

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

Кафедра физиологии человека и животных

**ОСОБЕННОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ТРАНСКРАНИАЛЬНОЙ  
ФОТОБИОМОДУЛЯЦИИ У МЫШЕЙ С ДИАБЕТОМ**

АВТОРЕФЕРАТ

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

Студента 4 курса 424 группы

Направления подготовки бакалавриата 06.03.01 Биология

Биологического факультета

Князева Станислава Викторовича

Научный руководитель:

доцент, канд. биол. наук \_\_\_\_\_  
(подпись, дата)

Е. И. Саранцева

Зав. кафедрой:

доцент, док. биол. наук \_\_\_\_\_ О. В. Семячкина-Глушковская  
(подпись, дата)

Саратов 2024

## ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время все чаще можно встретить людей больных диабетом. За последние годы тенденция заболеваемости неуклонно растет, особенно в крупных городах. Сахарный диабет мультифункциональное заболевание, которое сопровождает человечество на всем протяжении его развития.

Однако, существует метод, согласно которому можно увеличить эффективность клеточного метаболизма, снизить уровень глюкозы в крови, снизить негативные эффекты этого заболевания на сосуды, мозг и другие жизненно важные органы. Основное терапевтическое воздействие такого метода было направлено на менингеальные лимфатические сосуды. Он основан на лазерной стимуляции с длиной волны 1267 нм с большой глубиной проникновения в ткани, в том числе тканей микроглии. В результате происходит снижение уровня глюкозы, улучшение клеточного метаболизма и снижения негативных последствий диабета.

Поэтому целью настоящей работы явилось изучение влияния воздействия ближнего инфракрасного излучения без фотосенсибилизаторов на мышей, больных диабетом.

Для достижения этой цели решались следующие задачи:

1. Моделирование аллоксанового диабета у лабораторных животных.
2. Эмпирическим путем подобрать мощность лазерного воздействия оптимального для сосудов мозга, открытия гематоэнцефалического барьера и общего влияния на организм
3. Проанализировать коэффициент энергетического обмена и суточную активность лабораторных животных до и после лазерного воздействия.

## **2 Материал и методы исследования**

### **2.1 Материал исследования**

Объектом исследования послужили мыши линии C57BL/6 (возраст варьировал от 6 до 12 месяцев) в количестве 20 особей. FITC-декстран, аллоксан, гомогенизатор, центрифуга, мультифотонный конфокальный микроскоп, феномастер, аллоксан, лазер с длиной волны 1267 нм. Лазерная установка: лазер на квантовых точках, работающий на длине волны 1267 нм, при мощности 229.7 мА. 1232В, нагрев лазера составлял приблизительно 25 градусов. В данном исследовании был использован человеческий инсулин, доза инсулина для одной мыши в день составила 150 мг/кг.

### **2.2 Методы исследования**

Сахарный диабет (СД) 1-го типа индуцировали у 2–3-месячных мышей путем подкожной инъекции 150 мг/кг аллоксана моногидрата в течение четырех дней.

Инъекцию инсулином осуществляли 2 раза в день в дозировке 0,003 унций/г.

Развитие модели аллоксанового диабета оценивали на 7-й день, 14-й и 21-й день после введения аллоксана.

Воздействие лазером на мозг мыши по протоколу: 1 мышь подвергалась фотовоздействию 1 час, 3 раза по 15 минут с перерывом в 5 минут, для облучения была выбрана область теменных и затылочной костей, предварительно очищенной от шерсти.

Анализ содержания глюкозы в крови проводили, определяя уровень гликемии глюкозооксидантным методом, натошак и через 1,2, 3 часа после ее введения.

Средний показатель массы мышей составил 68 г, продолжительность терапии.

Для проведения исследований использовали следующие методы:

1) для экспериментов лабораторные животные были разделены на четыре группы по 5 мышей: 1-я группа диабет (контроль), 2-я группа инсулин + диабет, 3-я группа диабет + лазер, 4-я группа диабет + инсулин + лазер.

2) моделирование аллоксанового диабета у мышей: введение аллоксана в кровотоки с целью разрушения бета-клеток островковой доли Лангерганса поджелудочной железы, разрушение происходило в течение 2-х недель;

3) проведение лазерной терапии (воздействие лазером на каждую группу по 1 часу по 1 минуте (17+5+17+5+17), с перерывом в один день на протяжении недели; проверка активности и метаболизма каждой группы до процедуры облучения лазером; введение FITC-декстрана, изъятие мозга, гомогенизация, центрифугирование, получение изображения супернатанта мозга.

4) для измерения концентрации флуоресцентного сигнала в надосадочной жидкости, взятой из ткани мозга, построили кривую концентрации FITC-декстрана и интенсивности флуоресценции. Для этого мы настроили несколько стандартных концентраций растворов FITC-декстран: 10, 50, 100, 200, 500 и 1000 нг/мл. Затем мы измерили интенсивность флуоресценции в каждой концентрации с помощью конфокальной микроскопии и подогнали стандартную кривую между концентрацией FITC-декстрана и интенсивностью флуоресценции по следующей формуле:

$$I = 0.077 * e^{2.567 * (\lg C)}$$

где, I – интенсивность флуоресценции, C – концентрация FITC-декстрана (нг/мл). Затем мы можем рассчитать концентрацию FITC-декстрана в надосадочной жидкости и количественно оценить утечку FITC-декстрана в каждой ткани мозга. Схематическая иллюстрация количественной оценки утечки FITC декстрана на рисунке 11.

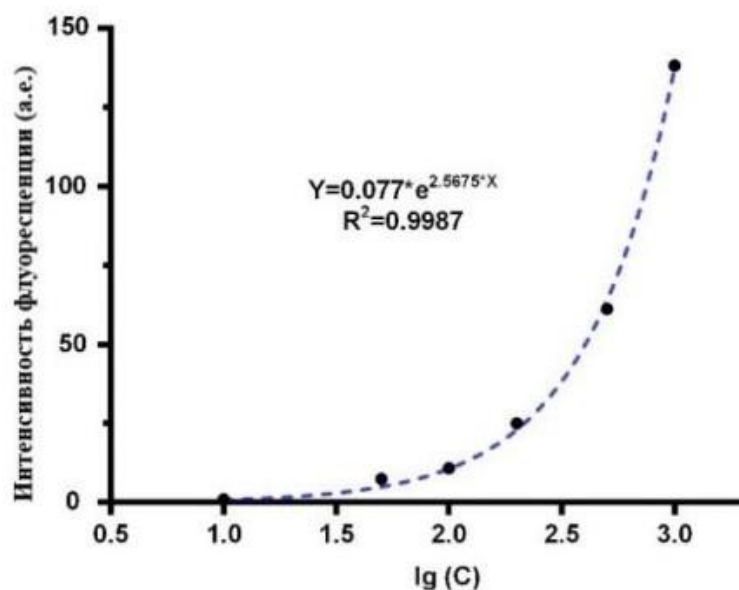


Рисунок 11 – Количественной оценки утечки FITC декстрана

Лазерная установка: лазер на квантовых точках, работающий на длине волны 1267 нм, при мощности 229.7 мА 1232В, нагрев лазера составлял приблизительно 25 градусов, длина волны и параметры лазера были подобраны эмпирическим путем.

### 2. 3 Статистическая обработка данных

Статистическая обработка результатов экспериментального исследования была проведена с помощью программного пакета Statistica 10.0.1011 (StatSoft, США) и стандартного пакета «MS Excel 2019». Гипотеза о нормальности распределения количественных признаков проверялась критерием Вальда - Вольфовица. Так как распределение не соответствовало нормальному закону, то для последующей обработки были использованы непараметрические методы. Статистическую значимость оценивали с помощью одностороннего дисперсионного анализа.

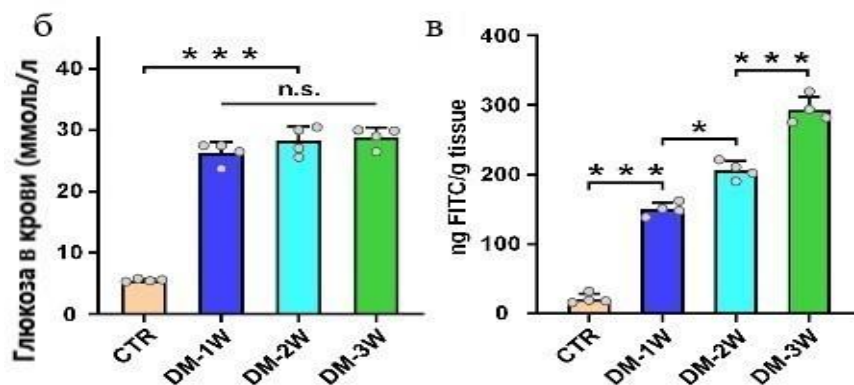
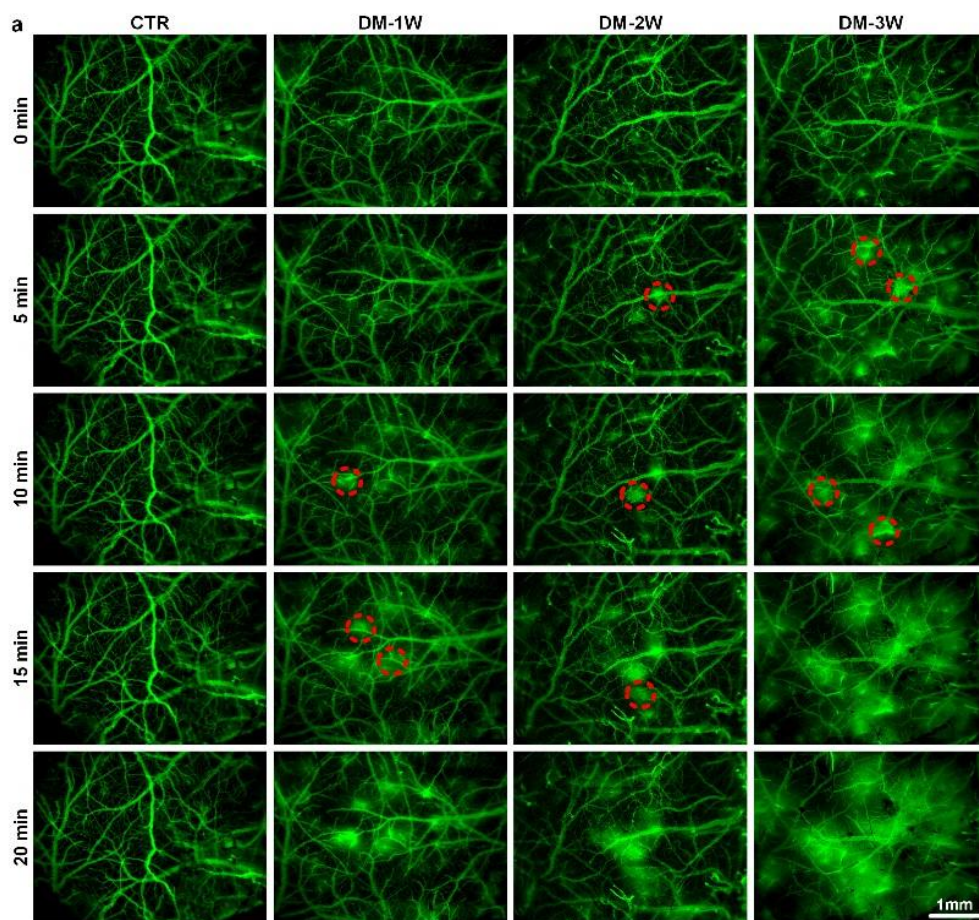
### 3 Результаты исследования

На первом этапе эксперимента был смоделирован аллоксановый диабет у мышей. Данные на рисунке 11, а-в. демонстрируют, что проницаемость ГЭБ для FITC-декстрана постепенно увеличивалась соответственно прогрессированию СД и повышению уровня глюкозы в крови.

Чтобы изучить, как изменяется проницаемость сосудов при развитии СД, мы проанализировали утечку FITC-декстрана массой 70 кДа в группах СTR, DM-1W, DM-2W и DM-3W и исследовали воспалительный статус путем измерения уровня гамма-интерферона (IFN- $\gamma$ ) и экспрессии микроглиального пуринаргического рецептора P2RY12 в тканях головного мозга (рисунок 12 в).

Дополнительные рисунки 11,12 демонстрируют, что проницаемость сосудов для FITC-декстрана постепенно увеличивалась соответственно прогрессированию СД и повышению уровня глюкозы в крови, это говорит о том, что сахарный диабет действительно увеличивает проницаемость сосуда мозга.

Наши результаты показали, что отсутствие здоровых мышей (группа СTR) утечки красителя, также высокую проницаемость ГЭБ для FITC-декстрана в группе трехнедельных диабетических мышей (DM-3W), данные на рисунке 11 а.

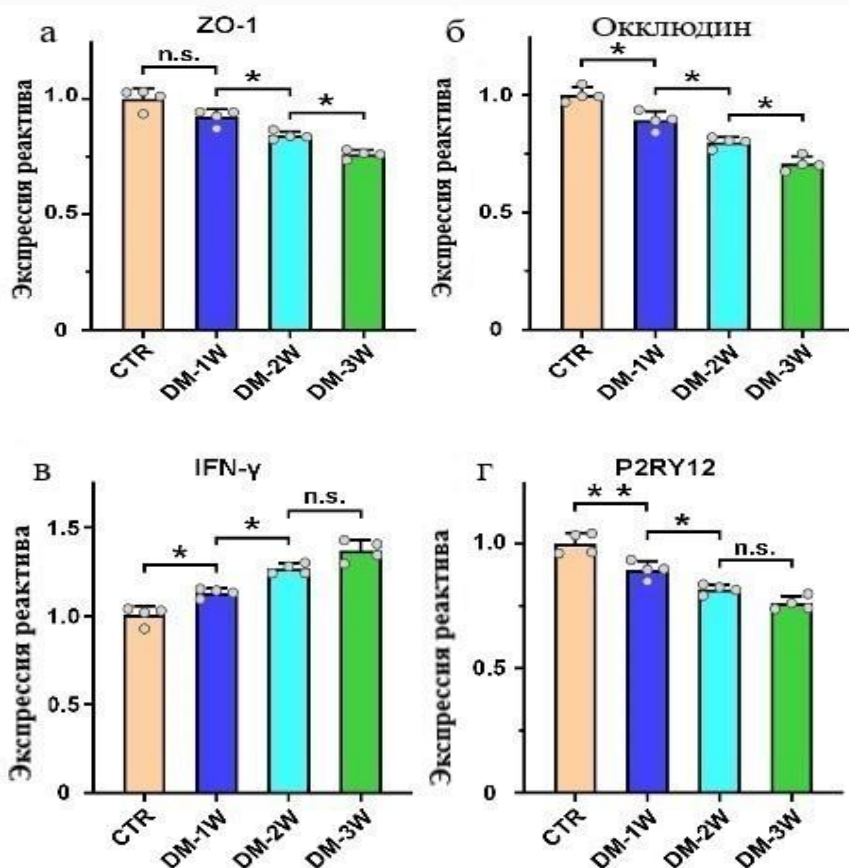


а – изображение демонстрирующее влияние сахарного диабета на сосуды мозга, б – показатели глюкозы в крови, в – показатели концентрации FITC – декстрана

Рисунок 11 – Влияние сахарного диабета на состояние сосудов головного мозга

Не было обнаружено каких-либо изменений в проницаемости ГЭБ и экспрессии (рисунок 12 а) белков ZO1 и окклюдина после лечения инсулином, лазером (tPBM) и инсулином + tPBM. После лечения инсулином или только

лазером, содержание воспалительного фактора IFN- $\gamma$  в ткани головного мозга было значительно снижено (в 1,13 раза меньше, диабет + инсулин (DM+I) по сравнению с DM-3W,  $p=0,003$ ; в 1,18 раза меньше, DM+tPBM по сравнению с DM-3W,  $p<0,001$ ), и экспрессия пуриnergического рецептора P2RY12 в микроглии была в 1,07 раза выше (диабет + инсулин и диабет).



а – показатель экспрессии ZO-1, б – – показатель экспрессии окклюдина , в – – показатель экспрессия IFN- $\gamma$ , – показатель экспрессии ZO-1, Г – показатель экспрессии P2RY12

Рисунок 12 – Экспрессия белков

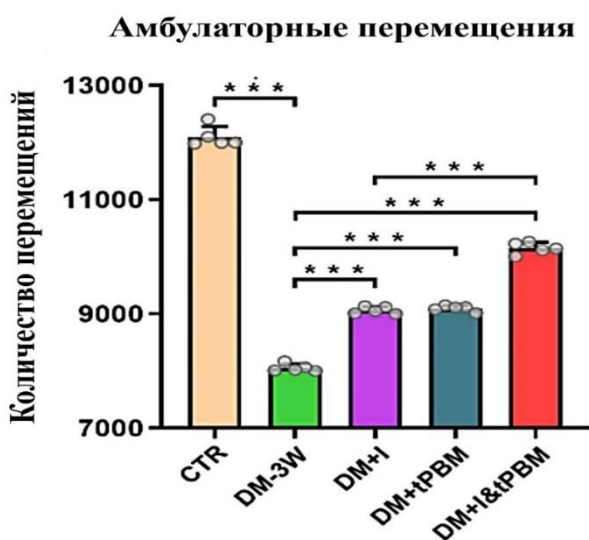
Не было обнаружено каких-либо изменений в проницаемости ГЭБ и экспрессии (рисунок 12 а) белков ZO1 и окклюдина после лечения инсулином, лазером (tPBM) и инсулином + tPBM, оба подхода не были эффективны для восстановления целостности ГЭБ, несмотря на восстановление уровня глюкозы в крови (рисунок 11.б). Однако после лечения инсулином или только лазером, содержание воспалительного фактора IFN- $\gamma$  в ткани головного мозга



было значительно снижено (в 1,13 раза меньше, диабет + инсулин (DM+I) по сравнению с DM-3W,  $p=0,003$ ; в 1,18 раза меньше, DM+tPBM по сравнению с DM-3W,  $p<0,001$ ), и экспрессия пуриnergического рецептора P2RY12 в микроглии была в 1,07 раза выше (диабет + инсулин и диабет).

На втором этапе эксперимента мы исследовали влияние инсулина и лазера (tPBM) на физиологию мышей, страдающих диабетом.

Количество перемещений за время эксперимента на феномастре в течении 1 часа анализа представлен на рисунке 13 (n.s., \*, \*\* и \*\*\* указывают на



незначимость,  $p<0,05$ ,  $p<0,01$  и  $p<0,001$  соответственно).

Рисунок 13 – Количество амбулаторных перемещений

Данные о количестве амбулаторных перемещений указывают на количестве перемещений на то, что присутствует зависимость между терапией и увеличением перемещений мышей с лазерной терапией (tPBM) и группе получившей инсулин, контрольная группа (CTR) мышей была более чем в 2 раза менее подвижной, в сравнении с группой проходившей лечения инсулином и лазером.

Результаты по затратам энергии, группа сахарный диабет + инсулин + лазер (DM+I&tPBM) показывает близкий к интактной группе результаты по затраченной энергии, что говорит о том что им доступно больше энергии, чем

группам диабет и диабет + инсулин, но показатели интактной группы максимальные, что можно было увидеть в тестах, и с помощью эмпирических наблюдений, также мыши с сахарным диабетом демонстрировали признаки изменения поведения, повышенную агрессию, учащенное мочеиспускание и повышение аппетита.

Контрольная интактная группа (CTR) демонстрирует самое большое энергопотребление среди всех экспериментальных групп, так показатели затрат энергии составляют 14.6 kcal/kg/h, следующим за ним идет группа диабет + инсулин и лазер (DM+I&tPBM) 12.7 kcal/kg/h, группа диабет + лазер (DM+tPBM) приблизительно 10 kcal/kg/h, группа получающая лишь инсулин (DM+I) 8.8 kcal/kg/h и диабетная (DM-3W) с самым низким показателем 7.9 kcal/kg/h. (n.s., \*, \*\* и \*\*\* указывают на незначимость,  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  и  $p < 0,001$  соответственно).

Использование одной лишь лазерной терапии не даёт положительного эффекта, инсулин даёт небольшой рост потребления энергии, уступая лазерной терапии, воздействие одновременно лазера и инсулина даёт большой прирост доступной энергии по сравнению с больными диабетом. 2 метода обладают синергизмом и усиливают друг друга, но не позволяют полностью восстановить энергетический обмен до уровня здоровых мышей.

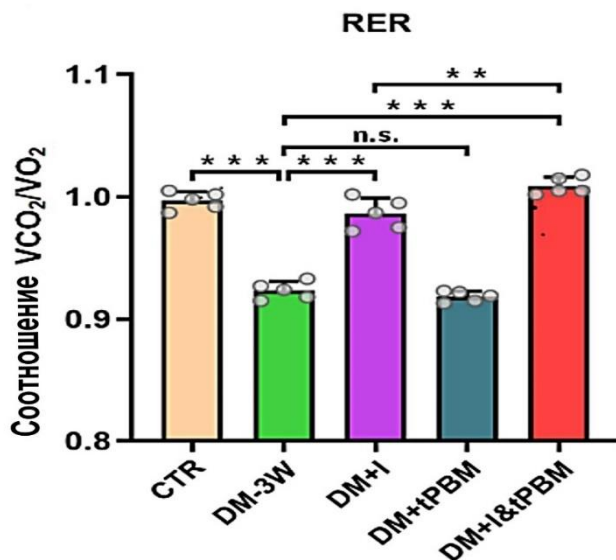
Коэффициент дыхательного обмена (RER) – соотношение между метаболической выработкой углекислого газа и поглощением кислорода, определяется путем сравнения выдыхаемых газов с воздухом в контейнере феномастера при нагрузочном тесте, полученные данные позволяют оценивать метаболизм жиров и углеводов, насколько эффективно

используются энергетические запасы в организме, данные представлены на рисунке 15.

Рисунок 15 – Коэффициент дыхательного обмена (RER)

Контрольная группа (CTR) и группа диабет + инсулин и лазер (DM+I&tPBM) имеют самые высокие показатели  $VCO_2/VO_2 \max$  на уровне 1.0, показатели последнего даже выше чем у здоровых мышей, следующим за ним идет группа диабет + инсулин (DM+I)  $VCO_2/VO_2 \max$ , группа диабет + лазер (DM+tPBM) и диабетная (DM-3W) показывают самые низкие результаты  $VCO_2/VO_2 \max$  (n.s., \*, \*\* и \*\*\* указывают на незначимость,  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  и  $p < 0,001$  соответственно).

Исходя из полученных данных можно сделать вывод что группа интактных животных и мыши получившие лечение инсулином, инсулином и лазером, повышает показатель  $VCO_2/VO_2 \max$ , значит при нагрузке они используют расходуют глюкозу, так как она доступна для клетки, однако использование лишь только лазера не дает никакого результата по сравнению с группой диабетных мышей без лечения. Группы диабет и лазер при нагрузке



использовали жиры и углеводы, показав худшие результаты.

## ВЫВОДЫ

1. Получили модель аллоксанового диабета, что подтверждает, увеличение глюкозы, в крови лабораторных животных.

2. Сахарный диабет способствует размыканию белков плотных контактов (ZO1, окклюдин) гематоэнцефалического барьера и влияет на экспрессию факторов воспаления, после лечения инсулином или только лазером содержание воспалительного фактора IFN- $\gamma$  в ткани головного мозга было увеличено, а экспрессия белка микроглиального пуринергического рецептора P2RY12 в микроглии при прогрессировании сахарного диабета уменьшалось.

Длина волны 1267 нм оказалась оптимальной для терапии.

3. Существует зависимость между терапией и увеличением подвижности мышцей с лазерной терапией (tBM), контрольная группа (CTR) мышцей была более чем в 2 раза менее подвижной, в сравнении с группой проходившей лечения инсулином и лазером. Использование одной лишь лазерной терапии не дало положительного эффекта, одновременное воздействие лазера и инсулина даёт большой прирост доступной энергии по сравнению с больными диабетом. 2 метода обладают синергизмом и усиливают друг друга, но не позволяют полностью восстановить энергетический обмен до уровня здоровых мышцей.

Животные получившие лечение инсулином, инсулином и лазером, повышает показатель  $VCO_2/VO_2$  max, значит при нагрузке они используют расходуют глюкозу, так как она доступна для клетки. Однако использование лишь только лазера не дает результата по сравнению с группой мышцей с диабетом без лечения. Группы диабет и лазер при нагрузке использовали жиры и углеводы, показав худшие результаты.

