

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

Кафедра физиологии человека и животных

**ЛАЗЕРНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ТЕРАПИИ ИНСУЛЬТА
ГОЛОВНОГО МОЗГА У БЕСПОРОДНЫХ МЫШЕЙ**

АВТОРЕФЕРАТ

Студентки 5 курса 531 группы

Специальности 06.05.01 Биоинженерия и биоинформатика

Биологического факультета

Чукалиной Татьяны Сергеевны

Научный руководитель

доцент, к. б. н.

 Т. Д. Искра

Зав. кафедрой

д.б.н., доцент

 О. В. Семячкина-Глушковская

Саратов 2019

ВВЕДЕНИЕ

Уверенное развитие лазерных технологий делает их одними из наиболее перспективных в современности. После того, как в 1960 году Т. Майман создал первый лазер на основе кристалла рубина, появились новые возможности использования светового потока. Лазерные технологии за последние полвека нашли применение в промышленности для обработки материалов, в химии в качестве катализаторов и во многих других сферах жизни. Каждый лазер излучает когерентный свет, который позволяет создать большие мощности, при этом пучок энергии может быть сфокусирован в очень маленькой точке. В настоящее время эта особенность лазера широко используется в биологии и медицине (медико-биологические исследования, медицинская диагностика и терапия).

Используемые на сегодняшний день технологии забора биоматериала человека сопровождаются негативными последствиями. Лазерные технологии играют ключевую роль в решении этой проблемы. В частности, их применяют в микроскопии, с целью визуализации процессов, проходящих внутри организма, без использования скальпеля. 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.

В настоящее время инсульт стал основной социально-медицинской проблемой неврологии. Ежегодно в мире регистрируется около 12 миллионов инсультов. В Российской Федерации смертность от цереброваскулярной патологии за 7 месяцев 2018 года составила 182,6 случаев на 100 тыс. человек. В данную численность входят как люди среднего и пожилого возраста, так и дети, включая грудничков. У взрослых возникновение инсульта связано с заболеваниями сердечно-сосудистой системы и

неправильным образом жизни, а у детей чаще всего с травмой, полученной во время прохождения через родовые пути.

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].

Целью нашей работы является выяснение перспективы применения лазерного излучения для терапии геморрагического инсульта головного мозга.

Для достижения данной цели, были поставлены следующие задачи:

1. создать модель геморрагического инсульта головного мозга у мышей;
2. изучить особенности влияния лазерного излучения 1268 нм на дренажную функцию лимфатической системы брыжейки кишечника; определить эффективность действия лазера 1268 нм для терапии инсульта головного мозга у мышей

Структура дипломной работы: работа состоит из введения, основной части, заключения, выводов и приложения. Основная часть включает в себя обзор литературы, составленный на основе анализа 41 источников, экспериментальной части. Литературный обзор состоит из трех глав: Лазерные технологии в биомедицинских исследованиях, современные представления о лимфатической системе головного мозга, инсульт головного мозга.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы исследования

Объектами исследования являлись беспородные самцы мыши весом около ($n=36$) и крысы весом около ($n=8$).

Для выяснения терапевтического эффекта лазерного воздействия на мозг мыши был смоделирован геморрагический инсульт путем введения аутокрови и проведен анализ влияния лазера на скорость лимфоцитов с помощью гистологических срезов и атомно-абсорбционной спектроскопии.

Методы исследования

Эксперимент проходил в три 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. Эффекты лазера на лимфатическую систему. Крысы (n=8). У данной группы прижизненно извлекали кишечник и с помощью светового микроскопа наблюдали за скоростью движения лимфоцитов в норме и после лазерного воздействия.

3 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).

Результаты исследования

Моделирование геморрагического инсульта

Результаты гистологического анализа показали, что через 5 часов у мышей из экспериментальной группы в головном мозге была сформирована крупноочаговая геморрагия, и отмечался явно выраженный отек вещества головного мозга в области геморрагии.

Естественный геморрагический инсульт сопровождается развитием периваскулярного отека. Появление его на гистологических срезах подтверждает результативность созданной модели. Сам по себе отек – это скопление излишков жидкости разного характера в тканях органа (в мозге интерстициальная и цереброспинальная). Помимо прямого ущерба, полученного от острого нарушения кровообращения, накопление избытков жидкости приводит к тому, что в черепной коробке не остается свободного места, повышается внутричерепное давление, на мозг оказывается давление, что усугубляет последствия инсульта. Поэтому необходимо изучать пути очищения головного мозга от жидкости, скопившейся крови и продуктов ее распада для возможного ускорения этого процесса.

Таким образом, полученные данные позволяют заключить, что введение крови животного в область стриатума приводит к образованию геморрагического инсульта через 5 часов, с соответствующими симптомами. Образование геморрагии и отека у опытной группы доказывают эффективность предложенной нами модели геморрагического инсульта, и ее можно было использовать в дальнейших этапах эксперимента.

Изучение влияния лазерного излучения на работу лимфатической системы

После подтверждения результативности модели геморрагического инсульта, мы приступили к изучению влияния лазера на лимфатическую систему. Мозг очищается от метаболитов, жидкости и последствий гемолиза эритроцитов с помощью менингеальной лимфатической системы. При крупном геморрагическом инсульте этот процесс происходит долго, и кровь успевает произвести негативное воздействие. Лазер может ускорить дренажную функцию лимфатической системы. Для изучения роли лазера в работе лимфатических сосудов, мы приступили ко второму этапу эксперимента.

С помощью установки для *in vivo* мониторинга скорости потока биологических жидкостей в микрососудах было произведено исследование скорости движения лимфотока. С помощью установки для *in vivo* мониторинга скорости потока биологических жидкостей в микрососудах, включающая лазер 1268 нм и соединенного с ней компьютера была определена скорость движения лимфоцитов по сосуду до излучения лазером и после у каждой крысы. Результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Скорость движения лимфоцитов

№ животного	Скорость движения лимфоцитов, мкм/с	
	Контроль	Опыт
1	0,17±0,03	0,25±0,02
2	0,15±0,04	0,23±0,04
3	0,14±0,03	0,22±0,05
4	0,13±0,05	0,24±0,05
5	0,15±0,02	0,23±0,03
6	0,18±0,04	0,26±0,04
7	0,14±0,05	0,25±0,03
8	0,13±0,02	0,26±0,02
Среднее значение	0,15± 0,03	0,24 ±0,04***

*** $p < 0,001$ относительно контроля

По результатам таблицы 1 можно сделать вывод, что лазерное излучение длиной волны 1268 нм и мощностью 10мВт оказывает стимулирующее действие на лимфатическую систему кишечника крысы. То есть активизирует ее дренажную функцию.

Лечение инсульта лазерным излучением

Получив рабочую модель геморрагического инсульта и экспериментально доказав роль лазера как ускорителя лимфотока, мы

приступили к третьему этапу. Его проведение было направлено на выяснения роли лазерного излучения в скорости очищения мозга от геморрагического инсульта. В результате развития данного заболевания в головном мозге образуются производные крови – гемосидерин и двухвалентное железо, которые мы выбрали в качестве маркеров. Данные вещества при инсульте накапливаются в глубоких шейных лимфатических узлах, поэтому был проведен анализ именно этих участков лимфатической системы. Воздействие лазером на мозг затруднено из-за его высокой защищенности мозговыми оболочками. Для эффективности процедуры была проведена корректировка значения мощности лазера. В дополнительной серии экспериментов (в рамках проекта) по изучению дренажной функции мозга была выявлена оптимальная мощность лазерного излучения (30 мВт), при которой значительно повышалась скорость лимфотока. Эта серия не вошла в мою работу.

В ходе третьего этапа были проведены анализ гистологических срезов ткани глубоких шейных лимфатических узлов и атомно-абсорбционная спектроскопия. Гистологические срезы глубокого шейного лимфатического узла мышей с 1 этапа (все срезы животных из данной группы существенно не отличались друг от друга) были представлены для сравнения количества гемосидерина с нормальной тканью. Ткань каждого узла имела однородную структуру, гемосидерин не обнаружен.

У мышей обеих групп ($n = 24$) моделировали инсульт как на 1 этапе эксперимента. Далее, у животных из 1 группы через 6 часов проводили гистологический анализ ($n = 6$) и с помощью атомно-абсорбционной спектроскопии определяли количество железа ($n = 6$) в глубоких шейных лимфатических узлах.

Показано состояние ткани глубокого шейного лимфатического узла у мышей опытной группы, то есть через 6 часов после моделирования геморрагического инсульта. Ткань лимфатических узлов также была

однородна, но уже с отчетливо видными зернами гемосидерина. Данный результат наблюдался у каждой мыши из опытной группы ($n = 6$). Отмечается умеренное содержание гемосидерина.

У мышей второй группы после моделирования инсульта область головного мозга подвергали лазерному облучению в месте введения крови в течение часа по выше приведенной схеме. После завершения лазерной терапии проводили аналогичный анализ.

Показано состояние ткани лимфоузла после моделирования инсульта и проведенной лазерной терапии. Отмечается повышенное содержание пигмента гемосидерина в ткани, по сравнению с результатами первой группы данного этапа.

С помощью методики, описанной выше, была проведена подготовка образцов глубоких шейных лимфатических узлов к атомно-абсорбционной спектроскопии. С помощью нее было определено количество железа в исследуемых образцах. В объем обнаруженного железа входили атомы, как находящиеся до разрушения в составе гемосидерина, так и в свободном состоянии.

По результатам вычисления было определено среднее значение уровня железа в тканях узлов мышей контрольной и опытной группы. Они составили 0,46 мкг/г и 0,78 мкг/г соответственно ($p < 0,001$). В таблице 2 представлены данные о количестве железа, содержащегося в глубоких шейных лимфатических узлах мышей обеих групп данного этапа.

На основе данных из таблицы 2 была построена гистограмма. Она наглядно показывает повышение накопления железа с лимфоузлах при инсульте. Что соответствует данным гистологического анализа.

Таблица 2 – Уровень содержания железа в глубоких шейных лимфатических узлах мышей контрольной и опытной групп

№ животного	Уровень железа, мкг/г	
	Контроль	Опыт
1	0,39±0,03	0,80±0,04
2	0,47±0,04	0,79±0,02
3	0,41±0,03	0,81±0,01
4	0,50±0,02	0,73±0,04
5	0,49±0,05	0,72±0,02
6	0,51±0,02	0,83±0,03
Среднее значение	0,46±0,03	0,78±0,02***

*** $p < 0,001$ относительно контроля

По результатам проведенной атомно-абсорбционной спектроскопии мы установили, что уровень железа повысился в глубоких шейных лимфатических узлах после инсульта в 1,7 раз. Это свидетельствует о повышенной скорости выведения веществ из головного мозга в периферическую лимфатическую систему, а значит и о стимулирующем действии лазерного излучения 1268 нм на дренажную функцию лимфатической системы.

Результаты гистологического анализа глубоких шейных лимфатических узлов и определение количества железа показали, что воздействие лазерного излучения ускоряет процесс очищения мозга через повышение скорости лимфотока. Через 6 часов после введения крови и при отсутствии лазерной терапии отмечался средний уровень накопления пигмента гемосидерина и количество железа было равно $0,46 \pm 0,03$. Наличие гемосидерина и железа свидетельствует о гемолизе клеток введенной в мозг крови, а значит и о процессе очищения мозга от последствий инсульта. А уже через 6 часов после введения крови с учетом проведения лазерной терапии

отмечается повышенный уровень накопления гемосидерина в ткани узла и увеличение количества железа в 1,7 раз. Это значит, что излучение активирует лимфатическую систему и процесс очищения мозга происходит в более короткие сроки.

Предлагаемый способ лазерной терапии 1268 нм позволяет ускорить процесс очищения мозга от последствий геморрагического инсульта. 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 геморрагического инсульта головного мозга позволяет существенно расширить исследовательские возможности в изучении механизмов развития и терапии данного заболевания.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Подводя итоги, можно выделить основные результаты проведения экспериментов дипломной работы. В ходе проведения первого этапа было выявлено, что введение крови, взятой из хвостовой вены, в область стриатума приводит к образованию геморрагического инсульта у мышей через 5 часов. Эти данные были подтверждены с помощью гистологического анализа ткани мозга.

В ходе второго этапа эксперимента было выявлено стимулирующее действие лазерного излучения на скорость движения лимфы и следовательно на дренажную функцию лимфатической системы на примере брыжейки кишечника крысы. Результаты были получены с помощью установки *in vivo* мониторинга скорости потока биологических жидкостей в микрососудах, включающая лазер 1268 нм.

В ходе третьего, заключительного этапа эксперимента было доказано терапевтическое действие лазера на мозг мыши при геморрагическом инсульте, что подтверждено повышением количества гемосидерина и атомов железа в глубоких шейных лимфатических узлах у мышей в группе с моделированным инсультом и лазерным воздействием, по сравнению с мышами с инсультом, не подвергавшихся действию лазера.

Выводы

1. Разработана модель геморрагического инсульта у мышей, подтвержденная гистологическими анализами;
2. Лазерное воздействие оказывает активирующее влияние на лимфатическую систему брыжейки кишечника;
3. Лазерное излучение ускоряет дренажную функцию лимфатической системы головного мозга и способствует более быстрому очищению мозговых тканей от продуктов гемолиза, что было подтверждено результатами гистологического анализа и атомно-абсорбционной спектроскопии, и поэтому может быть рекомендовано для дальнейшего изучения как метод терапии при геморрагическом инсульте.

