

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

Кафедра физиологии человека и животных

ФОТОТЕРАПИЯ ГЛИОМЫ У КРЫС ВО ВРЕМЯ СНА

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 4 курса 421 группы

Направления подготовки бакалавриата 06.03.01 Биология

Биологического факультета

Михайлик Юлии Алексеевны

Научный руководитель:

доцент, канд. биол. наук

Т. Д. Искра

Зав. кафедрой:

доцент, док. биол. наук

О.В.Семячкина-Глушковская

Саратов 2026

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Мозг является центральным органом нервной системы, обеспечивающим интеграцию физиологических процессов, высшую нервную деятельность, поведенческие реакции и гомеостаз организма в целом. Поддержание структурно-функциональной целостности мозговой ткани — критически важное условие для реализации когнитивных, сенсорных и моторных функций. Любое нарушение микроархитектоники или метаболизма нейронов и глии неизбежно приводит к тяжелым неврологическим дефицитам, снижающим качество и продолжительность жизни.

Одним из наиболее деструктивных факторов, поражающих мозг, являются глиомы — первичные опухоли центральной нервной системы, происходящие из глиальных клеток. Глиома в особенности глиобластома (глиобластома мультиформная, IV степень по классификации всемирной организации здравоохранения), является наиболее частой и агрессивной первичной злокачественной опухолью центральной нервной системы [1-3, 15]. Глиобластома мультиформная составляет 16% всех первичных новообразований центральной нервной системы и 54% всех глиом; заболеваемость растет с возрастом, достигая пика у лиц старше 60 лет [1-3, 29,30]. Опухоль характеризуется высокой инвазивностью, микрососудистой пролиферацией, некрозами и выраженной гетерогенностью [1-3, 17,18]. Стандартная терапия (максимальная безопасная резекция, лучевая терапия, темозоломид) обеспечивает медиану выживаемости около 15 месяцев; менее 10% пациентов живут более двух лет [1-3, 27,28]. Одним из факторов, ограничивающих эффективность лечения, является возрастное иммуностарение — снижение разнообразия Т-клеток, потеря CD28, уменьшение выработки IL-2, что усугубляется самой опухолью, вызывающей тяжёлую дисфункцию Т-клеток [1-3, 31,32]. Кроме того, рост глиомы нарушает отток интерстициальной жидкости и цереброспинальной жидкости по менингеальным лимфатическим сосудам, открытым в 2015 году [1-3, 3,5,6]. Эти

сосуды обеспечивают дренаж продуктов метаболизма и иммунный надзор; их блокада при глиоме ведёт к отёку мозга и ухудшению прогноза [1-3, 11,12,26]. Несмотря на совершенствование методик хирургического лечения в последнее время не удаётся улучшить результаты комбинированного лечения глиомы, о чём свидетельствует тот факт, что продолжительность жизни, например, пациентов с глиомой, в среднем сохраняется на уровне 8–12 месяцев [1]. В связи с этим моделирование глиомы у крыс служит адекватной экспериментальной моделью для изучения патогенеза и методов воздействия на опухоль.

Современные подходы к терапии глиом (хирургическое удаление, химиотерапия, лучевая терапия) сталкиваются с рядом фундаментальных ограничений: инвазивный характер опухоли препятствует полной резекции, гематоэнцефалический барьер снижает эффективность системного введения химиопрепаратов, а высокая радиочувствительность окружающей здоровой ткани ограничивает дозы ионизирующего излучения. Более того, многие противоопухолевые агенты обладают нейротоксичностью и нарушают естественные циркадные ритмы, что делает актуальным поиск альтернативных или адъювантных методов.

В последние годы активно развивается фотодинамическая и низкоинтенсивная лазерная терапия, избирательно воздействующая на патологические ткани. Современное развитие биомедицинских технологий тесно связано с активным внедрением физических методов воздействия на биологические объекты. Фототерапия (фотобиомодуляция, низкоинтенсивная лазерная терапия) представляет собой неинвазивный физический метод воздействия на биологические ткани с использованием света в красном и ближнем инфракрасном диапазоне (600–1100 нм) [1-4]. В отличие от высокоэнергетических лазеров, фототерапия не вызывает термического повреждения, а напротив, активирует внутриклеточные регенеративные процессы. Основным мишенью служит цитохром с-оксидаза митохондрий: поглощение фотонов увеличивает синтез аденозинтрифосфорной кислоты,

модулирует уровни активных форм кислорода (АФК) и высвобождение оксида азота, что приводит к улучшению микроциркуляции, снижению воспаления и стимуляции репарации тканей [2-4, 12,13]. Ключевые параметры фототерапии – длина волны, плотность мощности ($5\text{--}200\text{ мВт/см}^2$), доза ($1\text{--}10\text{ Дж/см}^2$) и режим облучения (непрерывный или импульсный) – требуют тщательной индивидуализации, поскольку даже небольшие отклонения могут изменить эффект со стимулирующего на подавляющий (бипазная дозовая зависимость) [2-4, 15]. В связи с этим целью данной работы является экспериментальная оценка эффективности и безопасности фототерапии глиомы у крыс при воздействии в фазу сна, обоснование возможности её применения как щадящего противоопухолевого метода.

Данный метод получил широкое распространение в физиотерапии, стоматологии, дерматологии и спортивной медицине. В последние годы все большее внимание уделяется его применению в ветеринарии и биомедицинских исследованиях на лабораторных животных.

Фототерапия представляет собой сложный биофизический процесс, при котором свет, в основном в диапазоне красного и ближнего инфракрасного спектра, поглощается митохондриальными хромофорами, стимулируя выработку АТФ, изменение внутриклеточной концентрации ионов кальция и активных форм кислорода. Эти процессы запускают каскад клеточных и тканевых реакций, направленных на восстановление гомеостаза. Особенно чувствительными к подобным видам воздействия оказываются ткани мелких животных, таких как лабораторные крысы, мыши, морские свинки, что делает их удобной моделью для отработки фототерапевтических методик, применяемых в дальнейшем для человека, в том числе у пациентов с глиальными опухолями.

Переход от классической онкологии к фототерапии обоснован способностью низкоинтенсивного света влиять не только на метаболизм опухолевых клеток, но и на лимфатическую систему мозга. Эксперименты на модели глиомы крыс (клеточная линия С6) показали, что фотобиомодуляция с

длиной волны 1267 нм стимулирует лимфатическую доставку липосом к опухоли, минуя гематоэнцефалический барьер, и усиливает лимфатический клиренс из мозга [1-4, 34,35]. При этом критически важным оказалось проведение фототерапии во время глубокого сна. Именно в эту фазу расширяются периваскулярные пространства, активируется лимфатическая система и усиливается ток цереброспинальной жидкости, что способствует выведению токсичных метаболитов [2-4, 19,21,22].

Однако при всей перспективности фототерапии существует ряд технологических ограничений. Большинство существующих систем предназначены для локального или одноканального воздействия, что ограничивает масштаб экспериментов и клинического применения.

В условиях растущего спроса на прецизионные неинвазивные методы воздействия на биологические объекты, разработка технологии фототерапии для мелких животных является актуальной научной задачей. Она сочетает в себе междисциплинарный подход, включающий оптику, электронику, биоинженерию и биологию, и имеет высокую практическую значимость как в области экспериментальной медицины, так и в ветеринарной практике [2].

Целью данной работы является изучение влияния фототерапии при глиоме у крыс.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Изучить влияние фототерапии на клеточные маркеры пролиферации и апоптоза при глиоме у крыс;
2. Изучить влияние курса фототерапии во время сна на активацию дренажных путей в головном мозге у крыс с глиомой.

Структура и объём работы. Выпускная квалификационная работа состоит из введения, трех глав, выводов, списка использованных источников и содержит 7 рисунков. Общий объем работы составляет 42 страницы. Количество использованных литературных источников составило 40.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Введение. Одним из наиболее деструктивных факторов, поражающих мозг, являются глиомы — первичные опухоли центральной нервной системы, происходящие из глиальных клеток. Глиома в особенности глиобластома (глиобластома мультиформная, IV степень по классификации всемирной организации здравоохранения), является наиболее частой и агрессивной первичной злокачественной опухолью центральной нервной системы. Глиобластома мультиформная составляет 16% всех первичных новообразований центральной нервной системы и 54% всех глиом; заболеваемость растет с возрастом, достигая пика у лиц старше 60 лет.

1 Обзор литературы

В первой главе описана глиома, как патология. Изучены основы фототерапии и ее применение в ветеринарии и биомедицине. Показаны технические средства для фототерапии. Приведены анализ существующих многоканальных систем и биофизические механизмы воздействия света. Описан подбор параметров излучения (длина волны, мощность, длительность) и реакции тканей мелких животных на фотостимуляцию

2 Материалы и методы исследования

Во всех экспериментах использовались свободные от патогенов самцы крыс линии Wistar массой 200–250 г (возраст около двух месяцев), полученные из Национального центра ресурсов лабораторных животных (Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина и А. В. Овчинникова РАН, Пущино, Россия). Животные содержались в стандартных условиях с неограниченным доступом к корму и воде, при температуре 25 ± 2 °C, влажности около 55% и световом режиме 12 ч свет/12 ч темно (освещение с 08:00 до 20:00). За неделю до начала опытов крысы акклиматизировались в виварии. Все процедуры соответствовали требованиям Директивы 2010/63/ЕС, «Руководству по уходу и использованию лабораторных животных», а также методическим указаниям Минобрнауки РФ (№ 742 от 13 ноября 1984 г.), одобренным Комиссией по биоэтике СГУ (протокол № 8 от 18 апреля 2023 г.).

Эксперименты проводились на следующих группах (n = 10 для каждого из основных этапов, n = 20 для выживаемости):

- Контроль (здоровые крысы), без ФТ;
- Глиома без ФТ;
- Глиома + курс ФТ во время глубокого сна.

3 Результаты исследования

Целью данной работы является изучение влияния фототерапии при глиоме у крыс. Для оценки состояния клеток: способности к делению (пролиферации) и запуска программы самоуничтожения (апоптоза, в исследуемых группах были использованы молекулярные маркеры, такие как Ki67, Bax и p53. Они используются в гистологии и иммуногистохимии.

Ki67 — маркер пролиферации - это ядерный белок, присутствующий в клетках во время всех активных фаз клеточного цикла (G1, S, G2, M), но отсутствующий в покоящихся клетках (фаза G0). Процент Ki67-позитивных клеток отражает долю делящихся клеток в ткани. Чем выше индекс Ki67, тем агрессивнее растёт опухоль.

Bax (Bcl-2-associated X protein) — проапоптотический маркер, белок из семейства Bcl-2, который при активации встраивается в наружную мембрану митохондрий и вызывает высвобождение цитохрома c, запуская каскад каспаз соответственно клетка погибает апоптозом. Повышение уровня Bax говорит о запуске программы гибели клеток. Это хорошо для терапии опухоли.

p53 — регулятор апоптоза и клеточного цикла, это белок-супрессор опухолей, который при повреждении ДНК останавливает клеточный цикл (для репарации) или запускает апоптоз через активацию Bax. В норме p53 предотвращает превращение здоровой клетки в раковую. При многих мутациях (в том числе в глиомах) p53 может быть неактивен. Повышение уровня p53 в ответ на терапию часто означает восстановление защитного механизма.

В данной работе маркеры применены, для визуализации фототерапевтического эффекта на клетки глиомы в иммуногистохимическом методе.

3.1 Влияние фототерапии мозга крыс с глиомой на клеточные маркеры пролиферации и апоптоза

На первом этапе в эксперименте мы изучали как влияет фототерапия на процессы пролиферации глиальных клеток и апоптоза клеток глиомы. В более ранних экспериментах, не вошедших в данную работу, было выявлено что фотобиомодуляция более эффективна во время глубокого сна, поэтому терапия глиомы нами проводилась у спящих животных [21,22].

Для эксперимента были взяты 30 крыс которые были разделены на 3 группы: 1 (Контроль) группа здоровых животных, 2 (Глиома) группа с глиомой – животные которым вводили клеточную линию раковой глиомы, 3 (Глиома+ФТ) группа животных с глиомой которым проводилось терапия лазером - светодиодом 1050 нм, (n = 10, в каждой группе).

Через 28 дней проводили диагностику развития глиомы при помощи МРТ. После этого в третьей группе проводили фототерапию в течении 14 дней.

Для выяснения механизмов действия ФТ у спящих крыс с глиомой были проведены гистологические срезы.

Проведенное исследование показало, что курс фототерапии в период глубокого сна оказывает выраженное противоопухолевое действие. Анализ клеточных маркеров выявил следующие изменения:

1 - уровень экспрессии Ki67, индикатора клеточной пролиферации, был существенно выше в группе глиомы без облучения по сравнению с ФТ-группой. У животных, получавших ФТ, пролиферация опухолевых клеток подавлялась, что говорит о том что рост опухоли остановился. Кроме того, экспрессия Вах (маркера апоптоза) и регулятора p53 была снижена в группе с глиомой без ФТ, но значительно повышалась после курса ФТ, следовательно самоликвидация старых, поврежденных или потенциально опасных клеток была возобновлена ;

2 - в группе «глиома» уровень Ki67 был существенно выше, чем после курса фототерапии. При ФТ подавление пролиферации оказалось сильнее

соответственно Ki67 снижается, в глиоме без ФТ экспрессия Вах была снижена (опухоль сопротивляется апоптозу);

3 - после курса ФТ уровень Вах значительно повышается, а это значит клетки глиомы активнее уходят в апоптоз.

В группе глиоме без ФТ p53 снижена; после курса ФТ её экспрессия увеличивается в 1,8 раза, что способствует естественной гибели клетки.

В частности, экспрессия Ki67, Вах и p53 увеличивалась в 2,3, 1,5 и 1,8 раза соответственно.

Таким образом фототерапия проведенная у спящих крыс с глиомой эффективно тормозила рост глиомы через подавление пролиферации и индукцию апоптоза.

3.2 Влияние курса фототерапии на активацию дренажных путей головного мозга крыс с глиомой

Поскольку во время глубокого сна происходит расширение периваскулярных пространств, и соответственно усиление тока цереброспинальной жидкости и активация работы дренажных путей мозга (ДПМ) [19], то следующим этапом эксперимента стало изучение влияния курса фототерапии во время сна на активацию дренажных путей в головном мозге у крыс с глиомой. Для визуализации процессов клиринга был использован краситель FITCD.

Через 28 дней после введения глиомы, животным 3й группы проводилась фотобиомодуляция в течении 14 дней. После этого крысам всех трех групп вводился краситель в правый боковой желудочек. FITCD как маркер обладает свойством при облучении ультрафиолетом или синим светом молекула начинает ярко светиться (флуоресцировать), что позволяет отслеживать ее перемещение в тканях, клетках и жидкостях с помощью микроскопии или спектрофотометрии. Затем животных выводили из эксперимента и извлекали мозг для исследования. Из тканей мозга готовили срезы и рассматривали с помощью конфокального микроскопа.

Как видно в контрольной группе (Контроль) наблюдалось интенсивное распределение FITCD по мозговой ткани и активное выведение через ГШЛУ, тогда как у крыс с глиомой без ФТ происходило значительное снижение этих показателей.

Проведение ФТ во время сна улучшало распределение FITCD в тканях мозга и его дренаж в лимфоузлы. Степень стимуляции дренажа мозга была значительно выше у крыс, получавших ФТ, что подтверждает преимущество ФТ, синхронизированной с физиологическими процессами сна.

Контроль (здоровые крысы) – высокая плотность интенсивности как на графике (хорошее распределение маркера в мозге), так и на графике (активное выведение в лимфоузлы).

Глиома + ФТ – значительное повышение интенсивности по сравнению с группой «без ФТ», приближаясь к контрольным значениям (хотя, вероятно, не полностью достигая их). Это указывает на восстановление дренажной функции мозга после курса фототерапии.

В ходе эксперимента было выявлено, что влияние курса фототерапии во время сна активирует дренажные процессы в головном мозге при глиоме. Оценка распределения флуоресцентного маркера FITCD и его накопления в глубоких шейных лимфатических узлах (ГШЛУ) показала следующее:

У здоровых крыс (контроль) наблюдалось интенсивное распределение FITCD в ткани мозга и активное выведение через ГШЛУ, что соответствует нормальной работе лимфатической и менингеальной лимфатической систем.

При развитии глиомы без ФТ дренажная функция мозга значительно угнетена: распределение FITCD снижено, накопление в ГШЛУ минимально, что отражает блокаду оттока интерстициальной жидкости и цереброспинальной жидкости.

Проведение курса фототерапии приводило к заметному улучшению распределения FITCD в мозговой ткани и усилению его дренажа в шейные лимфоузлы. Эффект был выражен значительно сильнее, чем в группах без ФТ или с ФТ.

Фототерапия во время глубокого сна эффективно активирует лимфатическую и менингеальную лимфатическую системы у крыс с глиомой.

Улучшается распределение интерстициальной жидкости и её отток по периваскулярным пространствам.

Восстанавливается выведение метаболитов и маркеров в глубокие шейные лимфоузлы, что нарушено при росте глиомы.

Синхронизация фототерапии со сном критически важна. Именно во сне расширяются периваскулярные пространства и усиливается ток цереброспинальной жидкости, поэтому световое воздействие в этот период даёт максимальный дренажный эффект.

Полученные данные обосновывают использование сон-синхронизированной фотобиомодуляции как перспективного неинвазивного метода для уменьшения перитуморозного отёка, усиления противоопухолевого иммунного надзора и, в конечном счёте, для комплексной терапии глиальных опухолей.

Следовательно, фототерапия, применяемая в фазу глубокого сна, эффективно активирует дренажные пути мозга при глиоме, восстанавливая лимфатический клиренс. Это подтверждает преимущество синхронизации фототерапевтического воздействия с физиологическими процессами сна, когда периваскулярные пространства расширены, а ток цереброспинальной жидкости максимален. Полученные результаты обосновывают использование сон-синхронизированной ФТ как потенциальной стратегии для улучшения выведения токсичных продуктов и противоопухолевого иммунного надзора при глиоме.

ВЫВОДЫ

1. Фототерапия проведенная у спящих крыс с глиомой эффективно тормозила рост глиомы через подавление пролиферации и индукцию апоптоза.

2. В ходе эксперимента было выявлено, что влияние курса фототерапии во время сна активирует дренажные процессы в головном мозге при глиоме.

Таким образом, синхронизация фототерапии с физиологическим состоянием глубокого сна является ключевым условием её эффективности при глиоме.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1 Noorvash, B., Amaral, L.J., Nelson, T. Remote monitoring of sleep activity in patients diagnosed with glioblastoma/ B. Noorvash, L.J. Amaral, T. Nelson// J. Clin. Oncol. – 2022, – Vol. 16, – P e14036.

2 Büttner-Teleagă, A., Kim, Y.T., Osel, T. Sleep disorders in cancer—A systematic review. Int. J. Env. Res. Public. Health 2021, 18, 11696–11734.

3 Semyachkina-Glushkovskaya, O., Penzel, T., Blokhina, I. Night photostimulation of clearance of beta-amyloid from mouse brain: New strategies in preventing Alzheimer’s disease. Cells 2021, 10, 3289.

4 Semyachkina-Glushkovskaya, O., Abdurashitov, A., Klimova, M. Photostimulation of cerebral and peripheral lymphatic functions. Transl. Biophotonics 2020, 2, e201900036.

5 Semyachkina-Glushkovskaya, O., Fedosov, I., Shirokov, A. Photomodulation of lymphatic delivery of liposomes to the brain bypassing the blood-brain barrier: New perspectives for glioma therapy. Nanophotonics 2021, 12, 3215–3227.

6 Bragin, D., Kameneva, M., Bragina, O. Rheological effects of drag-reducing polymers improve cerebral blood flow and oxygenation after traumatic brain injury in rats. J. Cereb. Blood Flow. Metab. 2017, 37, 762–775.