

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра физиологии человека и животных

**ПОДАВЛЕНИЕ РОСТА ГЛИОМЫ ПУТЕМ ПРЯМОЙ ЛАЗЕРНОЙ
ГЕНЕРАЦИИ СИНГЛЕТНОГО КИСЛОРОДА**

АВТОРЕФЕРАТ

Студентки 4 курса 421 группы
Направление подготовки бакалавриата 06.03.01 Биология
Биологического факультета
Буслаевой Юлии Александровны

Научный руководитель
доцент, к. б. н.



Е.И. Саранцева

Зав. кафедрой
доцент, д.б.н.



О. В. Семячкина-Глушковская

Саратов 2019

ВВЕДЕНИЕ

Сегодня патологические заболевания головного мозга встречаются достаточно часто, что является причиной смерти при наличии опухолей и болезней центральной нервной системы живого организма. Одним из серьезных видов онкологических заболеваний головного мозга является глиома. Это первичная опухоль, возникающая из глиальных клеток, которые составляют опорное вещество центральной нервной системы. Глиома быстро распространяется и может колонизировать весь мозг, так как опухолевые клетки довольно быстро распространяются далеко за пределы основной массы опухоли.

Глиомы являются летальными формами опухолей головного мозга, которые составляют примерно 30% всех новообразований.

Средняя продолжительность жизни пациентов с момента постановки диагноза составляет всего 15 месяцев, и менее 5% пациентов живут дольше 5 лет из-за 80% рецидива агрессивной формы глиомы. Высокая частота рецидивов, плохая реакция на лечение и низкие показатели продолжительности жизни делают злокачественную глиому наиболее опасным новообразованием.

Образование глиомы характеризуется высокой плотностью микрососудов, в которых выявляется масса дефектов, аномальная морфология и нарушение проницаемости гематоэнцефалического барьера (ГЭБ).

Борьба со злокачественными новообразованиями продолжает оставаться одной из приоритетных задач в медицине. Прогнозы ВОЗ за 1999-2020 гг. показывают, что заболеваемость и смертность от онкологических заболеваний во всем мире возрастет в 2 раза, поэтому разработка и внедрение новых, высокотехнологичных методов ранней диагностики и лечения рака является актуальной проблемой современной медицины. Одними из таких методов являются фотодинамическая терапия (ФДТ).

Методы лечения с использованием ФДТ остаются сегодня мало изучены (авторы, которые занимались ФТ).

Целью данной работы было изучить эффективность подавление роста глиомы головного мозга у крыс путем прямой лазерной генерации синглетного кислорода.

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

1. Смоделировать заболевание глиомой C6 у крыс
2. Оценить эффективность использования в работе маркера апоптоза ВАХ на крысах с глиомой C6.
3. Оценить эффективность использования в работе маркера аутофагии LC3b на крысах с глиомой C6.
4. Оценить эффективность использования в работе маркера пролиферации Ki67 на крысах с глиомой C6.

Основная часть

Опухоли головного мозга - это группа внутричерепных новообразований, которые возникают вследствие неконтролируемого деления клеток ткани мозга, мозговых оболочек, черепно - мозговых нервов, кровеносных сосудов мозга, а так же железистых тканей – гипофиза и эпифиза, или же возникающих в результате метастазирования опухоли, находящейся в другом органе. Такие опухоли могут быть как злокачественными, так и доброкачественными.

Стандартный показатель смертности от опухолей мозговых оболочек, головного и спинного мозга и других частей ЦНС в период с 2000 по 2010 гг. в Российской Федерации непрерывно возрастал с 3,2 до 3,5 на 100 тысяч населения. Общий прирост составил 7% при среднегодовом темпе 0,7%. Причём скорость прироста показателя смертности был выше у лиц мужского пола: с 3,8 до 4,3 на 100 тысяч населения, в среднем на 1% в год. У женщин указанный показатель менялся мало, составив 2,8-3,0 на 100 тысяч населения. Отметим, что прирост смертности был не так велик сравнительно с уровнем прироста заболеваемости (33,1%) за этот период.

Наряду с запоздалой диагностикой и отсутствием специфических диагностических маркеров, высокая пролиферативная активность и выраженная инфильтрация паренхимы мозга опухолевыми клетками в процессе инвазивного роста мультиформной глиобластомы являются главными причинами смерти этой категории больных. Традиционным подходом к лечению глиальных опухолей является хирургическая операция с последующим облучением и химиотерапией.

Когда традиционные способы терапии злокачественных новообразований по тем или иным причинам невыполнимы, выбором могут стать лазерные технологии. Среди них наиболее эффективным является вариант фотодинамическая терапия опухолей.

В основе механизмов ФДТ лежит образование синглетного кислорода, который возникает на короткое время (доли секунд) при переносе энергии квантов света фотосенсибилизаторами на кислород в крови и тканях. Однако,

проникающая способность света при фотодинамическом воздействии на длинах волн 630-670 нм небольшая, всего доли сантиметра, поскольку существуют ограничения по плотности мощности излучения на поверхности ткани. Поскольку, прямое возбуждение синглетного кислорода априори более эффективно, то возникает задача оптимизации доставки лазерного излучения с необходимой плотностью мощности к опухоли, что является одной из приоритетных задач медицины.

Материалы исследования

Эксперименты выполняли на половозрелых беспородных белых самцах крыс в количестве 30 шт, массой 200-300 г в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных». По окончании испытаний животные выводились из эксперимента путем декапитации мозговой коробки. Далее у животных забирался мозг. Далее проводили иммуногистохимическое исследование экспрессии маркеров применением антител к белку LC3B ab48394, активации апоптоза BAX (ab54829) и экспрессия белка Ki-67 (cloneSP6) ab16667. Иммуногистохимические исследования проводили на парафиновых срезах. Использовали систему детекции REVEAL Polyvalent HRP-DAB Detection System с антителами ABCAM в разведении к антителу от 1:50 до 1:100.

Методы исследования

Исследования были выполнены на следующих группах лабораторных животных: 1) контроль, который включает половозрелых здоровых самцов крыс (n=10); 2) крысы с глиомой без лазерной терапии 1268 нм (n=10); 3) крысы с глиомой, которые получали лазерную терапию с (14 по 28 день) развития опухоли с перерывом в 1 день (n=10).

Далее воздействовали лазером LD-1267-FBG-350 длина волны = 1268 нм, осуществляли в течение 1 часа с перерывом в 5 мин. Контроль температуры во

время лазерного воздействия производился при помощи бесконтактного ИК термометра (Pico USB TC-08 thermo 35 couple data logger (USA)).

Следующим этапом были изготовлены гистологические срезы толщиной 50 мкм на вибротоме (Leica VT 1000S Microsystem, Германия) для иммуногистохимического анализа. Гистологические срезы будут оцениваться методом световой микроскопией.

Результаты исследования

На первом этапе наших исследований было выполнено вживление глиомных клеток линии С6. Животным давалось время на адаптационный период 2-3 дня. Гистологические изменения в тканях мозга начинают происходить на 10-14 день после вживления.

Гистологический анализ показал изменение здоровых тканей мозга через 7, 10 и 30 дней после имплантации глиомных клеток в область каудопутамена с помощью стереотаксического аппарата Narishige (Japan) по координатам 2*2 мм с отступом вправо. Ранние стадии глиомы (7 и 10 дней после имплантации) характеризуются появлением скопления клеток атипичной глии, клеточный полиморфизм не проявляется. Прогрессирование глиомы до 30 дней сопровождается увеличением сосудистого компонента, появлением участков некроза, сопровождается клеточным полиморфизмом.

Размер глиомы через 30 дней после имплантации С6 является более значительным, чем через 10 дней после имплантации С6 (средний размер глиомы составлял 7 мм², 4 мм², 3 мм² через 30-10-7 дней после имплантации ГК).

Таким образом, морфологический анализ тканей головного мозга четко демонстрируют значительные изменения в мозге крысы, связанные с прогрессированием глиомы через 7-10-30 дней после имплантации ГК. Следовательно, для следующего исследования поглощения и проникновения лазерных волн различной длины мы выбрали эти временные точки роста глиомы, чтобы сравнить их с гистологическими прогрессирования опухоли.

Иммуногистохимический анализ тканей мозга с применением антител к белку LC3B ab48394, который участвует в формировании аутофагосомальных вакуолей (аутофагосом) показал, что в норме незначительная экспрессия LC3B ab48394 обнаруживается в перинуклеарной области нейронов, при развитии глиомы C6 – выраженная экспрессия белка отмечается в цитоплазме, под воздействием лазера 1268 нм на глиомную опухоль – цитоплазматическая экспрессия маркера аутофагии существенно подавляется. Степень выраженности экспрессии оценивали полуколичественным методом: слабая (+), умеренная (++), выраженная (+++).

Таким образом, развитие глиомы сопровождается усилением процессов аутофагии, о чем свидетельствует выраженная экспрессия белка LC3B ab48394 в цитоплазме, который способствует образованию комплекса аутофаголизосом из аутофагосом и лизосом. Формирование данного комплекса отражает активацию процессов деградации аутофагосом, т.е. утилизацию и переработку компонентов клетки под воздействием лазера с длиной волны 1268 нм.

Для изучения механизма подавления процессов аутофагии под действием лазера, на следующем этапе проводили иммуногистохимическое исследование экспрессии маркера активации апоптоза Вах. ВаХ (ab54829) – ускоряет запрограммированную гибель клеток путем связывания и антагонизма с рецептором апоптоза BCL2 или его аденовирусного гомолога E1B белка 19к.

Результаты исследования показывают, что апоптоз в клетках глиомы слабовыражен, о чем свидетельствует слабая экспрессия ВаХ. Под воздействием лазера 1268 нм выраженность экспрессии белка ВаХ в опухолевых клетках существенно повышается, что свидетельствует о стимулирующих эффектах лазера в отношении развития апоптоза в глиоме.

На третьем этапе наших исследований изучалась пролиферативная активность клеток глиомы под воздействием лазера 1268 нм. С этой целью анализировалась экспрессия белка Ki-67 (cloneSP6) ab16667 как маркера пролиферативной активности. Антитела к антигену Ki-67 реагируют с пролиферирующими (G1, S, M, G2 стадии клеточного цикла), но не с

покоящимися клетками (стадия G0), что позволяет проводить оценку пролиферативной активности в клетках опухоли.

В целом, результаты исследования выявили, что для головного мозга в норме характерна перинуклеарная цитоплазматическая экспрессия маркера образования аутофагосом LC3b и отрицательная экспрессия на маркер апоптоза Вах и пролиферации Ki67. Для глиомы без лазера характерна высокая пролиферативная активность ($37,5 \pm 0,6\%$) с митозами и выраженной экспрессией маркера Ki67 (рисунок 3 Б), цитоплазматическая экспрессия маркера образования аутофагосом LC3b и единичная слабоположительная реакция на маркер апоптоза Вах.

Для глиомы после лазера характерен выраженный патоморфоз, проявляющийся в уменьшение размеров клеток, снижение пролиферативной активности на 37%, увеличение экспрессия маркера апоптоза Вах до 95% и снижение количества клеток экспрессирующих маркер аутофагии Lc3b на 70% (таблица 1).

Таблица 1 - Экспрессия иммуногистохимических маркеров и морфометрические данные по группам контроля, крыс с глиомой до лазерного воздействия и у крыс с глиомой на фоне проведения лазерной терапии

| Группа / Маркер | Контроль, % | Глиома до лазерного воздействия, % | Глиома после лазерного воздействия, % |
|-----------------|-------------|------------------------------------|---------------------------------------|
| Ki67 | 0 | $37,5 \pm 0,6$ +++ | $23,2 \pm 1$ * +/+++ |
| Вах | 0 | $7 \pm 3,4$ + | $95,8$ * ++/++++ |
| Lc3b | 100% + | $95 \pm 2,3$ ++ | 25 ± 15 * + |

Примечание: * - $p < 0.005$ относительно контроля

Таким образом результаты наших исследований доказывают, что лазер с длиной волны 1268 нм оказывает угнетающее действие на глиомные клетки. Это показано на экспрессии иммуногистохимических маркеров Ki67, Вах, Lc3b.

В опытах на животных с глиомой линии С6, применяя такие методы, как гистологический и иммуногистохимический с использованием маркеров апоптоза (ВАХ), аутофагии (LC3b) и пролиферации (Ki67) было показано, что для глиомы после лазерной терапии характерен выраженный патоморфоз, проявляющийся в уменьшение размеров клеток.

Лазерная активация апоптоза снижает пролиферативную активность опухолевых клеток и блокады процессов аутофагии. Угнетение процессов аутофагии под влиянием лазера препятствует развитию резистентности к фармакологическому лечению глиомы, также подавление лазером пролиферации глиомы обеспечивает цитостатический эффект, а за счет лазерной активации апоптоза клетки опухоли гибнут запрограммированным путем, не вызывая общей интоксикации.

Практическим путем была показана эффективность применения прямой лазерной генерации синглетного кислорода на искусственно зараженных глиомой крысах. На основании этих фактов можно сделать заключение, что воздействие лазером 1268 нм в дозе 357 Дж/см² может являться эффективным вспомогательным способом подавления активности, пролиферации клеток злокачественных опухолей. Этот метод может проявлять себя как метод действия на опухоль в комплексной терапии раковых больных.

Выводы

1. Клетки злокачественной глиомы С6 приживались после имплантации в область сагиттального синуса (срединная линия) с пересечением брегмы. Глиома развивалась в период с 3 по 14 день после вживления. Активный рост опухоли наблюдался в течение 30 дней. В первую неделю после введения, злокачественное новообразование развивалось на поверхности мозга. После 20 дня опухолевые клетки начинали активно прорастали внутрь тканей, изменяя их структуру.

2. Показана эффективность использования в работе маркера апоптоза (BAX) на крысах с глиомой линии С6, которая проявляется в увеличении экспрессии маркера до 95% после лазерного воздействия.

3. Выявлена эффективность использования в работе маркера аутофагии (LC3b) на крысах с глиомой линии С6. После лазерного воздействия отмечалось уменьшение экспрессии маркера на 70%. Развитие глиомы сопровождалось усилением процессов аутофагии, о чем свидетельствует выраженная экспрессия белка LC3В ab48394 в цитоплазме.

4. Выявлена положительная динамика при лазерной терапии с использованием маркера пролиферации (Ki67) на крысах с глиомой линии С6, которая показала снижение пролиферативной активности глиомных клеток на 37%.

