

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

Кафедра физиологии человека и животных

**ВОЗРАСТ КАК ЛИМИТИРУЮЩИЙ ФАКТОР ДЛЯ ВЫВОДА
МЕТАБОЛИТОВ С ПОМОЩЬЮ ФОТОБИОМОДУЛЯЦИИ МОЗГА У
СТАРЫХ МЫШЕЙ**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ
Студентки 4 курса 422 группы
Направления подготовки бакалавриата 06.03.01 Биологии
Биологического факультета
Лассуед Самар

Зав. кафедрой:
доцент, док. биол. наук _____ О. В. Семячкина-Глушковская

Научный руководитель:
доцент, канд. биол. наук _____ Е. И. Саранцева

Саратов 2026

Введение. Старение представляет собой фундаментальный биологический процесс, сопровождающийся прогрессирующими структурно-функциональными изменениями в головном мозге, которые лежат в основе снижения когнитивных функций и повышенного риска развития нейродегенеративных заболеваний, включая болезнь Альцгеймера (БА) и болезнь Паркинсона (БП). Одним из ключевых патогенетических механизмов возраст-ассоциированной нейродегенерации является нарушение гомеостаза мозговой ткани вследствие накопления метаболитов, таких как β -амилоид ($A\beta$), тау-белок, глутамат, лактат, обладающих нейродегенеративной активностью.

Показано, что ФБМ стимулирует клиренс токсичных метаболитов, включая $A\beta$, вероятно, за счет активации лимфатических и периваскулярных путей. Однако подавляющее большинство исследований, демонстрирующих эффективность ФБМ, выполнено на молодых или средневозрастных моделях, что существенно ограничивает экстраполяцию полученных данных на стареющий мозг.

Поэтому целью настоящего исследования явилась оценка роли возраста как лимитирующего фактора эффективности фотобиомодуляции в стимуляции выведения метаболитов.

Для достижения этой цели решались следующие задачи;

1. Оценить с помощью конфокального анализа *ex vivo* распределение красителя FITCD в сосудах мозга мыши во время сна и бодрствования.
2. Определить интенсивность выведение трессера FITCD до и после фотобиомодуляции у мышей разного возраста.
3. Оценить качество когнитивных функций у старых мышей до и после фотобиомодуляции.

Структура и объем работы. Работа включает введение, три главы, заключение, выводы, список использованных источников. Работа

проиллюстрирована 5 таблицами и 4 рисунками. Список использованных источников включает в себя 25 наименований.

Основное содержание работы. В главе «Обзор литературы» представлен анализ литературных данных о возрастных характеристиках состояния мозга у лабораторных животных и их когнитивных возможностях. А также выводе метаболитов из мозга у разных возрастных групп во время бодрствования и сна. В главе «Результаты исследований» представлены полученные данные об оценке выведения красителя из сосудов мозга и ГШЛУ у старых мышей во время сна и бодрствования.

Объекты и методы исследования. Все эксперименты проводились на мышах в возрасте 3, 6 и 24 месяцев. 24-месячные мыши, использованные для *ex vivo* конфокального анализа дренажа мозга в контрольных условиях, а также после ФБМ+бодрствование и ФБМ+сон ($n = 5$ в каждой группе). Были проведены Павловские тесты и статистический анализ с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим апостериорным тестом Дункана для множественных сравнений. Критический уровень значимости принимали $p < 0,05$.

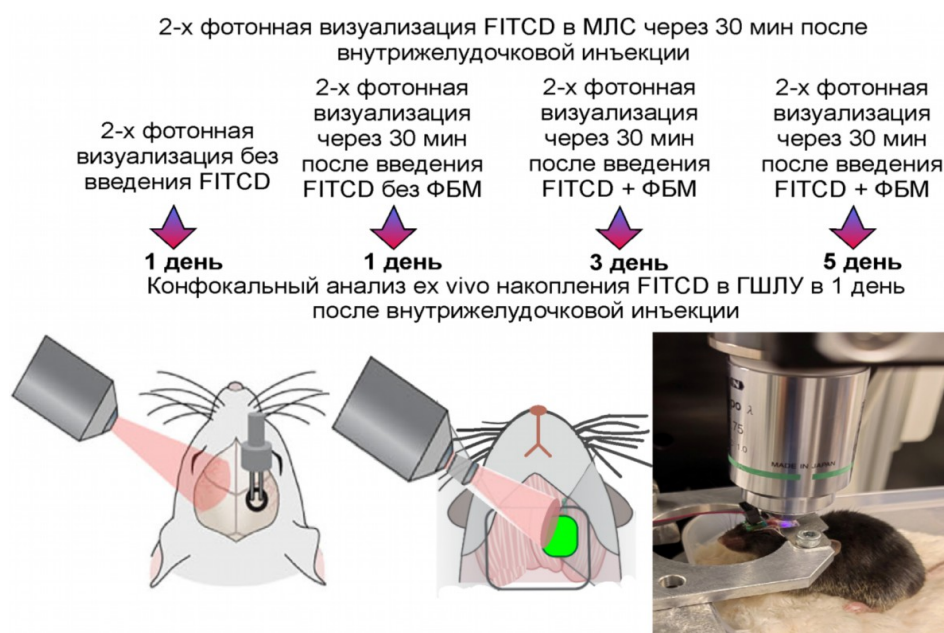


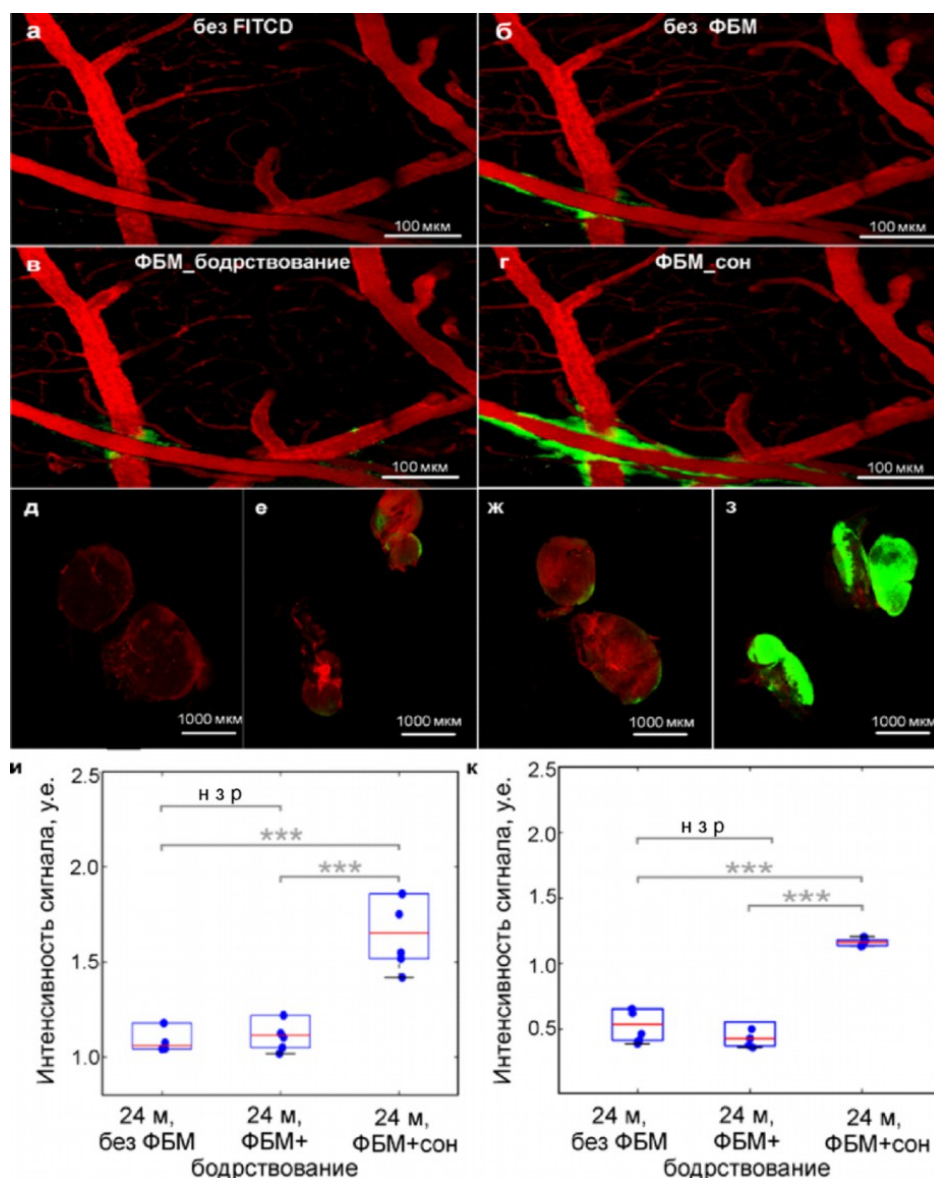
Рисунок 1 - Дизайн эксперимента при 2-х фотонная визуализация сосудов после введений FITCD *ex vivo*

Результаты исследований

Оценка выведения красителя из сосудов мозга и ГШЛУ у старых мышей во время сна и бодрствования

Для ответа на вопрос о механизмах эффективной фотостимуляции дренажа мозга и выведения метаболитов во время сна у 24-месячных мышей была проведена двухфотонная визуализация в реальном времени через оптическое окно интенсивности выведения FITCD из правого латерального желудочка и его распределения в периваскулярных пространствах (ПВП) у мышей без анестезии (рисунок 2). На рисунке показаны типичные изображения церебральных сосудов без внутривентрикулярной инъекции FITCD (рисунок 2 а), распределение FITCD в ПВП через 30 минут после введения трассера (рисунок 2 б), с ФБМ во время сна (рисунок 2 г) и с ФБМ во время бодрствования (рисунок 2 в).

Мониторинг распределения FITCD в ПВП без ФБМ, во время сна (FITCD вводили через катетер в момент регистрации NREM-сна по ЭЭГ) или бодрствования проводился на той же мыши на первый, третий и пятый дни исследования, когда FITCD полностью выводился из ПВП. То есть, точно такое же исследование повторялось трижды на одной и той же неанестезированной мыши. Количественный анализ показал минимальные количества FITCD в ПВП без ФБМ, которые не изменялись после ФБМ во время бодрствования, но значительно увеличивались после ФБМ во время сна ($1,58 \pm 0,04$ против $1,22 \pm 0,05$, $p < 0,001$ между группой FITCD с ФБМ+сон и группой FITCD без ФБМ; $1,58 \pm 0,04$ против $1,24 \pm 0,01$, $p < 0,001$ между группой FITCD с ФБМ+сон и группой FITCD с ФБМ+бодрствование; $1,22 \pm 0,05$ против $1,24 \pm 0,01$, ns между группой FITCD без ФБМ и группой FITCD с ФБМ+бодрствование, $n=5$, тест ANOVA с последующим тестом Дункана). Рисунок 2 и; к.



а - Многофотонные изображения у старой мыши без инъекции FITCD, через 30 мин после инъекции FITCD и без ФБМ (первое исследование). день наблюдения), а также с ФБМ+сон (третий день исследования) или с РВМ+бодрствование (пятый день эксперимента); и и к Количественный анализ интенсивности сигнала от FITCD в у.е. в периваскулярных пространствах (и) и ГШЛУ (к).; в *** - $p < 0,001$; $n=5$ в каждой группе; нзр – статистически незначимые результаты, ANOVA-тест с последующим использованием теста Дункана

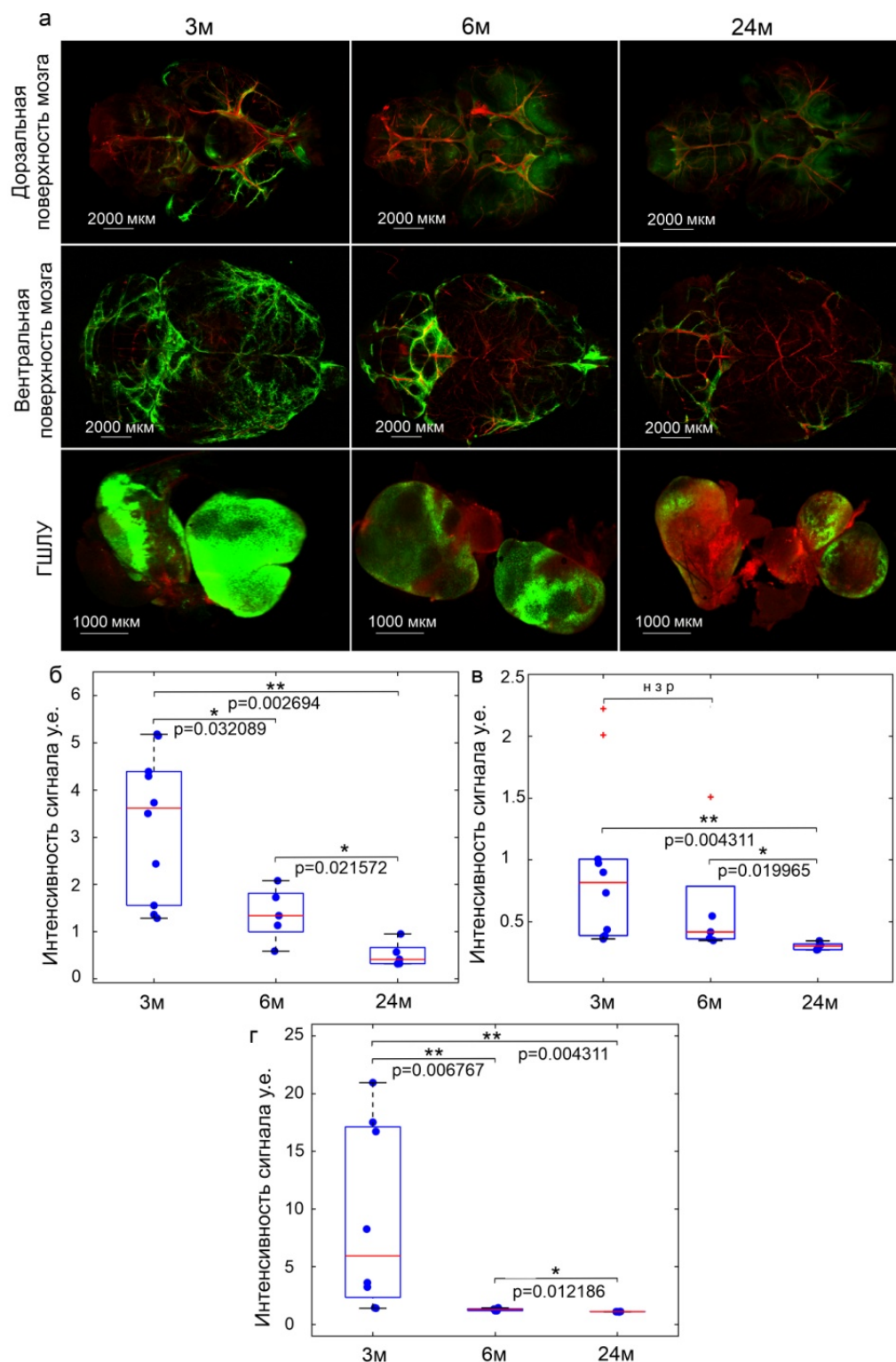
Рисунок 2 – Влияние РВМ во время сна и бодрствования на дренаж мозга у 24-месячных мышей

Дополнительно, в других группах с использованием того же протокола введения FITCD в правый латеральный желудочек проводился *ex vivo* конфокальный анализ лимфатического выведения красителя из мозга в ГШЛУ (рисунки 2 а-з). Наши результаты *ex vivo* были сходны с данными *in vivo* и показали значительное накопление FITCD в ГШЛУ только в группе FITCD с ФБМ+сон, тогда как в группах FITCD без ФБМ или FITCD с ФБМ+бодрствование уровень красителя был минимальным и не различался между собой ($1,29 \pm 0,08$ против $0,52 \pm 0,09$, $p < 0,001$ между группой FITCD с ФБМ+сон и группой FITCD без ФБМ; $1,29 \pm 0,08$ против $0,49 \pm 0,07$, $p < 0,001$ между группой FITCD с ФБМ+сон и группой FITCD с ФБМ+бодрствование; $0,49 \pm 0,07$ против $0,52 \pm 0,09$, ns между группой FITCD без ФБМ и группой FITCD с ФБМ+бодрствование, $n=5$, тест ANOVA с последующим тестом Дункана). Результаты показали, что ФБМ во время сна, но не во время бодрствования, усиливает дренаж мозга, т.е. увеличивает движение мозговой жидкости через глимфатические и/или лимфатические пути, способствуя более эффективному выведению растворенных в мозговой жидкости соединений в периферию. ФБМ во время сна (ФБМ+сон), но не в состоянии бодрствования (ФБМ+бодрствование), улучшает клиренс метаболитов и когнитивные функции у старых мышей

Таким образом, было показано, что ФБМ во сне ускоряет выведение красителя из сосудов мозга в ГШЛУ, что способствует его очищению.

Оценка выведения красителя из сосудов мозга и ГШЛУ у старых мышей во время сна и бодрствования

На втором этапе эксперимента был проведен анализ способности очищения и выведения метаболитов из тканей мозга в ГШЛУ у мышей разного возраста. Рисунок 3.



а - Репрезентативные изображения распределения FITCD (зеленый) в вентральной и дорсальной частях мозга и накопления FITCD в ГШЛУ у 3-, 6- и 24-месячных мышей из контрольной группы; б-г - количественный анализ интенсивности флуоресцентного сигнала от FITCD в дорсальной части мозга

(б), вентральной части мозга (в) и в ГШЛУ (г) в тестируемых группах; дополнительные парные сравнения по критерию Манна–Уитни–Уилкоксона (# - $p < 0,05$), $n=8$ в каждой группе

Рисунок 3 – Сравнительная характеристика выведения FITCD из сосудов мозга и ГШЛУ у мышей разного возраста

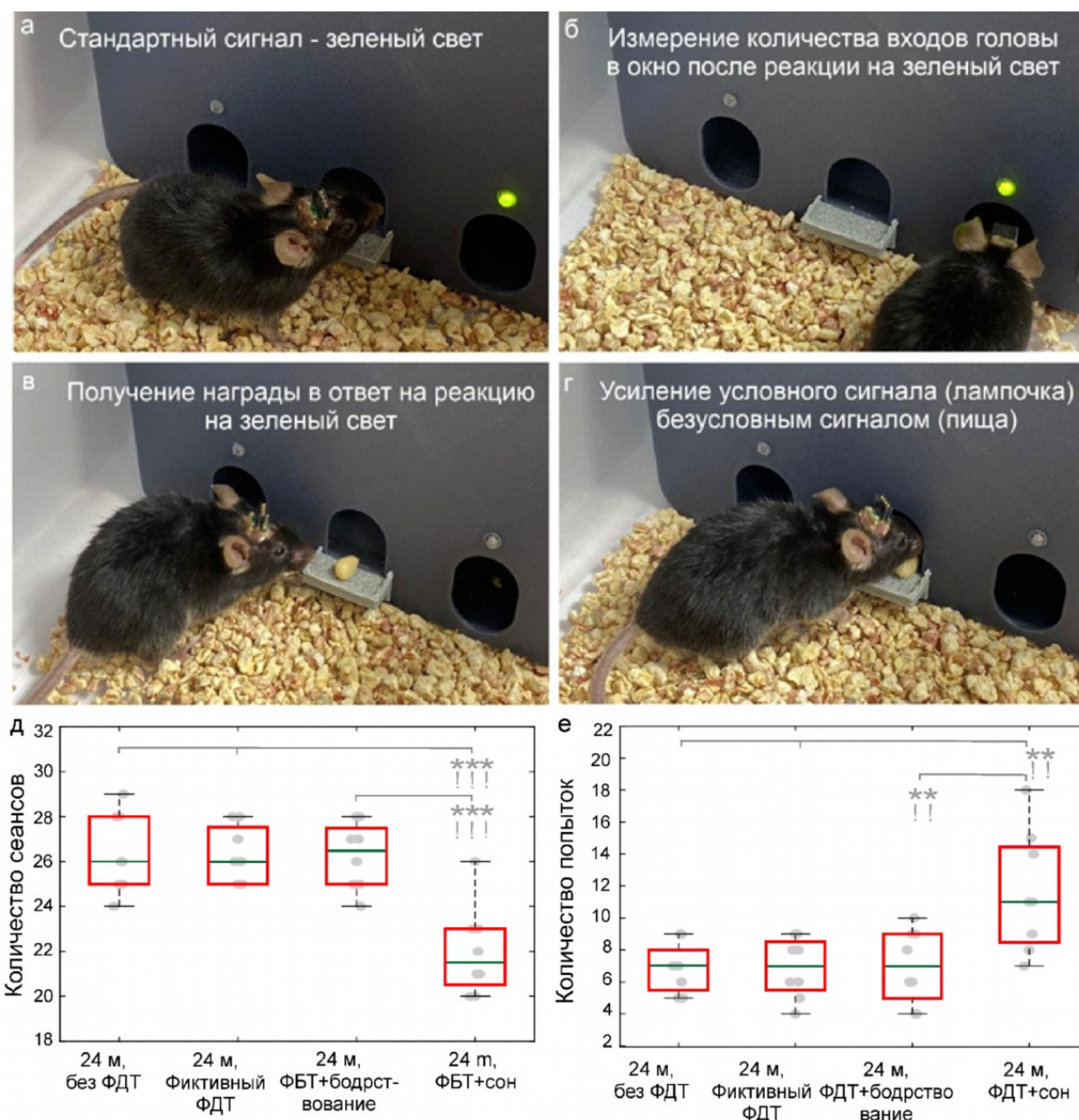
Как показано на рисунке 3, наилучшие показатели выведения красителя свойственны молодым мышам (3 месяца). Действительно, на фото 3 а показан дренаж мозга в реальном времени у мыши с использованием двухфотонного микроскопа через 30 минут после инъекции FITCD.

Как показали результаты исследования, интенсивность выведения красителя дорсальной поверхности мозга самая высокая у мышей молодого возраста (рисунок 3а). Действительно, интенсивность окраски сосудов наиболее значима, что подтверждает и статистический анализ (рисунок 3 б). Рисунки 3 а наглядно демонстрируют, что дренаж головного мозга был значительно снижен у 24-месячных мышей по сравнению с 3-месячными мышами (в 2,7 раза дорсальной частях мозга, при $p=0.002694$; в 1,8 раза в ГШЛУ) и 6-месячных мышей (в 1,7 раза и в 0,6 раза, в вентральной ($p=0.004311$) и дорсальной ($p=0.002694$) частях мозга, в 1,5 раза в ГШЛУ ($p=0.004311$). Не было обнаружено достоверно значимых различий в дренаже мозга между 3-месячными и 6-месячными мышами (рисунок 3 в).

Таким образом, количественный анализ с использованием ANOVA-теста, тестов Дункана и Бонферрони, продемонстрировали значимые различия между 3 м и 24 м мышами, тогда как различия в дренаже между мышами 3 м и 6 м не всегда значимы. Следовательно, возраст является естественным лимитирующим фактором в системе очищения тканей мозга от метаболитов.

Оценка когнитивных функций у мышей до и после фотобиомодуляции

На третьем этапе экспериментов применяли Павловские тесты совместно с фотобтомодуляцией (ФБМ). Результаты показали, что ФБМ оказывает влияние на когнитивные функции у 24-месячных мышей. Результаты теста с формированием условного рефлекса по Павлову показали, что в группе ФБМ+сон по сравнению с контролем количество обучающих сессий уменьшилось в 1,2 раза ($p < 0,001$), тогда как количество полученных наград увеличилось в 1,7 раза ($p < 0,01$), что свидетельствует о положительном влиянии ФБМ во сне на когнитивные функции у старых животных (число сессий: $22,03 \pm 0,71$ против $26,38 \pm 0,63$, $p < 0,001$; число заходов за наградой: $11,63 \pm 1,64$ против $6,88 \pm 0,55$; $n = 8$ в каждой группе; ANOVA с тестом Дункана). Рисунок 4.



а–г Иллюстрация операционной стенки, использованной для Павловского кондиционирования, и стадии формирования условного рефлекса «свет–еда»; д; е Количественный анализ эффектов 10-дневного курса ФБМ + бодрствование или ФБМ + сон на формирование условного рефлекса «свет–еда» в тестируемых группах, включая оценку количества сеансов, необходимых для достижения условного рефлекса (д), и количества заглядываний головой (е) в кормушку за наградами, $n=8$ в каждой группе; **

– $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$ по тесту ANOVA с последующим тестом Дункана; † – $p < 0,05$, ‡ – $p < 0,01$, §§ – $p < 0,001$ после поправки Бонферрони

Рисунок 4 – Эффекты 10-дневного курса ФБМ во время сна и бодрствования на формирование Павловских условных рефлексов у 24-месячных мышей

Как показано на рисунке 4 д; е, ФБМ+бодрствование не оказывала существенного влияния на процессы обучения у старых мышей (число сессий: $26,25 \pm 0,53$ против $26,38 \pm 0,63$, различия недостоверны; число заходов за наградой: $7,00 \pm 0,82$ против $6,88 \pm 0,55$, различия недостоверны; $n = 8$ в каждой группе; результаты проверки нулевой гипотезы с использованием ANOVA с тестом Дункана и поправкой Бонферрони). Рисунок 4 д; е.

Различий между контрольной и ложнооперированной группой не выявлено по показателям когнитивного теста (число обучающих сессий: $26,38 \pm 0,63$ в контроле и $26,25 \pm 0,45$ в ложнооперированной группе, различия недостоверны; число заходов за наградой: $6,88 \pm 0,55$ в контроле и $7,00 \pm 0,67$ в ложнооперированной группе, различия недостоверны; $n = 8$ в каждой группе; ANOVA с пост-хок тестом Дункана).

Таким образом, результаты данной серии экспериментов подтвердили предположение о том, что сон усиливает стимулирующее воздействие ФБМ на клиренс метаболитов и когнитивные функции у старых мышей.

Выводы

1. Метод введения флуоресцентного трассера FITCD в правый боковой желудочек с последующим конфокальным анализом *ex vivo* глубоких шейных лимфатических узлов является эффективным инструментом оценки дренажной функции мозга, при этом у старых мышей (24 месяца) базальный уровень накопления трассера минимален ($0,52 \pm 0,09$ усл. ед.), что отражает возрастное снижение лимфатического оттока.

Фотобиомодуляция достоверно усиливает выведение FITCD из мозга старых мышей только при проведении во время сна, но не в состоянии бодрствования: интенсивность флуоресценции в периваскулярных пространствах после ФБМ+сон составила $1,58 \pm 0,04$ против $1,22 \pm 0,05$ в контроле и $1,24 \pm 0,01$ после ФБМ+бодрствование ($p < 0,001$), в лимфатических узлах — $1,29 \pm 0,08$ против $0,52 \pm 0,09$ и $0,49 \pm 0,07$ соответственно ($p < 0,001$), что подтверждает, что сон является необходимым условием для реализации стимулирующего эффекта ФБМ на дренажную систему мозга у старых животных.

2. Интенсивность выведения красителя в дорсальной поверхности мозга самая высокая у мышей молодого возраста. Действительно, интенсивность окраски сосудов наиболее значима, что подтверждает и статистический анализ: дренаж головного мозга был значительно снижен у 24-месячных мышей по сравнению с 3-месячными мышами (в 2,7 раза дорсальной частях мозга, при $p = 0.002694$; в 1,8 раза в ГШЛУ) и 6-месячных мышей (в 1,7 раза и в 0,6 раза, в вентральной ($p = 0.004311$) и дорсальной ($p = 0.002694$) частях мозга, в 1,5 раза в ГШЛУ ($p = 0.004311$). Не было обнаружено достоверно значимых различий в дренаже мозга между 3-месячными и 6-месячными мышами.

3. Десятидневный курс ФБМ, проведённый во время сна, значительно улучшает когнитивные функции у старых мышей, количество сеансов для выработки условного рефлекса уменьшилось в 1,2 раза ($22,03 \pm 0,71$ против $26,38 \pm 0,63$, $p < 0,001$), а число полученных подкреплений увеличилось в 1,7 раза ($11,63 \pm 1,64$ против $6,88 \pm 0,55$, $p < 0,01$); ФБМ в бодрствовании не влияла на показатели обучения и памяти ($p > 0,05$), следовательно, сон является терапевтическим окном, позволяющим фототерапии улучшать когнитивные функции у старых мышей.