

Министерство образования и науки Российской Федерации  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ  
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра физиологии человека и животных

**ПОВЫШЕНИЕ ПРОНИЦАЕМОСТИ  
ГЕМАТОЭНЦЕФАЛИЧЕСКОГО БАРЬЕРА ФОТОДИНАМИЧЕСКИМ  
ВОЗДЕЙСТВИЕМ ЛАЗЕРА С ДЛИНОЙ ВОЛНЫ 635 НМ**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 4 курса 421 группы

Направления 06.03.01 Биология

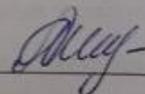
Биологического факультета

Мустафиной Нурии Наилевны

Научный руководитель

доцент кафедры физиологии человека

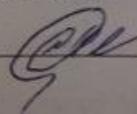
и животных, к.б.н., \_\_\_\_\_



Е.И. Саранцева

Зав. кафедрой физиологии человека

и животных, д.б.н., доцент \_\_\_\_\_



О.В. Семячкина-Глушковская

Саратов 2018

**Актуальность работы.** Одной из главных задач в медицине остается борьба со злокачественными новообразованиями. Заболеваемость и смертность от онкологических заболеваний во всем мире, по прогнозам ВОЗ за 1999-2020 гг., возрастет в 2 раза, поэтому разработка и введение новых, высокотехнологичных методов ранней диагностики и лечения злокачественных опухолей является актуальной проблемой современной медицины. Основным методом лечения опухолей мозга остается хирургический.

У здорового человека гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) препятствует поступлению в мозг большинства противоопухолевых препаратов. Рост опухоли сопровождается повреждением ГЭБ, приводящим к повышению его проницаемости. Лекарственная терапия у больных сопряжена со значительными трудностями. Несмотря на совершенствование микрохирургической техники и использование комплексной терапии, успехи в лечении злокачественных опухолей головного мозга остаются неутешительными.

Наименее благоприятный прогноз остается у больных глиобластомами, относящихся к 4-й степени злокачественности (классификация ВОЗ). Средняя продолжительность жизни больных глиобластомой по данным разных авторов не превышает 9–12 мес (мультиформная глиобластома), при этом выживаемость при хирургическом лечении составляет 16–20 нед, при комплексном – 40–60 нед. Это обусловлено особенностями формирования мультиформной глиобластомы: инфильтративным характером роста новообразования, сопровождающимся проявленным перифокальным отеком ткани мозга и дальнейшей диссеминацией опухоли, отсутствием капсулы. Визуально мультиформная глиобластома не отличается от окружающей здоровой ткани мозга, что способствует затруднению определения границы и удаления. Применение современных методов интраоперационной навигации (ультразвукового исследования, нейронавигации, рентгеновской

компьютерной и магниторезонансной томографии) незначительно изменило выживаемость больных.

Все большее внимание исследователей привлекают фотодинамическая терапия (ФДТ) и флюоресцентная диагностика (ФД) злокачественных опухолей мозга. Применение данных методов стало возможно лишь в последние несколько десятилетий, после изобретения и освоения лазерной техники. История развития самих методик, основанных на фотохимических свойствах различных видов лекарственных препаратов, насчитывает не одно столетие.

Фотодинамическую терапию в начале использовали только для лечения больных со злокачественными новообразованиями, но сегодня метод нашел широкое применение в офтальмологии, дерматологии, гастроэнтерологии, ревматологии, урологии и др. специальностях в лечении пациентов с заболеваниями неопухоловой природы. Принципиальными отличиями ФДТ от других методов лечения являются: бесконтактность, невозможность инфицировать пациента, безболезненность и бескровность лечебной процедуры. Терапевтический эффект выражается в быстром заживлении и сохранении структуры тканей, отсутствии рубцов. При этом клиническая эффективность ФДТ зависит от ряда факторов, одним из которых является дифференцированный выбор фотосенсибилизатора (ФС) с селективным накоплением и длительным пребыванием в патологически измененных, инфицированных тканях. Поэтому в качестве оптимального ФС для ФДТ с наилучшими физико-химическими и фармакологическими характеристиками хорошо себя проявил препарат 5-аминолевулиновая кислота.

В связи с этим целью настоящей работы является изучение эффективности фотодинамического воздействия с использованием фотосенсибилизатора 5-ALA.

Для решения поставленной цели нами были сформулированы следующие задачи:

1. Определить возможность открытия ГЭБ путем фотодинамического воздействия с помощью *Evans Blue* и декстрана;
2. Определить наиболее эффективную дозу лазерного воздействия;
3. Выявить оптимальную дозу фотосенсибилизатора.

**Структура бакалаврской работы.** Выпускная квалификационная работа состоит из шести частей: сокращения, введения, основной части, заключения, выводов и списка использованных источников. Основная часть включает в себя три раздела: обзор литературы, материал и методы и результаты исследования. Раздел обзор литературы состоит из трех подразделов: история использования фотодинамической терапии, структура ГЭБ, его работа в норме и при патологиях, эффективности фотодинамической терапии с использованием фотосенсибилизатора 5-ALA. Раздел материалы и методы представлен описанием исследуемых объектов и условий проведения эксперимента. Раздел результаты исследования включает в себя: эффекты ФДВ на проницаемость ГЭБ к *Evans Blue* в зависимости от дозы лазера и ФС, интенсивность флуоресценции до, 90 мин и 4 часа после лазерного воздействия (655 нм+ 5ALA 20 мг/кг), спектр флуоресценции в зависимости от дозы ФС, результаты конфокальной микроскопии и гистологического анализа эффектов фотодинамического воздействия на ГЭБ.

**Объектом исследования** служили самцы белых беспородных мышей в количестве 35 особей.

**Основное содержание работы.** Исследование проводили на кафедре физиологии человека и животных Саратовского государственного научно-исследовательского университета имени Н.Г.Чернышевского. Эксперимент был выполнен на здоровых самцах белых беспородных мышей. Всех животных содержали в виварии кафедры физиологии человека и животных в стандартных контролируемых условиях: 12-часовой период освещения, температура воздуха плюс  $(20\pm 2)^\circ\text{C}$ , влажность 50-70%, корм и вода *ad libitum*.

**Постановка эксперимента.** Основной нашей задачей, было выяснить, какая сила лазерного воздействия и доза фотосенсибилизатора являются оптимальными для открытия ГЭБ. Кроме того, необходимо было определить ту силу и время воздействия, при которых не происходило бы необратимых разрушений тканей мозга.

Первым этапом наших исследований являлось эмпирическим путем подобрать силу и время воздействия лазера на ткани мозга. Применяли силу действия лазера 10, 15, 20, 40 Дж/см<sup>2</sup> и две дозы фотосенсибилизатора 5-ALA - 20 мг/кг и более высокая доза - 80 мг/кг.

Использовали следующие группы мышей по 7 особей в каждой:

- 1) контроль (без лазерного воздействия и введения ФС);
- 2) мощность лазера 10 Дж/см<sup>2</sup>, время воздействия 250 сек и доза 5-ALA 20 мг/кг;
- 3) 15 Дж/см<sup>2</sup> и время воздействия 375 сек доза 5-ALA 20 мг/кг;
- 4) 20 Дж/см<sup>2</sup> и время воздействия 333 сек и доза 5-ALA 20 мг/кг;
- 5) 40 Дж/см<sup>2</sup> и время воздействия 400 сек и доза 5-ALA 20 мг/кг.

**Обсуждение результатов исследования.** Во время первой стадии экспериментов мы применяли клинически рекомендованную дозу 5-ALA - 20 мг/кг. Изучили влияние лазерного воздействия на проницаемость ГЭБ при интраорбитальном введении *Evans Blue*. Представили два момента времени - 90 минут после лазерного воздействия, когда наблюдали первые значительные изменения в ГЭБ и 4 часа после лазерного воздействия, когда все структуры и показатели ГЭБ приходят в норму.

После 90 мин лазерного воздействия в первой группе содержание красителя *Evans Blue* при силе лазерного воздействия 10 Дж/см<sup>2</sup> изменилось до 9.90 мкг/г со стандартным отклонением 0.08, что является достоверным показателем. Во второй группе при 15 Дж/см<sup>2</sup> силы воздействия лазера содержание *Evans Blue* увеличилось до 17.33 мкг/г с отклонением 0.09. В третьей группе при 20 Дж/см<sup>2</sup> содержание *Evans Blue* изменилось до 17.91

мкг/г с отклонением 0.08. В четвертой группе при 40 Дж/см<sup>2</sup> содержание Evans Blue изменилось до 17.87 мкг/г с отклонением 0.09.

Затем, через 4 часа на этих же группах мышей произвели повторный учет данных и выяснили, что при силе лазерного воздействия 10 Дж/см<sup>2</sup> содержание Evans Blue изменилось до 0.73 мкг/г с отклонением 0.05. При 15 Дж/см<sup>2</sup> содержание Evans Blue изменилось до 0.62 мкг/г с отклонением 0.09. При 20 Дж/см<sup>2</sup> содержание Evans Blue изменилось до 0.64 мкг/г с отклонением 0.04. При 40 Дж/см<sup>2</sup> содержание Evans Blue изменилось до 0.58 мкг/г с отклонением 0.05.

Исследуя временную динамику изменений в ГЭБ, было обнаружено, что максимальные сдвиги отмечаются через 90 мин после ФДВ, а именно с силой лазерного воздействия 15 Дж/см<sup>2</sup> и временем 375 сек содержание красителя Evans Blue был максимально высоким 17.33 мкг/г.

Данные, представленные в таблице 1, показывают, что доза лазера 10 Дж/см<sup>2</sup> вызвала 19,0 кратное увеличение проницаемости ГЭБ после лазерного воздействия для *Evans Blue* по сравнению с исходным состоянием (контроль без лазерного воздействия). Лазерная доза 15 Дж/см<sup>2</sup> сопровождалась 33,3-кратным увеличением экстравазации *Evans Blue*, которая в 1,7 выше, чем при лазерной дозе 10 Дж/см<sup>2</sup>. При дальнейшем увеличении силы воздействия до 20 Дж/см<sup>2</sup> и выше наблюдалось разрушение ткани мозга с образованием периваскулярной экземы. Т. е. применение более высоких доз лазера (20 и 40 Дж/см<sup>2</sup>) незначительно изменило концентрацию *Evans Blue* по сравнению с дозой 15 Дж/см<sup>2</sup>.

На следующем этапе данной серии экспериментов проводили сравнение эффектов ФДВ на ГЭБ в зависимости от разной концентрации ФС 20 мг/кг и 80 мг/кг. Лазерная доза была выбрана 15 Дж/см<sup>2</sup>, т.к. начиная с этой дозы были выявлены выраженные изменения в проницаемости ГЭБ к *Evans Blue*. Группы включали по 7 особей и были сформированы следующим образом:

- 1) 15 Дж/см<sup>2</sup> + 20 мг/кг 5-ALA;

2)  $15 \text{ Дж/см}^2 + 80 \text{ мг/кг 5-ALA}$ .

Результаты показали, что если доза ФС 20 мг/кг вызывала экстравазацию Evans Blue из сосудов в ткани мозга в 2,2 раза, то 80 мг/кг - в 75,6 раз, т.е. эффект был сильнее в 34,3 раза (рисунок 2). Т.е. доза 20 мг/кг является оптимальной, при увеличении дозы (80 мг/кг) наблюдаем появление периваскулярной экземы.

Второй тест для оценки состояния ГЭБ включал в себя конфокальную микроскопию (Olympus FV10i-W, Olympus, Japan) проницаемости ГЭБ к декстрану 70 кДа. Группы в этом эксперименте включали по 8 особей:

1) контроль, без ФДВ;

2)  $15 \text{ Дж/см}^2 + 20 \text{ мг/кг 5-ALA}$ ;

3)  $15 \text{ Дж/см}^2 + 80 \text{ мг/кг 5-ALA}$ .

Оценку интенсивности экстравазации декстрана проводили в соответствии с рекомендациями, представленными в публикации. Экстравазацию оценивают таким образом: слабая «+» - если процесс отмечается на уровне одного видимого сосуда виде слабого облака вышедшего декстрана в ткани мозга; средняя «++» - то же, но наблюдается яркое облако; сильная «+++» - яркие облака вокруг нескольких соседних сосудов; «++++» - диффузная облака в разных зонах мозга.

Конфокальная микроскопия: слева – контроль, без ФДВ; посередине - «++» - сильная экстравазация декстрана из сосудов мозга в его ткани при введении физиологической дозы ФСБ (20 мг/кг); справа- «++++» - диффузная более выраженная экстравазация декстрана при введении 5-ALA 80 мг/кг.

Результаты показали, что лазерное воздействие в дозах  $15 \text{ Дж/см}^2$  с 5-АЛА (20 мг/кг) вызывало интенсивный выход декстрана из капилляров головного мозга, что в результате привело к формированию красных "облачков" вокруг микрососудов. Высокая доза 5-АЛА (80 мг/кг с дозой лазера  $15 \text{ Дж/см}^2$ ) сопровождалась диффузным типом экстравазации декстрана, т.е. происходило более сильное нарушение ГЭБ.

Гистологический анализ показал, что при более высокой дозе 5-ALA начинаются необратимые изменения в тканях мозга. Действительно, силы лазерного воздействия  $15 \text{ Дж/см}^2$  с 5-ALA (20 мг/кг) вызывали умеренный периваскулярный отек, предвещающий утечку растворенного вещества из микрососудов. Высокая доза 5-ALA (80 мг/кг) вызывала более обширный периваскулярный отек с очень интенсивным накоплением растворенного вещества в периваскулярном пространстве как показано на рисунке 3 Б.

Гистологический анализ: нормальные ткани мозга в контрольной группе; среднее фото отражает образование периваскулярной эдемы (повышение проницаемости сосудов мозга к воде) на фоне ФДВ при дозе ФС (20 мг/кг). более выраженные изменения в проницаемости сосудов к воде при ФДВ при дозе ФС (80 мг/кг). Результаты гистологического анализа показали, что ФДВ-зависимое открытие ГЭБ сопровождается развитием периваскулярной эдемы, как следствие повышения проницаемости ГЭБ к воде. При этом повышение дозы ФСБ приводило не только к накоплению воды в тканях мозга, но и изменению формы сосудов, которые становились извилистыми. Может привести к нарушению метаболических процессов в тканях мозга.

Наши результаты показывают, что лазерное воздействие (с длиной волны 635 нм + 5-ALA) вызывает временное открытие ГЭБ. Исходя из наших графиков, мы видим, что восстановление обнаружилось через 4 часа после лазерного воздействия, что практически соответствует контролю. Но, как показывает гистологический анализ при увеличении дозы лазерного воздействия, мы наблюдали периваскулярную экзему.

Проницаемость ГЭБ для *Evans Blue* (68,5 кДа) и декстрана (70 кДа), которые имитируют выход через ГЭБ высокомолекулярных соединений, увеличивается при действии лазера с дозой 10 - 40  $\text{Дж/см}^2$ . Но результаты такого воздействия принципиально отличны друг от друга. Эти эффекты зависят от силы лазерного воздействия и концентрации фотосенсибилизатора. Оптимальные дозы лазера, которые индуцировали

открытие ГЭБ без необратимых повреждений, составляли 10-15 Дж/см<sup>2</sup>. Интересно, что дальнейшее увеличение мощности лазера до 40 Дж/см<sup>2</sup> сопровождалось более широкими изменениями в ГЭБ, а именно в возникновении периваскулярной эдемы.

Таким образом, была выявлена технология открытия ГЭБ с помощью фотодинамического воздействия (длина волны 635 нм) на открытом черепе. Повышение проницаемости ГЭБ к высоко- и низкомолекулярным соединениям отмечается 90 мин после ФДВ. Закрытие ГЭБ наблюдается через 4 часа после ФДВ. Оптимальная доза для лазера 635 нм - 15 Дж/см<sup>2</sup> (средняя по интенсивности доза), фотосенсибилизатора 5-ALA - 20 мг/кг. Дальнейшее повышение лазерной дозы и дозы фотосенсибилизатора не приводит к более выраженным изменениям со стороны ГЭБ, однако, вызывают негативные последствия в виде периваскулярной эдемы, т.е. накоплению воды в тканях мозга.

**Заключение.** Наши эксперименты на здоровых мышах ясно показывают, что небольшие дозы лазерного воздействия (10 Дж/см<sup>2</sup>) с концентрацией 5-ALA 20 мг/кг не дают полноценного открытия ГЭБ. Оптимальной оказалась доза для полного открытия ГЭБ - 15 Дж/см<sup>2</sup>, т.к. она является безопасной и не оставляет за собой последствия в виде периваскулярной эдемы, по сравнению с дозами 20 и 40 Дж/см<sup>2</sup>. Увеличение концентрации 5-ALA (80 мг/кг) сопровождающееся серьезным нарушением ГЭБ, приводящим к травмам тканей головного мозга (периваскулярная эдема). Поэтому оптимальной дозой 5-ALA оказалась доза 20 мг/кг. Мы считаем, что эти результаты имеют большое значение для более глубокого понимания влияния ФДТ на сосудистую систему мозга. В дальнейшем возможно применение силы лазерного воздействия 15 Дж/см<sup>2</sup> и дозы 5-ALA 20 мг/кг для временного открытия ГЭБ с целью доставки лекарственных препаратов к очагу поражения в центральной нервной системе.

И.Нашу  
11.06.13