

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

**ИЗУЧЕНИЕ ПРОНИЦАЕМОСТИ ГЕМАТОЭНЦЕФАЛИЧЕСКОГО
БАРЬЕРА К GM1-ЛИПОСОМАМ**

АВТОРЕФЕРАТ ДИПЛОМНОЙ РАБОТЫ

студентки 5 курса 531 группы

специальность 06.05.01

Биоинженерия и биоинформатика

биологического факультета

Башкировой Елены Валерьевны

Научный руководитель

Доцент кафедры физиологии человека

и животных, к. б. н., доцент




28.05.2018
подпись, дата

Е.Ю.Лыкова

Зав. кафедрой физиологии

человека и животных,

д. б. н., доцент



28.05.2018
подпись, дата

О.В. Семячкина-Глушковская

Саратов 2018

Введение: Гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) представляет собой высокоселективный мембранный барьер, который локализуется на эндотелиальных клетках и контролирует транспорт питательных веществ и других необходимых компонентов из крови в паренхиму мозга.

ГЭБ играет жизненно важную роль для здоровья центральной нервной системы (ЦНС), защищая мозг от патогенных микроорганизмов. Хотя этот защитный механизм необходим для осуществления нормальных функций ЦНС, он также создает препятствие для поступления лекарств в мозг. Из 7000 лекарств, которые зарегистрированы в базе данных комплексной медицинской химии, только 5% могут лечить неврологические заболевания из-за того, что примерно 100% крупных молекул (антитела, рекомбинантные белки, генные терапевтические средства) не пересекают ГЭБ.

ГЭБ получил значительное внимание со стороны исследований во всем мире за последние четыре десятилетия. В течение первых 100 лет изучения ГЭБ (1880–1980 гг.) установили анатомическую структуру и физиологию ГЭБ. Следующие 30 лет были сосредоточены на понимании механизмов, лежащих в основе явления ГЭБ. В настоящее время эра развития новых методов повышения проницаемости ГЭБ с целью доставки лекарственных препаратов в мозг. Существует более 70 различных методов для преодоления ГЭБ, включая физические, химические и биологические подходы. Однако, ни один из этих методов не применяется в медицинской практике из-за инвазивности (фотодинамическое повышение проницаемости ГЭБ через открытый череп), невозможности достичь необходимой терапевтической дозы препаратов в мозг (интраназальные методы), малой области воздействия (1–3 мм) и необходимости дополнительного введения микрокапсул с газом (фокусный ультразвук).

Применение сильного звука (100 дБ, 370 Гц) может явиться перспективным способом доставки препаратов в мозг, поскольку данный диапазон звука встречается в повседневной жизни, например, при работе

кухонного комбайна, при прослушивании музыки в MP3 плеерах, на рок концертах.

Использование наносистем, в первую очередь коллоидных носителей, таких как липосомы, способных доставлять лекарственные препараты и макромолекулы в мозг, представляют собой развитие неинвазивных методов пересечения ГЭБ. Липосомы известны своей биоразлагаемостью, биосовместимостью и гибкостью в структуре. Они имеют уникальную фосфолипидную двухслойную структуру (аналогичную физиологической мембране), что делает их более совместимыми со структурными компонентами ГЭБ и помогает препарату проникать в мозг.

Для лучшего понимания механизмов, ответственных за проникновение липосом через ГЭБ, используется 3D молекулярный метод моделирования как информативный инструмент для анализа проницаемости ГЭБ для липосом.

Целью исследований явилось изучение проницаемости ГЭБ под воздействием звука (100 дБ, 370 Гц) к GM1-липосомам в качестве потенциальной транспортной системы с использованием звука.

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

- 1) Проведение подтверждающих тестов на повышение проницаемости ГЭБ в условиях действия звука с применением красителя Evans Blue и декстрана 70 кДа у мышей, а также конфокальной микроскопии;
- 2) Исследование проницаемости ГЭБ для флуоресцентных GM1-липосом с применением конфокальной и двухфотонной микроскопии у мышей;
- 3) Применение метода молекулярного моделирования для анализа механизмов проникновения липосом через эндотелий ГЭБ.

Структура дипломной работы. Дипломная 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, результаты исследования. Раздел обзор литературы состоит из четырех подразделов: структура гематоэнцефалического барьера, проницаемость гематоэнцефалического барьера, доставка

лекарственных препаратов коллоидными наносистемами, применение липосом в качестве транспортных систем для доставки препаратов в ткани мозга. Раздел материалы и методы представлен двумя подразделами: объекты исследования и методы исследования. Подраздел методы исследования включает в себя семь пунктов: спектрофлуориметрический анализ экстравазации EBd, конфокальная микроскопия, двухфотонная лазерная сканирующая микроскопия, обработка изображений с использованием системы Prairie View Ultima, метод изучения проницаемости ГЭБ с помощью флуоресцентных GM1-липосом, метод молекулярного моделирования, статистическая обработка данных. Раздел результаты исследования представляет собой описание полученных результатов в ходе исследования и содержит пять подразделов: анализ экстравазации альбуминового комплекса EBd с помощью спектрофлуориметрического анализа, изучение проницаемости ГЭБ для декстрана с помощью конфокальной микроскопии, изучение проницаемости ГЭБ для GM1 – липосом с помощью конфокальной микроскопии, изучение проницаемости ГЭБ для GM1 – липосом с помощью двухфотонной лазерной сканирующей микроскопии, молекулярное моделирование.

Объектом исследования служили взрослые самцы белых беспородных мышей. Для каждого исследования были выделены 4 группы:

1. Контрольная (не подвергавшаяся воздействию звука) (n=10);
2. Через 1 час после воздействия звука (n=10);
3. Через 4 часа после звукового воздействия (n=10);
4. Через 24 часа после звукового воздействия (n=10).

Все экспериментальные процедуры проводились в соответствии с «Руководством по уходу и использованию лабораторных животных». Мышей содержали при $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 55% влажности и 12/12 часовом цикле свет / темнота.

Основное содержание работы. На первом этапе работы определили экстравазацию альбумина в ткани головного мозга с использованием красителя Evans Blue (EBd), который является классическим инертным индикатором для изучения проницаемости сосудов для крупных молекул. EBd – краситель с

молекулярной массой 961Да, который связывается с альбуминами плазмы крови, в силу чего масса его альбуминового комплекса достигает 68,5 кДа. Поэтому Evans Blue введенный внутривенно, не может пройти через ГЭБ в нормальном состоянии, но при этом достаточно легко может пройти через ГЭБ, после звукового воздействия.

Концентрация EVd в интактном мозге была около нуля ($0,37 \pm 0,02$ мкг / г ткани). Это минимальное количество красителя в неповрежденном мозге можно объяснить небольшим количеством красителя, который может оставаться на стенках сосудов головного мозга после процедуры перфузии физиологическим раствором. Концентрация EVd в тканях мозга была увеличена после звукового воздействия у каждой мыши. Так, через 1 час после воздействия звука наблюдалось 22,8–кратное увеличение уровня EVd в тканях мозга ($9,3 \pm 0,92$ существенно выше $0,37 \pm 0,02$ мкг / г ткани), ($p < 0,05$). Через 4 часа и 24 часа после звукового воздействия проницаемость ГЭБ для EVd полностью нормализовалась, и экстравазация красителя в мозг была аналогична нормальному состоянию ($0,58 \pm 0,02$, мкг / г ткани и $0,49 \pm 0,03$ мкг / г ткани соответственно).

Высокий уровень EVd в крови через 24 часа после инъекции может объяснить тот факт, что этот краситель выводится из организма путем фагоцитоза макрофагами, что занимает длительный период времени. Поэтому 30–50% исходного уровня EVd–меченого альбумина остается в плазме через 24 часа после инъекции красителя.

Флуоресцеин–родамин (FITC) –декстран 70 кДа использовался в качестве дополнительного маркера для характеристики проницаемости ГЭБ для высокомолекулярных молекулярных веществ. Для декстрана было выбрано короткое время циркуляции (2 мин), потому он быстро выводится почками из крови. Это также было основанием для выбора высокой молекулярной массы FITC–декстрана 70 кДа, поскольку декстран с молекулярным весом > 50 кДа имеет значительно меньшую клубочковую фильтрацию.

Конфокальная микроскопия выявила накопление FITC–декстрана в тканях мозга через 1 час после звукового воздействия. Экстравазация FITC–декстрана определялась как флуоресцентный сигнал, обнаруженный за пределами стенок сосудов в виде ярко–красных облаков, связанных с группой капилляров как показано на рисунке 6. Необходимо отметить, что через 4 часа и 24 часа после звука проницаемость ГЭБ восстанавливалась и не наблюдалась экстравазация декстрана.

Таким образом, опыты с введением EVd и декстрана подтвердили обратимое повышение проницаемости ГЭБ для высокомолекулярных соединений под воздействием звука.

На следующем этапе исследований проводили анализ проницаемости ГЭБ к GM1–липосомам 100 нм в качестве перспективных наноматериалов для доставки лекарств в головной мозг и терапии заболеваний центральной нервной системы.

Экстравазация GM1 – липосом в ткани мозга наблюдалась через 1 час после звука. В контрольной группе, а также через 4 часа и 24 часа после звукового воздействия ГЭБ был непроницаем для GM1–липосом.

В опытах *in vivo* с применением 2PLSM были подтверждены вышеприведенные данные *ex vivo* о том, что под воздействием звука ГЭБ открывается для GM1–липосом.

Экстравазацию липосом оценивали количественно. Так, флуоресцентный сигнал вокруг сосудов мозга увеличился до $15,9 \pm 2,2$ % через 1 час ($p < 0,01$), но уже составил $5,4 \pm 1,1$ % через 4 часа после звукового воздействия и соответствовал $3,4 \pm 0,8$ % через 24 часа после звукового воздействия по сравнению с интактным мозгом ($2,2 \pm 0,8$ %).

В целом, применение конфокальной (*ex vivo*) и двухфотонной (*in vivo*) микроскопии показали эффективность применения звука для обратимого повышения проницаемости ГЭБ к GM1–липосомам.

Для понимания механизмов прохождения через ГЭБ липосом на следующем этапе исследования применяли метод молекулярного моделирования.

Для трехмерного молекулярного моделирования липосом использовали модели с диаметром 20 нм, представленные молекулами холестерина (CHOL) и DPPC (Dipalmitoylphosphatidylcholine). В этом случае крупнозернистая (CG) модель MARTINI версии 2.2, реализованная в Gromacs 5.0.7 и пакетах KVAZAR, является эффективным методом для большинства экспериментов, в которых рассматривали липосому с диаметром 20 нм.

Липосома была смоделирована в виде сферы, образованной фосфолипидным бислоем. Бислоем включает 2240 CG-молекул DPPC и 642 CG-молекул холестерина, т. е. состоит из 34584 зерна. Капля воды внутри липосомы имитирует лекарство, которое переносится липосомой. Эта капля воды образована 3000 зернами воды. Каждое зерно содержит 4 молекулы, поэтому в целом капля образована 12000 молекулами H_2O . Диаметр водяной капли равен 10.6 нм. Толщина двухслойной оболочки липосомы составляет 10 нм. В целом, крупнозернистая модель липосомы включает всего 37584 зерна. Равновесная структура липосомы была получена при нормальном давлении и температуре 310 К.

Модель мембраны эндотелиальных клеток была построена как фрагмент фосфолипидного бислоя молекул DPPC. Для имитации контактов липосомы с мембраной эндотелиальных клеток создали периодический квадрат размером 50×50 нм и векторами трансляции в направлениях X и Y. Бислоем включал 8450 молекул DPPC; его CG-модель включала 101400 зерен. Толщина слоя составляет 5–5,5 нм. Равновесная структура мембраны образуется при нормальном давлении и температуре 310 К.

Характер движения липосом в теменном потоке плазмы можно сравнить с движением броуновской частицы. Поэтому липосома, движущаяся в потоке, неизбежно переходит в стенку сосуда. Величина смещения в плоскости, перпендикулярной направлению потока, может быть определена с

использованием уравнения Стокса–Эйнштейна. Из этого уравнения следует, что квадрат смещения L в интервале времени t вычисляется по формуле:

$$\langle L \rangle^2 = 4k_B T t / 3\pi d \eta$$

где d – диаметр частицы;

η – коэффициент вязкости среды;

t – время во время наблюдаемое смещение частицы;

k_B – постоянная Больцмана;

T – абсолютная величина температуры среды.

Для липосомы диаметром ~ 20 нм смещение за 1 с составляет 8,7 мкм. Следует отметить, что значение L уменьшается с увеличением диаметра липосомы. Таким образом, значение $L = 3,9$ мкм при тех же условиях, но при $d = 100$ нм. Эти данные свидетельствуют о том, что липосома всегда будет смещаться к стенкам сосуда и сталкиваться с эндотелиальными клетками. Основываясь на результатах численного эксперимента, было обнаружено, что «прилипание» липосомы будет происходить при контакте с клеточной мембраной независимо от скорости движения липосом. Под «прилипанием» подразумевается такое взаимодействие липосома–мембрана, в результате которого липосома больше не может покинуть мембрану.

При исследовании выявили, что распределение полярных фосфолипидных голов липосомы и мембран начинает резко меняться при их сплайсинге. В начальный момент и до контакта с поверхностью бислоя, распределение гидрофобной части бислоя почти идеально (моментальный снимок в 0 нс). Когда липосома контактирует с мембраной, распределение гидрофобной части резко меняется уже в первые наносекунды. В последующие десятки наносекунд поверхность мембраны выглядит нарушенной. Это связано с естественной реакцией равновесной структуры мембраны на внешнее действие липосомы. Затем структура мембраны сглаживается постепенно. Можно сказать, что липосома притягивается мембраной до этого момента, о чем свидетельствует уменьшение vdW–энергии. Кроме того, в этом случае наблюдается также электростатическое притяжение, в также происходит

длительный период расслабления комплекса липосомы–мембраны. Этот период сопровождается уменьшением потенциальной энергии и энергии ван–дер–ваальсового взаимодействия. В этот период липосома почти погружена в мембранный слой, поэтому vdW–энергия и Р–энергия уменьшаются. Это указывает на то, что процесс сплайсинга проходит с минимальными затратами энергии.

Таким образом, энергетически выгодным путем для прохождения липосом через эндотелий является трансцитоз, что также согласуется с данными других исследований

Заключение. ГЭБ является непреодолимой преградой отделяющей центральную нервную систему от общей внутренней среды. Непроницаемость его относительна и зависит в значительной степени от количества и концентрации находящихся в крови веществ, от состояния организма, от длительности пребывания вещества в организме, от внешних воздействий и ряда других причин. Анатомические элементы, из которых складывается структура барьера, не только защищают мозг, но и регулируют его жизнедеятельность, питание, выведение продуктов обмена веществ и т.п.

Несмотря на то, что множество исследований по реализации направленного транспорта через ГЭБ были успешными, многие задачи не нашли решения. Поэтому дальнейшее исследование ГЭБ и способов направленного транспорта сохраняют свою актуальность.

Исследования проницаемости ГЭБ для высокомолекулярных веществ при помощи конфокальной микроскопии показали, что через 1 час после звукового воздействия, отмечалось выраженное диффундирование флуоресцентного декстрана (70 кДа) за пределы сосудов в паренхиму мозга, через 4 и 24 часа после звукового воздействия наблюдалась нормализация работы ГЭБ. Это показывает, что данный метод позволяет временно повысить проницаемость ГЭБ.

Результаты конфокальной микроскопии, подтверждались спектрофлуориметрическим методом. Повышенное накопление в тканях мозга

красителя, связанного с альбумином крови (68 кДа), было зафиксировано через 1 час после звукового воздействия. Через 4 часа и 24 часа после воздействия звука, концентрация Evans Blue в тканях мозга приходила в норму. Спектрофлуориметрия еще раз подтверждает, что данный метод открытия барьера с помощью звукового воздействия, имеет временный характер.

Мы провели анализ проницаемости ГЭБ к GM1–липосомам 100 нм в качестве перспективных наноматериалов для доставки лекарств в головной мозг.

Данные конфокальной и 2PLSM показывают экстравазацию GM1–липосом (100 нм) из мозговых капилляров в паренхиму головного мозга через 1 час после воздействия звуком, когда проницаемость ГЭБ значительна.

Проведены *in silico* исследования закономерности взаимодействия липосом малого диаметра с мембраной эндотелиальной клетки при движении в щелевом пространстве между клетками.

Для понимания механизмов прохождения липосом через ГЭБ применяли метод молекулярного моделирования. Используя метод молекулярного моделирования, установили, что трансцитоз является энергетически выгодным путем для прохождения липосом через эндотелий.

Для трехмерного молекулярного моделирования проникновения липосом через эндотелий использовали модели липосомы, представленные молекулами холестерина и DPPC (Dipalmitoylphosphatidylcholine). Крупнозернистая (CG) модель MARTINI версия 2.2, реализованная в пакете Gromacs 5.0.7, использовалась для реализации большого числа экспериментов.

Практическая значимость полученных результатов заключается в том, что данный материал в дальнейшем можно использовать для разработки эффективного способа доставки лекарственных препаратов в мозг.

Выводы: 1) Альбуминовый комплекс не проходит через гематоэнцефалический барьер. Экстравазация альбуминового комплекса в ткани головного мозга через 1 час после звукового воздействия (100 дБ, 370 Гц) указывает на увеличение проницаемости гематоэнцефалического барьера.

через 4 часа и 24 часа проницаемость гематоэнцефалического барьера приходила в норму.

2) Звуковое воздействие (100 дБ, 370 Гц) вызывает значительное, но обратимое открывание гематоэнцефалического барьера, что было установлено с использованием инъекции и визуализации Evans Blue и декстрана.

3) Экстравазацию GM1-липосом (100 нм) из мозговых капилляров в паренхиму головного мозга через 1 час после воздействия звука (когда проницаемость гематоэнцефалического барьера значительна), подтверждают данные конфокальной (*ex vivo*) и двухфотонной (*in vivo*) микроскопии.

4) Трансцитоз является энергетически выгодным путем для прохождения липосом через эндотелий, что подтверждает метод молекулярного моделирования.