

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

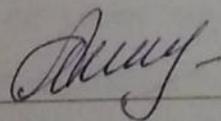
Кафедра физиологии человека и животных

ПОВЫШЕНИЕ ПРОНИЦАЕМОСТИ ГЕМАТОЭНЦЕФАЛИЧЕСКОГО
БАРЬЕРА ФОТОДИНАМИЧЕСКИМ ВОЗДЕЙСТВИЕМ
ЛАЗЕРА С ДЛИНОЙ ВОЛНЫ 1268 нм

АВТОРЕФЕРАТ

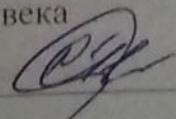
БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА
студентки 4 курса 421 группы
направления 06.03.01 Биология
биологического факультета
Шнитенковой Анастасии Александровны

Научный руководитель
к.б.н., доцент



Е.И. Саранцева

Зав. кафедрой физиологии человека
и животных, д.б.н., доцент



О.В. Семячкина-Глушковская

Саратов 2018

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время патологические заболевания головного мозга встречаются достаточно часто. Это является причиной смерти при наличии опухолей и болезнях центральной нервной системы живого организма. Одним из серьезных видов онкологических заболеваний головного мозга является глиома.

Современные методы диагностики позволяют выявить подобные аномалии на ранних стадиях развития. Кроме того, эти методы являются слабо травматичными. На современном этапе развития медицины выделены приоритетные направления для лечения глиомы, которые заключаются в развитии оптических технологий повышения проницаемости гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) для адресной доставки эффективных противоопухолевых препаратов в очаг поражения с использованием клеточных и супрамолекулярных транспортных систем.

В некоторых случаях, когда традиционные способы специальной терапии злокачественных новообразований по тем или иным причинам невыполнимы, методом выбора могут стать лазерные технологии. В нашей работе мы применили лазер с длиной волны 1268 нм, потому что такая длина волны почти не наносит вреда сосудам и тканям мозга. И к тому же не требует применение фотосенсибилизатора.

Однако исследования, связанные с открытием гематоэнцефалического барьера с помощью методов фотодинамики изучены недостаточно.

Поэтому целью данной работы являлось изучение проницаемости гематоэнцефалического барьера под влиянием лазера с длиной волны 1268 нм без использования фотосенсибилизатора.

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

1. Оценить степень открытия ГЭБ после фотодинамического воздействия с использованием красителя *Evans Blue* и *Dextran*.
2. Выявить оптимальное время, которое соответствует наибольшей концентрации *Evans Blue* в тканях мозга.

3. Оценить способность липосом проходить через ГЭБ после фотодинамического воздействия.

Материалы исследования.

Эксперименты проводились на достаточно большой выборке мышей (8 групп по 3 особи в каждой) половозрелых нелинейных самцов массой около 25 грамм. Животных размещали в стандартных лабораторных условиях с доступом к пище и воде. Все процедуры были выполнены в соответствии с «Руководством по уходу и использованию лабораторных животных». Мышей содержали при 25 ± 2 ° C, 55% влажности и 12/12 часовом цикле свет / темнота.

Методы исследования.

Для определения лазерного излучения на проницаемость ГЭБ применялись методы:

1) Спектрофлуориметрический метод с использованием *Evans Blue*, 68 кДа (2% раствор в объемной дозе 0,2 мл/100 гр мыши, Sigma, iv vivo).

2) Конфокальная микроскопия с применением Dextran, 70 кДа (1% раствор в объемной дозе 0,2 мл/100 гр/ мыши, iv vivo, меченый тетраметилпроламином).

Для определения лазерного излучения и прохождения липосом через ГЭБ применялся метод:

3) Метод магнитно-резонансной томографии с внутривенным введением контрастного вещества, а именно препарата гадолиния (1.2 мл/кг, iv vivo).

С целью изучения проницаемости гематоэнцефалического барьера под влиянием лазера с длиной волны 1268 нм без использования фотосенсибилизатора на первом этапе работы проводился анализ влияния лазера с длиной волны 1268 нм на сосуды головного мозга. Учитывалась концентрация *Evans Blue* в тканях мозга. Было выяснено, что воздействие лазера с длиной волны 1268 нм вызывает временное открытие ГЭБ.

На первом этапе исследования определяли концентрацию *Evans Blue* (68 кДа) в тканях мозга на открытом и закрытом черепе, а также на контрольной группе с введением *Evans Blue* и без него с помощью спектрофлуориметрического метода.

Как показали наши данные, концентрация *Evans Blue* без лазерного воздействия в тканях и сосудах мозга невысока. Кроме того, существует разница между воздействием лазера на открытый и закрытый череп. При воздействии лазера на открытый череп концентрация *Evans Blue* значительно выше, чем при воздействии на закрытый череп. Применение меньших мощностей и даже сверх мощного лазерного воздействия (в 10 раз превышающего минимальную мощность) приводит к менее эффективному открытию ГЭБ: 10 мВ – в 20 раз ($p < 0.001$), 30 мВ в – в 31 раз ($p < 0.001$), 300 мВ – в 23 раза ($p < 0.001$). Сверхмощное воздействие приводит к длительному восстановлению ГЭБ, что лимитирует применение высоких мощностей лазера.

На втором этапе исследования выяснили оптимально установленные параметры лазера 1268 нм (70 мВ и 17 мин). Это необходимо для тестирования проницаемости ГЭБ к декстрану 70 кДа.

Далее производили МРТ и результаты этого анализа подкреплялись данными *in vivo* исследованиями, проведенными с использованием двух-фотонной микроскопии. Данные двух-фотонной микроскопии, также как и данные МРТ, показали, что лазер 1268 нм (70 мВ, 17 мин, воздействие через интактные череп и кожу) открывает ГЭБ через 1 час, а восстанавливается он через 4 часа.

Таким образом, содержание декстрана в сосудах мозга и его тканях до и после применения лазера 1268 нм разное. Исходя из этого видно, что накопление декстрана в церебральных сосудах до воздействия лазера больше, чем после. Это связано с тем, что через час ГЭБ открывается и в этот момент содержание декстрана уменьшается. Затем через 4 часа

проницаемость ГЭБ восстанавливается и содержание декстрана увеличивается.

На следующем этапе оценивали проницаемость ГЭБ для GM1-липосом 100 нм с использованием двух-фотонной микроскопии, конфокального микроскопа.

На рисунке 1 показаны результаты *in vivo* анализа проницаемости ГЭБ к липосомам через 60 мин после применения 1268 нм. Этот график показывает, что до действия лазером липосомы проходили через ГЭБ не достаточно хорошо. Но после действия лазером 1268 нм плотные контакты разрушаются, поэтому проницаемость ГЭБ увеличивается и проходит большее количество липосом.

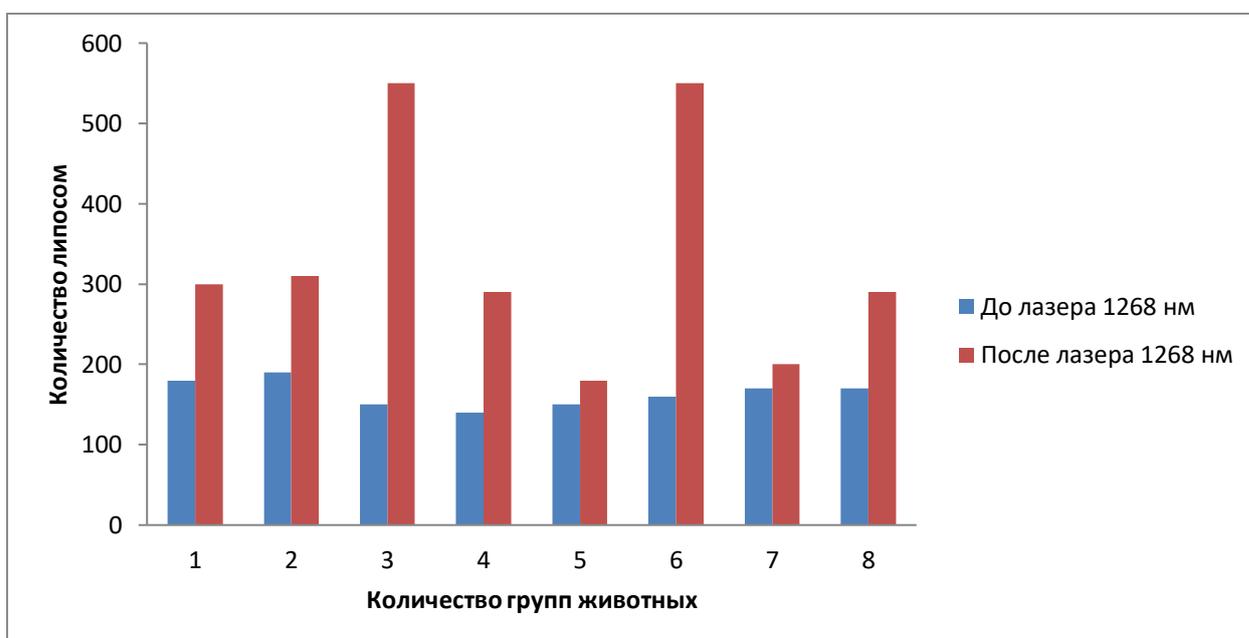


Рисунок 1 - Анализ проницаемости ГЭБ к липосомам через 60 мин после применения 1268 нм.

В соответствии с рисунком 1 действие после лазерного излучения с длиной волны 1268 нм с наблюдением выхода липосом больше, чем до действия лазером. Это связано с тем, что спустя час ГЭБ открывается и проницаемость для липосом становится больше. Затем оценивали эффективность открытия ГЭБ для GM1-липосом (из мозга быка) с помощью лазера 1268 нм с применением меток для эндотелиальных клеток церебральных сосудов - SMI, и базальной мембраны – ламинин.

Исследование было подтверждено с помощью методов конфокальной микроскопии.

В целом, по результатам конфокальной микроскопии было выявлено, что было оказано лазерное воздействие 1268 нм (70 мВ, 17 мин) и оно сопровождалось появлением липосом размером 100 нм за пределами эндотелия церебральных сосудов, базальной мембраны и среди астроцитов. Это доказывает эффективность лазерного открытия ГЭБ для липосом размером 100 нм. Такие липосомы проходят через ГЭБ и не повреждают ткани и сосуды мозга. Они являются перспективными наноматериалами для доставки лекарств в головной мозг.

Экстравазация GM1 - липосом в ткани мозга наблюдалась спустя час после лазерного воздействия. И спустя 4 часа ГЭБ был непроницаем для липосом.

В ходе выполненной работы можно сказать, что новым направлением в неинвазивном открытии ГЭБ с целью доставки лекарственных препаратов в мозг с помощью липосом является технология повышения проницаемости ГЭБ с применением лазера 1268 нм, не требующего применения ФСБ и повреждения кожи и черепа.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Гематоэнцефалический барьер является препятствием для проникновения в мозг некоторых лекарственных веществ. В нашем исследовании был выбран лазер новой генерации 1268 нм. Были установлены наиболее оптимальные параметры применения лазера с длиной волны 1268 нм (70 мВ, 17 мин) для открытия ГЭБ через закрытый череп и интактную кожу. С помощью применения специальных тестов на проницаемость ГЭБ и маркеров его структурных элементов была доказана эффективность неинвазивного временного лазерного открытия ГЭБ, которое наблюдается через 1 час после воздействия с последующим быстрым закрытием ГЭБ (через 4 часа). Выявлено, что глубина проникновения лазерного излучения (1268 нм) в ткани мозга увеличивается по мере роста опухоли.

Установлены оптимальные дозы применения лазера (70 мВ, 17 мин). Показана эффективность применения лазера 1268 нм для доставки в ткани мозга липосом 100 нм в качестве транспортных систем для лекарственных средств.)

Таким образом, разработана неинвазивная лазерная технология открытия ГЭБ с помощью непрямого генерации синглетного кислорода лазером – 1268 нм, не требующего применения фотосенсибилизаторов.

ВЫВОДЫ

1. Была определена степень открытия ГЭБ после фотодинамического воздействия с помощью *Evans Blue* и Dextran. Концентрация *Evans Blue* в тканях мозга увеличивается спустя час после лазерного воздействия. Так же происходит и с Dextran.
2. Достаточное время для развития эффективного воздействия лазера при всех мощностях – 17 минут, применение меньшего времени не оказывает эффектов на ГЭБ.
3. Была проведена оценка способности липосом проходить через ГЭБ. И было установлено, что липосомы (100 нм) могут проходить через ГЭБ и не повреждать ткани мозга. Так же было установлено, что чем больше проницаемость ГЭБ, тем лучше и в большем количестве проходят липосомы.

4.06.18

Шиб