

МИНОБРНАУКИ РОССИИ

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования

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

Кафедра физиологии человека и животных

**ИННОВАЦИОННАЯ ТЕХНОЛОГИЯ ФОТОТЕРАПИИ
КОНТУЗИОННОЙ ТРАВМЫ СПИННОГО МОЗГА**

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 2 курса 243 группы

направления подготовки 06.04.01 Биология

профиль «Современные технологии визуализации и анализа живых систем»

Биологического факультета

Златогорской Дарьи Андреевны

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 2024

ВВЕДЕНИЕ

Травматические повреждения спинного мозга (ТПСМ) — одна из наиболее сложных и актуальных проблем медицины. Пациенты с ТПСМ составляют не самую многочисленную группу пострадавших, но в силу тяжести последствий и высокого уровня инвалидизации повреждение спинного мозга имеет особое социальное значение и относится к одному из самых тяжелых видов травм [1].

ТПСМ характеризуется значительным числом тяжелых последствий и осложнений, развитием травматической болезни спинного мозга со сложным комплексом структурных и функциональных нарушений, приводящих к ограничению самообслуживания и передвижения, стойким эндокринным сдвигам и изменениям со стороны внутренних органов и систем, утрате контроля тазовых функций, высоким показателям летальности, крайне высокому уровню социальной и психологической дезадаптации пациентов [1].

На протяжении длительного времени вопросы оказания специализированной помощи пострадавшим с повреждениями позвоночника и спинного мозга сохраняют медицинскую и социальную актуальность, что обусловлено тяжестью полученных повреждений, сложностями диагностики и лечения, высокими показателями летальных исходов и степени инвалидизации травмированных [2].

Большое количество приведенных научных исследований свидетельствует о том, что низкоинтенсивное излучение лазера при взаимодействии с живой тканью индуцирует ряд положительных патогенетических воздействий: активацию транспорта кислорода, стимуляцию белкового обмена в клетке, повышение активности ферментов антиоксидантной защиты и угнетение процессов перекисного окисления липидов. Это те механизмы, в которых нуждаются все живые клетки и ткани в любых стрессовых, в том числе послеоперационных ситуациях, когда они испытывают дефицит красных квантов энергии, необходимых для нормального осуществления фотохимических процессов [3].

Моделью для изучения эффектов фототерапии в отношении регенерации тканей ЦНС явилась контузионная травма спинного мозга. Выбор данного направления связан с тем, что повреждение спинного мозга зачастую приводит к инвалидности и характеризуется высокой смертностью в связи с лимитированными методами терапии, способствующей эффективной регенерации его тканей [3-7]. Действительно, несмотря на разработку и внедрение в клиническую практику алгоритмов обследования, современных методов реанимации и анестезиологического обеспечения, а также усовершенствование хирургических методик лечения, показатели летальности в разных медицинских организациях сохраняются на уровне до 45,6 % [3, 4].

В спинном мозге мышей недавно были открыты менингеальные лимфатические сосуды (МЛС) у грызунов [7]. Эти результаты согласуются с более ранними работами на макаках, указывающим на лимфатические механизмы дренажных процессов в тканях спинного мозга [8, 9]. На основе этого факта была выдвинута вторая гипотеза о фотостимуляции регенеративных процессов спинного мозга после контузионной травмы как нового направления в терапии позвоночно-спинномозговых травм. Учитывая тот факт, что лимфодренажные процессы в головном мозге активируются во время сна [10-13], фокус исследований был направлен на сравнение эффектов фототерапии поврежденного спинного мозга у мышей, получающих лечение во сне или в бодрствовании.

Целью работы является разработка технологии фототерапии (ФТ) контузионной травмы спинного мозга у мышей под ЭЭГ-контролем.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Исследование представительства лимфатических сосудов в тканях спинного мозга у человека и мышей в норме и после контузионной травмы для более детального понимания механизмов фототерапевтических эффектов;

2. Изучение эффектов фототерапии во сне и бодрствовании на процессы регенерации тканей спинного мозга взрослых самцов мышей после контузионной травмы с применением гистологического и конфокального анализа;

3. Анализ лимфодренажных процессов у взрослых самцов мышей до и после контузионной травмы на фоне фототерапии во сне и бодрствовании с применением конфокальной микроскопии;

4. Исследование эффектов фототерапии во сне или бодрствовании на восстановление барьерной функции спинного мозга после контузионной травмы.

Основная часть

История лечения травм спинного мозга насчитывает много веков. В древнем Египте врачи применяли новаторские методы для лечения ТПСМ. Однако еще десятки лет назад считалось, что ничего нельзя сделать для помощи людям с ТПСМ, потому что считалось, что центральная нервная система не может восстанавливаться после повреждения. Поскольку ТПСМ является травматическим событием, которое приводит к нарушению моторных, сенсорных и/или автономных функций и отрицательно сказывается на психологическом и социальном благополучии пациента, открытие регенеративного решения для ТПСМ может вдохнуть новую жизнь в пациентов, которые кажутся безнадежными.

В попытке бороться с травматическими повреждениями спинного мозга и его побочными эффектами Национальное исследование острых травм спинного мозга (NASCIS) публикует терапевтические протоколы для ТПСМ с 1984 года. Результаты NASCIS II и III предложили протокол, основанный на лечении метилпреднизолона натрия сукцинатом (MPSS). Несмотря на рекомендации руководства NASCIS, различные клинические и животные исследования показали, что стероидная терапия не является безопасным методом, и существуют сообщения о таких побочных эффектах, как инфекция мочевых путей, нозокомиальная пневмония, желудочно-кишечное кровотечение и потеря веса, возникающие при стероидной терапии после ТПСМ.

Теперь медицинский мир ищет новые неинвазивные протоколы с меньшим количеством побочных эффектов. Фотобиомодуляционная терапия была установлена как противовоспалительное и неинвазивное лечение с минимальными побочными эффектами. Хотя все еще недостаточно данных о применении ФБМ в качестве альтернативы стероидной терапии после ТПСМ у людей, есть несколько исследований на животных, поддерживающих использование ФБМ-терапии при ТПСМ. ФБМ способна уменьшать боль и улучшать функциональную неспособность благодаря анальгезирующему и

противовоспалительному эффектам, расслаблению мышц, заживлению тканей и стимуляции миграции и пролиферации клеток. Механизм действия ФБМ основан на поглощении света фоторецепторами в митохондриях (цитохром с оксидаза), что ускоряет транспорт электронов, увеличивает синтез АТФ и модулирует различные факторы транскрипции.

Материалы исследования

Объекты исследования

Объекты исследования

Группы животных

Эксперименты включали следующие группы:

- 1) здоровые мыши без повреждения спинного мозга, n=10;
- 2) мыши с контузионной травмой спинного мозга без фототерапии, n=10;
- 3) мыши с контузионной травмой спинного мозга, получающие 7-дневный курс фототерапии во сне, n=10;
- 4) мыши после контузионной травмой спинного мозга, получающие 7-дневный курс фототерапии в бодрствовании, n=10.

1) Самцы мышей BALB/c (20-25 г). Животные содержались в стандартных условиях вивария научного медицинского центра ФГБОУ ВО «Саратовский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского» при температуре 25 ± 2 °С, 55% влажности и 12/12 часовом цикле свет/темнота. Экспериментальные протоколы утверждены локальной этической комиссией (Приказ 35-В от 11.03.2022 г.) ФГБОУ ВО «Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского».

2) Аутопсийный материал умерших пациентов был представлен спинным мозгом (n=9), включающий ткани неповрежденного спинного мозга с оболочками. Анатомические исследования на аутопсийном материале проводились в соответствии с этическими нормативами, принятыми

Хельсинской декларацией (WMA Declaration of Helsinki – Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects).

Методы исследования

После проведения контузионной травмы проводили фототерапию под контролем ЭЭГ. На 3 день травмы, к магнитной фото-пластине подсоединяется светодиод для последующей фотобиомодуляции. Для фотобиомодуляции использовался светодиод с длиной волны 1050 нм и выходной мощностью 50 мВт в корпусе 2853 SMD. Управление драйвером светодиода осуществляли с помощью широтно-импульсной модуляции (ШИМ). Использовалась 10% скважность ШИМ, что при 17-минутном (1036 с) облучении обеспечивало дозу в 50 Дж.

В последующие 7 дней проводили автоматизированную фототерапию под ЭЭГ контролем сна и бодрствования согласно схеме (17 мин – лазерное излучение, 5 мин – пауза, 17 мин – лазерное излучение, 5 мин – пауза, 17 мин – лазерное излучение, общее время воздействия 61 мин).

Результаты исследования

Конфокальный анализ представительства лимфатических сосудов в тканях спинного мозга у человека и мышей

Дренажная система головного и спинного мозга играет важную роль в выведении из центральной нервной системы (ЦНС) ненужных метаболитов и токсинов [101-103]. До сих пор остаются неизвестными структуры, выполняющие роль дренажа и «пылесосов» в ЦНС, несмотря на пере-открытие менингеальных лимфатических сосудов (МЛС) и выявление их важной функции в выведении продуктов крови [103], токсинов, такие как бета-амилоид [102] и альфа-синуклеин [104] из оболочек мозга. Роль недавно предложенной лимфатической системы в этих процессах не подтвердилась во многих экспериментальных исследованиях и стала предметом критики в мировой научной общественности [105]. Поиск лимфатических сосудов в ЦНС является центральным объектом в решении важного вопроса в понимании какие структуры выполняют функцию дренажа и выведения токсинов из ЦНС. В

пионерских исследованиях были обнаружены лимфатические капилляры в тканях головного мозга человека, экспрессирующие белки характерные для лимфатического эндотелия [106].

Эти пилотные результаты явились основой для изучения наличия лимфососудов в тканях спинного мозга человека и мышей для более детального понимания механизмов фототерапевтических эффектов.

У мышей проведение конфокального и иммуногистохимического анализа не выявили наличие лимфатических структур в тканях неповрежденного спинного мозга ни у молодых, ни у половозрелых особей. Однако, в условиях развития контузионной травмы спинного мозга через 3 часа после воздействия были обнаружены LYVE-1-позитивные лимфатические структуры.

Результаты исследования тканей неповрежденного спинного мозга человека выявили вокруг церебральных сосудов лимфатические структуры, экспрессирующие характерные для лимфатического эндотелия белки, такие как подоплатин и LYVE-1. Внутри LYVE-1-позитивных лимфатических структур обнаружены иммунные клетки, включая лимфоциты CD8 (Т-киллеры), CD45 (Т-клетки иммунологической памяти; CD68 (клетки дифференцировки), а также CD11b (дендритные клетки) (Рисунок 5).

Таким образом, пилотные исследования подтвердили гипотезу о наличии лимфатических структур в тканях спинного мозга человека, которые были ранее обнаружены в тканях неповрежденного головного мозга, а также после развития внутрижелудочковых геморрагий. Эти предварительные результаты могут свидетельствовать о наличии сети церебральных лимфатических сосудов, тесно взаимодействующих с МЛС и осуществляющих функцию дренажа тканей ЦНС и выведения из нее ненужных метаболитов и токсинов также, как это происходит в лимфатической системе на периферии.

В силу ограниченного аутопсийного материала тканей спинного мозга человека (n=9) представляется необходимым проведение дополнительных

исследований для набора статистики и получения необходимых доказательств наличия лимфатической стенки, чтобы сделать заключение о присутствии лимфатических сосудов в спинном мозге. Это требует глубокого сканирования свежих тканей спинного мозга, полученных в течение 2-3 часов после смерти, что также затрудняет быстрый набор материала. Тем не менее, полученные результаты присутствия лимфатических структур в тканях (не в оболочках) спинного мозга человека являются пионерскими.

Гистологический анализ тканей спинного мозга мышей после контузионной травмы

Результаты гистологических исследований показали, что контузионная травма спинного мозга приводила к разрушению нейронных связей и геморрагиями в месте повреждения. Через 3 дня после повреждения развивался некроз тканей спинного мозга в области нанесения контузии с выраженным периваскулярным и перицеллюлярным отеком, что связано с нарушением проницаемости ГЭБ. Через 7 дней после травмы отмечалось развитие вакуолизации нейронов и их дистрофия. Курс фототерапии во сне, но не в бодрствовании частично улучшал морфологические показатели тканей спинного мозга. Так, у мышей после фото-лечения во сне не наблюдалось периваскулярной эдемы, что свидетельствует как об активации лимфодренажных процессов в спинном мозге, так и о стабилизации его барьерной функции.

Конфокальный анализ лимфодренажной функции спинного мозга мышей после контузионной травмы

Для изучения лимфодренажной функции спинного мозга в области травмы (на 10 день после контузии) изучали в реальном режиме времени распределение FITC декстрана 70 кДа по ликворной системе спинного мозга через 3 часа после его введения в большую мозговую цистерну. Травма спинного мозга сопровождалась существенным подавлением лимфодренажных процессов, что приводило к незначительному распределению красителя в периваскулярных

пространствах спинного мозга по сравнению с контролем. Курс фототерапии в течении 7 дней существенно улучшал лимфодренажную функцию спинного мозга мышей после контузионной травмы. Действительно, в обеих группах животных, получающих фототерапию в бодрствовании или во сне, распределение FITC декстрана 70 кДа по тканям спинного мозга было статистически значительно выше, чем у мышей без лечения. При этом эффекты фототерапии на лимфодренажные процессы были выше в группе, получающих фото-лечение во сне, чем в бодрствовании.

Конфокальный анализ состояния ГЭБ спинного мозга мышей после контузионной травмы

Результаты показали, что на 3 день после травмы спинного мозга наблюдалась интенсивная экстравазация EvansBlue из церебральных сосудов в его ткани без восстановления функции ГЭБ к 10 дню эксперимента. Фототерапия в течении 7 дней как во сне, так и в бодрствовании сопровождалась восстановлением проницаемости ГЭБ, в силу чего уровни красителя EvansBlue в этих группах не отличались от контроля.

Не наблюдалось статистических различий по показателю содержания EvansBlue в тканях спинного мозга между лечеными мышами во сне и бодрствовании.

ВЫВОДЫ

1. Показано представительство лимфатических структур в тканях спинного мозга у человека и животных, что является основой для более детального понимания механизмов фототерапевтических эффектов;
2. Гистологический анализ выявил улучшение морфологических показателей тканей спинного мозга у мышей после фототерапии во время сна, что свидетельствует как об активации лимфодренажных процессов в спинном мозге, так и о стабилизации его барьерной функции;

3. Конфокальный анализ распределения FITC декстрана по тканям спинного мозга показал улучшение лимфодренажной функции после 7-дневного курса фототерапии;
4. Проницаемость ГЭБ восстанавливалась на одинаковых уровнях после 7-дневного курса фототерапии как во время сна, так и во время бодрствования.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- 1 Лобзин, С.В. Острое травматическое повреждение спинного мозга в Санкт-Петербурге. Эпидемиологические данные: частота, гендерные и возрастные особенности / С.В. Лобзин // Вестник Северо-Западного государственного медицинского университета им. И.И. Мечникова. - 2019. - Т. 11, №2. - С. 27-34.
- 2 Якушин, О.А. Анализ летальных исходов у пациентов с позвоночно-спинномозговой травмой в остром периоде/ О.А.Якушин // научно-практический рецензируемый журнал «Политравма/Polytrauma». - 2019. - №3. - С. 55-60.
- 3 Копаев, С.Ю. Эндоокулярное биостимулирующее воздействие низкоинтенсивного излучения гелий-неонового лазера 0,63 мкм на клетки заднего эпителия роговицы в процессе экстракции катаракты / С. Ю. Копаев // Практическая медицина. - 2018. - Т.16, №9. - С.126-129.
- 4 Morozov, I.N. Epidemiology of spine and spinal cord injury (review) / I. N. Morozov, S.G. Mlyavykh // Medical Almanac. - 2011. - V.17. - № 4. - P. 157-159.
- 5 Barbiellini, A. C. Epidemiology of traumatic spinal cord injury: a large population-based study / A. C. Barbiellini, L. Salmaso, S. Bellio, et al // Spinal Cord. - 2022. - V.60. - P. 812-819.

- 6 Traumatic Spinal Injury among Patients with Spinal Injuries Admitted to the Spine Unit of a Tertiary Care Centre: A Descriptive Cross-sectional Study / K.P. Paudel, [et al.] // JNMA J Nepal Med Assoc. - 2022. - V.60. - P. 335-339.
- 7 Development and plasticity of meningeal lymphatic vessels / S. Antila[et al.] // J Exp Med. - 2017. - V.214. - P. 3645-3667.
- 8 Lymphatic drainage of the cerebrospinal fluid from monkey spinal meninges with special reference to the distribution of the epidural lymphatics / M. Miura[et al.] // Arch HistolCytol. - 1998. - V.61. - P. 277-286.
- 9 Gilchrist, E. The relation of the peripheral lymphatic system to the spinal cord / E. Gilchrist // Edinb Med J. - 1934. - V.41. - P. 359-362.
- 10 Night photostimulation of clearance of beta-amyloid from mouse brain: New strategies in preventing Alzheimer's disease / O. Semyachkina-Glushkovskaya[et al.] // Cells. - 2021. - V.10. - P. 3289.
- 11 Mechanisms of phototherapy of Alzheimer's disease during sleep and wakefulness: the role of the meningeal lymphatics / O. Semyachkina-Glushkovskaya[et al.] // Front Optoelectron. - 2023. - V.16. - P. 22.
- 12 Xie, L. Sleep drives metabolite clearance from the adult brain / L. Xie, H. Kand, Q. Xu // Science. - 2013. - V.342. - P. 373-377.
- 13 Fultz, N.E. Coupled electrophysiological, hemodynamic, and cerebrospinal fluid oscillations in human sleep / N.E. Fultz, G. Bonmassar, K. Setsompop // Science. - 2019. - V.366. - P. 628-631.