

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

Кафедра физиологии человека и животных

**ВОЗРАСТНЫЕ РАЗЛИЧИЯ ПРОНИЦАЕМОСТИ
ГЕМАТОЭНЦЕФАЛИЧЕСКОГО БАРЬЕРА ПОСЛЕ
ФОТОДИНАМИЧЕСКОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ**

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 2 курса 241 группы

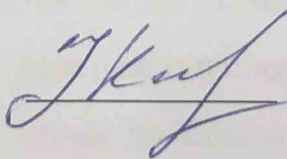
Направления подготовки магистратуры 06.04.01 Биология

Биологического факультета

Мамедовой Айсел Тофик кызы

Научный руководитель

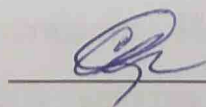
д.ф-м.н., профессор



Ю. Г. Куртц

Зав.кафедрой

д.б.н., доцент



О. В. Семячкина-Глушковская

Саратов 2019

Введение. Фотодинамическое воздействие (ФДВ) – малоинвазивный терапевтический способ лечения заболеваний центральной нервной системы (ЦНС), включая злокачественные опухоли головного мозга как у взрослых, так и у молодых пациентов. Фотодинамическая терапия (ФДТ) открывает новые возможности в диагностике и лечении различных заболеваний. ФДТ является результатом комбинированного действия трех нетоксичных компонентов - фотосенсибилизатора, света и кислорода. Противоопухолевые эффекты данного вида лечения обусловлены комбинацией прямого фотоповреждения клеток, разрушения сосудистой сети опухоли и активации иммунного ответа [1].

Для диагностики вводится фотосенсибилизатор природного или искусственного происхождения, который избирательно накапливается в опухоли, связываясь с окружающими здоровыми тканями. Это обеспечивает диагностический эффект ФДТ и помогает хирургу увидеть границы опухоли при возбуждении флуоресценции красителя.

Однако открытия последних лет выявили совершенно новые сосудистые эффекты ФДВ, которые проявляются в повышении проницаемости ГЭБ в локальной точке мозга. Например, в исследованиях Madsen, Hirschberg впервые было показано, что применение лазера и фотосенсибилизатора в больших дозах приводит к открытию ГЭБ и появлению вазогенного отека [2, 3, 4].

Новые открытия эффектов ФДВ стимулировали пересмотр правил применения этого метода для лечения онкологии мозга, в частности, разных форм глиом. Встал вопрос о более глубоком изучении механизмов ФДВ и исследование особенностей применения фотодинамического лечения опухолей мозга у пациентов разного возраста. Известно, что одним из побочных эффектов после применения ФДВ является развитие вазогенного отека. В свете новых сведений о влиянии ФДВ на проницаемость ГЭБ, стало очевидно, что это может быть связано с ФДВ-открытием ГЭБ для жидкостей. Для оптимизации применения ФДВ в медицинской практике и более глубокого

понимания механизмов ФДВ на сосуды мозга актуальным является изучение влияния разных доз ФДВ на ГЭБ с учетом возраста испытуемых.

Целью данной работы было выявление возрастных различий в проницаемости гематоэнцефалического барьера после фотодинамического воздействия.

Для достижения поставленной цели были сформулированы задачи:

1. Оценить доза-зависимые изменения проницаемости ГЭБ после ФДВ (длина волны 635 нм + 5-АЛА/Пр IX) разной интенсивности (10-20-30-40 Дж/см²) на основе спектрофлуориметрического определения содержания Evans Blue в тканях мозга мышей разного возраста (4 и 8 недель);

2. Провести конфокальный анализ проницаемости ГЭБ к FITC-декстрану 70 кДа под ФДВ разной интенсивности (10-20-30-40 Дж/см²) у мышей разного возраста (4 и 8 недель);

3. Определение оптимальной дозы ФДВ, эффективного для повышения проницаемости ГЭБ с учетом возраста мышей;

4. Провести качественный анализ ФТВ-зависимого открытия ГЭБ у мышей разного возраста (4 и 8 недель) с использованием оптимальной дозы ФДВ и применением маркеров нейроваскулярной единицы с последующим конфокальным анализом.

Структура и объем работы. Дипломная работа состоит из введения, 2 глав (обзор литературы и экспериментальной части), заключения, выводов, списка используемых источников. Список литературы включает 48 источников на русском и английском языках. Работа изложена на 48 страницах машинописного текста.

Основное содержание работы. Работа выполнена на базе кафедры физиологии человека и животных Саратовского Государственного Университета имени Н. Г. Чернышевского, ЦКП «Симбиоз» ИБФРМ РАН и Саратовского Государственного Медицинского Университета имени В. И. Разумовского.

Эксперименты проводились на беспородных мышах ($n = 168$) в возрасте 4 и 8 недель. 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.

Экспериментальные животные были разделены на две группы по возрастам:

1 группа – мыши в возрасте 4 недель;

2 группа – мыши в возрасте 8 недель.

Далее указанные группы делились на подгруппы, с учетом контроля и в зависимости от воздействия разных доз лазера. Каждая подгруппа включала по 6 животных.

Фотодинамическое воздействие проводилось с помощью лазера длиной волны 635 нм под общей анестезией (ксиланит – 10 мг/кг и золетил – 10 мг/кг). За 20 минут до начала лазерного воздействия вводили фотосенсибилизатор – аминолевулиновую кислоту (5-АЛА/Пр IX) в дозе 20 мг/кг (доза рекомендована для применения ФДВ у людей). [43]. Процедуру ФДВ проводили с помощью оптического просветления.

Использовали неимпульсный лазер 635 нм (XPeBRD-L1-0000-00901, CREE, Inc.) с напряжением 1 Вт с ранжированием дозы от 10 - 200 Дж/см². Для достижения дозы лазерного воздействия 10 Дж/см², 20 Дж/см², 30 Дж/см², 40 Дж/см² лазерную иррадиацию осуществляли в течение 4-х минут и 23-х секунд.

Оценку содержания красителя в тканях мозга проводили с помощью спектрофлуориметрического метода в соответствии с рекомендациями оценки состояния ГЭБ с применением красителя Evans Blue [46].

По результатам, представленным в таблице 1, можно сделать вывод о том, что у мышей обоих возрастов во всех контрольных группах не наблюдалось никаких изменений в проницаемости гематоэнцефалического барьера.

Тем не менее, нами были обнаружены значительные возрастные различия проницаемости гематоэнцефалического барьера с помощью фотодинамического воздействия спустя 1,5 и 4 часа (рисунки 6-7). Действие лазера при 10 Дж/см² и 20 Дж/см² были в 1,7 и в 1,6 раза выше у мышей в возрасте 4 недель, по сравнению с 8-недельными животными.

Спустя четыре часа после фотодинамического воздействия содержание EVd в головном мозге мышей в возрасте 4–8 недель с различными дозами облучения вернулось в нормальное состояние, что указывает на восстановление гематоэнцефалического барьера.

Таким образом, результат спектрофлуориметрического анализа позволил выявить возрастные различия в ФДТ-опосредованном открытии ГЭБ, которые проявлялись при использовании оптимальных доз ФДВ (10 Дж/см² и 20 Дж/см²). Высокие дозы ФДТ – 30 Дж/см² и 40 Дж/см² не сопровождалось повышением проницаемости ГЭБ и не наблюдалось возрастных различий в экстравазации Evans Blue из церебральных сосудов в ткани головного мозга.

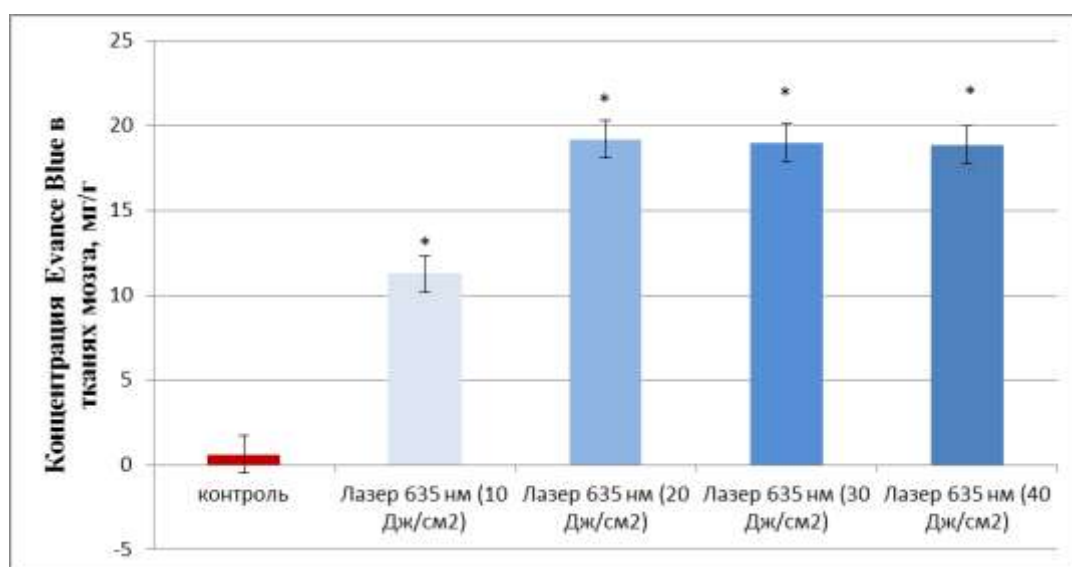


Рисунок 6 – Фотодинамическое повышение проницаемости ГЭБ к красителю Evans Blue у мышей 4-недельного возраста: * - $p < 0.05$ относительно контроля

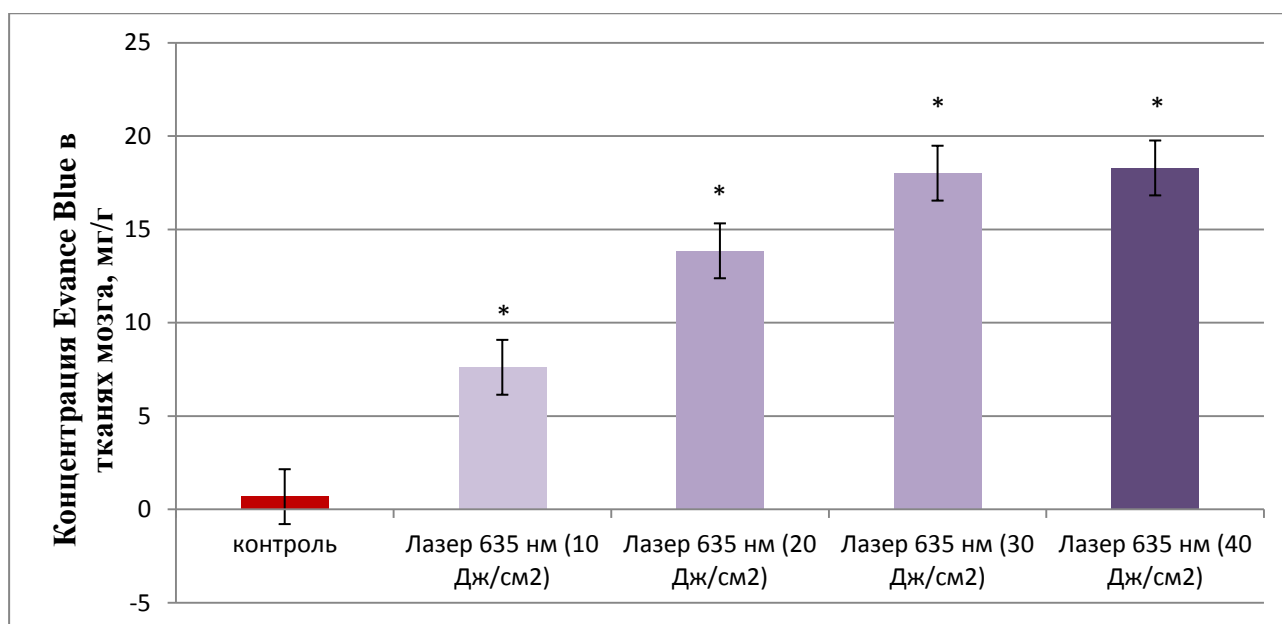


Рисунок 7 – Фотодинамическое повышение проницаемости ГЭБ к красителю Evans Blue у мышей 8-недельного возраста: * - $p < 0.05$ относительно контроля

Вторым этапом оценки состояния гематоэнцефалического барьера включал в себя конфокальную микроскопию (Olympus FV10i-W, Olympus, Japan) к FITC-декстрану 70 кДа.

Оценку интенсивности экстравазации FITC-декстрана проводили в соответствии с рекомендациями, представленными в публикации (таблица 2) [48].

Экстравазацию FITC-декстрана устанавливали как образование флуоресцентного облака, четко визуализируемого в периваскулярном пространстве.

Слабая экстравазация (+) была определена образованием облака, четко связанного с одним участком утечки сосуда. Средняя экстравазация (++) определялась как яркое флуоресцентное облако, четко связанное с местом утечки FITC-декстрана из одного сосуда. Сильная экстравазация (+++) характеризовалась наличием яркого флуоресцентного облака, четко связанное с

Таблица 2 – Систематизация оценки уровня экстравазации FITC - декстрана из сосудов мозга в его ткани

Дозы ФДВ	Интенсивность экстравазации декстрана	
	4 недели	8 недель
Возраст		
Контроль	/	/
10 Дж/см ²	+++	+
20 Дж/см ²	+++	++
30 Дж/см ²	++++	+++
40 Дж/см ²	++++	++++

Примечание: / - нет экстравазации; + - слабая; ++ - средняя; +++ - сильная; ++++ - диффузная

группой сосудов. Диффузная экстравазация (++++) определялась как обширный выход FITC- декстрана во многих местах головного мозга без четких границ у конкретных сосудов.

Результаты исследования представлены на рисунке 8.

Слабое ФДВ (10 Дж/см²) сопровождалось возрастными различиями в открытии ГЭБ. Так, у 4-х недельных мышей наблюдалась сильная экстравазация FITC-декстрана, которая проявлялась в появлении сильной периваскулярной флуоресценции зонда вокруг группы сосудов мозга, в то время как у 8-ми недельных животных наблюдалась слабая экстравазация FITC-декстрана в виде слабой флуоресценции зонда вокруг одного церебрального сосуда. ФТД (20 Дж/см²) сопровождалось теми же изменениями в проницаемости ГЭБ для FITC-декстрана у 4-х недельных мышей и проявлением более сильной экстравазации у 8-ми недельных животных.

Важно отметить, что дальнейшее повышение интенсивности ФДВ до 30 Дж/см² и 40 Дж/см² не приводило к повышению проницаемости ГЭБ к FITC-декстрану ни у мышей ювенильного возраста, ни у взрослых особей. Поэтому на этих дозах ФДТ не отмечалось возрастных различий в открытии ГЭБ.

Данные результаты с использованием конфокальной микроскопии выхода FITC-декстрана из сосудов головного мозга мышей в его ткани ясно показывают, что открытие ГЭБ с помощью ФДВ зависит от доз лазера и возраста мышей. Для низких и средних лучевых воздействий (10–20 Дж/см²) у 4-х недельных мышей наблюдаются более значительные изменения в проницаемости ГЭБ для FITC-декстрана по сравнению с 8-ми недельными мышами при высоких облучениях (30–40 Дж/см²), что вызывает нарушение гематоэнцефалического барьера в обеих возрастных группах.

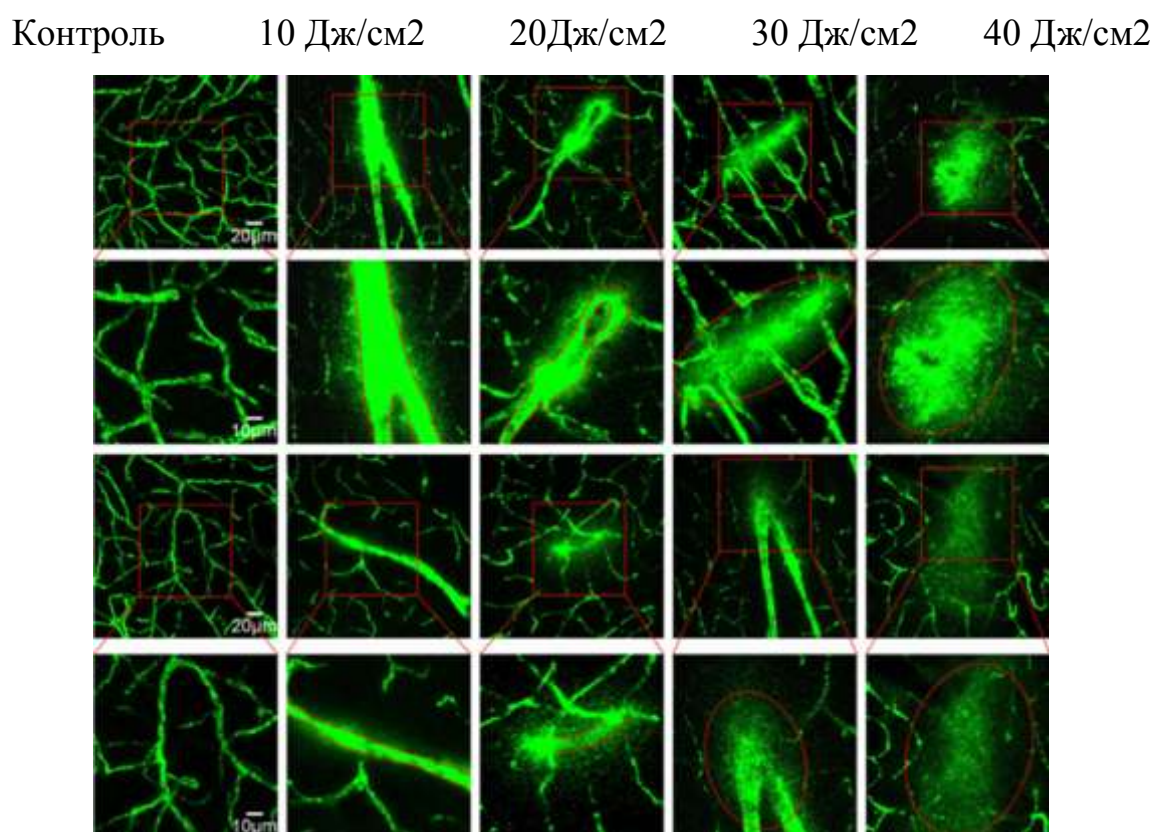
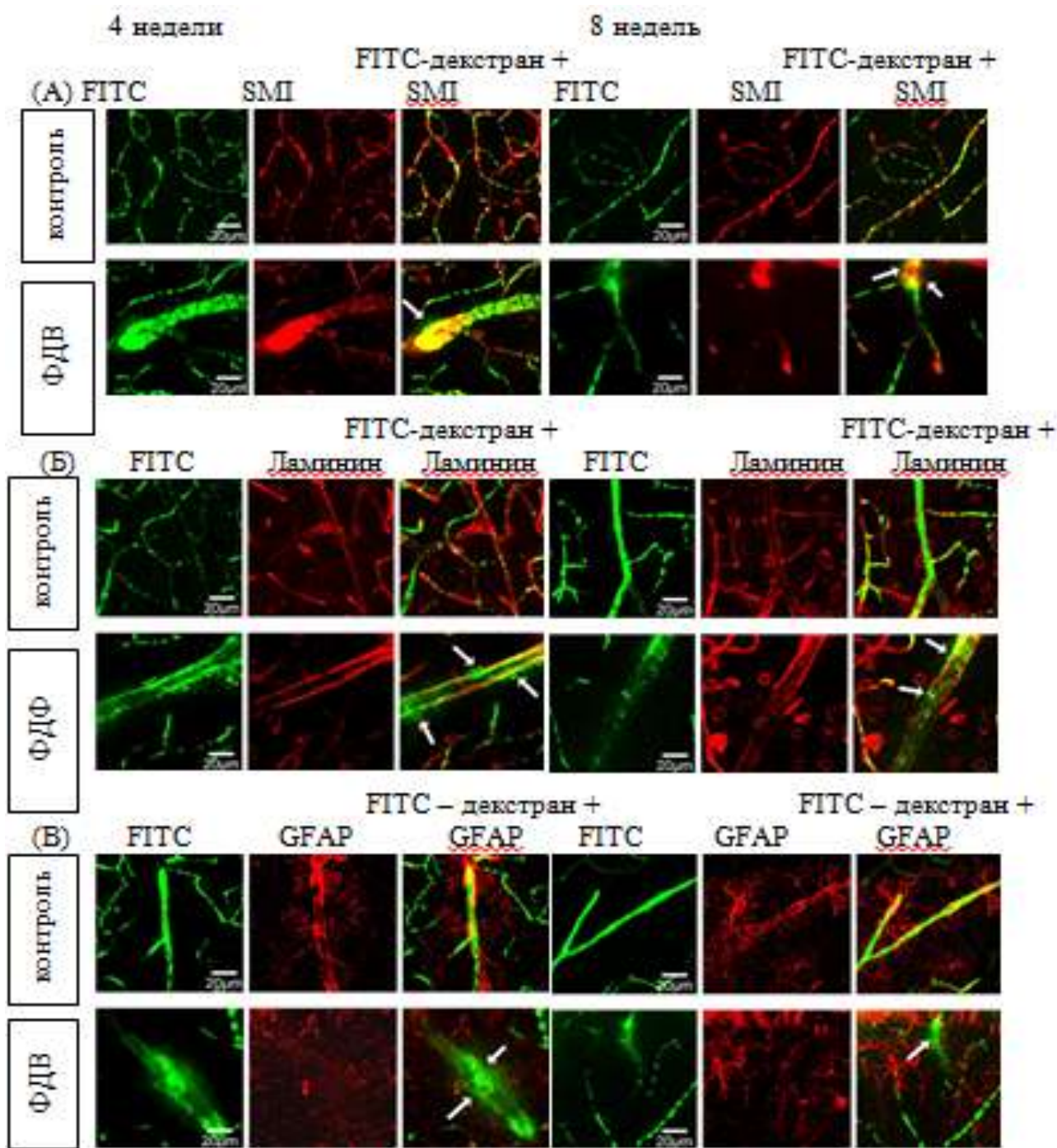


Рисунок 8 - Результаты конфокальной микроскопии экстравазации декстрана 70 кДа из сосудов мозга в его ткани у мышей разного возраста



Зеленая окраска - FITC-декстран

Красная окраска - SMI

Рисунок 9 - Конфокальная микроскопия экстравазации FITC-декстрана из церебральных сосудов в ткани мозга с применением специфических маркеров эндотелиальных клеток - SMI, базальной мембраны – ламинин и астроцитов – GFAP. Белыми стрелками указаны места выхода FITC-декстрана за пределы сосудов головного мозга

Рисунок 9 (А) демонстрирует утечку FITC-декстрана за пределы эндотелиальных клеток сосудов головного мозга, помеченных SM1.

На рисунке 9 (Б) показан выход FITC-декстрана за пределы базальной мембраны, обозначенный антителами ламинина, являющийся одним из белков базальной мембраны.

Рисунок 9 (В) иллюстрирует экстравазацию FITC-декстрана из сосудов головного мозга в ткани мозга среди астроцитов.

Полученные экспериментальные данные ясно показывают, что выбранный индикатор FITC-декстрана успешно пересекает все элементы гематоэнцефалического барьера, включая церебральный эндотелий, базальную мембрану и астроциты после фотодинамического воздействия.

Чтобы проанализировать морфологические изменения в тканях мозга и церебральных сосудах после ФДТ с использованием различных лучевых воздействий, мы провели гистологические исследования на мышцах обоих возрастов (рисунок 10).

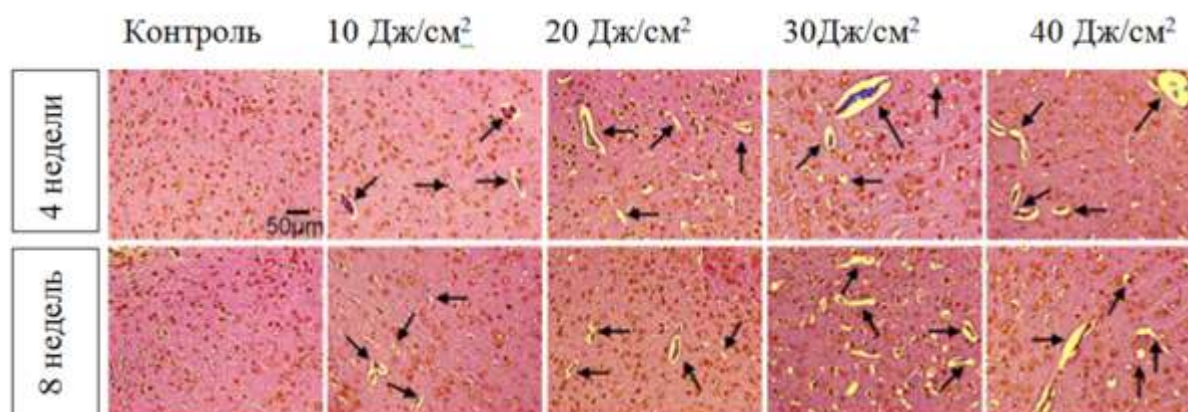


Рисунок 10 - Результаты гистологического анализа ФДВ на сосуды мозга у мышей разного возраста. Черными стрелками указаны периваскулярный отек

Важным результатом явился тот факт, что, несмотря на проведение фотодинамического воздействия без повреждения черепа, данное воздействие сопровождалось в 100% случаев развитием периваскулярной эдемы (пустое пространство вокруг сосудов головного мозга), интенсивность которой напрямую зависела от дозы ФДВ. При этом повреждающие эффекты ФДВ в

отношении церебральных сосудов были более выраженными у крыс 4 недельного возраста по сравнению с 8-ми недельными животными. Одним из механизмов, ответственных за обширное накопление жидкости в периваскулярном пространстве мозга, является нарушение комплекса плотных контактов и нарушение в контроле экспрессии аквапориновых каналов в астроцитах и эндотелии сосудов.

Выводы

1. В ходе данного исследования было установлено, что фотодинамическое воздействие вызывает доза-зависимое повышение проницаемости ГЭБ для высокомолекулярных соединений, таких как Evans Blue (EBd) - 68,5 кДа - и FITC-декстран - 70 кДа у мышей обоих возрастов. Были установлены оптимальные дозы ФДЗ 10 Дж/см² и 20 Дж/см² с наименьшими изменениями в морфологии сосудов и тканей мозга.

2. Фотодинамическое воздействие в 100% случаев сопровождается развитием периваскулярной эдемы, интенсивность которой напрямую зависит от дозы ФДВ. Повреждающие эффекты ФДВ в отношении церебральных сосудов более выражены у крыс 4-х недельного возраста по сравнению с 8-ми недельными животными.

3. Полученные результаты являются важной информационной платформой для нового применения фотодинамического воздействия в качестве метода доставки лекарств в мозг, особенно в послеоперационном лечении опухолей мозга.