

МИНОБРНАУКИ РОССИИ

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования

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

Кафедра физиологии человека и животных

**ТЕХНОЛОГИЯ ФОТОБИОСТИМУЛЯЦИИ ДРЕНАЖНОЙ СИСТЕМЫ  
МОЗГА ВО ВРЕМЯ СНА ДЛЯ УЛУЧШЕНИЯ ОБУЧЕНИЯ И  
ПАМЯТИ У МЫШЕЙ**

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 2 курса 243 группы

Направления подготовки магистратуры 06.04.01 Биология

Биологического факультета

Адушкиной Виктории Вячеславовны

Научный руководитель

доцент, канд. биол. наук

\_\_\_\_\_

Е.И. Саранцева

(подпись, дата)

Зав. кафедры

доцент, док. биол. наук

\_\_\_\_\_

О. В. Семячкина–Глушковская

(подпись, дата)

Саратов 2024

## ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время все больше интереса ученые всего мира проявляют к технологии фотобиостимуляции (ФБС), которую все чаще применяют в медицине. Особого внимания в последние годы заслуживают возможности этого метода при патологиях центральной нервной системы. Традиционно считалось, что механизмы терапевтического воздействия ФБС заключаются в повышении в метаболизме и микроциркуляции мозговой ткани, а также в снижении окислительного стресса и воспаления [1]. Недавно было обнаружено, что ФБС также может эффективно стимулировать функции менингеальных лимфатических сосудов (МЛС) [2,3]. Действительно, серия экспериментальных исследований показала, что ФБС стимулирует лимфатическое выведение токсинов и метаболитов из тканей мозга грызунов [4]. ФБС активирует лимфатическую прокачку посредством регуляции цикла сокращения и расслабления лимфатических сосудов (ЛС) путем активации внутриклеточных активных форм кислорода. Предполагается, что ФБС также может приводить к ангио- и лимфангиогенезу, который может быть еще одним механизмом, ответственным за опосредованную ФБС стимуляцию дренажной системы мозга (ДСМ) [4]. Известно, что дренажная функция сосудов мозга активизируется во время сна. В этот период усиливаются обменные процессы между тканями мозга и кровью за счет расширения периваскулярных пространств (ПВП), что способствует перемещению мозговых жидкостей. Однако не каждый сон способен активировать ДСМ. Считается, что только глубокая стадия сна или дельта-активность мозга сопровождаются путем интенсивного выведения отходов жизнедеятельности, метаболитов и токсинов из головного мозга. Во время бодрствования размер ПВП уменьшается, и обмен между жидкостями и тканями мозга нарушается. Таким образом, сон является движущим фактором для удаления ненужных молекул из мозга.

Основываясь на новых данных, была предложена идея использования ФБС во время глубокого сна в качестве нового многообещающего

направления в улучшении когнитивных и исполнительных функций, внимания и памяти, так как ФБС – это терапевтический метод, основанный на использовании красного или ближнего инфракрасного излучения, который показал очень многообещающие результаты в лечении различных видов деменции, депрессии и других нейрокогнитивных расстройств. Хотя ФБС обычно используется в бодрствующем состоянии, в настоящее время еще не разработаны технологии фотобиостимуляции, которые могли бы применяться во время стадии глубокого сна. Поэтому при технологии ФБС под контролем ЭЭГ возможна стимуляция ДСМ во время глубокого сна, что может привести к улучшению обучения и памяти у лабораторных животных.

Целью данной работы являлось развитие новой технологии фотобиостимуляции дренажной системы мозга во время сна для улучшения обучения и памяти у мышей.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Зарегистрировать сигналы электроэнцефалографии (ЭЭГ) головного мозга мышей во время бодрствования и сна для определения стадии глубокого сна;
2. Провести поведенческие тесты павловско–инструментального переноса (ПИП) и распознавания новых объектов для выявления когнитивных способностей у лабораторных животных;
3. Определить возможности лимфатического выведения токсинов из тканей мозга во время стадии глубокого сна с последующей визуализацией с помощью конфокального микроскопа.

## Основная часть

Недавние данные свидетельствуют о том, что менингеальные лимфатические сосуды играют решающую роль в поддержании гомеостаза головного мозга, выводя макромолекулы как через спинномозговую жидкость, так и через интерстициальную жидкость из центральной нервной системы в шейные лимфатические узлы. Нарушение мозговой лимфатической системы рассматривается как фактор риска развития нейровоспалительных и нейроваскулярных заболеваний, нарушения восстановления после травм головного мозга [1]. Когнитивная дисфункция может ухудшать способность к обучению и память, сопровождаясь возможной афазией, апраксией, агнозией или дислексией. Из-за своей невосприимчивости и вредности когнитивная дисфункция оказывает большое социальное воздействие впоследствии. Кроме того, доклинические исследования показали нарушение менингеальной лимфатической функции при нейродегенеративных заболеваниях, таких как болезнь Альцгеймера (БА) и болезнь Паркинсона (БП). Фактически, нарушение функции МЛС является фактором, способствующим развитию БА, и ускоряет агрегацию бета-амилоида ( $A\beta$ ) [2]. Предварительные результаты предыдущих исследований на мышинной модели БА проливают свет на потенциальное влияние ФБС на дренажную систему головного мозга через клиренс  $A\beta$  через МЛС [3,4]. Последующие исследования также показали, что опосредованное ФБС-повышение проницаемости гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) может привести к дальнейшей активации лимфатического клиренса  $A\beta$  из головного мозга.

Согласно гипотезе, что дренажная система мозга (ДСМ) является основным движущим фактором для удаления метаболитических отходов из спящего мозга во время глубокого сна [5], размер периваскулярных пространств и объем ИСЖ увеличиваются, способствуя удалению метаболитов из тканей головного мозга. Во время бодрствования размер периваскулярных пространств уменьшается, а обмен между жидкостями и

мозговой тканью подавляется. Аналогичные изменения наблюдаются при развитии БА, что связано с подавлением функций ДСМ, что приводит к накоплению Аβ в тканях головного мозга.

Биологический эффект оптического излучения с длиной волны 1267 нм и 1050 нм связан с прямым возбуждением синглетного кислорода. Длина волны 1267 нм переводит молекулу кислорода в основном состоянии в первое возбужденное синглетное состояние без дополнительной энергии колебаний. Ширина полосы составляет относительно 20 нм. Полоса 1065 нм отражает переход молекулы основного состояния в первое возбужденное синглетное состояние, с одновременным возбуждением его первого колебательного уровня. Полоса также относительно широкая –  $\pm 15$  нм. Коэффициент поглощения меньше, чем при переходе на 1270 нм. После возбуждения энергия колебаний очень быстро затухает, выделяя тепло в окружающую среду, поэтому для любых практических биологических целей возбуждение при длине волны 1065 нм равно возбуждению при длине волны 1270 нм. Использование 1065 нм предпочтительнее в биологических исследованиях из-за десятикратные снижения водопоглощения по сравнению с 1270 нм [6].

Несмотря на то, что полоса излучения светодиода частично перекрывалась с полосой излучения с выделенным кислородом, был продемонстрирован значительный эффект ФБС с использованием светодиодного источника света, который может быть очень полезен в дальнейшем для применения метода ФБС у людей.

## **Материалы исследования**

### *Объекты исследования*

Во всех экспериментах использовали самцов мышей линии C57BL/6 (25–28 г, возраст 3 месяца), которые были получены из Национального центра лабораторных исследований животных в Пущино (Московская область, Россия). Животные содержались в стандартных лабораторных условиях с неограниченным доступом к пище и воде. Все экспериментальные процедуры проводились в соответствии с «Руководством по уходу за лабораторными

животными и их использованию», Директива 2010/63/ЕС о защите животных для научных целей, а также руководящие принципы Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (№ 742 от 13.11.1984), которые были одобрены комиссией по биоэтике Саратовского государственного университета (протокол № 8 от 18.04.2023). Мышей содержали при температуре  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , влажности 55% и цикле свет–темнота в течение 12:12 часов (светло с 08:00 утра до 08:00 вечера).

Мыши адаптировались к условиям эксперимента в течение одной недели перед началом экспериментов, чтобы обеспечить акклиматизацию к помещению для содержания животных. Эксперименты проводились в следующих группах: (1) без ФБС, ЭЭГ–контроль бодрствования; (2) отсутствие ФБС, ЭЭГ–контроля глубокого сна; (3) ФБС во время глубокого сна; (4) ФБС во время бодрствования;  $n = 7\text{--}8$  в каждой группе на всех сеансах экспериментов.

#### **Методы исследования**

На первом этапе эксперимента была записана двухканальная корковая ЭЭГ. Мышам имплантировали два серебряных электрода (диаметр наконечника: 2–3 мкм), расположенных на глубине 150 мкм в координатах (ML: 2,0 мм и AP: –2 мм) от пересечения брегмы по обе стороны от средней линии, под ингаляционным наркозом 1% изофлураном (Sigma–Aldrich, Сент–Луис, США, со скоростью 1 л/мин. Соотношение  $\text{N}_2\text{O}/\text{O}_2\text{—}70/30$ ). Дополнительно был установлен датчик ближе к роструму, соединенный с винтами с помощью стоматологического акрилового материала (ZhermackSpA, БадиаПолесине, Венеция, Италия). Ибупрофен (Bhavishya Pharmaceuticals Pvt. Ltd., Хайдарабад, Телангана, Индия, 15 мг/кг) для облегчения послеоперационной боли добавлялся в воду за 2–3 дня до операции и в течение 3 дней после операции. Перед началом эксперимента мышам дали 10 дней на восстановление после операции.

Запись ЭЭГ проводилась с помощью ЭЭГ–системы с использованием ADS1293 (Texas instruments, Даллас, США) – маломощного, 3–канального, 24–разрядного аналогового интерфейса для измерения биопотенциала.

Для ФБС использовался светодиод с длиной волны 1050 нм и выходной мощностью 50 МВт в корпусе из 2853 SMD. ФБС выполнялся в течение 61 мин в следующей последовательности: 17 мин – светодиод включен, 5 мин – пауза, 17 мин – светодиод включен, 5 мин – пауза, 17 мин – светодиод включен. Интенсивность излучения на поверхности черепа не превышает 0,5 Вт/см<sup>2</sup>. Доза для ФБС при однократной ФБС–терапии составила 30 Дж/см<sup>2</sup>, а при 10–дневном курсе ФБС – 0,3 кДж/см<sup>2</sup>.

Поведенческие тесты по Павловско-инструментальному переносу проводились с оперантной камерой (25 × 20 × 15 см), размещенной вместе со звуком, который представлял собой белый шум 85 дБ и чистый тональный сигнал 3 кГц, а также светом в виде инфракрасного светодиода, расположенным внутри корпуса. Внутри емкости в центре камеры был расположен дозатор гранул для выдачи «поощрения» по 12 мг (семена подсолнуха, Минск, Беларусь). Сверхчувствительные рычаги управления находились на расстоянии 7 см на расстоянии друг от друга по обе стороны дозатора гранул. Динамики были расположены на высоте 7 см над рычагами. Тест начинался с 30–минутных сеансов в течение первых 3 дней, чтобы отобрать группу мышей, предпочитающих одну и ту же пищу, и адаптировать этих мышей к условиям эксперимента, когда пищевые гранулы (безусловный стимул, БС) появлялись в дозаторе со случайным интервалом в течение 60 секунд.

Визуализация структуры мозга после введения FITC-декстрана проводилась с помощью вертикального конфокального микроскопа Nikon A1R MP (корпорация Nikon, Токио, Япония) с CFI Plan AchromatLambda D 2X (корпорация Nikon, Токио, Япония), установленного в фокусирующем окуляре.

## **Результаты исследования**

### **Фотобиостимуляция во время сна по сравнению с бодрствованиемлучше улучшает обучение и память у здоровых мышей**

На первом этапе было проанализировано влияние ФБС во время сна и бодрствования на обучение и память у здоровых мышей. Чтобы изучить процесс обучения у мышей, мы использовали тест ПИП, когда мышью обучали ассоциировать звук с подачей пищи. Позже мышью подвергли инструментальному обучению, в ходе которого они научились нажимать на рычаг, чтобы получать пищу без звука. Наконец, мышам снова была предоставлена возможность нажимать на рычаг, на этот раз в присутствии и отсутствие звука. Результаты реакции на получение вознаграждения показали, что обученные мыши нажимали на рычаг чаще в присутствии звука, чем без него, даже если звук ранее не сопровождался нажатием рычага. Таким образом, ассоциация "звук–еда" перешла в инструментальную ситуацию, которая указывала на успешное обучение.

Результаты показывают, что всем мышам (100%,  $n = 7$ ) из контрольной группы потребовалось 15 сеансов, чтобы достичь критерия жизнеспособности. Оба курса ФБС во время сна и бодрствования улучшили обучаемость у мышей, все из которых (100%,  $n = 8$  в каждой группе) смогли получить критерий PAVD для 7 ( $p = 0,000077$ ) и 11 ( $0,006293$ ) сеансов соответственно. Таким образом, можно сделать вывод, что ФБС облегчает обучение. Однако влияние ФБС на когнитивные функции было лучше у спящих мышей по сравнению с бодрствующими ( $p = 0,009736$ ). В ПИП–тесте мыши из всех тестируемых групп нажимали на АР против НА значительно чаще во время УР+, чем во время УР – или ПИП. Кроме того, у всех мышей частота детекции головы также чаще наблюдались во время УР+, чем во время УР – или ПИП–теста.

Однако мыши из контрольной группы нажимали на АР во время УР+ меньше, чем мыши из групп ФБС+ сон и ФБС + бодрствование. Таким

образом, мыши без ФБС допускали больше ошибок во время УР+, чем мыши, получавшие ФБС ( $p = 0,000185$  между сном + ФБС и сном без ФБС;  $p = 0,033729$  между бодрствованием + ФБС и бодрствованием без ФБС), т.е. курс ФБС увеличивал количество правильных ответов при нажатии на АР во время УР+.

Однако после курса ФБС во время сна скорректированные ответы были чаще, чем после ФБС во время бодрствования ( $p = 0,01847$ ). Наконец, показатели детекции головы мыши в отверстиях были повышены при ФБС по сравнению с контрольной группой, особенно при ФБС во время сна по сравнению с бодрствованием ( $p = 0,000070$  между сном + ФБС и сном без ФБС;  $p = 0,000268$  между бодрствованием + ФБС и бодрствованием без ФБС;  $p = 0,015562$  между ФБС во время сна и бодрствования).

Затем были проанализированы влияние курса ФБС на пространственную память, включая когнитивные способности и распознавание, с помощью теста на запоминание местоположения двух объектов. Этот тест основан на свойстве мышей запоминать новое местоположение объекта, затрачивая на это больше времени, чем на привычные процессы. Испытание проводилось в открытой коробке, к которой мышей сначала приучали в течение 5 минут. На следующий день два предмета из похожего материала, но разной формы (красный круг и синий квадрат) были представлены на 5 минут в одном положении друг перед другом. Через 60 минут аналогичные предметы были представлены снова, но синий квадрат поменялся местами, в то время как красный круг остался на прежнем месте.

Результаты показали, что во всех тестируемых группах мыши тратили больше времени на изучение объекта, который должен был измениться, по сравнению со знакомым. Выполнение ФБС во время сна, но не во время бодрствования, сопровождалось увеличением индекса различения по сравнению с контролем, что позволяет предположить, что ФБС только во время сна способствует лучшему запоминанию пространства, расположения и перемещения объектов в нем ( $p = 0,002117$  между сном + ФБС и сном без

ФБС;  $p = 0,002117$  между сном + ФБС и сном без ФБС, значение  $0,140801$  между бодрствованием + ФБС и бодрствованием без ФБС). Таким образом, используя тест на запоминание местоположения двух объектов, ФБС во время сна по сравнению с бодрствованием лучше улучшает память у здоровых мышей.

### **Фотобиостимуляция во время сна по сравнению с бодрствованием лучше стимулирует дренажную систему мозга здоровых мышей**

На первом этапе мы проанализировали изменения ДСМ во время бодрствования и сна без и после однократного применения ФБС у мышей.

Результаты показали, что NREM сопровождался более выраженным распространением FITC–декстрана как в дорсальной, так и в вентральной частях мозга, а также его накоплением в глубоких шейных лимфатических узлах по сравнению с бодрствованием ( $0,80 \pm 0,04$  против  $0,24 \pm 0,02$ ,  $p = 0,001399$  для дорсальной части мозга;  $1,44 \pm 0,06$  против  $0,77 \pm 0,05$ ,  $p = 0,033662$  для вентральной части головного мозга;  $11,29 \pm 0,55$  против  $4,71 \pm 0,28$ ,  $p = 0,002428$  для глубоких шейных лимфатических узлов). ФБС во время бодрствования и особенно во время сна вызывал увеличение распределения FITC–декстрана в головном мозге и его перемещение из ЦНС в ГШЛУ по сравнению с мышами без ФБС (группа: сон + ФБС по сравнению со сном, а не с ФБС:  $1,80 \pm 0,03$  против  $0,80 \pm 0,04$ ,  $p = 0,000065$  для дорсальной части мозга;  $1,66 \pm 0,09$  против  $1,44 \pm 0,06$ ,  $p = 0,373858$  для вентральной части мозга;  $21,14 \pm 0,57$  против  $11,29 \pm 0,55$ ,  $p = 0,000105$  для ГШЛУ; бодрствование + ФБС против бодрствования, отсутствие ФБС:  $1,37 \pm 0,06$  против  $0,24 \pm 0,02$ ,  $p = 0,000065$  для дорсальной части мозга;  $1,01 \pm 0,05$  против  $0,77 \pm 0,05$ ,  $p = 0,584763$  для вентральной части головного мозга;  $14,57 \pm 0,60$  против  $4,71 \pm 0,28$ ,  $p = 0,000105$  для ГШЛУ). Таким образом, ФБС во время сна стимулировал ДСМ выше, чем во время бодрствования ( $1,80 \pm 0,03$  против  $1,37 \pm 0,06$ ,  $p = 0,009807$  для дорсальной части мозга;  $1,66 \pm 0,09$  против  $1,01 \pm 0,05$ ,  $p = 0,015901$  для вентральной части мозга;  $21,14 \pm 0,57$  против  $14,57 \pm 0,60$ ,  $p = 0,002428$  для ГШЛУ).

## ВЫВОДЫ

1. ЭЭГ–измерение позволило зафиксировать в группах NREM–стадию у мышей, что сопровождалось более выраженным распространением FITC–декстрана как в дорсальной, так и в вентральной частях мозга, а также его накоплением в глубоких шейных лимфатических узлах по сравнению с бодрствованием в группах с фотобистимуляцией;
2. Тесты на запоминание расположения объектов и Павловский–инструментальный перенос показали улучшение памяти в группах, где была проведена фотобиостимуляция во время сна;
3. Фотобиостимуляция во время бодрствования, и особенно во время сна, вызывал увеличение распределения FITC–декстрана в головном мозге и его перемещение из центральной нервной системы в глубокие шейные лимфатические узлы по сравнению с мышами без ФБС.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Functional aspects of meningeal lymphatics in ageing and Alzheimer's disease / Mesquita, S. [et al.] // *Nature*. - 2018. - Vol. 560. - P. 185–191.
2. Principles of immunology and its nuances in the central nervous system / Dunn, G. [et al.] // *Neuro-Oncology*. - 2015. - Vol. 17. - P. 3–8.
3. Lymphatic drainage system of the brain: A novel target for intervention of neurological diseases / Sun, B. [et al.] // *Prog. Neurobiol.* -2018. - Vol. 63. - P. 118–143.
4. Blocking meningeal lymphatic drainage aggravates Parkinson's disease-like pathology in mice overexpressing mutated  $\alpha$ -synuclein / Zou, W. [et al.] // *Transl. Neurodegener.* -2019. - Vol. 8. - P. 10–17.
5. Pilot study of transcranial photobiomodulation of lymphatic clearance of beta-amyloid from the mouse brain: Breakthrough strategies for non-pharmacologic therapy of Alzheimer's disease / Zinchenko, E. [et al.] // *Biomed. Opt. Express.* - 2019. - Vol. 10. - P. 4003–4017.
6. Self-reported sleep and  $\beta$ -amyloid deposition in community-dwelling older adults / Spira, A. [et al.] // *JAMA Neurol.* - 2013. - Vol. 70. - P. 1537–1543.