

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

Кафедра физиологии человека и животных

**ПРИМЕНЕНИЕ ТЕХНОЛОГИИ МУЛЬТИФОТОННОЙ
МИКРОСКОПИИ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ЭФФЕКТОВ
ФОТОСТИМУЛЯЦИИ НА ДРЕНАЖ МОЗГА**

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

Магистра 2 курса 243 группы

Направления подготовки магистратуры 06.04.01 Биология

Биологического факультета

Тужилкина Матвея Алексеевича

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 2026

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Сон является фундаментальным биологическим процессом, обеспечивающим гомеостаз центральной нервной системы. Хронический дефицит сна у лиц старше 50 лет ассоциирован с 85% риском развития деменции (Sabia et al., 2021), а даже однократная депривация сна приводит к накоплению β -амилоида в мозге здоровых людей (Ooms et al., 2014; Shokri-Kojori et al., 2018). Ключевую роль в очищении мозга от токсичных метаболитов играет лимфатическая система, активность которой существенно возрастает во время сна (Xie et al., 2013; Semyachkina-Glushkovskaya et al., 2023).

Однако методы исследования дренажных функций мозга *in vivo* остаются технически сложными. Использование анестезии искажает естественную структуру сна и модулирует периваскулярный клиренс (Hablitz et al., 2019; Kelz & Mashour, 2019). Жёсткая фиксация головы животных, необходимая для мультифотонной микроскопии, вызывает хронический стресс, подавляет REM-сон и изменяет микроглиальную активность (Stowell et al., 2019; Juczewski et al., 2020). Существующие альтернативы (наголовные микроскопы) обладают низким пространственным разрешением и не позволяют синхронно регистрировать ЭЭГ – золотой стандарт идентификации фаз сна.

Таким образом, остро востребована разработка метода, сочетающего неинвазивную оптическую визуализацию высокого разрешения, синхронный ЭЭГ-мониторинг и возможность длительного наблюдения за естественно спящими, свободно передвигающимися животными без анестезии.

Цель работы – создание и валидация метода оптического мониторинга мозга в режиме реального времени у свободно передвигающихся мышей, позволяющего изучать дренажные процессы в состоянии бодрствования и естественного сна, а также оценивать эффективность фотостимуляции.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Разработать систему фиксации мыши под объективом мультифотонного микроскопа с синхронной регистрацией ЭЭГ для корреляции динамики дренажных процессов во время глубокого сна и бодрствования.

2. Изучить различия в дренажных процессах головного мозга мышей во время бодрствования и глубокого сна *in vivo* с применением мультифотонной микроскопии.

3. Исследовать эффекты фотостимуляции на дренажные процессы и клиренс флуоресцентного β -амилоида (ФА β) из головного мозга мыши в реальном времени во время бодрствования и глубокого сна.

Структура и объём работы. Выпускная квалификационная работа состоит из введения, трех глав, выводов, списка использованных источников и содержит 11 рисунков. Общий объём работы составляет 50 страниц. Количество использованных литературных источников составило 36.

Научная новизна и значимость работы. Впервые разработана и экспериментально апробирована система фиксации свободно движущихся мышей под объективом мультифотонного микроскопа, позволяющая проводить длительную (до 2 часов) оптическую визуализацию мозга с одновременной регистрацией ЭЭГ в условиях естественного сна без анестезии. Ключевыми элементами новизны являются: 3D-печатная облегчённая головная пластина с винтовой стабилизацией, многослойный матрас с текстурой, имитирующей шерсть животных, и протокол поэтапной адаптации с использованием большой клетки и индивидуального бокса для сна.

Впервые методом мультифотонной микроскопии *in vivo* у одних и тех же неанестезированных мышей с контролем ЭЭГ количественно показано, что во время глубокого NREM-сна наблюдается значительное усиление заполнения периваскулярных пространств флуоресцентным декстраном (FITCD) по сравнению с бодрствованием, что свидетельствует о расширении дренажных путей.

Впервые продемонстрировано, что фотостимуляция (635 нм, 50 мВт/см²), проводимая в период глубокого сна, но не в бодрствовании, достоверно усиливает клиренс FITCD и флуоресцентного β -амилоида из периваскулярных пространств и накопление маркеров в глубоких шейных лимфатических узлах,

что указывает на наличие «терапевтического окна» сна для фотостимуляции дренажа.

Теоретическая значимость работы заключается в экспериментальном подтверждении концепции «астроцитотропического» контроля дренажа мозга (Semyachkina-Glushkovskaya et al., 2023), согласно которой переключение между сном и бодрствованием модулирует объём внеклеточного пространства и периваскулярный транспорт. Полученные данные о зависимости эффективности фотостимуляции от фазы сна расширяют фундаментальные представления о нейро-глио-васкулярной единице как о минимальной функциональной единице локального сна и клиренса метаболитов.

Практическая значимость:

– Разработанный метод фиксации может быть воспроизведён в любой лаборатории, оснащённой мультифотонным микроскопом, благодаря использованию доступных 3D-печатных деталей и открытых протоколов адаптации.

– Выявленное «терапевтическое окно» сна для фотостимуляции создаёт основу для разработки хрономодулированных методик фотобиомодуляции при болезни Альцгеймера и других нейродегенеративных заболеваниях, связанных с нарушением глимфатического клиренса.

– Синхронная регистрация ЭЭГ и мультифотонных изображений позволяет неинвазивно оценивать дренажную функцию мозга в реальном времени, что может быть использовано в доклинических исследованиях нейропротекторных препаратов.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Введение

Во введении обоснована актуальность темы, связанная с необходимостью изучения дренажных функций мозга в условиях естественного сна без анестезии и стресса от фиксации. Сформулированы цель и задачи исследования, указаны

научная новизна и практическая значимость работы, представлены положения, выносимые на защиту.

1 Обзор литературы

В первой главе проанализированы современные методы изучения сна, оптические технологии нейровизуализации, подходы к регистрации кальциевой активности глиальных клеток и их роль в дренаже мозга. Рассмотрены проблемы фиксации головы животных (стресс, подавление REM-сна, артефакты). Показано, что существующие методики (анестезия, наголовные микроскопы, жёсткая фиксация) не позволяют одновременно достичь высокого пространственного разрешения, длительного мониторинга и сохранения естественного сна. Обоснована необходимость разработки новой системы фиксации, валидированной по микроглиальной Ca^{2+} -активности и пригодной для изучения фотостимуляции дренажа.

2 Материалы и методы исследования

Представлена характеристика экспериментальных животных (30 самцов мышей BALB/c, 1 месяц). Детально описаны хирургические процедуры: имплантация ЭЭГ-электродов, хронических катетеров в боковой желудочек и бедренную вену, установка 3D-печатной головной пластины и оптического окна. Изложен протокол поэтапной адаптации животных к фиксации и тренировки сна под микроскопом (10 дней, отбор 14 из 30 мышей). Описана система фиксации: многослойный матрас, индивидуальный бокс, винтовая стабилизация. Приведены параметры мультифотонной микроскопии (Nikon A1R MP, $\lambda=970$ нм, 30 кадров/с) и синхронной ЭЭГ-регистрации. Указаны методы введения контрастных агентов (FITCD, Evans Blue, ФАβ) и протокол фотостимуляции (635 нм, 50 мВт/см², ежедневно в течение недели во время сна или бодрствования). Описан количественный анализ изображений (ImageJ: вычитание фона «катящимся шаром», бинаризация, морфологическая фильтрация, расчёт доли

площади, занятой частицами) и статистическая обработка (ANOVA с пост-тестом Данна, $p < 0,05$).

3 Результаты исследования

3.1 Разработка системы фиксации

Создана экспериментальная установка, включающая матрас из пенополиуретана с мягкой обивкой, имитирующей шерсть животных, и нагревательным ковриком; небольшую индивидуальную коробку для сна, которую мышь может перемещать; большую клетку для адаптации; облегчённую 3D-печатную головную пластину с винтовой системой стабилизации, позволяющую одновременно крепить ЭЭГ-электроды, хронический катетер и оптическое окно. После 10 дней тренировки 14 из 30 мышей (47%) демонстрировали стабильные эпизоды NREM- и REM-сна под микроскопом, что подтверждено ЭЭГ-паттернами (дельта-волны во сне, тета-ритм в REM, десинхронизация при бодрствовании). Разработанная система обеспечила возможность длительной (до 2 часов) оптической визуализации мозга без признаков дегидратации (гибкая поилка) и без использования анестезии.

3.2 Дренажные процессы во сне и бодрствовании

Методом мультифотонной микроскопии *in vivo* у одних и тех же мышей ($n=5$) проведено сравнение распределения FITCD (70 кДа) в периваскулярных пространствах (PVS) после инъекции в правый боковой желудочек. Во время глубокого NREM-сна (контроль по ЭЭГ) интенсивность флуоресценции FITCD в PVS была достоверно выше, чем в бодрствовании, что свидетельствует о расширении дренажных путей. Количественный анализ показал, что отношение площади, занятой маркером, к общей площади области интереса возрастает в 2,3 раза ($p < 0,001$). *Ex vivo* конфокальная визуализация мозга и глубоких шейных лимфатических узлов подтвердила большее накопление FITCD у спящих мышей.

3.3 Эффекты фотостимуляции (ФС)

На тех же животных ($n=5$) проведены повторные измерения в трёх временных точках (дни 1, 3, 5) после полного клиренса FITCD. Фотостимуляция

(635 нм, 50 мВт/см²) проводилась во время ЭЭГ-верифицированного глубокого сна или бодрствования. Установлено, что ФС во время сна вызывает статистически значимое увеличение интенсивности сигнала FITCD в PVS по сравнению с контролем без ФС ($1,58 \pm 0,04$ vs $1,22 \pm 0,05$, $p < 0,001$). При ФС в бодрствовании достоверного усиления клиренса не наблюдалось ($1,24 \pm 0,01$, $p > 0,05$ vs контроль). Аналогичные результаты получены при использовании флуоресцентного β -амилоида (ФА β): ФС во сне, но не в бодрствовании, ускоряла выведение ФА β из паренхимы и увеличивала его накопление в менингеальных лимфатических сосудах и глубоких шейных узлах. Таким образом, выявлено «терапевтическое окно» глубокого сна, в котором фотостимуляция эффективно усиливает лимфатический и лимфатический дренаж мозга.

ВЫВОДЫ

1. Разработан новый метод фиксации свободно движущихся мышей с помощью пластины для головы под объективом мультифотонного микроскопа. Установлено, что после периода адаптации у 47% мышей (14 из 30) выявлен медленный и быстрый сон под микроскопом, что свидетельствует о демонстрации естественного сна в условиях эксперимента и возможности оптического мониторинга сценариев спящего мозга в реальном режиме времени. Разработанный метод включает: (1) применение специального матраса, сохраняющего запахи домашней клетки и имеющего текстуру, напоминающую шерсть, что позволяет животным быстрее адаптироваться к экспериментальной обстановке; (2) фиксация головы с помощью облегчённой головной пластины с системой фиксирующих винтов, крепления ЭЭГ электродов и хронического катетера для введения контрастных веществ в правый боковой желудочек, а также для места создания оптического окна; (3) отбор мышей в процессе обучения на основе их способности засыпать в экспериментальной установке.

2. Во время глубокого сна наблюдается более высокая интенсивность сигнала от декстрана по сравнению с бодрствованием, так как происходит

естественная активация дренажных процессов головного мозга за счёт увеличения диаметра периваскулярных пространств вокруг кровеносных сосудов, за счёт чего усиливается клиренс красителя из тканей головного мозга.

3. ФС во время глубокого сна, но не в состоянии бодрствования, усиливает дренажные процессы и клиренс декстрана и ФАβ из головного мозга мышцей, то есть увеличивает движение мозговой жидкости по глифматическим и/или лимфатическим путям, способствуя более эффективному выведению растворенных в мозговой жидкости веществ на периферию.