

МИНОБРАЗОВАНИЯ 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 ТКАНИ ГЛИОБЛАСТОМЫ У МЫШЕЙ  
С ПОМОЩЬЮ ФОТОДИНАМИЧЕСКОГО ПОВЫШЕНИЯ  
ПРОНИЦАЕМОСТИ ГЕМАТОЭНЦЕФАЛИЧЕСКОГО БАРЬЕРА**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студента 4 курса 421 группы

Направления подготовки бакалавриата 06.03.01 «Биология»

Биологического факультета

Егорова Полина Николаевна

Научный руководитель

Зав. кафедры доцент, д. б. н \_\_\_\_\_ О. В. Семячкина-Глушковская  
(подпись, дата)

Зав. кафедры доцент, д. б. н \_\_\_\_\_ О. В. Семячкина-Глушковская  
(подпись, дата)

Саратов 2024

**Введение.** Одним из распространённых онкологических заболеваний являются опухоли головного мозга, в частности ГБМ, которые происходят из астроцитарной глии и характеризуются высокой пролиферативной активностью, быстрым ростом и очень ограниченными возможностями лечения.

Несмотря на совершенствование методик различных методов лечения опухолей мозга, выживаемость от ГБМ остается низкой. Лишь немногие пациенты имеют выживаемость более 5 лет после постановки диагноза.

Удаление максимально возможного безопасного количества опухолевой ткани, не вызывающего неврологического дефицита, является первым шагом в лечении взрослых и детей с ГБМ.

Однако операция не сильно улучшает положительный результат. В большинстве случаев ГБМ рецидивирует, возникает в пределах 2 см от места резекции. Стандартного лечения рецидивов не существует.

Как правило, пациенты, перенесшие операцию, получают химиотерапию, которую часто комбинируют с радиотерапией. Однако, есть несколько ограничений в терапии ГБМ у детей. У новорожденных, лучевая терапия может привести к серьезному нарушению развития, роста и когнитивных способностей за счет прямой ионизации ДНК, вызывающей не только деграцию ДНК в ядрах клеток ГБМ, но также и мутации ДНК в здоровых нейронных клетках, окружающих ГБМ.

Гематоэнцефалический барьер ограничивает доставку подавляющего большинства противоопухолевых препаратов, что создает проблему фармакологической терапии ГБМ, особенно лечения областей- сателлитов опухоли, которые растут вдоль здоровых сосудов головного мозга с интактным ГЭБ. Следовательно, эффективная терапия рецидивирующего ГБМ зависит от разработки стратегий обхода интактного ГЭБ на границе ГБМ для предотвращения миграции и прогрессирования опухоли.

В настоящий момент фотодинамическая терапия является

многообещающим методом – она представляет собой введение фотосенсибилизатора и последующее лазерное воздействие.

ФДТ применяют во время хирургии во время первичной ГБМ при резекции первичного диагноза ГБМ; вторичную ФДТ применяют при рецидивах ГБМ с помощью полупроводникового лазера с диаметром 400 мкм. Управление еды и лекарств агентства министерства здравоохранения и социальных служб США (FDA) одобрила применение 5-аминолевулиновой кислоты (5-АЛА) для ФДТ при ГБМ.

5-АЛА является одним из наиболее распространённых и применяется в медицине для лечения ГБМ у пациентов. Она имеет способность селективно накапливаться в клетках опухоли головного мозга и, при воздействии лазера с длиной волны 635 нм, генерирует синглетный кислород, который запускает митохондриальный апоптоз в раковых клетках, что приводит к гибели ГБМ.

Тем не менее, ФДТ имеет ограничения к применению, его нельзя проводить новорождённым и маленьким детям, а также пациентам с аллергическими реакциями и чувствительной кожей, поэтому разработка новых методов ФДТ, не содержащих ФС, может дать новые возможности преодолеть ограничения ФДТ-терапии ГБМ.

В связи с этим была разработана новая технология лазерной терапии с длиной волны 1268 нм, которая способствует генерации синглетного кислорода без введения в организм фотосенсибилизатора.

Одни из самых перспективных транспортных систем для доставки лекарственных средств в опухоли мозга являются липосомы.

Целью работы явилось изучение эффектов лазерного воздействия 1268 нм на проницаемость ГЭБ для эффективной доставки липосом к ГБМ.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Сравнение эффектов лазерного воздействия 1268 нм (прямая генерация синглетного кислорода) и 1122 нм (не генерирует синглетный

кислород) на проницаемость ГЭБ у мышей с применением магнитно-резонансной томографии, иммуногистохимии и конфокальной микроскопии.

2. Исследование механизмов повышения проницаемости ГЭБ после лазерного воздействия 1268 нм на основе изучение экспрессии белков плотных контактов, включая Р-гликопротеин (Pgp), клаудин-5 (CLDN-5), оклудин, Zonula-1 (ZO-1), молекула соединительной адгезии (JAM), транспортер монокарбоксилата 1 (MCT1), кластер дифференцировки 31 (CD31) и определения трансэндотелиального сопротивления (ТЭС), а также уровня лактата в тканях головного мозга с помощью снижения экспрессии MCT1 по механизму отрицательной обратной связи.

3. Проанализировать доставку липосом в ГБМ после лазерного (1268 нм) повышения проницаемости ГЭБ с применением конфокальной микроскопии.

Глиобластома — это злокачественное глиальное новообразование мозга, развивающееся в основном в его белом веществе. Средний показатель заболеваемости колеблется в пределах 2,9-4,5 на 100 000 населения. Образование локализуется почти исключительно в белом веществе мозга, может появляться в стволе головного мозга, мозжечке и спинном мозге [1].

ГБМ могут возникать *de novo*, то есть они начинаются как опухоль степени IV без признаков предшественника более низкой степени. Опухоли *de novo* являются наиболее распространенной формой глиобластомы и, как правило, более агрессивны и поражают пожилых пациентов.

В качестве альтернативы, вторичные ГБМ могут развиваться из астроцитарных опухолей более низкой степени (степень II или степень III) и со временем развиваться в опухоли степени IV. Как правило, эти опухоли изначально имеют тенденцию к более медленному росту, но постепенно могут стать агрессивными.

Клетки новообразования отличаются высокой стойкостью к облучению, в результате чего возможности применения лучевой терапии ограничиваются из-за чувствительности окружающих здоровых клеток.

Химиотерапия – не гарантия, что опухоль станет меньших размеров, потому что не все средства могут проникнуть через ГЭБ. На данный момент есть множество терапий, который могут помочь излечится или приостановить рост ГБМ, среди которых иммунотерапия, лучевая терапия, хирургическое вмешательство и их комбинация друг с другом.

Несмотря на постепенный прогресс в терапевтическом подходе к ГБМ, разработка как новых, так и существующих медикаментозных методов лечения рецидивирующей ГБМ была минимальной. Последним препаратом, значительно улучшившим общую выживаемость при ГБМ, был темозоломид (TMZ), который был представлен 20 лет назад.

Несмотря на улучшение медианы выживаемости без прогрессирования (PFS) в обоих исследованиях, применение бевацизумаба первой линии не улучшило ОС у пациентов с глиобластомой. В соответствии с этим, согласно систематическому анализу, комбинация бевацизумаба при впервые диагностированном ГБМ выгодна с точки зрения увеличения медианы PFS, но не ОС. Таким образом, для окончательного улучшения результатов лечения пациентов с глиобластомой необходимы инновационные методы лечения.

Одно из основных ограничений новых методов лечения ГБМ отчасти из-за неэффективной доставки лекарств через ГЭБ. ГЭБ образуется эндотелиальными клетками мозга, выстилающими микроциркуляторное русло головного мозга, что представляет особую проблему для доставки лекарств.

Гематоэнцефалический барьер — это комплексная структура, находящийся в центральной нервной системе на границе между кровью и нервной тканью и регулирующий поступление из крови в цереброспинальную жидкость и нервную ткань циркулирующих в крови веществ.

ГЭБ работает как селективный фильтр, пропускающий в цереброспинальную жидкость одни вещества и не пропускающий другие,

которые могут циркулировать в крови, но чужды мозговой ткани.

При опухолях мозга проблема заключается в том, что головной мозг защищает гематоэнцефалический барьер – физиологический механизм, способный избирательно контролировать обменные процессы между кровью, ЦНС и цереброспинальной жидкостью. Упомянутый барьер гарантирует постоянство внутренней среды в головном и спинном мозгу. Из-за этого большая часть внедряемого химиолекарства попросту не доходит до мозга и не может лечить опухоли.

При ГБМ происходит нарушение интерэндотелиальных экспрессий плотных соединений. Экспрессия клаудина-1 теряется в микрососудах ГБМ, тогда как клаудин-5 и окклюдин значительно понижаются, а экспрессия ZO-1 не затрагивается.

Опухолевые астроциты плохо дифференцированы, что может быть не в состоянии высвобождать факторы, необходимые для функции ГЭБ.

Многочисленные исследования показали, что AQP4 широко активируется при астроцитоме и метастатической аденокарциноме, что коррелирует с наблюдаемым отверстием ГЭБ, визуализируемым с помощью компьютерной томографии (КТ) с контрастным усилением.

Таким образом, похоже, что нарушение ГЭБ, связанное с опухолями головного мозга, повышает экспрессию AQP4.

Тем не менее, точный механизм повышенной экспрессии AQP4 в различных клинических ситуациях неизвестен. 30 % опухолей в головном мозге являются метастатическими поражениями, вызванными раком.

По клиническим и экспериментальным данным, при использовании фотодинамической терапии при опухолях головного мозга, у пациентов наблюдается увеличение продолжительности жизни и значительно снижается риск развития тяжёлых неврологических осложнений.

ФДТ сочетает в себе источник света и нетоксичные ФС. Метод фотодинамической терапии применяется в несколько этапов – первый из них – введения пациенту раствора ФС, чаще это делают внутривенно.

На втором этапе происходит накопление вещества в опухоли или другой ткани, в зависимости от целей терапии, происходит это в течение трех.

Третий этап заключается в непосредственно облучении поражённого участка светом в видимом диапазоне (400–700 нм), спектральный состав которого соответствует спектру поглощения ФС, длительность процедуры 15-20 мин.

После интенсивного облучения в участках опухоли, содержащих ФС, развиваются фотофизические и фотохимические реакции, продуктом которых является молекула с высокой химической активностью – синглетный кислород.

Синглетный кислород повреждает опухолевые клетки путем прямого повреждения (некроз и апоптоз) или вследствие окклюзии опухолевых сосудов (образование тромбов) и вторичного усиления иммунитета хозяина. Время жизни  $^1O_2$  составляет от 0,04 до 4 с, а расстояние миграции от 0,02 до 1 м.

Таким образом, ФДТ считается малоинвазивной терапией, нацеленной на каждую клетку, содержащую фотосенсибилизатор, с сохранением окружающих нормальных тканей.

#### *Объект исследования*

Самцы мышей C57BL/6 (25–28 г) использовались во всех экспериментах и были получены из Национального центра ресурсов лабораторных животных в (Пушино, Москва, Россия) или Лаборатории Джексона (Бар-Харбор, штат Миссури, США).

Мы выполнили МРТ-визуализацию проницаемости ГЭБ для гадолиниума- ди-этилентриамина-пентауксусной кислоты с использованием специально разработанной последовательности для последующей оценки изменений интенсивности МРТ-сигнала.

Средние значения  $K_i$   $\text{map}$  достигли  $79,6 \pm 15$  а.е. ( $p < 0,01$ ) только через 1 ч после облучение лазером с длиной волны 1268 нм. Все остальные

значения  $K_i$  для лазеров с длиной волны 1268 нм и 1122 нм были сопоставимы с исходным уровнем –  $33,8 \pm 9,0$  а.е.

Наблюдалось восстановление проницаемости ГЭБ через 4 ч после облучения с длиной волны 1268 нм, что подтвердило наши данные *ex vivo* с использованием EVAS, предполагающие обратимое воздействие лазера с длиной волны 1268 нм на проницаемость ГЭБ.

Визуализация *in vivo* утечки FITCD массой 70 кДа в паренхиме головного мозга с помощью 2PLSM подтвердила наши результаты МРТ. Действительно, 2PLSM показал открытие гематоэнцефалического барьера через 1 ч после облучения лазером с длиной волны 1268 нм, но не после облучения лазером с длиной волны 1122 нм.

В мозгу мыши, который был облучен лазером с длиной волны 1122 нм, экстравазации FITCD не наблюдалось. Количественная оценка проницаемости сосудов через 20 мин после инъекции FITCD у мышей, облученных лазером с длиной волны 1268 нм, показывает увеличение до  $17,4 \pm 4,2\%$  через 1 ч ( $p < 0,01$ ); и до  $7,2 \pm 4\%$  через 4 ч после облучения лазером с длиной волны 1268 нм ( $p = 0,15$ ). по сравнению с тем, что исходный уровень ( $4,4 \pm 1,2\%$ ).

У мышей, облученных лазером с длиной волны 1122 нм, не было обнаружено существенной разницы в утечке FITCD ( $4,37 \pm 1\%$ ,  $5,89 \pm 2,9\%$  и  $5,1 \pm 4\%$  для исходного уровня, через 1 ч и 4 ч после лазерного облучения соответственно).

У животных, облученных лазером с длиной волны 1122 нм, не наблюдалось никаких изменений в динамике установленной флуоресценции.

У мышей, облученных лазером с длиной волны 1122 нм, FITC в паренхиме головного мозга и в плазме крови были одинаковыми в разные моменты времени.

На первом этапе исследования мы проанализировали экспрессию белков, осуществляющих работу гематоэнцефалического барьера.

Опосредованное лазером повышение проницаемости ГЭБ



сопровождалось увеличением экспрессии Pgp, АТФ-зависимого транспортного белка, а также снижением экспрессии белков плотных соединений (TJ), таких как ZO-1 и CLDN- 5.

На следующий день после облучения с длиной волны 1268 нм, когда ГЭБ был закрыт, статус белка ГЭБ изменился. Действительно, экспрессия Pgp, ZO-1 и CLDN-5 восстанавливалась до контрольного уровня. Экспрессия MCT1, которая опосредует транспорт лактата через ГЭБ, снижалась по мере накопления лактата в тканях головного мозга ( $5,09 \pm 0,01$  нмоль/мг против 7,33

$\pm 0,03$  нмоль/мг,  $p < 0,001$ , U-тесты Уилкоксона, Манна-Уитни). Напротив, экспрессия JAM и CD31 увеличилась.

Повышенная проницаемость ГЭБ, индуцированная лазером с длиной волны 1268 нм, связана со снижением TEER, активацией ABC-транспортной системы через Pgp, а также временной потерей присутствия TJ (ZO-1 и CLND5) в эндотелиальных промежутках.

Восстановление ГЭБ сопровождается активацией метаболической активности нейронов (накопление лактата со снижением экспрессии MCT1 по механизму отрицательной обратной связи), восстановлением TEER и стабилизацией проницаемости ГЭБ за счет повышения экспрессии JAM и CD31.

Через час после лазерного облучения с длиной волны 1268 нм TEER, отражающий целостность белков TJ, снизился по сравнению с контрольной группой. На следующий день после облучения лазером с длиной волны 1268 нм TEER восстановился и был аналогичен контрольной группе.

Через час после облучения лазером с длиной волны 1268 нм TEER, отражающий целостность белков TJ, снизился по сравнению с контрольной группой.

На следующий день после лазерного облучения с длиной волны 1268 нм TEER восстановился и был аналогичен контрольной группе.

На втором этапе исследования мы изучили возможность доставки

липосом к опухоли при повышении проницаемости ГЭБ с помощью лазерного

Интенсивность флуоресцентного сигнала от липосом была в 5,4 раза выше у мышей, получавших лазер 1268 нм, чем у мышей без лазерного облучения 1268 нм.

Кроме того, лазер 1268 нм значительно увеличивал дренаж мозга, распределение FITCD в спинных и особенно в вентральных частях мозга было значительно выше после лазерного облучения 1268 нм, чем у интактных мышей (дорсальная часть мозга:  $24,9 \pm 2,3$  а.е. против  $12,7 \pm 3,5$  а.е.,  $p < 0,01$  и вентральная часть мозга:  $175,5 \pm 4,8$  а.е. против  $6,8 \pm 2,2$  а.е.,  $p < 0,001$ ,  $n = 7$  в каждой группе, тесты Уилкоксона, Манна-Уитни U).

Выводы:

1. Сравнивая эффекты лазерного воздействия 1268 нм и 1122 нм на проницаемость ГЭБ у мышей было обнаружено, что инфракрасный лазер (1268 нм) индуцирует ОГЭБ в локальной части коры головного мозга, что сопровождается активацией дренажной системы мозга;

2. Было обнаружено, что повышение ОГЭБ после ФДТ связано со снижением ТЭС в церебральных сосудах, активацией АТФ-транспортной системы через гликопротеин-Р (Pgp), а также с временным снижением экспрессии белков плотных контактов (ZO-1 и CLND- 5). Восстановление ГЭБ сопровождается активацией метаболической активности нейронов, ТЭС и стабилизацией проницаемости ГЭБ с повышением экспрессии JAM и CD31;

3. Анализ распространения липосом в головном мозге при ФДТ с длиной волны 1268 нм показал, что повышение ОГЭБ в локальной части коры сопровождается эффективным распределением липосом в тканях ГБМ.