

МИНОБРНАУКИ РОССИИ

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования

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

Кафедра физиологии человека и животных

**СОЗРЕВАНИЕ ВЕНОЗНЫХ И ЛИМФАТИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ
ВЫВЕДЕНИЯ СПИННОМОЗГОВОЙ ЖИДКОСТИ ИЗ МОЗГА МЫШЕЙ
НА РАЗНЫХ ЭТАПАХ ОНТОГЕНЕЗА**

АВТОРЕФЕРАТ

БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 4 курса 421 группы

направления 06.03.01 «Биохимия и физиология процессов адаптации»

Биологического факультета

Гидаевой Алсу Шахин кызы

Научный руководитель:

к. б. н., доцент

подпись, дата

Т.Д. Искра

Зав. кафедрой человека и
животных

д. б. н., доцент

подпись, дата

О. В. Семячкина-Глушковская

Саратов 2024

Введение. В настоящее время вопрос о созревании лимфатических и венозных процессов выведения спинномозговой жидкости является достаточно актуальным в контексте понимания механизмов циркуляции и дренажа спинномозговой жидкости в организме.

Лимфатическая система отображена практически во всех тканях и органах и реализовывает транспорт лимфы для возвращения очищенной тканевой жидкости в кровь и удаления обменных продуктов. Одной из ее важных функций является дренажная, т. е. лимфатическая система регулирует водный гомеостаз организма за счет поддержания подходящего объема межклеточной жидкости. Водный гомеостаз в центральной нервной системе имеет ключевое клиническое и физиологическое значение, так как большую часть веса мозга составляет вода, если быть точнее, то 80% [1]. Водный транспорт связан с различными функциями мозга, таких как производство и дренаж спинномозговой жидкости, регулирование объема клеток и контроль размера внеклеточного пространства.

Долгое время, более двух тысячелетий в нейрофизиологии считалось, что в мозге отсутствуют лимфатические сосуды. В XVIII в. ученый, итальянский анатом Паоло Маскагани в своих опытах представил макеты сплетения прозрачных сосудов в оболочках мозга и назвал их лимфатическими, но несмотря на это, вплоть до недавнего времени господствовало представление об «иммунной стерильности» мозга. Благодаря новым методам в оптической визуализации стало вероятным повторить опыты Маскагани с применением современных технологий двухфотонной и конфокальной микроскопии. В 2015 г. были опубликованы результаты двух независимых научных групп, у которых получилось доказать наличие лимфатических сосудов в оболочках мозга. В связи с этим появились новые пути изучения неизвестных или малоизвестных процессов, например, движение лимфоцитов из головного мозга и взаимосвязь между центральной и периферической лимфатическими системами. Существует мнение о том, что менингеальная лимфатика играет ключевую роль

в очищении мозга от метаболитов. Однако данные механизмы являются частью недавно обнаруженной теории глимфатической системы, которая осуществляет движение жидкости из кровеносных сосудов в ткани мозга и далее снова в кровоток. Но механизмы работы глимфатической системы вызывают сомнения из-за отсутствия доказательств возможности движения жидкости через глию, особенно, через астроциты, как утверждают ученые, которые создали теории о глимфатической системе.

Менингеальные лимфатические сосуды, особенно в дорсальной части черепа, принимают участие в удалении спинномозговой жидкости (ликвора), но точный путь оттока ликвора до сих пор остается неизвестен. В нашем исследовании раскрывается важность менингеальных лимфатических сосудов в базальной части черепа для этого процесса, визуализируя их четкое анатомическое расположение и характеризуя их специализированные морфологические особенности, которые облегчают поглощение и отток ликвора мышцей. Также показано, что с возрастом нарушается как целостность менингеальных лимфатических сосудов, так и дренаж ликвора.

Наши результаты должны улучшить понимание того, как менингеальные лимфатические сосуды способствуют нейропатофизиологическим процессам, связанным со старением.

Целью нашей работы является изучение особенностей процессов созревания лимфатических и венозных путей выведения спинномозговой жидкости из мозга мышцей на разных этапах онтогенеза.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Изучить возрастные особенности лимфодренажной функции в мозге у мышцей;
2. Изучить возрастные различия плотности менингеальных лимфососудов.

В обзоре литературы рассматриваются такие темы, как “Лимфатические и венозные пути дренажа тканей головного и спинного мозга”, “Теория лимфатической системы”, “Особенности сети менингеальных лимфатических сосудов”, “Созревание дренажной системы мозга в онтогенезе”.

Во всех проведенных экспериментах, в качестве объектов исследования, использовали мышей-самцов BALB/c (возраст 1 месяц n=10; возраст 16 месяцев n=10), полученных из Национального Ресурсного Центра Лабораторных Животных в Пушино (Московская область, Россия). Животные содержались в стандартных лабораторных условиях и имели свободный доступ к пище и воде. Все экспериментальные процедуры проводились в соответствии с «Руководством по уходу и использованию лабораторных животных».

Поставленная задача решалась путем мониторинга распределения красителя FITC-декстрана (1% раствор, Sigma Aldrich) по тканям головного мозга молодых (1 месяц, n=10) и старых (16 месяцев, n=10) мышей в реальном режиме времени с применением мультифотонной микроскопии и последующего количественного анализа накопления красителя в глубоких шейных лимфоузлах с применением конфокальной микроскопии. Исследуя то, в каком направлении, венозном или лимфатическом, движется трейсер, отслеживали в динамике его распространение по тканям головного мозга и диффузию в сагиттальный синус. Изображения получали при помощи мультифотонного микроскопа Nikon A1R MP (импульсный лазер Spectraphysics Insight X3, длина волны возбуждения 970 нм).

Для приготовления оптического окна за 3 суток до эксперимента проводили следующие процедуры. Животное закрепляется на стереотаксической установке (51500 Stoelting, США), на глаза наносилась мазь Тетрациклин (ОАО «Татхимфармпрепараты», Россия), удален волосной покров на голове в области от носовых костей до шеи с помощью машинки для бритья (Braun Series 3310s, Германия), после чего обрабатывалась кожа с помощью спирта. С помощью прямых рассекающих ножниц (52132-10P

Stoelting, США) отрезали кожу головы, придерживая её микрощипцами (52102-02P Stoelting, США), очищали череп от соединительнотканых оболочек, высушивали с помощью ватных тампонов. В черепе животного проводили краниотомию с помощью бормашины (Foredom, Россия) с диаметром сверла 1 мм. Отделившийся череп удаляли с помощью микрощипцов (52102-02P Stoelting, США) и перевязочных щипов (52108-83P Stoelting, США), открытую рану промывали физиологическим раствором до полного избавления от костной пыли. На завершающем этапе по размеру краниотомии вырезали покровное стекло, полностью закрывая отверстие, после чего стекло приклеивали по бокам стоматологическим акрилом (Zermack, Польша-Россия). Далее в черепе животного делали трепанационное отверстие с помощью стоматологической бормашины по заданным координатам (AP = 2.3 mm; ML = 4 mm).

Для проведения эксперимента наркотизированное животное закреплялось под объективом мультифотонного микроскопа на тёплой грелке, рядом с ним с помощью винта устанавливали навигационный держатель стереотаксической установки с присоединённым к нему микроинъектором (Stoelting, США). В гамилтон (Диаэм, Россия) набирали трейсер (FITC-декстран) в объёме 1 мкл, после чего он помещался в держатель микроинъектора и вводился в головной мозг на заданную глубину (DV = 1.5 мм), трейсер вводили объемом 1 мкл со скоростью 0.1 мкл в минуту.

На первом этапе исследования проводился мониторинг диффузии красителя FITC-декстрана по тканям головного мозга молодых и старых мышей с применением мультифотонной микроскопии. Далее для изучения возрастных особенностей лимфодренажной функции в мозге у мышей в возрасте 10 дней, 1 и 16 месяцев проводился количественный анализ накопления красителя в глубоких шейных лимфоузлах. Результаты исследований показали, что введение красителя в паренхиму мозга у молодых и старых мышей сопровождается его распределением по периваскулярным пространствам

головного мозга с последующим выведением и накоплением в глубоких шейных лимфоузлах, что показано на рисунке 3, 4, 5. Однако, у старых мышей количество накопленного красителя в глубоких шейных лимфатических узлах значительно ниже по сравнению с молодыми, что может свидетельствовать о снижении лимфодренажной функции с возрастом.

Интенсивность распределения красителя по тканям головного мозга на протяжении 4 часов наблюдения и его лимфатическое выведение в глубокие шейные лимфоузлы была более эффективна у молодых особей по сравнению со старыми животными.

Глубокие шейные лимфоузлы являются первой анатомической станцией, собирающей вместе с жидкостями мозга соединения, выводимые из него. Чем интенсивнее накапливается изучаемый краситель в глубоких шейных лимфоузлах, тем эффективнее работает дренажная система головного мозга. На основании полученных результатов, были сделаны выводы, что у старых животных снижается лимфодренажная функция по сравнению с молодыми мышами.

Нами была выдвинута гипотеза о том, что с возрастом снижается плотность представительства менингеальных лимфососудов, выполняющих важную роль в дренаже тканей ЦНС и лимфовыведения ненужных соединений. Это может приводить к снижению лимфодренажа тканей головного мозга, и как следствие, менее эффективному выведению ненужных соединений, что сопровождается их накоплением в ЦНС и ее "засорением".

Таким образом, в данном исследовании мы изучили возрастные особенности лимфодренажной функции в мозге у мышей. Интенсивность распределения красителя по тканям головного мозга и глубоких шейных лимфатических узлов молодых мышей выше по сравнению со старыми животными.

Для изучения особенностей изменения сети менингеальных лимфососудов с возрастом, проводили изучение плотности лимфососудов в

оболочках новорожденных, молодых и старых мышей с помощью конфокальной микроскопии.

Эти результаты согласуются с данными о том, что изменение морфологии менингеальных лимфососудов с возрастом сопровождается снижением лимфодренажной функции ЦНС.

Полученные новые научные данные о возрастных различиях в лимфодренажной и лимфовыводящей функциях головного мозга являются важной информативной платформой для разработки мер профилактики и терапии заболеваний ЦНС, ассоциированных с нарушением оттока жидкостей мозга и работы его лимфатической системы.

Эти результаты согласуются с данными о том, что изменение морфологии менингеальных лимфососудов с возрастом сопровождается снижением лимфодренажной функции ЦНС.

Полученные новые научные данные о возрастных различиях в лимфодренажной и лимфовыводящей функциях головного мозга являются важной информативной платформой для разработки мер профилактики и терапии заболеваний ЦНС, ассоциированных с нарушением оттока жидкостей мозга и работы его лимфатической системы.

На протяжении 4 часов наблюдения выведение красителя в венозную часть дренажа (в просвет верхнего сагиттального синуса) не наблюдалось. Венозная система дренажа тканей головного мозга включает в себя длительные процессы переноса жидкости из подпаутинного пространства в венозную кровь путем пинцитоза и активного транспорта, что требует энергии и времени, возможно, более длительного, чем 4 часа наблюдения в наших исследованиях.

Выводы. 1. По результатам конфокального анализа у старых мышей наблюдается снижение лимфодренажной функции по сравнению с молодыми животными, так как интенсивность распределения красителя по тканям головного мозга и глубоких шейных лимфатических узлов была более эффективна у молодых особей по сравнению со старыми животными;

2. У старых мышей плотность менингеальных лимфососудов уменьшается, и они становятся менее разветвленными, по сравнению с молодыми животными, что приводит к снижению лимфодренажной функции ЦНС. 1. По результатам конфокального анализа у старых мышей наблюдается снижение лимфодренажной функции по сравнению с молодыми животными, так как интенсивность распределения красителя по тканям головного мозга и глубоких шейных лимфатических узлов была более эффективна у молодых особей по сравнению со старыми животными;

2. У старых мышей плотность менингеальных лимфососудов уменьшается, и они становятся менее разветвленными, по сравнению с молодыми животными, что приводит к снижению лимфодренажной функции центральной нервной системы.