

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

Кафедра физиологии человека и животных

ОПТИЧЕСКАЯ ВИЗУАЛИЗАЦИЯ
ЛИМФАТИЧЕСКИХ СОСУДОВ МОЗГА

АВТОРЕФЕРАТ

Студентки 4 курса 421 группы
Направления 06.03.01 Биология
Биологического факультета
Ларькиной Валерии Викторовны

Научный руководитель

к. б. н., доцент

 Т. Д. Искра

Зав. кафедрой

д.б.н., доцент

 О.В. Семячкина-Глушковская

Саратов 2019

ВВЕДЕНИЕ

Более двух тысячелетий в нейрофизиологии считалось, что лимфатические сосуды в мозге отсутствуют. Несмотря на опыты итальянского анатома Паоло Маскагни, который еще в XVIII в. представил макеты сплетения прозрачных сосудов в оболочках мозга и назвал их лимфатическими, вплоть до недавнего времени господствовало представление об «иммунной стерильности» мозга. Благодаря развитию в области оптических технологий, в настоящее время стало возможным повторить опыты Маскагни с применением современных методов визуализации [1].

В 2015 г. были опубликованы результаты двух независимых научных групп, доказавших существование лимфатических сосудов в оболочках мозга. В связи с этим появились новые пути изучения неизвестных процессов, происходящих в головном мозге, а также, установить связь центральной и периферической лимфатических систем. Существует гипотеза о том, что менингеальная лимфатика вовлечена в механизмы, ответственные за очищение мозга от метаболитов. Однако механизмы работы лимфатической системы подвергаются сомнению в силу отсутствия эффективных маркеров, позволяющих визуализировать лимфатические сосуды и доказать возможности движения жидкости через глию и, в частности, через астроциты, как утверждают создатели теории о лимфатической системы головного мозга [2].

Возможность визуализации менингеальной лимфатики *in vivo* открывает горизонты в появлении принципиально новых фундаментальных знаний о процессах очищения мозга от метаболитов и соединений. Для понимания этих процессов нами впервые были разработаны специальные подходы для визуализации прозрачных лимфатических сосудов в оболочках мозга с применением флуоресцентной микроскопии, оптической когерентной томографии и маркеров [2].

Целью нашего исследования стало изучение методов оптической визуализации лимфатических сосудов головного мозга *in vivo*.

Для решения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Проанализировать эффективность применения Evans Blue для визуализации лимфатической системы головного мозга с помощью флуоресцентной микроскопии.

2. Оценить перспективы применения специфического антитела Live – 1 и маркер FITC-декстрана 70 кДа для визуализации менингеальных лимфатических сосудов.

3. Изучить особенности визуализации менингеальных лимфатических сосудов с помощью оптической когерентной томографии и золотых наночастиц.

1 Основная часть

До 2015 года считалось, что ткани мозга лишены лимфатических сосудов и потому, до сих пор, остается не ясным, как мозг очищается от метаболитов и регулирует водный баланс. Несмотря на тот факт, что еще в 18 веке итальянский анатом Паоло Маскагни представил макет лимфатики в менингеальных оболочках мозга, никто в течение двух тысячелетий не смог повторить его опыт, т.к. лимфатические сосуды прозрачны и чрезвычайно тонкие. Это стало возможно только с появлением оптических технологий в XXI веке, что позволило приоткрыть занавесу в загадки лимфатики.

С филогенетической точки зрения считается, что лимфатическая система впервые появилась у позвоночных. Примитивная лимфатическая система с эволюционно сохраняющимися структурными и клеточными особенностями была недавно обнаружена у рыб, что оказалось чрезвычайно ценным в различных генетических исследованиях. У земноводных, рептилий и птиц, нелетающих, лимфатическая система развилась со специализированным лимфатическим сердцем. Основной функцией ее является лимфодренаж и транспорт метаболитов. У летающих птиц и млекопитающих лимфатическая система развивалась, теряя сердце лимфы и вместо этого приобретая лимфатические узлы для иммунных функций.

Гиппократ впервые описал лимфатический сосуд как «белую кровь» и придумал термин «хил» (от греческого хилоса, означающего сок). Хил – это жидкость молочной ткани, состоящая из эмульгированных жиров и свободных жирных кислот, которые все вместе называются лимфой. Она образуется в пищеварительной системе, а затем поглощается специализированными лимфатическими сосудами, известными как лактильные.

В настоящее время строение лимфатической системы достаточно подробно изучено. В нее входят: лимфатические капилляры; лимфатические посткапилляры; лимфатические сосуды; лимфатические узлы; лимфатические стволы и протоки.

Корнями лимфатической системы являются лимфатические капилляры, в которые поступают из тканей продукты обмена веществ, а в патологических условиях инородные частицы и микроорганизмы. По лимфатическим сосудам могут распространяться клетки злокачественной опухоли. Лимфатические капилляры представляют тонкостенные эндотелиальные трубки, соединяющиеся в сети; они имеются везде, кроме головного и спинного мозга, паренхимы селезенки, хрящей, склеры и хрусталика глаза, плаценты. Диаметр лимфатических капилляров в несколько раз превышает диаметр кровеносных капилляров. При слиянии лимфатических капилляров образуются лимфатические сосуды, для которых характерно наличие клапанов, обеспечивающих ток лимфы в одном направлении. В местах расположения клапанов образуются сужения. Лимфатические сосуды образуют в стенках органов широкопетлистые сплетения.

2 Материалы и методы исследования

Работа выполнена на 38 белых беспородных мышах, на базе кафедры физиологии человека и животных Саратовского национально-исследовательского государственного университета имени Н. Г. Чернышевского. В экспериментах использовались самцы мышей массой 20-25 г.

Животные содержались в стандартных лабораторных условиях, с доступом к пище и воде. Все процедуры были выполнены в соответствии с «руководством для ухода и использованию лабораторных животных» [22]. Экспериментальный протокол был одобрен комитетом по уходу и использование лабораторных животных в Саратовском государственном университете (протокол Н-147, 07.02.2018).

Анестезия проводилась с расчетом 100 мкл раствора на 100 г животного (50 мкл золетил + 50 мкл ксиланит). Действующим веществом ксиланита является гидрохлорид ксилазина, снижающий возбудимость альфа-2-адренорецепторов. Вследствие чего ксиланит обладает успокаивающим и обезболивающим свойствами. Также он оказывает расслабляющее действие на мышцы [23]. Золетил – общий анестетик, оказывающий диссоциативное действие с выраженным обезболивающим эффектом. За счет неполного расслабления мышц сохраняются некоторые рефлексy (глоточный, гортанный, кашлевой), дыхательная система не угнетается. Золазепам, подавляя подкорковые участки мозга, оказывает седативное и анксиолитическое действия и вызывает расслабление мышц [24].

Трепанация черепа проводилась с использованием стоматологической дрели (Mikroton, Aesculap) и стереотаксической рамы для фиксации животного.

Флуоресцентную микроскопию осуществляли с использованием флуоресцентного микроскопа (Zeiss Imager.A1, Германия), оснащенного камерой CMOS (acA1920-40uc, Basler AG, Германия) и объектив 10 × 0,3

Оптическая когерентная томография проводилась коммерческой системой ОКТ (Thorlabs Ganymede), дающей продольное и поперечное разрешение 6,2 мкм и 8 мкм. Основная длина волны ОКТ 930 нм.

Эксперимент *in vivo* проходил в три этапа:

1. Изучение эффективности применения Evans Blue для визуализации лимфатических сосудов.

Для этого были сформированы две группы животных по 7 мышей в каждой. Опытным животным вводили Evans Blue. Через 30 минут проводили флуоресцентную микроскопию мозга животным обеих групп. Контрольным животным краситель не вводили.

2. Применение маркера Live-1 для визуализации менингеальной лимфатической систем. Восьми мышам вводили ретроорбитально FITC – декстран, для того чтобы выделить менингеальную кровеносную систему и антитело Live-1 в комплексе с Alexa 488, в *cisterna magna*, откуда он распределялся по лимфатические сосуды головного мозга. Затем проводили флуоресцентную микроскопию мозга под разными фильтрами.

3. Визуализация лимфатической системы помощью ОКТ и золотых наночастиц (n=16). Для данного исследования были сформированы 2 группы по 8 мышей в каждой. Опытным животным вводили золотые наночастицы в паренхиму мозга.

Флуоресцентная микроскопия с применением красителя Evans Blue

Животных контрольной и опытной групп наркотизировали. Готовили операционное поле (удаляли шерсть, обеззараживали и делали надрез). Затем голову фиксировали на стереотаксической раме. Череп высверливали хирургической дрелью в области проекции *cisterna magna*.

Затем опытными животными вводили в *cisterna magna* с помощью Гамильтона в течении 5 минут Evans Blue. Через 30 минут циркуляции красителя проводили флуоресцентную микроскопию у животных обеих групп.

Флуоресцентная микроскопия с применением FITC-декстрана 70 кДа и Live-1

FITC-декстран 70 кДа вводили ретроорбитально (1 мг / 25 г мыши, 0,5% раствор в 0,9%) физиологическим раствором (Sigma-Aldrich) и давали циркулировать в течение 2 минут. Live-1 (ALY7, eBioscience) в объеме 5 мл вводили в cisterna magna. Затем проводили флуоресцентную микроскопию через открытый череп.

ОКТ – визуализация с золотыми наночастицами

1. Наркотизация;
2. Установка животного на стереотаксической установке;
3. Подготовка поверхности головы к трепанации;
4. Выставление координат стереотаксической установки (для введения наночастиц в кору: 1мм вниз от брегмы, 1,5 вправо, 1,5 вглубь, то есть в кору головного мозга);
5. Просверливание отверстия с помощью дрели для трепанации;
6. Разведение золотых наночастиц (40 нм) разводят 1:1 в 1,8 % физ. р-ре.
7. Введение наночастиц (7 мкл) в головной мозг с помощью Гамильтона в течение 5 минут.
8. ОКТ-визуализация
9. Анализ полученных данных

Запись на ОКТ производилась в лаборатории оптики и лазерной физики СГУ.

3 Результаты исследования

Оптическая визуализация менингеальных лимфатических сосудов невозможна без введения контрастных агентов в лимфоток или ткани мозга из-за мелких размеров и прозрачности сосудов и чтобы решить проблему визуализации мы использовали разные маркеры: краситель Evans Blue, антитело Live-1 в присутствии маркера FITC-декстрана для флуоресцентной микроскопии и золотые наночастицы для оптической когерентной томографии.

На первом этапе нашего исследования мы изучали эффективность применения краситель Evans Blue для окрашивания менингеальных лимфатических сосудов.

С этой целью 8 мышам делали инъекцию Evans Blue в *cisterna magna*, которая является субарахноидальным пространством, собирающим спинномозговую жидкость, вырабатываемую четвертым желудочком и частью менингеальной лимфатической системы. С током лимфы Evans Blue распространился по сосудам и через 30 минут окрасил их. Визуализация с помощью флуоресцентной микроскопии позволила нам увидеть менингеальные сосуды у животных опытной группы, так как краситель Evans Blue дает флуоресцентный сигнал в красном спектре. Однако, подобное изображение не дает четкого представления о лимфатической системе. Выявлено, что у мышей контрольной группы ($n=8$) лимфатические сосуды не визуализируются.

Вторым этапом нашего исследования стало изучение эффективности применения для повышения видимости лимфатических сосудов антитело Live-1 и маркер FITC-декстрана для выделения кровеносных сосудов головного мозга. Антитело Live-1 (эндотелиальный рецептор гиалурона 1 эндотелия лимфатических сосудов, ответственный за транспорт различных молекул через эндотелий лимфатических сосудов), для изучения лимфатической системы его используют в связке Levy-1+Alexa488 (синтетический краситель, устойчивый к «выгоранию» и изменению pH, с высоким квантовым выходом флуоресценции и гидрофильностью).

Мы вводили FITC-декстрана ретроорбитально (в вену под нижним веком) и маркер Levy-1 в cisterna magna наркотизированным животным (n= 8) с помощью стереотаксической рамы и шприца Гамильтона. FITC-декстран циркулировал в кровеносных сосудах 30 минут. После этого проводили флуоресцентную микроскопию *in vivo* через трепанированный череп.

Применение маркеров FITC-декстрана и Live-1 позволяет визуализировать лимфатические сосуды и кровеносные головного мозга и дает четкое представление об их взаимном расположении.

Третьим этапом нашего исследования стало изучение эффективности применения золотых наностержней для визуализации менингеальной лимфатической системы с помощью оптической когерентной томографии. Для этого 16 мышей разделили на две группы контрольную (n=8) и опытную (n=8). Животным опытной группы вводили золотые наночастицы в кору головного мозга. Контрольным животным наночастицы не вводили.

Через 10 минут после введения, проводили ОКТ-визуализацию.

Как видно из ОКТ-изображений, у контрольных животных, менингеальные сосуды, практически не визуализируются и представлены едва различимыми полостями. Введение наностержней в кору головного мозга повышает видимость лимфатических сосудов.

Спецификой данного эксперимента, является то, что золотые наностержни выводятся из сосудов в течении 20-30 минут.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучение физиологии лимфатической системы в оболочках мозга чрезвычайно актуально. Это открывает новые горизонты в появлении принципиально новых знаний об иммунных процессах в тканях мозга, механизмах его очищения от токсинов и метаболитов, а также генезе нейродегенеративных, сосудистых и онкологических заболеваний.

В опытах на мышах проведены исследования применением различных маркеров для визуализации лимфатических сосудов мозга с помощью флуоресцентной микроскопии и оптической когерентной томографии. Показано, что введение красителя *Evans Blue* повышает видимость лимфатических сосудов в красном спектре при флуоресцентной микроскопии.

Применение специфического красителя для лимфатической системы Live-1 в присутствии FITC-декстран позволяет визуализировать лимфатические сосуды головного мозга при помощи флуоресцентной микроскопии в зеленом спектре и совмещать с изображением кровеносных сосудов, окрашенных флуоресцирующим декстраном, видимых в красном спектре.

Введение золотых наностержней в кору головного мозга, дает возможность наблюдения менингеальных лимфатических сосудов с помощью оптической когерентной томографии в течении 20-30 минут, и является достаточно перспективным для изучения особенностей сосудов и выявления эффектов лимфатической системы.

Показана перспективность применения флуоресцентной микроскопии и оптической когерентной томографии для прижизненной визуализации лимфатической системы мозга *in vivo*.

Выводы

1. Установлено, что краситель Evans Blue визуализирует лимфатические сосуды головного мозга при флуоресцентной микроскопии. Опыт с применением данного маркера оказался не перспективным, так он является неспецифическим и способен окрашивать наряду с лимфатическими сосудами различные ткани мозга и капилляры кровеносной системы.

2. Применение специфического красителя для лимфатической системы Live-1 в присутствии FITC-декстран позволяет визуализировать лимфатические сосуды головного мозга на фоне кровеносных и дает четкое представление об их взаимном расположении.

3. Визуализация менингеальных лимфатических сосудов с помощью оптической когерентной томографии и золотых наночастиц достаточно перспективна как для изучения особенностей сосудов, так и для выявления эффектов лимфатической системы. Спецификой данного эксперимента, является то, что золотые наностержни выводятся из сосудов в течении 20-30 минут.

