

Естественные науки. 2025. № 1 (18). С. 45–54.

Yestestvennyye nauki = Natural Sciences. 2024; 1 (14): 45–54 (In Russ.)

Научная статья[©]

УДК: 616.831-006.484:611.423:615.831

doi 10.54398/2500-2805.2025.18.1.006

НЕИНВАЗИВНАЯ СТИМУЛЯЦИЯ ЛИМФАТИЧЕСКОГО ОЧИЩЕНИЯ ТКАНЕЙ МОЗГА ОТ КРОВИ И ТОКСИНОВ У ГРЫЗУНОВ С ГЛИОМОЙ

*Саранцева Елена Ивановна¹, Искра Татьяна Дмитриевна²✉,
Наволокин Никита Александрович³*

¹⁻³Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, г. Саратов, Россия

³Саратовский государственный медицинский университет имени В. И. Разумовского, г. Саратов, Россия

²tata-isk@yandex.ru✉

Аннотация. Изучение механизмов, обеспечивающих очищение головного мозга, является одной из приоритетных задач исследований в области диагностики и терапии неврологических заболеваний и патофизиологических состояний. Фотостимуляция или фототерапия является наиболее многообещающим терапевтическим методом, благодаря своей способности модулировать клеточные и молекулярные процессы, что позволяет восстанавливать функции центральной нервной системы. Приоритетное внимание в научных исследованиях уделяется детальному изучению влияния фотобиомодуляции на процессы очищения головного мозга и разработке новых терапевтических подходов в лечении патологий головного мозга. Данные исследования были сфокусированы на развитии неинвазивной технологии подавления роста глиомы у мышей с использованием фотодинамической терапии с длиной волны 1 268 нм. Были проведены исследования по изучению роли лимфатической системы мозга в очищении его тканей от эритроцитов и гемоседерина. Исследования показали, что лимфатическая система мозга выполняет функцию очищения его тканей от крови после перенесенного кровоизлияния. Транскраниальное фотодинамическое воздействие оказывало стимулирующее влияние на вывод гемоседерина из тканей мозга и скорость лимфотока. Полученные результаты носят прогрессивный и пионерский характер и не имеют аналогов в мире.

Ключевые слова: фотобиомодуляция, заболевания головного мозга, лимфатическое очищение, гемоседерин, глиома, конфокальная визуализация

Благодарности: работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 24-75-10047 «Технология сохранения работоспособности головного мозга в условиях дефицита сна и старения» с 2024 по 2027 г.

Для цитирования: Саранцева Е. И., Искра Т. Д., Наволокин Н. А. Неинвазивная стимуляция лимфатического очищения тканей мозга от крови и токсинов у грызунов с глиомой // *Естественные науки. 2025. № 1 (18). С. 45–54. <https://doi.org/10.54398/2500-2805.2025.18.1.006> (In Russ.).*

NONINVASIVE STIMULATION OF LYMPHATIC CLEANSING OF BRAIN TISSUES FROM BLOOD AND TOXINS IN RODENTS WITH GLIOMA

Sarantseva Elena I.¹, Iskra Tatyana D.², Navolokin Nikita A.³

^{1–3}Saratov National Research State University named after N. G. Chernyshevsky, Saratov, Russia

³Saratov State Medical University named by V. I. Razumovsky, Saratov, Russia

²tata-isk@yandex.ru✉

Abstract. The study of brain cleansing mechanisms is one of the priority research objectives in the field of the diagnostics and therapy of neurological diseases and pathophysiological conditions. Photostimulation, or phototherapy, is the most promising therapeutic method due to its ability to modulate cellular and molecular processes, which allows to restore the functions of the central nervous system. Priority in scientific research is given to the detailed study of the effect of photobiomodulation on the processes of brain cleansing and to developing new therapeutic approaches for treating brain pathologies. These studies were focused on developing a non-invasive technology for suppressing glioma growth in mice using photodynamic therapy with a wavelength of 1270 nm. Studies were conducted to study the role of the lymphatic system of the brain in cleansing its tissues from erythrocytes and hemosiderin. The studies have shown that the lymphatic system of the brain performs the function of cleansing its tissues from blood after a hemorrhage. Transcranial photodynamic exposure had a stimulating effect on the removal of hemosiderin from brain tissue and the rate of lymph flow. The results obtained are progressive and pioneering and have no analogues in the world.

Keywords: photobiomodulation, brain diseases, lymphatic cleansing, hemosiderin, glioma, confocal visualization

Acknowledgments: the work was supported by the Russian Science Foundation grant No. 24-75-10047 “Technology for maintaining brain performance under conditions of sleep deficiency and aging” from 2024 to 2027.

For citation: Sarantseva E. I., Iskra T. D., Navolokin N. A. Noninvasive stimulation of lymphatic cleansing of brain tissues from blood and toxins in rodents with glioma. *Yestestvennyye nauki = Natural Sciences. 2025; 1 (18): 45–54. <https://doi.org/10.54398/2500-2805.2025.18.1.006> (In Russ.).*

Введение. Как известно, развитие глиомы сопровождается отёком головного мозга, приводящего к росту внутричерепного давления и возникновению интракраниальных геморрагий, в результате чего в его тканях накапливаются эритроциты и продукты их распада. В связи с этим была поставлена задача разработать способ неинвазивного повышения очистительной и дренажной функций лимфатической системы мозга. Для того чтобы

доказать, что лимфатическая система в данном случае является проводящими путями для вывода крови из мозга, были проведены пилотные эксперименты с применением конфокальной микроскопии с целью визуализации эритроцитов в просвете мозговых лимфатических сосудов. В норме эритроциты циркулируют только в кровеносном русле и не обнаруживаются в лимфатической системе. Присутствие эритроцитов в церебральной лимфатической сети возможно лишь в случае их попадания из тканей мозга.

Материалы и методы исследования. Для визуализации лимфатических сосудов была использована технология колоколизации двух специфических маркеров лимфатического эндотелия — эндотелиальный рецептор гиалуронана 1 эндотелия лимфатических сосудов (Live-1-Lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor 1) и белок гомеобокса 1 (Prox1-Prospero homeobox protein) [5]. На следующие сутки после возникновения внутрижелудочкового кровоизлияния голова мышей иссекалась и помещалась на двое суток в 4 % забуференный формалин. После чего ткани мозга и его оболочки извлекались и проходили подготовку для конфокальной микроскопии с применением вышеуказанных антител. После данной процедуры ткани мозга и его оболочки проходили подготовку для конфокальной микроскопии с применением вышеуказанных антител. Изучаемые образцы обрабатывались по стандартному иммуногистохимическому протоколу с соответствующими первичными и вторичными антителами. Конфокальную микроскопию проводили с помощью автоматизированного конфокального лазерного сканирующего микроскопа с водной иммерсией “Olympus FV10i-W” (“Olympus”, Япония). Неспецифическую активность блокировали двухчасовой инкубацией при комнатной температуре с 10 % бычьим сывороточным альбумином в растворе 0,2 % “Triton X-100” в натрий-фосфатном буфере. Инкубация с первичными антителами в разведении 1 : 500 проводилась в течение ночи при плюс 4 °С с кроличьими антимышиными антителами: goatanti-rabbit LYVE-1 antibody (1 : 500; PA-16635, “Invitrogen”, “Molecular Probes”, Eugene, Oregon, USA) и goatanti-mouse Prox-1 antibody (1 : 500; PA-16635, “Invitrogen”, “Molecular Probes”, Eugene, Oregon, USA). На всех этапах проводилась двух-трёхкратная промывка образцов пятиминутной инкубацией в промывочном растворе.

Количественную оценку гемосидерина в тканях лимфоузла проводили путем анализа фотоснимков с помощью программ “Ореол” и “ImageJ”. Площадь присутствия гемосидерина изучали с применением программы (плагин “AnalyzeParticles” во вкладке “Analyze”, подсчитывая суммарную площадь гемосидерина по отношению к ткани лимфоузла — показатель “TotalArea”).

Золотые наностержни применяли в качестве контрастных агентов, поскольку лимфатические сосуды прозрачные и не видны в микроскоп [3, 4, 6]. Мониторинг накопления золотых наностержней в глубоких лимфатических узлах проводили в течение 1 ч после введения. Коммерческий спектральный оптический когерентный томограф “Thorlabs GANYMEDE” (центральная длина волны 930 нм, ширина спектра 150 нм, продольное разрешение 4,4 мкм

в водной среде, максимальная глубина зондирования 2,7 мм) использовались в исследованиях. Объектив LSM02 использовали для достижения пространственного оптического разрешения в 13 мкм. Частота следования А-сканов томографа 30 кГц. 2048 А-сканов использовалось для построения одного Б-скана для достижения необходимой плотности пространственной выборки. 150 Б-сканов было отснято в одной и той же области объекта, затем данный набор Б-сканов подвергался цифровой стабилизации, в качестве референсных участков использовались пустоты в лимфатическом узле. После стабилизации каждое изображение исследовалось на предмет артефактов, вызванных движениями объекта. Изображения с ненадлежащим качеством исключались из анализа. Данная проблема возникала в связи с тем, что глубокий лимфатический узел сложно полностью изолировать от близлежащих органов и тканей, в связи с чем любое движение или сокращение мышц может приводить к существенному снижению качества ОКТ изображения. Оставшиеся изображения усреднялись для достижения лучшего соотношения «сигнал / шум». Алгоритм линейной регрессии использовали для нахождения линии тренда массива данных. Угол наклона данной линии был использован как параметр скорости аккумуляции. Все расчёты производились в линейной шкале интенсивности ОКТ изображений.

Количественное содержание золотых наностержней в тканях головного мозга оценивали методом атомно-абсорбционной спектроскопии (ААС) с помощью спектрофотометра “Dual Atomizer Zeeman AA iCE 3500” (“Thermo Scientific Inc”, США). Процесс подготовки образца ткани осуществлялся в автоматическом режиме с постоянным контролем температуры в микроволновой системе “MARS Xpress” (США). Для калибровки спектрометра использовался стандарт ААС (Fluke). Для всех выполненных измерений, стандартное отклонение не превышало 4 %.

Золотые наностержни получали путём опосредованного роста «зёрен» в бинарной смеси поверхностно-активных веществ. Спектры экстинкции измеряли на спектрофотометре “Specord 250” (“Analytik”, Jena, Germany). Изображения получали методом просвечивающей электронной микроскопии на просвечивающем электронном микроскопе “Libra-120” (“Carl Zeiss”, Jena, Германия).

Результаты исследования и их обсуждение. Конфокальную микроскопию применяли для визуализации лимфатических сосудов мозга и присутствие в них эритроцитов у грызунов с глиомой. Рисунок 1 отражает примеры конфокальной микроскопии и указывает на тот факт, что кровь выводится их тканей мозга по лимфатическим путям.

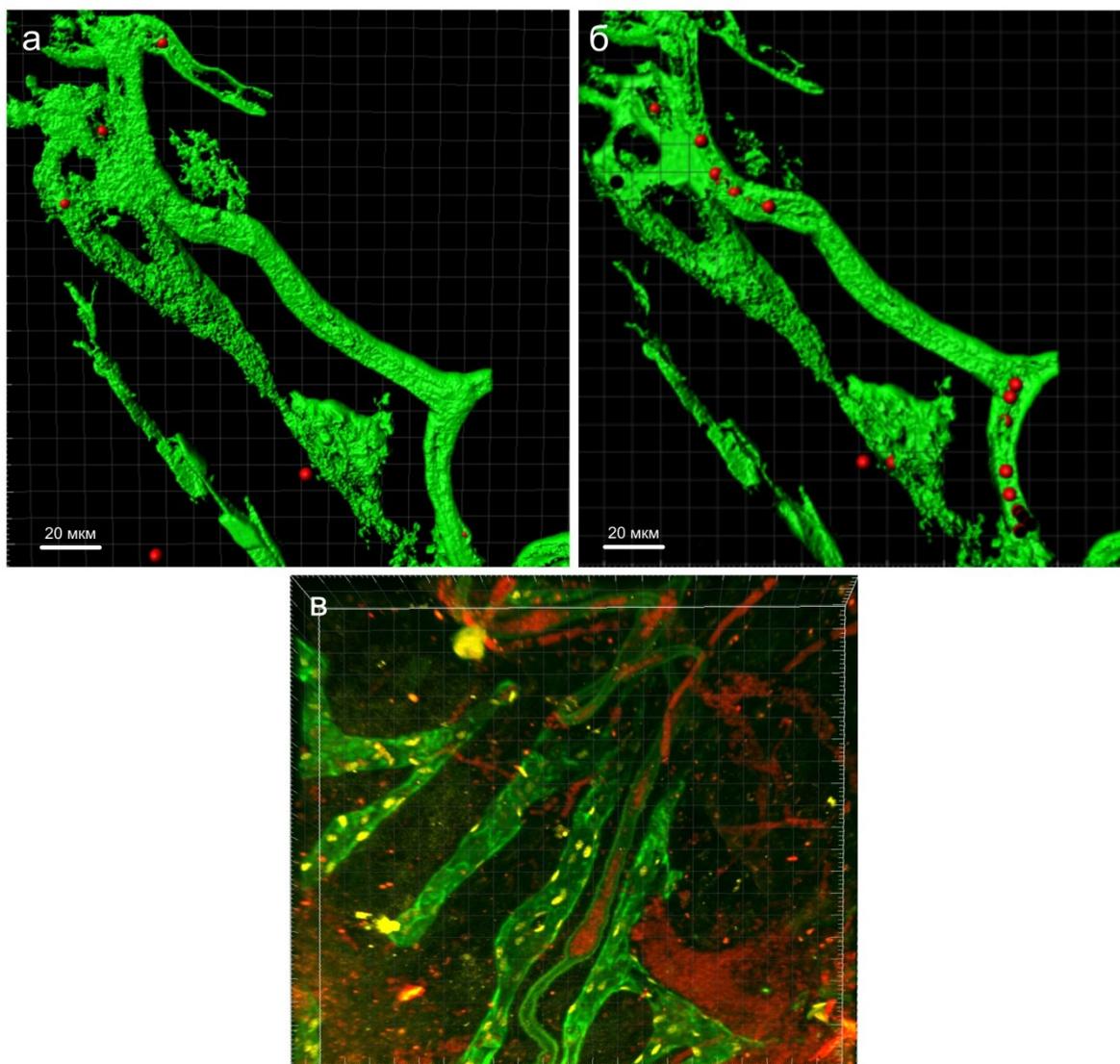


Рисунок 1 — 3D конфокальное изображение менингеальных лимфатических сосудов: а, б — лимфатические сосуды (зелёная окраска, мечение маркером Lyve-1) и присутствие в их просвете эритроцитов (красные точки), $n = 10$; в — лимфатические сосуды с присутствующими в них эритроцитами после развития внутрижелудочкового кровоизлияния с применением метода колоколизации двух маркеров лимфатического эндотелия (Lyve-1 — зелёная окраска и P-gx-1 — жёлтые точки). Справа видны в диффузном расположении эритроциты, что свидетельствует о пассивном передвижении крови из желудочков и тканей мозга в его оболочки, $n = 15$

На рисунке 1 показано присутствие эритроцитов в оболочках мозга (красный цвет), что свидетельствует о пассивном проникновении крови из области желудочков и тканей мозга в его оболочки. Лимфатические сосуды являются открытыми сосудами, через отверстия которых жидкости входят путём диффузного передвижения и разницы гидростатического давления. Вместе с током жидкостей в лимфатическое русло попадают макромолекулы и клетки. С этим процессом связаны механизмы лимфатического очищения тканей от вирусов, бактерий и токсинов [5].

Таким образом, конфокальная визуализация доказала, что лимфатическая система мозга выполняет функцию очищения его тканей от крови после перенесенного кровоизлияния.

Следующим этапом исследования стало установление факта, что первой анатомической станцией на периферии, принимающей кровь из лимфатических сосудов являются глубокие шейные лимфатические узлы. Данный результат получен с помощью синего красителя *Evans Blue* 10 %, который был введён в правый желудочек мозга. При флуоресцентном свечении этот краситель даёт красный цвет, что позволяет проследить путь его выведения. Рисунок 2 отражает результаты эксперимента указывающего, что после введения красителя в правый желудочек уже через 30 мин он накапливается в глубоком шейном лимфатическом узле. Кроме того, сам узел окрашивался в синий цвет (рис. 2). Таким образом, было доказано наличие прямой анатомической связи между церебральной и периферической лимфатическими системами.

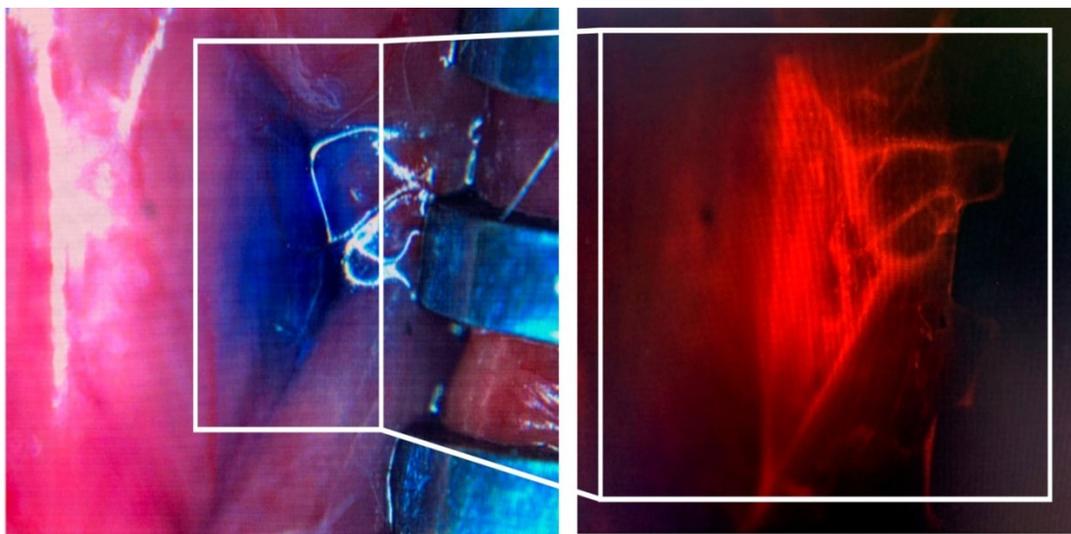


Рисунок 2 — Визуализация накопления красителя *Evans Blue* в тканях глубокого шейного лимфатического узла после его введения в правый желудочек мозга. Присутствие красителя определялось по визуализации синей окраски исследуемой ткани в обычном свете и красного свечения в флуоресцентном микроскопе, $n = 15$

Для повышения очистительной функции лимфатических сосудов мозга применяли неинвазивный метод терапии — транскраниальное фотодинамическое воздействие (1 267 нм в течение 61 мин: 17 мин — излучение, 5 мин — пауза) на лимфатические сосуды в области сагиттального синуса и анализировали эффективность применения различных доз лазера на очищение тканей мозга от продукта распада гемоглобина — гемосидерина. Содержание гемосидерина изучали в тканях глубокого шейного лимфоузла с применением гистологического метода. Отложения гемосидерина появляются в случае выхода крови в ткани мозга, что является надёжным гистологическим маркером развития геморрагий [1, 2]. Для изучения эффективной интенсивности лазерного излучения, достаточного для стимуляции очистительной функции

лимфатической системы, осуществляли воздействие в разных фотодинамических дозах (8 – 16 – 32 – 64 – 130 Дж/см²). Рисунок 3а иллюстрирует результаты исследований, которые выявили незначительное присутствие гемосидерина в шейном глубоком лимфоузле мышцы после внутрижелудочкового кровоизлияния.

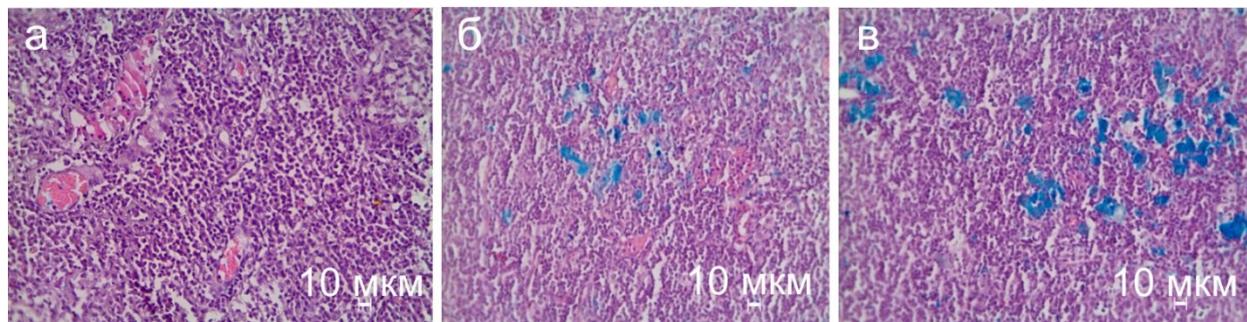


Рисунок 3 — Гистологическая картина присутствия гемосидерина — продукта распада гемоглобина в шейном глубоком лимфоузле мышцы в норме (слева), после внутрижелудочкового кровоизлияния без применения лазера (посередине) и после фотодинамического воздействия (справа, 1 268 нм, в дозе 64 Дж/см² в течение 1 ч по алгоритму «17 мин — излучение, 5 мин — пауза»). Гемосидерин представлен в виде голубых скоплений, $n = 15$ в каждой группе

После транскраниального фотодинамического воздействия дозой 64 Дж/см² выход из мозга гемосидерина увеличился в 11,4 раза ($37,30 \pm 1,21$ усл. ед. против $3,27 \pm 1,21$ усл. ед. в контроле, $p < 0,001$). Менее интенсивное фотодинамическое воздействие (рис. 3б) не оказывало эффектов на повышение очищения тканей мозга от гемосидерина ($3,21 \pm 1,19$ усл. ед. против $3,27 \pm 1,21$ усл. ед. для 8 Дж/см²; $2,98 \pm 1,86$ усл. ед. против $3,27 \pm 1,21$ усл. ед. для 16 Дж/см²; $3,41 \pm 1,72$ усл. ед. против $3,27 \pm 1,21$ усл. ед. для 32 Дж/см²). Более интенсивное лазерное воздействие 130 Дж/см² (рис. 3в) не оказывало влияние на проницаемость сосудов головного мозга и потому не было использовано для дальнейшего изучения.

В качестве дополнительного теста для анализа фотодинамического повышения дренажной и очистительной функции церебральной лимфатической системы применяли метод визуализации в реальном режиме времени очищения тканей мозга от золотых пигелированных наностержней (размер: диаметр 16 ± 3 нм и длина 92 ± 17 нм), введённых в его разные области (кору больших полушарий: AP – 1,06 мм; DV – 1,5 мм; ML – 1,5 мм, в гиппокамп: AP – 2,0 мм; ML – 1,3 мм; DV – 1,9 мм, в цистерну магна, и в правый желудочек (AP – 1,06 мм; ML – 2,00 мм; DV – 2,50 мм) с последующим накоплением в шейном глубоком лимфатическом узле. Для оценки скорости накопления золотых наностержней использовали оптическую когерентную томографию [6].

Результаты исследования содержания наностержней и скорости их накопления представлены на рисунке 4. Графическое изображение, полученных данных, показало существенное повышение скорости накопления

и содержания золотых наностержней в глубоком шейном лимфоузле после применения фотодинамического воздействия.

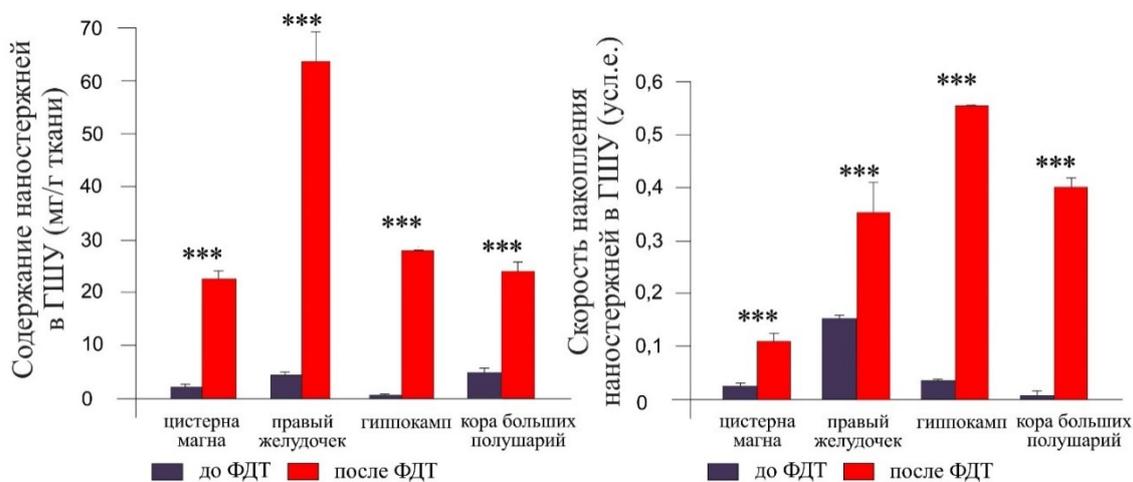


Рисунок 4 — Скорость накопления золотых наностержней (усл. ед.) и их содержание (мг/г) в глубоком шейном лимфоузле мышей до (контрольная группа) и после (экспериментальная группа) применения фотодинамического воздействия 1 268 нм (64 и 10 Дж/см² на поверхности мозга); *** $p < 0,001$ по сравнению с контрольной группой, $n = 10$ в каждой группе

Как показано на схеме (рис. 5), при воздействии лазером с длиной волны 1 268 нм наблюдается расширение лимфатического сосуда, что часто коррелирует с повышением эндотелиальной проницаемости. Активация лимфатического очищения мозга происходит в результате расширения просвета сосудов и увеличения скорости лимфотока, способствуя более быстрому восстановлению тканей мозга.



Рисунок 5 — Схематическое изображение релаксирующих эффектов лазерного воздействия (1 268 нм, 64 и 10 Дж/см²) на лимфатические сосуды

Полученные результаты носят прогрессивный и новаторский характер и не имеют аналогов в мире. В известных авторам источниках патентной и научно-технической информации не описано способа лимфатической стимуляции очищения тканей мозга от крови и токсинов путём применения фотодинамического неинвазивного воздействия с длиной волны 1 267 нм в дозе излучения 64 Дж/см² через интактный череп и без применения фотосенсибилизаторов.

Заключение. Применение фотодинамической стимуляции очистительных процессов лимфатической системы мозга будет способствовать развитию прорывных технологий повышения восстановительных свойств центральной нервной системы после перенесённых травм головного и спинного мозга, а также при развитии глиомы, так как фотостимуляция улучшает функции лимфатической и иммунной систем. Предложенный неинвазивный терапевтический метод будет способствовать повышению качества и продолжительности жизни таких пациентов, снижению затрат государства на их лечение, что соответствует приоритетным направлениям развития здравоохранения.

Технология не имеет аналогов в мире и предлагается в России впервые. Это даст возможность российским учёным занять достойное конкурентоспособное место на международной арене по продвижению новых разработок по управлению лимфатическими и иммунными механизмами мозга. Это также будет являться важной информативной платформой для появления инновационных решений в развитии технологий для нейрореабилитационной медицины.

Список литературы

1. Fischbach, F. A. On the structure of hemosiderin and its relationship to ferritin / F. A. Fischbach, D. W. Gregory, Pauline M. Harrison, T. G. Hoy, J. M. Williams // *Journal of Ultrastructure Research*. — 2016. — Vol. 37 (5). — P. 495–503. — doi 10.1016/s0022-5320(71)80020-5.
2. Richter, G. A. Study of Hemosiderosis with Aid of Electron Microscopy / G. A. Richter // *The Journal of Experimental Medicine*. — 2016. — Vol. 106 (2). — P. 203–218. — doi 10.1084/jem.106.2.203.
3. Semyachkina-Glushkovskaya, O. Photodynamic opening of the blood-brain barrier and pathways of brain clearing / O. Semyachkina-Glushkovskaya [et al.] // *Biophotonics*. — 2018. — Vol. 11. — e201700287. — doi 10.1002/jbio.201700287.
4. Semyachkina-Glushkovskaya, O. Application of optical coherent tomography for in vivo monitoring of the meningeal lymphatic vessels during opening of blood-brain barrier: Mechanisms of brain clearing / O. Semyachkina-Glushkovskaya [et al.] // *Journal of Biomedical Optics*. — 2017. — Vol. 22. — P. 1–9. — doi 10.1117/1.JBO.22.12.121719.
5. Semyachkina-Glushkovskaya, O. Blood – Brain Barrier, Lymphatic Clearance, and Recovery: Ariadne’s Thread in Labyrinths of Hypotheses / O. Semyachkina-Glushkovskaya, D. Postnov, J. Kurths // *International Journal of Molecular Sciences*. — 2018. — Vol. 19, № 3818. — doi 10.3390/ijms19123818.
6. Zhinchenko, E. Pilot study of transcranial photobiomodulation of lymphatic clearance of beta-amyloid from the mouse brain: break through strategies for non pharmacologic therapy

of Alzheimer's disease / E. Zhinchenko [et al.] // *Biomedical Optics Express*. — 2019. — Vol. 10 (8). — BOE.10.004003. — doi 10.1364/BOE.10.004003.

References

1. Fischbach F. A., Gregory D. W., Harrison Pauline M., Hoy T. G., Williams J. M. On the structure of hemosiderin and its relationship to ferritin. *Journal of Ultrastructure Research*. 2016; 37 (5): 495–503. Doi 10.1016/s0022-5320(71)80020-5.
2. Richter, G. A. Study of Hemosiderosis with Aid of Electron Microscopy. *The Journal of Experimental Medicine*. 2016; 106 (2): 203–218. doi 10.1084/jem.106.2.203.
3. Semyachkina-Glushkovskaya, O. [et al.]. Photodynamic opening of the blood-brain barrier and pathways of brain clearing pathways. *Biophotonics*. 2018; 11: e201700287. doi 10.1002/jbio.201700287.
4. Semyachkina-Glushkovskaya, O. [et al.]. Application of optical coherent tomography for in vivo monitoring of the meningeal lymphatic vessels during opening of blood-brain barrier: Mechanisms of brain clearing. *Journal of Biomedical Optics*. 2017; 22: 1–9. doi 10.1117/1.JBO.22.12.121719.
5. Semyachkina-Glushkovskaya, O., Postnov, D., Kurths, J. Blood – Brain Barrier, Lymphatic Clearance, and Recovery: Ariadne's Thread in Labyrinths of Hypotheses. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018; 19 (3818). doi 10.3390/ijms19123818.
7. Zhinchenko, E. [et al.]. Pilot study of transcranial photobiomodulation of lymphatic clearance of beta-amyloid from the mouse brain: break through strategies for non pharmacologic therapy of Alzheimer's disease. *Biomedical Optics Express*. 2019; 10 (8): BOE.10.004003. doi 10.1364/BOE.10.004003.

Информация об авторах

Саранцева Е. И. — кандидат биологических наук, доцент;
Искра Т. Д. — кандидат биологических наук, доцент;
Навокин Н. А. — кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник.

Information about authors

Saranceva E. I. — Candidate of Biological Sciences, Associate Professor;
Iskra T. D. — Candidate of Biological Sciences, Associate Professor;
Navolokin N. A. — Candidate of Medical Sciences, Senior Researcher.

Вклад авторов

Все авторы сделали эквивалентный вклад в публикации.
Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Contribution of the authors

All authors have made equivalent contributions to publications.
The authors declare that there is no conflict of interest.

Статья поступила в редакцию 27.01.2025; одобрена после рецензирования 07.02.2025; принята к публикации 14.02.2025.

The article was submitted 27.01.2025; approved after reviewing 07.02.2025; accepted for publication 14.02.2025.