

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 В ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К
ФОТОТЕРАПИИ ГЛИОБЛОСТОМЫ У КРЫС**

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

Студента 2 курса 243 группы

Направления подготовки магистратуры 06.04.01 Биология

Биологического факультета

Дмитренко Александра Владимировича

Научный руководитель

к.б.н., доцент _____ Е.И. Саранцева

(подпись, дата)

Зав. кафедрой человека и животных,

д.б.н., доцент _____ О. В. Семячкина – Глушковская

(подпись, дата)

Саратов 2025

Введение. Глиобластома (ГБ) является одной из наиболее злокачественных и слабо поддающихся терапии опухолевых новообразований головного мозга. Локализация, быстрый рост, высокая степень инвазивности, выраженная гетерогенность клеточного состава создают серьёзные ограничения для эффективного лечения современными методами. Сумма этих факторов обуславливает крайне неблагоприятный прогноз выживаемости пациентов с данным видом злокачественных новообразований центральной нервной системы (ЦНС) [1].

Одним из основных факторов, влияющих на эффективность лечение ГБ, является своевременная и точная диагностика, играющая ключевую роль в выборе стратегии лечения. Современные методы обнаружения новообразований ЦНС основаны на неинвазивном принципе. В большинстве случаев процесс диагностики предусматривает клиническую оценку симптомов ГБ и опирается на нейровизуализационные методы. Наиболее информативным методом в современной практике остаётся магнитно-резонансная томография (МРТ) с использованием контрастирующих агентов. МРТ позволяет определить локализацию, размер и характер роста, а также степень сосудистой проницаемости опухоли. Комплексная диагностика позволяет не только подтвердить наличие ГБ, но и оценить её биологические особенности, что особенно важно при выборе индивидуального подхода в лечении [2].

Современные методы терапии злокачественных новообразований головного мозга предусматривают комплексный подход – хирургическое вмешательство, лучевая и химиотерапии. Однако клинические протоколы лечения ГБ имеют ограниченную эффективность в связи с рядом факторов: невозможностью полного удаления опухоли, устойчивостью к цитостатическим препаратам, наличием иммунного подавления в микроокружении опухоли и активным развитием ангиогенеза. В связи с этим даже комплексный подход, сочетающий несколько методик при терапии ГБ, не всегда способен дать ожидаемого терапевтического эффекта для

достижения длительной ремиссии, а лишь незначительно замедлить прогрессирование. Это обстоятельство обуславливает необходимость поиска новых подходов к терапии ГБ, включая биофизические и молекулярно-направленные методы [3].

В связи с этим возрастает интерес к альтернативным методам лечения, среди которых всё большее внимание привлекает фототерапия (ФТ). Данный метод способен рассматриваться и как вспомогательная, и как самостоятельная стратегия лечения, в том числе в отношении трудно поддающейся и рецидивирующей ГБ. В контексте интеграции в мультимодальные лечебные схемы, ФТ способна повышать их эффективность и снижать токсичность традиционных методов терапии ГБ [4]. ФТ охватывает различные технологии, включая применение монохроматического света (в том числе лазеров и светодиодов), которые могут оказывать цитотоксическое, иммуномодулирующее или регенеративное воздействие на ткани, в зависимости от используемых параметров воздействия на опухоль [5].

Однако эффективность ФТ, как и других методов, может существенно изменяться в зависимости от физиологических и биохимических параметров организма. Одним из ключевых факторов, влияющих на чувствительность опухоли к лечению, является возраст. Экспериментальные и клинические данные показывают, что с возрастом происходят значительные изменения в иммунной системе, метаболизме и экспрессии ключевых молекул в тканевом микроокружении ГБ [6].

Изучение возрастных аспектов чувствительности глиобластомы к фототерапии представляет собой важную и актуальную задачу. Выявление специфического механизма взаимодействия опухоли с оптическим излучением в зависимости от возраста и определение оптимальных параметров терапии для различных возрастных групп способно дать основу для разработки персонализированных стратегий лечения и повышения эффективности терапии у пациентов с ГБ.

Целью данной работы явилось изучение механизмов возрастных различий в эффективности фототерапии при лечении глиобластомы у крыс, связанных с функцией менингеальных лимфатических сосудов и иммунным ответом.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Оценить возрастные различия в морфологии и дренажной функции менингеальных лимфатических сосудов в условиях наличия и отсутствия фототерапии у 6 – и 24 – месячных крыс;
2. Проанализировать выживаемость крыс с глиобластомой в возрасте 6 и 24 месяцев в условиях наличия и отсутствия фототерапии, а также при удалении глубоких шейных лимфатических узлов;
3. Оценить влияние фототерапии на глиобластому иммунный ответ организма крыс в зависимости от возраста;
4. Исследовать воздействие фототерапии на пролиферацию и апоптоз клеток глиобластомы у «молодых» и «старых» крыс.

Магистерская работа включает содержание, список сокращений и обозначений, введение, 3 главы (обзор литературы, материалы и методы, результаты исследований и выводы), выводы и список использованных источников, включающий 70 источников на русском и английском языках. Работа изложена на 50 страницах машинописного текста. Работа проиллюстрирована 15 рисунками и 2 таблицами.

Основное содержание работы. Во всех экспериментах использовали самцов крыс линии Wistar в возрасте 6 и 24 месяцев, полученных из Национального центра ресурсных лабораторных животных (Пушино, Москва, Россия). Выбор возраста обусловлен необходимостью оценки эффективности ФТ у животных возрастной категории juvenis (6 месячные «молодые» крысы) и senectus (24 месячные «пожилые» крысы).

В ходе экспериментального исследования также использовались: клеточная культура глиобластомы (C6-TurboRFP); стереотаксическая система (Narishige, Токио, Япония); микрошприц Гамильтона объёмом 50

мкл; лазерный диод с волоконной брэгговской решеткой с синхронизацией по длине волны (1050 нм); конфокальный лазерный сканирующий микроскоп Nikon A1R MP, Nikon Instruments Inc; маркер рецептора гиалуроновой кислоты эндотелия лимфатических сосудов 1 (LYVE1); маркер глиального фибриллярного кислого белка астроцитов (GFAP); краситель кровеносной системы Evans Blue; моноклональные антитела в разведении 1:100, включая Vcl-2-ассоциированный X белок (Vax), p53, Ki67 и CD95.

Возрастные различия в морфологии и дренажной функции сети менингеальной лимфатической сосудов у 6 – и 24 – месячных здоровых крыс в условиях наличия и отсутствия фототерапии. На первом этапе была проведена визуализация МЛС у здоровых 6 – и 24 – месячных крыс посредством конфокальной микроскопии.

Так же на данном этапе был проведён количественный анализ покрытия флуоресцентным маркером лимфатической системы LYVE-1 области пересечения сагиттального и венечного синусов у здоровых крыс в возрасте 6 – и 24 – месяцев (количественный анализ покрытия LYVE-1 выражен в % от ROI).

По результатам конфокальной съёмки и оценки представленности живых лимфатических сосудов было выявлено, что у 24-месячных крыс больше лимфатических сосудов, чем у 6-месячных животных (ИФ = $25,925 \pm 0.66$ у.е. и 17.15 у.е. соответственно).

Для изучения дренажной функции МЛС у 6 – и 24 – месячных крыс, а также влияния наличия большего количества лимфатических сосудов в составе менингеальной системы у «пожилых» крыс по сравнению с «молодыми», был проведён конфокальный анализ выведения FITCD из правого бокового желудочка в глубокие шейные лимфатические узлы.

По результатам конфокальной визуализации наличия FITCD в ГШЛУ, наблюдалось большее количество красителя в группе 6 – месячных крыс по сравнению с 24 – крысами. Аналогичная картина наблюдалась и в условиях наличия ФТ МЛС. Конфокальный анализ показал увеличение лимфатической

экскреции FITCD из мозга в ГШЛУ только у 6-месячных крыс и отсутствие таких эффектов у 24-месячных животных.

Проведённый количественный и статистический анализ интенсивности флуоресценции FITCD в ГШЛУ разных возрастных групп в условиях наличия и отсутствия ФТ показал, что удаление красителя из мозга и накопление его в ГШЛУ было значительно снижено у 24 – месячных крыс, по сравнению с 6 – месячными ($5,8 \pm 0,15$ у.е. против $2,675 \pm 0,18$ у.е., между 6-месячными крысами с и без ФТ, $0,425 \pm 0,07$ у.е. против $0,68 \pm 0,16$ у.е., между 24-месячными крысами с и без ФТ).

И несмотря на то, что представленность живых менингеальных лимфатических сосудов у 24 – месячных крыс была выше, факт большего накопления FITCD в ГШЛУ у молодых животных может свидетельствовать о гиперплазии лимфатических сосудов старшей возрастной группы, которую можно рассматривать как первопричину снижения дренажа ликвора.

Различия в выживаемости здоровых крыс 6 – и 24 – месяцев, при наличии и отсутствии фототерапии глиобластомы, а также в условиях удаления глубоких шейных лимфатических узлов. На втором этапе исследования была проведено исследование роли дренажа головного мозга в развитии устойчивости к ГБ посредством оценки выживаемости крыс с ГБ после удаления ГШЛУ, а также в условиях наличия и отсутствия ФТ в различных возрастных группах.

Результаты статистического анализа выживаемости показали, что до блокады оттока ликвора из головного мозга «молодые» крысы были более устойчивы к развитию ГБ, чем «пожилые». После удаления ГШЛУ, смертность у 6-месячных крыс резко возросла, что уравнивало их шансы на выживание по сравнению с 24 – месячными крысами. Выживаемость «пожилых» животных также снизилась после удаления ГШЛУ

Результаты по изучению морфофункциональных особенностей и выживаемости различных возрастных групп при ГБ свидетельствуют о возрастных изменениях в МЛС и дренаже ликвора, что является причиной

ослабленной резистентности к развитию ГБ у 24 – месячных крыс повышенной чувствительности к ФТ глиобластомы у 6 – месячных крыс.

Влияние фототерапии на локализацию CD8+ Т-лимфоцитов в глиобластоме и глубоких шейных лимфатических узлах крыс в зависимости от возраста. Для оценки влияния ФТ на иммунный ответ в условиях ГБ производилась оценка локализации CD8+Т-клеток в опухоли.

В условиях отсутствия ФТ Т-лимфоциты были обнаружены только на границе ГБ, в то время как после ФТ их количество в центре опухоли и особенно в мозговых оболочках значительно увеличилось у 6-месячных крыс и слабо у 24-месячных.

По результатам количественного и статистического анализа интенсивность флуоресценции маркера Т-лимфоцитов CD8+ в ГБ составило $63,4 \pm 4,2$ у.е. против $15 \pm 2,5$ у.е. между 6-месячными крысами с ФТ и без ФТ; $27,3 \pm 2,0$ против $10,7 \pm 5,1$, между 24-месячными крысами с ФТ и без ФТ.

Аналогичная терапевтическая динамика наблюдалась в глубоких шейных лимфатических узлах, где количество CD8+Т-клеток увеличивалось под воздействием ФТ, что было более выражено у молодых крыс в сравнении со взрослыми животными.

Результаты количественного и статистического анализа присутствия CD8+ Т-клеток в ГШЛУ показали большее присутствие Т-лимфоцитов у молодых животных, по сравнению с более возрастной группой, как в случае наличия ФТ, так и при её отсутствии ($84,9 \pm 1,8$ против $39,9 \pm 8,9$, $p < 0,001$ между 6-месячными крысами с ФТ и без него; $32,2 \pm 1,6$ против $15,6 \pm 2,3$, $p < 0,05$ между 24-месячными крысами с ФТ и без ФТ).

Гистологический анализ влияния фототерапии на пролиферацию и апоптоз клеток глиобластомы. Гистологический анализ показал, что в обеих возрастных группах без ФТ глиобластома была представлена опухолевой тканью с обширными кровоизлияниями и некрозом. Контуры опухоли были нечеткими. Кроме того, в опухолевые клетки отличались высокой плотностью и активным митотическим делением.

После ФТ в обеих возрастных группах ГБ имела более четкие границы с тканью головного мозга. Опухоль была более локализована, кровоизлияний не было, клетки ГБ располагались в образце реже и имели дистрофические повреждения. Признаков митоза в клетках ГБ не было обнаружено.

Также в ходе исследования была выявлена высокая экспрессия маркера пролиферации Ki67 у крыс с ГБ, которая была более выражена у 24-месячных крыс по сравнению с 6-месячными. Экспрессия маркеров внутриклеточного апоптоза Bax и p53 была слабо выражена у 6-месячных крыс с ГБ и отсутствовала у 24-месячных крыс. У молодых крыс с ГБ при ФТ значительно подавлялась экспрессия Ki67, что связано с дополнительной стимуляцией внешних путей апоптоза. В отличие от молодых крыс, у взрослых крыс ФТ оказывал слабое влияние на экспрессию Ki67 и стимулировал только внутренний апоптоз (CD95).

Статистический анализ выявил явные различия в молекулярных механизмах терапевтического действия ФТ, выраженные в более эффективном действии на молодых крыс и слабо проявляющимся у взрослых животных.

ВЫВОДЫ

1. Укрыс старшей возрастной группы наблюдалось большее количество лимфатических сосудов в твёрдой мозговой оболочке, однако это сопровождалось снижением их дренажной функции, что связано с нарушением лимфангиогенных механизмов, выраженных в гиперплазии лимфатической ткани. Проведённая фототерапия способствовала активации лимфатического дренажа и улучшению выведения маркера FITCD даже в условиях гиперплазии менингеальной лимфатической системы у 24 – месячных крыс. Данный эффект был менее значительным, чем у 6 – месячных крыс, что свидетельствует о потенциально меньшей устойчивости к возникновению глиобластомы у 24 – месячных животных.

2.«Молодые» крысы демонстрировали повышенную устойчивость к глиобластоме по сравнению с «пожилыми», однако удаление глубоких шейных лимфатических узлов нивелировало этот эффект, что подтверждает ключевую роль лимфатической системы в противоопухолевой защите. Наличие фототерапии увеличивало продолжительность жизни как у «молодых», так и у «пожилых» животных, но в случае лимфатической блокады, вызванной удалением глубоких шейных лимфатических узлов, её эффект резко снижался.

3.На фоне фототерапии количество CD8⁺ Т-лимфоцитов как в ткани опухоли, так и в глубоких шейных лимфатических узлах у 6-месячных крыс значительно возрастало, что говорит об активации системного и локального цитотоксического иммунного ответа. У 24 – месячных животных увеличение числа Т-лимфоцитов было выражено в значительно меньшей степени, указывая на возрастное снижение иммунной реактивности и чувствительности к фототерапии.

4.В группе 6 – месячных крыс с глиобластомой фототерапия привела к значительному снижению экспрессии маркера пролиферации Ki67 и усилению экспрессии апоптотического белка Вах и p53, что отражает активацию внешних и внутренних путей программируемой клеточной

гибели. У 24-месячных крыс аналогичные изменения были менее выраженными: наблюдалось умеренное снижение пролиферации и слабая экспрессия Вах и p53, при этом фототерапия активировала в большей степени апоптоз по механизму, ассоциированному с CD95. Возраст оказывает значительное влияние на молекулярные механизмы противоопухолевого ответа, снижая чувствительность клеток глиобластомы к фототерапии у пожилых животных.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Современные подходы к терапии глиобластомы / Н. С. Кузнецова [и др.] // Южно-Российский онкологический журнал. – 2023. – Т.4, №1. – С. 52-64.
- 2 Магнитно-резонансная томография с перфузионной визуализацией в диагностике глиобластом головного мозга (обзор литературы) / Н. И. Сергеев [и др.] // Вестник Российского научного центра рентгенорадиологии Минздрава России. – 2021. – С.37-44.
- 3 Overcoming immunotherapy resistance in glioblastoma: challenges and emerging strategies / X. Fu [et al.] // Frontiers in Oncology. – 2025. – Vol. 15. – P.1-3.
- 4 Photodynamic therapy in brain cancer: mechanisms, clinical and preclinical studies and therapeutic challenges / W. Domka [et al.] // Front. Chem. – 2023. – P.1-2.
- 5 Photodynamic Therapy for Glioblastoma: Illuminating the Path toward Clinical Applicability / D. Bhanja [et al.] // Cancers. – 2023. – P.1-15.
- 6 Advanced Age Increases Immunosuppression in the Brain and Decreases Immunotherapeutic Efficacy in Subjects with Glioblastoma / E. Ladomersky [et al.] // Clin Cancer Res. – 2020. Vol. 26, №19. – P.5232-5245.