

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

Кафедра физиологии человека и животных

**МЕХАНИЗМЫ ФОТОННЫХ СТИМУЛИРУЮЩИХ ВОЗДЕЙСТВИЙ  
НА ФУНКЦИИ МЕНИНГИАЛЬНЫХ И ПЕРИФЕРИЧЕСКИХ  
ЛИМФОСОСУДОВ В ОПЫТАХ НА МЫШАХ *IN VIVO* И *IN VITRO***

АВТОРЕФРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 4 курса 424 группы

Направления подготовки бакалавриата 06.03.01 биология

Биологического факультета

Лысенко Анастасии Александровны

Научный руководитель:

доцент, канд. биол. наук \_\_\_\_\_

Е. И. Саранцева

Зав. кафедрой:

доцент, док. биол. наук \_\_\_\_\_

О. В. Семячкина-Глушковская

Саратов 2024

**Введение.** В настоящее время научные исследования все более активно обращаются к изучению роли менингеальных лимфатических сосудов в поддержании нормального функционирования головного мозга. По последним данным, эти сосуды играют ключевую роль в поддержании гомеостаза организма путем обеспечения дренажа и иммунного контроля в центральной и периферической нервной системах.

Нарушение мозговой лимфатической системы рассматривается как фактор риска развития нейровоспалительных, нейроваскулярных и нейродегенеративных заболеваний, а также нарушения восстановления после травм головного мозга.

Лимфатическая система, представляющая собой глия-зависимый механизм удаления токсинов из центральной нервной системы, становится объектом внимания для разработки новых методов стимуляции её функций. Особый интерес вызывает роль этой системы в удалении бета-амилоида (A $\beta$ ) – метаболита, накапливающегося в мозге при нарушениях сна и ассоциируемого с различными патологиями мозга. Исследования в области нейроиммунологии и нейрофизиологии показывают, что световые стимуляции, включая фотонные воздействия, могут модулировать функции менингеальных и периферических лимфососудов. Понимание этих механизмов имеет потенциал для разработки новых методов лечения и терапии заболеваний, связанных с дисфункцией лимфатической системы в нервной ткани.

Однако, несмотря на значимость этих исследований, механизмы воздействия остаются недостаточно изученными. Это обуславливает актуальность данной темы и необходимость проведения дальнейших исследований в этой области.

Поэтому целью настоящей работы явилось выявление механизмов фотонных стимулирующих воздействий на функции менингеальных и периферических лимфососудов в опытах на мышах *in vivo* и *in vitro* во время сна и бодрствования.

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

1. Изучить биоэлектрическую активность головного мозга мышей во время стадий глубокого и быстрого сна с помощью электроэнцефалографии.
2. Проанализировать эффективность неинвазивной ночной фотостимуляции лимфатического выведения бета-амилоида из тканей мозга мыши.
3. Провести мониторинг электроэнцефалографии с одновременной подачей фотовоздействия в NERM стадию сна у мышей без анестезии с анализом лимфодренажной функции методом исследования выведения красителя Evans Blue из тканей мозга с помощью *in vivo* флуоресцентной микроскопии.

**Основное содержание работы.** Все экспериментальные процедуры проводили в соответствии с установленными правилами проведения исследований на животных (Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, Institute for Laboratory Animal Research, Division on Earth and Life Studies, National Research Council of the National Academies, Guide for the care and use of laboratory animals. 8th edition. Washington: The National Academies Press; 2011. <http://oacu.od.nih.gov/regs/guide/guide.pdf> [Accessed 28 Feb 2012]). и в соответствии с международными стандартами GLP.

Исследования проводили на половозрелых самцах мышей BALB/c (25±4 гр.). Экспериментальные животные были получены в питомнике «Андреевка» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России (г. Пущино, р-н п. Андреевка, Солнечногорский р-он, Московская область, Россия). Они содержались в стандартных условиях вивария лаборатории «Умный сон» ФГБОУ ВО «Саратовский государственный университет» в контролируемых условиях: температура 25±2 °С, 55% влажности и естественном световом режиме (12/12 часов свет/темнота). Все процедуры проводились в соответствии с «Руководством по уходу и использованию лабораторных животных».

Период адаптации животных к условиям содержания составлял не менее 7 дней. Протокол экспериментов одобрен Комитетом по уходу и использованию лабораторных животных в Саратовском государственном университете (Протоколы № 13 от 07.02.2017 г.).

Эксперименты проводились в следующих группах:

1. Бодрствующие мыши без фотовоздействия;
2. Бодрствующие мыши + фотовоздействие;
3. Спящие мыши без фотовоздействия;
4. Спящие мыши + фотовоздействие;

n = 5 в каждой группе.

В ходе исследования были использованы следующие методы:

1. Введение  $\beta$ -амилоида 1-42 ( $A\beta$ , Sigma-Aldrich, USA) – это экспериментальная процедура, которая проводится на лабораторных животных с целью изучения влияния  $A\beta$  на определенные процессы в организме.

Для введения  $\beta$ -амилоида ( $A\beta$ , Sigma-Aldrich, USA) использовали Hamilton с иглой 29-G (Bonaduz, Швейцария). Скорость введения составляла 0,1 мкл/мин. Мыши были подвергнуты газовой изофлурановой анестезии, для этого использовали изофлуран в концентрации 1% и газовую смесь  $N^2O/O^2$  в соотношении 70/30. Скорость потока газовой смеси составляла 1 литр/мин. Введение  $\beta$ -амилоида осуществляли по стереотаксическим координатам от точки *Bregma*. Координаты составляли: AP – 2,0 мм; ML +/- 1,3 мм; DV – 1,9 мм.

В ходе работы было выявлено, что  $A\beta$  интенсивно выводится из тканей мозга в глубокие шейные лимфатические узлы во время сна.

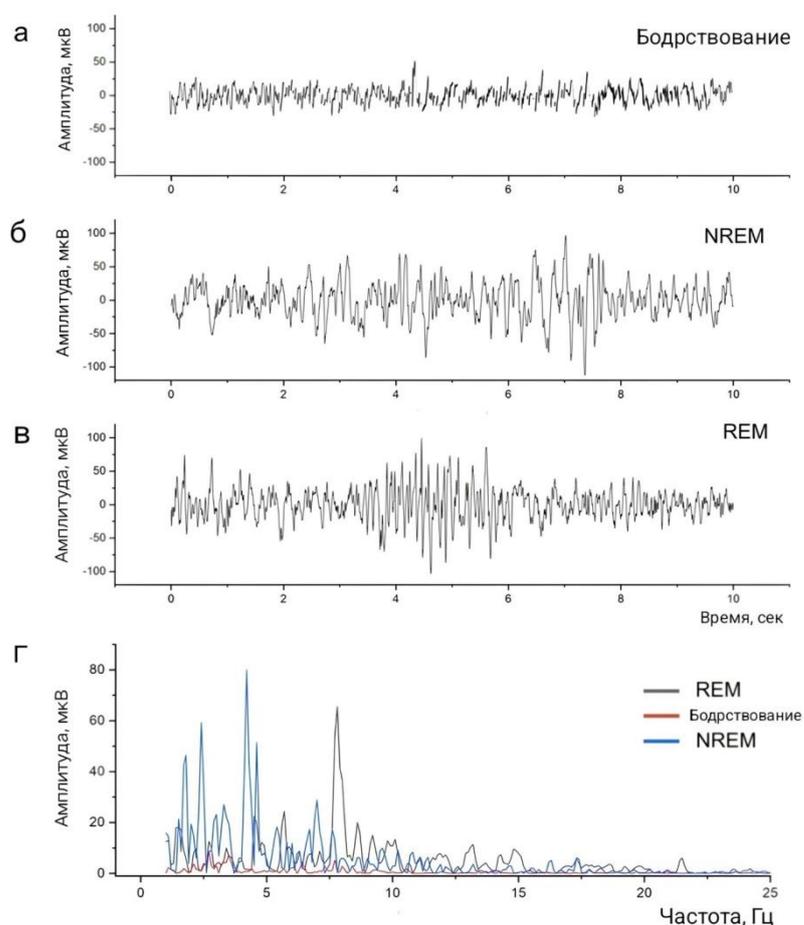
2. Регистрация ЭЭГ – это процесс записи электрической активности мозга с помощью электроэнцефалографии.

Для проведения процедуры были подготовлены два серебряных электрода с диаметром наконечника 2-3 мкм. Электроды располагались на глубине 150 мкм в координатах (L: 2,0 мм и P: 2 мм) от точки *Bregma* по обе

стороны от средней линии. Мыши были введены в состояние ингаляционной анестезии 1% изофлураном. Для этого использовали изофлуран производства компании Sigma-Aldrich (Сент-Луис, США) со скоростью 1 л/мин N<sup>2</sup>O/O<sup>2</sup> в соотношении 70/30).

После введения анестезии были просверлены небольшие трепанационные отверстия в черепе мыши, в которые была установлена головная пластина. Контакты электродов ЭЭГ были вставлены в трепанационные отверстия с одной стороны от средней линии между черепом и лежащей в основе твердой мозговой оболочкой. Отведения (контакты датчика) ЭЭГ были спаяны и закреплены стоматологическим акрилом (Zhermack SpA, Бадия Полесине, Италия).

Сигналы оценивали с помощью программы Clampex 10.2 (1000 Гц с использованием MATLAB script: <http://chronus.org>). Фазы бодрствования, NREM и REM были определены путем сравнения показателей мощности сигналов ЭЭГ. Переход мышей ко сну, как NREM, так и REM-фазе, характеризуется увеличением общей амплитуды сигналов ЭЭГ (рисунок 1).



(а) – электроэнцефалограмма во время стадии бодрствования; (б) – электроэнцефалограмма во время стадии NREM (глубокого сна); (в) – электроэнцефалограмма во время стадии REM (быстрого сна); (г) – совмещенные ритмы

Рисунок 1 – Ритмы электрических колебаний в разные фазы сна

### 3. Фотовоздействие на лимфатические сосуды.

Процедура фиксации головной пластины со светодиодом для фотовоздействия проводилась в несколько этапов. Мыши были введены в состояние ингаляционной анестезии 1% изофлураном. Для этого использовали изофлуран производства компании Sigma-Aldrich (Сент-Луис, США) со скоростью 1 л/мин  $N^2O/O^2$  в соотношении 70/30). После введения анестезии, головную пластину со светодиодом фиксировали в области теменной и межтеменной костей с помощью стоматологического акрила

(Zhermack SpA, Бадиа Полесине, Италия). Светодиод был прикреплен к головной пластине двумя винтами.

Во всех экспериментах применяли лазерный диод с длиной волны LD-1267-FBG-350 (Innolume, Дортмунд, Германия). Доза излучения составляла 9 Дж/см<sup>2</sup> и 3 Дж/см<sup>2</sup>. Эксперимент проводили по следующему алгоритму: 17 минут – излучение, 5 мину – пауза. Общая продолжительность исследования составила 61 минуту.

Фотовоздействие осуществляли в области базальных менингеальных лимфатических сосудов, осуществляющих лимфодренажную и очистительную функции. Фотостимуляция существенно усиливает механизмы лимфатического выведения Аβ токсина из мозга, причем более выражено в момент глубокого сна, чем в условиях бодрствования (рисунки 2, 3).

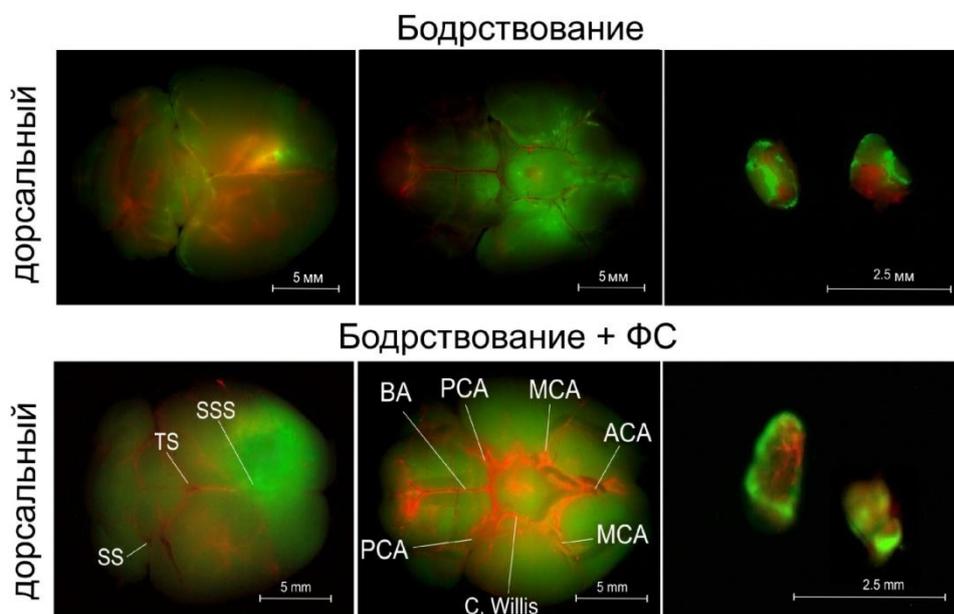


Рисунок 2 – Изображение полнопольной флуоресцентной микроскопии распределения бета-амилоида по дорсальное и вентральной частям мозга, а также его накопления в глубоких шейных лимфоузлах через 3 часа после введения токсина в правый боковой желудочек у мышей во время бодрствования до и после фотовоздействия

Результаты ясно демонстрируют, что ФС-опосредованная стимуляция системы выведения метаболитов мозга сопровождается активацией сократительной способности лимфатической системы, связанной с последующим внутриклеточным производством активных форм кислорода и оксида азота, лежащих в основе лимфатической релаксации (рисунок 3).

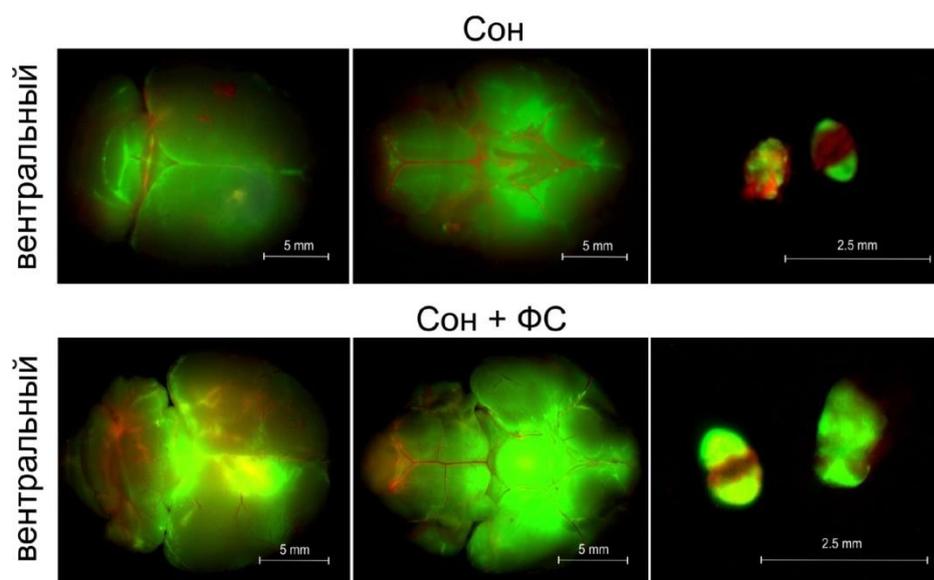


Рисунок 3 – Изображение флуоресцентной микроскопии распределения бета-амилоида по дорзальной и вентральной частям мозга, а также его накопление в глубоких шейных лимфоузлах через 3 часа после введения токсина в правый боковой желудочек у мышей во время сна до и после фотовоздействия

#### 4. Конфокальный анализ

Для конфокального анализа было произведено извлечение головного мозга и глубоких шейных узлов. Ткани фиксировали в 2% формалине в течение двух дней и в 20% сахарозе в течение суток. Это было сделано для того, чтобы сохранить структуру тканей и предотвратить их разложение. На вибротоме делали срезы толщиной 50 и 200 мкм. Срезы изготавливались для получения тонких слоев ткани, которые можно было бы исследовать под микроскопом.

Микроскопия проводилась с использованием конфокального микроскопа (Nikon, 2020, Япония). При анализе фотоснимков использовали программу ImageJ и подсчитывали интенсивность флуоресцентного сигнала от бета-амилоида (плагин “Analyze Particles” во вкладке “Analyze”). Этот плагин позволяет оценить суммарную интенсивность сигнала (“Total Area”).

#### 5. Введение в желудочки мозга красителя Evans Blue.

Под общей анестезией (миорелаксант ксиланит 50 мкл + золетил 100 мкл) мышь помещалась и фиксировалась в стереотаксическом аппарате. С помощью микроманипулятора Hamilton была сделана пункция черепа мыши в области правого бокового желудочка. Краситель Evans Blue вводили в желудочек (AP, 1.0 mm; ML, -1.4 mm; DV, 3.5 mm) в объеме 5 мкл (5% Sigma-Aldrich) . Введение осуществляли на глубину 2 мм с помощью иглы 34-G Hamilton со скоростью 0,1 мкл / мин (Harvard Apparatus, США) до и после применения фотовоздействия. Визуализацию лимфатического вывода красителя в глубокие шейные лимфоузлы проводили с использованием конфокального микроскопа (Nikon, 2020, Япония).

Результаты показали, что через 1 час после введения красителя в ткани мозга, глубокий шейный поверхностный узел окрашивался в синий цвет. В поверхностных шейных лимфоузлах изменений практически не было, как показано на рисунке 4.

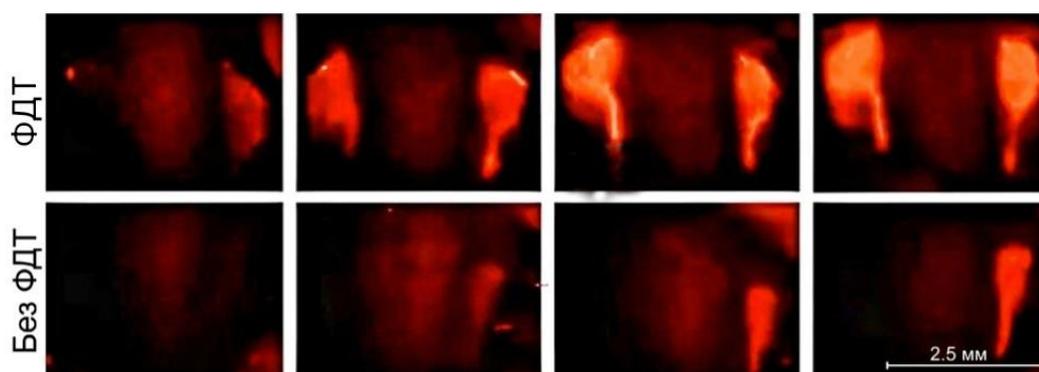


Рисунок 4 – Изображения, полученные в эксперимента *in vivo* с применением флуоресцентной микроскопии для изучения клиренса красителя Evans Blue из правого бокового желудочка в глубокий шейный лимфоузел у интактных мышей до и после фотовоздействия

6. Изоляция и культивирование клеток лимфатического эндотелия из брыжейки.

Метод использовался для изучения клеток лимфатического эндотелия из ткани брыжейки. Клетки лимфатического эндотелия играют важную роль в иммунной системе организма, обеспечивая транспорт лимфы и участвуя в иммунном ответе.

Слизистую оболочку брыжеечной лимфатической ткани собирали и помещали на 35-мм пластины, содержащие ледяной фосфатно-солевой буфер, и разрезали на небольшие (1 мм) фрагменты. Фрагменты инкубировали в 0,25% растворе коллагеназы А (Roche Diagnostics, Базель, Швейцария) при 37°C. Суспензию пропускали через нейлоновую сетку 100 мкм и центрифугировали при 1800 об/мин в течение 4 мин при 48°C. Осадок клеток ресуспензировали в сбалансированном солевом растворе Хэнка.

Клетки лимфатического эндотелия выделяли с использованием кроличьего антитела к крысиному подопланину (Sigma Chemical, Сент-Луис, Миссури, США) в разведении 1:100 в качестве первичного антитела вместе с вторичными козьими антикроличьими антителами (система MACS, Miltenyi Biotec, Bergisch). Клетки выращивали в среде Игла, модифицированной Дульбекко, с добавлением 20% эмбриональной телячьей сыворотки, 50 ЕД/мл пенициллина и 50 мг/мл стрептомицина.

Полученные результаты показывают, что фотовоздействие сопровождается повышением проницаемости лимфатического эндотелия для красителей за счёт временного снижения экспрессии белков плотных контактов и трансэндотелиальной резистентности. Рисунок 5.

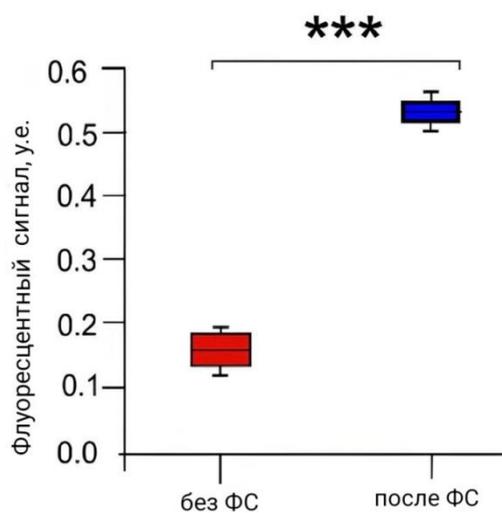


Рисунок 5 – Данные по измерению диаметра шейных лимфососудов

Благодаря статистической обработке, были получены данные, которые показали, что флуоресцентный сигнал после фотостимуляции выше в 3 раза. Воздействие лазера увеличивает сократительную способность лимфатических сосудов, увеличивая дренаж и скорость очищения мозга от метаболитов.

## ВЫВОДЫ

1 В ходе изучения биоэлектрической активности головного мозга мышей во время стадии глубокого сна отмечается замедление частоты электрических колебаний в мозге мышей, наличие характерных медленных волн (дельта-волн) с частотой менее 4 Гц. В то же время, во время быстрого сна наблюдается повышение частоты электрических колебаний и появление характерных быстрых волн (бета- и гамма-волны).

2 Результаты ясно показывают, что выведение бета-амилоида из мозга мышей происходит преимущественно во время сна. Более эффективный лимфатический клиренс  $A\beta$  наблюдается во время ночной фотостимуляции. Причиной могут служить циркадные колебания уровня  $A\beta$  в головном мозге.

3 Фотостимуляция расширяет лимфатические сосуды, что приводит к активации лимфодренажной системы. Влияние на тонус и проницаемость менингеальных лимфососудов способствует более быстрому выведению бета-амилоида из тканей мозга в глубокие шейные лимфатические узлы в NERM стадию сна у мышей.