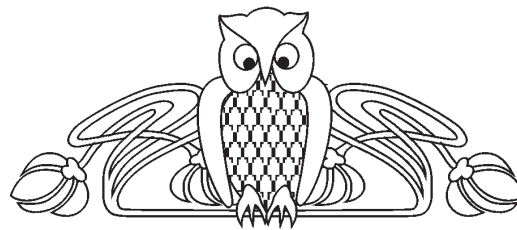




УДК 612.42

РОЛЬ МЕНИНГИАЛЬНОЙ ЛИМФАТИКИ В ПРОЦЕССАХ ОЧИЩЕНИЯ МОЗГА: ВИЗУАЛИЗАЦИЯ *IN VIVO*

Э. Н. Дуарте Торрес, А. С. Абдурашитов, А. А. Намыкин,
А. А. Широков, Н. А. Шушунова, Е. И. Саранцева,
О. В. Семячкина-Глушковская



Дуарте Торрес Эрик Николас, студент кафедры физиологии человека и животных, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, Междисциплинарный центр критических технологий в медицине, inkvision10@gmail.com

Абдурашитов Аркадий Сергеевич, аспирант кафедры оптики и биофотоники, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, Учебная лаборатория атомной физики, квантовой электроники и спектроскопии, abdurashitov-optics@mail.ru

Намыкин Антон Александрович, аспирант кафедры оптики и биофотоники, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, Учебная лаборатория атомной физики, квантовой электроники и спектроскопии, anton-namikin@bk.ru

Широков Александр Александрович, кандидат химических наук, Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов, shirokov_a@ibppm.ru

Шушунова Наталия Александровна, магистрант кафедры физиологии человека и животных, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, Междисциплинарный центр критических технологий в медицине, shushunovan.a@gmail.com

Саранцева Елена Ивановна, кандидат биологических наук, доцент кафедры физиологии человека и животных, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, Междисциплинарный центр критических технологий в медицине, sorphora68@mail.ru

Семячкина-Глушковская Оксана Валерьевна, доктор биологических наук, заведующая кафедрой физиологии человека и животных, доцент, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, Междисциплинарный центр критических технологий в медицине, glushkovskaya@mail.ru

В экспериментах на крысах было проведено введение в паренхиму мозга красителя *Evans Blue* и золотых наностержней с последующей их визуализацией с помощью оптической когерентной томографии и флуоресцентной микроскопии. Результаты показали, что менингеальная лимфатика играет важную роль в очистке головного мозга от применяемых маркеров, введенных в его ткани. Мозг быстро очищается от красителя по менингеальному лимфатическому пути. В свете открытия лимфатических сосудов в оболочках мозга становится очевидно, что менингеальная лим-

фатика является связующим звеном между выведением спинно-мозговой и интерстициальной жидкостей из мозга в периферическую лимфатику. Именно глубокий шейный лимфатический узел определяется как первое звено в этой цепочке. Показано, что глубокий шейный лимфатический узел является первой анатомической «станцией» на пути оттока жидкости из мозга. Для понимания этих процессов впервые были разработаны специальные подходы для визуализации прозрачных лимфатических сосудов в оболочках мозга с применением оптической когерентной томографии и флуоресцентной микроскопии. Полученные данные показывают, что лимфатические механизмы лежат в основе дренажной и очистительной функций мозга.

Ключевые слова: менингеальная лимфатическая система, оптическая когерентная томография, флуоресцентная микроскопия, *Evans blue*, золотые наностержни.

DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2018-18-4-433-438>

Введение

Более двух тысячелетий в нейрофизиологии считалось, что лимфатические сосуды в мозге отсутствуют. Несмотря на опыты итальянского анатома Паоло Маскагни [1, 2], который еще в XVIII в. представил макеты сплетения прозрачных сосудов в оболочках мозга и назвал их лимфатическими, вплоть до недавнего времени господствовало представление об «иммунной стерильности» мозга.

Благодаря прогрессу в оптической визуализации стало возможным повторить опыты Маскагни с применением современных технологий конфокальной и двухфотонной микроскопии. В 2015 г. были опубликованы результаты двух независимых научных групп, которые доказали существование лимфатических сосудов в оболочках мозга [3, 4]. В связи с этим появились новые пути изучения неизвестных процессов, таких как движение лимфоцитов из головного мозга и связь центральной и периферической лимфатических систем.

Существует гипотеза о том, что менингеальная лимфатика вовлечена в механизмы, ответственные за очищение мозга от метаболитов [5, 6]. Эти механизмы являются частью недавно обнаруженной лимфатической системы, которая осуществляет движение жидкости из крове-



носных сосудов в ткани мозга и далее снова в кровотоки. Однако механизмы работы лимфатической системы подвергаются сомнению в силу отсутствия доказательств возможности движения жидкости через глию и, в частности, через астроциты, как утверждают создатели теории о лимфатической системе [5, 6]. Данная теория построена на опытах по введению флуоресцентных маркеров в цистерны magna, после чего наблюдается их быстрое (за 5 мин) распространение в паренхиме головного мозга. Однако это утверждение не имеет ясных свидетельств. Сейчас активно обсуждается, что такое быстрое распространение краски по мозгу возможно только через пространства Вирхова–Робина [7–9], но не через астроциты, для чего пока еще не было представлено физиологических обоснований.

Существование менингеальной лимфатики открывает горизонты в появлении принципиально новых фундаментальных знаний о процессах очищения мозга от метаболитов и соединений, которые попадают в него через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ). Известно, что ГЭБ строго контролирует процесс поступления веществ в ткани мозга, и нарушение его барьерной функции приводит к серьезным последствиям в его работе [10–13]. Очевидно, что мозг обладает процессами защиты, связанными с экстренным очищением его тканей в условиях открытия ГЭБ. Однако эти процессы остаются неизвестными.

Для понимания этих процессов нами впервые были разработаны специальные подходы для визуализации прозрачных лимфатических сосудов в оболочках мозга с применением оптической когерентной томографии и флуоресцентной микроскопии. На основе этих технологий были поставлены задачи: изучить роль менингеальной лимфатики в процессах очищения мозга от красителя *Evans Blue* и золотых наностержней, введенных в его паренхиму.

Материалы и методы

Объекты исследования

Во всех экспериментах использовали самцов крыс. Животные содержались в стандартных лабораторных условиях с доступом к пище и воде *ad libitum*. Протокол эксперимента был одобрен комитетом по уходу и использованию лабораторных животных в Саратовском государственном университете (протокол Н-147, 07.02.2018).

Изготовление золотых наностержней

Исходная суспензия золотых наночастиц была приготовлена в бинарной смеси поверхностного активного вещества [14, 15]. При анализе изображений просвечивающей электрон-

ной микроскопии средняя ширина наночастиц составляла 16 ± 3 нм, а толщина 92 ± 17 нм. Эти данные хорошо согласуются с положениями продольного (975 нм) и поперечного (507 нм) резонансов в спектре экстинкции. Электронно-микроскопический и спектрофотометрический анализы проводили на базе ЦКП «СИМБИОЗ» ИБФРМ РАН (Саратов).

Введение в ткани мозга *Evans Blue* и золотых наностержней

Evans Blue (17 мкл, Sigma, США, 1% раствор) и золотые наностержни (17 мкл) вводили в паренхиму мозга (2 мм латеральнее и 2,5 мм каудальнее от брегмы) под общей газовой анестезией (2% изофлуран, 1 л/мин $N_2O/O_2 - 70:30$). Введение осуществляли на глубину 2 мм с помощью иглы 34-G Hamilton со скоростью 0,1 мкл/мин (Harvard Apparatus, США).

Оптическая когерентная томография (ОКТ)

Система (Thorlabs Ganymede II 930 нм) была использована для визуализации накопления золотых наностержней в полости глубокого шейного лимфатического узла. Скорость сканирования была равна 30 кГц. Осевые и боковые размеры поля обзора (FOV) составляли 3 и 2 мм соответственно (1,8 и 2,9 мкм в записанных изображениях). Регистрировали через 5 минут после инъекции раствора наностержней.

Флуоресцентная микроскопия

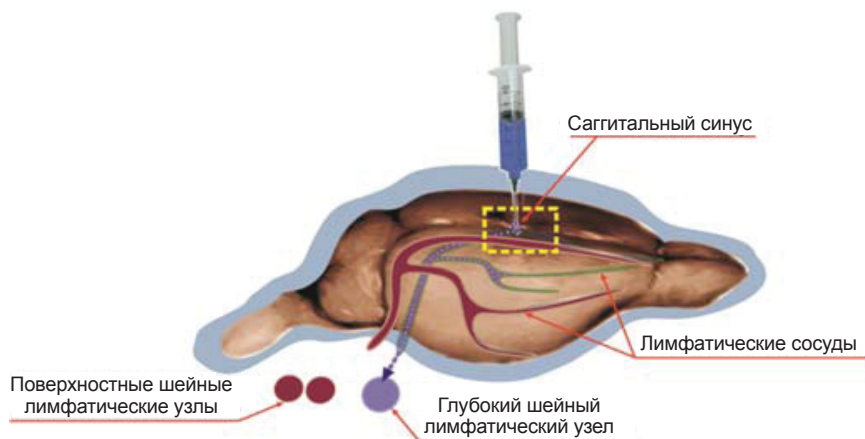
Флуоресцентный микроскоп использовался для изображения лимфатических сосудов после инъекции *Evans Blue* в мозг [16]. Самодельная установка состоит из объектива микроскопа с увеличением 5,5 и числовой апертурой 0,12 и камеры CMOS (DCC1545M, Thorlabs Inc, США).

Результаты и их обсуждение

На первом этапе исследований изучали процесс выведения краски *Evans Blue* из тканей мозга путем визуализации накопления красителя в лимфатических узлах (рисунок).

Краситель *Evans Blue* вводили непосредственно в паренхиму мозга и с помощью бинокля наблюдали окраску шейных поверхностных и глубоких лимфатических узлов. Результаты показали, что через 1 ч после введения краски в ткани мозга окрашивался в синий цвет глубокий шейный поверхностный узел (см. рисунок, б). В поверхностных шейных лимфоузлах в это время наблюдения изменений не было зафиксировано.

Глубокий шейный лимфатический узел является первой анатомической станцией выхода спинномозговой жидкости из мозга, что было показано в исследованиях на животных и людях [17–19].

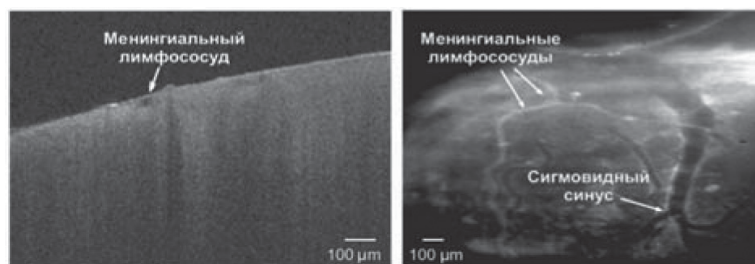


а



б

Поверхностные шейные лимфатические узлы Поверхностные шейные лимфатические узлы



в

г

Визуализация менингеальных лимфатических сосудов: а – схема эксперимента с инъекцией *Evans Blue* в паренхиму головного мозга; б – фотографии шейных лимфатических узлов до и через 1 ч после инъекции *Evans Blue* в ткани мозга (глубокий шейный лимфатический узел стал синим из-за лимфатического дренирования *Evans Blue* из мозга в полость глубокого шейного лимфатического узла. Поверхностные шейные лимфатические узлы остались неизменными; в и г – визуализация менингеальных лимфатических сосудов (указаны стрелками) вдоль венозных синусов мозга (двойные стрелки) с помощью оптической конфокальной томографии и контрастных золотых наностержней и флуоресцентной визуализации красителя *Evans Blue* в лимфатических сосудах оболочек мозга соответственно

Таким образом, наши результаты показали, что мозг быстро очищается от красителя по менингеальному лимфатическому пути. В свете открытия лимфатических сосудов в оболочках мозга и наших наблюдений становится очевидно, что менингеальная лимфатика является связующим звеном между выведением спинномозговой и интерстициальной жидкостей из мозга в периферическую лимфатику, где глубокий шейный лимфатический узел – первое звено в

этой цепочке. Наши результаты согласуются с данными других исследователей, которые также показали накопление красителя *Evans Blue* в глубоком шейном лимфатическом узле, который собирает жидкость из мозга [3, 4].

In vivo визуализация менингеальных лимфатических сосудов

In vivo визуализация менингеальной лимфатики представляет собой сложную задачу, вследствие того что лимфатические сосуды оболочек



мозга прозрачные с непостоянным током лимфы в них. Размеры этих сосудов у грызунов составляют всего 7–15 мкм в нормальном состоянии [18], что делает лимфатические сосуды «неуловимыми» для оптических приборов и существенно лимитирует исследовательские возможности.

Изучение физиологии лимфатической системы в оболочках мозга чрезвычайно актуально. Открываются новые горизонты в появлении принципиально новых знаний об иммунных процессах в тканях мозга, механизмах его очищения от токсинов и метаболитов, а также о генезе нейродегенеративных, сосудистых и онкологических заболеваний. Сегодня существует несколько методов, которые применяют в клинике для исследования периферической лимфатики. Это метод введения индоцианина зеленого [20], но он не применим в отношении лимфатики в оболочках мозга, так как нет такой аппаратуры, которая могла бы визуализировать через закрытый череп этот контрастный агент. В 2017 г. был разработан специальный алгоритм применения магнитно-резонансной томографии (МРТ, 7Т) для исследования лимфатики оболочек мозга у человека и обезьян [21]. Однако такой метод позволяет только констатировать факт наличия этих сосудов и не дает возможности изучать движение лимфы или иммунных клеток в лимфатике. Кроме того, 7Т МРТ – технологии дорогостоящие и недоступны для широкого пользования. Существует модель трансгенных грызунов с флуоресцентными лимфатическими сосудами, что позволяет изучать их прижизненно с применением двухфотонной микроскопии [4]. Однако такая модель не является коммерческой и недоступна для широкого применения в исследованиях. Таким образом, необходимо развивать технологии, позволяющие прижизненно анализировать процессы образования и движения лимфы в менингеальных лимфатических сосудах.

В данной работе были разработаны технологии применения флуоресцентной микроскопии и ОКТ для визуализации лимфатических сосудов в оболочках мозга у крыс. Для этого использовали контрастные агенты, краситель *Evans Blue* и золотые наностержни 10 нм, которые вводили в ткани мозга с целью активации процессов очищения мозга от контрастных агентов по лимфатике.

На рисунке, в изображены лимфатические сосуды (указаны стрелкой), которые заполнены красителем *Evans Blue*. Менингеальные лимфатические сосуды располагаются вдоль венозных синусов мозга (двойные стрелки), что также было показано другими исследователями в экспериментах *ex vivo* [3]. Лимфатические сосуды

заполнились красителем через 20 мин после его введения в ткани мозга, что свидетельствует о вовлечении менингеальных лимфатических сосудов в процесс очищения мозга от красителя, что было показано нами в первой серии экспериментов по визуализации глубокого шейного лимфатического узла (см. рисунок, а, б). Данные флуоресцентной микроскопии были подтверждены результатами ОКТ, где введение золотых наностержней в мозг сопровождалось появлением на ОКТ изображения сосудов с черными пустотами (заполненными наностержнями в качестве контрастного агента). Этот результат отражает факт очищения мозга от нанокompозитов после их введения в мозг по менингеальной лимфатике, что было нами также показано в опытах по изучению процессов очищения мозга от веществ, попадающих в его ткани после открытия ГЭБ [18, 19].

Заключение

В опытах на крысах проведены исследования роли менингеальной лимфатики в дренажной и очистительной функциях мозга с применением оптической когерентной томографии и флуоресцентной микроскопии. Показано, что введение в паренхиму красителя *Evans Blue* или золотых наностержней 10 нм сопровождается их быстрым выведением по менингеальным лимфатическим сосудам в периферическую лимфатику. Показана перспективность применения оптической когерентной томографии и флуоресцентной микроскопии для прижизненной визуализации лимфатической системы и дренажных процессов в мозге. Впервые выявлены принципиально важные результаты, показывающие вовлечение менингеальной лимфатики в механизмы очищения мозга от веществ, попадающих в его ткани.

Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 17-15-01263).

Благодарим доктора биологических наук Б. Н. Хлебцова (лаборатория нанобиотехнологий ИБФРМ РАН, Саратов) за синтез, оптическую характеристику и функционализацию золотых наностержней.

Список литературы

1. Mascagni P., Bellini G. B. *Istoria completa dei vasi linfatici*. Italy, Florence, 1816. Vol. 2. 195 p.
2. Lukić I. K., Glunčić V., Ivkić, G., Hubenstorf M., Marušić A. Virtual dissection : a lesson from the 18th century // *The Lancet*. 2003. Vol. 362, № 9401. P. 2110–2113.



3. Louveau A., Smirnov I., Keyes T. J., Eccles J. D., Rouhani S. J., Peske J. D., Harris T. H. Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels // *Nature*. 2015. Vol. 523, № 7560. P. 337.
4. Aspelund A., Antila S., Proulx S. T., Karlsen T. V., Karman S., Detmar M., Wiig H., Alitalo K. A dural lymphatic vascular system that drains brain interstitial fluid and macromolecules // *J. of Exp. Med.* 2015. Vol. 212, № 7. P. 991–999.
5. Iloff J. J., Wang M., Liao Y., Plogg B., Peng W., Gundersen G. A., Benveniste H., Vates G. E., Deane R., Goldman S. A., Nagelhus E. A., Nedergaard M. A paravascular pathway facilitates CSF flow through the brain parenchyma and the clearance of interstitial solutes, including amyloid β // *Sci. Translat. Med.* 2012. Vol. 4, № 147. P. 147.
6. Jessen N. A., Munk A. S., Lundgaard I., Nedergaard M. The glymphatic system: a beginner's guide // *Neurochem. Res.* 2015. Vol. 40, № 12. P. 2583–2599.
7. Virchow R. Ueber die Erweiterung kleinerer Gefäße // *Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medicin*. 1851. Vol. 3, № 3. P. 427–462.
8. Robin C. Recherches sur quelques particularites de la structure des capillaires de l'encephale // *J. Physiol. Homme. Anim.* 1859. Vol. 2. P. 537–548.
9. Nakada T. Virchow-Robin space and aquaporin-4 : new insights on an old friend // *Croatian Med. J.* 2014. Vol. 55, № 4. P. 328–336.
10. Prasad S., Sajja R. K., Naik P., Cucullo L. Diabetes mellitus and blood-brain barrier dysfunction : an overview // *J. of Pharmacovigilance*. 2014. Vol. 2, № 2. P. 125.
11. Haley M. J., Lawrence C. B. The blood–brain barrier after stroke : Structural studies and the role of transcytotic vesicles // *J. of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2017. Vol. 37, № 2. P. 456–470.
12. Setiadi A., Korim W. S., Elsaafien K., Yao S. The role of the blood–brain barrier in hypertension // *Exper. Physiol.* 2018. Vol. 103, № 3. P. 337–342.
13. Yamazaki Y., Kanekiyo T. Blood-brain barrier dysfunction and the pathogenesis of Alzheimer's disease // *Intern. J. of Mol. Sci.* 2017. Vol. 18, № 9. P. 1965.
14. Khlebtsov B. N., Khanadeev V. A., Ye J., Sukhorukov G. B., Khlebtsov N. G. Overgrowth of gold nanorods by using a binary surfactant mixture // *Langmuir*. 2014. Vol. 30, № 6. P. 1696–1703.
15. Ye X., Zheng C., Chen J., Gao Y., Murray C. B. Using binary surfactant mixtures to simultaneously improve the dimensional tunability and monodispersity in the seeded growth of gold nanorods // *Nano Lett.* 2013. Vol. 13, № 2. P. 765–771.
16. Lichtman J. W., Conchello J. A. Fluorescence microscopy // *Nature Methods*. 2005. Vol. 2, № 12. P. 910.
17. Cserr H. F., Harling Berg C. J., Knopf P. M. Drainage of brain extracellular fluid into blood and deep cervical lymph and its immunological significance // *Brain Pathology*. 1992. Vol. 2, № 4. P. 269–276.
18. Semyachkina-Glushkovskaya O., Abdurashitov A., Dubrovsky A., Bragin D., Bragina O., Shushunova N., Maslyakova G., Navolokin N., Bucharskaya A., Tuchin V., Kurths J., Shirokov A. Application of optical coherence tomography for in vivo monitoring of the meningeal lymphatic vessels during opening of blood–brain barrier: mechanisms of brain clearing // *J. of Biomed. Optics*. 2017. Vol. 22, № 12. P. 12.
19. Semyachkina-Glushkovskaya O., Chehonin V., Borisova E., Fedosov I., Namykin A., Abdurashitov A., Shirokov A., Khlebtsov B., Lyubun Y., Navolokin N., Ulanova M., Shushunova N., Khorovodov A., Agranovich I., Bodrova A., Sagatova M., Shareef A., Saranceva E., Iskra T., Dvoryatkina M., Zhinchenko E., Sindeeva O., Tuchin V., Kurths J. Photodynamic opening of the blood-brain barrier and pathways of brain clearing // *J. of Biophotonics*. 2018. Vol. 11, № 11. DOI: 10.1002/jbio.201700287
20. Yamamoto T., Narushima M., Yoshimatsu H., Yamamoto N., Oka A., Seki Y., Todokoro T., Iida T., Koshima I. Indocyanine green velocity : lymph transportation capacity deterioration with progression of lymphedema // *Ann. of Plastic Surgery*. 2013. Vol. 71, № 5. P. 591–594.
21. Absinta M., Ha S. K., Nair G., Sati P., Luciano N., Palisoc M., Louveau A., Zaghloul K., Pittaluga S., Kipnis J., Reich D. Human and nonhuman primate meninges harbor lymphatic vessels that can be visualized noninvasively by MRI // *Elife*. 2017. Vol. 6. DOI: 10.7554/eLife.29738

Lymphatic Meningeal Role in Processes of Brain Clearing: *in vivo* Visualization

E. N. Duarte Torres, A. S. Abdurashitov, A. A. Namykin, A. A. Shirokov, N. A. Shushunova, E. I. Sarantseva, O. V. Semyachkina-Glushkovskaya

Erik N. Duarte Torres, <https://orcid.org/0000-0002-9070-0064>, Saratov State University, Interdisciplinary Center of Critical Technologies in Medicine, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia, inkvision10@gmail.com

Arkadiy S. Abdurashitov, <https://orcid.org/0000-0003-0731-8364>, Saratov State University, Research-Educational Institute of Optics and Biophotonics, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia, abdurashitov-optics@mail.ru

Anton A. Namykin, <https://orcid.org/0000-0002-9945-8542>, Saratov State University, Research-Educational Institute of Optics and Biophotonics, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia, anton-namikin@bk.ru

Aleksandr A. Shirokov, <https://orcid.org/0000-0003-3239-7877>, Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences (IBPFM RAS), 13, Ave. Entuziastov, Saratov, 410049, Russia, shirokov_a@ibppm.ru

Natalia A. Shushunova, <https://orcid.org/0000-0001-5366-1783>, Saratov State University, Interdisciplinary Center of Critical Technologies in Medicine, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia, shushunovan.a@gmail.com



Elena I. Sarantseva, <https://orcid.org/0000-0002-3507-7708>, Saratov State University, Interdisciplinary Center of Critical Technologies in Medicine, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia, sophora68@mail.ru

Oksana V. Semyachkina-Glushkovskaya, <https://orcid.org/0000-0001-6753-7513>, Saratov State University, Interdisciplinary Center of Critical Technologies in Medicine, 82, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia, glushkovskaya@mail.ru

In the experiments on rats, *Evans Blue* dye and gold nanorods were injected into the brain parenchyma, followed by visualization with optical coherent tomography and a fluorescent microscopy. The results showed that meningeal lymphatics play an important role in the brain clearing, using markers introduced into the tissues. It has

been shown that the deep cervical lymph node is the first anatomical "station" for the outflow of fluid from the brain. The data obtained shed light on the lymphatic mechanisms underlying the drainage and clearing of brain functions.

Key words: meningeal lymphatic system, optical coherence tomography, fluorescence microscopy, *Evans Blue*, gold nanorods.

Acknowledgements: *This work was supported by the Russian Science Foundation (project no. 17-15-01263).*

We thank Dr. B. N. Khlebtsov (Laboratory of Nanobiotechnologies IBPMM RAS, Saratov) for the synthesis, optical characterization and functionalization of gold nanorods.

Образец для цитирования:

Дуарте Торрес Э. Н., Абдурашитов А. С., Намыкин А. А., Широков А. А., Шушунова Н. А., Саранцева Е. И., Семячкина-Глушковская О. В. Роль менингеальной лимфатики в процессах очищения мозга: визуализация *in vivo* // Изв. Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. 2018. Т. 18, вып. 4. С. 433–438. DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2018-18-4-433-438>

Cite this article as:

Duarte Torres E. N., Abdurashitov A. S., Namykin A. A., Shirokov A. A., Shushunova N. A., Sarantseva E. I., Semyachkina-Glushkovskaya O. V. Lymphatic Meningeal Role in Processes of Brain Clearing: *in vivo* Visualization. *Izv. Saratov Univ. (N. S.), Ser. Chemistry. Biology. Ecology*, 2018, vol. 18, iss. 4, pp. 433–438 (in Russian). DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2018-18-4-433-438>
