

МИНОБРНАУКИ РОССИИ

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования

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

Кафедра физиологии человека и животных

**ФОТОСТИМУЛЯЦИЯ ЛИМФАТИЧЕСКОГО КЛИРЕНСА β -
АМИЛОИДА ИЗ МОЗГА МЫШИ: НОВАЯ СТРАТЕГИЯ ТЕРАПИИ
БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 4 курса 421 группы
направления 06.03.01 «Биохимия и физиология процессов адаптации»
Биологического факультета
Жигилёвой Маргариты Анатольевны

Научный руководитель:

к. б. н., доцент

подпись, дата

Е. И. Саранцева

Зав. кафедрой человека и
животных

д. б. н., доцент

подпись, дата

О. В. Семячкина-Глушковская

Саратов 2024

ВВЕДЕНИЕ

Болезнь Альцгеймера – это нейродегенеративное заболевание, являющееся частой причиной деменции у людей пожилого и старческого возраста. На ранних стадиях данное заболевание имеет медленный темп развития, который со временем постепенно прогрессирует. Оно характеризуется постепенной деградацией когнитивных функций у пациентов, например, потеря памяти, языковые трудности и т.д.

На сегодняшний день болезнью Альцгеймера страдают около 50 млн человек в возрасте 65 лет и каждый год это число только растёт. При данном заболевании нейродегенерация развивается в основном в префронтальной коре и гиппокампе, поэтому болезнь Альцгеймера приводит к развитию психических (например, депрессия, апатия, галлюцинации, заторможенность и т.п.) и поведенческих симптомов (агрессия, истеричность, раздражительность и т. д.). При этом отсутствие необходимого лечения может повлечь за собой ухудшение состояния пациентов, приводящее к инвалидизации.

К одним из ключевых патологических признаков болезни Альцгеймера относят: накопление β -амилоида в мозге в виде диффузных и невритических бляшек, а также нейрофибриллярные клубки, содержащие гиперфосфорилированный тау-белок. При этом нейрофибриллярные клубки не являются главным фактором в патогенезе болезни Альцгеймера, так как известны и другие нейродегенеративные заболевания, при которых не было отложений β -амилоида, но были видны клубки. Поэтому способы снижения высокой нагрузки β -амилоида может быть главной терапевтической стратегией при болезни Альцгеймера.

Одним из таких способов является фотостимуляция. Это неинвазивный терапевтический метод, принцип работы которого заключается в воздействии на клетки и ткани лазерного излучения со световым спектром от видимого до ближнего инфракрасного диапазона. Метод фотостимуляции в последние годы часто используется при патологиях мозга, так как существуют данные,

что фотобиомодуляция способствует снижению β -амилоида и улучшению прохождения поведенческих тестов животных с болезнью Альцгеймера.

Механизм выведения β -амилоида из мозга до конца не изучен, однако ясно, что важную роль в данном процессе выполняет лимфатическая система. Важными элементами, участвующими в клиренсе, являются периваскулярное пространство, окружающее сосуды головного мозга, а также глиальные клетки: астроциты и микроглия. Эти клетки важны при выведении метаболитов, включая β -амилоид. На данный момент известно, что после разрушения β -амилоида пептидазами, он проходит по периваскулярным путям в глубокие шейные лимфатические узлы.

Поэтому целью настоящей работы явилось установить интенсивность выведения бета амилоида из разных областей мозга у мышей при болезни Альцгеймера.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Смоделировать болезнь Альцгеймера у мышей;
2. Проанализировать изменения плотности накопления β -амилоида до и после фотостимуляции в разных областях мозга;
3. Проанализировать влияние фотостимуляции на выведение β -амилоида из областей головного мозга мышей.

Материалы и методы

Материалы исследования

Объект исследования. Эксперименты проводили на самцах гетерозиготных мышей линии Wistar в возрасте от 4 до 6 месяцев и весом от 26 до 28 граммов. Животные содержались в стандартных лабораторных условиях и в специальных помещениях с доступом к воде и пище. Все экспериментальные процедуры проводились в соответствии с «Руководством по уходу за лабораторными животными и их использованию», Директива 2010/63/ЕС о защите животных для научных целей, а также руководящие принципы Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (№ 742 от 13.11.1984), которые были одобрены комиссией по биоэтике Саратовского государственного университета (протокол № 8 от 18.04.2023). Мышей содержали при температуре $25 \pm 2^\circ\text{C}$, влажности 55% и цикле свет–темнота в течение 12:12 часов (светло с 08:00 утра до 08:00 вечера).

Методы исследования

Фотостимуляцию применяли к теменной коре головного мозга в сагиттальном синусе. Использовался лазерный диод, излучающий с длиной волны 1267 нм. Общая продолжительность облучения и пауз составила 61 минуту, при этом за 17 минутами облучения следовала 5-минутная пауза. Мышам проводили фотостимуляцию в течение 14 дней каждый второй день под медикаментозной анестезией, начиная через 4-6 месяцев после моделирования болезни Альцгеймера. Использовались три лазерных доз: 16, 32 и 64 Дж/см². Нагрев ткани мозга, вызванный воздействием света, отслеживался с помощью регистратора данных термопары. Для визуализации лимфатической системы и сосудистой сети мозговых оболочек использовали флуоресцентные маркеры. Антитела против Lyve-1 и против Prox-1 использовали для маркировки лимфатических сосудов. Для анализа ГШЛУ лимфатические узлы были удалены и зафиксированы перед разрезанием для

дальнейшего анализа. Для мечения специфических структур были проведены различные стадии промывки и инкубации с флуоресцентными красителями и антителами. Иммуногистохимический анализ позволил визуализировать и исследовать лимфатические сосуды и ГШЛУ. Мозговые оболочки мыши и срезы ГШЛУ (предположительно специфическая структура) визуализировали с помощью конфокального микроскопа (Nikon A1R MP, Nikon Instruments Inc). Различные флуоресцентные маркеры, такие как Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 555 и Alexa Fluor 561, возбуждались на определенных длинах волн для визуализации определенных структур. Данные трехмерной визуализации были собраны с использованием изображений в плоскостях x, y и z. Полученные изображения были проанализированы с помощью программного обеспечения FIJI (Bitplane AG, Швейцария). Программа Matlab использовалась для измерения диаметра лимфатических сосудов. Анастезируемым мышам вводили раствор красителя Evans Blue в правый боковой желудочек. Визуализацию лимфатических узлов и последующие измерения проводили с использованием стереофлуоресцентного микроскопа и программного обеспечения FIJI.

Помимо фотобиомодуляционной терапии определялся общий уровень белка с помощью набора для анализа белка BCA (Thermo Scientific, Рокфорд, США). Белок из каждого образца отделяли с помощью 4-12% -ной подкормки (180-80184, Tanon). После переноса белков на мембрану из поливинилиденфторида (Millipore, Биллерика, США) мембрану закрывали 5%-ным обезжиренным молоком на 1, 5 ч при комнатной температуре и инкубировали в течение 2 ч при комнатной температуре с первичными антителами: анти-А β (1:1000; D54D2, Cell Signaling Technology, США). После этого мембрану инкубировали с HRP-конъюгированным вторичным антителом при комнатной температуре в течение 1 ч и обрабатывали усовершенствованным набором хемилюминесцентных реагентов (Thermo Scientific, Рокфорд, США). Полосы были отсканированы и оцифрованы,

плотность каждой полосы была определена количественно с помощью программного обеспечения FIJI и нормализована к значениям β -актина.

Статистический анализ проводился с использованием различных тестов, включая критерий Манна-Уитни и дисперсионный анализ (ANOVA). Уровень значимости был установлен на уровне $p < 0,05$ для всех анализов.

Таким образом, основная методология включала моделирование болезни Альцгеймера с последующей фотостимуляцией для улучшения патогенеза заболевания. Применение методики вестерн-блоттинга, использованной для обнаружения и количественного определения белков β -амилоида и тау в тканях мозга. Был проведен статистический анализ для определения существенных различий между группами.

Результаты исследования

Моделирование болезни Альцгеймера у мышей

Данные конфокальной микроскопии ясно продемонстрировали развитие болезни Альцгеймера у мышей, которое сопровождалось значительным накоплением малых и больших отложений β -амилоида в различных областях мозга, преимущественно в коре и гиппокампе (в месте инъекции β -амилоида), как показано на рисунке 1.

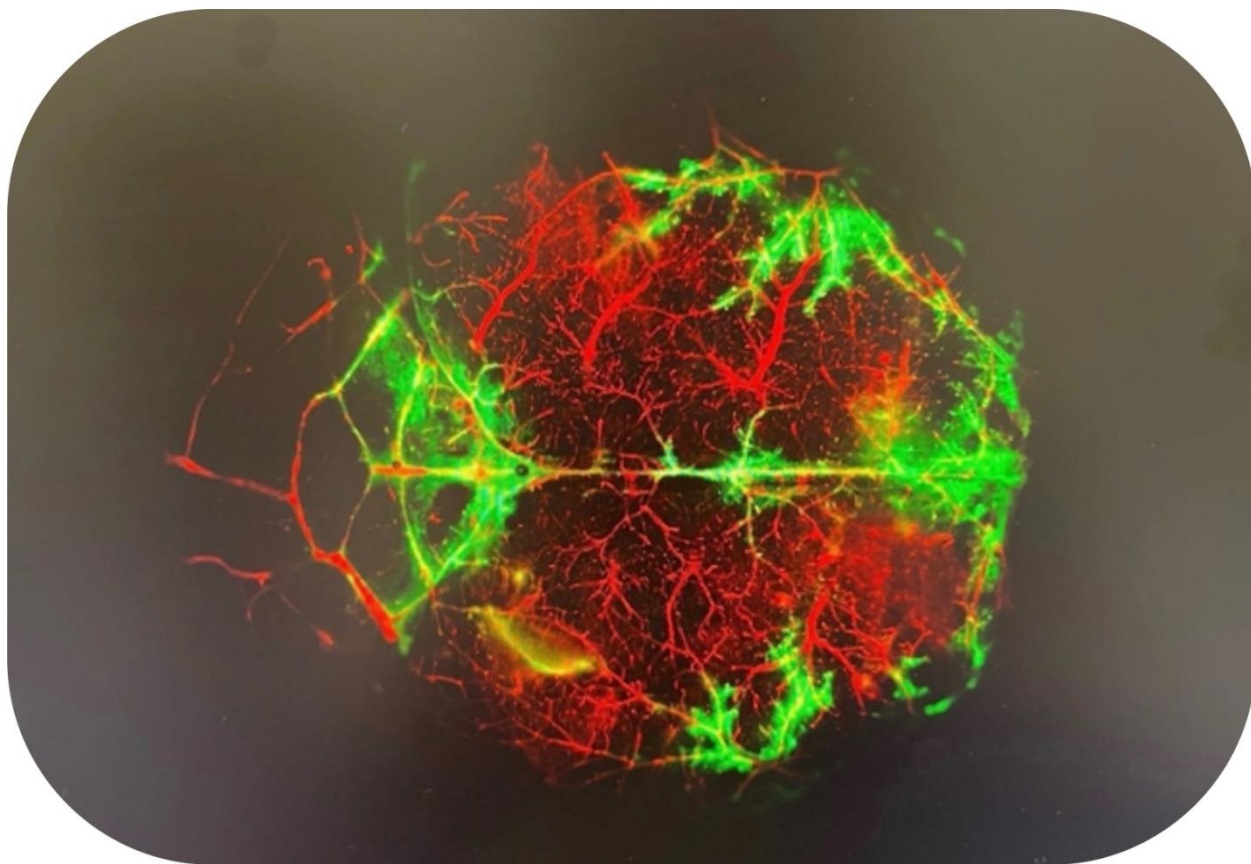
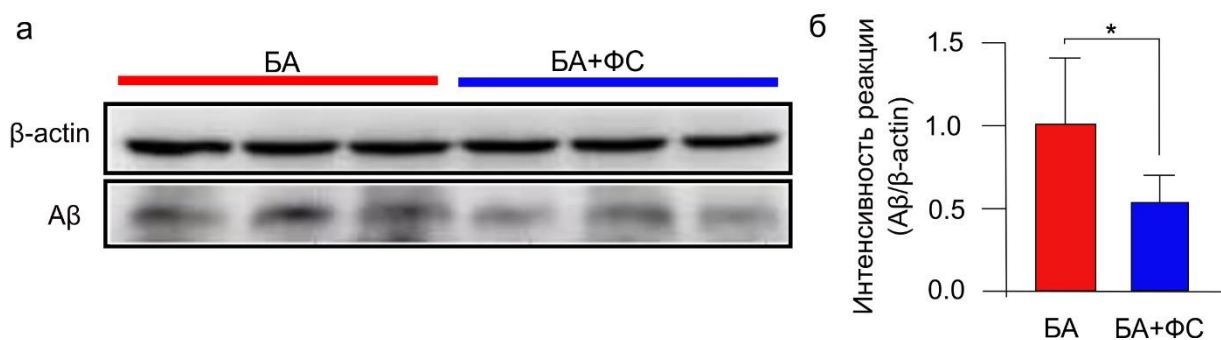


Рисунок 1 – Отложение β -амилоида в мозге, окрашенный зеленым цветом с помощью красителя FITC – декстрана (фото М.А. Жигилёвой)

Анализ изменения плотности накопления β -амилоида до и после фотостимуляции

Результаты вестерн-блоттинга показали, что общие уровни β -амилоида во всем мозге мышей с болезнью Альцгеймера были снижены после применения фотостимуляции (рисунок 2).



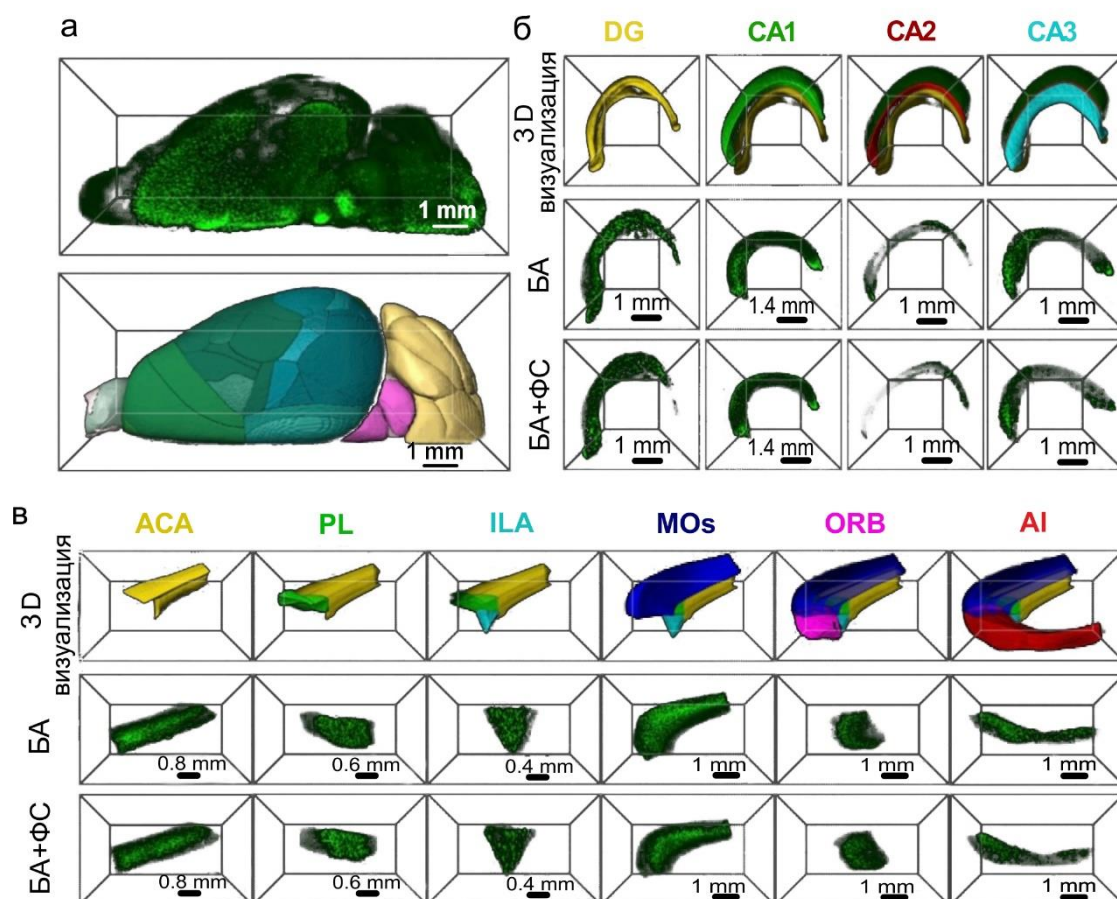
а – изображение β -амилоида методом вестерн-блоттинга; б – количественный анализ β -амилоида в головном мозге мыши

Примечания: данные представлены в виде среднего значения \pm стандартного отклонения, $n=10$, $*p<0,05$

Рисунок 2 – Полученные данные после проведения вестерн-блоттинга

В сочетании с технологиями визуализации оптической очистки тканей (iDISCO+), регистрации в ClearMap brain atlas и сегментации областей мозга мы исследовали клиренс β -амилоида в определенных областях префронтальной коры и гиппокампа (рисунок 3). Результаты показали, что плотность β -амилоидных бляшек в префронтальной коре была выше, чем в гиппокампе у мышей Wistar. После обработки фотостимуляцией плотность бляшек β -амилоида была значительно снижена ($p<0,05$), и это снижение было статистически сходным между префронтальной корой и гиппокампом (префронтальная кора: скорость уменьшения = 36%; гиппокамп: скорость уменьшения = 39%) (рисунок 4). Дальнейший анализ показал, что плотность бляшек β -амилоида снизилась во всех субрегионах префронтальной коры и гиппокампа со специфичностью в разных областях головного мозга (рисунок 3 б, в и на Рисунке 4). В частности, после фотостимуляции уменьшилось количество бляшек β -амилоида в гиппокампе CA1, CA2, CA3 и DG на 37%, 34%, 53% и 36% соответственно. Эти области мозга играют важную роль в долговременной, социальной, пространственной памяти и распознавании сходных воспоминаний.

Медиальная префронтальная кора, включая ACA, PL, ILA и MOs, играет решающую роль в когнитивных процессах и регуляции эмоций. Трехмерные данные показали, что плотность бляшек β -амилоида в префронтальной коре и субрегионах гиппокампа, связанных с памятью и когнитивными функциями, была уменьшена в разной степени (рисунок 3).



а – 3D изображения β -амилоида в полушарии после маркировки ткани, очистки и визуализации, а также визуализация после регистрации и сегментации; б – трехмерные флуоресцентные изображения β -амилоида в гиппокампе DG, CA1, CA2 и CA3; в – трехмерные флуоресцентные изображения β -амилоида в префронтальной коре ACA, PL, ILA, MOs, ORB и AI

Рисунок 3 – 3D изображения участков мозга и лимфатического клиренса β -амилоида из префронтальной коры и гиппокампа

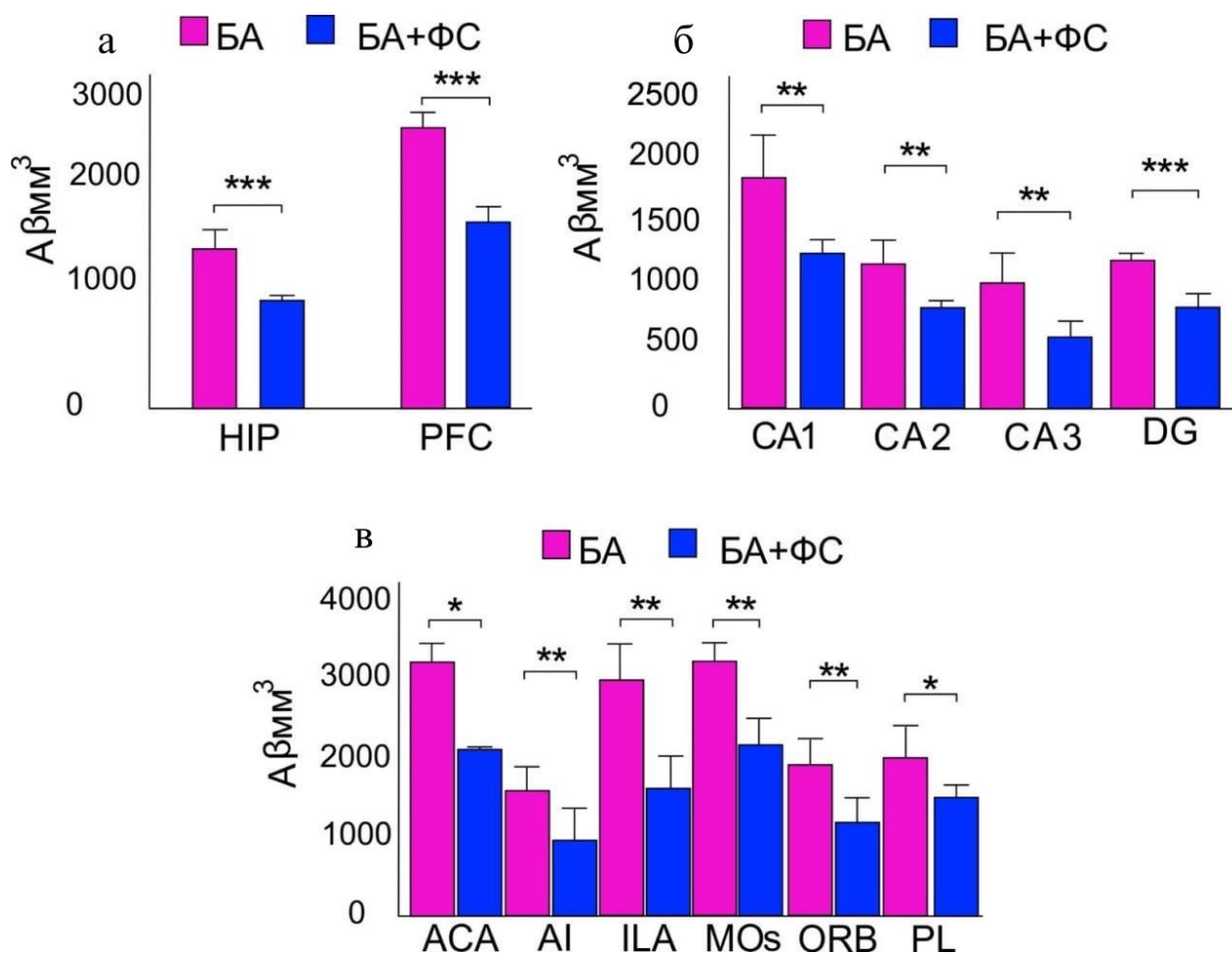
Латеральная префронтальная кора, включая ORB и AI, отвечает за чувства, когнитивные функции, социальное поведение и принятие решений. Фотобиомодуляция уменьшила количество бляшек β -амилоида в выше названных областях мозга на 42% и 49% соответственно (рисунок 4).



Рисунок 4 – Содержание β -амилоида в разных участках префронтальной коры и гиппокампе

В целом, плотность бляшек β -амилоида в разных областях мозга была снижена от 26% до 53% после терапии.

На основании полученных данных концентраций β -амилоида в префронтальной коре и гиппокампе был проведен статистический анализ (рисунок 5). Как показано на рисунке 10 б в гиппокампе наблюдается более усиленное снижение концентрации β -амилоида с 1750 до 1100 β -амилоида мм^3 в области CA1, а наименьшее выведение в – в CA2 (с 1000 до 660 β -амилоида мм^3) и DG (с 1100 до 700 β -амилоида мм^3). В префронтальной коре наибольший клиренс был замечен в области ILA (с 2900 до 1800 β -амилоида мм^3), а наименьший – PL (с 1900 до 1200 β -амилоида мм^3).



а – количество бляшек β-амилоида в префронтальной коре головного мозга и гиппокампе до и после фотостимуляции; б – количество бляшек β-амилоида в DG, CA1, CA2 и CA3 до и после фотостимуляции; в – количество бляшек β-амилоида в ACA, PL, ILA, MOs, ORB и AI до и после фотостимуляции

Примечания: данные представлены в виде среднего значения ± стандартного отклонения (n=5), *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001

Рисунок 5 – Данные количества β-амилоида в префронтальной коре и гиппокампе до и после фотостимуляции

Таким образом, полученные данные подтверждают положительное влияние фотобиостимуляции на выведение β-амилоида из префронтальной коры и гиппокампа.

Фотостимуляция лимфатического клиренса β-амилоида из головного мозга мыши

Менингеальные лимфатические сосуды и глубокие шейные лимфатические узлы является важным путем выведения метаболитов и токсинов из головного мозга. В результате исследований было выявлено, что фотостимуляция может способствовать выведению β -амилоида у мышей Wistar. Сначала мы исследовали уровни β -амилоида в глубоких шейных лимфатических узлах с помощью иммунофлуоресцентного окрашивания. Количество β -амилоида было значительно увеличено в глубоких шейных лимфатических узлах после 14-дневной фотостимуляции (БА против БА + ФС, $p < 0,001$).

Далее оценивалось влияние фотобиомодуляции на стимуляцию лимфатического выведения Evans Blue из мозга. При этом болезнь Альцгеймера сопровождалась уменьшением лимфооттока Evans Blue из головного мозга и накоплением красителя в глубоких шейных лимфатических узлах.

Эти данные указывают на ухудшение функции лимфатического клиренса у мышей с болезнью Альцгеймера. Более того, было выявлено, что фотобиомодуляционная терапия может увеличивать диаметр базальных менингеальных лимфатических сосудов, что будет способствовать выведению β -амилоида из тканей мозга (БА против БА + ФБМ, $p = 0,007$).

Как показали проведенные эксперименты, после фотостимуляции лимфатический клиренс Evans Blue значительно улучшился (БА против БА + ФС, 60 мин: $p = 0,029$; 80 мин: $p = 0,036$).

Приведенные выше результаты свидетельствуют о том, что фотостимуляция может улучшить лимфодренаж посредством модуляции тонуса менингеальных лимфатических сосудов, способствуя выведению β -амилоида из головного мозга в глубокие шейные лимфатические узлы у мышей с болезнью Альцгеймера.

ВЫВОДЫ

1. Была смоделирована болезнь Альцгеймера у мышей, что подтверждает конфокальная микроскопия.

2. Плотность накопления β -амилоидных бляшек в префронтальной коре была выше, чем в гиппокампе у мышей. После обработки фотобиомодуляцией плотность бляшек β -амилоида была значительно снижена ($p < 0,05$), в следующем процентном соотношении: в префронтальной коре концентрация β -амилоида снизилась на 36%, а в области гиппокампа на 39%. Также после фотостимуляции уменьшилось количество бляшек $A\beta$ в гиппокампе CA1, CA2, CA3 и DG на 37%, 34%, 53% и 36% соответственно. А в медиальной префронтальной коре, включая ACA, PL, ILA и MOs на 36%, 26%, 48% и 31%. Аналогичная ситуация с плотностью накопления β -амилоида наблюдалась и в латеральной префронтальной коре (49%).

3. После фотостимуляции лимфатический клиренс Evans Blue значительно улучшился (БА против БА + ФС, 60 мин: $p = 0,029$; 80 мин: $p = 0,036$). Также фотобиомодуляция способствовала увеличению диаметра базальных менингеальных лимфатических сосудов (БА против БА + ФС, $p = 0,007$). Данная терапия улучшает лимфодренаж посредством модуляции тонуса менингеальных лимфатических сосудов, способствуя выведению β -амилоида из головного мозга в глубокие шейные лимфатические узлы у мышей с болезнью Альцгеймера.