

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

Кафедра физиологии человека и животных

**ИЗМЕНЕНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КРОВИ ПРИ ФОТОДИНАМИЧЕСКОМ
ОТКРЫТИИ ГЕМАТОЭНЦЕФАЛИЧЕСКОГО БАРЬЕРА**

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 2 курса 241 группы

Направление подготовки магистратуры 06.04.01 Биология

Биологического факультета

Кулагиной Ольги Николаевны

Научный руководитель:

доцент, док. биол. наук



О.В. Семячкина - Глушковская

Зав. кафедрой:

доцент, док. биол. наук



О.В. Семячкина - Глушковская

Саратов 2019

Актуальность работы: Гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) представляет собой высокоорганизованную многофункциональную систему, которая расположена на границе кровеносной и центральной нервной системы (ЦНС), и играет важную роль в регуляции гомеостаза головного мозга. ГЭБ контролирует прохождение переносимых кровью различных веществ в ткани головного мозга: участвует в избирательном транспорте питательных веществ и других необходимых компонентов из крови в паренхиму мозга, регулирует выведение продуктов обмена веществ, ограничивает транспорт из крови в мозг различных токсинов и метаболитов. Эти защитные механизмы ограничивают поступление многих лекарственных препаратов в мозг.

Существует 7000 препаратов, которые зарегистрированы в общей базе данных лекарственных препаратов, но только 5% из них доступны для лечения заболеваний ЦНС. Причиной этого является то, что многие препараты имеют большой молекулярный вес (антитела, рекомбинантные белки и др.) и не могут проникать через ГЭБ.

Нарушение резистентности ГЭБ – перспективная тема для ученых всего мира в области таких направлений науки как неврология, фармакология, биохимия, нейрофизиология и других. В настоящее время этой проблеме посвящается большое количество научных работ. Было проведено большое количество исследований механизмов нарушения проницаемости ГЭБ при воздействии патологических факторов (токсических, инфекционных, травматических), а также при определенных экспериментальных воздействиях. Существует более 70 различных физических, химических и биологических методов преодоления ГЭБ. Фотодинамическая терапия (ФДТ) – это метод лечения, который основан на взаимодействии фотосенсибилизатора (ФС) (порфирины, хлорины и другие фотодинамические красители) и светового излучения определенной волны, в результате развивается фотодинамическая реакция, которая приводит к разрушению клеток опухоли.

В последнее время в некоторых научных работах было показано, что ФДТ может временно увеличить проницаемость ГЭБ: использование лазерного

излучения (635 нм) и стереотаксической процедуры показывают открытие ГЭБ для гадолиния, а использование лазерного излучения (670 нм) и фталоцианина алюминия демонстрируют открытие ГЭБ для макрофагов.

Тем не менее, еще не разработано таких методов, которые могли бы широко использоваться в повседневной клинической практике для безопасного «открытия» ГЭБ.

Целью данной работы явилось изучение временного повышения проницаемости ГЭБ с помощью фотодинамического воздействия (ФДВ) и анализ изменений в показателях основных биохимических параметров крови мышей при ФДВ.

Для реализации поставленной цели были сформулированы задачи:

1. Изучить эффекты ФДВ на проницаемость ГЭБ к высокомолекулярному альбуминовому комплексу красителя Evans Blue у мышей.

2. Изучить проницаемость ГЭБ при ФДВ с применением маркеров нейроваскулярной единицы у мышей.

3. Изучить изменения основных биохимических показателей крови мышей после ФДВ.

Структура магистерской работы. Выпускная квалификационная работа состоит из четырех частей: «Введения», «Основной части», «Выводов» и «Списка использованных источников». «Основная часть» включает в себя три раздела: «Обзор литературы», «Материалы и методы исследования» и «Результаты исследования». Раздел «Обзор литературы» состоит из четырех подразделов: «Структура и функции гематоэнцефалического барьера», «Изменение проницаемости ГЭБ в условиях неврологических патологий», «Особенности повреждений ГЭБ при некоторых видах патологии мозга», «Методы повышения проницаемости ГЭБ для лечения заболеваний мозга», «Фотодинамическое лечение опухолей мозга и модуляция проницаемости ГЭБ». Раздел «Материалы и методы исследования» представлен описанием исследуемых объектов и условий проведения эксперимента. Раздел «Результаты исследования» включает четыре подраздела: «Исследование эффектов фотодинамического воздействия на

проницаемость ГЭБ к высокомолекулярному альбуминовому комплексу красителя Evans Blue», «Морфологический анализ тканей мозга после фотодинамического открытия ГЭБ», «Оценка повышения проницаемости ГЭБ с применением маркеров нейроваскулярной единицы», «Анализ изменений основных биохимических показателей крови мышечной ткани после фотодинамического воздействия».

Объектом исследования служили особи белых половозрелых мышей.

Все процедуры были выполнены в соответствии с «Руководством по уходу и использованию лабораторных животных». Экспериментальные животные содержались в стандартных условиях (12 часовой период освещения, комнатная температура 18-22 °С, влажность 50-70%) вивария на стандартном виварном рационе.

Для изучения временного повышения проницаемости ГЭБ с помощью ФДВ и анализа изменений в показателях основных параметров крови мышечной ткани при ФДВ применялись методы: фотодинамическое воздействие разными дозами облучения, спектрофлуорометрический и гистологический методы, метод конфокальной микроскопии.

Для открытия ГЭБ у экспериментальных животных проводилось ФДВ на головной мозг. ФДВ осуществляли под общей анестезией.

Процедуру ФДВ проводили на открытом черепе, для этого делали трепанацию с помощью стоматологической дрели.

Для ФДВ использовали непрерывный лазер 635 нм (ХРeBRD-L1-0000-00901, CREE, Inc.) с выходной мощностью 1 Вт, и непрерывный волоконный лазер видимого диапазона 665 нм (KEOPSYS, LUMIBIRD) с выходной мощностью 2 Вт, с возможностью контроля плотности мощности излучаемого света в диапазоне от 20 до 200 мВт/см² с шагом 10 мВт/см². В первом случае мозг мышечной ткани облучали при постоянной плотности мощности 40, 60, 100 мВт/см² и времени экспозиции 250, 375, 500 и 750 секунд, соответственно, достигая, таким образом, световой дозы 10, 15, 20, 40 Дж/см² (длина волны 635 нм). Во втором

случае мозг мышей облучали при постоянной плотности мощности 20 мВт/см², времени экспозиции 250 секунд и световой дозы 5 Дж/см² (длина волны 665 нм).

Для контроля температуры на поверхности мозга при воздействии лазера применяли бесконтактный термометр (Pico USBTC-08, USA).

ФС вводили мышам ретроорбитально за 20 мин до проведения ФДВ 5-ALA из расчета 20 мг/кг веса, фталоцианина алюминия из расчета 1 мг/кг веса.

По окончании испытаний животные были выведены из эксперимента путем декапитации, после чего у них забиралась мозг и кровь для дальнейших исследований.

Спектрофлуориметрический метод оценки проницаемости ГЭБ включал в себя оценку проницаемости ГЭБ для красителя Evans Blue. Данный краситель имеет молекулярный вес 961 Да, однако, при попадании в кровь он образует альбуминовый комплекс, в силу чего его молекулярный вес вырастает до 68,5 кДа. В нормальных условиях ГЭБ непроницаем для Evans Blue, но, при наличии патологий, сопровождающих открытие ГЭБ, краска попадает в мозг и окрашивает его ткани в голубой цвет.

Животным проводили ретроорбитальную пункцию с целью внутривенного введения красителя Evans Blue в дозе (25 мг/25 г мыши, 1% раствор красителя в 0,9% физиологическом растворе). После чего краситель циркулировал в течение 30 мин, далее проводили перфузию церебральных сосудов с целью их промывки от красителя.

Затем животных декапитировали, мозг извлекали из черепной коробки и оценивали содержание красителя в тканях мозга на спектрофлуорометре Care Eclipse, Agilent, США).

Гистологический метод основан на изучении строения тканей организмов. Материалом для гистологического исследования служат тонкие слои тканей, окрашенные определенным способом для лучшей визуализации структурных компонентов ткани при микроскопии.

Гистологический метод оценки проницаемости ГЭБ применяли для изучения диффузии воды из плазмы крови в паренхиму мозга, анализируя

развитие периваскулярной эдемы. Материалом для данного метода исследования являлся мозг экспериментальных животных.

Окраска гистологических препаратов (по методу Д. Э. Коржевского и А. В. Гилярова) – двойная окраска: гематоксилин (основной краситель) окрашивает ядра клеток, эозин (кислый краситель) окрашивает цитоплазму клеток, а также различные неклеточные структуры.

Для определения проницаемости ГЭБ при ФДВ для высокомолекулярного вещества FITC-декстран 70 кДа (1% раствор в объемной дозе 0,2 мл на 100 г веса мыши) применялась конфокальная микроскопия. Срезы мозга животных изучались на конфокальном микроскопе TCL SP5 (Ltica-microsystems, Германия) на базе ЦКП «Симбиоз» ИБФРМ РАН г. Саратова.

Для визуализации прохождения высокомолекулярного вещества декстран 70 кДа через ГЭБ при ФДВ на мозг экспериментальных животных применяли маркеры нейроваскулярной единицы астроциты и эндотелий сосудов мозга. Для визуализации эндотелия сосудов и астроцитов при конфокальной микроскопии применяли окрашенные метки: для эндотелия сосудов мозга – SMI (тканеспецифический белок), для астроцитов – GFAP (глиальный фибриллярный кислый белок), который образует глиальные промежуточные филаменты астроцитов. При проведении конфокальной микроскопии GFAP – иммунопозитивные структуры и SMI -иммунопозитивные структуры проявляют красную флуоресценцию.

Методы оценки биохимических показателей крови проводились с соблюдением стандартизированных методик с обязательным проведением контроля качества.

Биохимические показатели крови определяли на биохимическом автоматическом анализаторе DURU CS-600B с произвольным доступом и открытой системой реагентов. Для исследования использовалась сыворотка крови без следов гемолиза, полученная путем центрифугирования в течение 15 мин при 3000 об/мин. Для калибровки фотометрической системы использовался мультикалибратор и серия контрольных сывороток.

Оценивали следующие биохимические показатели: общий белок, альбумины, креатинин, мочевины, аминотрансферазы (АСТ,АЛТ), лактатдегидрогеназу, щелочную фосфотазу.

Аналитические измерения гематологических показателей крови проводились с соблюдением стандартизированных методик с обязательным проведением контроля качества.

Гематологические показатели крови (лейкоциты, эритроциты, тромбоциты, гемоглобин) определяли на гематологическом анализаторе ВС-3200, предназначенном для *in vitro* диагностики. Для исследования использовалась цельная кровь с ЭДТА. Для калибровки фотометрической и кондуктометрической (импедансометрической) системы использовались калибраторы и серия контрольной крови.

Обсуждение результатов исследования

Для фотодинамического воздействия использовали лазер 635 нм и ФС 5-ALA, который при возбуждении превращается в IX-протопорфирин и формирует синглетный кислород, повреждающий эндотелий сосудов мозга и приводящий к временному повышению проницаемости ГЭБ. Фотосенсибилизатор 5-ALA вводили в дозе 20 мг/кг, которая применяется в клинических исследованиях.

Для оценки проницаемости ГЭБ использовали тест с применением красителя Evans Blue. Краситель Evans Blue является иммуно-нейтральной краской, которая при попадании в кровь образует комплекс с альбуминами плазмы, формируя высокомолекулярный комплекс 68.5 кДа. В нормальных условиях, краситель не способен проникать через ГЭБ из-за своего высокого молекулярного веса. Поэтому тест с внутривенным введением Evans Blue является стандартом для анализа проницаемости ГЭБ с применением спеткрофлуориметрии, которая позволяет оценивать количество прошедшей краски через ГЭБ в ткани мозга в физиологических единицах.

На первом этапе исследований была поставлена задача установить оптимальную дозу лазерного воздействия на ГЭБ с применением вышеуказанного метода.

Используя рекомендованную дозу 5-ALA было показано, что ФДВ эффективно повышает проницаемость ГЭБ к Evans Blue на разных дозах лазерного воздействия.

Исследуя временную динамику изменений в ГЭБ, было обнаружено, что максимальные сдвиги отмечаются через 90 мин после ФДВ. Через 4 часа после ФДВ не отмечалось проницаемости ГЭБ к красителю Evans Blue, что свидетельствует о восстановлении барьерной функции мозга. Было установлено доза-зависимое фотодинамическое повышение проницаемости ГЭБ к красителю Evans Blue, что отражает высокую проницаемость ГЭБ к высокомолекулярным соединениям под воздействием ФДВ. Фотодинамическое воздействие приводит к открытию ГЭБ с латентным периодом в 1 час и восстановлением проницаемости ГЭБ через 4 часа.

Основным условием безопасного открытия ГЭБ является отсутствие или минимальное проявление периваскулярной эдемы, возникающей в силу проникновения в ткани мозга воды из сосудов. Это сопровождается повышением внутричерепного давления, что приводит к тяжелым последствиям в отношении функций мозга. Для оценки безопасного режима ФДТ на дальнейших этапах изучали морфологические изменения в тканях и сосудах мозга после фотодинамического открытия ГЭБ с применением разных доз лазерного излучения.

Открытие ГЭБ, связанное с ФДВ, сопровождалось появлением периваскулярной эдемы. Низкие дозы лазера вызывает незначительное накопление воды вокруг микрососудов, в то время как более высокие дозы лазера вызывают более сильный отек.

Таким образом, результаты двух серий экспериментов позволили заключить, что оптимальной дозой ФДВ является 15 Дж/см² в силу высокой проницаемости ГЭБ на фоне незначительного изменения в морфологических показателях тканей и сосудов мозга.

При введении высокомолекулярного декстрана 70 кДа ретроорбитально экспериментальным животным из контрольной группы при исследовании срезов мозга мышей с помощью конфокальной микроскопии, вещество в нормальных

условиях не выходит за пределы церебральных сосудов. Но при ФДВ на мозг мышей происходит «открытие» ГЭБ, и декстран 70 кДа диффундирует в паренхиму мозга. Это показано с помощью тканеспецифических флуоресцирующих маркеров GFAP и SMI, которые окрашивают такие нейроваскулярные единицы ГЭБ, как эндотелий сосудов мозга и астроциты, что позволяет качественно оценивать выход декстрана при ФДВ в ткани мозга.

На заключительном этапе исследования мы изучали изменение основных биохимических показателей крови при ФДВ на мозг мышей, по которым можно судить о состоянии печени, почек, органов кроветворения экспериментальных животных. В результате эксперимента было установлено, что при ФДВ происходит повышение активности ферментов в крови: щелочной фосфатазы в среднем по группам в 4,6 раза по сравнению с контролем; АСТ – в 4,4 раза; АЛТ – в 1,9 раз; ЛДГ в 7,8 раз.

В результате ФДВ на ткани мозга мышей в разных экспериментальных группах: с разной интенсивностью облучения, с совместным воздействием лазера и ФС, только лазера или ФС не приводит к значимым изменениям основных биохимических показателей крови. Повышение активности ферментов печени связано с детоксикационной функцией печени и обусловлено общей реактивностью организма на химическое (ФС) и лучевое (лазерное) воздействие.

Заключение. По результатам проведенной работы были сделаны следующие выводы:

1. Была установлена оптимальная доза ФДВ на ГЭБ - 15 Дж/см², дальнейшее увеличение интенсивности ФДВ не приводит к более выраженным изменениям в барьерной функции мозга.

2. Оценка ФДВ-открытия ГЭБ с применением маркеров нейроваскулярной единицы выявило, что ФДВ эффективно повышает проницаемость ГЭБ для декстрана 70 кДа.

3. ФДВ индуцированное открытие ГЭБ сопровождается изменениями биохимических показателей крови, обусловленными физиологической реактивностью печени в ответ на ФДВ.

4. Метод ФДВ-открытия ГЭБ рассматривается как перспективная стратегия для внедрения в клиническую практику с целью доставки лекарственных препаратов в ткани мозга и лечения заболеваний ЦНС.

