ , как минимум 10 индивидуальных образцов тканей было получено с каждого животного,  $^{\dagger}$  -  $p<0.001$  между группами.

### **Эффекты лазерного лечения на неврологический статус мышей с болезнью Альцгеймера**

Как уже сказано ранее, в основе болезни Альцгеймер – отложения  $\beta$ -амилоида в церебральных сосудах, приводящие к ухудшению кровообращения и метаболических процессов в головном мозге. Вследствие этого ухудшаются когнитивные способности, в частности память. Поэтому для инъекции мы выбрали именно гиппокамп, так как эта структура мозга ответственна за когнитивные функции.

Для того, чтобы понимать пределы нормы у мышей сначала тесты провели на интактных животных ( $n=7$ ). Затем, взяв эти значения за эталонные, сравнивали состояние мышей с  $\beta$ -амилоидом, ложнооперированных и мышей с амилоидом, подвергавшихся лазерному облучению.

Шкала неврологического статуса зафиксировала значительные неврологические отклонения у мышей с  $\beta$ -амилоидом по сравнению с интактными и ложнооперированными животными:  $3.67 \pm 0.58$  /  $1.00 \pm 1.26$ ;  $1.08 \pm 0.87$ ,  $p<0.05$ , соответственно. О наличии у мышей с  $\beta$ -амилоидом БА

свидетельствуют сенсорные, двигательные, координационные нарушения, фиксируемые с помощью таких критериев как: моно- / гемипарезы, рефлекс приноживания, балансировка на круглом стержне, проход по перекладине (6 см / 4 см / 2 см), число парезов. Мыши с БА, подверженные лазерному воздействию проходили ту же серию тестов, продемонстрировав улучшение результатов. Это позволяет предположить, что лазерная стимуляция способствует улучшению неврологического статуса и когнитивных способностей при БА.

Тест с распознаванием нового объекта показал нарушения памяти у мышей с амилоидом по сравнению с интактными и ложнооперированными мышами. Время приноживания к новому и уже знакомому объектам у этих мышей примерно одинаковое, что свидетельствует о проблемах с памятью у этих животных. Мыши, подвергавшиеся лазерному воздействию, в этом тесте также демонстрируют лучшие результаты по сравнению с контрольной группой – они проводили больше времени, приноживаясь к новому объекту, чем к уже знакомому. (Рисунок 10 Б)

Таким образом, тесты подтверждают наличие болезни Альцгеймера у мышей с амилоидом и доказывают улучшение когнитивных способностей после лазерного воздействия на больных мышей.

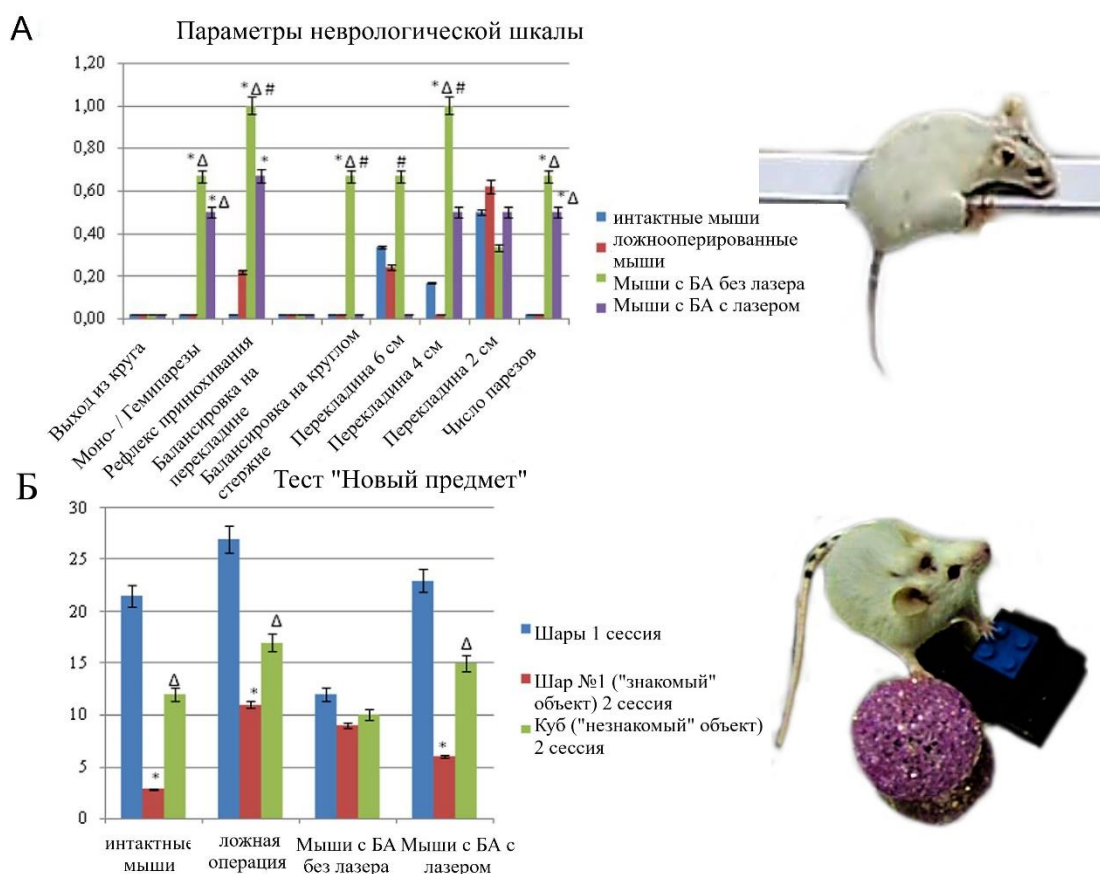


Рисунок 10 – Неврологические тесты: А – оценка неврологического статуса мышей по неврологической шкале: \* -  $p < 0.05$  интактные мыши;  $\Delta$  -  $p < 0.05$  ложнооперированные мыши; # - между мышами с болезнью Альцгеймера без лазера и с лазерной стимуляцией; Б – тест на распознавание нового объекта, отражающий процессы обучения, узнавания и запоминания : \* -  $p < 0.05$  шары в первой сессии;  $\Delta$  -  $p < 0.05$  шар №1 («знакомый» объект) и куб во второй сессии (новый предмет));  $n=7$  в каждой группе.

Анализ неврологического статуса и когнитивных способностей мышей подтвердили данные *ex vivo* и показали развитие нарушений памяти и когнитивных способностей у мышей после интрагипокампальной инъекции  $\beta$ -амилоида и улучшение памяти и способности к обучению у мышей с болезнью Альцгеймера на фоне лазерной терапии. Таким образом, предположение о том, что лазерная стимуляция менингеального лимфотока способствует выведению  $\beta$ -амилоида из мозга в глубокие шейные лимфатические узлы, восстанавливая при этом когнитивные функции, подтвердилось. Эти данные позволяют судить

о лазерной фотобиомодуляции как о новом неинвазивном методе борьбы с нейродегенеративными нарушениями, такими как болезнь Альцгеймера, рассеянный склероз, эпилепсия, инсульт, что может стать новой ступенью в развитии клинической медицины.

## **ВЫВОДЫ**

- 1) Лазерное воздействия длиной волны 1267 нм в оптимальной дозе (32 Дж/см<sup>2</sup>) стимулирует очищение тканей мозга от золотых наностержней и бета-амилоида по менингеальной лимфатической системе;
- 2) Лазерная стимуляция оказывает наиболее выраженные эффекты на менингеальный клиренс при воздействии на кору больших полушарий, а также на области мозга, содержащие спинномозговую жидкость, что связано с низкими проникающими свойствами лазера через кожу головы и череп;
- 3) Курс транскраниального лазерного воздействия на мышей с болезнью Альцгеймера оказывает значительные терапевтические эффекты в отношении неврологического статуса, поведения и процессов памяти;
- 4) Полученные результаты свидетельствуют о лимфодренажных эффектах транскраниального лазерного воздействия, что сопровождается активацией процессов очищения мозга от токсичных соединений и может быть использовано для развития новых нефармакологических технологий лечения болезней центральной нервной системы (ЦНС), включая инсульты, травмы головного мозга, нейродегенеративные заболевания и опухоли ЦНС.

### СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Louveau, A. Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels / I. Smirnov, T. Keyes, J. Eccles, S. Rouhani, J. Peske, N. Derecki, D. Castle, J. Mandell, K. Lee, et al // Nature 2015, № 523, P. 337–341.
2. Aspelund, A. A dural lymphatic vascular system that drains brain interstitial fluid and macromolecules / S. Antila, S. Proulx, T. Karlsen, S. Karaman, M. Detmar, H. Wiig, K. Alitalo // J. Exp. Med. 2015, № 212, P. 991–999.
3. Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, Institute for Laboratory Animal Research, Division on Earth and Life Studies, National Research Council of the laboratory animals. 8th ed. Washington: The National Academies Press 2011. URL:<http://oacu.od.nih.gov/regs/guide/guide.pdf> (accessed: 28 February 2013).

