

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

Кафедра физиологии человека и животных

**ИЗМЕНЕНИЕ ПРОНИЦАЕМОСТИ ГЕМАТОЭНЦЕФАЛИЧЕСКОГО
БАРЬЕРА ПРИ РАЗВИТИИ ГЛИОМЫ У КРЫС**

АВТОРЕФЕРАТ

Студента 2 курса 241 группы

Специальности 06.04.01 Биология

Биологического факультета

Хороводова Александра Петровича

Научный руководитель:
доцент, докт.биол.наук



О. В. Семячкина-Глушковская

Зав. кафедрой:
доцент, докт.биол.наук



О. В. Семячкина-Глушковская

Саратов 2019

ВВЕДЕНИЕ

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, менее 5% пациентов живут дольше 5 лет из-за 80% рецидива агрессивной глиомы. Высокая частота рецидивов, плохая реакция на лечение и низкие показатели продолжительности жизни делают злокачественную глиому наиболее опасным новообразованием.

Глиома быстро распространяется и может колонизировать весь мозг, так как опухолевые инвазивные клетки довольно быстро распространяются далеко за пределы основной массы опухоли. Образование глиомы характеризуется высокой плотностью микрососудов, в которых выявляется масса дефектов, аномальная морфология и нарушение проницаемости гематоэнцефалического барьера (ГЭБ). Несмотря на многочисленные исследования формирования и прогрессирования глиомы, состояние ГЭБ на фоне развития опухоли, остаются малоизученными.

В последнее десятилетие стало очевидным, что связанная с стрессом активация симпатической нервной системы играет важную роль в развитии опухоли и регуляции микрососудов мозга. Клинические исследования показывают, что глиома часто ассоциируется с высоким уровнем катехоламинов, а блокада бета 2-адренорецепторов (бета-2-АР) улучшает результаты лечения больных раком. Вовлечение бета-2-АР и бета-аррестина-1 как ко-фактора сигнальной трансмембранной передачи нервного импульса в развитие различных форм онкологии показано во многих исследованиях. Изучение роли адренергических механизмов в прогрессировании глиомы рассматривается как перспективное направление в развитии новых фармакологических стратегий в терапии заболевания. В этом направлении большое внимание уделяется исследованию вклада бета-2-АР в механизмы, ответственные за прогрессирование глиомы.

Целью данной работы явилось изучение адренергических механизмов нарушения барьерной функции сосудов мозга при прогрессировании глиомы у крыс.

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

1. Изучить миграцию клеток глиомы с применением конфокальной микроскопии и гистологического анализа тканей мозга;
2. Изучить влияние фармакологической модуляции бета-2-адренорецепторов на продолжительность жизни крыс с глиомой;
3. Изучить проницаемость гематоэнцефалического барьера на разных стадиях развития глиомы у крыс под действием блокаторов и стимуляторов бета-2-адренорецепторов;

Основная часть

На современном этапе развития медицины большой проблемой являются различные заболевания ЦНС. Существует около 7000 лекарств для лечения заболеваний центральной нервной системы, которые зарегистрированы в базе данных по комплексной медицинской химии, но только 5% из них являются эффективными. Препятствием для большинства лекарственных препаратов является наличие в нашем организме гематоэнцефалического барьера.

Гематоэнцефалический барьер — это специализированная система, включающая в себя церебральные эндотелиоциты, базальную мембрану, перициты и астроциты. ГЭБ отделяет центральную нервную систему от циркулирующей крови. ГЭБ выполняет барьерную, транспортную, нейросекреторную, метаболическую и иммунную функции, без которых нормальное функционирование ЦНС невозможно. ГЭБ позволяет проникать в мозг необходимые питательные вещества, одновременно блокируя другие элементы.

Глиома – это опухоль, развивающаяся из глиальной ткани. Эта опухоль часто приводит к летальному исходу, несмотря на современные методы лечения. Несмотря на десятилетний прогресс, как в понимании молекулярного патогенеза глиом, так и имеющихся клинических исследований, злокачественные глиомы остаются почти всегда неизлечимыми.

Адренорецепторы— рецепторы к адренэргическим веществам. Все адренорецепторы относятся к GPCR. Реагируют на адреналин и норадреналин. Различают несколько групп рецепторов, которые различаются по опосредуемым эффектам, локализации, а также аффинитету к различным веществам: α_1 -, α_2 -, β_1 -, β_2 , β_3 -адренорецепторы.

Исследования показали, что несколько типов опухолей у пациентов экспрессируют адренорецепторы, включая такие раковые заболевания как: рак поджелудочной железы, рак легких, меланому и рак простаты. По мере того как стало очевидно, что блокада адренэргической системы может ингибировать

рост опухоли в доклинических моделях, проводили эпидемиологические исследования.

Материалы исследования

Эксперименты проводились на самцах белых беспородных крыс массой 250 г. Все процедуры были выполнены в соответствии с «Руководством по уходу и эксплуатации лабораторных животных». Протокол эксперимента одобрен Комитетом по уходу и эксплуатации лабораторных животных Саратовского государственного университета (Протокол 7, 07.02.2018).

Методы исследования

Экспериментальные животные были разделены на три группы:

- 1) крысы с глиомой (контроль), которые получали физиологический раствор в том же объеме, что препараты, модулирующие активность бета-2-АР;
- 2) крысы с глиомой, которым вводили изопротеренол (агонистом бета-2-АР, 25 мг / кг / день, per os, Sigma, Сент-Луис, Миссури, США);
- 3) крысы с глиомой, которым вводили ICI-118551 (специфический антагонист бета-2-АР, 25 мг / кг / день, per os, Sigma, Сент-Луис, Миссури, США). Крысам вводили препараты в течение всех дней после имплантации раковых клеток.

Три указанные группы были разделены на 4 подгруппы: 3-7-10-28 дней (в каждой подгруппе 10 животных) после инъекции раковых клеток. Для конфокальной визуализации, спектрофлюориметрического анализа экстравазации ЕВ, гистологического анализа тканей головного мозга выделялось по 4 указанных выше подгруппы экспериментальных животных (через 3-7-10-28 дней после инъекции раковых клеток).

Для оценки макрофагальной инфильтрации через ГЭБ по одному животному в каждой группе вводили интервенозно 0,5 мл суспензии клеток флуоресцентных макрофагов.

Время жизни животных оценивали у 10 крыс из трех основных групп (контроль, ICI-118551 и изопротеренол), в этих группах крысы жили до естественной смерти.

Результаты исследования

Первый этап работы заключался в *in vivo* анализе миграции глиомных клеток из основной массы опухоли мозга у крыс. Анализ осуществлялся с применением конфокальной микроскопии и гистологии

На рисунке 3 представлены изображения клеток флуоресцентной глиомы и сосудов головного мозга, которые окружают опухоль.

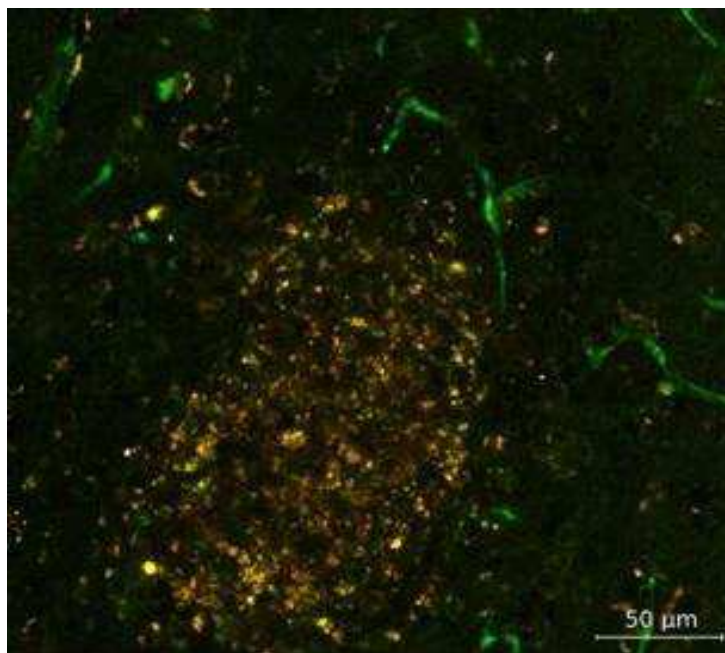


Рисунок 3 – Конфокальный анализ флуоресцентной глиомы (желтый цвет) и сосудов мозга (зеленый цвет), заполненных зеленым FITC-декстраном

Гистологический анализ тканей мозга показал клеточный полиморфизм. То есть форма и размер клеток сильно варьирует. Ядра в основном крупные, резко полиморфные, гиперхромные, так же наблюдается высокое ядерно-цитоплазматическое соотношение. Эти перечисленные морфологические признаки характерны для глиомы.

На рисунке 7 два красными стрелками обозначено направление миграции клеток глиомы от основной массы опухоли в здоровую ткань головного мозга.

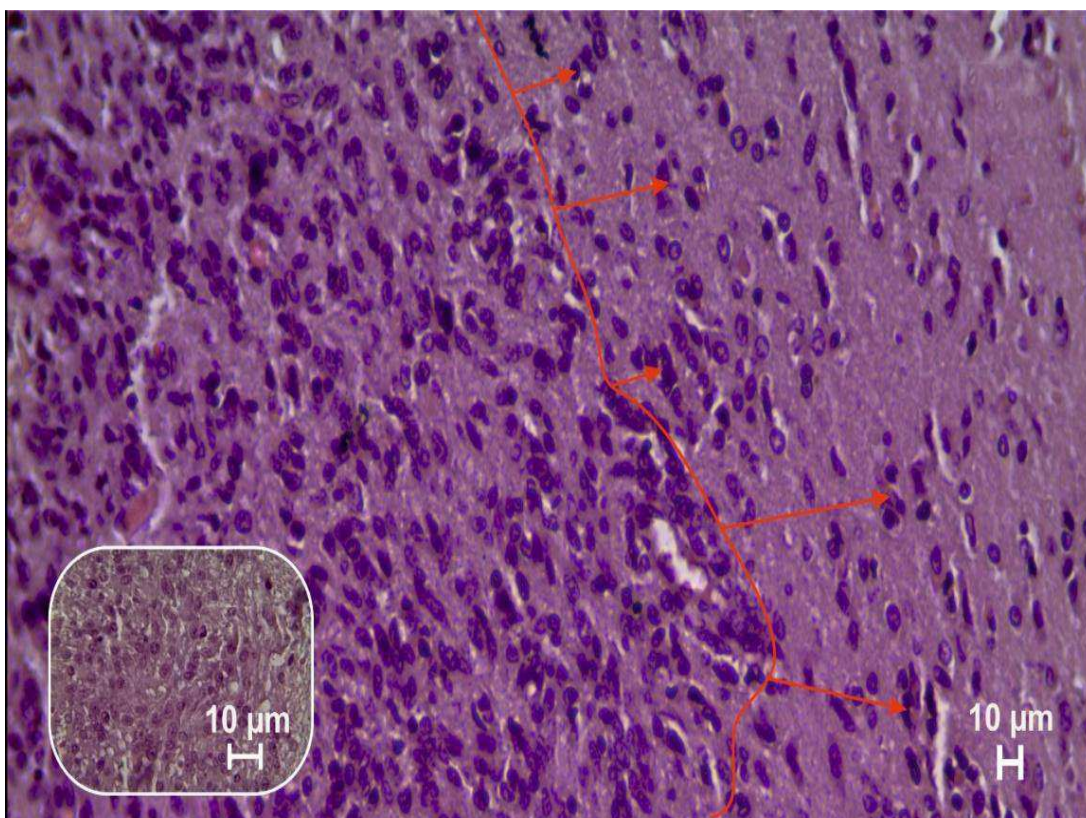


Рисунок 4 – Гистологический анализ миграции клеток глиомы

В полученных результатах исследования наблюдалась миграция опухоли у 40% (4 из 10) крыс в период между 14 и 28 днями после имплантации раковых клеток по данным гистологии и конфокального анализа. КГ распространялись по сосудам головного мозга от основной массы к здоровой ткани (рисунок 5).

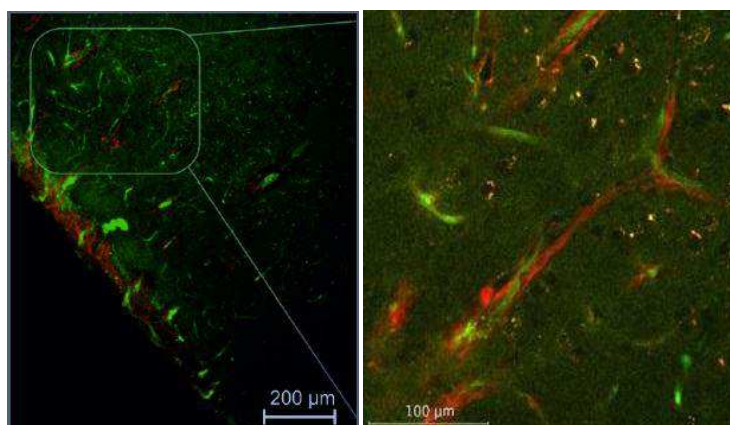


Рисунок 5 - Миграция глиомных клеток (красный цвет) по сосудам (зеленый цвет) головного мозга

Таким образом, в результате конфокального и гистологического анализа было показано, что клеток глиомы мигрируют от основной массы опухоли по кровеносным сосудам в здоровую ткань головного мозга.

3.2 Результаты исследования эффектов фармакологической модуляции бета-2-АР на продолжительность жизни крыс с глиомой

Поскольку на первом этапе было выявлено, что глиома при ее развитии мигрирует по сосудам мозга, на втором этапе исследований была поставлена задача: изучить влияние фармакологической модуляции бета-2-адренорецепторов на продолжительность жизни крыс с глиомой.

На основании фактов, что на фоне применения блокады бета-2-АР снижается метастазирование опухолей, была выдвинута гипотеза о том, что подавление активности указанных рецепторов будет способствовать снижению метастазированию глиомы у крыс.

Для тестирования гипотезы изучали продолжительность жизни крыс с глиомой на фоне фармакологической модуляции бета-2-АР.

Средняя продолжительность жизни животных получавших, изопротеренол, являющийся стимулятором бета-2-АР, составила 18-22 дня относительно контрольной группы (средняя продолжительность жизни животных, не подвергавшихся фармакологическому воздействию, составила 28 дней).

Блокада бета-2-АР позволила увеличить продолжительность жизни животных до 45 дней, у контрольных животных продолжительность жизни составляла в среднем 28 дней. В этой группе 20% крыс (2 из 10) продемонстрировали метастазирование, которое было в 2 раза меньше по сравнению с контрольной группой (40 %).

Таким образом, блокада бета-2-АР ICI-118551 увеличивает продолжительность жизни крыс с глиомой. Стимуляция бета-2-АР изопротеренолом, напротив, уменьшает срок жизни животных. Результаты, полученные в ходе исследования, подтверждают возможность создания новой

терапевтической стратегии предотвращения прогрессирования глиомы с применением блокаторов бета-2-АР.

3.3 Результаты исследования проницаемости гематоэнцефалического барьера на разных стадиях развития глиомы у крыс под действием блокаторов и стимуляторов бета-2-адренорецепторов

В последующей серии экспериментов исследовали изменение проницаемости ГЭБ для комплекса ЕВ-альбумин на разных стадиях формирования глиомы и влияние на эти процессы фармакологической модуляции бета-2-АР. Также изучали проницаемость ГЭБ для макрофагов крови, как признака активации иммунных процессов защиты и показателя серьезного повреждения ГЭБ.

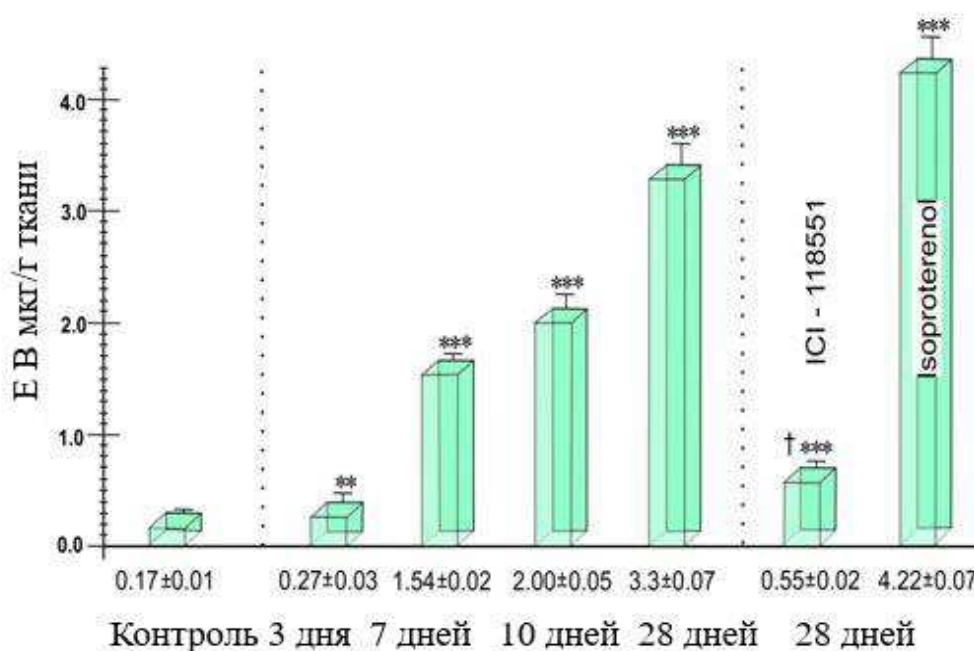


Рисунок 6 - Спектрофлуориметрический анализ экстравазации ЕВ из церебральных сосудов в ткани на фоне фармакологической модуляции бета-2-АР: ** - $p < 0.01$ и *** - $p < 0.001$ относительно контроля; † - между группами с фармакологической модуляцией бета-2-АР

На рисунке 6 показано постепенное увеличение проницаемости ГЭБ к ЕВ через 3–7–10–28 дней после имплантации КГ, что свидетельствует о прогрессировании нарушения ГЭБ с ростом глиомы без фармакологической модуляции бета-2-АР.

Также наблюдалось миграция макрофагов через открытый ГЭБ в паренхиму мозга (рисунок 7).

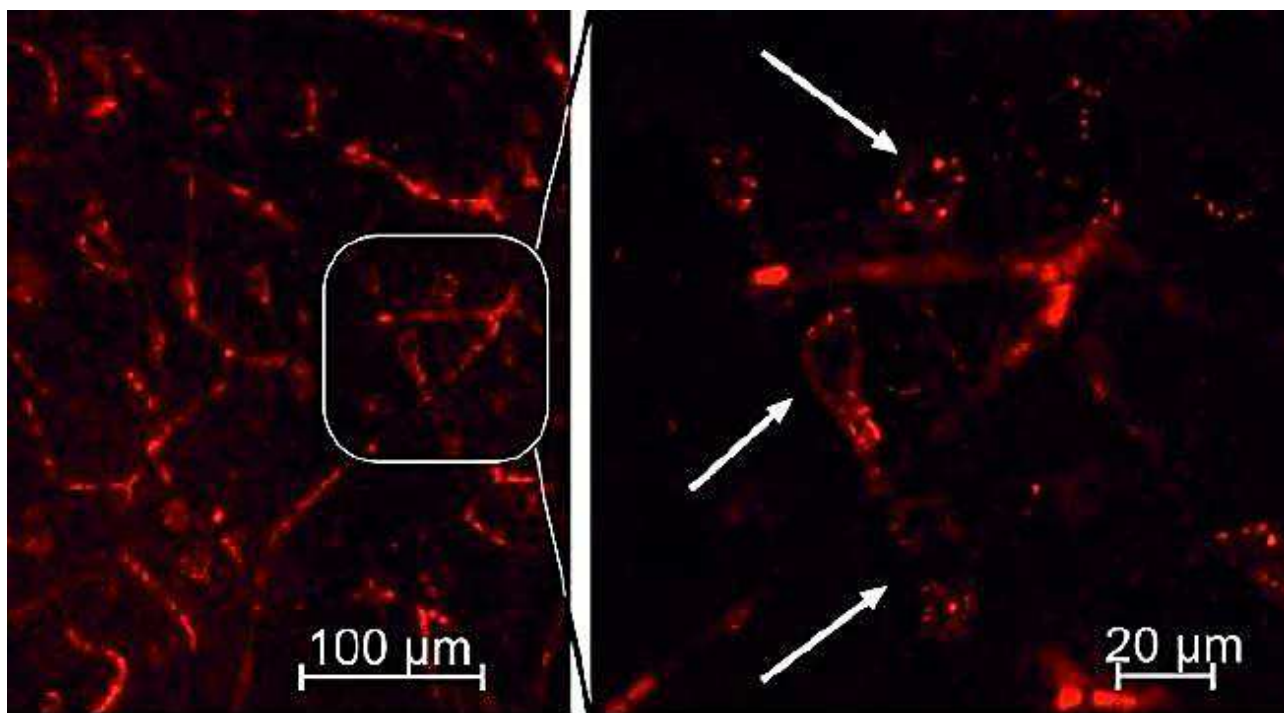


Рисунок 7 - Миграция макрофагов через открытый ГЭБ в паренхиму мозга

Так в ходе нашего исследования было показано, что блокада бета-2- АР ICI-118551 посредством адренергических механизмов снижала степень деструкции ГЭБ. Так же в ходе активации иммунных процессов защиты и показателя серьезного повреждения наблюдалось миграция макрофагов через открытый ГЭБ в паренхиму мозга.

ВЫВОДЫ

1. В результате конфокального и гистологического анализа было показано, что КГ мигрируют от основной массы опухоли по кровеносным сосудам в здоровую ткань головного мозга.
2. Блокада бета-2- АР ICI-118551 увеличивает продолжительность жизни крыс с глиомой. Стимуляция бета-2- АР изопротеренолом, напротив, уменьшает срок жизни животных.
3. Фармакологическая блокада бета-2- АР ICI-118551 сопровождается меньшим повреждением ГЭБ по сравнению со стимуляцией данного типа рецепторов изопротеренолом.
4. Практическая значимость полученных научных результатов состоит в получении принципиально новых знаний об адренергических механизмах метастазирования опухоли мозга и сопровождающие этот процесс нарушения ГЭБ. Научные данные о возможности улучшать состояние животных с глиомой и проницаемость ГЭБ на фоне приема блокаторов бета-2- АР может явиться новым направлением в лечении глиомы с целью стабилизации ее роста и предотвращения развития метастазов.

05.06.2019

