

МИНОБРНАУКИ РОССИИ

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования

**«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»**

Кафедра оптики и биофотоники

**Изучение динамики лимфатической системы с использованием
флуоресцентной микроскопии селективного планарного освещения и
оптической когерентной томографии**

**АВТОРЕФЕРАТ ВЫПУСКНОЙ КВАЛИФИКАЦИОННОЙ РАБОТЫ
БАКАЛАВРА**

студента 4 курса 435 группы

направления 12.03.04 «Биотехнические системы и технологии»

Физического факультета

Дубровского Александра Ильича

Научный руководитель

доцент каф. оптики и биофотоники,

к.ф.-м.н., доцент

И.В. Федосов

Зав. кафедрой

зав. кафедрой, д.ф.-м.н., профессор

В.В. Тучин

Саратов 2020

Введение. Актуальность. В последние годы учёные обратились к исследованию лимфатической системы головного мозга. Как показывают современные исследования, лимфатическая система головного мозга выполняет функцию очищения головного мозга, а также имеет связь с иммунной системой. Многие факторы указывают на связь нейровоспалительных и нейродегенеративных заболеваний, образования опухолей и прочих болезней головного мозга с нарушениями работы лимфатической системы головного мозга, но, несмотря на это, все свойства и функции лимфатической системы головного мозга до сих пор являются мало изученными, поэтому исследование лимфатической системы представляет большой интерес для современной науки и медицины.

Новизна. В выпускной квалификационной работе на основе данных, полученных методом оптической когерентной томографии (ОКТ), и анализа научных статей впервые проведено детальное рассмотрение возможности применения метода флуоресцентной микроскопии селективного планарного освещения для исследования *in vivo* глубокого лимфатического узла лабораторной крысы при изучении динамики лимфатической системы.

В работе впервые использованы экспериментальные данные по изучению очищения мозга лимфатической системой, полученные с помощью ОКТ в ходе проведения исследований междисциплинарной научной группой в рамках инновационного научного проекта.

Цель работы - оценить возможность исследования активности лимфатической системы при очищении головного мозга с использованием метода флуоресцентной микроскопии селективного планарного освещения.

Задачи:

1) экспериментально изучить методом ОКТ активность лимфатической системы лабораторных крыс во время очищения головного мозга при воздействии на проницаемость гематоэнцефалического барьера привитием глиомы;

2) рассмотреть ограничения метода ОКТ при исследовании лимфатической системы;

3) рассмотреть возможности экспериментального исследования динамики лимфатической системы с помощью флуоресцентной микроскопии селективного планарного освещения;

4) сравнить флуоресцентную микроскопию селективного планарного освещения с другими методами исследования лимфатической системы.

Практическая значимость работы заключается в том, что результаты данного исследования могут найти применение в дальнейших исследованиях лимфатической системы и других биологических систем организма методами оптической когерентной томографии и флуоресцентной микроскопии селективного планарного освещения.

Структура работы. Работа состоит из введения, двух глав, заключения и списка использованных источников.

Апробация работы. По тематике данной работы были опубликованы 6 статей в рецензируемых научных журналах (в соавторстве). Результаты исследования по использованию ОКТ для изучения динамики лимфатической системы головного мозга были представлены в докладе «The study of the lymphatic system dynamics by using optical coherence tomography and gold nanorod contrasting of the deep cervical lymph nodes» на 15-й международной научной конференции «Laser Application in Life Sciences», Израиль, 2018.

Основное содержание работы. В первой главе работы рассматриваются физические основы, различные вариации и применение в биомедицинских исследованиях с акцентом на исследование лимфатической системы методов оптической когерентной томографии (ОКТ), флуоресцентной микроскопии селективного планарного освещения (LSFM), многофотонной микроскопии (MPM) и фотоакустической визуализации, а также приводится информация о лимфатической системе головного мозга и важности её изучения.

Оптическая когерентная томография (ОКТ) - метод изучения рассеивающих многослойных объектов, основанный на принципах

низкокогерентной интерферометрии. В системах ОКТ анализ отражённого и рассеянного на изучаемом образце света производится с помощью интерферометра Майкельсона. ОКТ способна выполнять визуализацию внутренней структуры в биологических тканях. Освещение в системе ОКТ делится на два плеча - плечо с образцом, подвергающимся сканированию, и опорное плечо. Наложение световых волн, испытавших отражение в плече с образцом и в опорном плече, приводит к формированию интерференционной картины в случае, если свет прошёл оптические пути, отличающиеся менее чем на длину когерентности в обоих плечах. Интерференционная картина излучения из плеча с образцом и опорного плеча формирует профиль отражательной способности исследуемого объекта по глубине вдоль определённой прямой, называемый А-скан, который содержит информацию о пространственных размерах и положении структурных элементов в исследуемом объекте. Комбинация серии А-сканов, сделанных в разных пространственных координатах объекта, формирует изображение поперечного среза - В-скан. Направленное на исследуемый объект излучение от источника системы ОКТ в основном не отражается от приповерхностных элементов объекта, а рассеивается. Многократное рассеяние значительно снижает глубину детектирования и ухудшает соотношение сигнал-шум. В методе ОКТ для записи длины оптического пути света применяется интерферометрия, что позволяет определить и исключить из расчётов те фотоны, которые испытали многократное рассеяние, прежде чем были зарегистрированы. Это способствует уменьшению фонового шума, который может привести к нечёткости получаемых изображений.

Флуоресцентная микроскопия селективного планарного освещения (LSFM) является методом визуализации, применяемым при проведении биомедицинских исследований. В методе LSFM в слоях изучаемого объекта возбуждается флуоресценция с помощью тонкого светового листа. Детектирование флуоресценции слоя образца ведётся ортогонально плоскости светового листа. Для оптического секционирования образца, то есть получения

набора двумерных изображений его слоёв, производится детектирование флуоресценции в различных слоях образца при его смещения относительно плоскости светового листа. Система освещения воздействует на один слой изучаемого объекта, который находится в фокусе в данный момент времени. Соседние слои исследуемого образца при этом отражают и рассеивают свет с меньшей интенсивностью, и находящиеся вне фокуса в данный момент времени области не приводят к появлению побочного излучения. Необходимым условием для использования метода LSM является наличие флуоресценции, вызванной определённым флуоресцентным белком или другим флуорофором в исследуемой области образца. Применение инъекции флуоресцирующих меток часто используется для визуализации различных структур в биологических объектах. В некоторых случаях используется автофлуоресценция, свойственная определённым биологическим тканям. Различные рабочие установки для применения флуоресцентной микроскопии селективного планарного освещения имеют ряд типичных базовых элементов: система освещения, вызывающая флуоресценцию в слоях исследуемого образца; устройство для закрепления образцов; система детектирования, детектирующая флуоресценцию в слоях образца. Устройство освещения обычно состоит из лазера, устройства расширения светового пучка, цилиндрической линзы и осветительного объектива. Световой лист, сформированный осветительным объективом, освещает образец. Флуоресценция освещаемого слоя исследуемого образца, воспринимаемая детектирующей системой, состоящей из детектирующего объектива и камеры, используется для визуализации.

Многофотонная микроскопия (MPM) позволяет визуализировать биологические ткани с помощью процесса возбуждения флуоресценции в каждой молекуле флуорофора двумя или более фотонами. Многофотонное возбуждение флуоресценции является маловероятным процессом, поэтому для визуализации определённого сегмента исследуемый объект располагается в наиболее интенсивно освещаемой области, то есть в фокальной плоскости

объектива системы МРМ, где происходит оптическое секционирование изучаемого образца.

Фотоакустическая визуализация основана на детектировании ультразвуковых волн, вызванных тепловым расширением тканей исследуемого образца под воздействием возбуждающего излучения. Системы фотоакустической визуализации могут различаться строением фотоакустических зондов. Зонд освещения тёмного поля предполагает освещение для оптического возбуждения фотоакустических сигналов вдоль внешней границы ультразвукового анализатора. Оптическое возбуждение не возникает напрямую под ультразвуковым сканером. Другим вариантом фотоакустического зонда является зонд освещения светлого поля. Система освещения устроена таким образом, что излучение от источника направляется на поверхность образца прямо под ультразвуковым анализатором.

Лимфатическая система головного мозга имеет большое значение для здорового функционирования центральной нервной системы многих млекопитающих, в том числе и человека. Многие характеристики и функции лимфатической системы головного мозга до сих пор являются малоизученными. Лимфатическая система головного мозга выполняет функцию очищения центральной нервной системы. Лимфатическая система головного мозга поддерживает оптимальное состояние мозга, очищая потоки спинномозговой жидкости и межклеточной жидкости от излишних и вредоносных макромолекул. Современные исследования указывают на то, что нарушение работы лимфатической системы головного мозга имеет связь с развитием нейродегенеративных заболеваний. Изучение лимфатической системы головного мозга и её взаимодействий с гематоэнцефалическим барьером, контролирующим поступление продуктов обмена веществ в мозг, представляет большой интерес для современной науки и медицины. Более глубокое понимание функций лимфатической системы головного мозга и разработка методов воздействия на её активность могут привести к созданию

эффективных средств диагностики и терапии заболеваний, связанных с центральной нервной системой.

Во второй главе работы описываются ход и результаты экспериментального изучения динамики лимфатической системы головного мозга лабораторных крыс при открытии гематоэнцефалического барьера путём наблюдения с помощью ОКТ за накоплением золотых наностержней в полостях глубоких шейных лимфатических узлов, а также описывается ход предполагаемого эксперимента по изучению динамики лимфатической системы с помощью метода LSFМ, рассматриваются преимущества и недостатки LSFМ в исследовании лимфатической системы по сравнению с ОКТ, МРМ и фотоакустической визуализацией.

Исследование с помощью ОКТ проводилось на белых лабораторных крысах. Всем подопытным крысам, кроме одной, была привита глиома, которая способствовала увеличению проницаемости гематоэнцефалического барьера. Крыса без привитой глиомы являлась контрольной. В исследовании было использовано 7 крыс с привитой глиомой и одна здоровая крыса. В работе были использованы золотые наностержни для визуализации и анализа динамики очищения мозга лимфатической системой от прошедших через гематоэнцефалический барьер наночастиц. Наблюдение с помощью ОКТ за активностью лимфатической системой было возможно при наличии золотых наночастиц, так как сама лимфа является "прозрачной" для системы ОКТ, и полости в лимфатических узлах и лимфатические сосуды визуализируются в виде тёмных по сравнению с окружающими тканями областей. Перед каждым экспериментом подопытную крысу усыпляли с помощью анестезии, затем проводилась хирургическая операция, позволявшая в дальнейшем вести наблюдение за глубоким шейным лимфатическим узлом с помощью системы ОКТ. Затем лабораторные крысы закреплялись на микрометрическом столике и приводились в необходимое для ведения наблюдений пространственное положение. Введение подопытным крысам физиологического раствора, содержащего золотые наностержни, производилось через катетер в сонную

артерию. Запись В-сканов глубоких лимфатических узлов каждой из лабораторных крыс проводилась в течение 50 минут с интервалом в 5 минут. Введение золотых наностержней проводилось после первой записи, сделанной в "нулевую" минут эксперимента, на каждой крысе было сделано по 11 записей. В ходе каждой записи система ОКТ детектировала набор из 50 изображений В-сканов, из которых отбирались по 10 наиболее качественных изображений для проведения дальнейшей обработки данных (см. рисунок 1).

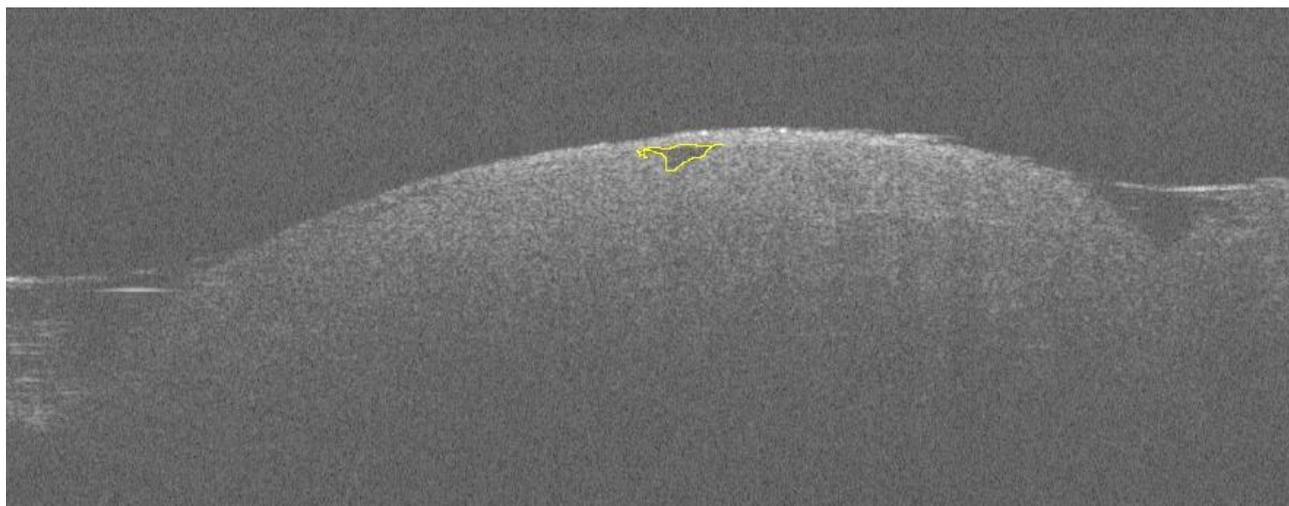
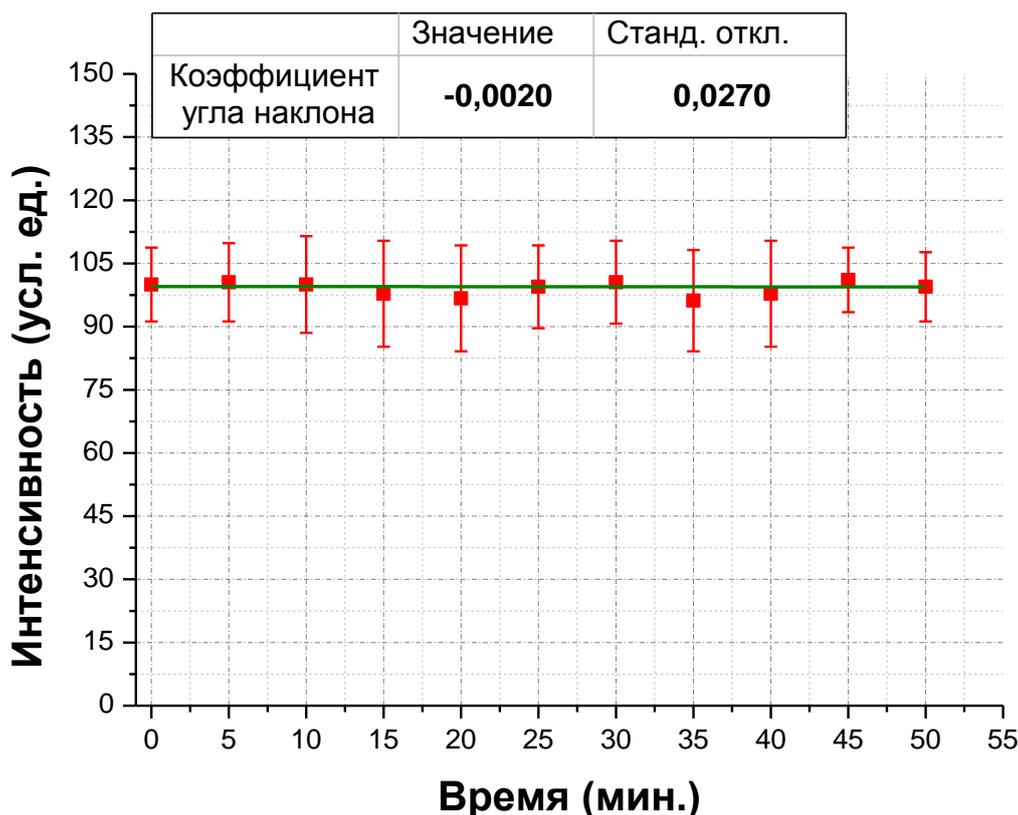


Рисунок 1 - исследование яркости пикселей в выделенной области с полостью в глубоком шейном лимфатическом узле

В случае крысы без привитой глиомы не наблюдалось выраженного роста среднего значения яркости пикселей с течением времени в областях изображений, содержащих полости лимфатического узла (см. рисунок 2). В случае с крысами с привитой глиомой наблюдался рост среднего значения яркости пикселей, при этом коэффициент угла наклона линии регрессии имел на несколько порядков большее по модулю значение, чем в случае контрольной крысы, и являлся положительным числом (см. рисунок 3). Полученные в итоге для всех крыс зависимости средних значений яркости пикселей в наборе изображений из каждой записи от времени и соответствующие значения стандартного отклонения яркости соответствовали накоплению золотых наночастиц в полостях глубоких шейных лимфатических узлов крыс с течением времени, то есть характеризовали динамику лимфатической системы головного мозга крыс.

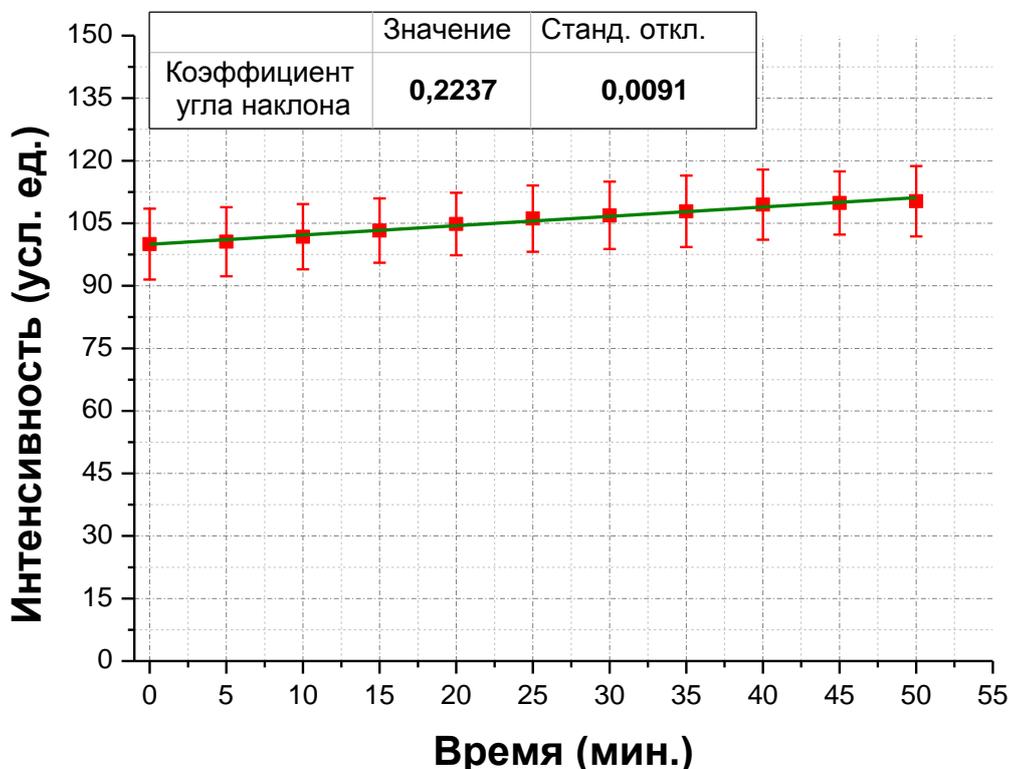


Зелёным цветом обозначена линия регрессии.

Рисунок 2 - график зависимости среднего значения яркости пикселей от времени при накоплении золотых наностержней в полостях глубокого лимфатического сосуда крысы без привитой глиомы

Рассчитанные средние значения яркости и стандартных отклонений характеризовали количество детектируемых фотонов в исследуемой области изображений и позволили сопоставить время и интервал значений, в котором находится истинное значение яркости пикселей исследуемой области, характеризующее накопление золотых наночастиц. Отличие результатов обусловлено тем, что в случае крыс с привитой глиомой была увеличена проницаемость гематоэнцефалического барьера и происходило очищение мозга лимфатической системой от прошедших через барьер золотых наностержней, что способствовало ярко выраженной динамике накопления золотых наностержней в полостях глубоких шейных лимфатических узлов. Визуализации с помощью ОКТ демонстрирует эту динамику, показывая увеличение с течением времени средних значений яркости пикселей

изображений лимфатических узлов в областях, содержащих полости, при выводе золотых наночастиц из мозга во время очищения головного мозга лимфатической системой.



Зелёным цветом обозначена линия регрессии.

Рисунок 3 - график зависимости средних значений яркости пикселей, полученных по наборам нормированных данных, от времени при накоплении золотых наностержней в полостях глубокого лимфатического сосуда крыс с привитой глиомой

Рабочая установка для проведения измерений методом LSFМ (см. рисунок 4) в предполагаемом эксперименте будет состоять из следующих элементов: источник освещения - лазер с центральной длиной волны 540 нм, устройство расширения пучка и цилиндрическая линза (для приведения излучения лазера в форму светового листа), микрометрический стол, штатив со столиком для исследуемого образца, элементы для закрепления исследуемого образца, светофильтр, пропускающий излучение флуоресцирующего красителя, микрообъектив, видеокамера. Измерения будут проводиться на лабораторных

крысах. Для изучения активности лимфатической системы при открытом гематоэнцефалическом барьере будет использоваться группа животных с открытым с помощью звукового воздействия барьером. Для относительной оценки результатов эксперимента будет использоваться контрольная группа лабораторных крыс, не подверженных открывающим барьер воздействиям. На предварительно анестезированных животных будет проводиться хирургическая операция для закрепления в удобном для наблюдения положении глубокого шейного лимфатического узла. Перед началом записи анестезированная крыса будет закрепляться на столике, установленном на штативе. Штатив будет устойчиво соединён с подвижной поверхностью микрометрического стола.

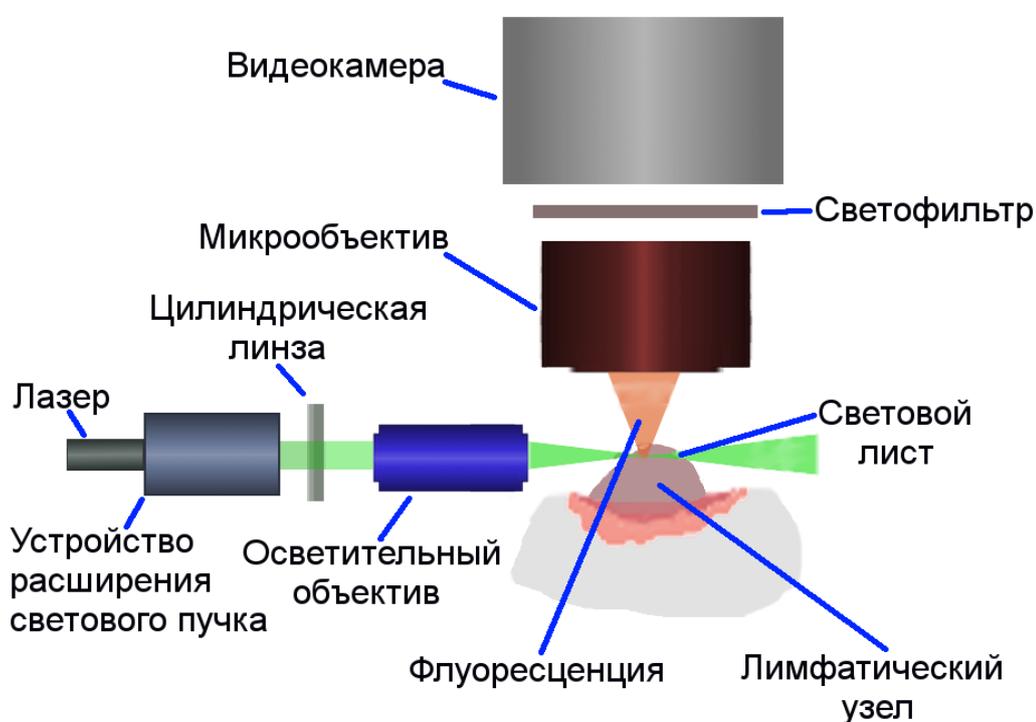


Рисунок 4 - установка для проведения измерений методом LSM

Конструкция из штатива и микрометрического стола позволит перемещать исследуемый образец в трёх измерениях. Запись изображений выбранной области с помощью рабочей установки начнётся сразу после введения через катетер в сонную артерию крысы флуоресцирующего красителя, evans blue. Через равные интервалы времени, например каждые 5 минут, с помощью видеокамеры будет проводиться регистрация излучения в лимфатическом узле. Ожидается повышение интенсивности флуоресценции с

течением времени в группе крыс с открытым гематоэнцефалическим барьером, так как прошедший через барьер краситель будет выводиться из мозга с помощью лимфатической системы. Выводимый краситель будет накапливаться в полостях глубокого шейного лимфатического узла. В контрольной группе не ожидается подобного эффекта, так как закрытый гематоэнцефалический барьер не пропустит частицы красителя. Над полученными изображениями потребуется провести анализ, например с помощью программы ImageJ можно изучить параметры интенсивности излучения в определённых областях лимфатического узла. В случае наблюдения увеличения интенсивности излучения, вызванного накоплением красителя, можно будет исследовать динамику работы лимфатической системы.

Метод LSFМ успешно применяют при изучении прозрачных и полупрозрачных биологических объектов с линейными размерами не превышающими 1-2 мм. Глубокий шейный лимфатический узел не является полупрозрачной средой, что будет сильно ограничивать проходимость его тканей для излучения. Для решения этой проблемы предполагается использовать просветляющие агенты. Другой потенциальной проблемой является само физиологическое расположение глубокого шейного лимфатического узла. Так как предполагается проведение исследования *in vivo*, положение лимфатического узла можно будет контролировать с определёнными ограничениями. В случае необходимости рабочая установка будет дополнена элементами, позволяющими перемещать линейно и поворачивать совместно систему освещения и камеру относительно лимфатического узла. По сравнению с системами фотоакустической визуализации система на основе метода LSFМ обладает менее сложной конструкцией. Это качество позволит собрать систему LSFМ и применить её на практике с относительно большей простотой. Методы многофотонной микроскопии и ОКТ обладают более низкой скоростью визуализации, чем LSFМ. Этот параметр играет большую роль при проведении исследований на

живых организмах, так как их биологическая активность (дыхание, сердцебиение) влияют на качество визуализации.

Заключение. Полученные с помощью ОКТ данные по исследовании глубокого шейного лимфатического узла крыс позволяют описать динамику лимфатической системы во время очищения головного мозга.

Основными проблемами, которые возникли при использовании метода ОКТ, являлись низкая скорость визуализация и ограничение визуализации по глубине.

В работе описаны ход работы и компоненты рабочей установки в предполагаемом эксперименте по изучению динамики лимфатической системы крысы с помощью LSFМ при открытом гематоэнцефалическом барьере. Непрозрачность биологических тканей глубокого шейного лимфатического узла и его физиологическое расположение могут вызвать затруднения при проведении эксперимента. Метод LSFМ обладает определёнными достоинствами и недостатками. Устранение трудностей и ограничений, связанных с глубиной сканирования и расположением лимфатических узлов, с помощью просветления биологических тканей и модификации крепления системы освещения и системы детектирования позволит использовать LSFМ для проведения исследований динамики лимфатической системы. LSFМ имеет более высокую скорость визуализации по сравнению с методами ОКТ и многофотонной микроскопии, что позволит получать более качественные по сравнению с ОКТ изображения, характеризующие активность лимфатической системы головного мозга. Также метод LSFМ более прост в реализации по сравнению с методом фотоакустической визуализации.

В перспективе представляется интересным реализация на практике исследования динамики лимфатической системы методом LSFМ, а также разрешение проблем, возникающих при применении метода ОКТ.

Список публикаций в соавторстве:

1. Semyachkina-Glushkovskaya, O. Application of optical coherence tomography for in vivo monitoring of the meningeal lymphatic vessels during opening of blood–

brain barrier: mechanisms of brain clearing / O. Semyachkina-Glushkovskaya, A. Abdurashitov, A. Dubrovsky, D. Bragin, O. Bragina, N. Shushunova, G. Maslyakova, N. Navolokin, A. Bucharskaya, V. Tuchind, J. Kurths, A. Shirokov // Journal of Biomedical Optics. - 2017. - V. 22. - Issue 12.

2. Semyachkina-Glushkovskaya, O. Photobiomodulation of lymphatic drainage and clearance: perspective strategy for augmentation of meningeal lymphatic functions / O. Semyachkina-Glushkovskaya, A. Abdurashitov, A. Dubrovsky, M. Klimova, I. Agranovich, A. Terskov, A. Shirokov, V. Vinnik, A. Kuzmina, N. Lezhnev, I. Blokhina, A. Shnitenkova, V. Tuchin, E. Rafailov, J. Kurths // Biomedical Optics Express. - 2020.- V. 11. - Issue 2. - pp. 725-734.

3. Semyachkina-Glushkovskaya, O. Photostimulation of cerebral and peripheral lymphatic functions / O. Semyachkina-Glushkovskaya, A. Abdurashitov, M. Klimova, A. Dubrovsky, A. Shirokov, A. Fomin, A. Terskov, I. Agranovich, A. Mamedova, A. Khorovodov, V. Vinnik, I. Blokhina, N. Lezhnev, A. Shareef, A. Kuzmina, S. Sokolovski, V. Tuchin, E. Rafailov, J. Kurths // Translational Biophotonics. - 2020. - V. 2. - Issue 1-2.

4. Semyachkina-Glushkovskaya, O. The interaction between the meningeal lymphatics and blood-brain barrier / O. Semyachkina-Glushkovskaya, A. Abdurashitov, A. Dubrovsky, A. Pavlov, N. Shushunova, G. Maslyakova, N. Navolokin, A. Bucharskaya, V. Tuchin, J. Kurths // Proc. SPIE. - 2018. - V. 10495.

5. Semyachkina-Glushkovskaya, O. Lymphatic clearance from the blood after subarachnoid hemorrhages / O. Semyachkina-Glushkovskaya, A. Abdurashitov, A. Dubrovsky, A. Shirokov, N. Navolokin, M. Klimova, E. Duarte Torres, A. Khorovodov, A. Mamedova, A. E. Shareef, A. Terskov, E. Saranceva, T. Iskra, J. Kurths // Proc. SPIE. - 2019. - V. 10865.

6. Klimova, M. The role of the meningeal lymphatic in the brain clearing / M. Klimova, A. Dubrovsky, E. Duarte Torres, A. Abdurashitov, A. Shirokov, A. Terskov, A. Khorovodov, E. Sarantseva, T. Iskra, O. V. Semyachkina-Glushkovskaya // Proc. SPIE. - 2019. - V. 11067.