

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

Кафедра физиологии человека и животных

**ТЕХНОЛОГИИ ПОВЫШЕНИЯ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЙ  
ЭФФЕКТИВНОСТИ АВАСТИНА**

**АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ**

студентки 4 курса 421 группы  
направления 06.03.01 Биология  
Биологического факультета  
Колосковой Анны Юрьевны

Научный руководитель

доцент, канд. биол. наук \_\_\_\_\_ Т. Д. Искра

(подпись, дата)

Зав. кафедрой

человека и животных,

доцент, док. биол. наук \_\_\_\_\_ О. В. Семячкина – Глушкова

(подпись, дата)

Саратов 2023

**Введение.** Разработка терапевтических препаратов, способных проникать через гематоэнцефалический барьер и достигать соответствующей цели, остается ключевой проблемой современной противоопухолевой терапии. Многие инвазивные и неинвазивные методы, а также различные типы препаратов и их гибридов были подробно исследованы в терапии лечения опухолей головного мозга. За последние 30 лет Управление по контролю за продуктами и лекарствами предложило только четыре препарата для терапии злокачественных опухолей головного мозга, такие как Ломустин, Кармустин, Темозоломид, которые являются алкилирующими агентами, и Авастин, моноклональное антитело. Процесс разработки новых лекарств для лечения заболеваний ЦНС не успевает за прогрессом молекулярной неврологии, поскольку большинство разработанных новых препаратов не способны проникать через интактный гематоэнцефалический барьер.

Гематоэнцефалический барьер образован эндотелиальными клетками микрососудов головного мозга, которые закрыты плотными соединениями, что делает его серьезным препятствием для большинства терапевтических средств при лечении заболеваний головного мозга. Целостность полупроницаемого механизма, создаваемого гематоэнцефалическим барьером, может быть нарушена при некоторых патологических состояниях, включая глиобластому.

Одним из наиболее эффективных препаратов антиангиогенной терапии стал Авастин, гуманизированное моноклональное антитело против лиганда **сосудистого эндотелиального фактора роста А (VEGF-A)**, которое связывается со своей циркулирующей мишенью, изменяя кинетику связывания лиганда с эндотелиальными клетками и подавляя ангиогенез.

Антиангиогенная терапия вызывает временную нормализацию сосудов, улучшает кровоток, что обеспечивает лучшую доставку кислорода и химиотерапевтических агентов и повышает эффективность как лучевой, так и химиотерапии. Модуляция доставки Авастина в нормальные сосуды головного мозга может значительно улучшить эффекты антиангиогенной

терапии глиобластомы. Однако эффективность данной терапии снижена из-за естественной преграды между сосудами и тканями головного мозга – гематоэнцефалический барьер, поэтому новые технологии повышения терапевтической эффективности Авастина, как монопрепарата, при открытом гематоэнцефалическом барьере может стать более эффективным средством при лечении опухолей мозга.

Таким образом, из-за физиологических и структурных свойств гематоэнцефалического барьера доставка лекарств в мозг представляет собой значимую проблему у пациентов с нарушениями центральной нервной системы, к которым относится глиобластома.

Целью работы являлось апробация одного из новых способов улучшения терапевтического эффекта Авастина у крыс с глиомой с помощью индуцированного громкой музыкой открытия гематоэнцефалического барьера.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Изучить проникновение Авастина в мозг крысы после обратимого открытия гематоэнцефалического барьера с помощью громкой музыки;
2. Изучить влияние громкой музыки на распределение ФИТЦ-БЦМ и Omniscan в тканях головного мозга;
3. Изучить терапевтический эффект препарата Авастин, доставленного в ткани мозга через открытый гематоэнцефалический барьер.

Эксперименты выполняли на 42 самцах крыс линии Wistar, не содержащих патогенов (200-250 г, возраст 2 месяца) в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных».

Исследования проводились на следующих группах животных:

- 1) 1 группа включала крыс с глиобластомой, которые получали внутрибрюшинную инъекцию физиологического раствора;

2) 2 группа включала крыс с глиобластомой и вызванным громкой музыкой открытием гематоэнцефалического барьера;

3) 3 группа включала крыс с глиобластомой, которые получали внутрибрюшинную инъекцию Авастина (БЦМ);

4) 4 группа включала крыс с глиобластомой и вызванным громкой музыкой открытием гематоэнцефалического барьера, которые получали внутрибрюшинную инъекцию Авастина (БЦМ);

5) 5 группа включала здоровых крыс с инъекцией физиологического раствора в том же объеме и в ту же область мозга, которая была выбрана для инъекции клеток глиомы;

6) 6 группа включала здоровых крыс с открытием гематоэнцефалического барьера, вызванным громкой музыкой.

Количество животных в каждой группе составляло 7 особей в каждой группе.

Для развития глиальной опухоли в головном мозге крыс проводили моделирование трансфицированной клеточной линии глиомы C6-TagRFP. Трансфицированную клеточную линию C6-TagRFP использовали для изучения роста флуоресцентной ГБМ.

Для визуализации открытия ГЭБ после воздействия громкой музыкой выполняли качественный и количественный анализ экстравазации красителя Evans Blue (961 Da). Количественная оценка проницаемости ГЭБ была выполнена с помощью спектрофлуорометрического анализа. Качественный анализ был выполнен при помощи конфокальной визуализации.

Использовали изотиоцианат флуоресцеина для синтеза флуоресцентного БЦМ с последующей конфокальной визуализацией экстравазации ФИТЦ-БЦМ.

Для изучения распределения ФИТЦ-БЦМ и Omniscan в головном мозге использовали флуоресцентную микроскопию и магнитно-резонансную томографию.

Проводили оценку объема глиобластомы для определения терапевтического эффекта БЦМ на рост глиобластомы при интактном ГЭБ и вызванным громкой музыкой открытие ГЭБ с помощью магнитно-резонансной томографии.

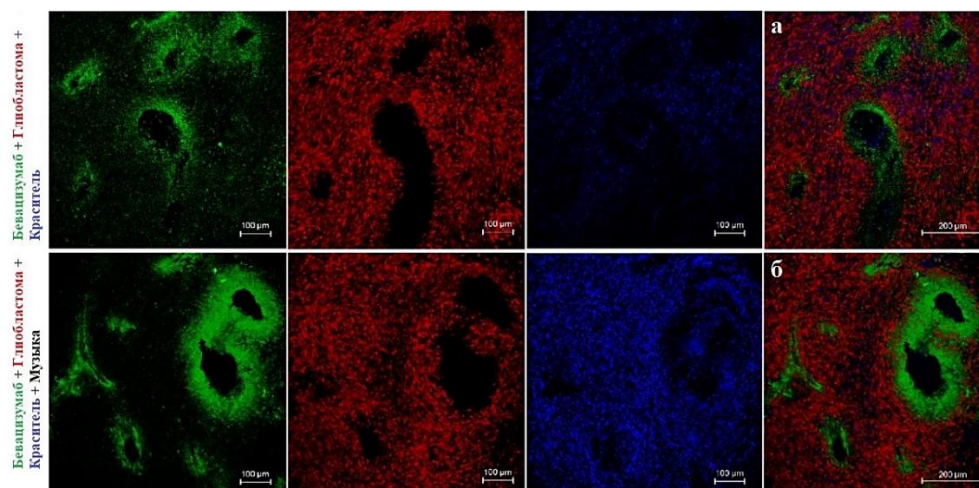
Для исследования клеточных механизмов был выполнен ИГХ анализ пролиферации (маркер Ki67) и апоптоза (маркер Вах) в клетках ГБМ. Подготовленные срезы визуализировали с помощью конфокальной микроскопии.

Бакалаврская работа включает содержание, список сокращений, введение, 3 главы (обзор литературы, материалы и методы, результаты исследований), выводы и список использованных источников, включающий 46 источников на русском и английском языках. Работа изложена на 56 страницах машинописного текста. Работа проиллюстрирована 12 рисунками.

**Основное содержание работы.** В ходе первой серии экспериментов исследовали было продемонстрировано, что проницаемость ГЭБ после воздействия громкой музыкой для Evans Blue была в 31,3 раза выше ( $3,45 \pm 0,21$  мкг/г ткани против  $0,11 \pm 0,06$  мкг/г ткани,  $p < 0,001$ , критерия Манна-Уитни–Уилкоксона,  $n=7$  в каждой группе) у крыс с ГБМ (через 21 день после имплантации клеток глиомы) по сравнению со здоровыми животными, что свидетельствует об открытии ГЭБ в опухоли головного мозга.

Конфокальный анализ экстравазации Evans Blue подтвердил данные спектрофлуориметрического анализа проницаемости ГЭБ для EVAS. Экстравазация Evans Blue определялась как четкая флуоресценция, видимая вокруг стенок сосуда (1б). В группе, где крысы не подвергались музыкальному воздействию, утечка красителя не наблюдалась, Evans Blue находился внутри сосудов головного мозга (рисунок 1а).

С целью оценки проницаемости открытого ГЭБ для веществ с высокой молекулярной массой было дополнительно использовано внутривенное введение ФИТЦ-БЦМ для проведения качественного анализа экстравазации ФИТЦ-БЦМ.



а — Конфокальная визуализация экстравазации ФИТЦ-БЦМ (зелёный) в глиальной опухоли (красный) при интактном гематоэнцефалическом барьере;

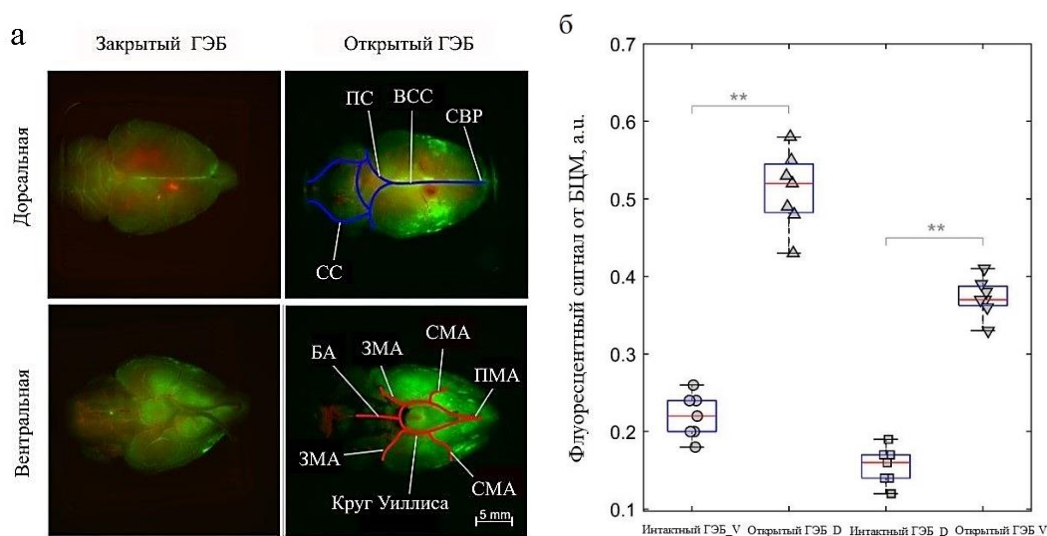
б — Конфокальная визуализация экстравазации ФИТЦ-БЦМ (зелёный) в глиальной опухоли (красный) после открытия гематоэнцефалического барьера

Рисунок 1 — Репрезентативные конфокальные изображения распределение Авастина (зелёный) в тканях глиобластомы (красный) крыс из групп ГБМ+БЦМ и ГБМ+БЦМ+Музыка

Было установлено, что вызванное громкой музыкой открытие ГЭБ существенно увеличивало распределение БЦМ вокруг сосудов головного мозга крыс с ГБМ по сравнению с группой крыс без музыкального воздействия. Экстравазация БЦМ вокруг сосудов головного мозга было в 2,1 раза выше в ГБМ+БЦМ+Музыка по сравнению с группы ГБМ+БЦМ ( $0,54 \pm 0,04$  а.е. против  $0,25 \pm 0,05$  а.е.,  $p < 0,001$ , критерий Манна–Уитни–Уилкоксона,  $n=7$  в каждой группе).

Было изучено влияние открытия ГЭБ, вызванного музыкой, на распределение ФИТЦ-БЦМ в жидкостях головного мозга после его введения в правый боковой желудочек в качестве сообщающейся полости для лимфодренажа жидкости. Было продемонстрировано, что флуоресценция БЦМ была выше у крыс с открытым ГЭБ по сравнению с интактный ГЭБ с

более сильным распределением ФИТЦ-БЦМ в вентральной, чем в дорсальной части мозга ( $0,51 \pm 0,04$  а.е. против  $0,22 \pm 0,03$  а.е.,  $p < 0,001$ , тест Манна–Уитни–Уилкоксона в вентральной части мозга и  $0,37 \pm 0,07$  а.ед. против  $0,15 \pm 0,02$  а.е.,  $p < 0,001$ , критерий Манна–Уитни–Уилкоксона в дорсальной части мозга,  $n=7$  в каждой группе).



а — Изображения периваскулярного распределения ФИТЦ-БЦМ на дорсальной и вентральной поверхности головного мозга при интактном и открытом гематоэнцефалическом барьере; б – Количественная оценка интенсивности флуоресцентный сигнал от ФИТЦ-БЦМ у крыс с интактным и открытым гематоэнцефалическим барьером, V – вентральный аспект мозга и D – дорсальный аспект мозга, \*\* -  $p < 0,01$ , тест Манна–Уитни–Уилкоксона,  $n=7$  в каждой группе.

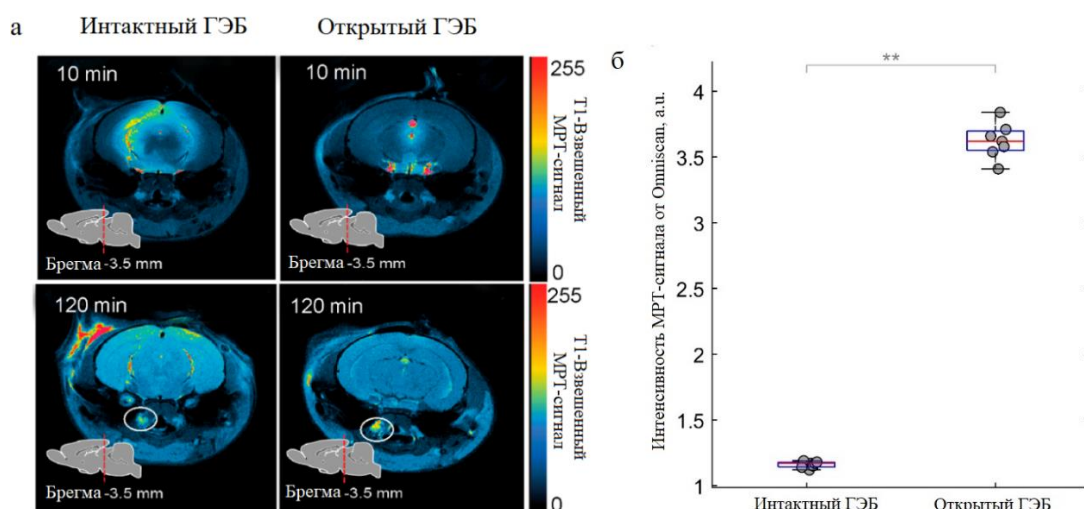
Изображения являются репрезентативными для  $n=7$  крыс. СМА: Средняя мозговая артерия; ЗМА: Задняя мозговая артерия; ПМА: Передняя мозговая артерия; БА: Базиллярная артерия; ВСС: Верхний сагиттальный синус; СС: Сигмовидный синус; ПС: Поперечный синус; РСС: Ростральный синус слияния.

Рисунок 2 — Распределение ФИТЦ-БЦМ (зеленый) у здоровых крыс при интактном и открытом гематоэнцефалическом барьере

Было обнаружено, что вызванное музыкой открытие ГЭБ увеличивало распределение ФИТЦ-БЦМ более значительно в вентральной, чем в дорсальной части нормального мозга. Так, после внутривенной инъекции ФИТЦ-БЦМ более интенсивно распределялся по мозговым артериям в пределах субарахноидального пространства в области Виллизиева круга у основания мозга с распространением в пределах этого пространства вдоль средней мозговой артерии и ее ветвей.

Эти данные свидетельствуют о том, что открытие ГЭБ способствует распределению ФИТЦ-БЦМ из желудочка в вентральную область мозга, где локализуются базальные менингеальные лимфатические сосуды, играющие важную роль в дренаже мозга.

С целью изучения влияния музыки *in vivo* на процессы лимфодренажа мозга, определяли накопление контрастного вещества Omniscan (0,1 мм/кг) в мозге крыс.



а — МРТ-изображения распределения Omniscan в головном мозге и выведения индикатора в ГШЛУ (обведены кружком); б — Количественная оценка интенсивности МРТ-сигнала от Omniscan у крыс с интактным и открытым ГЭБ, \*\* –  $p < 0,01$ , тест Манна-Уитни-Уилкоксона,  $n=7$  в каждой группе.

Рисунок 3 — Распределение Omniscan у здоровых крыс при интактном и открытом гематоэнцефалическом барьере



Используя МРТ-анализ распределения Omniscan в правом боковом желудочке в режиме реального времени, наблюдали выведение индикатора из мозга в ГШЛУ, которое было намного быстрее у крыс с открытым ГЭБ по сравнению с крысы с интактным ГЭБ.

Было продемонстрировано, что открытие ГЭБ значительно увеличивало распределение Omniscan из правого бокового желудочка в ГШЛУ ( $3,62 \pm 0,08$  а.е. против  $1,16 \pm 0,06$  а.е.,  $p < 0,001$ , тест Манна–Уитни–Уилкоксона,  $n=7$  в каждой группы).

На заключительном этапе исследования проводили оценку объема ГБМ с целью выявления терапевтического эффекта БЦМ на рост глиобластомы при интактном ГЭБ и вызванном громкой музыкой открытии ГЭБ. МРТ-анализ роста глиомы и объема опухоли был проведен через 7 и 21 день после имплантации опухолевых клеток в группах ГБМ.

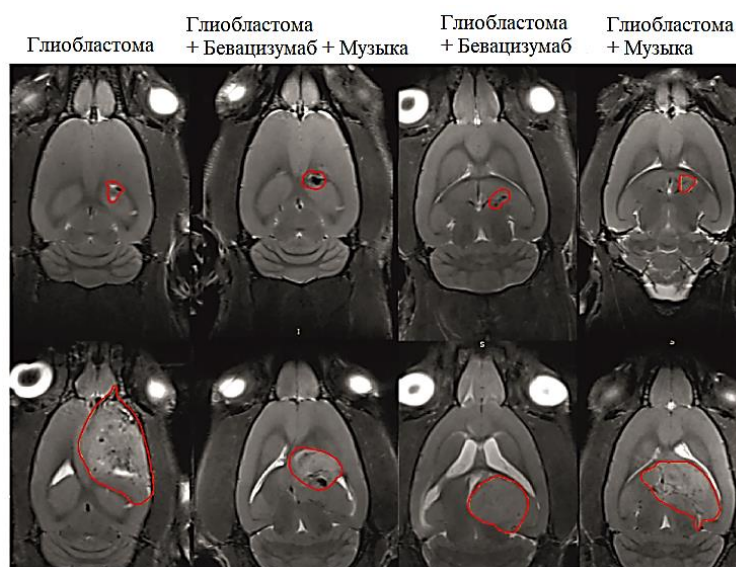


Рисунок 4 — МРТ-изображения глиобластомы в группах ГБМ, ГБМ+Музыка, ГБМ+БЦМ и ГБМ+БЦМ+Музыка

Было выявлено, что объем ГБМ был значительно увеличен с 7 по 21 день наблюдения в группах ГБМ, ГБМ+Музыка, ГБМ+БЦМ и ГБМ+БЦМ+Музыка. Объем ГБМ на 21 день прогрессирования опухоли был увеличен в 7,1 раза ( $64,1 \pm 3,3$  мм<sup>3</sup> по сравнению с  $9,0 \pm 1,1$  мм<sup>3</sup>,  $p < 0,001$ , критерий Манна–Уитни–Уилкоксона,  $n=7$  в каждой группе) в группе ГБМ+БЦМ+Музыка и в 14,4 раза

( $111,3 \pm 9,2$  мм<sup>3</sup> против  $7,7 \pm 2,2$  мм<sup>3</sup>,  $p < 0,001$ , критерий Манна–Уитни–Уилкоксона,  $n=7$  в каждой группе) в группе ГБМ+БЦМ. Было продемонстрировано, что объём ГБМ на 21 день роста опухоли был в 1,7 раза меньше в группе ГБМ+БЦМ+Музыка по сравнению с группы ГБМ+БЦМ+Музыка ( $64,1 \pm 3,3$  мм<sup>3</sup> против  $111,3 \pm 9,2$  мм<sup>3</sup>,  $p < 0,001$ , критерий Манна–Уитни–Уилкоксона,  $n=7$  в каждой группе).

Для исследования клеточных механизмов был выполнен ИГХ анализ пролиферации (маркер Ki67) и апоптоза (маркер Вах) в клетках ГБМ.

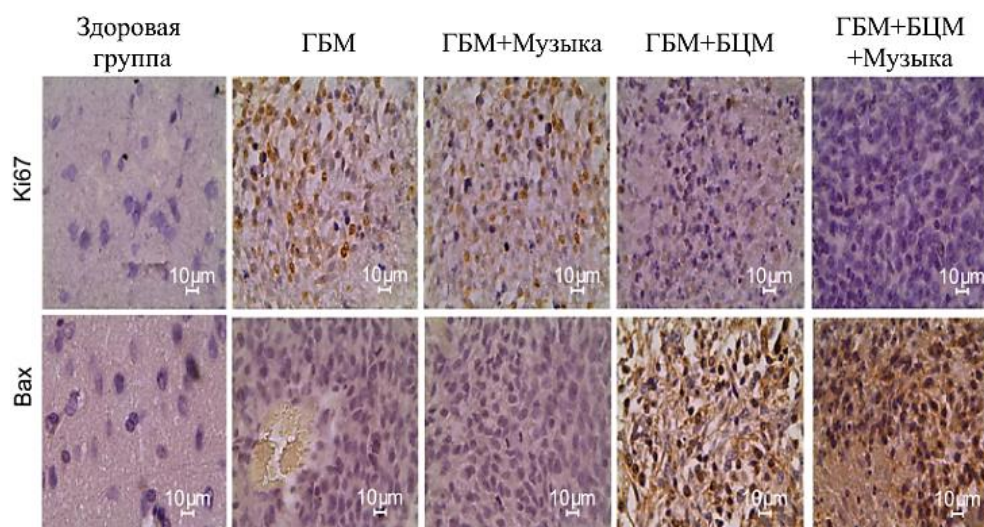


Рисунок 5 — ИГХ-анализ экспрессии Ki67 (маркер пролиферации) и Вах (маркер апоптоз) в группах Здоровые крысы, ГБМ, ГБМ+БЦМ, ГБМ+Музыка и ГБМ+БЦМ+Музыка

Рост глиобласты характеризовался повышенной экспрессией Ki67 (маркера клеточной пролиферации) по сравнению с нормальным мозгом, что указывает на высокую пролиферацию опухолевых клеток, которая была сходной между группами ГБМ и ГБМ+Музыка ( $43,22 \pm 8,40$  % против  $0,81 \pm 0,09$  %,  $p < 0,001$  для группы ГБМ и  $41,44 \pm 6,51$  % против  $0,81 \pm 0,09$  %,  $p < 0,001$  для музыкальной группы ГБМ, критерий Манна–Уитни–Уилкоксона,  $n=7$  в каждой группе). Однако экспрессия Ki67 была значительно снижена в группах, получавших БЦМ, что было более выражено у крыс с музыкальным воздействием, по сравнению с животными без музыкального воздействия.

Действительно, экспрессия Ki67 была в 18,7 раза ниже в ГБМ+БЦМ+Музыка по сравнению с в группах ГБМ+Музыка ( $2,21 \pm 0,22$  % против  $41,44 \pm 6,51$  %,  $p < 0,001$ , критерий Манна–Уитни–Уилкоксона,  $n=7$  в каждой группе) и в 2,8 раза ниже в группах ГБМ+БЦМ по сравнению с группами ГБМ ( $15,40 \pm 4,62$  % против  $43,22 \pm 8,40$  %,  $p < 0,001$ , критерий Манна–Уитни–Уилкоксона,  $n=7$  в каждой группе). Сравнение эффектов музыки на экспрессию Ki67 у крыс с глиомой, получавших и не получавших БЦМ, показывает, что пролиферация глиомы была в 6,9 раза меньше в ГБМ+БЦМ+Музыка по сравнению с группы ГБМ+БЦМ ( $2,21 \pm 0,22$  % против  $15,40 \pm 4,62$  %,  $p < 0,05$ , критерий Манна–Уитни–Уилкоксона,  $n=7$  в каждой группе).

Был выполнен количественный анализ иммунопозитивных клеток (%), экспрессирующих Вах (апоптоз) и Ki67 (пролиферацию) для исследования клеточных механизмов.

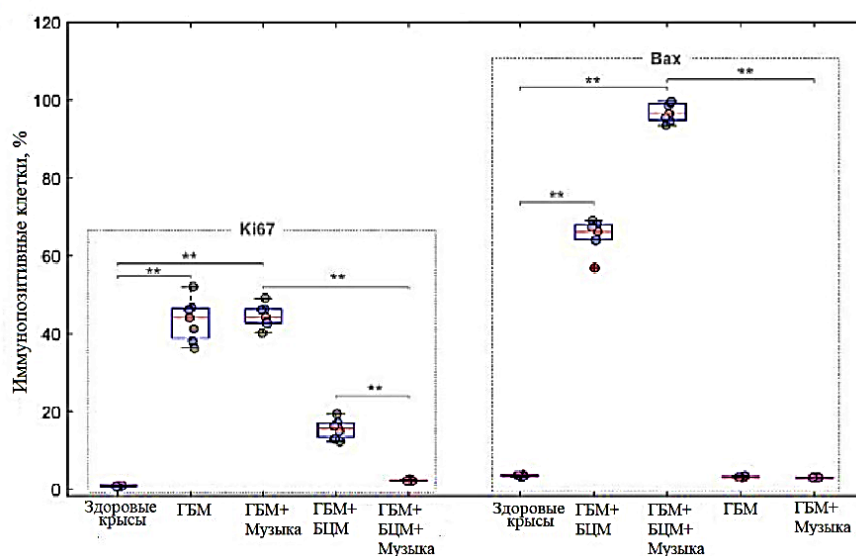


Рисунок 6 — Количественная оценка иммунопозитивных клеток (%), экспрессирующих Вах и Ki67 в группах Здоровые крысы, ГБМ, ГБМ+БЦМ, ГБМ+Музыка и ГБМ+БЦМ+Музыка, тест Манна–Уитни–Уилкоксона, \*\* -  $p < 0,01$ ,  $n=7$  в каждой группе

Согласно данным на рисунке, БЦМ индуцировал апоптоз в опухолевых клетках с высокой экспрессией Вах (маркера апоптоза) в обеих группах крыс с музыкальным воздействием и без него ( $96,32 \pm 7,33$  % против  $1,57 \pm 0,07$  %,

$p < 0,001$  для ГБМ+БЦМ+Музыка и  $64,12 \pm 3,31$  % против  $1,57 \pm 0,07$  %,  $p < 0,001$  для ГБМ+БЦМ, критерий Манна–Уитни–Уилкоксона  $n=7$  в каждой группе). Сравнение между этими двумя группами показало, что БЦМ-опосредованный апоптоз в клетках глиомы был в 1,5 раза выше в группе ГБМ+БЦМ+Музыка по сравнению с группой ГБМ+БЦМ ( $96,32 \pm 7,33$  % против  $64,12 \pm 3,31$  %,  $p < 0,001$ , критерий Манна–Уитни–Уилкоксона,  $n=7$  в каждой группе).

#### **Выводы:**

1. При обратимом неинвазивном открытии гематоэнцефалического барьера с помощью громкой музыки улучшается экстравазация Авастина в ткани головного мозга, что невозможно при закрытом гематоэнцефалическом барьере.

2. Музыкальное воздействие значительно увеличивает распределение индикаторов (ФИТЦ-БЦМ и Omniscan) из правого бокового желудочка в мозге крысы по путям мозговой дренажной системы (периваскулярной и лимфатической), которые являются важным путем доставки лекарств в мозг.

3. Установлено, что воздействие громкой музыкой улучшает терапевтический эффект Авастина, что подтверждается уменьшением объема глиобластомы, за счет снижения клеточных механизмов прогрессирования опухоли под действием противоопухолевого препарата, что сопровождается более высокой выживаемостью среди крыс.