

МИНОБРНАУКИ РОССИИ

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования

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

Кафедра физиологии человека и животных

Фотоповреждение лимфатических сосудов головного мозга

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 4 курса 421 группы

Направления подготовки магистратуры 06.03.01 Биология

Биологического факультета

Видяпиной Алёны Сергеевны

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

Существует гипотеза, что усиление дренажно-очистительной функции менингеальных лимфатических сосудов может быть перспективной терапевтической мишенью для профилактики неврологических заболеваний [1]. Существование менингеальной лимфатической системы открывает горизонты в появлении принципиально новых фундаментальных знаний о процессах очищения мозга от метаболитов и соединений, которые попадают в него через гематоэнцефалический барьер.

Известно, что гематоэнцефалический барьер строго контролирует процесс поступления веществ в ткани мозга, и нарушение его барьерной функции приводит к серьезным последствиям в его работе [2]. При некоторых заболеваниях, включая инсульт, энцефалит и опухоли головного мозга, проницаемость гематоэнцефалического барьера увеличивается, а потеря его целостности может отражать тяжесть или прогрессирование заболевания [3].

Фотодинамическая терапия применяется в медицине для лечения таких заболеваний, как опухоли мозга. Недавно было открыто, что фотовоздействие при такой процедуре повышает проницаемость церебральных сосудов, что является побочным эффектом [4]. Однако, менингеальные лимфатические сосуды располагаются в оболочках мозга, через которые проходит свет прежде, чем достичь поверхности мозга. Отсюда возникло предположение, что во время процедуры фотодинамического воздействия на мозг повышается проницаемость не только кровеносных, но и лимфатических сосудов.

Целью данной работы явилось изучение эффектов фотодинамического воздействия на лимфатические и кровеносные сосуды.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Изучить эффекты фотодинамического воздействия на дренаж мозга самцов мышей с применением конфокальной микроскопии;
2. Проанализировать фотодинамическое воздействие на сеть менингеальных сосудов самцов мышей;

3. Исследовать эффект фотодинамического воздействия на проницаемость красителя Evans Blue в менингеальных и кровеносных сосудах мозга самцов мышей.

Основная часть

Гематоэнцефалический барьер играет решающую роль в контроле притока и оттока биологических веществ, необходимых для метаболической активности мозга, а также функции нейронов [5].

ГЭБ — динамичная, полупроницаемая и чрезвычайно избирательная система в микрососудах головного мозга большинства позвоночных. Он отделяет кровоток от внеклеточной жидкости мозга. Он играет жизненно важную роль в регулировании транспорта веществ, необходимых для функционирования мозга. ГЭБ поддерживает стабильную среду мозга, защищая его от посторонних веществ в крови, которые могут его повредить.

Основная роль ГЭБ — предохранять мозг от изменений концентрации ионов крови, аминокислот, пептидов и других элементов. Когда ГЭБ становится негерметичным из-за травмы или инфекции, вода и соли попадают в ткань головного мозга, вызывая отек и, следовательно, высокое давление внутри черепа; это может оказаться фатальным [6].

В 2008 году было выявлено, что ФДТ может открывать ГЭБ [7].

Фотодинамическое воздействие представляет собой комбинированное влияние лазера и фотосенсибилизатора (порфирины, хлорины и др.) [8, 9]. Для правильного функционирования ФДТ необходимо наличие трех факторов: 1) фотосенсибилизирующего вещества, 2) источника видимого света (включая кислород) и 3) газа, способного окислять фотосенсибилизатор. Возбужденный фотосенсибилизатор переводит молекулярный кислород в синглетное состояние в результате межсистемного перехода [10]. Эта активная форма кислорода генерирует большое количество активных форм кислорода. Образующиеся активные формы вызывают окисление биологических макромолекул (включая белки, жирные кислоты и ДНК), что в свою очередь приводит к повреждению клеточных органелл, т. е. лизосом, ядра, митохондрий, выводя клетку на путь запрограммированной клеточной смерти [11].

ФДТ индуцированное повреждение клеток стимулирует как врождённый, так и приобретённый иммунный ответ: установлено, что *in vitro*, фотосенсибилизатор в форме сфероидов 5-АЛА способен активировать дендритные клетки (антигенпрезентирующие) [12].

Метаболическая активность центральной нервной системы требует эффективной дренажной системы, обеспечивающей выведение токсинов и продуктов жизнедеятельности клеток. Лимфатические сосуды присутствуют в большинстве тканей организма и недавно были обнаружены в мозговых оболочках [13].

Недавно было обнаружено, что фотодинамическая терапия с интрацистеральной инъекцией 5-АЛА вызывает повреждения менингеальных лимфатических сосудов, что приводит к снижению дренажа мозга. Вызванное ФДТ увеличение проницаемости менингеальных кровеносных сосудов приводит к экстравазации фотовозбужденного 5-АЛА из кровотока в мозговые оболочки, где расположены МЛС. Это, в свою очередь, провоцирует фотоповреждение эндотелия МЛС, предположительно по тому же механизму, по которому ФДТ вызывает повреждение эндотелия кровеносных сосудов [14].

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 использовались взрослые самцы C57BL/6 мышей (весом 23-25 г, возрастом 3 месяца). Мыши были приобретены в Национальном центре ресурсов лабораторных животных в Пущино (Московская область, Россия). Животные содержались в стандартных лабораторных условиях (температура $25\pm 2^\circ\text{C}$, влажность 55%, световой день 12 часов, темный день 12 часов) с неограниченным доступом к пище и воде. Все экспериментальные процедуры проводились в соответствии с

"Руководством по уходу и использованию лабораторных животных", Директивой 2010/63/EU о защите животных, используемых в научных целях, и рекомендациями Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (№742 от 13.11.1984 г.), утвержденными Биоэтической комиссией Саратовского государственного университета (Протокол № 9, 19.02.2024). Эксперименты проводились в следующих группах: 5-АЛА с внутривенным введением, с введением в цистерну Магна и без лазерного возбуждения, а также лазером без обработки 5-АЛА; ФДТ с 5-АЛА с инъекцией в цистерну Магна и 5-АЛА с внутривенной инъекцией ; n = 8 в каждой группе во всех сессиях экспериментов.

Методы исследования

Для повышения проницаемости ГЭБ использовали неинвазивный метод фотовозбуждения 5-АЛА, вводимого в кровь.

Для изучения открытия гематоэнцефалического барьера мы использовали три протокола с использованием внутривенного введения красителя Evans Blue (2 мг/25 г мыши, 1% раствор в физиологическом 0.9% растворе натрия хлорида, Sigma Chemical Co., Сент-Луис, Мичиган, США). Для *in vivo* изображения экстравазации Evans Blue из сосудов мозга в паренхиму мозга мы использовали мультифотонный лазерный сканирующий микроскоп (Nikon A1R MP, Nikon Instruments Inc., Токио, Япония) и наблюдали проницаемость микрососудов в коре (глубина 150 мкм) в течение 30 минут через 1 час после ФДТ с 5-АЛА (в/в).

Для повреждения менингеальных лимфатических сосудов 5-АЛА (20 мг/кг, 5 мкл, Niorik, Москва, Россия) вводился в цистерну мозга, после чего и воздействовали лазером 635 нм.

Вся статистическая обработка была выполнена с использованием программного обеспечения Microsoft Office Excel и SPSS 17.0 для Windows. Результаты были представлены в виде среднего значения \pm стандартной ошибки среднего (SEM). Межгрупповые различия во всех сериях

экспериментов были оценены с использованием теста ANOVA с последующим пост-тестом Дункана. Уровень значимости был установлен на уровне $p < 0,05$ для всех анализов.

Результаты исследования

Эффект фотодинамической терапии на дренаж мозга

На первом этапе мы изучали дренаж мозга с использованием ex-vivo конфокального анализа целого изображения мозга и удаление FITCD из мозга в периферическую лимфатическую систему. В этой связи FITCD был введён в правый боковой желудочек и распределялся по мозгу в течение часа, после чего выходил в глубокие шейные лимфатические узлы. Не было изменений в флуоресцентном сигнале от FITCD в мозге и глубоких шейных лимфатических узлах между контрольными группами, включая 5-АЛА (внутричерепное введение) или 5-АЛА (внутривенно) без лазерного возбуждения, а также только с лазерной обработкой.

Однако фотодинамическая терапия в обеих группах, включая лазерное возбуждение 5-АЛА (внутричерепное введение) и 5-АЛА (внутривенно), вызвала значительное снижение флуоресцентного сигнала от FITCD в мозге и глубоких шейных лимфатических узлах. Количественный анализ показал, что у ФДТ-медиированной группы, получившей 5-АЛА (внутричерепное введение), уменьшение дренажа мозга было более выражено по сравнению с группой, обработанной 5-АЛА (внутривенно). Таким образом, эти данные позволяют предположить, что ФДТ вызывает подавление дренажа мозга, приводящее к уменьшению лимфатического дренажа в тканях мозга, что наблюдается при обоих видах введения 5-АЛА, в циркуляторную систему крови и особенно в цистерну мозга.

Воздействие фотодинамической терапии на сеть задних менингеальных лимфатических сосудов

Поскольку в первой серии экспериментов мы обнаружили снижение дренажа мозга после фотодинамической терапии (ФДТ), на следующем этапе мы целились в изучение воздействия ФДТ на сеть задних МЛС, охватывающую основные венозные синусы (верхний сагиттальный и поперечный), играющие ключевую роль в дренаже мозга. Результаты исследования показали, что покрытие сосудов, положительных на LYVE-1, вдоль верхнего сагиттального и поперечного синусов было значительно снижено через 7 дней после ФДТ у мышей, получавших 5-АЛА (внутривенно) и 5-АЛА (внутричерепное введение), по сравнению с контролем. Однако, количественный анализ показал, что фото-повреждения МЛС были менее выражены после ФДТ+5-АЛА (внутривенно) по сравнению с ФДТ+5-АЛА (внутричерепное введение). Эти результаты предполагают, что снижение дренажа мозга в группах с ФДТ может быть связано с сильным снижением задней сети МЛС.

Воздействие ФДТ на проницаемость менингеальных сосудов и сосудов мозга

Для подтверждения гипотезы, что ФДТ увеличивает проницаемость не только сосудов мозга, но и менингеальных кровеносных сосудов, приводя к повреждениям МЛС, мы проанализировали проницаемость менингеальной и мозговой кровеносной системы к Evans Blue в течение 1 часа до и после ФДТ с 5-АЛА (внутривенно) и 5-АЛА (внутричерепное введение). Результаты показывают экстравазацию Evans Blue из менингеальных кровеносных сосудов в пространство, заполненное ЦСЖ, как в группах с ФДТ с 5-АЛА (внутривенно), так и с 5-АЛА (внутричерепное введение).

Спектрофлуорометрический анализ выявил высокий уровень Evans Blue в менингах после ФДТ по сравнению с контрольной группой ($0,69 \pm 0,03$ $\mu\text{g/g}$ ткани vs. $0,10 \pm 0,01$ $\mu\text{g/g}$ ткани, $p < 0,001$ между группой с ФДТ с 5-АЛА

(внутричерепное введение) и контролем; $0,54 \pm 0,02$ $\mu\text{g}/\text{г}$ ткани vs. $0,10 \pm 0,01$ $\mu\text{g}/\text{г}$ ткани между группой с ФДТ с 5-АЛА (внутривенно) и контролем, $n=8$ в каждой группе, ANOVA-тест с пост-тестом Дункана).

Однако, только в группе с ФДТ с 5-АЛА (внутривенно), а не в группе с ФДТ с 5-АЛА (внутричерепное введение), наблюдалось открытие ГЭБ в коре. Результаты иллюстрируют живое мультифотонное и ex-vivo конфокальное изображение открытия ГЭБ у мышей после ФДТ с 5-АЛА (внутривенно), соответственно. Результаты не показывают открытия ГЭБ в контрольной группе без ФДТ.

Количественный анализ демонстрирует высокий уровень Evans Blue в мозговой ткани по сравнению с контрольной группой ($1,17 \pm 0,03$ $\mu\text{g}/\text{г}$ ткани vs. $0,12 \pm 0,02$ $\mu\text{g}/\text{г}$ ткани между группой с ФДТ с 5-АЛА (внутривенно) и контролем, $n=8$ в каждой группе, ANOVA-тест с пост-тестом Дункана.

Таким образом, эти данные позволяют предположить, что фотоактивированный 5-АЛА может воздействовать на интактные эндотелиальные клетки кровеносных и лимфатических сосудов.

ВЫВОДЫ

1. Фотодинамическое воздействие с применением лазера 635 нм и венозным введением 5-АЛА вызывает увеличение проницаемости как менингеальных, так и церебральных сосудов у здоровых мышей, что приводит к их повреждению;
2. Фотодинамическое воздействие (лазер 635 нм + 5-АЛА) приводит к снижению дренажа мозга, что было установлено по подавлению распределения красителя FITC-декстрана в мозге и по его выведению в глубокие шейные лимфатические узлы;
3. Фотодинамическое воздействие (лазер 635 нм + 5-АЛА) повреждает сеть менингеальных лимфатических сосудов, что сопровождается уменьшением их плотности в оболочках мозга вокруг сагиттального синуса.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- 1 Фотобиомодуляция лимфатического дренажа и клиренса: перспективная стратегия усиления менингеальных лимфатических функций / О Семьячкина-Глушковская [и др.] // Биомедицинская оптика экспресс. – 2020. – Т. 11, № 2. – С. 725-734.
- 2 Роль менингеальной лимфатики в процессах очищения мозга: визуализация *in vivo* / Э. Н. Дуарте Торрес [и др.] // Изв. Саратов. ун-та Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. - 2018.- Т. 18, № 4. – С. 433-438.
- 3 Глимфатическая система головного мозга: функциональная анатомия и клинические перспективы / Николенко ВН [и др.] // Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика. - 2018. – Т. 10, № 4. - С. 94–100.
- 4 Photodynamic opening of blood-brain barrier. / Semyachkina-Glushkovskaya O. [et al.] // Biomed Opt Express. - 2017. - V. 8, № 11. - P. 5040-5048.
- 5 Кадри, Х. Обзор структуры, функций, нарушений и биомаркеров целостности гематоэнцефалического барьера. // Кадри Х., Нурани Б. и Кукулло Л. // Жидкостные барьеры ЦНС. – 2020 - Т. 17, № 69.
- 6 Langen, U. H. Development and Cell Biology of the Blood-Brain Barrier. // Langen U. H., Ayloo S, Gu C. // Annu Rev Cell Dev Biol. – 2019. – V. 6, № 35. - P. 591-613.
- 7 Photodynamic Opening of the Blood-Brain Barrier and the Meningeal Lymphatic System: The New Niche in Immunotherapy for Brain Tumors. / Semyachkina-Glushkovskaya O. [et al.] // Pharmaceutics. - 2022. - V. 14, № 12. - P. 2612.
- 8 Фотобиомодуляционная терапия и глимфатическая система: многообещающие применения для улучшения лимфатической дренажной системы головного мозга / Ф. Салехпур [и др.] // Международный журнал молекулярных наук. - 2022 г. - Т. 5, № 3 - С. 122-131.
- 9 Biophotonic Strategies of Measurement and Stimulation of the Cranial and the Extracranial Lymphatic Drainage Function/ O. Semyachkina-Glushkovskaya [et

- al.] // IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics. - 2021. - V. 27, № 4. - P. 1-13.
- 10 Advances in nanotechnology-assisted photodynamic therapy for neurological disorders: A comprehensive review / Nasir A. [et al.] // Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology. – 2024. – Т. 52, №. 1. – P. 84-103.
- 11 Photodynamic therapy and associated targeting methods for treatment of brain cancer. / Bartusik-Aebisher D. [et al.] // Front Pharmacol. - 2023. - V. 14. - P.1250699.
- 12 Применение фотодинамической терапии в лечении злокачественных новообразований центральной нервной системы. / Суфианов А. А. [и др.] // Вестник Авиценны. - 2020. - Т. 22, № 3. - С. 491-497.
- 13 In Vitro Models of Blood and Lymphatic Vessels-Connecting Tissues and Immunity. / Bogseth A. [et al.] // Adv Biol (Weinh). - 2023. - V. 7, № 5. - P. 2200041.
- 14 Enhanced Meningeal Lymphatic Drainage Ameliorates Neuroinflammation and Hepatic Encephalopathy in Cirrhotic Rats. / Hsu SJ. [et al.] // Gastroenterology. - 2021. - V. 160, № 4. - P. 1315-1329.