

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

Кафедра физиологии человека и животных

**ЭФФЕКТЫ РАЗНЫХ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОВ НА
ГЕМАТОЭНЦЕФАЛИЧЕСКИЙ БАРЬЕР**

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 2 курса 241 группы

Направления 06.04.01 Биология

Биологического факультета

Рыбаковой Анастасии Николаевны

Научный руководитель:
доцент, док.биол.наук



О. В. Семячкина-Глушковская

Зав. кафедрой:
доцент, док.биол.наук



О. В. Семячкина-Глушковская

Саратов 2019

Введение. ГЭБ представляет собой физиологический барьер, основной функцией которого является поддержание гомеостаза мозга путем защиты нервных тканей от циркулирующих в крови чужеродных агентов. Поэтому барьер непроницаем для ряда веществ, особенно для крупных молекул, и играет роль высокоселективного фильтра, через который происходит транспорт веществ в мозг и вывод продуктов обмена из него в кровь. Однако высокая избирательность барьера вызывает затруднения, возникающие при лечении ряда заболеваний, связанных с ЦНС, поскольку ГЭБ не пропускает целый ряд лекарственных препаратов. В частности, одной из наиболее частых причин смерти при опухолях ЦНС является глиома, представляющая собой онкологическое заболевание мозга. Глиома остается неизлечимым заболеванием с плохим прогнозом. Применяемые в наше время методы терапии опухолей могут продлить жизнь пациента на 12-14 месяцев.

Поэтому изучение ГЭБ и его проницаемости, а также оптимизации повышения его проницаемости, является на сегодняшний день актуальной и перспективной задачей.

Одним из перспективных методов доставки лекарственных препаратов в мозг является фотодинамическое воздействие, которое приводит к временному и обратимому повышению проницаемости ГЭБ к высокомолекулярным соединениям. Фотодинамическое воздействие заключается в лазерном возбуждении введенного в организм фотосенсибилизатора, в силу чего образуется активная форма кислорода, а именно синглетный кислород, который оказывает мощное воздействие на целый ряд физиологических процессов.

Однако, метод фотодинамического открытия ГЭБ требует оптимизации и совершенствования в применении поскольку остаются неизвестными оптимальная доза лазера и наиболее эффективный и безопасный в отношении воздействия на сосуды мозга тип фотосенсибилизаторов. Для решения данной проблемы была поставлена цель и задачи научных исследований.

Целью работы явилось изучение фотодинамического повышения проницаемости ГЭБ к высокомолекулярному комплексу красителя *Evans Blue* и

к FITC-декстрану 70 кДа в условиях применения различных типов фотосенсибилизаторов и различных доз лазера для выявления наиболее эффективного фотодинамического воздействия на ГЭБ.

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

1. Изучить возможность изолированного влияния лазеров с длиной волны 665 нм и 635 нм, а также разных фотосенсибилизаторов на проницаемость ГЭБ с применением спектрофлуориметрического определения концентрации красителя *Evans Blue* в тканях мозга мышей;

2. Провести сравнение повышения проницаемости ГЭБ с применением разных типов фотосенсибилизаторов и выявить наиболее эффективный из них по показаниям уровня красителя *Evans Blue* в тканях мозга мышей;

3. Провести конфокальный качественный анализ проницаемости ГЭБ к FITC-декстрану 70 кДа на основе применения наиболее эффективного фотосенсибилизатора, выявленного в задаче 2.

Основное содержание работы. Объектом исследования были белые мыши возрастом 6 недель и весом 20-25 г. Все животные были поделены на следующие группы (по 6 животных в каждой):

1) контрольная группа, представленная здоровыми животными;

2) экспериментальная группа животных, в которой мышей подвергали только воздействию лазера (длина волны равна 665 нм и 635 нм, установленная мощность – 70 мВ) разных доз облучения – 2,5; 5 и 10 Дж/см²;

3) экспериментальная группа животных, которым вводили различные фотосенсибилизаторы (фталоцианины – AlPc; GalZnPc; ZnPc; TyrPc; и фотосенсибилизатор 5-АЛА);

4-8) группы животных представлены мышами, которым вводили фотосенсибилизаторы (фталоцианины – AlPc; GalZnPc; ZnPc; TyrPc; и фотосенсибилизатор 5-АЛА) и подвергали лазерному облучению (длина волны – 665 нм для фталоцианинов AlPc; GalZnPc; ZnPc; TyrPc и 635 нм для фотосенсибилизатора 5-АЛА). Каждая из данных групп была также поделена на

три подгруппы, внутри которых животные подвергались лазерному облучению разной дозировки: 2,5 Дж/см², 5 Дж/см² и 10 Дж/см² соответственно.

9) группа животных, которым вводили FITC-декстран после фотодинамического воздействия с оптимальными параметрами для лазера и наиболее эффективным фотосенсибилизатором, установленными нами ранее.

Первым этапом исследования стало изучение влияния изолированного лазерного излучения и введения только фотосенсибилизатора на проницаемость ГЭБ. Результаты для лазера приведены в таблице 1 и на рисунке 1, а для фотосенсибилизаторов – в таблице 2 и на рисунке 2.

Таблица 1 – Эффект воздействия лазерного облучения (длина волны 665 нм и 635 нм) на проницаемость ГЭБ для *Evans Blue*

Доза лазерного излучения, Дж/см ²	Концентрация <i>Evans Blue</i> в мозге, мг/г ткани
(контроль)	0,37±0,02
Лазер с длиной волны 665 нм	
2,5	0,39±0,01
5	0,35±0,06
10	0,33±0,05
Лазер с длиной волны 635 нм	
2,5	0,40±0,03
5	0,34±0,02
10	0,32±0,05

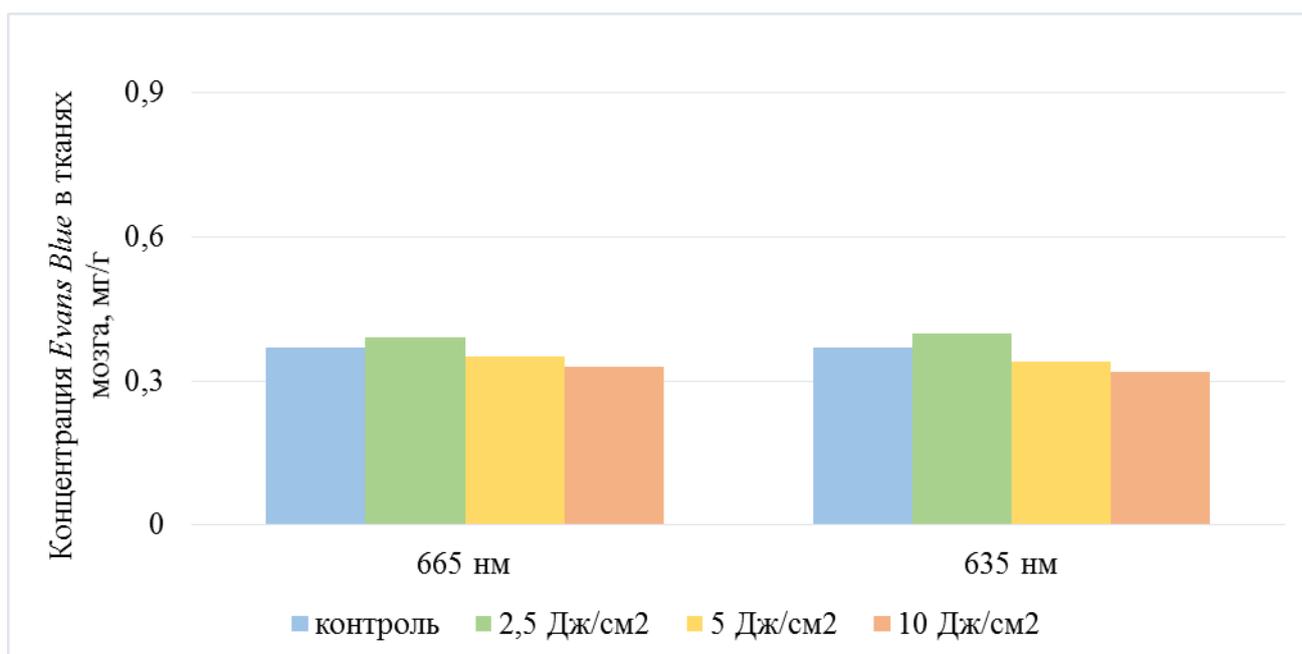


Рисунок 1 – Сравнение концентрации *Evans Blue* при изолированном лазерном воздействии для разных доз облучения (длины волн 665 нм и 635 нм)

Таблица 2 – Эффект воздействия разных типов фотосенсибилизаторов на проницаемость ГЭБ для *Evans Blue*

Фотосенсибилизаторы	Концентрация <i>Evans Blue</i> в мозге, мг/г ткани
AlPc	0,25±0,05
GalZnPc	0,23±0,09
TyrPc	0,20±0,07
ZnPc	0,28±0,05
5-АЛА	0,21±0,01

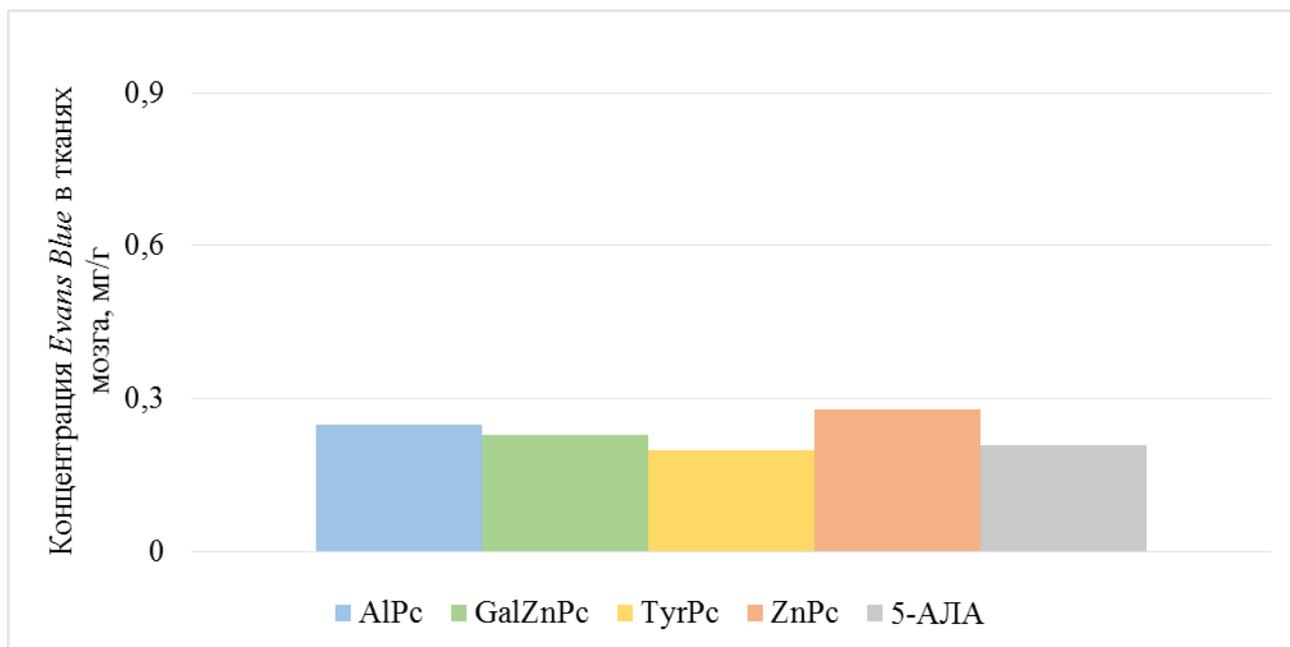


Рисунок 2 – Сравнение концентрации *Evans Blue* при введении только фотосенсибилизатора (AlPc, GalZnPc, TyrPc, ZnPc или 5-A1A)

Таким образом, результаты двух серий экспериментов позволяют заключить, что изолированное воздействие лазеров на длине волны 665 нм и 635 нм, а также введение разных типов фотосенсибилизаторов, таких как AlPc, GalZnPc, TyrPc, ZnPc, 5-A1A, не сопровождалось изменениями в проницаемости ГЭБ к красителю *Evans Blue*, т.е. подобное воздействие не способно открывать ГЭБ.

Следующим этапом научной работы явилось изучение эффекта фотодинамического воздействия, включая комбинированное влияние лазера и фотосенсибилизатора. Изучение содержания красителя *Evans Blue* в тканях мозга проводили через 1 час после фотодинамического воздействия.

Первым фотосенсибилизатором, который исследовали в ходе данной работы, стал AlPc. Полученные для этого фталоцианина данные приведены ниже, в таблице 3.

Таблица 3 – Эффект фотодинамического воздействия на проницаемость ГЭБ к *Evans Blue* с использованием фотосенсибилизатора AlPc

Доза лазерного излучения, Дж/см ²	Концентрация <i>Evans Blue</i> в мозге, мг/г ткани
(контроль)	0,37±0,02
2,5	18,64±1,31***
5	23,18±2,17***
10	20,37±2,18***

Примечание – *результаты достоверны ($p < 0,001$) относительно контрольной группы (без фотодинамического воздействия).

Приведенные данные указывают на то, что проницаемость ГЭБ была значительно повышена (в 50,38 раз) по сравнению с контролем уже при подаче минимальной дозы лазерного облучения (2,5 Дж/см²). При увеличении дозы лазерного облучения до 5 Дж/см² наблюдалось дальнейшее повышение проницаемости барьера в 62,65 раз по сравнению с контрольной группой и в 1,24 раза по сравнению с первой дозой облучения. Однако следующее увеличение дозы подаваемого излучения не приводило к еще более выраженному повышению проницаемости ГЭБ: концентрация красителя *Evans Blue* в тканях мозга была в этом случае в 55,05 раз больше, чем таковая в контрольной группе, т.е. и в 1,14 раз меньше, чем при дозе излучения 5 Дж/см².

Таким образом, можно заключить, что фотодинамическое воздействие оказывает доза-зависимые эффекты на ГЭБ, который открывается наиболее значительно при малых и средних дозах излучения, в то время как высокоинтенсивное воздействие, напротив, снижает эффективность повышения проницаемости ГЭБ.

Аналогичная ситуация наблюдалась с применением TvpPc для фотодинамического открытия ГЭБ. Результаты, полученные для данного вещества в ходе эксперимента, приведены в таблице 4.

Таблица 4 – Эффект фотодинамического воздействия на проницаемость ГЭБ для *Evans Blue* с использованием фотосенсибилизатора TmPc

Доза лазерного излучения, Дж/см ²	Концентрация <i>Evans Blue</i> в мозге, мг/г ткани
(контроль)	0,37±0,02
2,5	12,55±1,05***
5	18,44±2,50***
10	14,12±2,02***

Примечание – *результаты достоверны ($p < 0,001$) относительно контрольной группы (без фотодинамического воздействия).

Применение двух других фотосенсибилизаторов, таких как GalZnPc и ZnPc, сопровождалось аналогичными эффектами в отношении эффективного повышения проницаемости ГЭБ, за исключением отсутствия доза-зависимых изменений в уровне красителя *Evans Blue* в тканях мозга. Результаты исследования приведены в таблице 5 и 6.

Таблица 5 – Эффект фотодинамического воздействия на проницаемость ГЭБ для *Evans Blue* с использованием фотосенсибилизатора GalZnPc

Доза лазерного излучения, Дж/см ²	Концентрация <i>Evans Blue</i> в мозге, мг/г ткани
(контроль)	0,37±0,02
2,5	33,54±2,02***
5	33,80±3,03***
10	33,93±2,05***

Примечание – *результаты достоверны ($p < 0,001$) относительно контрольной группы (без фотодинамического воздействия).

Таблица 6 – Эффект фотодинамического воздействия, оказанный на проницаемость ГЭБ для *Evans Blue*, с использованием фотосенсибилизатора ZnPc

Доза лазерного излучения, Дж/см ²	Концентрация <i>Evans Blue</i> в мозге, мг/г ткани
(контроль)	0,37±0,02
2,5	17,44±1,02***
5	17,62±2,03***
10	17,62±1,03***

Примечание – *результаты достоверны ($p < 0,001$) относительно контрольной группы (без фотодинамического воздействия).

Как видно из приведенных данных, при всех выбранных дозах лазерного излучения наблюдался примерно одинаковый уровень накопления красителя в мозге. Значения концентрации внутри группы среди разных дозировок излучения несильно отличались друг от друга, что позволяет сделать вывод об отсутствии доза-зависимости для GalZnPc и ZnPc при данных дозах излучения.

Результаты с применением фотосенсибилизатора 5-АЛА и лазера 635 нм приведены в таблице 7.

Таблица 7 – Эффект фотодинамического воздействия на проницаемость ГЭБ для *Evans Blue* с использованием фотосенсибилизатора 5-АЛА

Доза лазерного излучения, Дж/см ²	Концентрация <i>Evans Blue</i> в мозге, мг/г ткани
(контроль)	0,37±0,02
2,5	1,18±0,08***
5	1,09±0,02***
10	8,97±0,05***

Примечание – *результаты достоверны ($p < 0,001$) относительно контрольной группы (без фотодинамического воздействия).

Проведение сравнительного анализа эффективности применения разных фотосенсибилизаторов в отношении повышения проницаемости ГЭБ показало, что 5-АЛА значительно меньше, чем другие фотосенсибилизаторы (AlPc, GalZnPc, TyrPc, ZnPc), оказывало воздействие на ГЭБ.

Среди фталоцианинов GalZnPc вызывал наиболее значительное повышение проницаемости ГЭБ к красителю *Evans Blue*: в 90,6 раз, в 91,35 раза и в 91,7 раз при дозах излучения 2,5; 5 и 10 Дж/см², что было примерно в 2 раза по отношению к TyrPc, ZnPc, AlPc и примерно в 9 раз по сравнению с 5-АЛА (Рисунок 3).

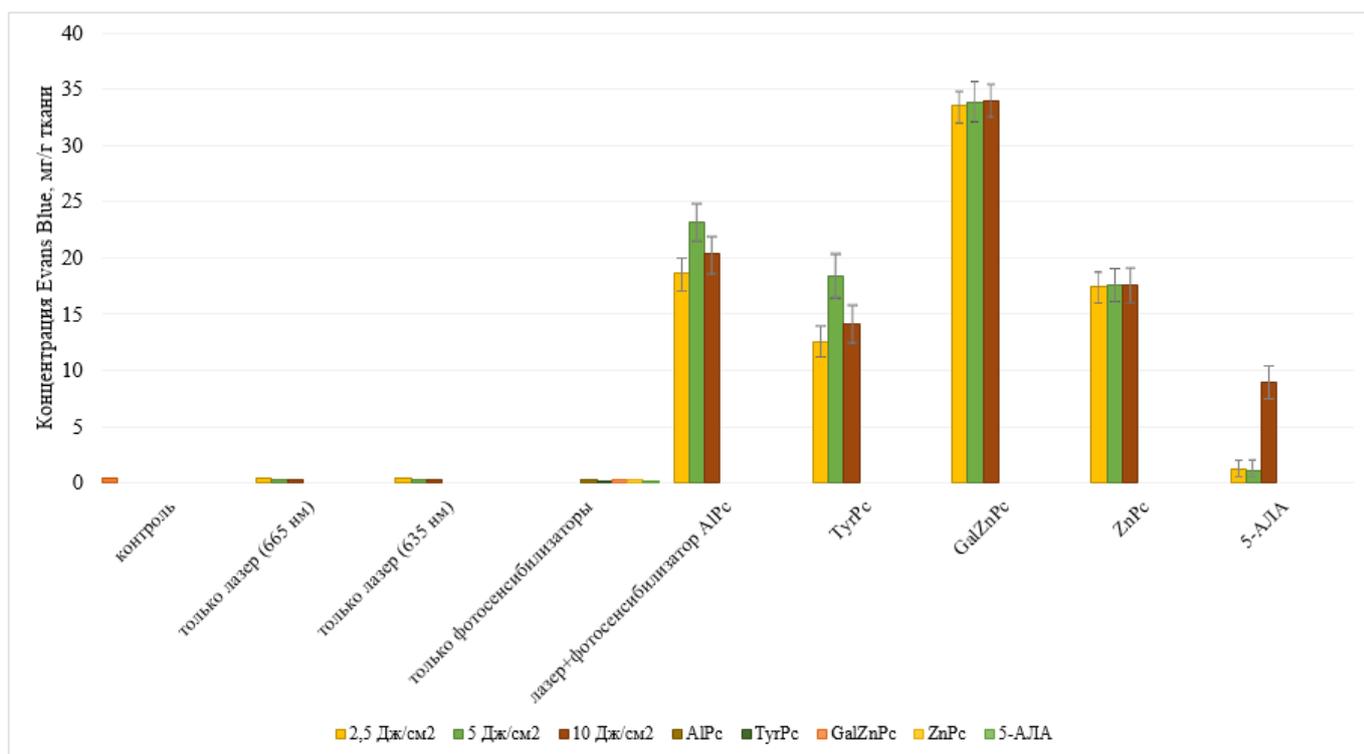


Рисунок 3 – Сравнение полученных данных для разных фотосенсибилизаторов и разных дозировок лазерного облучения; *** - $p < 0.001$ относительно контроля

На следующем этапе исследования мы провели качественный анализ проницаемости ГЭБ к FITC-декстрану 70 кДа. Для фотодинамического воздействия применили наиболее оптимальные параметры для лазерного излучения и наиболее эффективный фотосенсибилизатор, выявленные в ходе

ранее проведенных экспериментов в рамках данной научной работы. Оптимальной длиной волны лазера была 665 нм, доза оказываемого лазерного излучения составила 5 Дж/см², а наиболее эффективным фотосенсибилизатором был выбран GalZnPc. Для анализа результатов фотодинамического воздействия использовали метод конфокальной микроскопии с применением специфичного маркера NG2 для перицитов. Полученные результаты представлены на рисунке 4.

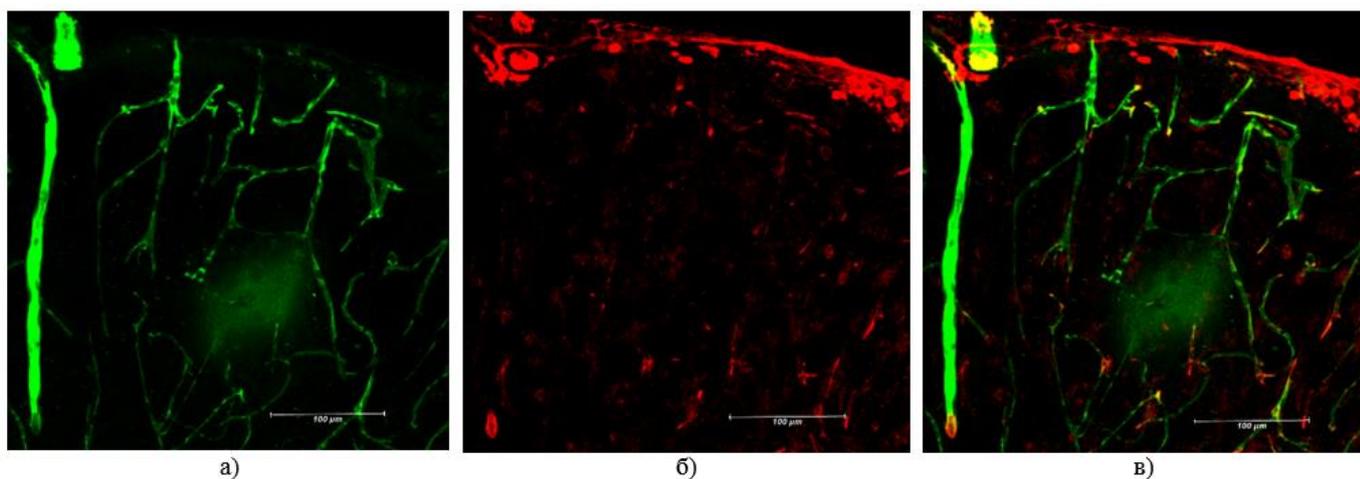


Рисунок 10 – Конфокальная микроскопия экстравазации FITC-декстрана из церебральных сосудов в ткани мозга с применением маркера перицитов NG2: а) кровеносные сосуды, заполненные FITC-декстраном, с видимым облаком экстравазации зонда; б) перициты, меченные с помощью специфичного маркера NG2; в) объединенные изображения церебральных сосудов, заполненных FITC-декстраном, и перицитов

Как видно из полученных изображений, FITC-декстран минует «вторую линию защиты» ГЭБ, т.е. преодолевает эндотелиальные клетки и перициты, что выражается наличием яркого зеленого облака FITC-декстрана, расположенного вокруг нескольких церебральных сосудов. Это свидетельствует о его экстравазации из церебральных капилляров в ткани головного мозга мыши.

Таким образом, фотодинамическое воздействие, оказываемое на длине волны 665 нм с дозой лазерного излучения, равной 5 Дж/см² и при введении

фотосенсибилизатора GalZnPc, является эффективным для повышения проницаемости ГЭБ к высокомолекулярным веществам (в данном случае к FITC-декстрану).

Выводы

1. Фотодинамическое воздействие, включая комбинированные эффекты лазеров 665 нм и AlPc, GalZnPc, TurgPc, ZnPc, а также лазера 635 нм и 5-АЛА, значительно повышает проницаемость ГЭБ к красителю *Evans Blue*, что не наблюдается в условиях изолированного применения лазеров и фотосенсибилизаторов;

2. Фотодинамическое воздействие оказывает доза-зависимые эффекты на ГЭБ, который открывается наиболее значительно при малых и средних дозах излучения, в то время как высокоинтенсивное воздействие, напротив, снижает эффективность повышения проницаемости ГЭБ;

3. 5-АЛА значительно меньше, чем AlPc, GalZnPc, TurgPc, ZnPc, оказывает воздействие на ГЭБ. Среди фталоцианинов GalZnPc вызывает примерно в 2 раза более выраженное повышение проницаемости ГЭБ по отношению к TurgPc, ZnPc, AlPc и примерно в 9 раз по сравнению с 5-АЛА;

4. Конфокальный качественный анализ показал, что фталоцианин GalZnPc, используемый в качестве фотосенсибилизатора при оказании фотодинамического воздействия эффективно повышает проницаемость ГЭБ к FITC-декстрану.

