

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

Кафедра физиологии человека и животных

**ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ ИНФРАКРАСНОГО
ИЗЛУЧЕНИЯ ПРИ ИНСУЛЬТЕ У ГРЫЗУНОВ**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

студентки 4 курса 424 группы
направления 06.03.01 Биология
Биологического факультета
Ахмедовой Назмиат Гудратовны

Научный руководитель

доцент, канд. биол. наук _____ Т. Д. Искра

(подпись, дата)

Зав. кафедрой

человека и животных,

доцент, док. биол. наук _____ О. В. Семячкина – Глушковская

(подпись, дата)

Саратов 2023

Введение. Инфракрасное излучение – это электромагнитное излучение, которое занимает спектральную зону между красным концом видимого света (с длиной волны $\lambda = 0,78$ мкм и частотой 430 Т Гц) и микроволновым радиоизлучением ($\lambda \sim 1—2$ мм, частота 300 ГГц) [1].

Все живые организмы подвержены естественному электромагнитному излучению, достигающему Земли от Солнца. Природным источником инфракрасного излучения является Солнце-это их единственный концентратор и излучатель. Расположенная к Земле ближе всех звезда излучает сильный заряд волн (0,75—2 мк), который способен пройти через озоновый слой и достичь поверхности планеты. Энергия из солнечного света преобразуется в химическую энергию для производства питательных веществ. Действие инфракрасного излучения от Солнца может оказывать прямое воздействие на живые организмы. Оно способно помочь увеличить температуру тела, стимулируя метаболизм клеток и повышая иммунную систему [2].

Рассмотрение инфракрасного излучения как экологического фактора включает в себя изучение его влияния на окружающую среду и живые организмы, а также оценку его роли в биологических процессах и экосистемах. Для этого проводятся исследования по оценке эффектов инфракрасного излучения на растительный и животный мир, включая растения, животных и микроорганизмы. Также изучаются вопросы, связанные с изменением уровня инфракрасного излучения в окружающей среде в связи с изменением климатических условий и загрязнением окружающей среды.

Инфракрасное излучение применяется в медицине в лечебных, научно-исследовательских, судебно-медицинских и терапевтических целях. Новым достижением в развитии лазерных технологий является их применение в лечении цереброваскулярных заболеваний человека, так были предприняты попытки терапии ишемического инсульта головного мозга. Лазер активно применяется в комплексе реабилитационного лечения больных с

хроническими и острыми формами нарушений мозгового кровообращения [3,4].

Правильно рассчитанная дозировка инфракрасного излучения положительно влияет на организм человека. Инфракрасное излучение применяется как болеутоляющее и восстанавливающее средство при острых и хронических воспалительных процессах, невралгических болях, миозитах. С помощью инфракрасного излучения проводится успешная терапия большого количества заболеваний. Использование инфракрасного лазера в лечебных целях (с длиной волны-940 нм, средней мощностью 4 мВт) приводит к улучшению самочувствия у 65-90% пациентов с заболеваниями двигательной системы, кожи, периферической циркуляции крови (Вавилов, 2013).

По современным представлениям лимфатическая система головного мозга играет ключевую роль в процессах очищения мозга от различных метаболитов и токсинов, возникающих в нормальном состоянии организма и при патологиях, поэтому получение новых технологий и способов лечения инсульта необходимо связывать с работой лимфатической системы [5].

Цель исследования: изучить терапевтическое действие инфракрасного излучения (лазер длина волны 1267 нм) при инсульте взрослых и новорожденных мышей.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1.Изучить пути выведения эритроцитов из мозга взрослых мышей, в модели с внутрижелудочковым кровоизлиянием до применения инфракрасного излучения.

2.Выявить эффект стимуляции инфракрасного излучения на лимфатический клиренс эритроцитов из головного мозга новорожденных крыс.

3.Определить терапевтическое влияние курса инфракрасной фотостимуляции на восстановление новорожденных крысят после внутрижелудочкового кровоизлияния.

Эксперименты проводились на 30 половозрелых самцов мышей BALB/c (25-28 г), 10-дневных новорожденных крыс Вистар (8-10 г) и 21-дневных крысят Вистар (20-22 г). Животные содержались в стандартных условиях вивария, с доступом к пище и воде, без ограничений. Все процедуры проводились в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных». Протокол эксперимента был одобрен Комитетом по уходу и использованию лабораторных животных Саратовского государственного университета (Протокол Н-147, 17.04.2021).

Все экспериментальные процедуры выполнялись в соответствии с Директивами 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 года по охране животных, используемых в научных целях, Статья 27. Эксперимент проводился по протоколу проекта № 18-15-00172/2018 и был одобрен комитетом по уходу и использованию лабораторных животных в Саратовском государственном университете.

Исследования проводились на следующих группах животных:

1 группа, состоящая из интактных мышей (без анестезии и без воздействия инфракрасного излучения);

2 группа, включающая мышей с внутрижелудочковым кровоизлиянием, но не подвергших инфракрасному излучению;

3 группа, мыши с моделью внутрижелудочкового кровоизлияния с инфракрасным излучением.

Эксперимент проводился в два этапа:

1 этап. Моделирование инсульта. Мыши (n = 12), 2 группы. Контроль – здоровые животные (n = 6). Мышам из опытной группы (n = 6) вводили кровь в область стриатума. Через 5 часов у обеих групп проводили гистологический анализ мозговой ткани и глубоких шейных узлов;

2 этап. Терапия инсульта. Мыши (n = 24), 2 равные группы. У всех мышей моделировали инсульт. Мышей второй группы через 5 часов после введения крови подвергали лазерной терапии в течение часа. Мышей обеих групп через 6 часов после введения крови выводили из эксперимента и

проводили анализ глубоких шейных лимфатических узлов с помощью атомно-абсорбционной спектроскопии (по 6 узлов из каждой группы) и с помощью гистологического анализа (по 6 узлов из каждой группы).

Анестезия проводилась с расчетом 100 мкл раствора на 100 г животного (золетил + ксиланит). Действующим веществом ксиланита является гидрохлорид ксилазина, снижающий возбудимость альфа-2-адренорецепторов.

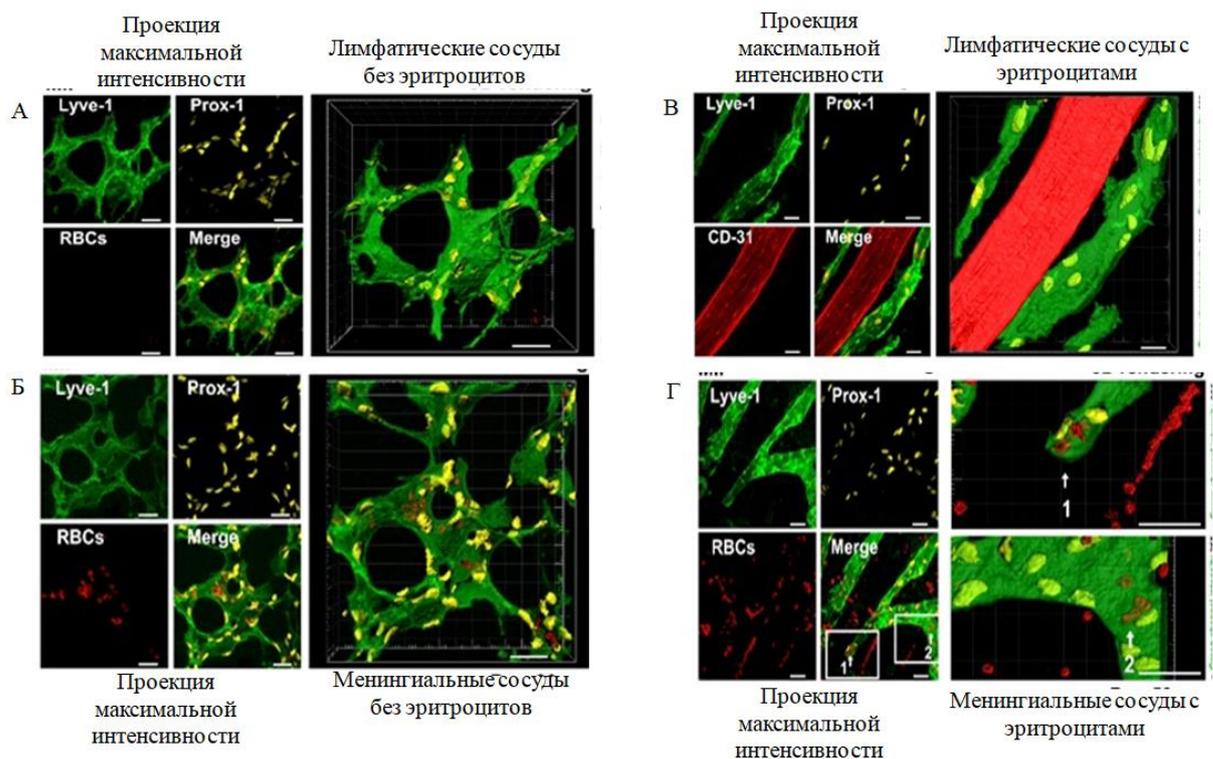
Трепанация черепа осуществлялась с использованием стоматологической дрели (Mikroton, Aescular) и стереотаксической рамы для фиксации животного.

Лазерное облучение было проведено с помощью лазера длиной волны 1267 нм (LD-1267-FBG-350, Innolume, Dortmund, Germany).

Для решения поставленной цели необходимо было создать рабочую модель внутрижелудочкового кровоизлияния. Для этого мы провоцировали развитие инсульта путем введения аутокрови животного.

Бакалаврская работа включает содержание, список сокращений, введение, 3 главы (обзор литературы, материалы и методы, результаты исследований), выводы и список использованных источников, включающий 42 источников на русском и английском языках. Работа изложена на 41 странице машинописного текста. Работа проиллюстрирована 6 рисунками.

Основное содержание работы. Первый этап исследований был посвящен изучению лимфатического пути выведения эритроцитов из мозга 10 интактных мышей и 10 взрослых мышей с моделью внутрижелудочкового кровоизлияния. Для достижения поставленной задачи применяли конфокальный анализ шейных лимфатических узлов, окрашенных двумя классическими лимфатическими маркерами (Lyve-1, гиалуроновый рецептор-1 эпителия лимфатических сосудов и Prox-1, гомеобоксный белок-1 Prospero) и клеток эндотелия крови (CD-31).



А-отсутствие эритроцитов в лимфатических сосудах шейных лимфатических узлов у интактных мышей (n=10), Б-присутствие эритроциты в шейных лимфатических узлах у мышей с внутрижелудочковым кровоизлиянием (n=10), В, Г-присутствие эритроциты менингеальных лимфатических сосудах мышей с внутрижелудочковым кровоизлияние, но не у интактных мышей.

Рисунок 1 - Конфокальный анализ лимфатического клиренса эритроцитов из мозга взрослых мышей в лимфатические сосуды шейных лимфатических узлов.

На рисунке 1 отражены результаты визуализации конфокального микроскопа, с помощью которого мы выявили, что в лимфатических сосудах шейных лимфатических узлов у интактных мышей отсутствовали эритроциты (рис. 1 А), а у мышей с моделью внутрижелудочкового кровоизлияния в лимфатических сосудах шейных лимфатических узлах присутствовали эритроциты, которые наблюдались через 1 час после моделирования внутрижелудочкового кровоизлияния (рис. 1 Б). Так же мы

наблюдаем присутствие эритроциты менингеальных лимфатических сосудах мышей с внутрижелудочковым кровоизлиянием (рис.1 В, Г).

Анализ конфокальной микроскопии показал, что эритроциты наблюдались в лимфатических сосудах мышей с внутрижелудочковым кровоизлиянием, но не у интактных мышей. Это доказывает, что после внутрижелудочкового кровоизлияния эритроциты могут быть эвакуированы в субарахноидальное пространство посредством движения спинномозговой жидкости и проникать в менингеальные лимфатические узлы, которые дренируют их в шейные лимфатические узлы.

Для изучения инфракрасной фотостимуляции на лимфатический клиренс эритроцитов из головного мозга новорожденных крыс была выбрана доза 9 Дж/см^2 , как наиболее эффективная на предварительных этапах эксперимента.

При применении инфракрасной фотостимуляции в разовой дозе 9 Дж/см^2 наблюдали повышение удаления красителя EBd из правого бокового желудочка в шейные лимфатические узлы новорожденных крыс ($n=10$), содержание которых оценивали методом атомно-абсорбционной спектроскопии на спектрофотометре.

Установили, что интенсивность флуоресценции EBd в шейные лимфатические узлы на 60 мин наблюдения была выше у новорожденных крыс без инфракрасной фотостимуляции (рис. 2).

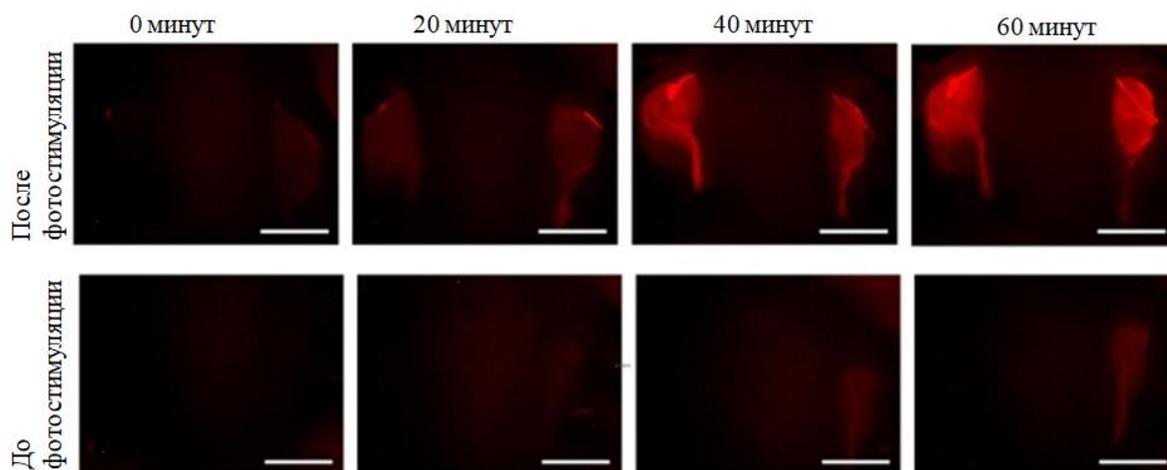
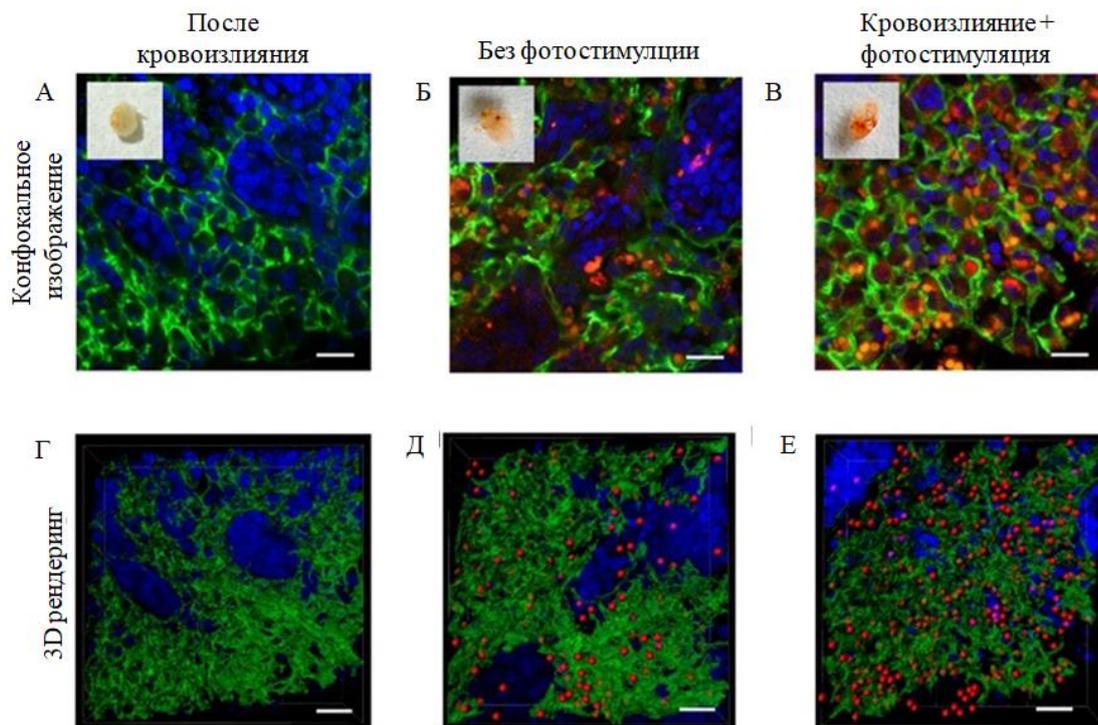


Рисунок 2 - Репрезентативные флуоресцентные изображения клиренса EYFP из правого бокового желудочка в шейные лимфатические узлы с и без инфракрасной фотостимуляции 9 Дж/см^2 лимфатического клиренса эритроцитов у здоровых новорожденных крыс.

Далее мы использовали флуоресцентную микроскопию для визуализации *in vivo* клиренса красителя EYFP из правого бокового желудочка до и после инфракрасной фотостимуляции с дозой 9 Дж/см^2 у здоровых мышей. Первоначально эффективное время элиминации красителя было установлено на мышах без инфракрасной фотостимуляции с помощью визуализации в белом свете. На рисунке 3 показано, что через 60 минут после внутрижелудочковой инъекции EYFP лимфатические сосуды шейных лимфатических узлов становятся синими из-за накопления красителя.



А-В - репрезентативные конфокальные изображения шейных лимфатические узлы через 1 час после инъекции физиологического раствора (А), крови без инфракрасной фотостимуляции (Б) и крови с инфракрасной фотостимуляцией (В) в правый боковой желудочек, Г-Е - 3D-рендеринг через 1 час после введения физиологического раствора (Г), крови без инфракрасной фотостимуляции (Д) и крови с инфракрасной фотостимуляцией (Е) в правый задний желудочек (объем шейных лимфатических сосудов - $135 \times 135 \times 40$ мкм. Лимфатические сосуды были помечены Lyve-1 (зеленый цвет) и Prox-1 (желтый цвет), а эритроциты визуализировались по их автофлуоресценции (красный цвет).

Рисунок 3 – Конфокальное изображение и 3D-рендеринг клиренса EVD из лимфатических сосудов в течение 1 часа с дозой инфракрасной стимуляции 9 Дж/см^2

Таким образом, мы изучили влияние инфракрасной фотостимуляции с дозой 9 Дж/см^2 на клиренс эритроцитов из головного мозга у здоровых новорожденных крыс. Результаты, представленные на рисунке 3 показывают,

что количество эритроцитов в шейных лимфатических узлах было значительно выше в группе у крыс с внутрижелудочковым кровоизлиянием, подверженные инфракрасной фотостимуляции.

Данное исследование показало, что дозы инфракрасной стимуляции 3 Дж/см² и 6 Дж/см² были недостаточны для лимфатического клиренса эритроцитов из головного мозга новорожденных крыс. Напротив, дозы инфракрасной стимуляции 9-18-27 Дж/см² вызывали аналогичные эффекты на накопление EВd в шейные лимфатические узлы. Однако дозы ИФ 18 Дж/см² и 27 Дж/см² сопровождались повышением температуры черепа, что может вызывать тепловое воздействие на эритроциты. Поэтому инфракрасная стимуляция с дозой 9 Дж/см² на черепе была выбрана как оптимальная для дальнейших экспериментов.

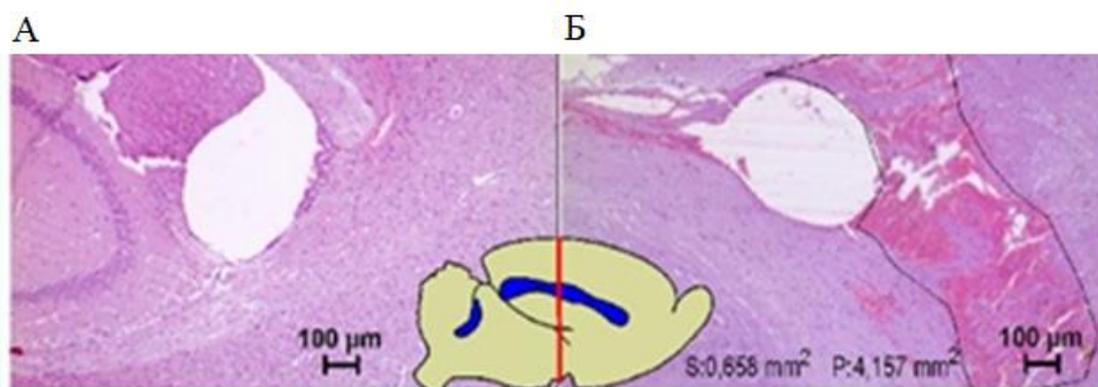
Результаты демонстрируют, что инфракрасная стимуляция при однократном введении в дозе 9 Дж/см² не изменяет мозговой кровотока на макро- и микроциркуляцию, что свидетельствует о прямом влиянии инфракрасной стимуляции на лимфатическую систему.

На данном этапе исследования мы изучали терапевтические эффекты инфракрасной фотостимуляции-9 Дж/см². Для этого были проведены визуальные репрезентативные системы исследования, гистологическое исследование тканей мозга и изменения происходящие в глубоких шейных узлах в течении 7 дней с помощью конфокальной микроскопии.



Рисунок 4- Репрезентативные 2D-изображения головного мозга через 3 и 11 дней после внутрижелудочкового кровоизлияния с курсом инфракрасной фотостимуляции и без него.

На рисунке 4 показано, что внутрижелудочковое кровоизлияние сопровождалось формированием гематомы, которая уменьшилась через 11 дней после выздоровления. Инфракрасная фотостимуляция значительно способствовала лучшему восстановлению головного мозга после внутрижелудочкового кровоизлияния



А- нормальные ткани правого желудочка головного мозга, Б- ткани правого желудочка головного мозга с внутрижелудочковым кровоизлиянием после 3 суток.

Рисунок 5- Гистологический анализ тканей правого желудочка головного мозга

Курс инфракрасной фотостимуляции значительно уменьшил объем внутрижелудочкового кровоизлияния (рис.5). Действительно, размер внутрижелудочкового кровоизлияния через 11 суток против 3 суток после внутрижелудочкового кровоизлияния был в 4,1 раза меньше при внутрижелудочковом кровоизлиянии+инфракрасная фотостимуляция ($0,10 \pm 0,02$ мм² против $0,41 \pm 0,64$ мм², $p=0,0001$, $n=10$ в каждой группе, критерий Уэлча) и только в 1,5 раза меньше при внутрижелудочковом кровоизлиянии без инфракрасной фотостимуляции ($0,27 \pm 0,04$ мм² против $0,41 \pm 0,64$ мм², $p=0,001$, $n=10$ в каждой группе, группа Уэлча). Инъекция крови в правый задний желудочек не сопровождалась образованием периваскулярной гематомы. Этот факт можно объяснить более высокой сопротивляемостью гематоэнцефалического барьера к повреждениям у новорожденных крыс, чем у взрослых животных.

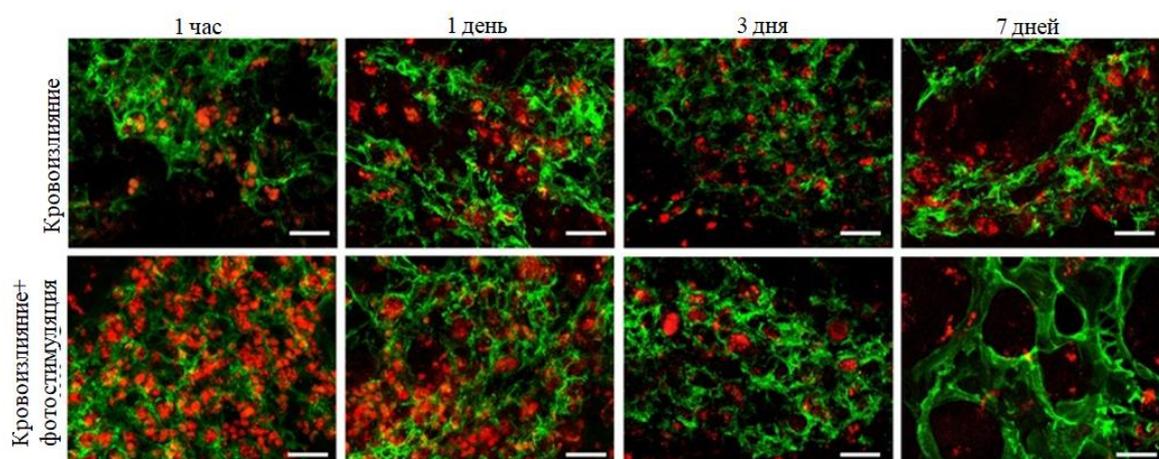


Рисунок 6 - Репрезентативные конфокальные изображения присутствия эритроцитов в лимфатических сосудах шейных лимфатических узлах мышей до и после инфракрасной фотостимуляции.

Быстрое сокращение гематомы после курса инфракрасной фотостимуляции сопровождалось быстрым удалением эритроцитов из

головного мозга. На рисунке 6 отчетливо видно, что количество эритроцитов в лимфатических сосудах шейных лимфатических узлов постепенно снижалось от 1 до 7 дней наблюдения, что было более выражено в группе мышей с внутрижелудочковым кровоизлиянием и курсом инфракрасной фотостимуляции по сравнению с группой мышей с внутрижелудочковым кровоизлиянием без инфракрасной фотостимуляции.

После курса инфракрасной фотостимуляции крысы продемонстрировали полное избавление от вазогенного отека, который мы наблюдали у крыс через 3 дня после внутрижелудочкового кровоизлияния по сравнению с контрольной группой. Однократная доза инфракрасной фотостимуляции 9 Дж/см^2 улучшала время восстановления внутричерепного давления, которое значительно увеличивалось после внутрижелудочкового введения крови.

Предлагаемый способ лазерной терапии 1267 нм позволяет ускорить процесс очищения мозга от последствий внутрижелудочкового кровоизлияния. При лазерной терапии данной длины волны резких негативных последствий выявлено не было. Преимущество данного способа является минимизированное отрицательное воздействие на животное. Новый подход к моделированию и лечению внутрижелудочкового кровоизлияния головного мозга позволяет существенно расширить исследовательские возможности в изучении механизмов развития и терапии данного заболевания.

Выводы:

1. Изучение путей выведения эритроцитов из мозга взрослых мышей в модели с внутрижелудочковым кровоизлиянием до применения инфракрасной стимуляции показало, что эритроциты могут быть эвакуированы в субарахноидальное пространство посредством движения спинномозговой жидкости и проникать в менингеальные лимфатические узлы, которые дренируют их в шейные лимфатические узлы.

2. Стимуляция инфракрасного излучения имеет прямое действие на лимфатический клиренс эритроцитов из мозга новорожденных крыс
3. Инфракрасное излучение оказывает терапевтическое воздействие на внутрижелудочковое кровоизлияние, ускоряя эвакуацию эритроцитов из желудочков, снижая нарастание внутричерепного давления, улучшая неврологический исход и снижая смертность.