

МИНОБРНАУКИ РОССИИ

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования

**«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н. Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»**

Кафедра физиологии человека и животных

ФОТОТЕРАПИЯ ГЛИОМЫ У КРЫС ВО СНЕ

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

Студента 2 курса 243 группы
Направления 06.04.01 Биология
Биологического факультета
Гафурова Евгения Андреевича

Научный руководитель

д.б.н., доцент

О. В. Семячкина-Глушковская

(подпись, дата)

Зав. кафедрой человека и животных,

д.б.н., доцент

О. В. Семячкина - Глушковская

(подпись, дата)

Саратов 2024

ВВЕДЕНИЕ

Опухоли головного мозга, особенно злокачественные глиомы, относятся к наиболее агрессивным онкологическим заболеваниям. Несмотря на многочисленные достижения нейрохирургических оперативных методик, адъювантной химиотерапии и лучевой терапии, прогноз для больных остается крайне неблагоприятным. Даже химиотерапевтические препараты, наиболее эффективные при глиобластоме, такие как нитрозомочевины, соединения платины и темозоломид, лишь незначительно увеличивают продолжительность жизни пациентов [1-2].

В России опухоли мозга проявляются у 23 человек из 100 тысяч, это составляет почти 34 тыс. человек в год, причем у 32% они являются злокачественными. Касательно глиобластомы, она возникает у 3 человек из 100 тысяч. Статистика показывает, что с 2008 по 2018 годы прирост заболеваемости составил почти 25%. Всего на учете со злокачественными опухолями состоят почти 4 млн человек [3].

Лечение опухолей также заслуживает внимания. Чаще всего их удаляют хирургическим путем, однако так удалить можно не каждое новообразование. Если же операция невозможна, из-за трудодоступности, применяют лучевую и химиотерапию.

Особенности, ответственные за агрессивный характер глиомы, включают быструю пролиферацию, диффузный рост и инвазию в отдаленные области мозга, а также обширный отек мозга и высокий уровень ангиогенеза. Подтверждая важность ГЭБ, сообщалось об улучшении выживаемости пациентов со злокачественными глиомами, когда системная химиотерапия применялась после гиперосмотического или химического разрушения ГЭБ [4].

В 60% случаев опухоли головного мозга развиваются из глиальных клеток и именуется глиомами. Они составляют около половины всех новообразований головного мозга.

Основными чертами злокачественных глиом являются общее происхождение из астроцитарнойглии, высокая пролиферативная активность, быстрый рост, быстрая прогрессия глиальных опухолей от относительно доброкачественных к злокачественным вариантам [5-6].

Целью работы является развитие методов лечения глиомы во время сна-бодрствования, поиск лучшего способа для подавления роста опухолей и увеличения продолжительности жизни крыс, прошедших курс терапии.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Выявление эффективной дозы и интенсивности лазерного излучения для проведения фототерапии у крыс с глиомой.
2. Изучить эффекты курса фототерапии на уровень внутричерепного давления и активизацию лимфодренажной системы.
3. Исследовать влияние фототерапии во время сна и бодрствования на выживаемость крыс с глиомой.

Основная часть

Глиобластома (ГБМ) — одна из наиболее частых внутричерепных злокачественных опухолей. Она очень смертоносна и склонна к рецидивам и регенерации. Хотя хирургическое лечение, лучевая терапия и химиотерапия добились определенного прогресса в последние годы, прогноз пациентов с ГБМ мрачный из-за серьезной системной токсичности и побочных эффектов, а среднее время выживания обычно составляет менее 14 месяцев. Поэтому крайне важно найти новые эффективные методы лечения. Фототерапия, включая фотодинамическую терапию (ФДТ) и фототермическую терапию (ФТТ), является новым неинвазивным местным методом лечения. Он привлек широкое внимание в области лечения ГБМ из-за своей высокой эффективности, низкой токсичности и побочных эффектов. Диксит использовали тераностически наночастицы, нацеленные на два рецептора, для эффективной терапии ГБМ посредством ФДТ [7].

Во всем мире опухоли головного мозга диагностированы у 300 000 человек, среди которых умерло 250 000 пациентов. В 2000 году 5- и 10-летняя выживаемость при агрессивных опухолях головного мозга составляли примерно 12% и 9% соответственно. В настоящее время ситуация улучшилась, а 5- и 10-летняя выживаемость при злокачественном раке головного мозга составляет примерно 36% и 31% соответственно. Однако, несмотря на улучшение терапии при опухолях головного мозга выживаемость по-прежнему низка по сравнению с другими видами рака [8].

Материалы исследования

Объекты исследования

Исследования проводили с использованием 5 групп животных: 1) здоровые крысы; 2) ложно-оперированные особи; 3) крысы с глиомой без фототерапии; 4) крысы с глиомой, получающие фототерапию во сне; 5) крысы с глиомой, получающие фототерапию в бодрствовании, n=10 во всех группах животных.

Методы исследования

После проведения имплантации клеток глиомы был произведён подбор мощности и дозы лазерного излучения, эффективность которых проверялась с помощью измерения температуры на наружной поверхности черепа и коре головного мозга.

Для измерения диффузного пропускания черепа использовались образцы черепа животных, изъятые сразу после умерщвления вместе с наклеенной шайбой.

Для регистрации уровня внутричерепного давления датчик с чувствительной мембраной помещали в катетер, после чего с помощью пинцета для канюляции сосудов его помещали под твёрдую оболочку головного мозга и закрепляли на поверхности черепа стоматологическим акрилом.

После регистрировали двухканальную корковую ЭЭГ/одноканальную электромиограмму (PinnacleTechnology, Тайвань).

Для ФБМ использовался светодиод 1050 нм с выходной мощностью 50 мВт в корпусе 2853 SMD. Светодиодный драйвер управлялся с помощью выхода широтно-импульсной модуляции (ШИМ) микроконтроллера прибора ЭЭГ.

Для изучения влияния ФБМ во время бодрствования и глубокого сна на дренажную систему головного мозга проводилось введение FITCD в правый боковой желудочек.

Для оптической визуализации лимфатического выведения изучаемого трейсера из тканей мозга и их накопления в глубоких шейных лимфоузлах применялась система конфокальной микроскопии A1R MP (Nikon, Япония).

После применения курса лазерной терапии был произведён гистологический анализ тканей головного мозга на наличие клеточных эффектов лазерного воздействия на глиобластому, флуоресцентная модель глиобластомы была применена для демонстрации изменения характера распространения опухоли в мозге.

Результаты исследования

Выявление эффективной дозы лазерного излучения для проведения фотовоздействия на головной мозг крысы

На первом этапе исследования для подбора дозы лазерного излучения на поверхности головного мозга были выполнены измерения диффузного пропускания черепа крысы в области установки шайбы *ex vivo*.

Диффузное пропускание черепа варьируется в пределах от 15 до 30% в зависимости от толщины черепа. Диффузное отражение более однородно в области 1050 нм, однако также имеет место значительная вариативность в области от 1100 до 1400 нм.

Результаты расчета энергии, дозы и освещенности на поверхности головного мозга представлены в таблице 1. Для расчета дозы и освещенности

коэффициент увеличения диаметра пучка в результате рассеяния света принимался равным 1,2.

Таблица 1 - Расчетная доза облучения на поверхности головного мозга животного

Скважность модуляции, %	Средняя освещенность, мВт/см ²	Энергия за 17 мин, один светодиод, Дж	Доза за 17 минут, Дж/см ²
1	0.66	0.05	0.67
2	1.3	0.09	1.3
3	2	0.14	2
4	2.6	0.19	2.6
5	3.3	0.23	3.2
10	6.5	0.46	6.6
20	13	0.92	13
50	33	2.35	33
100	64	4.6	66

Влияние курса фотобиомодуляции на уровень внутричерепного давления и активацию лимфодренажной система мозга у крыс с глиомой

На следующем этапе, проводили трёхнедельный курс фототерапии (1050 нм, 30 Дж/см²) крыс с глиомой с целью снижения ВЧД и активации лимфодренажной системы головного мозга.

Для исследования механизмов более эффективного снижения ВЧД у спящих крыс по сравнению с бодрствующими, изучали эффекты фототерапии на дренажную систему мозга.

Влияние курса фотобиомодуляции на повышение выживаемости крыс с глиомой

На следующем этапе исследований изучали, как влияет снижение ВЧД и повышение лимфодренажной функции головного мозга крыс с глиомой на их выживаемость.

Результаты показали, что объем глиомы снижался в 2,5 раза ($p < 0,01$) в группе крыс, получающих фототерапию во сне и в 1,7 раза ($p < 0.01$) в группе особей, получающих лечение в бодрствовании. Таким образом, фототерапия во сне по сравнению с бодрствованием оказывала в 1,5 раза ($p < 0.01$) раза более эффективно подавляла рост опухоли.

Влияние курса ФБМ во время сна и бодрствования на апоптоз и пролиферацию клеток глиомы

На следующем этапе мы изучали клеточные механизмы терапевтического воздействия курса ФБМ во время сна и бодрствования. Данные иммуногистохимического исследования показывают, что экспрессия маркера пролиферации (Ki67) была выше у крыс с глиомой и без курса ФБМ по сравнению с крысами, получавшими курс ФБМ во время сна или бодрствования.

Таблица 2. Маркеры пролиферации и апоптоза (%) в тестируемых группах

Маркеры	Контроль (здоровые крысы)	Контроль (Ложно-оперированные крысы)	Контроль (ложно-оперированные после ФТ во сне)	Контроль (ложно-оперированные после ФТ в бодрствовании)	Крысы с глиомой без ФТ	Крысы с глиомой, получающие ФТ в бодрствовании	Крысы с глиомой, получающие ФТ Во сне
Ki67	-	-	-	-	98.87±1.1	27.44±6.0 ***	11.69±1.0 ***†††
Vax	-	-	-	-	16.29±4.3	65.33±7.5 **	96.91±3.8 ***††
p53	-	-	-	-	20.25±6.1	47.00±4.4 **	87.33±7.4 ***†††

ФТ – фототерапия, n=10 в каждой группе, *** - $p < 0.001$; ** - $p < 0.01$ – между крысами с глиомой без фототерапии и особями, получающими фототерапию во сне или в бодрствовании; ††† - $p < 0.001$; †† - $p < 0.01$ между крысами с глиомой, получающими фототерапию во сне или в бодрствовании, ANOVA с апостериорным тестом Дункана

Развитие глиомы характеризуется иммуносупрессией, что проявляется в низком содержании необходимых лимфоцитов, в частности CD8⁺ - Т-клеток, активирующих апоптоз в клетках опухоли. Низкий уровень CD8⁺ - Т-клеток в микроокружении глиомы связан с появлением перитуморального отека, создающего преграду для миграции лимфоцитов к клеткам опухоли. Результаты исследования показали, что представительство CD8⁺ Т-лимфоцитов в клетках флуоресцентной глиомы и в ГШЛУ было значительно выше после курса фототерапии, причем в более выраженной степени у крыс, получающих фото-лечение во сне, чем в бодрствовании.

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что курс фототерапии во сне более эффективно, чем в бодрствовании, повышает устойчивость к прогрессированию глиомы у крыс, повышая выживаемость у животных;
2. Выявлено, что воздействие лазером 1050нм дозой 30 Дж/см² является эффективным в терапии глиомы;
3. Обнаружены механизмы терапевтических эффектов фототерапии во сне, связанные с повышением лимфодренажа тканей головного мозга, что создает благоприятные условия для миграции иммунопротекторных CD8⁺ Т-клеток к тканям глиомы.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Semyachkina-Glushkovskaya O., Terskov A., Photodynamic opening of the Blood-Brain Barrier and the Meningeal Lymphatic system: The New Niche in Immunotherapy for Brain Tumors / O. Semyachkina-Glushkovskaya, A. Terskov // *Pharmaceutics*. - 2022. - Vol. 14, № 2612. - P. 2-7
2. Shirokov A., Blokhina I., Fedosov I., Different Effects of Phototherapy for Rat Glioma during Sleep and Wakefulness / A. Shirokov, I. Blokhina, I. Fedosov // *Biomedicines* 2024. - 2024. - Vol. 12, - P. 3-10
3. Noorvash B., Nelson T., Amaral L., Remote monitoring of sleep activity in patients diagnosed with glioblastoma / B. Noorvash, T. Nelson, L. Amaral // *Journal of Clinical Oncology*. - 2022. - Vol. 40, № 16. - P. 3-4
4. Semyachkina-Glushkovskaya O., Sokolovski S., Fedosov I., Transcranial Photosensitizer-Free Laser Treatment of Glioblastoma in Rat Brain / O. Semyachkina-Glushkovskaya, S. Sokolovski, I. Fedosov // *IJMS*. - 2023. - Vol. 24, № 18. - P. 4-10
5. Kienzler J., Zakelis R., Fandino J., Changing the paradigm of intracranial hypertension in brain tumor patients: a study based on non-invasive ICP measurements / J. Kienzler, R. Zakelis, J. Fandino // *BMC Neurology*. - 2020. - Vol. 20, № 20. - P. 14-20
6. Semyachkina-Glushkovskaya O., Penzel T., Poluektov M., Phototherapy of Alzheimer's Disease: Photostimulation of Brain Lymphatics during Sleep: A Systematic Review / O. Semyachkina-Glushkovskaya, T. Penzel., M. Poluektov // *IJMS*. - 2023. - Vol. 24, №13. - P. 4-10
7. Buttner-Teleaga A., Kim Y., Osel T., Sleep Discordes in Cancer-A Systematic Review / A. Buttner-Teleaga. Y. Kim, T. Osel // *IJERPH*. - 2021. - Vol.18, № 21. - P. 17-24
8. Huang Y., Jiang Z., Deng J., Sleep quality of patients with postoperative glioma at home / Y. Huang, Z. Jiang, J. Deng // *World Journal of Clinical Cases*. - 2020. - Vol. 8, №20. - P. 221-225