

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

Кафедра физиологии человека и животных

ДОСТАВКА ЛИПОСОМ В МОЗГ ПО ЛИМФАТИЧЕСКИМ ПУТЯМ

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студента 4 курса 421 группы
направления подготовки бакалавриата 06.03.01 Биология
Биологического факультета
Дмитренко Александра Владимировича

Научный руководитель

к.б.н., доцент



(подпись, дата)

Е.И. Саранцева

Зав. кафедрой человека и животных,

д.б.н., доцент



(подпись, дата)

О. В. Семячкина – Глушковская

Саратов 2023

Введение. В настоящее время увеличение возникновения нейродегенеративных заболеваний является серьёзной проблемой во всём мире, так общемировая статистика болезни Альцгеймера на 2020 год составила 50,6 млн человек, а прогноз к 2030 году оценивается в 65,7 млн человек. Для болезни Паркинсона (БП) и развития злокачественных опухолей, таких как глиобластома составляет 4 млн человек в год и 5,26 случаев на 100000 человек соответственно. В свою очередь мозг является крайне сложной структурой человеческого организма, его защитные структуры, такие как гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) и ретикулярно-эндотелиальная система затрудняют доставку лекарственных препаратов в мозг трудной задачей, что также осложняет лечение данных заболеваний.

Терапевтическая действенность лекарственного препарата (ЛП) в борьбе с заболеваниями центральной нервной системы (ЦНС), обуславливаются достижением необходимой концентрации функционирующего вещества клетки-мишени. Подавляющее большинство современных методик лечения обусловлена систематическим введением лекарственных средств (ЛС) что вместе с неспецифическим распределением в тканях и структурах головного мозга, вызывает побочные явления и системную токсичность. Основными проблемами в лечении нейродегенеративных заболеваний является увеличение безвредности и разработку автотранспортных систем для доставки лекарственных средств, позволяющих гарантировать целевую доставку ЛП к клетке-мишени или тканям снизив общее токсическое воздействие на головной мозг.

Одним из широко используемых веществ для доставки ЛС, в настоящее время являются липосомы. Липосомы - это наночастицы, которые состоят из липидных слоев и могут быть использованы для доставки лекарственных препаратов в организм. Они имеют ряд преимуществ перед другими способами доставки лекарств, включая повышенную эффективность и уменьшение токсичности для организма. Их размер позволяет им проникать через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ). Однако, чтобы доставить липосомы в мозг,

необходимо использовать альтернативные общепринятому пути кровеносной доставки ЛП, таким путём может стать лимфатическая система.

Интраназальная доставка липосомальных лекарственных средств по лимфатическим путям является многообещающей альтернативой системному введению свободных лекарственных препаратов, которая использует прямой анатомический путь по лимфатической системе через решётчатую кость к оболочкам головного мозга.

Целью данной работы явилось исследование эффективности доставки лекарственных препаратов в мозг для лечения опухоли с использованием липосом, введенных через решётчатую кость (*lamina cribrosa*)

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Конфокальная визуализация интраназальной доставки липосом в здоровый головной мозг мыши через решётчатую кость;
2. Оценка роли менингеальной лимфатической системы в интраназальной доставке липосом при фотоабляции;
3. Изучение влияния глиобластомы на доставку лекарственных препаратов в головной мозг;
4. Оценка роли фотодинамического воздействия при интраназальной доставке лекарственных препаратов в мозг по лимфатическим путям.

Бакалаврская работа включает содержание, список сокращений, введение, 3 главы (обзор литературы, материалы и методы, результаты исследований и выводы), выводы и список использованных источников, включающий 45 источников на русском и английском языках. Работа изложена на 41 страницах машинописного текста. Работа проиллюстрирована 16 рисунками и 2 таблицами.

Основное содержание работы. В качестве объекта исследования использовали мышей-самцов линии C57BL/6 (25–28 г), полученных из Национального лабораторного центра ресурсов животных (Пушино, Москва, Россия). Животных содержали в стандартных лабораторных условиях, с доступом к пище и воде вволю. Все экспериментальные процедуры проводились в соответствии с «Руководством по уходу и использованию лабораторных

животных», Директивой 2010/63/ЕС о защите животных, используемых в научных целях, и рекомендациями Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (№ 742 от 13.11.1984), одобренных Комиссией по биоэтике Саратовского государственного университета (протокол № 7).

Животных содержали в стандартных лабораторных условиях. Все процедуры выполняли в соответствии с «Руководством по уходу и использованию лабораторных животных». Протоколы экспериментов были одобрены Комиссией по биоэтике Саратовского государственного университета (Протокол № 7) и Институциональным комитетом по уходу и использованию животных Университета Нью-Мексико, США (19-200767-HSC200247).

В ходе экспериментального исследования также использовались липосомы (GM1); Клеточные культуры глиобластомы (EPNT-5 и EPNT-5-TagRFP); Стереотаксическая система (Narishige, Токио, Япония); микрошприц Гамильтона объёмом 50 мкл; Лазерный диод с волоконной брэгговской решеткой с синхронизацией по длине волны (LD 1267-FBG-350, Innolume, Дортмунд, Германия); 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.

Для исследования эффективности доставки лекарственных препаратов в мозг для лечения опухоли с использованием липосом, введенных через решётчатую кость мышей глубоко анестезировали внутрибрюшинным золетилом (Virbac, Carros, Франция) в дозе 20 мкг/кг, перемещали в стереотаксический головодержатель и иммобилизовали на стереотаксической системе (Narishige, Токио, Япония) путём фиксации головы. Скальп мышей под анестезией выбривали и трижды протирали бетадином, а затем ополаскивали спиртом. В месте планируемой операции удаляли волосы и делали надрез в области планируемой инъекции. Разрез делали по сагиттальному гребню от брегмы до ламбдовидного шва и удаляли надкостничную мембрану. Маленькой стоматологической бормашиной просверлили трепанационное отверстие в

кости, не разрывая твердую мозговую оболочку в обнаженном черепе на 1 мм кпереди и на 1 мм латеральнее брегмы.

Клетки ГБМ (5 x 10⁵ клеток на мышь) вводили на глубину 1 мм от поверхности мозга микрошприцем Гамильтона в объеме 7 мкл со скоростью 0,5 мкл/мин. После этого трепанационное отверстие запечатывали стерильным костным воском и тканевым клеем, а рану зашивали рассасывающимся шовным материалом 3-0. После имплантации клеток ГБМ рану закрыли и обработали 2% раствором бриллиантового зеленого.

Для изучения доставки липосом в мозг по лимфатическим путям использовались зеленые липосомы с эффективным диаметром и индексом полидисперсности 99,6 нм и 0,160 соответственно. Инъекция липосом осуществлялась в полость носа микрошприцем Гамильтона в объеме 5 мкл (по 2,5 мкл в каждую полость носа).

Визуализацию *ex vivo* распределения флуоресцентных красителей и липосом в головном мозге, ГБМ и мозговых оболочках проводили с помощью системы конфокальной и многофотонной микроскопии A1R MP на основе вертикального фокусирующего револьверного микроскопа Ni-E (Nikon, Япония). Четыре лазерных источника возбуждения с длинами волн 405 нм, 488 нм, 561 нм, 640 нм и набор фотоумножителей в качестве детекторов использовались для многоканального конфокального изображения с объективами 2× и 20×

Срезы ткани, окрашенные ИГХ методом, помещали на стандартные предметные стекла микроскопа и визуализировали с помощью адаптера для предметных стекол, закрепленного на том же предметном столике. Изображения были получены с использованием программного обеспечения NIS-Elements (Nikon Instruments Inc.) и проанализированы с использованием программного обеспечения Fiji (программное обеспечение для обработки изображений с открытым исходным кодом) и Vaa3D (программное обеспечение для визуализации и анализа с открытым исходным кодом). Во всех экспериментах сосуды головного мозга заполняли красителем Evans Blue (2 мг/100 г, 1% раствор

в 0,9% физиологическом растворе, (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США), который вводили внутривенно за 30 мин до конфокальной инъекции. и многофотонная микроскопия через хвостовую вену. Lyve-1 конъюгированный с Alexa Fluor 488 (5 мкл, 0,1 мкл/мин, NBP1 43411AF488, Novus Biologicals, Centennial, CO, США), вводили через 90 мин в полость носа в большую цистерну перед конфокальной и мультифотонной микроскопией.

Для фотоабляции менингеальной лимфатической системы проводилось производилось введение Визудина в цистерну Магна в объёме 5 мкл с последующей его активацией с помощью лазера с длиной волны 689 нм через истончённый череп

Фотостимуляция лимфодренажной функции лимфатических путей решётчатой кости осуществлялась с помощью мощного лазерного диода с фиксированной длиной волны на волоконной брэгговской решетке (LD-1267-FBG-350, Innolume, Дортмунд, Германия), излучающий на длине волны 1267 нм. Лазерный диод был соединен с одномодовым дистальным волокном, заканчивающимся коллимационной оптикой, чтобы обеспечить диаметр луча 5 мм для фотостимуляции МЛС в области поперечного синуса и верхнего сагиттального синуса, и диаметр луча 1 мм для фотостимуляции лимфодренажа, расположенного в полости носа.

В течении 7 дней после имплантации клеток ГБМ все экспериментальные животные проходили недельное восстановление, после чего их фиксировали в стереотаксической раме и сразу после интраназального введения липосом (5 мкл) животных облучали лазером ближнего инфракрасного диапазона.

Для облучения лимфатической системы использовался использовался мощный лазерный диод с фиксированной длиной волны на волоконной брэгговской решетке (LD-1267-FBG-350, Innolume, Дортмунд, Германия), излучающий на длине волны 1267 нм. Лазерный диод был соединен с одномодовым дистальным волокном, заканчивающимся коллимационной оптикой, чтобы обеспечить диаметр луча 5 мм для фотостимуляции МЛС в области поперечного синуса и верхнего сагиттального синуса (рисунок 7), и

диаметр луча 1 мм для фотостимуляции лимфодренажа, расположенного в полости носа.

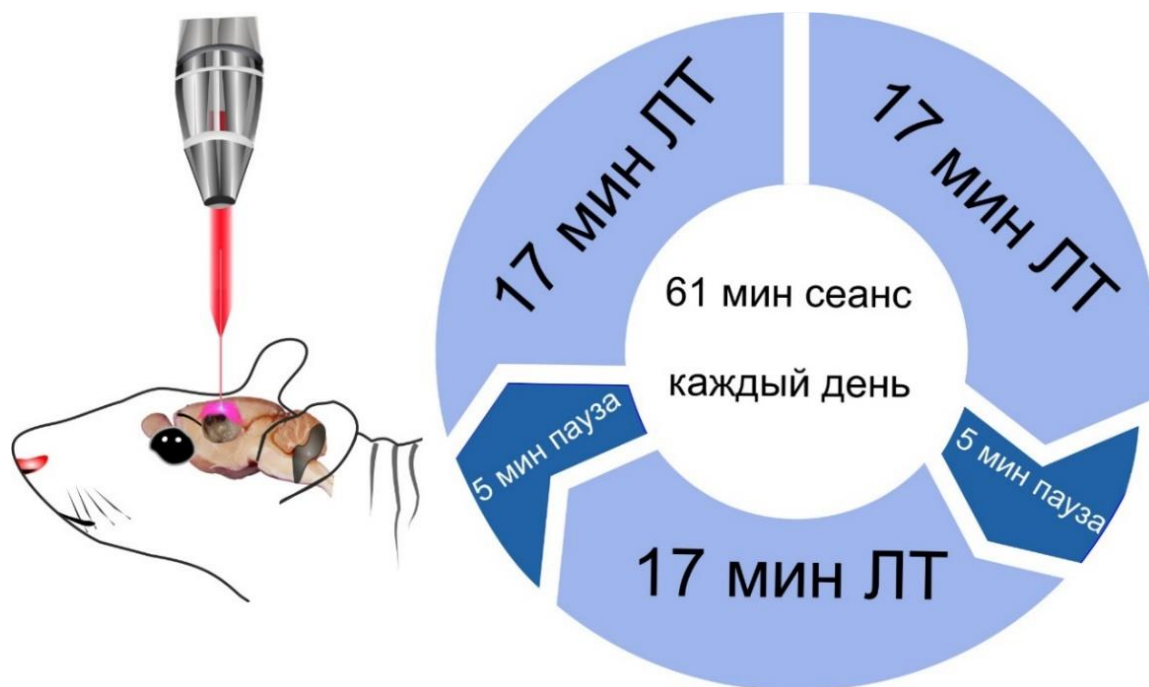


Рисунок 1 – Схема лазерного воздействия на головной мозг мыши

Анализ пропускания лазерного излучения с длиной волны 1267 нм, проходящего через свежеприготовленный образец черепа мыши, выявил эффект рассеяния, дающий в 1,2 раза более широкий лазерный луч длиной 6 мм, и только 35% исходной лазерной энергии достигло верхнего слоя коры. Дозы лазера рассчитывали следующим образом:

$$D=0.35*P/(1.2*S) *T, (1)$$

где D – доза облучения;

S — площадь лазерного пятна на коре головного мозга (см^2);

P – мощность лазерного воздействия на поверхность черепа (Вт);

T – полное время лазерного облучения (с).

Таким образом, полный ежедневный курс лазерного воздействия, включает в себя 17 мин лазера + 5 мин пауза + 17 мин лазер + 5 мин пауза + 17 мин лазер мощностью 100 мВт с приложенной дозой 510 Дж/ см^2 (на поверхность черепа и на область решетчатой кости) (рисунок 1) и 124 Дж/ см^2 (на поверхности

головного мозга) под ингаляционным наркозом (1% изофлуран при 1 л/мин N₂O/O₂ — соотношение 70/30).

Для конфокальной визуализации доставки липосом в тестируемые ткани использовали протокол иммуногистохимического (ИГХ) анализа с маркерами эндотелиального гиалуринового рецептора 1 лимфатических сосудов (LYVE1) и глиального фибриллярного кислого белка (GFAP) астроцитов. Для анализа иммуногистохимии собирали мозг, мозговые оболочки и ткани и готовили свободно плавающие срезы. Исследуемые ткани фиксировали в течение 48 ч в 4%-м солевом растворе, забуференном формалином, затем на вибраторе (Leica, Wetzlar, Германия) вырезали срезы тканей толщиной 40–50 мкм. Экспрессию антигена оценивали на срезах головного мозга и мозговых оболочек мышей по стандартной методике одновременного комбинированного окрашивания препарата с использованием конфокального лазерного сканирующего микроскопа Nikon A1R (MP, Nikon Instruments Inc.).

В ходе проведённых экспериментов была проведена конфокальная визуализация распределения липосом, через 3 часа после их интраназального введения, вдоль решётчатой кости и обонятельной луковицы (рисунок 2)

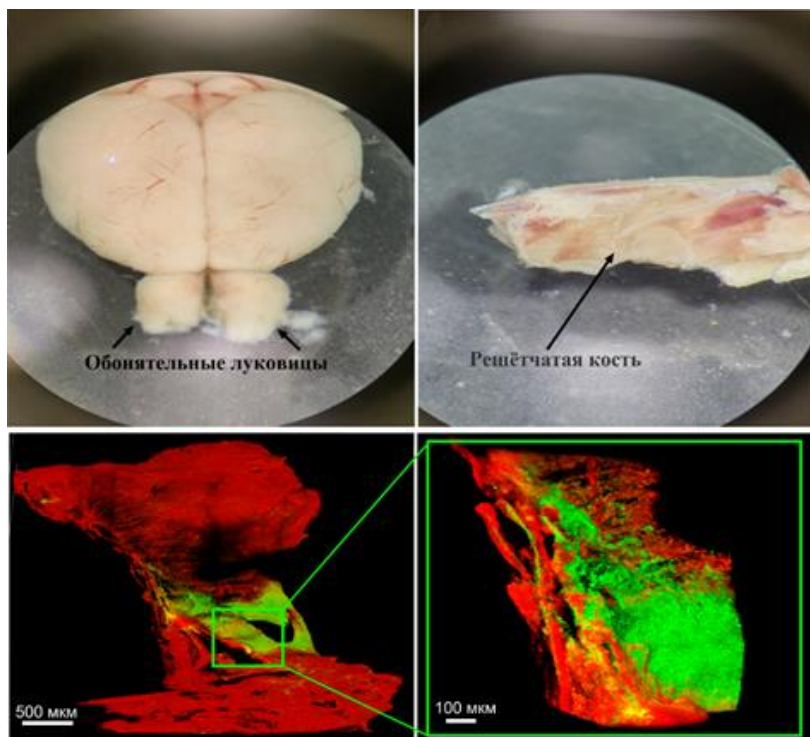


Рисунок 2 – Расположение обонятельных луковиц и решётчатой кость

Также наблюдалось распределения наночастиц в головном мозге, в результате чего конфокальная визуализация выявила направленное распределение липосом вдоль основных церебральных артерий (рисунок 3).

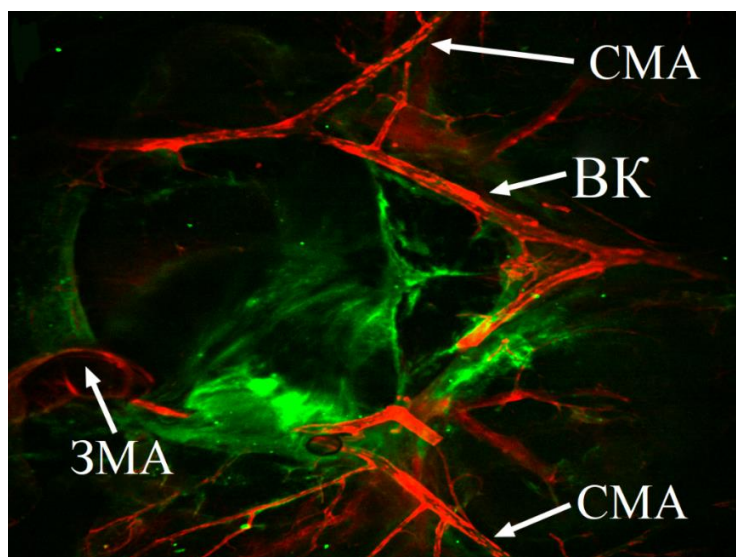


Рисунок 3– Конфокальное изображение распределения липосом на вентральной поверхности головного мозга мыши

В данном исследовании мы также наблюдали присутствие липосом (зелёные) в менингеальной лимфатической системе (Рисунок 4) и на поверхности головного мозга после его интраназального введения.

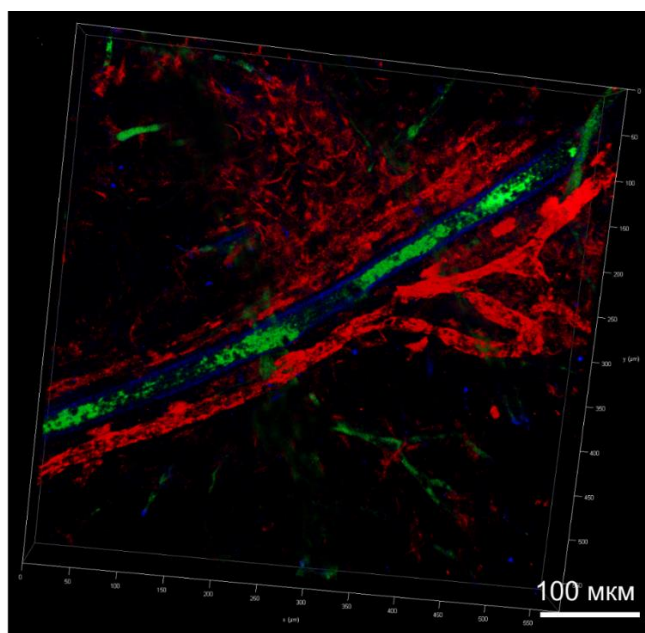


Рисунок 4 – Распространение наночастиц по менингеальным лимфатическим сосудам

На втором этапе была проанализирована эффективность распространения липосом в тканях головного мозга после фотоабляции менингеальной лимфатической системы с помощью введения Визудина в цистерну Магна и его последующей активации лазером с длиной волны 689 нм, что значительно уменьшило распространение липосом и лимфатический охват по сравнению с другими группами: имитация; визудин; лазер; визудин+лазер.

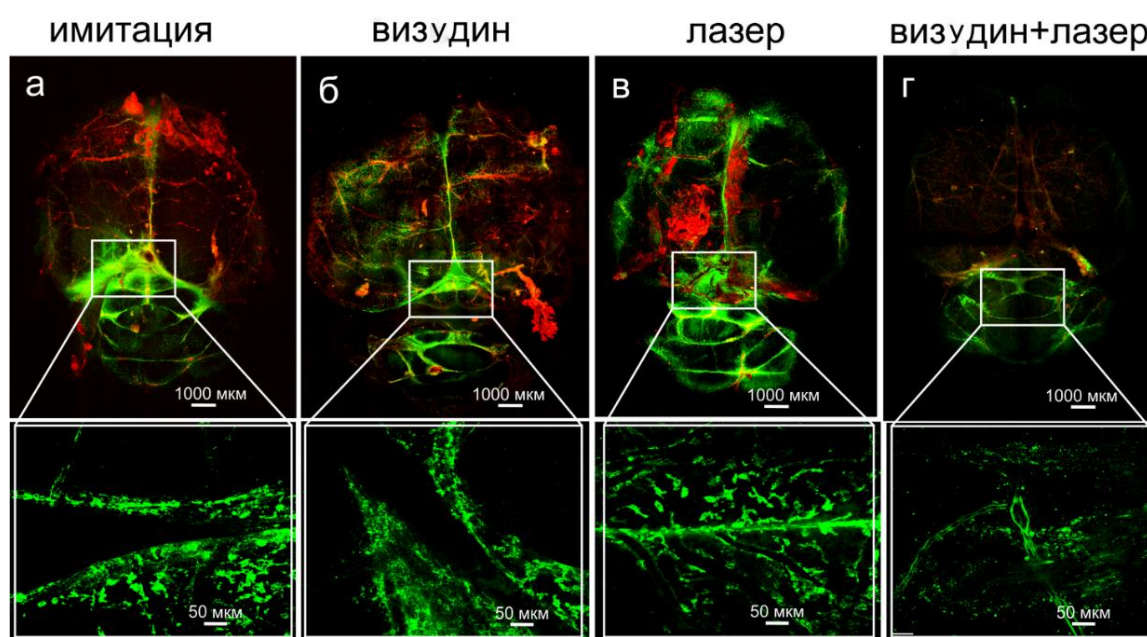


Рисунок 5 – Влияние фотоабляции менингеальных лимфатических сосудов на интраназальную доставку липосом в мозг

На третьем этапе исследования было проанализировано распределение липосом на дорсальной поверхности здорового головного мозга и при развитии глиобластомы, в результате которого наблюдалось резкое уменьшение распространения липосом в головном мозге, в группе животных с ГБМ по сравнению со здоровыми мышами (рисунок 6).

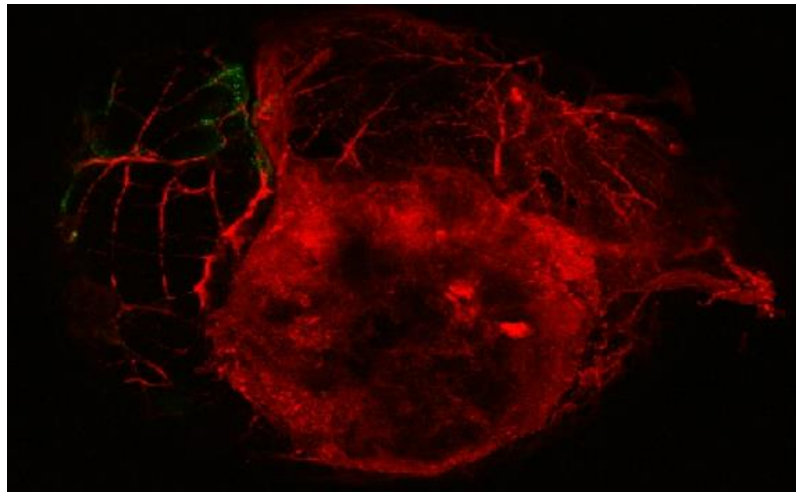
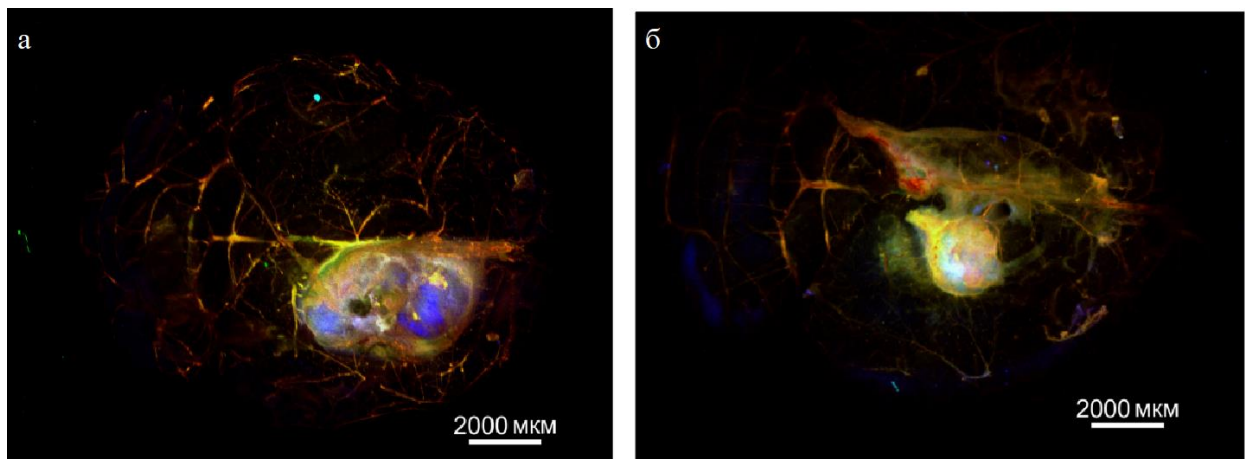


Рисунок 6 – репрезентативные конфокальные изображения липосом (зеленый), распространяющихся в дорсальной части головного мозга в группах с ГБМ (глиобластома красная)

На последнем этапе работы был проведён конфокальный анализ накопления липосом в ГБМ у мышей, получавших и не получавших лазерное облучение. показывает, что группа с фотовоздействием на ГБМ демонстрирует более высокое накопление липосом в тканях опухоли, чем без лазерной стимуляции (рисунок 7).



а, б – изображения мозга мыши с ГБМ (синяя) через 3 часа после интраназального введения липосом (зеленый) у мышей, не получавших лечения (а) и обработанных лазером (б)

Рисунок 14 – Влияние фотостимуляции на доставку липосом к глиобластоме у мышей

ВЫВОДЫ: 1. В ходе конфокальной визуализации интраназальной доставки лекарственных средств по лимфатическим путям через решётчатую кость наблюдается направленное распределение липосом по решётчатой кости, а затем по вентральной поверхности головного мозга вдоль основных церебральных артерий: средней, задней мозговой артерии, а также виллизиевому кругу;

2. В результате проведённой фотооблучения (визудин+лазер) менингеальный лимфатический охват и распространение липосом было значительно снижено, что доказывает высокую значимость менингеальной лимфатической системы в распространении липосом в головном мозге;

3. Наличие глиобластомы значительно снижает интенсивность флуоресцентного сигнала от липосом в 2,4 раза ниже чем в головном мозге здоровых мышей. Для глиобластомы характерно значительное снижение транспорта липосом в головной мозг, что указывает на нарушения дренажной функции менингеальной лимфатической системы и интактности гематоэнцефалического барьера;

4. В ходе проведённой фотомодуляции интраназального лимфатического транспорта наблюдается повышение интенсивности сигнала от липосом при глиобластоме в 2,9 раза в сравнении с группой мышей, у которых отсутствовало лазерное воздействие. Лазерное воздействие повышает эффективность интраназальной доставки липосом в глиобластому.



