

МИНОБРНАУКИ РОССИИ

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования

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

Кафедра физиологии человека и животных

**ФОТОСТИМУЛЯЦИЯ ДРЕНАЖНОЙ ФУНКЦИИ ГОЛОВНОГО
МОЗГА ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ПАТОЛОГИИ**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 4 курса 421 группы

Направления подготовки магистратуры 06.04.01 Биология

Биологического факультета

Якуниной Арины Вадимовны

Научный руководитель

доцент, канд. биол. наук

Т. Д. Искра

(подпись, дата)

Зав. кафедры

доцент, док. биол. наук

О. В. Семячкина–Глушковская

(подпись, дата)

Саратов 2025

ВВЕДЕНИЕ

Исследование механизмов, обеспечивающих очищение центральной нервной системы, приобретает все большую актуальность в контексте изучения неврологических заболеваний и патофизиологических состояний [1]. Нарушение процессов клиренса метаболитов и патологических продуктов, таких как кровь и ее компоненты, может приводить к развитию воспаления, нейродегенерации и других осложнений [2]. В связи с этим поиск эффективных методов, направленных на улучшение очищения центральной нервной системы, остается одной из ключевых задач современных нейронаук.

Внутрижелудочковые кровоизлияния, являющиеся распространенным осложнением у недоношенных детей, приводят к значительным нарушениям в работе центральной нервной системы и поэтому требуют разработки новых стратегий [3, 4]. В этом контексте фотобиомодуляция рассматривается как один из потенциальных методов, способных улучшить состояние пациентов за счет стимуляции репаративных процессов и усиления клиренса патологических продуктов.

Исследования показывают, что у недоношенных детей с возрастом 27 недель и менее в 40–60% случаев отмечаются умеренные или тяжелые неврологические нарушения. Частота внутрижелудочковых кровоизлияний составляет 20–25%, при этом риск и тяжесть увеличиваются с уменьшением гестационного возраста и массы тела. Внутрижелудочковые кровоизлияния 3-й степени связаны с высокой летальностью и ухудшением когнитивных и моторных функций, требуя в 75% случаев специального ухода, при этом частота детского церебрального паралича может достигать 63% [5, 6, 7, 8].

В связи с этим возникает необходимость поиска эффективных путей улучшения дренажной функции головного мозга и предотвращения серьезных последствий, таких как постгеморрагическая гидроцефалия.

С развитием современных технологий фотобиомодуляция стала рассматриваться как перспективный метод лечения патологий нервной системы [9].

Фотостимуляция основана на применении световых лучей определенной длины волны для модуляции клеточных и молекулярных процессов. Исследования последних лет демонстрируют, что фотобиомодуляция стимулирует репаративные процессы, уменьшает окислительный стресс и улучшает микроциркуляцию, что делает ее потенциально эффективным инструментом для восстановления функций центральной нервной системы [10, 11].

Выявление механизмов фотостимуляции позволит разработать улучшенные методы лечения и профилактики неврологических осложнений.

Целью исследования стало изучение влияния фотостимуляции на процесс очищения головного мозга новорожденных крыс с патологией на примере модели внутрижелудочковой геморрагии.

Для реализации указанной цели были поставлены следующие задачи:

1. изучить влияние фотостимуляции на дренажную функцию лимфатических сосудов головного мозга у крысят с внутрижелудочковой геморрагией;
2. исследовать влияние фотостимуляции на патологические параметры новорожденных крыс при экспериментально индуцированных внутрижелудочковых кровоизлияниях;
3. изучить влияние фотобиомодуляции на моторные и рефлекторные функции у новорожденных крыс с внутрижелудочковыми кровоизлияниями.

Основная часть

В разделе представлен анализ современных научных данных о лимфатической системе головного мозга, её роли в дренаже метаболитов и патологических продуктов. Рассмотрены механизмы развития внутрижелудочковых геморрагий (ВЖГ) у новорожденных, их последствия в виде нарушения ликвородинамики, повышения внутричерепного давления и повреждения нервной ткани. Особое внимание уделено современным методам реабилитации, включая фотобиомодуляцию (ФБМ), как перспективному подходу для улучшения дренажной функции мозга.

Обсуждаются ключевые исследования, демонстрирующие влияние ФБМ на микроциркуляцию, активацию лимфатических сосудов и ускорение клиренса токсичных метаболитов. Подчёркивается роль менингеальных лимфатических сосудов (МЛС) в выведении эритроцитов при кровоизлияниях, а также механизмы действия света ближнего инфракрасного диапазона (1267 нм) на сократимость лимфатических сосудов.

Материалы исследования

Объекты исследования

В экспериментах были использованы новорожденные 10-дневные крысы Wistar. Животные содержались в стандартных лабораторных условиях, с доступом к пище и воде *adlibitum*. Все экспериментальные процедуры проводились в соответствии с “Руководством по содержанию и уходу за лабораторными животными” [12], Директивой 2010/63/ЕС “Об охране животных, используемых в научных целях”, и руководящими указаниями Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (№ 742 от 13.11.1984) [13], которые были утверждены Комиссией по биоэтике Саратовского государственного университета (Протокол № 7) и Комитетом по институциональному уходу и использованию животных Университет Нью-Мексико, США (19-200767-HSC200247).

Методы исследования

Для создания неонатальной модели ВЖГ вводили 7 мкл аутологичной крови в правый боковой желудочек (координаты желудочка: AP=-1,2 мм; ML=1,8 мм; DV=2,7 мм). Кровь брали из хвостовой вены той же крысы и собирали в стерильный эппендорф, предварительно промытый гепарином, чтобы избежать коагуляции во время забора крови и инъекции. Во всех оперативных вмешательствах использовались асептические методы.

Определение размеров геморрагического повреждения, периваскулярных пространств и площади желудочков проводили на 3-й день после развития внутрижелудочковых геморрагий. Для этого животных анестезировали и интракардиальноперфузировали 4% формалином в 0,1 моль/л фосфатно-солевого буфера (рН 7,4). После этого животных выводили и удаляли мозг, выдерживали в 4% формалине в течение 24 ч, а затем мозг каждого животного разрезали на блоки толщиной 3 мм в трех проекциях.

Для фотовоздействия использовался лазерный диод (LD-1267-FBG-350, Innolume, Дортмунд, Германия), излучающий на длине волны 1267 нм. Лазерный диод был соединен с одномодовым дистальным волокном, оканчивающимся коллимационной оптикой, чтобы обеспечить диаметр луча на головном мозге 5 мм. Облучали область сагиттального синуса курсом 63 Дж/см² в течение 7 дней с последовательностью 17 мин — облучение, 5 мин — пауза, всего 61 мин.

Для регистрации внутричерепного давления катетер (PE-50), заполненный искусственной спинномозговой жидкостью (Sigma-Aldrich), вводили через атлантозатылочную мембрану в большую цистерну и приклеивали цианоакрилатным клеем.

Для мечения лимфососудов использовали антитела Anti-Lyve-1 и Anti-Prox-1. Мозговые оболочки фиксировали со сводом черепа в 2% формалине в течение ночи при 4 °С. Затем мозговые оболочки отделяли от черепа. Для визуализации лимфососудов в глубоких шейных лимфоузлах их удаляли и фиксировали в 2% формалине при 4 °С, а затем фиксировали в 2% агарозе,

после чего нарезали на срезы толщиной 60 мкм с помощью вибратома (Leica VT1000, Германия). Препараты мозговых оболочек и лимфоузлов промывали 3 раза (по 5 мин) промывным раствором (0,2% Тритон-Х-100 в PBS), затем инкубировали в блокирующем растворе (смесь 2% Тритон-Х-100) в течение 1 часа с последующей инкубацией с AlexaFluor 488 — конъюгированным антителом против Lyve-1 (1:500; FAB2125G, R&D Systems, Миннеаполис, Миннесота, США), с кроличьими антителами к Prox-1 (1:500; ab101851, Abcam, Кембридж, Великобритания). Срезы мозговых оболочек мышей, а также лимфоузлов визуализировали с помощью конфокального микроскопа (LSM 710, Zeiss, Йена, Германия) с объективом $\times 20$ (0,8 NA).

Для изучения роли МЛС в выведении продуктов крови из системы желудочков проводили их фотоабляцию (визудин + лазер 689 нм). Крысят из группы “визудин+лазер” анестезировали и вводили визудин (APExBIO, Cat. No. A8327, A8327, 5 мкл) в большую цистерну со скоростью 0,1 мкл/мин. Через 15 минут воздействовали лазером с длиной волны 689 нм (ChangchunLaserTechnology, доза 50 Дж/см²) в различных местах, включая большую цистерну, левый и правый поперечные синусы, верхний сагиттальный синус, и соединение всех пазух.

Проводили оценку поведения новорожденных животных с ВЖГ на фоне получения курса фотовоздействия. Все поведенческие тесты проводились во время фазы светового цикла в изолированной поведенческой комнате. Животные были выбраны для тестирования поведения на 11-й день после операции по введению крови в правый боковой желудочек. В исследованиях использовали следующие поведенческие тесты для новорожденных крыс: тест на оценку силы задних и передних конечностей, тест на избегание падения, тест на избегание светлых участков.

Для гистологического анализа состояния тканей мозга и церебральных сосудов животные умерщвлялись путем помещения их в станцию для эвтаназии (SK-CO2-STD, Южная Корея). Мозг извлекали и фиксировали в

забуференном формалине 10 % и далее в парафине. Толщина срезов была 4 мкм; окраска проводилась гематоксилином и эозином.

Флуоресцентная микроскопия мониторинга накопления лимфатического выведения красителя Evans Blue из системы желудочков в глубокие шейные лимфоузлы. В правый боковой желудочек вводили 5 мкл 5% красителя Evans Blue (Sigma-Aldrich) (0,5 мл/мин). Через 20 мин обнажали глубокие шейные лимфоузлы. Стереофлуоресцентный микроскоп (AxioZoom. V16, Zeiss, Йена, Германия), работающий при 10-кратном увеличении, использовали для визуализации накопления красителя в лимфоузлах в течение 60 мин до и после ФС (9 Дж/см²). После визуализации интенсивность флуоресценции красителя (а.е.) измеряли с использованием программного обеспечения FIJI.

Мониторинг распределения FITC-dextran70 кДа в головном мозге и ее лимфатическое выведение в глубокие шейные лимфоузлы. Сосуды головного мозга заполняли красителем Evans Blue, инъецированным в хвостовую вену (Sigma Chemical Co., Сент-Луис, Миссури, 2 мг/масса тела, 1% раствор в 0,9% физиологическом растворе). Оптическое исследование *ex vivo* распределения FITC-dextran проводили через 3 ч после внутрижелудочкового введения трейсера 10-дневным крысам. Изображение было выполнено с использованием конфокального микроскопа (Nikon A1R MP, Nikon Instruments Inc.) с объективом × 20 (0,75 NA).

После завершения экспериментов животные умерщвлялись в CO₂аппарате (CO₂GasChamber, ThreeshineInc., Korea).

Статистический анализ полученных результатов проводился с помощью программного пакета StatSoft Statistica v6.0 Multilingual. Значимость различий измеряемых параметров оценивалась с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни для независимых выборок. Критерий Уэлча применяли для проверки статистической гипотезы о равенстве математических ожиданий случайных величин, имеющих необязательно равные известные дисперсии. Критерий Уилкоксона применяли для сопоставления показателей, измеренных

в двух разных условиях на одной и той же выборке испытуемых. Все показатели были представлены в виде «среднее±стандартное отклонение». Значения P менее чем 0,05 рассматривались как значимые.

Результаты исследования

Проведенное исследование было направлено на изучение эффектов фотостимуляции на дренажную функцию менингеальных лимфатических сосудов (МЛС), а также на восстановление патологических параметров и моторно-рефлекторных функций у новорожденных крыс с моделью внутрижелудочковых геморрагий (ВЖГ). Работа состояла из трех основных этапов, каждый из которых включал комплексные экспериментальные и статистические методы анализа.

На первом этапе исследовалась роль фотостимуляции в усилении дренажной функции МЛС. Использование красителей (FITC-dextran 70 кДа) и антител (Anti-Lyve-1, Anti-Prox-1) позволило визуализировать процессы клиренса метаболитов и эритроцитов. Результаты показали, что фотостимуляция значительно ускоряет распределение трейсеров в вентральной области мозга и их накопление в глубоких шейных лимфатических узлах. Статистический анализ подтвердил достоверное увеличение скорости клиренса при применении фотостимуляции ($p < 0,001$). Кроме того, эксперименты с визуальным и лазерным облучением выявили функциональную значимость МЛС в выведении метаболитов, а также их уязвимость к комплексному воздействию, приводящему к повреждению сосудов.

Второй этап был посвящен изучению влияния фотостимуляции на патологические изменения при ВЖГ. Гистологический анализ показал, что фотостимуляция способствует уменьшению объема геморрагий в 2,38 раза по сравнению с контролем, снижению внутричерепного давления (восстановление в 1,6 раза быстрее) и уменьшению размеров периваскулярных пространств. Эти данные свидетельствуют о выраженном терапевтическом

эффекте фотобиомодуляции, ускоряющей репаративные процессы в тканях мозга.

Третий этап включал оценку моторных и рефлекторных функций у крыс с ВЖГ. Поведенческие тесты (оценка силы мышц, избегание падения и др.) продемонстрировали значительное улучшение показателей в группе с фотостимуляцией по сравнению с группой без лечения. Например, время выполнения теста на силу мышц передних конечностей увеличилось с 4 до 12 минут, а результаты теста на избегание падения сравнивались с контрольными значениями. Это подтверждает положительное влияние фотостимуляции на восстановление неврологических функций.

Выводы.

В ходе исследования было выявлено, что применение фотостимуляции с использованием лазерного излучения длиной волны 1267 нм способствует улучшению дренажной функции мозга при модели внутрижелудочковых кровоизлияний у новорожденных крыс. Анализ результатов проведенных этапов позволил сделать ряд важных выводов:

1. фотостимуляция усиливает дренажную функцию лимфатических сосудов головного мозга у крысят с внутрижелудочковой геморрагией. Использование маркеров подтвердило наличие и функциональную активность лимфатических сосудов в менингеальных оболочках, что свидетельствует об их участии в дренаже метаболитов. Эксперименты с красителями продемонстрировали, что менингеальные лимфатические сосуды эффективно транспортируют макромолекулы и компоненты крови из желудочковой системы;

2. фотобиомодуляция способствует восстановлению патологических параметров новорожденных крыс при экспериментально индуцированных внутрижелудочковых кровоизлияниях. Ряд параметров, таких как: размер структур, внутричерепное давление, изменение структуры тканей головного

мозга восстанавливались в несколько раз быстрее при применении фотостимуляции;

3. стимуляция лазером способствует восстановлению моторных и рефлекторных функций у новорожденных крыс с внутрижелудочковыми кровоизлияниями. Установлено, что данный метод стимуляции способствует нормализации сенсорно-двигательных рефлексов, нарушенных в результате индуцированной патологии.

Таким образом, результаты исследования подтверждают эффективность фотобиомодуляции при внутрижелудочковых геморрагиях, подчеркивая её потенциал как метода стимуляции, способствующего снижению воспаления и улучшению процессов регенерации пораженных тканей.

Список использованных источников

- 1 Nedergaard, M. Glymphatic failure as a final common pathway to dementia / M. Nedergaard, S. A. Goldman // *Science*. — 2020. — V.370, №6512. — P.50–56.
- 2 Tsao, P-C. Pathogenesis and prevention of intraventricular hemorrhage in preterm infants / P-C. Tsao // *J Korean Neurosurg Soc*. — 2023. — V.66, №3. — P.228–238.
- 3 Mitrofanis, J. Why and how does light therapy offer neuroprotection in Parkinson’s disease? / J. Mitrofanis // *Neural Regeneration Research*. — 2017. — V.12, №4. — P.574–575.
- 4 Posthemorrhagic hydrocephalus development after germinal matrix hemorrhage: established mechanisms and proposed pathways / D. Klebe [et al.] // *Journal of Neuroscience Research*. — 2020. — V.99, №7. — P.1023–1032.
- 5 Факторы риска развития внутрижелудочковых кровоизлияний у недоношенных детей: результаты одноцентрового исследования\ / А. Р. Киртбая [и др.] // *Неонатология: новости, мнения, обучение*. — 2024. — Т.12, №2. — С.8–19.
- 6 Каримова, Л.К. Внутрижелудочковое кровоизлияние — современные представления о патогенезе, факторах риска, диагностике и лечении (обзор литературы) / Л. К. Каримова // *Российский остеопатический журнал*. — 2020. — Т.1, №2. — С.158–167.
- 7 Внутрижелудочковые кровоизлияния у глубоконедоношенных детей: этиопатогенез, клиника, факторы риска и особенности перинатальной профилактики / О. В. Завьялов [и др.] // *Врач*. — 2021. — Т.32, №2. — С.10–16.
- 8 Клинические рекомендации: внутрижелудочковое нетравматическое кровоизлияние у плода и новорождённого. [Электронный ресурс]: https://raspm.ru/files/vnutrigeludochkovye_krovoizliyania.pdf (дата обращения: 22.04.2025). Загл. с экрана.

9 Hambin, M.R. Photobiomodulation for traumatic brain injury and stroke / M. R. Hambin // Journal of Neuroscience Research. — 2018. — V.99, №4. — P.731–743.

10 Brain photobiomodulation therapy: a narrative review / F. Salehpour [et al.] // Molecular Neurobiology. — 2018. — V.58, №3. — P.1165–1187.

11 The glymphatic system: current understanding and modeling / T. Bohr [et al.] // iScience. — 2022. — V.25, №9. — P.104987.

12 Приложение А к Европейской конвенции об охране позвоночных животных, используемых для экспериментов и в других научных целях (ETS №123). Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными (статья №5 конвенции) [Электронный ресурс]: <https://ruslasa.ru/wp-content/uploads/2017/06/Prilozhenie-A-k-ETS.pdf> (дата обращения: 02.03.2024). Загл. с экрана.

13 Директива 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях [Электронный ресурс]: https://ruslasa.ru/wp-content/uploads/2017/06/Directive_201063_rus.pdf (02.03.2024). Загл. с экрана.