

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

Кафедра физиологии человека и животных

**ФОТОДИНАМИЧЕСКОЕ ОТКРЫТИЕ ГЕМАТОЭНЦЕФАЛИЧЕСКОГО
БАРЬЕРА ЧЕРЕЗ ИНТАКТНЫЙ ЧЕРЕП**

АВТОРЕФЕРАТ

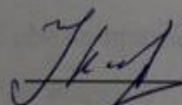
Студента 2 курса 241 группы

Специальности 06.04.01 Биология

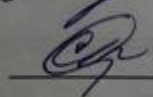
Биологического факультета

Терскова Андрея Витальевича

Научный руководитель
д.ф.-м.н., профессор

 Куртц Ю. Г.

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

 Семячкина-Глушковская О. В.

Саратов 2019

ВВЕДЕНИЕ

Гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) играет важную роль в поддержании здоровья центральной нервной системы (ЦНС). Он состоит из специализированных эндотелиальных клеток, перицитов, базальной мембраны и астроцитов. Этот комплекс ГЭБ контролирует проникновение переносимых кровью агентов в мозг и защищает ЦНС от токсинов и патогенов. Тем не менее, это также ограничивает терапию для ЦНС. Заболевания ЦНС составляют 30% от общего числа всех заболеваний. По причине невозможности лечения многих заболеваний мозга, методы открытия ГЭБ получили значительное внимание в последние десятилетия.

Недавно было обнаружено, что фотодинамическая терапия (ФДТ), как широко используемый метод для флуоресцентной резекции глиомы также может эффективно открывать ГЭБ. ФДТ реализована путем сочетания светового излучения с фотосенсибилизаторами (порфирины, хлорины и многие другие фотодинамические красители). Возбужденный фотосенсибилизатор непосредственно окисляет биомолекулы и/или взаимодействует с молекулярным триплетом кислорода ($3 O_2$), производит синглетный кислород ($1 O_2$), что вызывает апоптоз раковых клеток и/или некроз через мембрану плазмы и разрыв митохондрий. 5-аминолевулиновая кислота (5-АЛА) является пролекарством, которое широко используется в ФДТ благодаря своей безопасности. После введения 5-АЛА метаболизируется до протопорфирина IX, проявляющий фотодинамический эффект при облучении светом ткани-мишени. Как правило, применением ФДТ на тканях мозга сопровождается вазогенным отеком, который происходит в области, окружающей участок обработки светом, предполагая локальную деградацию ГЭБ. Другим недостатком применения ФДТ является рассеивающее свойство черепа сильно ограничивает проникновение света, что сильно лимитирует проникновение лазера в ткани мозга и в силу чего ФДТ вынуждены проводить на открытом черепе. Это неизбежно сопровождается изменениями внутричерепного давления, что может приводить в необратимым последствия в отношении различных функций мозга.

Мэдсен продемонстрировал открытие ГЭБ через неповрежденный череп, но с большими дозами фотосенсибилизатора и лазерного облучения, которое также часто сопровождается сильным вазогенным отеком.

В данной работе была выдвинута гипотеза, что ФДВ можно достичь на низких дозах с применением технологии оптического просветления черепа, т.е. не повреждая его. Данная технология заключается в нанесении на ткани черепа определенных реактивов, которые делают его на время прозрачным. Такое оптическое окно на черепе может обеспечить ФДВ-открытие ГЭБ с безкраниотомии.

В этом исследовании была поставлена цель протестировать гипотезу о возможном открытии ГЭБ с помощью ФДВ через интактный череп с применением технологии оптического просветления.

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

1. Изучить возможность применения оптических агентов для просветления тканей черепа мыши с применением оптической когерентной томографии для визуализации сосудов мозга;
2. Изучить проницаемость ГЭБ для высокомолекулярного альбуминового комплекса красителя Evans Blue после ФДВ через интактный череп с применением спектрофлуориметрического определения концентрации зонда в тканях мозга;
3. Установить оптимальную дозу ФДВ через интактный череп с применением технологии оптического просветления и гистологического метода изучения тканей мозга;
4. Изучить в опытах *in vivo* открытие ГЭБ через просветленный череп для родаминового декстрана 70 кДа с применением двух-фотонной микроскопии;
5. Изучить проницаемость ГЭБ для GM1-липосом (100 нм) в качестве потенциальных транспортных систем доставки лекарственных препаратов в мозг с применением конфокальной микроскопии и маркеров нейроваскулярной единицы;

6. Изучить механизмы, ответственные за фотодинамическое повышение проницаемости ГЭБ через просветлённый череп на основе исследования экспрессии белков плотных контактов, показателей окислительного стресса (малоновый диальдегид), а также насыщение тканей мозга кислородом (SpO₂).

Материалы исследования

Работа выполнена на базе кафедры физиологии человека и животных Саратовского Государственного Университета имени Н. Г. Чернышевского, ЦКП «Симбиоз» ИБФРМ РАН, Саратовского Государственного Медицинского Университета имени В. И. Разумовского и Хуачьжонского университета г. Ухань, Китай.

Эксперименты проводились на 8-недельных беспородных самцах мышей в следующих группах:

1. Контроль - без лазерного облучения;
2. Инъекция 5-аминолевулиновой кислоты (5-АЛА) без лазерного облучения;
3. Лазерное облучение без введения 5-АЛА;
4. Фотодинамическое воздействие (ФДВ) через неповрежденный череп без оптической очистки;
5. Фотодинамическое воздействие через неповрежденный череп после использования оптического очищающего средства.

Четвертая и пятая группы были разделены на 4 подгруппы, соответствующие различным лазерным дозам:

1. (4-1) (5-1) 10 Дж/см²;
2. (4-2) (5-2) 20 Дж/см²;
3. (4-3) (5-3) 30 Дж/см²;
4. (4-4) (5-4) 40 Дж/см².

Каждая группа и подгруппа включали 6 мышей. Все процедуры были выполнены в соответствии с «Руководством по уходу и эксплуатации лабораторных животных». Протоколы № 1, 3, 9 эксперимента одобрены

Комитетом по уходу и эксплуатации лабораторных животных Саратовского Государственного Университета.

Методы исследования

В данном исследовании будет применяться технология оптического просветления, с помощью оптических агентов (ОА). Оценку эффективности применения ОА проводили с применением *in vivo* визуализации сосудов мозга с помощью оптической когерентной томографии OCS1300SS (Thorlabs Inc. USA).

Мышей анестезировали смесью золетила и ксиланита (8мкл) внутрибрюшинно. Скальп был удален и поверхность черепа была высушена. После этого ОА были использованы для создания просветленного черепа с окном, диаметром 5мм [25]. ФДВ было выполнено через 30 мин после внутривенного введения 5-АЛА. Мы использовали 5-АЛА с клинически рекомендуемой дозой (20 мг/кг) [15]. Лазер с длиной волны 635 нм (ХРeBRD-LI-0000-00901. CREE. Inc., Durham, North Carolina, USA) использовали для облучения мозга мыши через просветленный череп. Регулируя длительность облучения, мозг мыши облучался различными световыми дозами в 10, 20, 30, 40 Дж/см² соответственно.

Для оценки проницаемости ГЭБ *ex vivo* была протестирована экстравазация Evans Blue dye (EBd) с использованием спектрофлуориметрического анализа.

Для визуализации проницаемости ГЭБ *in vivo* использовалась двухфотонная лазерная сканирующая микроскопия (2 ФЛСМ) для изображения экстравазации родаминового декстрана (70 кДа).

Для исследования эффективности открытия ГЭБ, связанного с ФДВ, для липосом мы использовали три различных маркера для выявления целостности гематоэнцефалического барьера:

1. антитела SMI-71 в качестве маркера цереброваскулярного эндотелия;
2. антиглиальный фибриллярный кислый белок (GFAP), метящий астроциты;

3. ламинин (Laminin), маркирующий базальную мембрану.

Для оценки изменений тканей головного мозга после ФДВ мышей декапитировали после проведения экспериментов для морфологического анализа.

Так же были изучены механизмы, ответственные за открытие ГЭБ с помощью ФДВ исследовали экспрессию молекулярных факторов, которые участвуют в контроле проницаемости ГЭБ, таких как трансмембранные белки плотных контактов (CLND-5 и ZO-1) и белок адгезии (VE-кадгерин), а также фактор ко-фактор трансмембранной передачи возбуждения (бета-аррестин-1, ARRB1), контролирующей экспрессию комплекса этих белков.

Результаты исследования

На первом этапе исследований проводили оптическое просветление черепа с использованием ОА. На рисунке 7 представлен успешный результат просветления черепа животного после использования ОА на черепе. Как видно из рисунка и данных оптической когерентной томографии, изображение сосудов мозга через прозрачный череп значительно улучшилось после применения ОА. Таким образом, методика просветления черепа показала высокую эффективность для визуализации сосудов мозга.

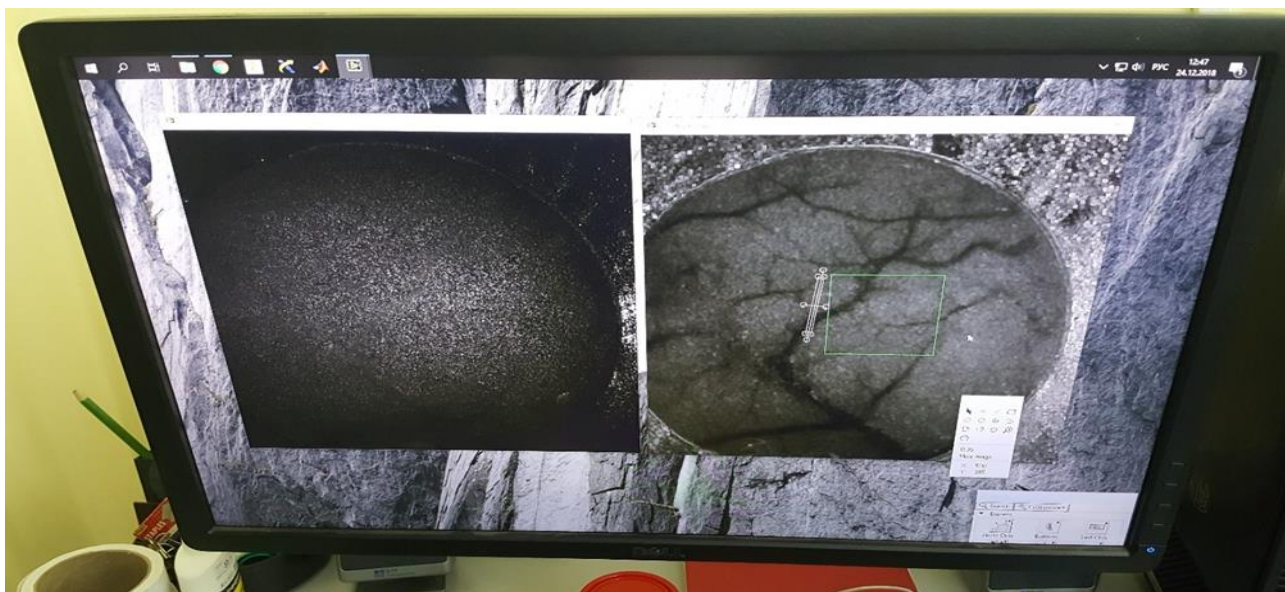


Рисунок 7 – Изображение оптической когерентной томографии сосудов мозга до (слева) и после (справа) просветления черепа

На втором этапе научной работы анализировали влияние ФДВ в зависимости от дозы воздействия на проницаемость ГЭБ, используя спектрофлуориметрическое определение содержания EVD в тканях мозга мыши [76]. Для исследования доза-зависимых эффектов ФДВ были выбраны следующие дозы лазера эмпирическим путем: 10, 20, 30 и 40 Дж/см². Результаты показали, что не было изменений в проницаемости ГЭБ для EVD у мышей из контрольной группы и мышей, которым вводили только 5-АЛА или на которых воздействовали только лазером с разными дозами. Аналогичные результаты были выявлены у мышей, после ФДВ через интактный череп (5-АЛА + лазер) без просветления его тканей. Однако ФДВ с просветлением сопровождается появлением EVD в высокой концентрации в мозге, что указывает на значительную экстравазацию EVD из церебральных сосудов в ткани мозга. Сравнение между группами мышей, перенесших ФДВ с оптическим окном и без просветления показало, что лазерная доза 10 Дж/см² вызывала увеличение уровня в тканях мозга EVD в 10,3 раза ($p < 0.05$), 20 Дж/см² - 20,2 раз ($p < 0.05$); 30 Дж/см² - 22,3 раз ($p < 0.05$); 40 Дж/см² - в 22,9 раза ($p < 0.05$).

Открытие ГЭБ с помощью ФДВ сопровождалось вазогенным отеком (эдемой), т.е. появлением избыточной жидкости в периваскулярном пространстве. Низкие дозы лазера (10 Дж/см² и 20 Дж/см²) сопровождалась умеренной вазогенной эдемой, в то время как при более высоких дозах лазера (30 Дж/см² и 40 Дж/см²) развивался выраженный периваскулярный отек.

Рисунок 9 демонстрирует открытие ГЭБ с помощью ФДВ для родаминового декстрана, который показывает измерения интенсивности сигнала флуоресценции внутри и вокруг сосуда головного мозга. Рисунок 9 (а) отражает схему эксперимента.

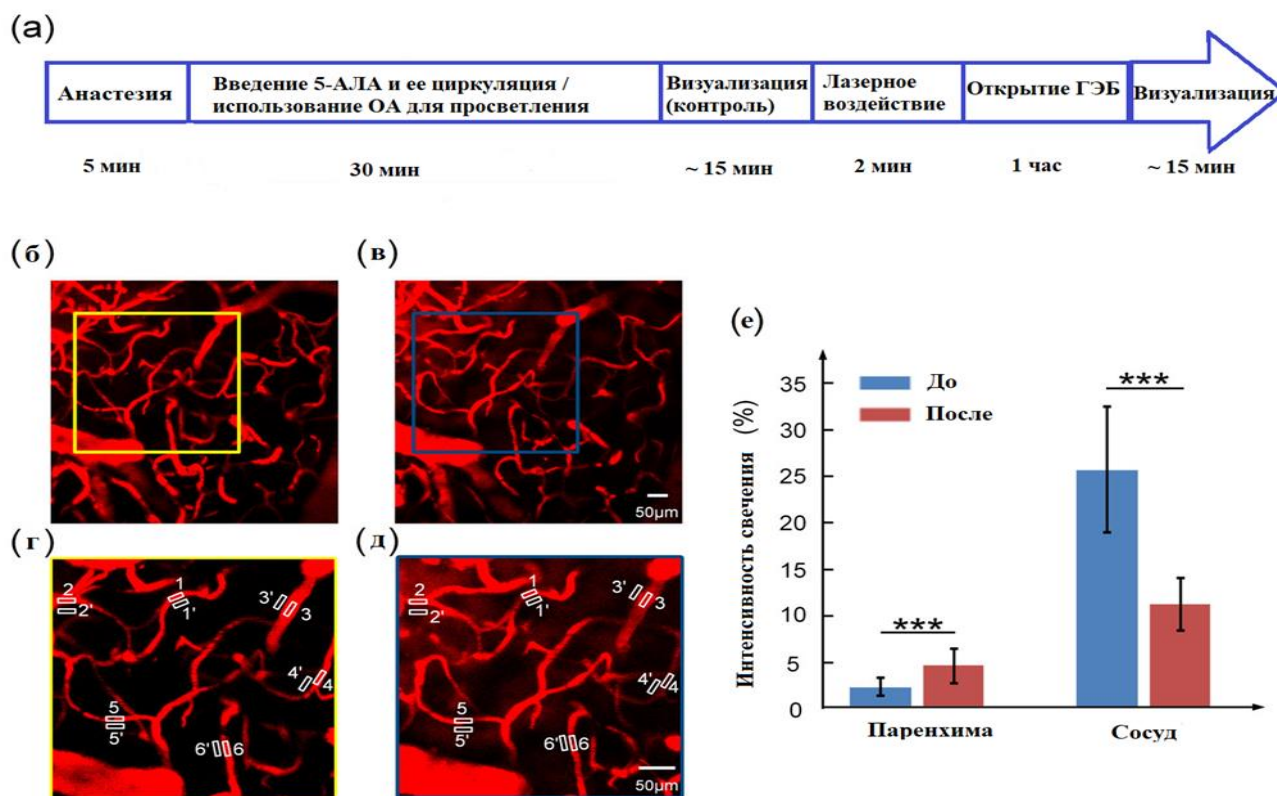


Рисунок 9 - Анализ *in vivo* открытия ГЭБ с помощью ФДВ для родаминового декстрана 70 кДа. (а) Схема эксперимента, (б) и (в) - одна и та же область, отображаемая на 2 ФЛСМ до и после ФДВ, (г) и (д) представляют собой увеличенные изображения, соответствующие областям, обозначенным в (б) и (в), соответственно. (е) Количественный анализ интенсивности сигнала внутри (1-6) и снаружи (1-6) сосудов

Было выбрано 6 областей для количественного анализа интенсивности сигнала перед и после ФДВ (Рисунок 9(г) и (д)). Через 1 час после ФДВ наблюдается сильная экстравазация родаминового декстрана (70 кДа) из сосудов головного мозга в периваскулярное пространство, что приводит к высокому флуоресцентному сигналу вокруг церебральных микрососудов. Действительно, флуоресцентный сигнал в периваскулярном пространстве увеличился в 2 раза, что указывает на высокую экстравазацию зонда из церебральных сосудов в паренхиму головного мозга через открытый ГЭБ. Флуоресцентный сигнал в сосудах мозга уменьшился в 2,3 раза из-за экстравазации родаминового декстрана в ткани мозга и обмена веществ почками (рисунок 9(е)). Эта серия экспериментов *in vivo* подтвердила наши данные ex

vivo, предполагая, что неинвазивное открытие ГЭБ с помощью ФДВ через просветленный череп возможно для доставки молекул с высоким молекулярным весом.

Следующим этапом исследования явилось изучение эффективности открытия ГЭБ с помощью ФДВ через просветленный череп для липосом как перспективных нано-транспортных систем для доставки лекарств в мозг и антиглиомной терапии [72]. Рисунок 10 демонстрирует эффективную экстравазацию липосом из сосудов головного мозга в паренхиму мозга через открытый ГЭБ. Наблюдается распределение липосом среди астроцитов (рисунок 10(а)) и вне цереброваскулярного эндотелия, и за пределами базальной мембраны (Рисунок 10(б) и (в)).

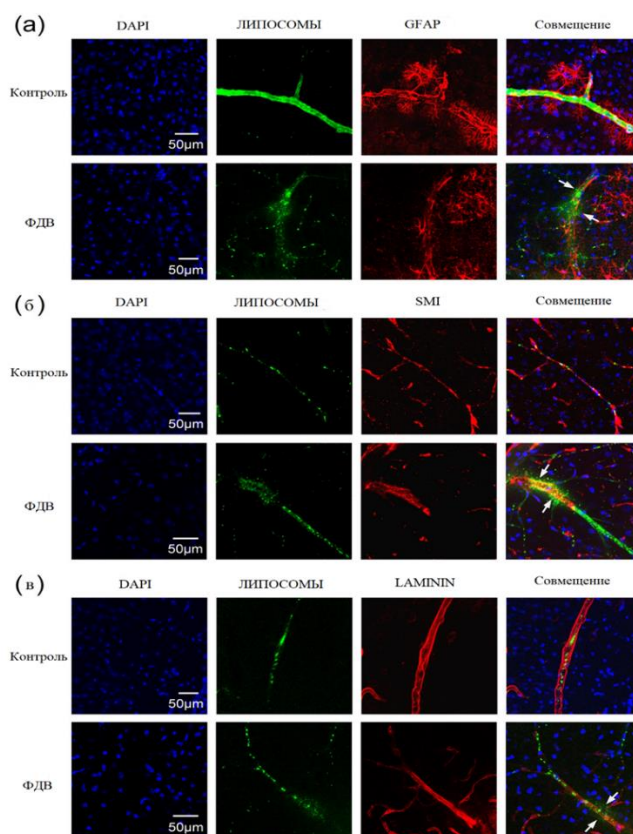


Рисунок 10 - Конфокальная визуализация неинвазивного открытия ГЭБ с помощью ФДВ для GM1-липосом с использованием маркеров нейроваскулярной единицы: (а) распределение липосом между астроцитами, меченных GFAP; (б) экстравазация липосом через эндотелий церебральных сосудов, меченых SMI, в ткани мозга; (в) распределение липосом за пределами базальной мембраны, помеченной Laminin.

Для изучения механизмов, ответственные за открытие ГЭБ с помощью ФДВ исследовали экспрессию молекулярных факторов, которые участвуют в контроле проницаемости ГЭБ, таких как трансмембранные белки плотных контактов (CLND-5 и ZO-1) и белок адгезии (VE-кадгерин), а также фактор ко-фактор трансмембранной передачи возбуждения (бета-аррестин-1, ARRB1), контролирующей экспрессию комплекса этих белков.

Рисунок 11(а) демонстрирует, что открытие ГЭБ (1 ч после ФДВ) сопровождалось уменьшением в экспрессии CLND-5 и VE-кадгерина, но увеличением в экспрессии ZO-1 и ARRB-1 по сравнению с контрольной группой.

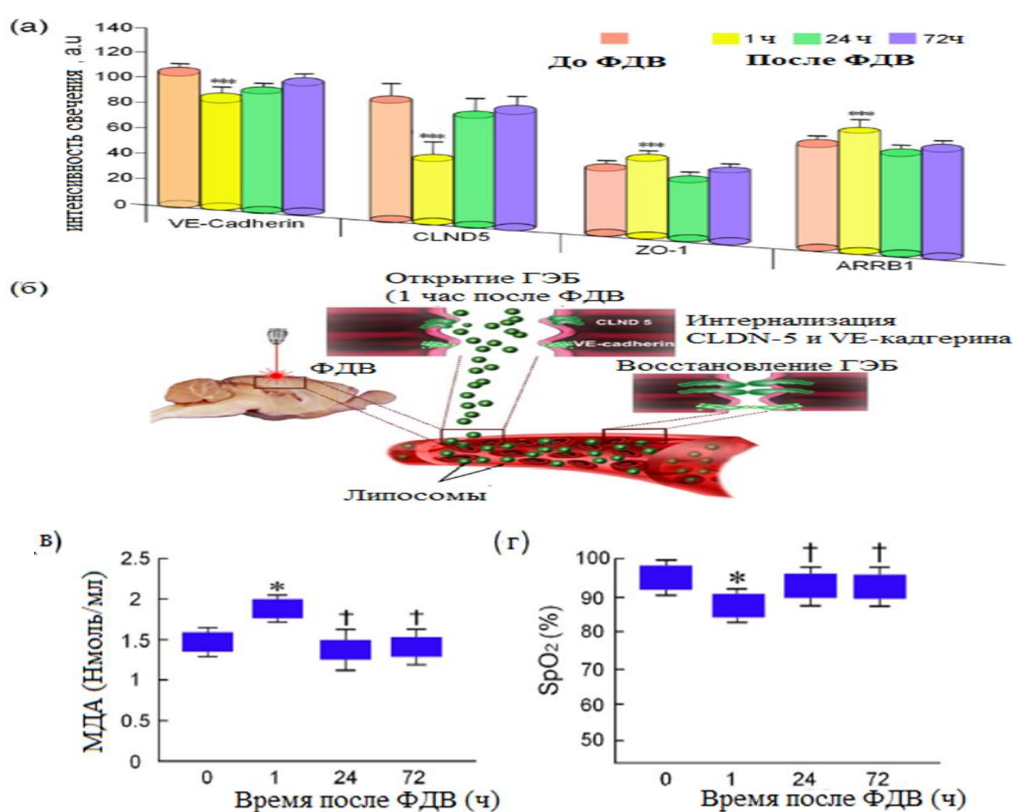


Рисунок 11 - Механизмы, лежащие в основе ФДВ-индуцированного открытия ГЭБ для GM1-липосом. (а) Экспрессия белков плотных контактов (CLDN-5 и ZO-1) и адгезии (VE-кадгерин), трансмембранного белка сигнальной системы (ARRB1). (б) Схема фотодинамического открытия ГЭБ, (в) ФДВ-индуцированные изменения уровня МДА в тканях мозга. (г) ФДВ-индуцированные изменения в SpO₂ головного мозга. * - $p < 0,05$ и *** - $p < 0,001$ по сравнению с контролем; † - $p < 0,05$ между группами.

Для изучения метаболических изменений, связанных с открытием ГЭБ с помощью ФДВ, был проанализирован уровень МДА тканей головного мозга, как маркер окислительного стресса, а также SpO₂ в мозге, как важный критерий церебральной метаболической активности [44]. Результаты показали, что ФДВ-опосредованное открытие ГЭБ было связано с увеличением уровня МДА на 12% ($p < 0,05$) и снижением SpO₂ на 10% ($p < 0,05$) через 1 ч после ФДВ (Рисунок 11(в) и (г)).

Результаты показали повышенную экспрессию ARRB1, которая является главной в передаче сигналов трансмембранных процессов и снижении экспрессии CLND-5 и VE-кадгерина, как основных компонентов целостности ГЭБ

ВЫВОДЫ

1. Применение технологии оптического просветления черепа у мышей позволяет выполнять неинвазивное открытие ГЭБ с помощью ФДВ.
2. Установлена оптимальная лазерная доза для открытия ГЭБ с помощью ФДВ (20 Дж/см²) при просветленном черепе.
3. Показана эффективность открытия ГЭБ с помощью ФДВ для высокомолекулярных соединений, таких как EVd (68,5 кДа), родаминового декстрана (70 кДа) и для GM1-липосом (100 нм).
4. Механизмами ФДВ-открытия ГЭБ является развитие окислительного стресса и изменения в экспрессии белков плотных контактов (CLDN-5 и ZO-1) и фактора адгезии (VE-кадгерин) на фоне временной гипоксии тканей мозга.
5. Практическая значимость научного исследования состоит в том, что с применением технологии оптического просветления можно открыть ГЭБ с помощью ФДВ с низкими дозами фотосенсибилизатора и лазерного облучения, что позволяет минимизировать повреждения в тканях мозга после ФДВ. Метод открытия ГЭБ с помощью ФДВ через интактный череп имеет большой потенциал для лечения опухолей мозга, где требуется повторное применение ФДВ, что может быть достигнуто через создания оптического окна в черепе.

