

МИНОБРНАУКИ РОССИИ

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования

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

Кафедра физиологии человека и животных

**МЕХАНИЗМЫ ФОТОТЕРАПИИ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА У  
МЫШЕЙ В БОДРСТВОВАНИИ И ВО СНЕ: РОЛЬ МЕНИНГЕАЛЬНОЙ  
ЛИМФАТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студента 4 курса 421 группы

Направления подготовки бакалавриата 06.03.01 Биология

Биологического факультета

Тужилкина Матвея Алексеевича

Научный руководитель:

доцент, док.биол. наук

Глушковская

\_\_\_\_\_

О. В. Семячкина-

(подпись, дата)

Зав. кафедрой:

доцент, док.биол. наук

Глушковская

\_\_\_\_\_

О. В. Семячкина-

(подпись, дата)

Саратов 2024

**Введение.** Одним из распространяющихся заболеваний головного мозга на данный момент является болезнь Альцгеймера (БА), начинающееся с потери памяти и приводящее к проблемам с мышлением, речью, ориентацией и поведением. С 1990 по 2019 г. заболеваемость БА увеличилась на 147%. Сообщалось, что глобальное число пожилых людей с БА удваивается каждые 5 лет. На основании данных, полученных из базы данных Global Burden of Disease за 2019 г., к 2060 г. заболеваемость БА утроится. Фармакологическая терапия БА не показала эффективности и безопасности. Действительно, рандомизированные клинические испытания адуканумаба третьей фазы ENGAGE, проведенные на 3285 пациентах с БА, сообщают о различных последствиях, связанных с терапией, включая отеки (35,2%), головную боль (46,6%), спутанность сознания (14,6%), головокружение (10,7%), тошноту (7,8%), микрокровоизлияния и поверхностный сидероз у 197 участников (19,1%) и 151 участника (14,7%) соответственно.

Фотобиомодуляция (ФБМ) — немедикаментозный подход, основанный на использовании красного или ближнего инфракрасного света, показавший очень многообещающие результаты в терапии БА в пилотных клинических исследованиях и исследованиях на животных. Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (FDA) США признало ФБМ безопасной, поскольку ФБМ является неинвазивным методом без каких-либо побочных эффектов. Имеются данные о том, что повышение метаболизма и микроциркуляции в тканях головного мозга, а также снижение окислительного стресса и воспаления являются механизмами действия ФБМ. Недавно было обнаружено, что ФБМ эффективно стимулирует лимфатическое удаление отходов и токсинов, в том числе амилоида- $\beta$  ( $A\beta$ ), из головного мозга.

Лимфатические сосуды мозга активируются во время глубокого сна. Клиренс  $A\beta$  наблюдается только во время глубокого сна или nonrapid eye movement (NREM), тогда как бодрствование сопровождается

подавлением выведения токсинов из головного мозга мышей. Позже мы продемонстрировали, что ФБМ во время глубокого сна по сравнению с бодрствованием обеспечивает лучшую терапию БА у мышей. В настоящее время сон рассматривается как информативная платформа для разработки перспективных терапевтических подходов к патологии БА. Однако вопрос о том, почему ФБМ во время сна более эффективен в терапии БА, чем во время бодрствования, остается малоизученным. В этом исследовании мы изучали роль менингеальных лимфатических сосудов в механизме связанной с ФБМ стимуляции удаления А $\beta$  из мозга мышей во время глубокого сна и бодрствования.

Целью данного исследования явилась разработка оптической технологии для терапии болезни Альцгеймера у мышей во время глубокого сна.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Исследовать эффективность выведения флуоресцентного А $\beta$  (ФА $\beta$ ) из тканей головного мозга мышей после фото-повреждения МЛС с применением конфокальной микроскопии;
2. Изучить возможность восстановления лимфодренажной и лимфовыводящей функции у мышей после фото-повреждения МЛС с помощью 7-ми дневного курса ФБМ и сравнить его эффективность во сне и бодрствовании с применением технологии введения ФА $\beta$  в боковой правый желудочек и в гиппокамп с последующим конфокальным анализом распределения ФА $\beta$  по тканям головного мозга и в его оболочках;
3. Провести конфокальный анализ присутствия ФА $\beta$  в оболочках головного мозга мышей с нормальными и поврежденными МЛС до и после ФБМ;

В современном мире огромную проблему для здравоохранения составляют нейродегенеративные заболевания, в том числе старческая

деменция, большинство случаев которой (60-70%) вызваны болезнью Альцгеймера. По состоянию на 2020 год в мире насчитывалось около 50 миллионов человек с болезнью Альцгеймера. Чаще всего она начинается у людей старше 65 лет, хотя до 10% случаев имеют раннее начало, поражая людей в возрасте от 30 до 60 лет. Она поражает около 6% людей в возрасте 65 лет и старше, и женщин чаще, чем мужчин.

Болезнь Альцгеймера характеризуется медленным и постепенным развитием. Наиболее ранним её симптомом обычно являются трудности с запоминанием недавних событий, однако постепенно, по мере прогрессирования заболевания, симптоматика отягощается, и у пациентов появляются: проблемы с речью, дезориентация и нарушения пространственного гнозиса (вплоть до потери места жительства), перепады настроения, отсутствие мотивации, пренебрежительное отношение к себе и прочие поведенческие нарушения. По мере прогрессирования заболевания и ухудшения своего состояния, пациенты, страдающие от болезни Альцгеймера, часто отдаляются от семьи, перестают быть активными участниками общественной жизни, замыкаются в себе, что вызывает развитие различных психических расстройств, только усугубляющих состояние больного. Скорость прогрессирования заболевания вариативна, но ожидаемая продолжительность жизни пациентов, после постановки диагноза – от трёх, до девяти лет. Причиной смерти больных, обычно является угнетение жизненных функций, обусловленное дегенерацией нервной ткани.

Причины возникновения болезни Альцгеймера весьма плохо изучены, однако, на данный момент, установлено большое количество как генетически детерминированных, так и чисто экологических факторов риска её развития, которые включают травму головы в анамнезе, повышенное кровяное давление, клиническую депрессию; однако крупнейшим известным генетическим фактором риска в различных этнических группах является аллель АРОЕ, во варианте Е4.

Однако, стоит уточнить, что вариант E4 не коррелирует с риском в различных популяциях. Например, у нигерийцев, имеющих самую высокую частоту аллеляAPOE4, болезнь Альцгеймера встречается редко, что может быть связано с низким уровнем холестерина в их популяции. В то же время, у европейцев, имеющих два аллеляAPOE4, риск развития болезни Альцгеймера к 75 годам в 10-30 раз выше, что может быть вызвано взаимодействием аполипопротеина E4 с амилоидом. Болезнь Альцгеймера сопровождается накоплением агрегатов  $\beta$ -амилоида. Аполипопротеин E же, усиливает протеолиз $\beta$ -амилоида как внутри клеток, так и в межклеточном пространстве, а поскольку его изоформаAPOE- $\epsilon$ 4 не так эффективна в стимулировании этих реакций, как другие, -это приводит к повышенному риску развития болезни Альцгеймера у носителей этой вариации гена.

Хотя 40-65% пациентов с болезнью Альцгеймера, имеют, по крайней мере одну копию аллеля  $\epsilon$ 4, APOE4 не является определяющим фактором заболевания. По крайней мере, у трети пациентов с болезнью Альцгеймера наличествует отрицательный уровень APOE4, кроме того, у некоторых гомозигот APOE4 заболевание никогда не развивается. Тем не менее, у людей с двумя аллелями  $\epsilon$ 4 риск развития БА в 20 раз выше. Есть также доказательства того, что аллель APOE2 может выполнять защитную роль, при болезни Альцгеймера.

Течение болезни Альцгеймера действительно связано с амилоидными бляшками и нейрофибрилярными клубками, а также с утерей нейронных связей в мозге, но начальные симптомы этого заболевания очень часто принимаются за нормальное старение мозга, так как для постановки точного диагноза необходимо проводить исследование тканей мозга, а это возможно лишь *ex vivo*.

Причины болезни Альцгеймера остаются до конца не выясненными, но их выявление на данный момент является важным направлением биомедицинских исследований. Существует несколько конкурирующих

гипотез, так или иначе объясняющих основную причину болезни Альцгеймера.

Основной гипотезой, объясняющей причины болезни Альцгеймера, является появившаяся в 1991 году амилоидная гипотеза. Её сторонники считают основной причиной заболевания внеклеточные отложения  $\beta$ -амилоида ( $A\beta$ ). Это подтверждается расположением гена белка-предшественника амилоида на 21-ой хромосоме, а также тем, что у людей с дополнительной копией этого гена за счёт трисомии 21-ой хромосомы (синдром Дауна), повсеместно наблюдаются проявления болезни Альцгеймера к 40 годам.

Когда в мозге образуется аномальное количество  $\beta$ -амилоида – он накапливается в межклеточном пространстве в виде амилоидных бляшек, и  $\tau$ -белков, или внутриклеточно в виде нейрофибриллярных клубков, что приводит к прогрессирующей потере функции мозга. Достижения в методах визуализации мозга позволяют исследователям наблюдать развитие и распространение аномальных амилоидных и  $\tau$ -белков *in vivo*, а также изменения в структуре и функциях мозга.  $\beta$ -амилоид сам по себе представляет из себя фрагмент более крупного белка. Когда эти фрагменты объединяются вместе, они оказывают токсическое воздействие на нейроны, из-за чего нарушается межклеточная коммуникация. Таким образом, с течением времени в тканях мозга образуются всё более-и-более крупные отложения, которые и называются амилоидными бляшками.

При болезни Альцгеймера происходит разрушение нейронов и синапсов, как в коре головного мозга, так и в некоторых подкорковых её областях, что неизбежно приводит к грубой их атрофии. Дегенерации подвергаются теменные, височные, лобные доли коры головного мозга, а также поясная извилина. Кроме того, дегенерируют ядра ствола головного мозга и голубое пятно моста. Нейрофибриллярные клубки и бляшки  $\beta$ -амилоида особенно распространены в гиппокампе больных, что хорошо обнаруживается при микроскопии мозга. У многих пожилых людей в тканях мозга могут

обнаруживаются нейрофибрилярные клубки и амилоидные бляшки, но у людей, страдающих болезнью Альцгеймера, их количество сильно увеличено в отдельных областях мозга, таких как височная доля, что может также сопровождаться наличием в тканях телец Леви, которые обычно связывают с болезнью Паркинсона.

Бляшки состоят из небольших пептидов, длиной 39-43 аминокислоты, называемых  $\beta$ -амилоидом.  $\beta$ -амилоид представляет собой фрагмент более крупного белка-предшественника  $\beta$ -амилоида (БПА), трансмембранного белка, который, проникая через мембрану нейрона, имеет решающее значение для роста нейронов, их выживания и восстановления после травмы [82, 83]. При болезни Альцгеймера  $\gamma$ -секретаза и  $\beta$ -секретаза действуют совместно в протеолитическом процессе, который вызывает разделение БПА на более мелкие фрагменты. Один из этих фрагментов дает начало фибриллам  $\beta$ -амилоида, которые затем образуют сгустки, которые откладываются вне нейронов в плотных образованиях, известных как амилоидные бляшки.

Каждый нейрон имеет цитоскелет, частично состоящий из структур, называемых микротрубочками. Эти микротрубочки действуют как дорожки, направляя питательные вещества и молекулы из тела клетки к концам аксона и обратно.  $\tau$ -белок стабилизирует микротрубочки при фосфорилировании но, при болезни Альцгеймера гиперфосфорилируется, начинает соединяться с другими нитями, создавая нейрофибрилярные клубки и разрушая транспортную систему нейрона, чем может вызывать его гибель, из-за нарушения регуляции переносимых элементов.

На данный момент достоверно неизвестно, как именно нарушения выработки и агрегации  $\beta$ -амилоида приводят к болезни Альцгеймера. Некоторые исследования указывают, в числе прочего, на роль иммунных маркеров, таких как воспаление и цитокины в патологии болезни Альцгеймера. Очевидно, что системное воспаление, вызванное, например, ожирением, может влиять на иммунные процессы, способствуя

прогрессированию заболевания. Кроме того, при болезни Альцгеймера были описаны изменения в распределении различных нейротрофических факторов.

Хорошо известна такая особенность протекания болезни Альцгеймера, как снижение активности холинергических нейронов. Следовательно, для лечения используют ингибиторы ацетилхолинэстеразы, снижающие скорость расщепления ацетилхолина, и борющиеся таким образом с его дефицитом, возникающим в следствие гибели холинергических нейронов. Кроме них, существует препарат мемантин, действие которого основано на блокировке NMDA-рецепторов, что ингибирует их чрезмерную стимуляцию глутаматом, приводящую при болезни Альцгеймера к гибели нервных клеток в следствие явления эксайтотоксичности.

Эти фармакологические методы лечения показали себя неэффективными.

Таким образом, эффективных фармацевтических методов лечения болезни Альцгеймера на данный момент не существует, а доступные методы лечения, борясь не с причиной, а со следствиями, являются паллиативными по своей природе. Это тем более заставляет нас обратиться к немедикаментозным методам, в поисках эффективного способа терапии неизлечимого заболевания.

#### *Объект исследования.*

Во всех экспериментах использовали мышей-самцов линии C57BL/6 (25–28 г), полученных из Национального лабораторного центра ресурсов животных (Пушино, Москва, Россия).

На первом этапе мы проверили эффективность действия ФБМ в восстановлении лимфодренажа головного мозга после повреждения МЛС. При этом, фотоабляция МЛС сопровождалась значительным подавлением распределения ФАβ в ликворной системе головного мозга по сравнению с контролем. Интенсивность флуоресцентного сигнала от ФАβ была в 4,28 раза и в 12,06 раз меньше в группе 5-АЛК+лазер 635 нм (фотоабляция) по сравнению с контрольными группами, включая группы лазер и 5-АЛК+лазер соответственно.



В целом эти результаты подтверждают, что повреждение МЛС связано со значительным снижением мозгового лимфатического оттока.

7-дневный курс ФБМ улучшал распространение ФАβ в мозговой жидкости, что было более выражено в группе «ФБМ во время глубокого сна» по сравнению с группой «ФБМ во время бодрствования». Так, после ФБМ интенсивность флуоресцентного сигнала от ФАβ была в 5,52 раза выше в группе «ФБМ во время сна» и в 2,61 раза больше в группе «ФБМ во время бодрствования». Таким образом, лимфодренаж головного мозга был в 2,11 раза выше у мышей после курса ФБМ во время сна по сравнению с бодрствованием.

На следующем этапе мы проанализировали влияние 7-дневного курса ФБМ во время сна и бодрствования на присутствие ФАβ в мозговых оболочках как важного пути выведения Аβ из мозга, при этом было показано присутствие ФАβ в просвете МЛС, что позволяет предположить, что МЛС являются путем удаления ФАβ из головного мозга.

Эти результаты ясно показывают, что фотоабляция подавляла выведение ФАβ более эффективно при применении 7-дневного курса ФБМ во время глубокого сна, чем во время бодрствования, интенсивность сигнала была в 4,00 и в 1,14 раза больше, по сравнению с другими группами, где интенсивность сигнала от ФАβ в мозговых оболочках была в 8,75 и 2,85 раза меньше в группе «5-АЛК+лазер» по сравнению с группами «Лазер» и «5-АЛК» соответственно ( $0,05 \pm 0,005$  а.е. против  $0,23 \pm 0,035$  у. Уитни критерий). Эти данные свидетельствуют о значительном подавлении выведения Аβ из головного мозга через мозговые оболочки после повреждения МЛС.

Таким образом, ФБМ улучшал клиренс ФАβ через мозговые оболочки, что было более выражено при использовании фотобиомодуляции во время глубокого сна по сравнению с бодрствованием.

На заключительном этапе изучали эвакуацию ФАβ из гиппокампа и после повреждения МЛС, а также после ФБМ во время глубокого сна и бодрствования. Нами было показано, что фотоабляция МЛС подавляла

выведение ФАβ из гиппокампа, так как, уровень ФАβ в гиппокампе был в 6 и 8 раз выше у мышей с поврежденными МЛС по сравнению с контролем, в том числе в группах «5-АЛК» и «Лазер» соответственно. Курс ФБМ во время глубокого сна и в состоянии бодрствования обеспечивал восстановление выведения ФАβ из гиппокампа. Однако уровень его сигнала в гиппокампе после курса ФБМ во время глубокого сна был в 2,3 раза меньше, чем после курса ФБМ в состоянии бодрствования ( $0,73 \pm 0,13$  а. – U-критерий Уитни). Таким образом, эта серия экспериментов ясно показывает, что ФБМ более эффективно стимулирует выведение ФАβ из гиппокампа во время сна по сравнению с бодрствованием.

*Выводы:*

- 1 Возбуждение лазером 635нм 5-АЛА приводит в фотоповреждению МЛС у мышей, что сопровождается подавлением лимфодренажной и лимфовыводящей функций головного мозга;
- 2 Курс ФБС в течение 7 дней является эффективным методом восстановления лимфодренажной и лимфовыводящей функции головного мозга у мышей. Причем применение ФБС во время сна оказывает более выраженные терапевтические эффекты, чем во время бодрствования;
- 3 7-и-дневный курс ФБС во сне эффективнее стимулирует лимфатическое выведение ФАβ у мышей, чем курс ФБС во время бодрствования;
- 4 МЛС являются туннелями выведения ФАβ у мышей и терапевтическими мишенями для ФБС.