

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

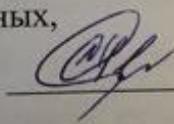
Кафедра физиологии
человека и животных

Проницаемость гематоэнцефалического барьера для липосом

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

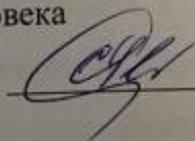
Студентки 2 курса 241 группы
направления 06.04.01 «Биология»,
биологический факультет
Бодровой Анастасии Алексеевны

Научный руководитель
заведующий кафедрой
физиологии человека и животных,
доцент, д.б.н.



О.В. Семячкина-Глушковская

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



О.В. Семячкина-Глушковская

Саратов 2018

Введение. Прошрое десятилетие было охарактеризовано прогрессом разработки лекарственных средств. В 2012 году американское управление по контролю за продуктами и лекарствами одобрило 39 новых лекарственных средств. Среди них только два новых лекарства были одобрены для лечения болезней центральной нервной системы (ЦНС). Вместе с этим, в силу отсутствия эффективной терапии заболеваний ЦНС, многие неврологические патологии приводят к потере нетрудоспособности населения и связаны с длительным пребыванием в больнице [1].

Инсульт, эпилепсия и психические заболевания (невроз, депрессия и шизофрения) остаются неизлечимыми и сопровождаются высокой смертностью. Несмотря на значительный прогресс в биотехнологической индустрии, до сих пор нет надежных лекарственных препаратов для лечения заболеваний мозга [1].

Причиной отсутствия прогресса в лечении заболеваний ЦНС является гематоэнцефалический барьер (ГЭБ), который представляет собой динамическую систему белков на границе между кровью и тканями мозга, регулирующую проницаемость различных веществ в мозг и обратно. Это защитное свойство ЦНС для предотвращения попадания в мозг токсинов, бактерий и вирусов. Однако, это также создает проблему доставки препаратов в мозг для лечения его патологий [1].

Развитие методов доставки препаратов в мозг за счет повышения проницаемости ГЭБ является приоритетной и актуальной задачей современной медицины и нейробиологии. Существует около 70 методов доставки препаратов в мозг, которые, однако, не внедрены в клиническую практику за счет их инвазивности, лимитированной в достижении терапевтической дозы препаратов в тканях мозга, сложностью выполнения [1].

В последнее время липосомы рассматриваются как перспективные и безопасные наноносители или транспортные системы для лекарственных препаратов, особенно, противоопухолевых соединений, которые оказывают токсическое воздействие на весь организм и за счет их адресной доставки в

мозг существенно повышается как биодоступность, так и снижаются токсические опасные эффекты [].

Для преодоления указанных проблем в данном исследовании была поставлена цель, разработать неинвазивный метод доставки разных типов липосом.

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

1. Разработать метод, основанный на применении прерывистого слышимого звука по специальному алгоритму (370 Гц, 100 дБ) для повышения проницаемости ГЭБ у мышей.

2. Исследовать возможность доставки в мозговую ткань GM₁-липосом (диаметром 104 нм) у мышей под воздействием звука с применением конфокальной микроскопии.

3. Сравнить эффективность доставки в ткани мозга PI-липосом (диаметром 99 нм) у мышей под воздействием звука с применением конфокальной микроскопии.

4. Исследовать стабильность липосом при прохождении ГЭБ с помощью метода компьютерного моделирования.

Научная новизна

Среди 7000 препаратов, зарегистрированных в общей базе данных лекарственных препаратов, только 5% могут способствовать лечению неврологических заболеваний. Причиной этого является то, что около 95% фармацевтических веществ не проходят через ГЭБ. Для преодоления этих проблем разработана оригинальная модель неинвазивного метода обратимого повышения проницаемости ГЭБ у мышей для доставки лекарственных средств в головной мозг.

Положения, выносимые на защиту:

1. Слышимый звук в диапазоне 370 Гц, 100 дБ вызывает обратимое повышение проницаемости ГЭБ у мышей.
2. Звуко-зависимое открытие ГЭБ является эффективным для проникновения липосом в ткани мозга.

3. GM₁-липосомы более эффективно проходят ГЭБ у мышей по сравнению с PI-липосомами.
4. Размер щели между эндотелиацитами определяет стабильность липосом при их прохождении ГЭБ. Чем уже зазор между эндотелиацитами, тем менее стабильны липосомы.

Структура магистерской работы. Выпускная квалификационная работа состоит из пяти частей: введения, основной части, заключения, выводов и списка использованных источников. Основная часть включает в себя три раздела: обзор литературы, материалы и методы и результаты исследования. Раздел обзор литературы состоит из двух подразделов: изменение проницаемости гематоэнцефалического барьера при различных физиологических состояниях организма; липосомы как способ доставки лекарственных средств. Раздел материалы и методы представлен описанием исследуемых объектов и условий проведения эксперимента.

Основное содержание работы. Для изучения проницаемости ГЭБ, использовали липосомы, как транспортные системы, которые были синтезированы в Московской Лаборатории Биотехнологии РАН.

Было сконструировано два типа флуоресцентно-меченых липосом на базе матрицы из фосфатидилхолина яичного желтка (ePC). Один тип содержал 10 мол. % фосфатидилинозита (PI) из *S. cerevisiae*(PI-липосомы), другой – такое же количество ганглиозида GM₁ из мозга быка (GM₁-липосомы).

Дальнейшим этапом исследования был разработан *неинвазивный метод обратимого повышения проницаемости ГЭБ*. Метод основан на применении прерывистого слышимого звука в течение 2-х часов по специальному алгоритму: 10 сек. звук 60 сек. перерыв. (370 Гц, 100 дБ). Применение данного метода высокоэффективно для прохождения липосом через ГЭБ в течение часа.

Для изучения проницаемости ГЭБ для двух типов флуоресцентно меченых липосом, использовали *метод конфокальной микроскопии*. Для этого мышам контрольной и опытной группе вводилась в левую сонную артерию суспензия липосом в объеме 0.2 мл, через 2 минуты после введения суспензии

флуоресцентных липосом животных декапитировали, аккуратно извлекали мозг и помещали в 10% раствор забуференного формалина.

Срезы мозга (50 мкм) получали на вибротоме (Leica Микросистема 1000-X VT, Германия). Делали 8-12 срезов с одного мозга для анализа на конфокальном микроскопе.

Для качественной оценки проницаемости ГЭБ были использованы маркеры структурных элементов ГЭБ: SMI (маркер эндотелиальных сосудов ГЭБ) [2], GFAP (маркер астроцитов) [3], Laminin (маркер базальной мембраны сосудов мозга) [4].

Далее образцы мозга исследовались на конфокальном микроскопе серии Leica TCS SP8 X, Германия, для этого задавалась определенная длина волны (с максимум поглощения и максимум испускания красителя). Для флуоресцентно меченых GM₁-липосом и PI-липосом (поглощение 497 нм, испускание 504 нм) использовалась длина волны 490-510 нм.

Для того чтобы понять насколько устойчивы липосомы, когда проходят через ГЭБ, использовали метод компьютерного моделирования. Для компьютерного моделирования процесса проникновения липосом в мозг были проведены следующие работы. Были построены атомно-молекулярные модели липосом, биологической мембраны и межклеточной щели.

Для этого был применен метод крупнозернистого моделирования MARTINI. Модель липосомы построена из липидных (DPPC) и холестерольных (CHOL) молекул в процентном соотношении 60/40. Диаметр липосомы - 28 нм. Внутренняя полость может оставаться пустой или заполненной водой/водным раствором необходимого лекарства. Равновесная конфигурация липосомы достигается минимизацией ее полной энергии. Биологическая мембрана моделируется липидным бислоем, состав, которого идентичен составу липосомы. Щель между двумя клетками представляется двумя мембранами с различным зазором между ними (20-40 нм). Все компьютерные манипуляции осуществлялись с помощью программных пакетов GROMACS и

KVAZAR при температуре 305-310 К. Все процессы моделировались в течение 10-20 нсек.

Результаты исследования. В качестве развития новых методов доставки фармакологических препаратов в мозг нами было сконструировано два типа флуоресцентно-меченых липосом на базе матрицы из фосфатидилхолина яичного желтка (ePC): PI-липосомы, содержащие 10 мол.% фосфатидилинозита из *S. Cerevisiae*; GM₁-липосомы, включающие такое же количество ганглиозида GM₁ из мозга быка.

В экспериментах *in vivo* было установлено, что липосомы двух видов, введенные внутривенно, обнаруживаются в сосудах мозга в течение 1 часа, однако, в обычных условиях липосомы не проходят через ГЭБ (рисунок 1,3,5). Под влиянием звука (неинвазивный метод обратимого повышения проницаемости ГЭБ), липосомы обнаруживаются за пределами сосудов мозга и диффундируют в его тканях. GM₁-липосомы (рисунок 2,4,6) по сравнению с PI-липосомами более эффективны для целей переноса препаратов через ГЭБ в ткани мозга. Для качественной оценки проницаемости ГЭБ были использованы маркеры структурных элементов ГЭБ. Первый маркер SMI (рисунок 1Б), подкрашивает эндотелиальные клетки ГЭБ. С помощью конфокальной микроскопии на рисунке 1В маркер SMI показывает, что липосомы находятся внутри церебральных сосудов. Под действием звука проницаемость ГЭБ увеличилась и липосомы вышли за пределы сосудов мозга (рисунок 2В).

Второй маркер GFAP, который был использован, подкрашивал астроциты ГЭБ (рисунок 3Б). На рисунке 3В маркер GFAP показывает, что липосомы находятся внутри церебральных сосудов. Под действием звука проницаемость ГЭБ увеличилась и липосомы вышли за пределы сосудов мозга (рисунок 4В).

Последний маркер - Laminin маркер базальной мембраны сосудов головного мозга (рисунок 5Б). На рисунке 5В маркер Laminin показывает, что липосомы находятся внутри церебральных сосудов. Под воздействием звука проницаемость ГЭБ увеличилась и липосомы находятся как внутри, так и за пределами церебральных сосудов (рисунок 6В).

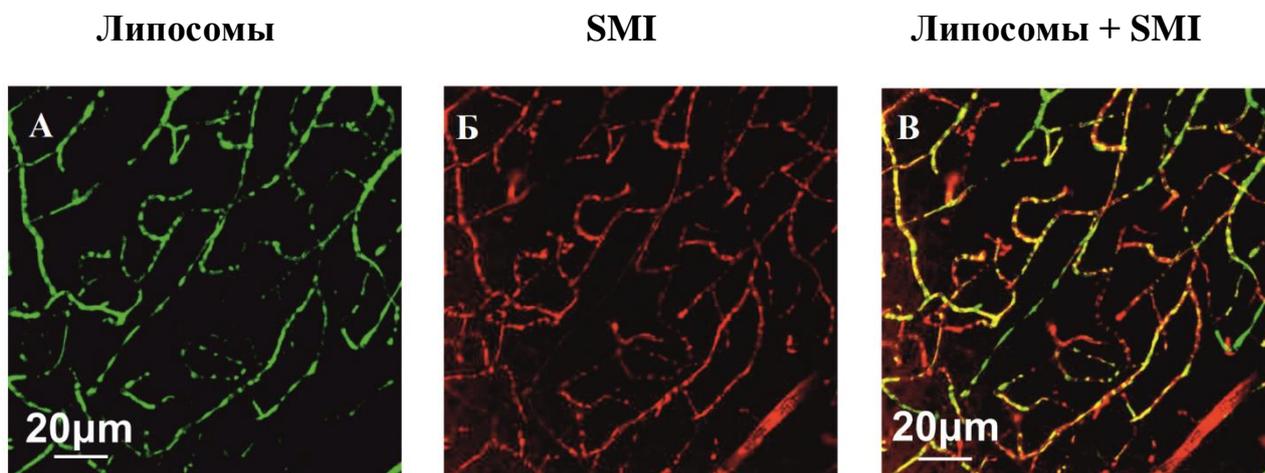


Рисунок 1 - GM₁-липосомы в мозговой ткани без звукового воздействия (контроль), липосомы находятся внутри церебральных сосудов. А – липосомы внутри церебральных сосудов; Б - маркер структурных элементов ГЭБ, красным цветом помечены эндотелиациты сосудов мозга (SMI); В – совмещенная фотография А и Б.

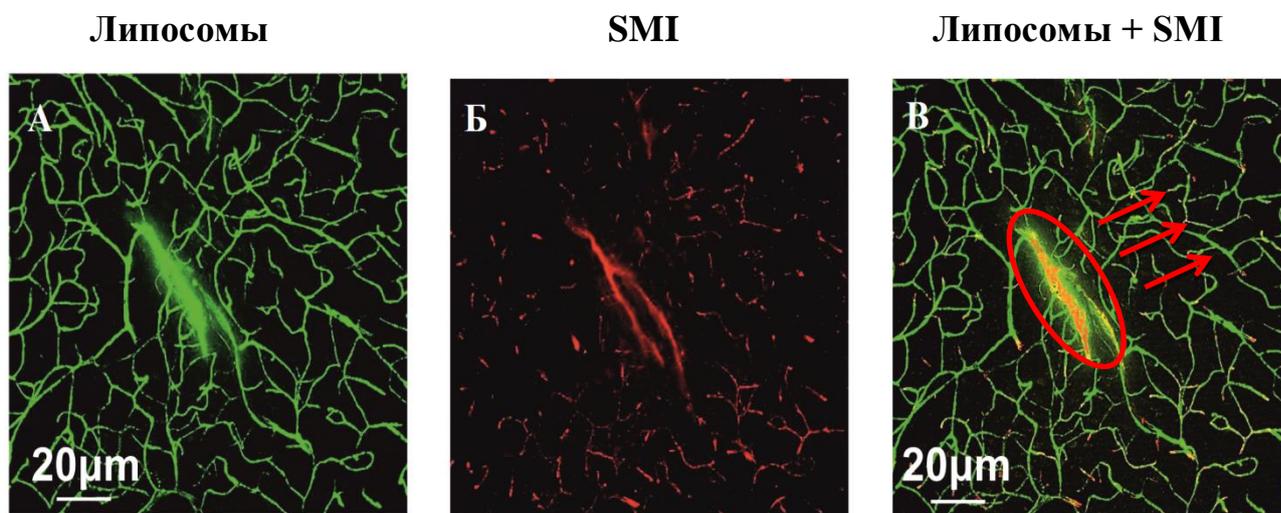


Рисунок 2 - Экстравазация липосом GM₁ через ГЭБ под влиянием звука. А – липосомы как внутри сосудов мозга, так и за их пределами; Б - маркер структурных элементов ГЭБ, красным цветом помечены эндотелиациты сосудов мозга (SMI); В – совмещенная фотография А и Б. Красные стрелки показывают движения липосом из церебральных сосудов в окружающие ткани мозга.

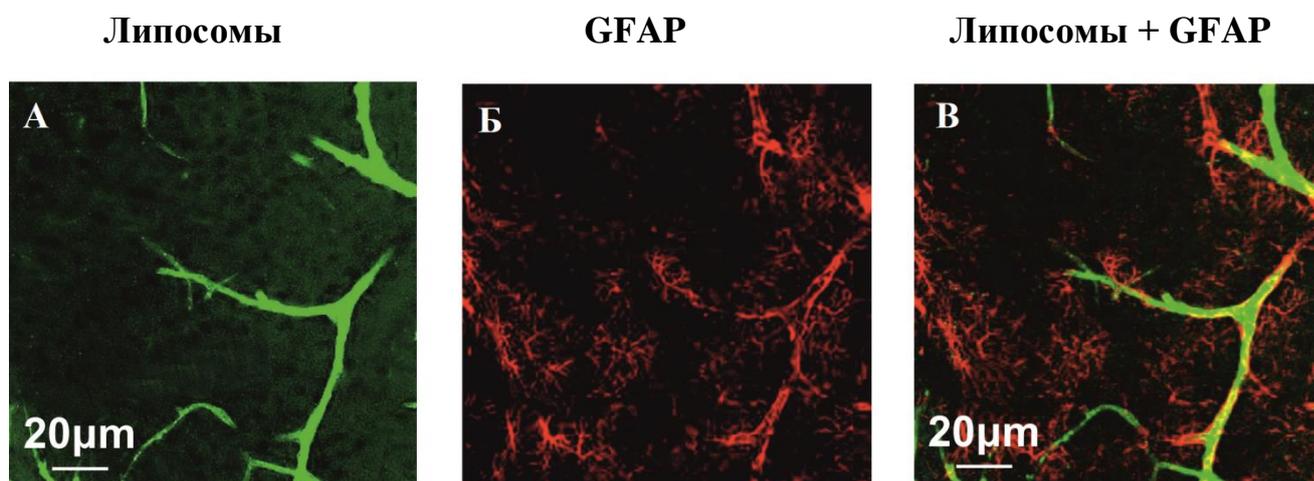


Рисунок 3 - GM1-липосомы в мозговой ткани без звукового воздействия (контроль), липосомы находятся внутри церебральных сосудов. А – липосомы внутри церебральных сосудов; Б - маркер структурных элементов ГЭБ, красным цветом помечены астроциты сосудов мозга (GFAP); В – совмещенная фотография А и Б.

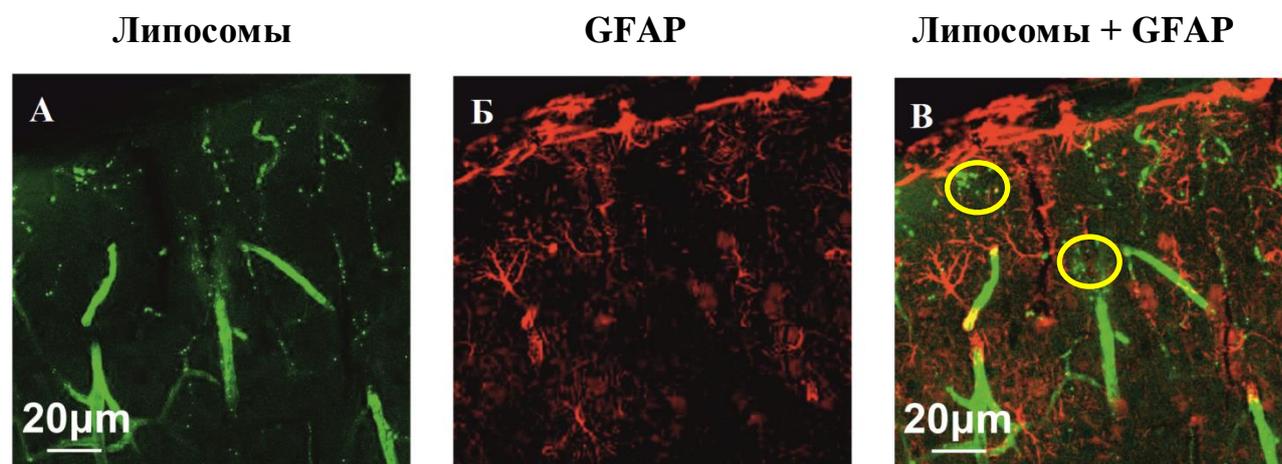


Рисунок 4 - Экстравазация липосом GM1 через ГЭБ под влиянием звука. А – липосомы как внутри сосудов мозга, так и за их пределами; Б - маркер структурных элементов ГЭБ, красным цветом помечены астроциты сосудов мозга (GFAP); В – совмещенная фотография А и Б. Кружками обозначен выход липосом из церебральных сосудов в окружающие ткани мозга.

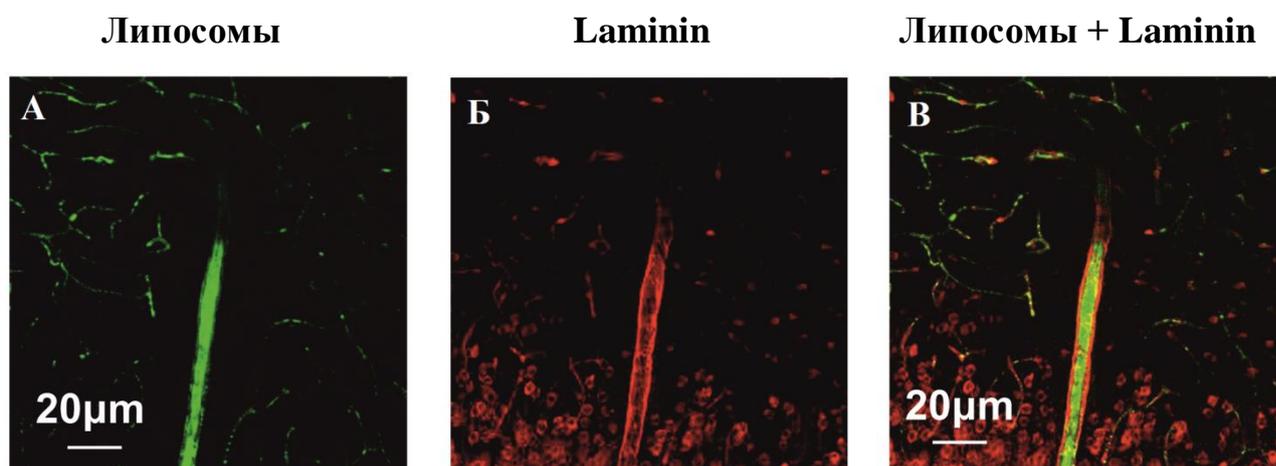


Рисунок 5 - GM1-липосомы в мозговой ткани без звукового воздействия (контроль), липосомы находятся внутри церебральных сосудов. А – липосомы внутри церебральных сосудов; Б - маркер структурных элементов ГЭБ, красным цветом помечены астроциты сосудов мозга (GFAP); В – совмещенная фотография А и Б.

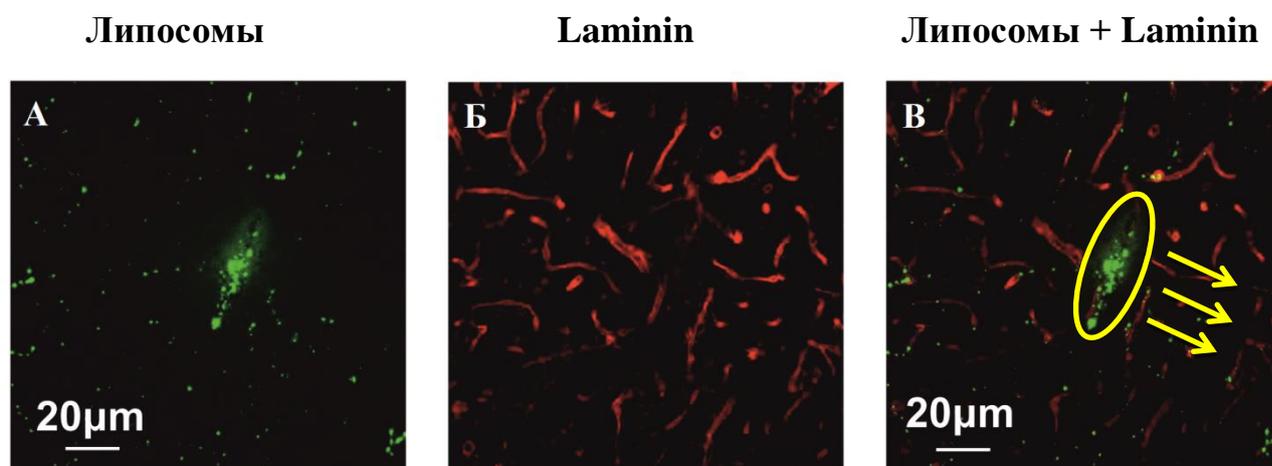


Рисунок 6 - Экстравазация липосом GM1 через ГЭБ под влиянием звука. А – липосомы как внутри сосудов мозга, так и за их пределами; Б - маркер структурных элементов ГЭБ, красным цветом помечены астроциты сосудов мозга (GFAP); В – совмещенная фотография А и Б. Желтые стрелки показывают движения липосом из церебральных сосудов в окружающие ткани мозга.

Была проведена серия численных экспериментов по изучению транспорта лекарства, содержащегося в липосоме, сквозь мембрану клетки. Скорость липосомы варьировалась в пределах 0.89 - 1.07 м/с, также рассматривались различные случаи угла падения на поверхность мембраны. Поскольку процесс контакта липосомы с мембраной можно в большинстве случаев охарактеризовать как роллинг, углы рассматривались в промежутке от 0 до 20 градусов. Исследовали фрагменты процесса роллинга липосомы, движущейся с минимальной скоростью 0.89 м/с под углом 10 градусов. При таком движении лекарство остается снаружи мембраны (рисунок 7).

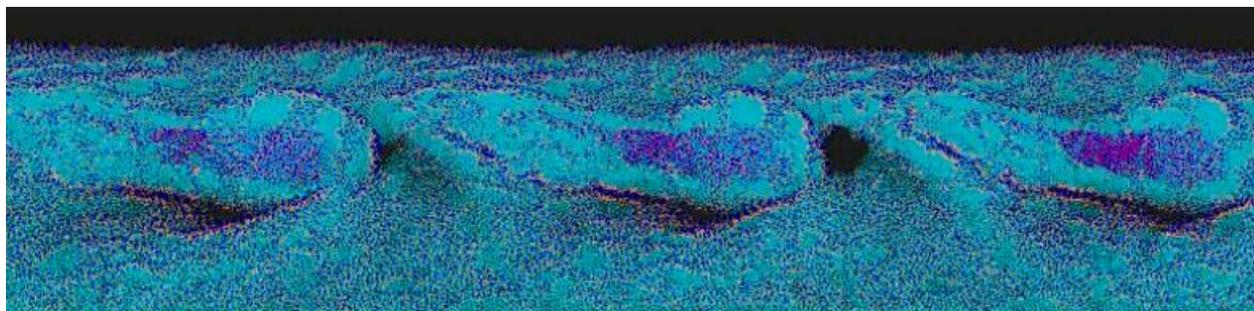


Рисунок 7 - Роллинг липосомы по поверхности мембраны при скорости 0.89 м/с, под углом к поверхности 10 градусов

Проведена серия численных экспериментов по изучению транспорта липосомы сквозь межклеточные щели. На рисунке 8 представлены изображения, полученные в четыре разных момента времени, когда липососома только входит в щелевое пространство со скоростью 0.87 м/с и далее проникает между клетками. Скорости варьировались в пределах 0.87 - 1.07 м/с. Зазор между мембранами клеток рассматривался равным диаметру липосомы, менее его и более. На рисунке 8 видны два фрагмента мембран клеток, которые незначительно, но, тем не менее, заметно, деформируются при контакте с липосомой.

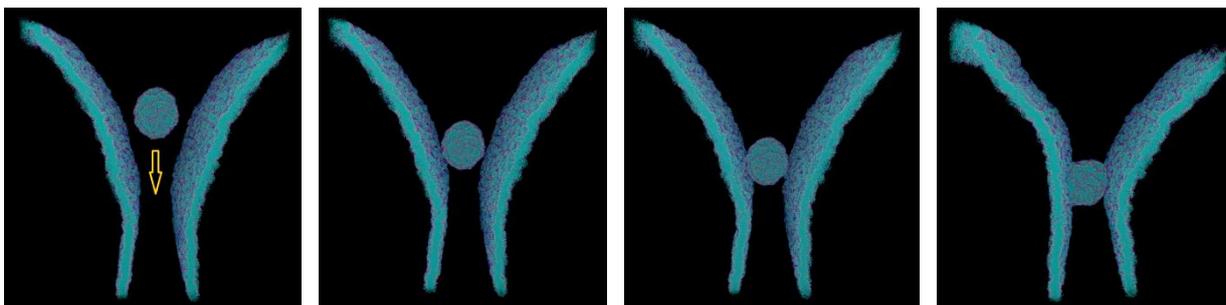


Рисунок 8 - Процесс проникновения липосомы в щель между двумя клетками.

По результатам моделирования определены оптимальные пути (с точки зрения энергии) проникновения липосомы сквозь биомембрану и сквозь межклеточное пространство. Липосома может доставлять лекарство непосредственно сквозь мембрану при определенных условиях: при максимальной скорости 1.07 м/с и малом угле падения на мембрану, равном 10 градусам, либо при меньших скоростях, но больших углах падения. Липосома может доставлять лекарство сквозь щели между клетками, когда размер щели превышает диаметр липосомы, так как в других случаях липосома залипает на стенки клетки.

Заключение. Известно, что ГЭБ имеет избирательную проницаемость для различных веществ, в том числе и для лекарственных средств. Одним из современных решений этой проблемы, является разработка липосом - наноразмерных транспортных систем, выступающие как контейнеры для лекарств к органу-мишени. Липосомальные системы доставки постоянно развиваются. Такие свойства липосом, как биосовместимость, защита включенных веществ от захвата клетками ретикулоэндотелиальной системы, способность доставлять вещества в цитоплазму клетки-мишени, делают их привлекательным для использования в медицине. Именно поэтому в нашем исследовании выбрали липосомы в качестве транспортных систем.

В ходе исследования было изучено два типа флуоресцентных липосом, которые проходили в мозговую ткань, преодолевая ГЭБ. Однако GM1-липосомы, по сравнению с PI-липосомами оказались более эффективны, и

проходили в большем количестве. Липосомы достаточно не стабильны при прохождении ГЭБ. Липосома может доставлять лекарство сквозь щели между клетками, когда размер щели превышает диаметр липосомы, так как в других случаях липосома залипает на стенки клетки.

Список использованных источников

1. Khalin, I. Nanoscale drug delivery systems and the blood–brain barrier / I. Khalin [et al.] // International Journal of Nanomedicine. 2014. Vol. 9, №1. P. 795-811.
1. Gabizon, A. Liposome formulations with prolonged circulation time in blood and enhanced up take by tumors / A. Gabizon // Proc. Natl. Acad. Sci. US A. Vol. 85, №18. 1988. P. 6949–6953.
2. Hallmann, R. Novel mouse endothelial cell surface marker is suppressed during differentiation of the blood brain barrier / R. Hallmann [et al.] // Dev. Dyn. 1995. Vol. 202, №4. P. 325–332.
3. Моргун, А.В. Структурная и функциональная гетерогенность астроцитов головного мозга / А.В. Моргун [и др.] // Бюллетень сибирской медицины. 2014. Т. 13, №5. С. 138-148.
4. Чехонин, В.П. Фундаментальные и прикладные аспекты изучения гематоэнцефалического барьера / В.П. Чехонин [и др.] // Вестник РАМН. 2012. Т. 67, № 8. С. 13.