

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

Кафедра физиологии человека и животных

МЕХАНИЗМЫ ОБРАТИМОГО ПОВЫШЕНИЯ ПРОНИЦАЕМОСТИ  
ГЕМАТОЭНЦЕФАЛИЧЕСКОГО БАРЬЕРА В УСЛОВИЯХ ПРЯМОЙ  
ГЕНЕРАЦИИ СИНГЛЕТНОГО КИСЛОРОДА

АВТОРЕФЕРАТ

Студентки 5 курса 531 группы

Специальности 06.05.01 Биоинженерия и биоинформатика

Биологического факультета

Кузнецовой Эльвиры Георгиевны

Научный руководитель

доцент, к. б. н.



Е.И. Саранцева

Зав. кафедрой

д.б.н., доцент



О. В. Семячкина–Глушковская

Саратов 2019

## ВВЕДЕНИЕ

Одним из основных факторов, определяющих патофизиологические изменения в центральной нервной системе (ЦНС), в частности головном мозге являются различные заболевания, например, доброкачественные опухоли – менингиомы, гемангиобластомы, злокачественные опухоли – глиомы, саркомы, а также болезнь Альцгеймера, синдром Норман-Робертса, сонный паралич, менингит, энцефалит, полиомиелит, нейросифилис, рассеянный склероз, эпилепсия. Наиболее опасной и трудно излечимой является глиома головного мозга.

Глиома – это опухоль, развивающаяся из глиальной ткани. Это распространенная опухоль, которая часто приводит к летальному исходу, несмотря на современные методы лечения. По сравнению с другими типами опухолей, глиомы сложнее лечить из-за гематоэнцефалического барьера. ГЭБ является защитой для паренхимы мозга от потенциально вредных посторонних веществ. В то же время ГЭБ представляет собой препятствие и для потенциально эффективных терапевтических агентов у пациентов с болезнью ЦНС. Это и есть причина, по которой многие химиотерапевтические препараты не могут быть использованы для лечения глиомы несмотря на то, что они эффективны при других злокачественных новообразованиях. Поэтому во всем мире активно изучается природа ГЭБ как на лабораторных животных, так и на человеке.

Все доступные методы лечения неспособны пройти через ГЭБ к опухолевым клеткам. Несмотря на прогресс в области медицины, как в понимании молекулярного патогенеза глиом, так и имеющихся клинических исследований, злокачественные глиомы остаются почти всегда неизлечимыми.

Большой интерес для ученых представляет фотодинамическая терапия, которая даёт перспективы на то, что в будущем будет возможно повышение

проницаемости ГЭБ для транспортировки лекарственных средств, необходимых для лечения заболеваний ЦНС.

Фотодинамическая терапия (ФДТ) представляет собой метод лечения злокачественных опухолей, в частности глиом, основанный на введении в кровяное русло фотосенсибилизаторов (ФС), которые накапливаются в ткани опухоли и при локальном воздействии лазерного облучения определенной длины волны фотосенсибилизатор взаимодействует с триплетным состоянием молекулярного кислорода и в результате образуется синглетный кислород и другие активные радикалы, оказывающие токсический эффект на опухолевые клетки.

Так как помимо опухолей головного мозга существует большое количество других заболеваний ЦНС необходимо найти способ повышения локальной проницаемости ГЭБ для транспорта лекарственных препаратов.

Целью данной работы являлось изучение проницаемости гематоэнцефалического барьера для различных биомакромолекул после фотодинамического воздействия (ФДВ) без использования фотосенсибилизаторов.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

1. Оценить проницаемость гематоэнцефалического барьера после фотодинамического воздействия для красителя *Evans Blue* и FITC-Dextran;
2. Оценить проницаемость гематоэнцефалического барьера после фотодинамического воздействия для GM1-липосом;
3. Описать механизм открытия гематоэнцефалического барьера в результате фотодинамического воздействия.

## **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. Наличие гематоэнцефалического барьера ограничивает доставку лекарственных препаратов в мозг. Несмотря на десятилетний прогресс, как в понимании молекулярного патогенеза глиом, так и имеющихся клинических исследований, злокачественные глиомы остаются почти всегда неизлечимыми.

Необходимо найти способ повышения локальной проницаемости ГЭБ для транспорта лекарственных препаратов. Большой интерес для ученых представляет фотодинамическая терапия, которая даёт перспективы на то, что в будущем будет возможно повышение проницаемости ГЭБ для

транспортировки лекарственных средств, необходимых для лечения заболеваний ЦНС.

Фотодинамическая терапия является методом лечения злокачественных опухолей, в частности глиом, основанным на введении в кровяное русло фотосенсибилизаторов, которые накапливаются в ткани опухоли. При локальном воздействии лазерного облучения определенной длины волны фотосенсибилизатор взаимодействует с триплетным состоянием молекулярного кислорода и в результате образуется синглетный кислород и другие активные радикалы, оказывающие токсический эффект на опухолевые клетки.

Синглетный кислород – общее название для двух возбужденных состояний молекулярного кислорода с более высокой энергией, чем в основном, триплетном состоянии. Синглетный кислород является одной из форм активных форм кислорода, которые в свою очередь играют основную роль в обновлении состава мембран, модификации их функций и перехода клетки из одного функционального состояния в другое. Синглетный кислород представляет собой высокореактивное вещество с очень коротким периодом полураспада. В результате трансформации синглетного кислорода образуются вторичные долгоживущие физиологически активные синглетно-кислородные факторы, вызывающие цепь биохимических и биофизических реакций внутри клеток.

### **Материалы исследования**

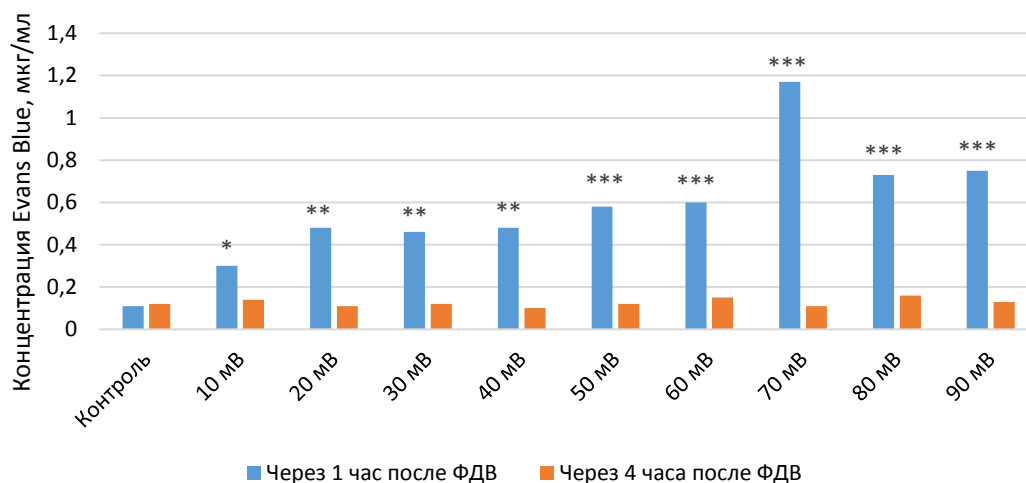
Исследования проводились на белых беспородных самцах мышей массой около 25 грамм (n=60). Для наблюдения проницаемости ГЭБ после лазерного воздействия использовался краситель *Evans Blue*, 68 кДа (2% раствор в объемной дозе 0,2 мл/100 гр мыши), FITC-Dextran, 70 кДа (1% раствор в объемной дозе 0,2 мл/100 гр мыши) и GM1-липосомы размером 100 нм (0,2 мл / 100 г мыши).

## Методы исследования

В ходе эксперимента животные были разделены на 4 группы: первая группа – контрольные животные, которым не проводилась ФДТ. Вторая группа – животные целостность ГЭБ которых проверялась с использованием красителя *Evans Blue*, 68 кДа, третья группа – животные целостность ГЭБ которых проверялась с применением FITC-Dextran, 70 кДа, четвертая группа – животные целостность ГЭБ которых проверялась с помощью GM1-липосомы размером 100 нм.

## Результаты исследования

В ходе эксперимента с помощью флуоресцентного анализа было обнаружено, что воздействие лазера с различной интенсивностью (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 мВ в течение 17 минут) увеличивает проницаемость ГЭБ для красителя *Evans Blue*, 68 кДа (рис.1).



\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  относительно контроля

Рисунок 1 – Концентрация красителя *Evans Blue* в головном мозге после лазерного излучения 1268 нм с разной интенсивностью

Облучение лазером с интенсивностью от 10 – 70 мВ вызвало повышение проницаемости ГЭБ для красителя *Evans Blue* у 30 – 60% испытуемых мышей, однако облучение лазером 1268 нм с интенсивностью от 70 - 90 мВ вызвало повышение проницаемости ГЭБ у всех испытуемых мышей.

Через 4 часа после облучения лазером целостность ГЭБ полностью восстанавливается без каких-либо морфологических изменений в тканях головного мозга.

Следующий этап эксперимента заключался в изучении проницаемости ГЭБ после воздействия на него лазерного излучения с интенсивностью 70 мВ в течении 17 минут для FITC-Dextran, 70 кДа. Чтобы исследовать проницаемость ГЭБ для FITC-Dextran, применялись три различных маркера: 1) антиген эндотелиального барьера, конъюгированный с антителами SMI-71, в качестве маркера цереброваскулярного эндотелия; 2) антиглиальный фибриллярный кислый белок (GFAP), метящий астроциты; и 3) ламинин, маркирующий базальные мембраны (рис. 2).

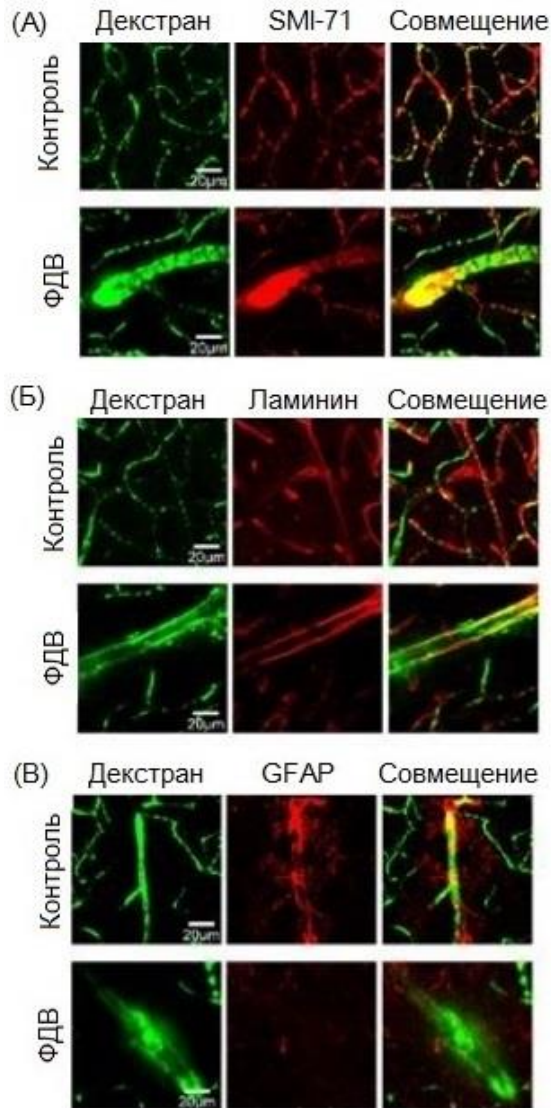


Рисунок 2 – Результаты конфокальной микроскопии, концентрация FITC-Dextran в головном мозге при использовании различных маркеров кровеносных сосудов А – антитела SMI-71, метящие эндотелиоциты, Б – ламинин, метящий базальные мембраны, В – антиглиальный фибриллярный кислый белок (GFAP), метящий астроциты

Данные конфокальной микроскопии показали, что лазер (70 мВ, 17 мин) повышает проницаемость ГЭБ через 1 час. В этот период экстравазация FITC-Dextran из сосудов мозга в его ткани увеличивается в 6 раз ( $p < 0,05$ ),



через 4 часа после фотодинамического воздействия проницаемость ГЭБ восстанавливается (табл.1).

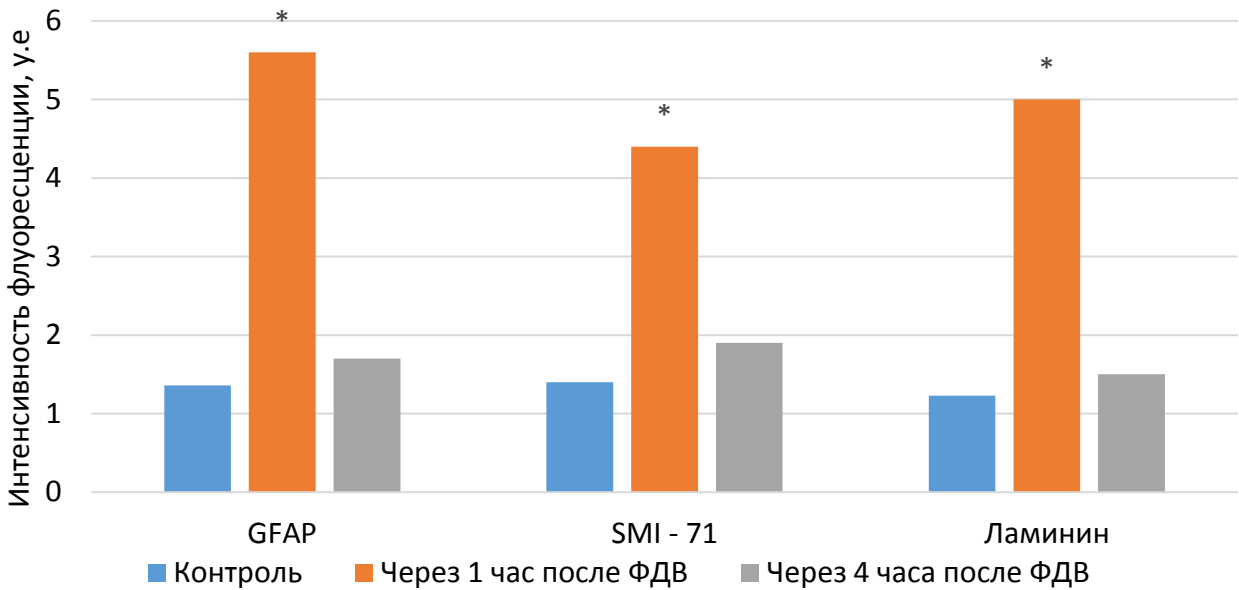
Таблица 1 - Содержание FITC-Dextran в сосудах мозга и его тканях до и после применения лазера (микроМоль)

	Кровеносные сосуды	Паренхима мозга
Контроль	144,2 ± 19,8	4,8 ± 2,9
Через 1 час после воздействия 1268 нм	104,0 ± 17,4	28,4 ± 3,1 *
Через 4 часа после воздействия 1268 нм	127,8 ± 23,9	6,2 ± 3,2

\*-p<0,05 относительно контроля

Исходя из полученных данных, было установлено, что через 1 час после лазерного воздействия проницаемость ГЭБ максимальная и FITC-Dextran наблюдается в паренхиме головного мозга. Через 4 часа после лазерного облучения целостность ГЭБ полностью восстанавливается.

Следующий этап эксперимента заключался в изучении проницаемости ГЭБ после воздействия на него лазерного излучения (70 мВ, 17 мин) для GM1-липосом размером 100 нм. Максимальная концентрация липосом в тканях головного мозга наблюдалась через 1 час после фотодинамического воздействия (рис. 3).



\*- $p < 0,05$  относительно контроля

Рисунок 3 - Концентрация GM1-липосом в тканях головного мозга до и после фотодинамического воздействия

Исходя из полученных данных, было установлено, что через 1 час после лазерного воздействия проницаемость ГЭБ увеличивается и GM1-липосомы наблюдаются в паренхиме головного мозга. Через 4 часа после лазерного облучения целостность ГЭБ полностью восстанавливается.

Исследование механизма повышения проницаемости ГЭБ при прямой генерации синглетного кислорода проводилось с использованием клеточной модели *in vitro*, содержащей три вида клеток: нейроны, астроциты, эндотелиоциты. Оценку уровня внутриклеточных активных форм кислорода (АФК) проводили флуориметрически через окисление дигидроэтидия (ДГЭ) до дигидроксиэтидия (ДГОЭ), который флуоресцирует при длине волны 585 нм. Этот анализ используется для обнаружения активных радикалов синглетного кислорода в клетках (табл.2).

Таблица 2 – Интенсивность флуоресценции ДГОЭ, у.е

Сводные данные по интенсивности, У.Е.		
№ группы	Группа	Интенсивность
1	НВЕ– контроль	514,48
2	НВЕ - воздействие лазера 1 минута	948,19
3	НВЕ - воздействие лазера 2 минута	1437,73

При оценке влияния лазерного излучения на продукцию синглетного кислорода в клетках ГЭБ установлено, что при лазерном воздействии в течении 1 и 2 минут произошло статистически значимое увеличение показателя с  $514,48 \pm 56,4$  у.е. (НВЕ - контроль) до  $948,19 \pm 43,3$  у.е. и  $1437,73 \pm 63,4$  у.е. Полученные данные свидетельствуют о значительном увеличении показателя флуоресценции ДГОЭ, что указывает на процесс прямой генерации синглетного кислорода в НВЕ (рис.4).

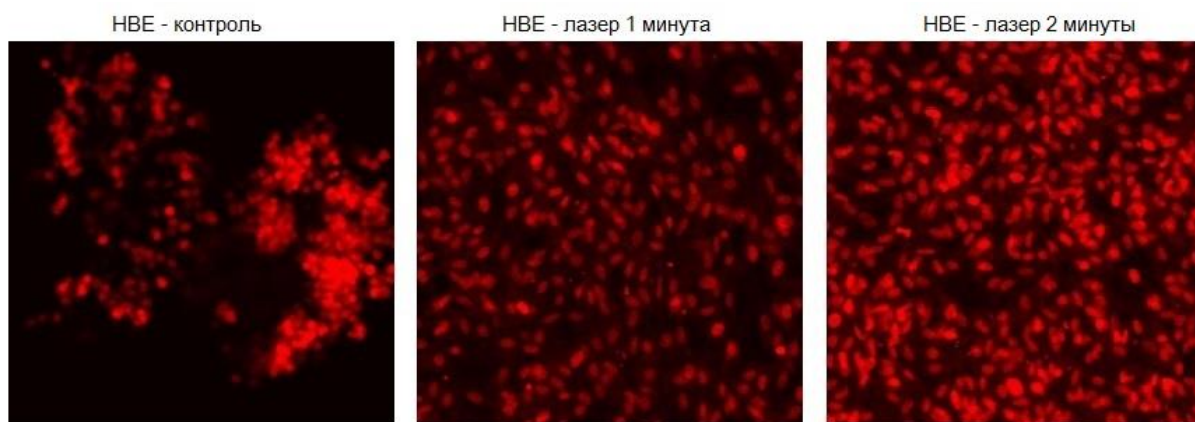


Рисунок 4 – Результаты конфокальной микроскопии по оценке интенсивности флуоресценции ДГОЭ в исследуемых группах

Было установлено, что при лазерном воздействии в течении 1 и 2 минут произошло значимое увеличение показателя с  $514,48 \pm 56,4$  у.е. (НВЕ -

контроль) до  $948,19 \pm 43,3$  у.е. и  $1\ 437,73 \pm 63,4$  у.е. Полученные данные свидетельствуют о значительном увеличении показателя флуоресценции ДГОЭ, что указывает на процесс прямой генерации синглетного кислорода в НВЕ.

Фотодинамическое воздействие лазером с длиной волны 1268 нм стимулирует генерацию синглетного кислорода, который оказывает раздражающее действие на актин цитоскелета эндотелиальных клеток, в результате чего актин начинает сокращаться. Это приводит к смещению цитоплазматических белков и белков плотных контактов внутрь эндотелиальных клеток и появляется возможность прохождения различных высокомолекулярных веществ в паренхиму головного мозга без каких-либо препятствий. Как показали наши исследования, через 4 часа после фотодинамического воздействия белки плотных контактов приходят в нормальное взаимодействие и целостность ГЭБ восстанавливается.

Таким образом, как показали наши исследования, механизм повышения проницаемости ГЭБ лабораторных мышей в условиях прямой генерации синглетного кислорода является эффективным методом для доставки высокомолекулярных соединений в головной мозг. Это указывает на возможность применения данного метода в медицинской практике для лечения заболеваний ЦНС.

## Выводы

1. Через 1 час после фотодинамического воздействия лазером интенсивностью 70 мВ в течение 17 минут увеличивается проницаемость гематоэнцефалического барьера для высокомолекулярных соединений, такие как краситель *Evans Blue* (68 кДа) и FITC-Dextran (70 кДа). Через 1 час после фотодинамического воздействия в паренхиме мозга концентрация красителя *Evans Blue* увеличивается в 10 раз, концентрация FITC-Dextran увеличивается в 6 раз по сравнению с контролем. Через 4 часа после фотодинамического воздействия целостность гематоэнцефалический барьер полностью восстанавливается.

2. Через 1 час после фотодинамического воздействия лазером интенсивностью 70 мВ в течение 17 минут гематоэнцефалический барьер становится проницаем для липосом, и их концентрация увеличивается в 5 раз в тканях головного мозга по сравнению с контролем.

3. Механизм увеличения проницаемости гематоэнцефалического барьера основан на прямой генерации синглетного кислорода в эндотелиоцитах, который приводит к изменению цитоскелета, деполяризации микротрубочек эндотелиальных клеток кровеносных сосудов, вследствие чего происходит временное изменение структуры плотных контактов в гематоэнцефалическом барьере.

