

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

Кафедра физиологии человека и животных

**ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ВЗАИМОСВЯЗЬ МЕЖДУ ПОВЫШЕНИЕМ
ПРОНИЦАЕМОСТИ ГЕМАТОЭНЦЕФАЛИЧЕСКОГО БАРЬЕРА И
АКТИВАЦИЕЙ ЛИМФОДРЕНАЖНЫХ ПРОЦЕССОВ МОЗГА**

Автореферат бакалаврской работы
студентки 4 курса 421 группы
направления 06.03.01 Биология
биологического факультета
Евсюковой Арины Сергеевны

Научный руководитель:

доцент, док. биол. наук



О. В. Семячкина-Глушковская

(подпись, дата)

Зав. кафедрой:

доцент, док. биол. наук



О. В. Семячкина-Глушковская

(подпись, дата)

Саратов 2021

Список сокращений

СМЖ – спинномозговая жидкость

ЦНС – центральная нервная система

ГЭБ – гематоэнцефалический барьер

МЛС – менингеальные лимфатические сосуды

ЛС – лимфатический сосуд

МРТ – магнитно-резонансная томография

ВЧД – внутричерепное давление

Gd-DTPA – гадолинийдиэтилентриамин-пентауксусной кислота

FITC–декстран – декстран флуоресцин

LYVE-1 – эндотелиальный рецептор лимфатических сосудов

NG2 – нейтрально / глиальный антиген-2

Введение. Лимфатическая система играет важную роль в поддержании здоровья организма. По лимфососудам осуществляется транспорт продуктов метаболизма; осуществляются иммунные реакции, созревание лимфоцитов; транспортировка иммунных клеток к зараженному участку. Не смотря на многообразие и важность выполняемых функций лимфатической системы, это одна из самых малоизученных систем организма. В частности, на протяжении двух веков существовала догма об отсутствии лимфатических сосудов в оболочках мозга.

В 2015 году группа ученых из США под руководством Джона Кипниса с помощью специфических маркеров лимфатического эндотелия и конфокальной микроскопии обнаружила лимфатические сосуды, выстилающие синусы в dura matter. Они способны осуществлять дренажную функцию и переносить иммунные клетки по спинномозговой жидкости (СМЖ) в глубокие шейные лимфатические узлы. Недавно появились доказательства того, что мозг имеет лимфатическую дренажную систему,

которая активно участвует в удалении метаболитов, гомеостазе мозга и регуляции иммунитета.

Гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) – это высокоселективный барьер, контролирующий транспорт продуктов метаболизма, патогенов и других потенциально опасных веществ из крови в мозг. Во время повышения проницаемости ГЭБ продукты жизнедеятельности, могут попадать в ткани головного мозга и оказывать на него патогенное воздействие. Известно, что лимфатическая система вовлекается в механизмы выведения токсинов из мозга. В частности, в клинических исследованиях показано, что повышение проницаемости ГЭБ с помощью фокусного ультразвука оказывает терапевтический эффект у пациентов с болезнью Альцгеймера. При исследованиях на животных установлено, что менингеальные лимфатические сосуды выводят токсичный бета-амилоид. Эта функция лимфатической системы снижается с возрастом, что объясняет риск развития болезни Альцгеймера у пожилых людей.

На основе вышеперечисленных данных возникла гипотеза, что существует функциональная взаимосвязь между нарушением барьерной функцией мозга и активацией работы менингеальной лимфатической системы.

Для тестирования данной гипотезы была поставлена цель изучить активацию лимфатического выведения макромолекул из тканей мозга после их прохождения через открытый ГЭБ.

Для достижения поставленной цели решали следующие задачи:

1. Изучить влияние звукового воздействия на повышение проницаемости ГЭБ у мышей с использованием флуоресцентной и конфокальной микроскопии, магнитно-резонансной томографии (МРТ), спектрофлуориметрического метода;

2. Изучить взаимосвязь между повышением проницаемости ГЭБ и активацией лимфатического выведения из тканей мозга соединений,

пересекающих открытий ГЭБ, с использованием конфокальной микроскопии и специфических маркеров лимфатического эндотелия

3. Изучить лимфатическое выведение FITC-декстрана 70 кДа с использованием конфокальной микроскопии и гадолинийдиэтилентриаминпентауксусной кислоты (Gd-DTPA) с применением магнитно-резонансной томографии из тканей мозга мышей до и после повышения проницаемости ГЭБ с помощью звука.

Структура и объем работы. Работа изложена на 57 страницах машинописного текста и включает 7 разделов: список сокращений и условных обозначений, введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты исследований и их обсуждение, заключение, список использованных источников, содержащий 68 наименований. Работа иллюстрирована 16 рисунками и 1 таблицей.

Основное содержание работы:

Глава 1 Обзор литературы

Обзор литературы содержит в себе сведения об общей характеристике лимфатической системы мозга, гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), особенностях их анатомии и функционирования. По расположению и функциональным особенностям МЛС разделили на: базальные и дорзальные МЛС. Развиваются они постнатально, первоначально появляются вокруг отверстий в базальной части черепа и спинного мозга, а затем прорастают вдоль кровеносных сосудов черепа и спинномозговых нервов в различные области мозговых оболочек. ГЭБ – высокоселективный барьер ограничивающий перенос патогенов из крови в мозг. Он образован эндотелиальными клетками, базальной мембраной, перицитами, астроцитами и плотными контактами. А также описана роль лимфатической системы оболочек мозга в поддержании здоровья центральной нервной системы.

Глава 2 Материалы и методы

Исследования проводились на беспородных самцах мышей, вес животных составлял 20 – 25 г. Группам мышей:

- 1) контрольные (интактные) мыши, без звукового воздействия;
- 2) экспериментальные животные, подвергающиеся звуковому повышению проницаемости ГЭБ.

Повышение проницаемости ГЭБ с помощью звука. В основе метода лежит применение громкого звука. Время воздействия звука во всех сериях экспериментов составляло 2 часа, но с периодичностью прослушивания звука 60 сек и 60 сек – пауза.

Спектрофлуориметрический анализ содержания красителя Evans Blue в тканях мозга мышей: традиционный способ оценки проницаемости ГЭБ с использованием внутривенного введения красителя (2% Evans blue в 0,1 М растворе фосфатного буфера) с последующим спектрофлуориметрическим определением концентрации вещества в тканях головного мозга. Evans blue циркулировал в крови 30 минут перед взятием тканей мозга для анализа.

Метод флуоресцентной микроскопии: проницаемость ГЭБ для красителя Evans Blue изучали *in vivo* с помощью флуоресцентной микроскопии у мышей с применением оптических просветлителей черепа.

Методы иммуногистохимического и конфокального анализа для оценки проницаемости ГЭБ: для проведения иммуногистохимического и конфокального анализа проводили транскардиальную перфузию головного мозга раствором 4% забуференного формалином (30-50 мл каждого раствора на мышшь), далее производили забор головного мозга и готовили свободноплавающие срезы. Срезы мозга обрабатывали по стандартному иммуногистохимическому протоколу. Конфокальную микроскопию срезов головного мозга мышей проводили с помощью автоматизированного конфокального лазерного сканирующего микроскопа с водной иммерсией Olympus FV10i-W (Olympus, Япония).

Методы магнитно-резонансной томографии для исследования проницаемости ГЭБ. Для оценки проницаемости ГЭБ использовали магнитно-резонансную томографию под анестезией, до и 1-4-24 часа после применения звука. Мышам вводили 0,1 мМ/кг гадолиний-диэтилентриамин-пентауксусной кислоты в виде болюсной внутривенной инъекции с последующей визуализацией. DCE-MPT выполняли с использованием поперечного быстрого картирования T1, которое состояло из получения предконтрастных и постконтрастных изображений в течение 15 минут после введения контраста

Метод двух-фотонной микроскопии применяли с использованием флуоресцентного декстран флуоресцина 70 кДа. FITC-декстран 70 кДа вводили внутривенно после чего он циркулировал в крови в течение 15 мин.

Для оценки изменений тканей головного мозга после воздействия звуком проводили гистологический анализ тканей мозга и улитки. ГЭБ мышей декапитировали для морфологического анализа. Образцы мозга были зафиксированы в 4% ПФА в течение 24 часов, а затем погружены в парафин. После этого мозги были нарезаны толщиной 4 мкм и окрашены гематоксилином-эозином.

Для изучения активации лимфодренажной функции мозга использовали метод конфокальной микроскопии мозговых оболочек и глубоких шейных узлов. TRITC-декстран 70 кДа вводили внутривенно и давали ему циркулировать в крови в течение 15 мин. После проводили декапитацию и извлечение мозговых оболочек, их инкубировали в течение суток при +4°C с козым анти-кроличьим антителом LYVE-1 и козым анти-мышинным антителом против NG2, соответственно. После нескольких промываний в физиологическом растворе, мозговые оболочки инкубировали в течение 3 часов при комнатной температуре с мечеными флуоресцентными вторичными антителами.

Глава 3 Результаты и обсуждения

На первом этапе исследований применяли спектрофлуориметрическое определение концентрации красителя Evans Blue в тканях мозга при воздействии звука разной продолжительности, интенсивности и частоты. Интенсивность звука была выбрана 70, 90 и 100 дБ в соответствии с тем, что 100 дБ – уровень звука, максимальным допустимый для безопасного прослушивания. Было выявлено, что через 1 час после воздействия звука (100 дБ) концентрация Evans Blue в тканях мозга у 100% мышей была увеличена в 18,6 раза. При воздействии звуком (90 дБ): уровень Evans Blue был увеличен в 14,6 раза, у 60% мышей (9 из 15). При воздействии звуком (70 дБ) не наблюдалось изменений в проницаемости ГЭБ. Так же методом спектрофлуориметрического анализа были выявлены участки мозга с повышением проницаемости ГЭБ. Наиболее высокое содержание Evans blue наблюдалось в коре больших полушарий, в то время как в тканях мозжечка, таламуса, гипоталамуса, поясной коре и т.д. проницаемость ГЭБ была в 2 раза меньше, по сравнению с корой больших полушарий.

Для выявления эффективного времени экстравазации Evans Blue из церебральных сосудов в ткани мозга использовали *in vivo* флуоресцентную микроскопию: экстравазация Evans Blue увеличивалась во времени, начиная проявляться с 1 мин введения с максимальным выходом Evans Blue в ткани мозга через 30 мин после его введения в кровь.

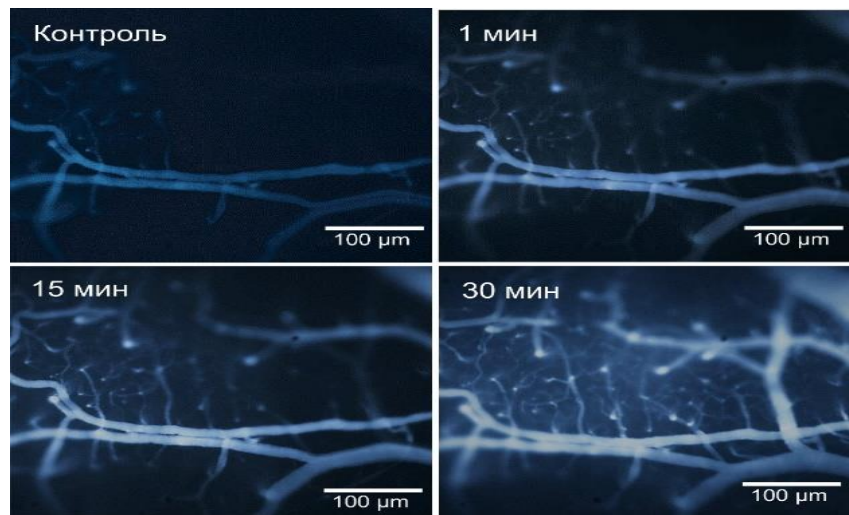


Рисунок 1 – Флуоресцентная визуализация в реальном режиме времени экстравазации красителя Evans Blue из церебральных сосудов в ткани мозга а – в норме, б – после воздействия громким звуком (экстравазация показана в виде яркой облачной флуоресценции)

Дополнительно, использовалась конфокальная визуализация срезов мозга, демонстрирующая *ex vivo* проницаемость ГЭБ для FITC-декстран у мышей. Результаты исследования показали появление FITC-декстрана за пределами капилляров мозга через 1 час после звукового воздействия.

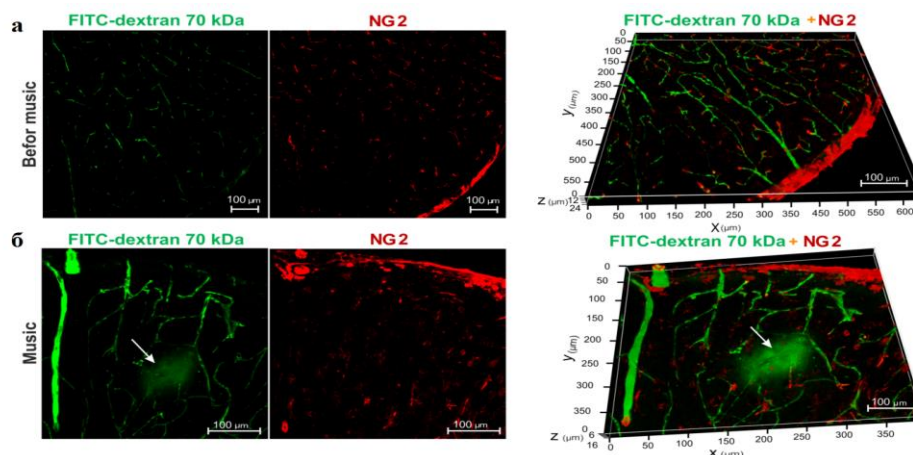


Рисунок 2 – Конфокальная визуализация срезов мозга, демонстрирующая *ex vivo* проницаемость ГЭБ для FITC-декстран у мышей, подвергшихся воздействию громкого звука: а – внутривенная инъекция FITC-декстран, но без звукового воздействия, б – инъекция FITC-декстран через 1 час после звукового воздействия, $n = 10$ в каждой группе

На следующем этапе анализировали влияние повторяющегося звука на проницаемость ГЭБ для низкомолекулярных соединений. Для этого проводили МРТ-анализ экстравазации Gd-DTPA (938 Да) из церебральных сосудов в ткани мозга. Результаты МРТ анализа показали, что через 1 час после звука значения К-мар увеличивалось в 2,8 раза относительно контроля. Дополнительно повышение проницаемости ГЭБ определялось *in vivo* с использованием двух-фотонной лазерной сканирующей микроскопии. Было установлено, что через 1 час после воздействия звука отмечалось существенное повышение проницаемости ГЭБ для FITC-декстрана 70 кДа, что отражалось в нарастании интенсивности флуоресценции сигнала за пределами церебральных капилляров. Восстановление барьерная функция мозга происходил уже через 4 часа.

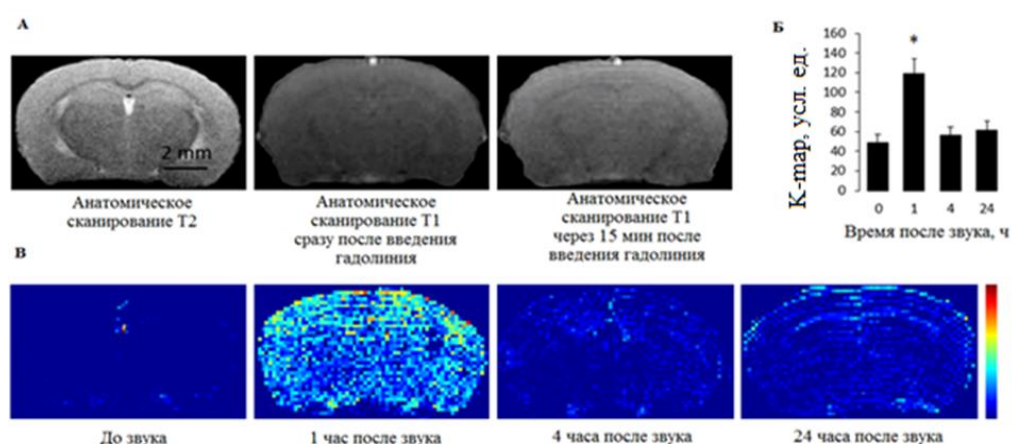


Рисунок 10 – МРТ анализ проницаемости ГЭБ для Gd-DTPA под воздействием звука (100 дБ, 370 Гц, продолжительность 2 часа): А – анатомический скан мозга в T2 и T1 режимах; Б и В – количественный и качественный МРТ анализ экстравазации Gd-DTPA из сосудов мозга в его ткани, соответственно. Максимальная проницаемость ГЭБ к Gd-DTPA наблюдается через 1 час после воздействия звука (яркое свечение) $n=7$, * – $p<0,05$ относительно контроля (без звука)

Для изучения безопасности применения громкого звука для повышения проницаемости ГЭБ применялся гистологический анализ тканей и сосудов

мозга, а так же гистологический анализ улитки и количественная оценка плотности синапсов в ганглии слухового нерва. Гистологический анализ не выявил каких-либо изменений в морфологических структурах тканей мозга и слуховой сенсорной системы.

С помощью иммуногистохимического анализа оценивали экспрессию белков плотных контактов, таких как клаудин-5, окклюдин, и ZO-1. Данные анализа показывают, что во время открытия ГЭБ интенсивность сигнала от окклюдина и клаудина-5 значительно снижается, что свидетельствует о повышении проницаемости ГЭБ. Интенсивность флуоресцентного сигнала от ZO-1 оставалась без изменения, т.е. звук не оказывал влияния на цитоскелет эндотелиальных клеток сосудов мозга.

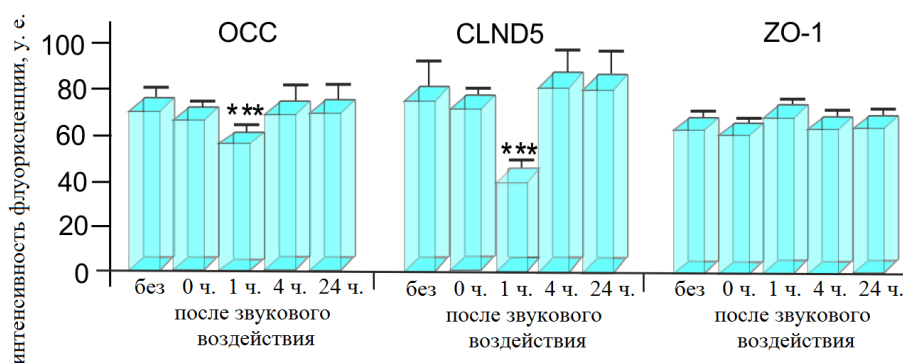


Рисунок 14 – Механизмы, лежащие в основе звукового повышения проницаемости ГЭБ: а – экспрессия белков плотных контактов в контрольной группе (до звукового воздействия) и через 1-4-24 часа после воздействия звуком (n = 10 для каждой группы): - p < 0,001 по сравнению с контрольной группой; б – количественное определение плотности синапсов в ганглии слухового нерва до (без воздействия звуком), через 1 час и 4 недели после звукового воздействия

Следующим этапом исследований явилось изучение активации лимфодренажной функции мозга после звукового повышения проницаемости ГЭБ. Для этого применяли метод конфокальной микроскопии для визуализации очищения тканей мозга от TRITC-декстрана, попадающего в мозг через открытый ГЭБ. Результаты показывают наличие TRITC-декстрана

в МЛС, что свидетельствует о клиренсе TRITC-декстрана из мозга после его пересечения открытого ГЭБ по церебральному лимфатическому пути.

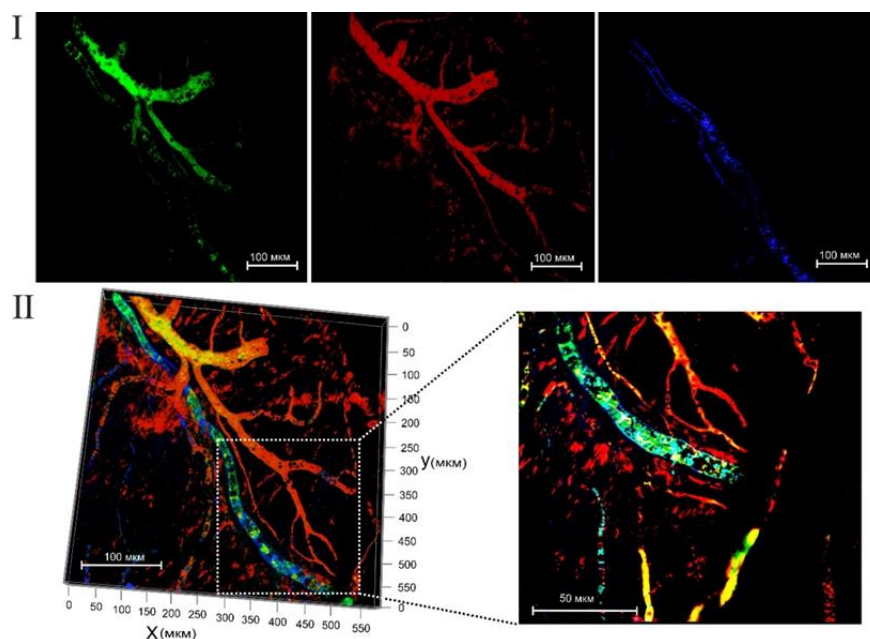


Рисунок 15 – Конфокальное изображение мозговой оболочки мыши после звуко-зависимого открытия ГЭБ для: I. TRITC-декстрана (зеленого цвета), который выходит из мозга по менингеальным лимфатическим сосудам, меченным Lyve-1 (синего цвета), церебральные сосуды (красный цвета) мечены антителами к перицитам NG-2. II - объединенное изображение на большом увеличении.

Используя конфокальную визуализацию глубоких шейных лимфатических узлов, которые являются первой анатомической станцией оттока СМЖ, мы получили результаты, свидетельствующие о том, что повышение проницаемости ГЭБ сопровождается лимфатическим клиренсом FITC-декстрана из тканей мозга по расширенным лимфатическим сосудам в увеличенные лимфатические узлы с последующим его накоплением в их тканях. Таким образом, две серии экспериментов с конфокальной визуализацией очищения тканей мозга от исследуемых трейсеров свидетельствуют о том, что звуковое открытие ГЭБ сопровождается активацией очистительной и дренажной функций церебральной лимфатической системы

Заключение:

1. Звуковое воздействие (100 дБ, 370 Гц) сопровождается обратимым повышением проницаемости ГЭБ у мышей для низко- и высокомолекулярных соединений, что было установлено в экспериментах с введением Evans Blue (спектрофлуориметрический анализ, флуоресцентная микроскопия), FITC-декстрана (конфокальный и двух-фотонная микроскопия), гадолиния – (МРТ анализ);

2. Повышение проницаемости ГЭБ приводит к активации лимфодренажной функции мозга, что определяли по анализу выхода FITC-декстрана из тканей мозга у мышей с открытым ГЭБ. Краситель обнаруживался в менингеальных лимфососудах, а также в лимфатической системы глубоких шейных лимфоузлов;

3. Новые данные об активации лимфодренажных и очистительных процессов мозга на фоне повышения проницаемости ГЭБ открывают новые перспективы развития технология стимуляции лимфатических сосудов с целью повышения восстановительных свойств ЦНС на фоне нарушения барьерной функции мозга.

