

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

Кафедра физиологии человека и животных

**ФОТОСТИМУЛЯЦИЯ ЛИМФОДРЕНАЖНОЙ ФУНКЦИИ МОЗГА**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 4 курса 421 группы

Направления подготовки бакалавриата 06.03.01 Биология

Биологического факультета

Касимовой Алины Сергеевны

Научный руководитель:

доцент, канд. биол. наук \_\_\_\_\_ Т. Д. Искра

Зав. кафедрой:

доцент, док. биол. наук \_\_\_\_\_ О. В. Семячкина-Глушковская

Саратов 2021

**Введение.** Недавно открытая менингеальная лимфатическая система грызунов, приматов и людей стимулировала переоценку базовых знаний о процессах очистки мозга и дренажа, а также о механизмах развития нейродегенеративных заболеваний. Однако функции менингеальной лимфатической системы остаются неясными. Известно, что менингеальная лимфатическая система играет важную роль в поддержании гомеостаза мозга путем отвода макромолекул из мозга в шейные лимфатические узлы. Есть новаторские данные, предполагающие, что нарушение работы менингеальных лимфатических сосудов способствует отложению амилоида- $\beta$  в мозговых оболочках.

Существует гипотеза, что усиление функций менингеальной лимфатической системы может быть многообещающей терапевтической целью для предотвращения или замедления болезни Альцгеймера.

Лазерная стимуляция может быть многообещающим методом стимуляции функций менингеальной лимфатической системы.

Низкоуровневая лазерная терапия, была предложена более 50 лет назад. Данное воздействие основано на освещении красных лазеров (600-700 нм) или ближнего инфракрасного света (760-1200 нм) на голову через неповрежденную кожу головы и череп. Свет проникает в мозг, где он поглощается определенными хромофорами, что стимулирует образование аденозинтрифосфата и оксида азота с увеличением энергетических и метаболических возможностей тканей мозга.

Воздействие лазером может уменьшать опосредованную А $\beta$  нейродегенерацию гиппокампа, нарушения памяти у грызунов, ингибировать А $\beta$ -индуцированный апоптоз клеток мозга и вызывать уменьшение бляшек А $\beta$  в коре головного мозга.

Есть вероятность, что терапевтическое действие лазера на мышей с болезнью Альцгеймера может быть связано с усилением лимфатического дренажа и очищающих функций. В связи с вышеизложенным, целью данного исследования стало изучение влияния фотостимуляции на выведение

различных маркеров из мозга мышей через менингеальную лимфатическую систему в периферическую лимфатическую систему как основного движущего фактора для активации лимфодренажа.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Разработать и апробировать метод многоканальной прижизненной флуоресцентной микроскопии головного мозга лабораторных животных для формирования представлений об анатомии мозговых кровеносных и лимфатических сосудов и их отличии при визуализации.

2. Использовать фотодинамическое воздействие для открытия гематоэнцефалического барьера для маркера FITC-декстран.

3. Применить фотостимуляцию для активации лимфодренажной функции и очищения мозга от маркера FITC-декстран.

**Основное содержание работы.** Работа выполнена на базе кафедры физиологии человека и животных Саратовского государственного университета имени Н.Г. Чернышевского. Все экспериментальные процедуры выполнялись в соответствии с установленными правилами проведения исследований на животных и в соответствии с международными стандартами GLP.

Эксперименты проводились на беспородных мышах-самцах (20-25 г, n = 47) в соответствии с Руководством по уходу и использованию лабораторных животных, опубликованным Национальными институтами здравоохранения США (публикация NIH № 85-23, пересмотренная в 1996 г.). Протоколы утверждены экспертной коллегией Саратовского государственного университета (протокол № 7 от 07.02.2017). Мышей содержали при температуре  $25 \pm 2$  °C, влажности 55% и цикле свет-темнота 12:12 часов. Пища и вода давались ad libitum.

Целью первого этапа исследований является разработка методов многоканальной прижизненной флуоресцентной микроскопии головного мозга лабораторных животных для формирования представлений об анатомии мозговых кровеносных и лимфатических сосудов и их отличии при визуализации.

В кровь животного (n=12) вводили маркер FITC декстран, видимый в зеленом спектре. Краситель Evans Blue, вводили в цистерну головного мозга, откуда он попадает в лимфатические сосуды и позволяет их наблюдать в красном спектре. Флуоресцентная микроскопия дает возможность прижизненно наблюдать топографию кровеносных сосудов в головном мозге (рисунок 1).

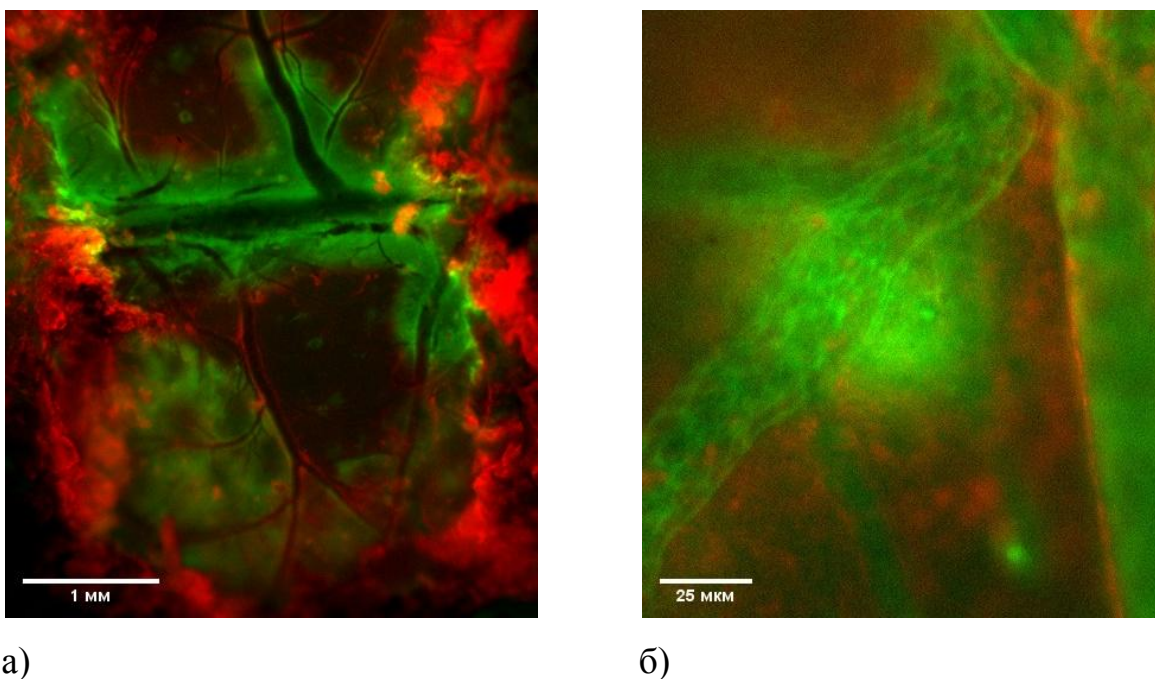


Рисунок 1 – Изображения кровеносных и лимфатических сосудов оболочки головного мозга мыши, зарегистрированные объективом  $4\times 0,2$  (а) и  $100\times 0,75$  (б). Красный спектр: Evans Blue, зеленый спектр: FITC декстран

На данном рисунке показано изображение малого кровеносного сосуда (зеленый спектр), и хорошо видна красная флуоресценция Evans Blue в периваскулярном пространстве кровеносного сосуда в правой части изображения. В связи с непрерывными микроперемещениями головного мозга, такое изображение может быть получено только при помощи системы визуализации с длительностью экспозиции менее 10 мс.

Данный эксперимент направлен на обнаружение возможных путей вывода красителя из головного мозга через лимфатические сосуды, локализованные в периваскулярном пространстве сосудов оболочки головного мозга. Подобная визуализация обеспечивает длительного непрерывное

наблюдение исследуемых животных.

## Очищение тканей мозга от молекул, пересекающих открытый гематоэнцефалический барьер, по менингеальной лимфатической системе с помощью фотостимуляции

Для изучения дренажной функции мозга было проведено фотодинамическое открытие ГЭБ, для обеспечения безопасного прохождения маркера в мозговые ткани с целью его дальнейшего выведения посредством фотостимуляции. Схема данного эксперимента представлена на рисунке 2.

Для ФД-индуцированного открытия ГЭБ в корковой области мозга для высокомолекулярных молекул мы использовали конфокальный анализ визуализации экстравазации FITC-декстрана 70 кДа. Мышей (n = 15) помещали на нагревательную платформу для поддержания температуры тела на всех этапах экспериментов. До и через 1 час после ФДВ краситель FITC-декстрана вводили внутривенно и давали циркулировать в течение 2 минут. Затем мышей декапитировали, и готовили препараты мозга для дальнейшего анализа.

Были получены и визуализированы приблизительно от 8 до 12 срезов на животное из кортикальных и подкорковых структур (рисунок 3).

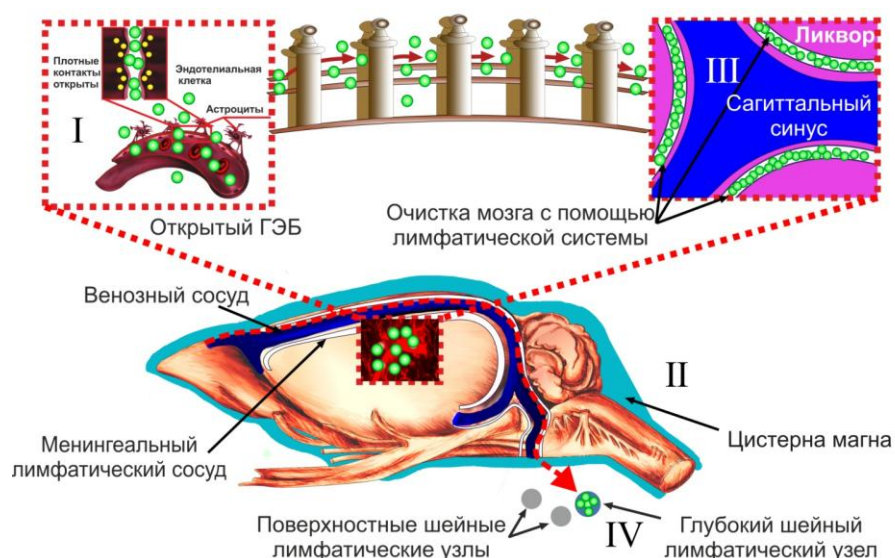


Рисунок 2 – Выход FITC декстрана через лимфатическую систему. Схема, иллюстрирует очищение мозга от FITC декстрана через менингеальные лимфатические сосуды в глубокий шейный узел после пересечения маркером открытого гематоэнцефалического барьера

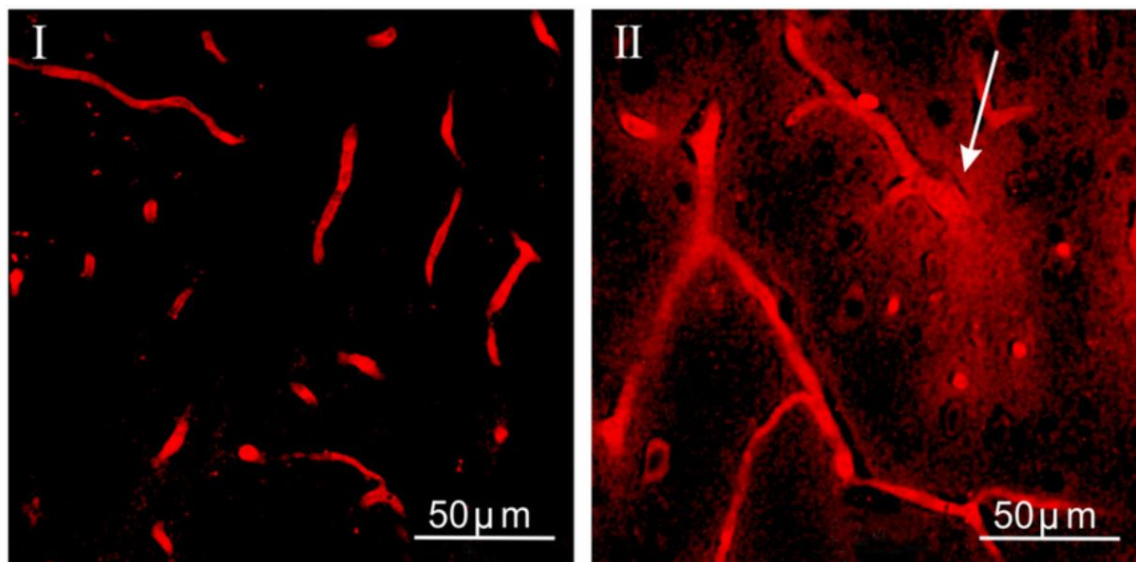


Рисунок 3 – Конфокальная визуализация нормальных сосудов головного мозга, заполненных FITCD (красный) (I- до открытия ГЭБ) и после ФТВ-индуцированного открытия ГЭБ (II, выход FITCD отмечена стрелкой)

На данном рисунке показан выход FITCD, который определяется как флуоресцентное облако (отмеченное стрелкой) вокруг церебральных капилляров. В нормальном состоянии ГЭБ экстравазации FITCD не происходит (рисунок 3, I). Таким образом, было подтверждено эффективное открытие ГЭБ с помощью ФДВ.

На следующем этапе исследования было изучено влияние фотостимуляции на дренажную функцию МЛС головного мозга мышей (n= 20). Для этого изучали, как мозг очищается от молекул, которые проникают в его ткани через ГЭБ, открытый ФДВ, то есть наблюдали очищение тканей мозга от

FITC-декстрана 70 кДа (FITCD) по менингеальным лимфатическим сосудам, которые играют важную роль в регенеративных механизмах мозга.

Для изучения процессов дренажа и очистки мозга, FITC-декстрана вводили внутривенно во время фотодинамического открытия ГЭБ.

Через полчаса после фотостимуляции мозга, для оценки активации лимфодренажной функции, мозговые оболочки и глубокий шейный лимфатический узел (ГШЛУ) собирали для конфокальной визуализации (рисунок 4).

На рисунке видно присутствие FITCD (зеленый) в менингеальных лимфатических сосудах (4, Б), которое также наблюдается в мозговом сосуде из-за его внутривенной инъекции. Поскольку лимфатические сосуды открыты, FITC декстран после пересечения открытого ГЭБ удаляется из тканей мозга через лимфатические пути (4, Д), что может объяснить присутствие маркера в лимфатических сосудах головного мозга. Это явление нетипично для нормального состояния, поскольку ГЭБ не поврежден. Мыши с открытым не поврежденным ГЭБ, демонстрируют флуоресцентный сигнал от FITC декстран в ГШЛУ, указывая на соединительный мост между менингеальной и периферической лимфатической сетью (рисунок 5).

Таким образом, этот эксперимент предполагает быстрое очищение мозга от FITC декстрана после его пересечения открытого ГЭБ из мозга через МЛС в ГШЛУ после фотодинамического воздействия.

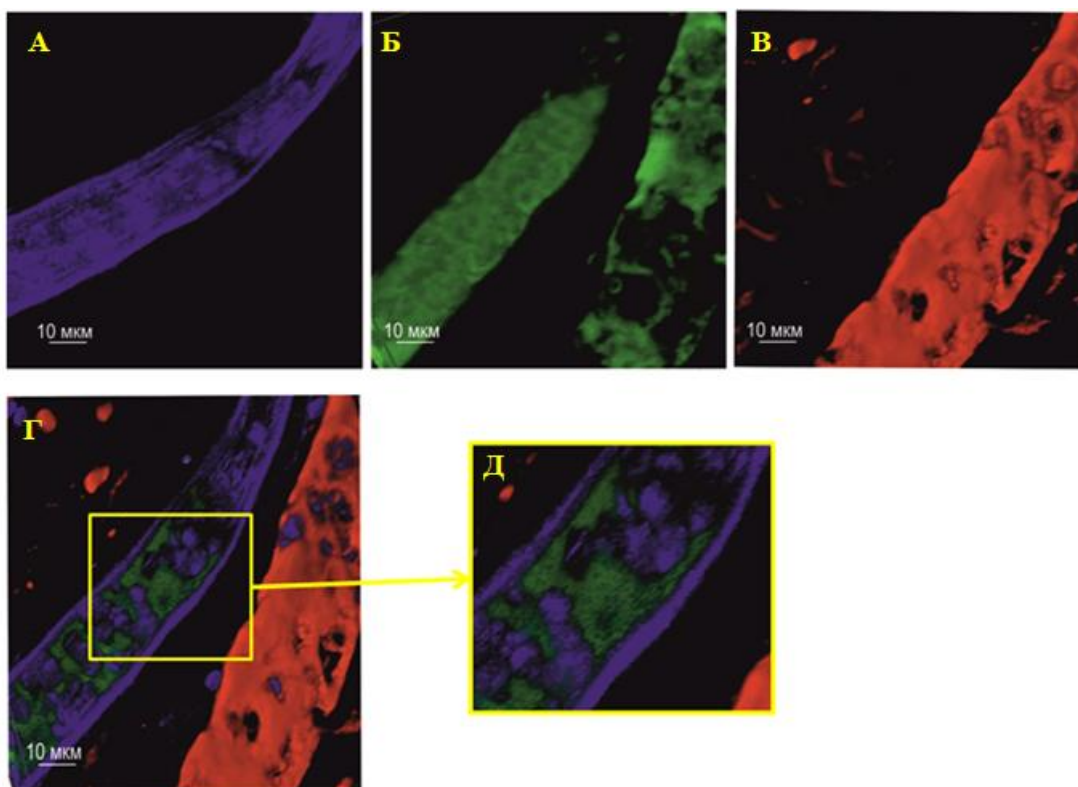


Рисунок 4 – Конфокальное изображение мозговой оболочки после ФД-открытия ГЭБ: А – менингеальные лимфатические сосуды отмеченные Lyve-1; Б - менингеальные лимфатические сосуды, заполненные FITCD, и сосуд головного мозга; В - сосуд головного мозга, отмеченный NG2; Г - изображение, слитое А – В; Д - конфокальное изображение выхода FITCD из тканей мозга по МЛС на большом увеличении



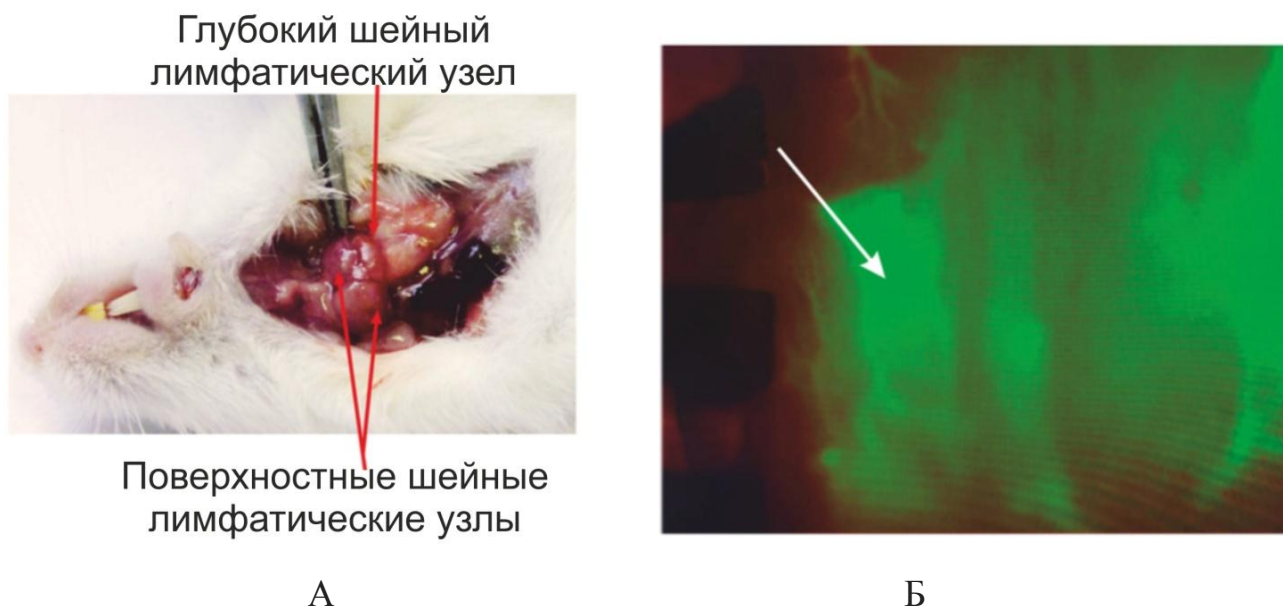


Рисунок 5 – Очищение головного мозга от FITCD через лимфатическую систему: А - анатомическое положение ГШЛУ, Б - флуоресцентное изображение накопления FITCD в ГШЛУ после его пересечения открытого ГЭБ

Таким образом, фотостимуляция лимфатической системы головного мозга, позволяет ускорить очищение мозга от маркера, введенного экспериментально и следовательно, повышает очистительную функцию МЛС, необходимую для выведения из мозга продуктов обмена веществ, белка  $\beta$  – амилоида, накопление которого вызывает болезнь Альцгеймера, а также гемоседерина, образующегося в тканях мозга после инсульта, то позволяет рекомендовать данный метод как профилактический и терапевтический.

### Выводы

1. Установлено, что стресс и прямое механическое воздействие звуковой волны, играют важную роль в повышении проницаемости гематоэнцефалического барьера.

2. Открытие гематоэнцефалического барьера протекает на фоне высокого содержания адреналина в крови и кровотока мозга, нормализация барьерной функции мозга сопровождается восстановлением исходного уровня гормона и церебрального кровотока.

3. Звук открывает гематоэнцефалический барьер, не повреждая ткани мозга.

4. Установлено наличие FITCD в менингеальных лимфатических сосудах, меченных Lyve-1, что свидетельствует о клиренсе FITCD из мозга после его пересечения, открытого гематоэнцефалического барьера через церебральный лимфатический путь.