

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

**ВОЗРАСТНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ДРЕНАЖА ГОЛОВНОГО МОЗГА
ПРИ ФОТОТЕРАПИИ ГЛИОБЛАСТОМЫ У КРЫС**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

студента 4 курса 421 группы
направления подготовки бакалавриата 06.03.01 Биология
Биологического факультета

Бигалиева Рамиля Ерлановича

Научный руководитель:

к. б. н., доцент

Е.И.Саранцева

дата, подпись

Зав.кафедрой:

док.биол.наук, доцент

О.В.Семячкина—Глушковская

дата, подпись

Саратов 2025

ВВЕДЕНИЕ

Глиобластома — агрессивное злокачественное новообразование головного мозга у пожилых людей с очень низкой общей выживаемостью. Возраст является важным фактором в заболеваемости и выживаемости ГБМ. Действительно, ГБМ чаще встречается у пожилых людей с пиком заболеваемости в возрасте от 45 до 65 лет. Возрастное снижение лимфоцитов приводит к повышению восприимчивости к инфекциям. Возрастное нарушение функции лимфоцитов создает барьер для терапии глиобластомы у пожилых людей.

В последнее время транскраниальная неинвазивная фотобиомодуляция была предложена в качестве перспективного альтернативного метода эффективного подавления прогрессирования глиобластомы и улучшения резистентности мозга к глиобластоме. Лимфатический эндотелий менингеальных лимфатических сосудов является важной мишенью для терапевтических эффектов фотобиомодуляции. В различных моделях заболеваний головного мозга, включая болезнь Альцгеймера, внутрижелудочковые кровоизлияния, сахарный диабет и глиобластому, установлено, что фотобиомодуляция стимулирует лимфатическую насосную работу, способствуя увеличению лимфотока и приводя к выведению из головного мозга растворенных в спинномозговой жидкости соединений.

Тем не менее, есть данные о том, что клиренс и дренаж мозга снижаются с возрастом. Действительно, у старых крыс наблюдается регрессия в ветвях дорсальных менингеальных лимфатических сосудов, в то время как базальные менингеальные лимфатические сосуды увеличились в размерах и демонстрируют гиперпластические фенотипы, что рассматривается как функциональная адаптация к возрастному снижению дренажа спинномозговой жидкости. Эти возрастные изменения в морфологии менингеальных лимфатических сосудов также связаны с дисфункцией лимфатического клапана из-за снижения экспрессии факторов транскрипции prospero homeobox protein 1 (PROX1) и forkhead box protein C2 (FOXC2). У

взрослых животных лимфатические эндотелиальные клетки нарушены, в то время как у молодых животных они удлинены и отчетливо сгруппированы в базальных менингеальных лимфатических сосудов, что свидетельствует о меньшем лимфотоке у старых крыс. Паттерны соединений в предварительно собирающихся лимфатических сосудах у молодых и старых крыс значительно различаются. Нарушение соединений лимфатических эндотелиальных клеток, приводящее к нарушению лимфотока, рассматривается как один из иницирующих факторов возрастной нарушения лимфатической целостности.

Целью работы являлось выявить возрастные особенности дренажа головного мозга у крыс при фототерапии глиобластомы.

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

1. Определить воздействие фотобиомодуляции на глиобластому у разных возрастных групп лабораторных животных;
2. Оценить влияние внутричерепного давления и содержание воды в мозге при фототерапии глиобластомы;
3. Изучить роль менингеальных лимфатических сосудов в дренажной способности удаления FITCD / EvansBlue при фотовоздействии.

Материалы и методы исследования

Материалы исследования

Во всех экспериментах использовались самцы крыс Вистар (380 - 597 г, в возрасте 6 и 24 месяцев). Экспериментальные животные были получены 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 № 8, 18.04.2023). Эксперименты проводились в следующих группах:

1. 6-месячные крысы, без фотовоздействия;
2. 6-месячные крысы + фотовоздействие;
3. 24-месячные крысы, без фотовоздействия;
4. 24-месячные крысы + фотовоздействие, $n= 5-8$ в каждой группе во всех экспериментах.

Методы исследования

Моделирование глиобластомы. Для создания флуоресцентной модели ГБМ нами была использована трансфицированная клеточная линия С6—TurboRFP. Клетки С6 культивировали в питательной среде Dulbecco's Modified Eagle Medium, содержащий 2,5% эмбриональной телячьей сыворотки, 4 мм глютамин, пенициллин и стрептомицин. Клетки глиобластомы С6 крысы трансфицировали ДНК-плазмидами TurboRFP-С (FP231; Eurogen, Россия). ДНК-плазмиды методом липосомальной трансфекции с помощью реагента для трансфекции Lipofectamine 2000 (11668019; Invitrogen, США) с последующей селекцией с использованием

антибиотика генетицин G418 (ant-gn-1; InvivoGen France). Контроль бактериальной и грибковой контаминации и определение морфологии клеток С6 проводили с помощью иммунофлуоресцентной микроскопии с DAPI и красителями нуклеиновых кислот Хёхста (D1306; Invitrogen, США). Для дополнительного контроля контаминации микоплазмы проводили ПЦР-тестирование с помощью набора для обнаружения микоплазмы (PP-401L, Jena Bioscience, Германия). Полученная клеточная линия, С6-TurboRFP, имеет отрицательный микоплазменный тест, стабильные культуральные и морфологические характеристики.

После этого клетки глиобластомы С6 трансфицировали плазмидами ДНК С6—TurboRFP-С. Клетки С6—TurboRFP (5×10^5 клеток на крысу) вводили в координатах (AP – 1,0 мм; МЛ – 1,0 мм; DV – 4,0 мм) объемом 15 мкл. Объем ГБМ контролировали методом магнитно-резонансной томографии (МРТ) с помощью томографа Clin scan 7T (Bruker, Mannheim, Germany). Для визуализации клеток С6-TurboRFP в изолированном мозге использовалась система флуоресцентной визуализации Fluor i In Vivo (NeoScience Co., Ltd., Сувон, Корея) (возбуждение - 500-550 нм, и излучение - 550-650 нм). С помощью программного обеспечения NEOimage (NeoScience Co., Ltd., Сувон, Корея) флуоресцентный сигнал RFP был отделен от фона и освещения, вызванного автофлуоресценцией и отраженным светом.

Магнитно-резонансная томография глиобластомы. Объем ГБМ оценивали с помощью томографа Clin scan 7T (Bruker, Mannheim, Germany). Крыс анестезировали 2% изофлураном в соотношении 1 л/мин N_2O/O_2 —70/30. Анатомические T2-взвешенные МРТ-изображения были получены с помощью быстрой спин-эхо-последовательности (быстрое получение с усилением релаксации (RARE)) [Время повторения (TR)/Время эха (TE) = 5 000 мс/56 мс, поле зрения (FOV) = 4 см × 4 см, толщина среза = 1 мм, разрыв между срезами (расстояние между срезами) = 1,1 мм, количество срезов = 12, матрица = 256×256 , количество усреднений = 3]. Для T1-взвешенной визуализации использовался метод RARE с 9,6 мс TE, 1000 мс TR и

фактором RARE 2, таким образом, 4 средних значения, требующих 4 мин 16 сек для оценки объема опухоли; ROI были построены вокруг областей видимого гиперусиления в каждом из срезов на T2-взвешенных и соответствующих T1-взвешенных изображениях с помощью NIH ImageJ и рассчитаны с помощью программного обеспечения MATLAB (версия 2018b, MathWorks, Inc., Natick, MA, США).

Фотобиомодуляция глиобластомы. Для ФБМ использовались светоизлучающие диоды (LED) с длиной волны 1050 нм в импульсном режиме. Головная пластина со светодиодами, закрепленная на бритой голове крысы с помощью стоматологического акрила (Zhermack SpA, Badia Polesine, Italia) под ингаляционной анестезией 1% изофлураном (Sigma-Aldrich, St Luis, США, из расчета 1 л/мин N₂O/O₂—соотношение 70/30). ФБМ проводилась в течение 61 мин: 17 мин – свет, 5 мин – пауза, 17 мин – свет, 5 мин – пауза, 17 мин – свет. Доза облучения составила 30 Дж/см² при однократном применении (для исследования ликвора-дренажа) и 0,42 кДж/см² в течение 14 дней курса ФБМ терапии ГБМ, который проводили ежедневно у крыс с 4-недельной ГБМ. Изменения температуры на поверхности мозга после ФБМ (световая радиация черепа не превышает 0,5 Вт/см²) не наблюдалось. Для измерения температуры на поверхности мозга до и во время ФБМ мы использовали термопару типа A-K3 (Ellab, Hillerød, Дания) и гибкий зонд термопары (IT-23, диаметр 0,23 мм, Physitemp Instruments LLC, NJ, Clifton, США), который вводили между теменной костью и мозгом в эпидуральное пространство.

Оптический мониторинг дренажа ликвора. FITC-D вводился в правый боковой желудочек (AP—1.0 мм; ML—1.4 мм; DV—3.5 мм при скорости 0,1 мкл/мин) через хронический полиэтиленовый катетер (PE-10, 0,28 мм внутренний диаметр × 0,61 мм наружный диаметр, ScientificCommoditiesInc., Лейк Хавасу-Сити, Аризона, США) с использованием микроинъектора (Stoelting, Сент-Луис, США). Через 1,5 ч после инъекции мониторинг

выведения FITC-D из мозга в ГШЛУ осуществляли с помощью конфокальной микроскопии (Nikon Corp., Токио, Япония). Обработка изображений выполнялась с использованием пакета обработки изображений с открытым исходным кодом Fiji. Процедуры обработки изображений были идентичны для каждой пары изображений (контрольных и образцов, обработанных лазером) для каждого канала, чтобы обеспечить точное сравнение интенсивности флуоресценции.

Конфокальный анализ. Крысы выводились из эксперимента с помощью газовой установки с использованием CO₂ (CO₂GasChamber, ThreeshineInc., Корея). Мозг и dcLNs удаляли и фиксировали в 10% буферном формалине с последующим приготовлением парафиновых срезов и стандартным протоколом ИГХ. Моноклональное антитело Abcam (США): Вах (ab216985, Abcam, США), Ki67 (клон SP6, ab166667, Abcam, США), p53 (ab131442, Abcam, США) и CD95 (FNab03016, FineTest, Китай) использовали в разведении 1:100. При окрашивании маркерами ИГХ использовали положительный и отрицательный контроль для исключения ложноотрицательных и ложноположительных результатов, создания стандартизации условий окрашивания и повышения объективности результатов. Процент положительно экспрессирующих клеток в 10 полях зрения для каждого образца и интенсивность иммуногистохимических реакций (слабых, умеренных и выраженных) рассчитывали с помощью микровизора медицинского пропускаемого света μVizo-103 (ЛОМО, Санкт-Петербург, Россия) с увеличением 774.

Для конфокальной визуализации мозг и ГШЛУ фиксировали в 4% буферном формалине в солевом растворе и сдвигали с толщиной 40-50 мкм с помощью вибротома (Leica, Германия). После этого срезы обрабатывали в соответствии со стандартным протоколом ИГХ с первичными антителами (антитело крысы к CD8+ (1:500; антитело к LYVE-1 у кролика (1:500; Abcam, Кембридж, Великобритания) и вторые антитела (козий антикрысиный IgG (H+L) Alexa Fluor 488 и козий антикроличий IgG (H+L) Alexa Fluor 555,

Invitrogen, Molecular Probes, Юджин, Орегон, США). Перед конфокальной микроскопией (Nikon A1R MP, Nikon Instruments Inc.) на срез наносили 15 мкл монтажной жидкости (50% глицерина в фосфатно-солевом буфере с 4',6-диамидино-2-фенилиндолом (DAPI) в концентрации 2 мкг/мл). DAPI, Alexa Fluor 488 и Alexa Fluor 555 возбуждались с длинами волн 405 нм, 488 нм и 561 нм соответственно. *EvansBlue* возбуждался с длиной волны 647 нм. Изображения были получены с помощью NIS-Elements 6.14. программное обеспечение (Nikon Instruments Inc.) и проанализировано с помощью программного обеспечения Фиджи (Fiji Is Just, ImageJ2 14.0/1.54g; Java 1.8.0_332 [64 бит]) и программное обеспечение Vaa3D 3.433.

Измерение содержания воды в мозге. Содержание воды в мозге определяли методом соотношения влажного и сухого веса. Крыс (n=8-9/группа) декапитировали. Мозги были немедленно удалены и нарезаны небольшими кусочками. Мозги взвешивали на аналитических весах (Denver Instrument Co., Богемия, Нью-Йорк) для получения сырого веса, а затем сушили при температуре 100 °C в течение 48 ч для получения сухого веса. После этого они высушивались при 100°C в течение 48 часов, чтобы получить сухой вес. Содержание воды в мозге выражалось как отношение сырого веса к сухому (вес мозговой ткани * 100%).

Измерение внутричерепного давления. Внутричерепное давление контролировали с помощью катетера (PE-50), заполненного искусственной спинномозговой жидкостью (BioChemazone, Ontario, Canada), вставленного в правый боковой желудочек и подключенного к датчику давления TSD104A с помощью усилителя DA100C (Biopac Systems, Inc., Goleta, CA, США). Регистрация ВЧД осуществлялась с использованием системы сбора данных Biopac MP160 и программного обеспечения AcqKnowledge 5.0.5. (Biopac Systems, Inc., Голета, Калифорния, США).

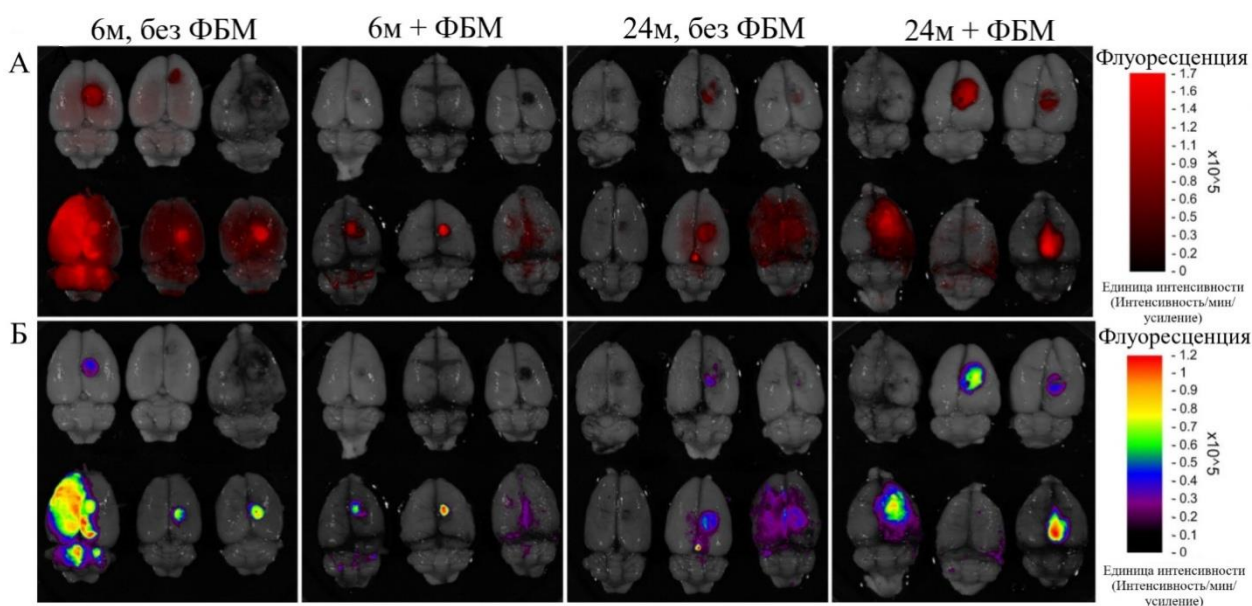
Статистический анализ. Вся статистическая обработка была выполнена с использованием программного обеспечения Microsoft Office Excel и SPSS 17.0 для Windows. Результаты были представлены в виде

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

Возрастные различия в фототерапии глиобластомы

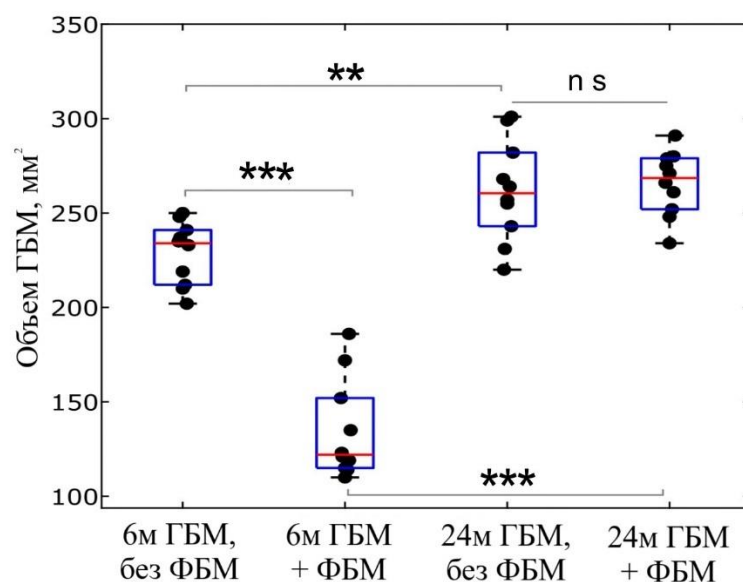
На первом этапе мы изучили влияние ФБМ на устойчивость к прогрессирующей ГБМ у 6- и 24- месячных крыс путем оценки объема и выживаемости ГБМ. Рисунок 1 — иллюстрируют флуоресцентную визуализацию роста глиобластомы с инвазией опухоли на дорсальную поверхность мозга у некоторых животных обеих возрастных групп.



А, Б- Флуоресцентная визуализация размера ГБМ у 6- и 24-месячных крыс без ФБМ и после ФБМ с интенсивностью флуоресценции по красной шкале (А) и радужной шкале (Б)

Рисунок 1– Влияние фотобиомодуляции на прогрессирование глиобластомы

Данные МРТ показали, что объем ГБМ у молодых крыс был ниже по сравнению со взрослыми животными (248,1±11,2 против±278 22,5, $p < 0,001$, $n=5$ в каждой группе). ФБМ достоверно снижал объем ГБМ (Рисунок 2).



тест ANOVA, критерий Дункана, ** - $p < 0.01$; *** - $p < 0.001$, ns – нет достоверной разницы

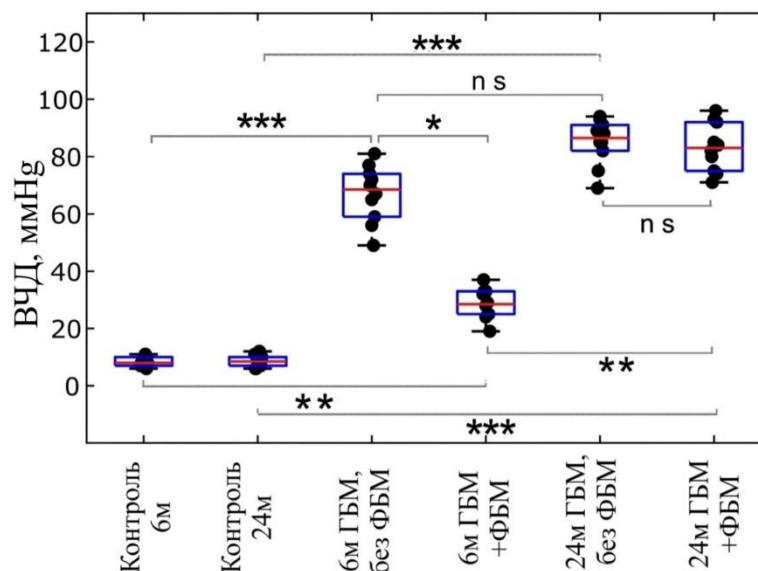
Рисунок 2 –Изменения объемов глиобластомы до и после фотобиомодуляции

Таким образом, у молодых животных после сеанса фототерапии наблюдалось уменьшение объема глиобластомы. После курса ФБМ у 6-месячных крыс наглядно показано изменение роста глиобластомы на поверхности мозга за счет сужения ее контуров. У 24-месячных крыс характер роста глиобластомы не изменился. Кроме того, фотобиомодуляция может провоцировать рост опухоли, как отмечалось на рисунке 2.

Оценка влияния внутричерепного давления и содержания воды во время фотовоздействия на глиобластому

Снижение дренажа спинномозговой жидкости и повышенное ВЧД из-за чрезмерного накопления жидкости в головном мозге являются важными факторами прогрессирования ГБМ. Поэтому на следующем этапе мы изучили изменения ВЧД и содержание воды в мозге при росте ГБМ, а также

влияние ФБМ на эти параметры у крыс разного возраста. Рисунки 3, 4 показывают, что у 6-месячных крыс наблюдалось более низкое ВЧД, вызванное ГБМ, и содержанием воды в мозге, чем у 24-месячных животных.

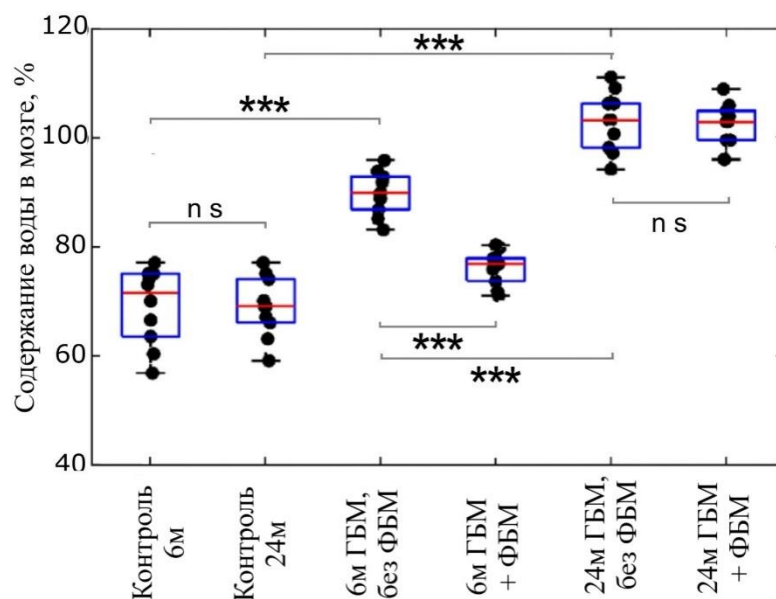


ВЧД: $32,2 \pm 2,8$ против $77,3 \pm 9,3$, $p < 0,001$ между 6-месячными крысами с курсом ФБМ и без него и $95,0 \pm 2,7$ против $93,1 \pm 3,2$, но между 24-месячными крысами с курсом ФБМ и без него. Различия ВЧД у 24- и 6- месячных здоровых крыс: $8,2 \pm 1,4$ против $8,9 \pm 1,9$, ns между 6- и 24-месячными крысами; тест ANOVA, критерий Дункана, ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$, ns – нет достоверной разницы

Рисунок 3 – Изменение внутричерепного давления (ВЧД) у животных разных возрастных групп

Примечательно, что ФБМ улучшила параметры дренажа спинномозговой жидкости у молодых, но не у взрослых крыс (ВЧД: $32,2 \pm 2,8$ против $77,3 \pm 9,3$, $p < 0,001$ между 6-месячными крысами с курсом ФБМ и без него и $95,0 \pm 2,7$ против $93,1 \pm 3,2$, но между 24-месячными крысами с курсом ФБМ и без него; Вода для мозга: $73,3 \pm 8,4$ против $86,2 \pm 2,8$, $p < 0,05$ между 6-

месячными крысами с курсом ФБМ и без него и $95,6 \pm 5,5$ против $97,4 \pm 6,2$, но между 24-месячными крысами с курсом ФБМ и без него $n=5$ в каждой группе) (Рисунки 3, 4). Различий в ВЧД и содержании воды в мозге у здоровых крыс из двух возрастных групп ВЧД не выявлено: $8,2 \pm 1,4$ против $8,9 \pm 1,9$, ns между 6- и 24-месячными крысами; Вода для мозга: $97,6 \pm 2,6$ против $96,6 \pm 3,0$, ns между 6- и 24-месячными крысами) (Рисунки 3, 4).



вода в мозге: $73,3 \pm 8,4$ против $86,2 \pm 2,8$, $p < 0,05$ между 6-месячными крысами с курсом ФБМ и без него и $95,6 \pm 5,5$ против $97,4 \pm 6,2$, но между 24-месячными крысами с курсом ФБМ и без него $n=5$ в каждой группе. Различия содержания воды в мозге у 24- и 6- месячных здоровых крыс: $97,6 \pm 2,6$ против $96,6 \pm 3,0$, ns между 6- и 24-месячными крысами; ** - $p < 0.01$; *** - $p < 0.001$, ns – нет достоверной разницы

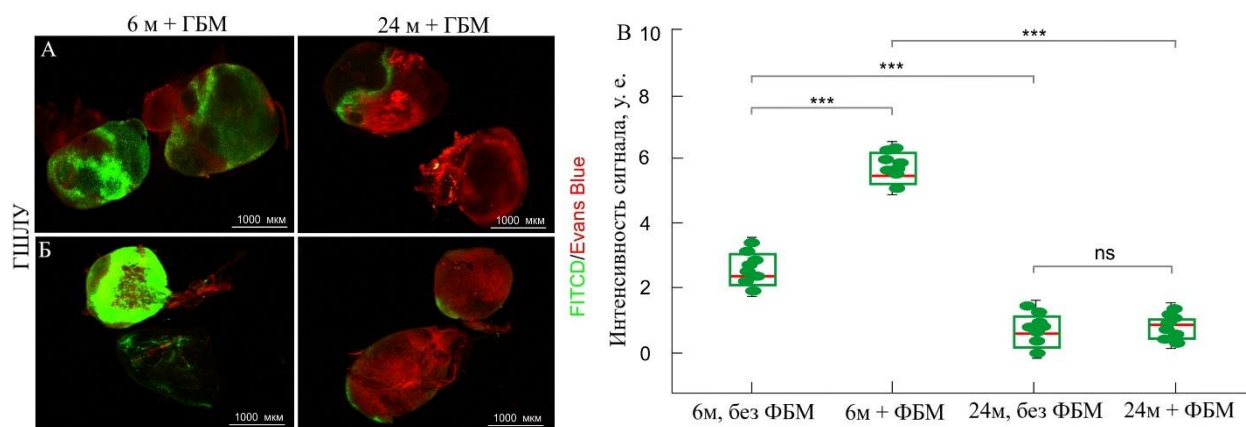
Рисунок 4 – Изменение содержания воды в мозге у животных разных возрастных групп

Таким образом, ФБМ повышает устойчивость к развитию ГБМ у 6-месячных, но не у 24-месячных крыс за счет стимулирующих эффектов на

дренаж ликвора, которые проявляются в снижении ВЧД и снижении количества воды в тканях мозга. Фотобиомодуляция не оказывает существенного влияния на старых животных с глиобластомой.

Возрастные различия в стимулирующих эффектах фототерапии на вывод FITCD / EvansBlue по лимфатическим путям

Поскольку МЛС играют ключевую роль в дренаже спинномозговой жидкости, мы предположили, что более высокая выживаемость у 6-месячных крыс по сравнению с 24-месячными животными может быть обусловлена возрастными различиями в сети МЛС. Лимфатическая абсорбция FITCD / Evans Blue была снижена у взрослых крыс по сравнению с молодыми, что свидетельствует о снижении значимости ликвора в дренаже мозга у здоровых крыс в возрасте 24 и 6 месяцев (Рисунок 5).



А, Б, В - изображения ГШЛУ у 6- и 24-месячных здоровых крыс до и после ФБМ (однократное применение), n=5 в каждой группе, тест ANOVA с тестом Дункана; *** - $p < 0,001$, ns – нет достоверной разницы

Рисунок 5- Возрастные различия в сети менингеальных лимфатических сосудов и влияние фотобиомодуляции на лимфатическое удаление FITCD / EvansBlue из мозга здоровых крыс

У взрослых животных мы наблюдали гиперплазию лимфатической системы, которая рассматривалась как показатель сниженного дренажа ликвора. Этот факт подтверждается результатами фотостимуляции МЛС, которые показали увеличение лимфатической экскреции FITCD / Evans Blue из мозга в ГШЛУ только у 6-месячных крыс и отсутствие таких эффектов у 24-месячных животных (Рисунок 5).

Результаты экспериментов показали, что возрастные изменения в МЛС и дренаже спинномозговой жидкости могут быть причиной изменений резистентности к развитию ГБМ и чувствительности к ФБМ у крыс в возрасте 24 и 6 месяцев.

ВЫВОДЫ

1. После курса фотобиомодуляции у 6-месячных крыс размеры глиобластомы несколько сократились, в то время как у 24-месячных крыс фотовоздействие провоцировало рост опухоли.

2. Фотобиомодуляция повышает устойчивость к развитию глиобластомы у 6-месячных за счет стимулирующих эффектов на дренаж ликвора, которые проявляются в снижении внутричерепного давления и воды в тканях мозга. Тогда как у старых животных фотовоздействие не вызвало значимых изменений.

3. Возрастные изменения в менингеальных лимфатических сосудах и дренаже спинномозговой жидкости могут быть причиной ослабления резистентности к развитию глиобластомы и чувствительности к фотобиомодуляции у 6- и 24- месячных крыс, что доказывает увеличение лимфатической экскреции FITCD / Evans Blue из мозга в глубокие шейные лимфатические узлы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты исследования наглядно демонстрируют, что старение мозга сопровождается снижением функций менингеальной лимфатической системы, что приводит к уменьшению дренажа ликвора. Эти возрастные изменения связаны со снижением резистентности к развитию глиобластомы и чувствительности к терапевтическим эффектам фотобиомодуляции у крыс в возрасте 24 и 6 месяцев. Действительно, фотобиомодуляция эффективно стимулирует выведение лишней жидкости только из мозга молодых крыс с глиобластомой, что приводит к снижению внутричерепного давления. Эти терапевтические эффекты фотобиомодуляции значительно повышают выживаемость и защитные иммунные реакции на развитие глиобластомы у молодых, но не у взрослых животных.

Таким образом, фотобиомодуляция может быть многообещающим и неинвазивным методом подавления роста глиобластомы путем фотостимуляции функций менингеальной лимфатической системы, которые значительно ограничены в стареющем мозге.