

МИНОБРНАУКИ РОССИИ

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования

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

Кафедра физиологии человека и животных

**Технология фотобиостимуляции дренажной системы мозга во время сна
для улучшения обучения и
памяти у мышей**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 4 курса 421 группы

Направления подготовки магистратуры 06.03.01 Биология

Биологического факультета

Романовой Анны Романовны

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 2025

ВВЕДЕНИЕ

Одним из наиболее распространенных нейродегенеративных заболеваний, приводящих к деменции, является болезнь Альцгеймера (БА). Деменция при БА характеризуется прогрессирующим снижением когнитивных функций, включая потерю памяти, нарушение мышления, речи, ориентации в пространстве и изменения поведения. Ключевым патогенетическим звеном является накопление бета-амилоидных бляшек (А β) в тканях головного мозга, что провоцирует нейровоспаление, синаптическую дисфункцию и гибель нейронов. С 1990 по 2021 год глобальная смертность от БА возросла на 147%, а по данным ВОЗ, деменция входит в топ-7 причин смерти среди пожилых людей. Ожидается, что к 2050 году число пациентов с деменцией превысит 150 млн человек, что создаст значительную социально-экономическую нагрузку [1-2]. Несмотря на многочисленные клинические исследования, современные фармакологические подходы, такие как ингибиторы холинэстеразы, антагонисты NMDA-рецепторов и моноклональные антитела к А β , демонстрируют ограниченную эффективность в коррекции деменции при БА и часто сопровождаются серьезными побочными эффектами [3].

Возникновение возрастных заболеваний, таких как метаболический синдром, сахарный диабет 2 типа, болезнь Паркинсона, деменция и БА, связаны с окислительным стрессом и хроническим нейровоспалением. Нарушение окислительно-восстановительного гомеостаза приводит к дисфункции пероксисом и нарушению выработки плазмалогена (ПЗМ), что может быть одним из механизмов развития возрастных заболеваний. БА имеет сложную этиологию, включающую нарушение генов, приводящих к избыточной генерации β -амилоида и тау-олигомеров. В настоящее время признанно, что ни один фармакологический препарат не может быть решением проблемы лечения БА, требуя комплексной терапии [4, 5].

Метод использования ПЗМ может стать перспективной технологией для альтернативной терапии БА, так как он основан на использовании липидов, с

помощью которых происходит переработка белка-предшественника А β . ПЗМиграют огромную роль в поддержании гомеостаза головного мозга. Они являются недостающим звеном между биохимическими и функциональными аномалиями, наблюдаемыми при БА и ее патологическими признаками, такими как накопление А β в мозге [6-8]. Уровень ПЗМ в мозге повышается до 30-40 лет и затем резко снижается примерно к 70 годам. Этот возрастной диапазон совпадает с периодом жизни, когда заболеваемость БА возрастает в геометрической прогрессии [9]. Таким образом, учитывая резкое снижение уровня ПЗМ в головном мозге с возрастом и их важную роль в поддержании гомеостаза мозга, можно сделать предположение, что дефицит ПЗМ в мозге тесно связан с БА и деменцией [10].

Целью данного исследования является разработка нового метода терапии БА на основе применения ПЗМ.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Изучить влияние ПЗМ на клиренс А β у мышей с инъекционной моделью БА с применением иммуногистохимического анализа и конфокальной микроскопии;

2. Провести анализ возрастных различий в эффектах ПЗМ на клиренс А β у мышей 3, 6, 12 и 24 месяцев.

Основная часть

В современном мире огромную проблему для здравоохранения составляют нейродегенеративные заболевания, в том числе старческая деменция, большинство случаев которой (60-70%) вызваны БА. В настоящее время во всем мире насчитывается около 50 миллионов пациентов с БА, и, согласно прогнозам, это число будет удваиваться каждые 5 лет и увеличится до 152 миллионов к 2050 году [11].

Причины возникновения БА пока не до конца изучены, но на данный момент выделено множество факторов риска, включая генетические предрасположенности и окружающую среду. Среди них можно выделить травму головы в прошлом, высокое артериальное давление, наличие клинической депрессии. В настоящее время ключевым элементом патогенеза считается нарушение метаболизма А β , который существует в нескольких формах, различающихся по своей растворимости, токсичности и способности к клиренсу.

Одним из важных аспектов является различие между свободным (растворимым) А β и связанным (олигомерным) А β . Свободный А β , циркулирующий в межклеточной жидкости и цереброспинальной жидкости (ЦСЖ), относительно эффективно удаляется через лимфатическую систему и менингеальные лимфатические сосуды [12, 13].

Функциональные исследования на животных моделях, в частности на трансгенных мышах с флуоресцентной маркировкой лимфатических сосудов, предоставили убедительные доказательства того, что менингеальные лимфатические сосуды обеспечивают физиологический отток не только СМЖ, но и интерстициальной жидкости мозга в шейные лимфатические узлы [14]. Этот процесс имеет критическое значение для поддержания гомеостаза ЦНС, поскольку позволяет эффективно удалять потенциально токсичные продукты метаболизма, включая белки с патологической конформацией.

С практической точки зрения, МЛС представляют значительный интерес как потенциальный путь доставки лекарственных препаратов, позволяющий обойти гематоэнцефалический барьер [15]. Эта возможность открывает новые перспективы в лечении нейродегенеративных заболеваний, нейроонкологических процессов и хронических нейроинфекций. В частности, исследуется возможность использования наночастиц, способных проникать в лимфатические сосуды мозговых оболочек для целенаправленной доставки терапевтических агентов.

Плазмалогены представляют собой один из видов фосфолипидов, которые оказывают на организм антиоксидантное действие. Они в большом количестве содержатся в нервных клетках головного мозга. Плазмалогены являются основой нервных волокон, которые связывают нервные клетки мозга – нейроны – между собой. Путем роста нервных связей между нейронами мозг развивается, поэтому плазмалоген является оптимальным средством против деменции.

Плазмалогены выполняют несколько важных функций. Одной из ключевых функций плазмалогенов является поддержание структуры и функций клеточных мембран. Они обеспечивают жидкость и гибкость мембран, что необходимо для нормального процесса обмена веществ и передачи сигналов между клетками[16].

Материалы исследования

Объекты исследования

Работа была выполнена на базе кафедры физиологии человека и животных биологического факультета и лаборатории «Умного сна» СГУ им. Н. Г. Чернышевского.

Во всех экспериментах использовали самцов мышей BALB/c, полученных из Национального ресурсного центра лабораторных животных в Пущино (Московская область, Россия). Животные содержались в стандартных лабораторных условиях с доступом к пище и воде. Все экспериментальные

процедуры проводились в соответствии с «Руководством по уходу и использованию лабораторных животных».

Эксперименты проводили в следующих группах:

- контроль;
- контроль с ПЗМ;
- мыши с БА;
- мыши с БА с ПЗМ;
- 6, - 14, - 24-месячные мыши без ПЗМ;
- 6, - 14, - 24-месячные мыши + ПЗМ, n=7-8 в каждой группе.

Методы исследования

Для приготовления липосом использовали концентрат фосфолипидов из бычьего мозга. Путем хроматографических методов получали дисперсии липосом, разделяли на аликвоты, замораживали в жидком азоте и хранили при -70°C до востребования.

Чтобы вызвать БА у мышей, мы использовали инъекцию пептида A β в гиппокамп (AP = -1,7 мм; ML = +/-1,2 мм; DV = 1,4 мм) со скоростью 0,1 мкл/мин с помощью микроинъектора и шприца Гамильтон.

Для проведения процедуры введения ПЗМ в желудочек мышам вживляют хронический катетер. Для этого в черепе животного продельвается трепанационное отверстие по координатам AP = -0,5 мм и ML = 1,2 мм диаметром 1,5 мм с помощью сверла. Полиэтиленовый катетер PE-20 помещается в стереотаксически держатель и вживляется в череп (DV = 2 мм), после чего фиксируется с помощью стоматологического акрила. Инъекция ПЗМ в объёме 5 мкл (~0,15 мг) производилась со скоростью 0,1 мкл/мин с помощью микроинъектора.

Для конфокальной визуализации наличия FA β в мозговых оболочках и гиппокампе мы использовали протокол иммуногистохимического анализа с маркерами эндотелиального гиалуронанового рецептора 1 (LYVE1) лимфатических сосудов и CD31 эндотелия крови.

Для иммуноферментного анализа (ИФА)использовали набор для определения растворимой формы Аβ. У мышей всех исследуемых групп был собран мозг и проведена дальнейшая пробоподготовка.

Статистический анализ с использованием критерия суммы рангов Уилкоксона с поправкой на непрерывность (критерий Манна — Уитни — Уилкоксона). Уровень значимости был установлен на $p < 0,05$.

Результаты исследования

Влияние плазмалогенов на клиренс Аβ из мозга на ранних стадиях болезни Альцгеймера

На первом этапе мы исследовали, способны ли ПЗМ стимулировать выведение Аβ из мозга и улучшать когнитивные нарушения на ранних стадиях БА (болезни Альцгеймера). В контроле небольшое количество Аβ присутствует в тканях мозга, его менингеальных сосудах и в глубоких шейных лимфатических узлах. В то же время в контроле ПЗМ не изменял уровень Аβ в исследуемых тканях. В группе БА уровень Аβ был значительно выше, чем в контрольной группе, во всех исследуемых тканях. В группе БА уровень Аβ был значительно выше, чем в контрольной группе, во всех исследуемых тканях. Важно отметить, что 21-дневный курс ПЗМ снизил уровень Аβ в головном мозге, его менингеальных сосудах и в глубоких шейных лимфатических узлах у мышей с БА. Анализ ИФА подтвердил конфокальные данные и показал повышенный уровень Аβ в тканях мозга мышей из группы БА, который снизился после курса ПЗМ. В контрольных группах влияние ПЗМ на количество Аβ в мозге отсутствовало, что, возможно, связано с низким уровнем Аβ в мозге в нормальном состоянии. Таким образом, эти данные свидетельствуют о том, что повышенное содержание Аβ в мозге и лимфатической системе мышей с БА может быть улучшено 21-дневным курсом ПЗМ.

Возрастные различия в выведении бета-амилоида из мозга мыши при инъекции плазмалогенов

Повышение уровня А β в тканях мозга является не только одним из признаков развития БА, но и фактором, сопровождающим старение мозга. Чтобы ответить на вопрос, можно ли скорректировать возрастные изменения уровня А β в мозге, во второй серии исследований изучали влияние курса ПЛМ на выведение А β из мозга в лимфоузлы у мышей разного возраста - 3-месячных (молодых взрослых), 6-месячных (среднего возраста), 14-месячных (пожилых) и 24-месячных (старых) мышей. Результаты конфокального анализа показали, что у молодых мышей (6 месяцев) низкий уровень А β в мозге, менингеальных сосудах и гшЛУ. Однако у мышей среднего и старого возраста (14 и 24 месяца) наблюдался повышенный уровень А β в мозге и в менингеальных сосудах, особенно, у старых мышей по сравнению с молодыми и среднего возраста животными, которые демонстрировали аналогичный низкий уровень А β в исследуемых тканях. У 14-месячных мышей введение ПЗМ усиливало выведение А β из мозга в периферические лимфатические пути, то есть через лимфатические пути, что приводило к снижению уровня А β в мозге и менингеальных сосудах и приближению его содержания к показателям молодых и средневозрастных животных. Интересно, что у 24-месячных мышей, несмотря на высокие значения А β в мозге и менингеальных сосудах, наблюдалось низкое содержание А β в глубоких шейных лимфатических узлах (рисунок 10), что, возможно, связано с возрастным снижением дренажной функции МЛС. ИФА-анализ уровня растворимого А β в головном мозге показал данные, аналогичные результатам конфокального анализа. Таким образом, ПЗМ улучшает клиренс А β у пожилых, но не у старых мышей, что, скорее всего, связано с частичным сохранением функций МЛС в старом мозге. Это может объяснить низкое содержание А β в глубоких шейных лимфоузлах у 24-месячных мышей, несмотря на высокий уровень А β в мозге и менингеальных сосудах и отсутствие эффекта ПЗМ на клиренс А β у старых мышей.

ВЫВОДЫ

1. Эксперименты с применением инъекционной модели БА выявили, что 21-дневный курс ПЗМ эффективно снижает уровень А β не только в тканях мозга, но и в оболочках мозга и глубоких шейных лимфатических узлах. Это свидетельствует о том, что ПЗМ способствует активному выведению А β из ЦНС через лимфатическую систему. При этом в контрольной группе, где уровень А β изначально был низким, значимого влияния ПЗМ не наблюдалось, что указывает на его направленное действие именно в условиях патологического накопления А β . Полученные данные подтверждаются как методами конфокальной микроскопии, так и ИФА. Таким образом, ПЗМ может рассматриваться как перспективный метод для коррекции амилоидной нагрузки при развитии БА.

2. Изучение возрастных различий показало, что уровень А β в мозге и в его оболочках прогрессивно увеличивается с возрастом, достигая максимума у старых (24-месячных) мышей. При этом у животных среднего возраста (14-месячных) ПЗМ демонстрирует выраженный положительный эффект, способствуя выведению А β через лимфатические пути и снижая его концентрацию до уровня, характерного для молодых мышей. Однако у старых мышей, несмотря на высокое содержание А β в мозге, курс приема ПЗМ не оказывал значимого влияния на клиренс А β . Это может быть связано с возрастными изменениями в МЛС, что подтверждается низким уровнем А β в шейных лимфоузлах даже при его избытке в ЦНС. Данный факт указывает на критическую роль сохранности лимфатического дренажа для эффективности ПЗМ и объясняет ограниченное действие метода у старых животных.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Li X. Global, regional, and national burden of Alzheimer's disease and other dementias / Li X [и др.] // *Front Aging Neurosci.* – 2022. – Vol. 14. - P. 937486
2. Alzheimer's Association (2022). Alzheimer's disease facts and figures. // *Alzheimer's Dementia.* – 2022 - №. 18. – P. 700–789
3. Saini V.J. Making the Case for the Accelerated Withdrawal of Aducanumab.Whitehouse PJ / V.J Saini [etal.] // *Alzheimers Dis.* – 2022- №. 87(3). – P. 999-1001
4. Amyloid-Related Imaging Abnormalities in 2 Phase 3 Studies Evaluating Aducanumab in Patients with Early Alzheimer Disease / Salloway S [и др.] // *JAMA Neurol.* – 2022. – Vol. 79. – P. 13–21
5. Lim L. The Growing Evidence for Photobiomodulation as a Promising Treatment for Alzheimer's Disease. // Lim L[etal.] // *J. Biosci. Med.* – 2018. – Vol. 6. – P. 100–110
6. Senanayake, V. Plasmalogen deficiency and neuropathology in Alzheimer's disease: Causation or coincidence?/ Senanayake, V.; Goodenowe, D. B. // *Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Intervention.* – 2019. – Vol. 5. – P. 524-532
7. Su, X.Q. Plasmalogens and Alzheimer's disease: a review. / Su, X.Q.; Wang, J.; Sinclair, A.J. // *Lipids Health Dis.* – 2019. – Vol. 18. – P. 100
8. Yamashita, S. Marine Plasmalogens: A Gift from the Sea with Benefits for Age-Associated Diseases. / Yamashita, S.; Miyazawa, T.; Higuchi, O. // *Molecules.* – 2023. – Vol. 28. – P. 6328
9. Наволокин Н. Перспективные стратегии снижения отложения амилоида SARS-CoV-2 в мозге и предотвращения обостряемой COVID-19 деменции и болезни Альцгеймера. / Наволокин Н. [и др.] // *Pharmaceuticals* – 2024. – Vol. 17. – P. 788

10. Hugo, J. Dementia and cognitive impairment: epidemiology, diagnosis, and treatment. / Hugo, J.; Ganguli, M. // Clin Geriatr Med. – 2024. – Vol. 30. – P. 421-442
11. Meletis. C.D. Alkyl-Acylglycerols and the Important Clinical Ramifications of Raising Plasmalogens in Dementia and Alzheimer's Disease. / Meletis. C.D [etal.] // IntegrMed (Encinitas). – 2020 – Vol. 19. – P. 12-16e
12. A paravascular pathway facilitates CSF flow through the brain parenchyma and the clearance of interstitial solutes, including amyloid β ./ Iliff JJ[идр.]//Sci Transl Med –2012.– Aug 15;4(147):147ra111.
13. Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels./ Smirnov I [идр.]//Nature. –2015.– Jul 16;523(7560):337-41.
14. Ahn JH. Meningal lymphatic vessels at the skull base drain cerebrospinal fluid. // Nature. – 2019– Vol. 572. – P.62-66
15. Применение фотодинамической терапии в лечении злокачественных новообразований центральной нервной системы. / Суфианов А. А. [и др.] // Вестник Авиценны. - 2020. - Т. 22, № 3. - С. 491-497
16. Functional aspects of meningeal lymphatics in ageing and Alzheimer's disease. / Da Mesquita S[идр.] // Nature. –2018–Vol. 560(7717). – P.185-191