doi: 10.17116/neiro201579315-26

# Проницаемость ГЭБ у здоровых крыс и при экспериментальной глиоме С6 после фракционной радиотерапии головного мозга

К.м.н. Г.М. ЮСУБАЛИЕВА*[1, 2], к.х.н. А.Б. ЛЕВИНСКИЙ[2], м.н.с. Я.А. ЗОРКИНА[1], д.м.н. В.П. БАКЛАУШЕВ[2], к.м.н. С.А. ГОРЯЙНОВ[3], д.м.н. Г.В. ПАВЛОВА[4], асп. П.А. МЕЛЬНИКОВ[2], к.ф.-м.н., ст.н.с. Г.Е. ГОРЛАЧЕВ, д.м.н., проф. А.В. ГОЛАНОВ, д.м.н., акад. А.А. ПОТАПОВ[3], акад. В.П. ЧЕХОНИН[1,2]

[1]Отдел фундаментальной и прикладной нейробиологии ФГБУ «Федеральный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии» Минздрава России, Москва; [2]кафедра медицинских нанобиотехнологий ГБОУ ВПО «Российский государственный медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России (ген. дир. — д.м.н., проф. З.И. Кекелидзе), Москва; ФГБНУ «НИИ нейрохирургии им. акад. Н.Н. Бурденко» (дир. — акад РАН А.А. Потапов), Москва; [4]ФГБУН «Институт биологии гена» РАН (дир. — д.б.н., проф. П.Г. Георгиев), Москва

Опухоли головного мозга сопровождаются нарушением функций гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), однако поступление лекарственных препаратов в клетки-мишени остается по-прежнему затрудненным. **Цель исследования** — оценка влияния фракционной радиотерапии на проницаемость гематоэнцефалического барьера на здоровых крысах и крысах с глиомой С6 *in vivo*. **Материал и методы.** Увеличение проницаемости ГЭБ при глиоме С6 оценивали методом мониторинга магнитно-резонансной томографии (обьем глиомы до и после радиотерапии в комбинации с иммунотерапией, *n*=30) и конфокальной микроскопии (флуоресцентная визуализация границ опухолевой инвазии в дозозависимом эксперименте по количеству вводимых антител). На здоровых крысах оценку проницаемости ГЭБ для высокомолекулярных соединений проводили методом иммуноферментного анализа ELIZA (*n*=23; 192 образца плазмы крови) и конфокальной микроскопии (*n*=7). **Результаты.** Было показано повышение проницаемости ГЭБ после фракционированной радиотерапии в направлениях «кровь—мозг» и «мозг—кровь» для высокомолекулярных биологических молекул. **Заключение.** Воздействие на ГЭБ облучением в терапевтических дозах может улучшить доставку лекарственных препаратов в головной мозг и тем самым минимизировать риск серьезных побочных явлений, связанных чаще всего с дозой лекарственного средства.

***Ключевые слова**: глиома, гематоэнцефалический барьер в норме и патологии, фракционированная радиотерапия.*

# Blood—brain barrier permeability in healthy rats and rats with experimental C6 glioma after fractionated radiotherapy of the brain

G.M. YUSUBALIEVA[1,2], A.B. LEVINSKIY[2], YA.A. ZORKINA[1], V.P. BAKLAUSHEV[2], S.A. GORYAYNOV[3], G.V. PAVLOVA[4], P.A. MEL'NIKOV[2], G.E. GORLACHEV, A.V. GOLANOV, A.A. POTAPOV[3], V.P. CHEKHONIN[1,2]

[1]V.P. Serbsky State Research Center for Social and Forensic Psychiatry, Department of Fundamental and Applied Neurobiology; [2]N.I. Pirogov Russian State Medical University, Department of Medical Nano-biotechnology; [3]Burdenko Neurosurgical Institute, Russian Academy of Medical Sciences; [4]Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences Brain tumors are accompanied by blood-brain barrier (BBB) dysfunction. However, targeted drug delivery still remains difficult to achieve.

**Objective.** To evaluate the effect of fractionated radiotherapy on permeability of the blood-brain barrier in healthy rats and rats with C6 glioma *in vivo*. **Material and methods.** An increase in BBB permeability in C6 glioma was assessed by dynamic MRI monitoring (glioma size before and after radiation therapy in combination with immunotherapy, *n*=30) and confocal microscopy (fluorescence imaging of tumor invasion boundaries in a dose-dependent experiment for the amount of injected antibodies). In healthy rats, BBB permeability to macromolecular substances (MMS) was assessed by ELISA (*n*=23, 192 plasma samples) and confocal microscopy (*n*=7). **Results.** It was shown that BBB permeability to biological macromolecules in blood-brain and brain-blood directions was increased after fractionated radiotherapy. **Conclusion.** Drug delivery to the brain can be improved using therapeutic doses of radiation treatment that affects the BBB and minimizes the risk of serious side effects that are often associated with the drug dose.

***Keywords:** glioma, blood-brain barrier in norm and pathology, fractionated radiotherapy.*

Стабильность внутренней среды головного мозга в норме обеспечивается целостностью гематоэнцефалического барьера (ГЭБ). Опухоли головного мозга сопровождаются нарушением функций ГЭБ, однако поступление лекарственных препаратов в клетки-мишени остается по-прежнему затрудненным. Соответственно, эффективность назначенной химио- или иммунотерапии при опухолях головного

© Коллектив авторов, 2015

*e-mail: gaukhar@gaukhar.org

мозга, в отличие от лечения опухолей внутренних органов, крайне низка. Чем обусловлена подобная избирательность?

В клинической практике в исключительных случаях временный прорыв ГЭБ проводят системным введением осмотических диуретиков (маннитол) или медиаторов воспаления (брадикинин) [1—3]. В последнее время появляются данные о положительном результате при предварительном облучении головного мозга с опухолями перед химиотерапией, однако диапазон применяемых доз фракционированной радиотерапии довольно широк [4—6]. К примеру, большинство исследователей [7—9] считают, что лучевая терапия в дозах от 20 до 30 Гр с размером фракции 2 Гр может применяться для прорыва ГЭБ без особых побочных эффектов.

За последнее десятилетие сведения о молекулярных изменениях церебрального эндотелия, реакции астроглии, длительности и сроках открытия гематоэнцефалического барьера при фракционированном облучении представляют собой разрозненную информацию [10—15]. По-прежнему спорным и открытым вопросом в современной нейроонкологии остается проблема состояния когнитивной сферы и качества жизни пациентов после цикла химио- или радиотерапии на фоне увеличения продолжительности жизни [16, 17]. Вследствие указанного исследование целесообразности превентивного применения радиотерапии перед началом химио- или иммунотерапии пациентам с опухолями головного мозга является актуальным.

В задачи исследования входила оценка временных параметров повышения проницаемости ГЭБ для специфических и неспецифических высокомолекулярных веществ, введенных в системный кровоток здоровых крыс и крыс с глиомой С6, подвергнутых различным дозам фракционированной радиотерапии.

## Материал и методы

*Экспериментальные животные и схема эксперимента.* Исследование проведено на 60 крысах линии Wistar. Возраст крыс на начало эксперимента — 2 мес, масса — 200±20 г. Животных содержали в условиях лабораторного вивария в клетках (по 8 особей в каждой) на стандартной диете (не менее 2 нед) до начала эксперимента при свободном доступе к воде и нормальном световом режиме. Условия содержания крыс и все экспериментальные процедуры соответствовали международным правилам обращения с животными (Директива Европейского сообщества 2010/63/EU от 24 сентября 2010 г., доступно по: http://ruslasa.ru/wp-content/uploads/Dir_2010_63_RusLASA2.pdf). Крысы были разделены случайным образом на 2 основные группы: 1-я группа — животные с моделированной глиомой С6 ($n$=30), 2-я — интактные ($n$=30). Каждая группа была разделена на три подгруппы, получавшие радиотерапию: 1А ($n$=10), 1В ($n$=10), 1С ($n$=5) и 2А ($n$=10), 2В ($n$=15), 2С ($n$=5). Дополнительно в каждой группе созданы две подгруппы без проведения радиотерапии: (1d и 2d).

*Протокол облучения головного мозга крыс.* Облучение головного мозга крыс выполнялось на линейном ускорителе PRIMUS («Siemens», США) на базе НИИ нейрохирургии им. Н.Н. Бурденко тормозным излучением 6 МВ с мощностью дозы 2 Гр/мин. Расстояние от источника излучения до плоскости расположения крыс составляло 100 см. Одновременно производилось облучение 4 крыс, которые располагались внутри формы из пенопласта носами к центру поля с таким расчетом, чтобы они упирались в стенку формы, и граница поля, определяемая по полувысоте дозового распределения, проходила позади головного мозга с запасом 5 мм, это гарантировало облучение всего головного мозга у всех крыс. Размер квадратного поля на уровне изоцентра составлял 140 мм. Для обеспечения электронного равновесия использовался слой твердой воды толщиной 20 мм. Полутень радиационного поля, определяемая по падению дозы с 80 до 20%, сокращалась до 4 мм посредством специально изготовленной рамки из сплава Вуда толщиной 60 мм. Облучение проводилось без общего наркоза, крыс обездвиживали с помощью рестейнеров (DecapiCones Braintree Scientific, Inc., США). Животные подвергались ежедневному облучению 5 раз в неделю до достижения суммарной дозы радиотерапии 36 Гр: 2 Гр×18 фракций (группы 1А и 2А), 4 Гр×9 фракций (группы 1b и 2b), 6 Гр×6 фракций (группы 1с и 2с), 0 Гр×0 фракций (группы 1d и 2d).

*Протокол эксперимента по оценке проницаемости ГЭБ у крыс, подвергнутых облучению (в норме и с глиомой).* В 1-й группе изменение проницаемости ГЭБ для ВМС при глиоме на фоне фракционной радиотерапии глиомы С6 оценивали методом мониторинга магнитно-резонансной томографии (МРТ) (морфометрия глиомы до и после радиотерапии в комбинации с иммунотерапией, $n$=30) и конфокальной микроскопии (флуоресцентная визуализация границ опухолевой инвазии в дозозависимом эксперименте по количеству вводимых антител). На крысах из 2-й группы оценку проницаемости ГЭБ для ВМС проводили методом ELIZA ($n$=23; 192 образца плазмы крови) и конфокальной микроскопии ($n$=7).

*Количественный анализ проницаемости ГЭБ по уровню концентрации глиофибриллярного кислого белка (GFAP) в сыворотке крови крыс, подвергнутых облучению методом иммуноферментного анализа* (ELIZA, вариант Sandwich). После завершения цикла радиотерапии из хвостовой вены крыс 1 раз в 7 дней в течение 3 мес отбирали по 2 мл цельной крови, осаждали центрифугированием форменные элементы, отбирали плазму и замораживали при –80 °С. Компоненты для проведения ELIZA (PabGFAP, recGFAP и MabGFAP) были получены в лаборатории иммунохимии ФГБУ «Федеральный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии» Минздрава России. Полистироловый планшет активировали MabGFAP (100 мкл с концентрацией 5 мкг/мл) в 0,1 М бикарбонатном буфере pH 9,6 в течение 8 ч при 4 °С. После 3-кратной отмывки от излишка MabGFAP в планшет вносились образцы плазмы крови, содержащей антиген (50 мкл) с последующей инкубацией при 20 °С в течение 1 ч. После вторичной 3-кратной отмывки вносили в плашку PabGFAP в разведении 1:5000, проявляли с помощью a-rabbit-HRP в разведении 1:200 (Goat antirabbit IgG-HRP, «Sigma», США). Для уменьшения неспецифической сорбции антивидовых антител их предварительно инку-

бировали в течение 1 ч с сывороткой мыши (1:200). Реакцию субстратной смеси с 3,3',5,5'-тетраметилбензидином (Ready-to-use, Invitrogen, США) останавливали добавлением 0,1 н HCl. По данным оптической плотности с помощью калибровочной кривой рассчитывали количественное значение концентрации GFAP.

*Качественный анализ проницаемости ГЭБ по накоплению меченных флуоресцентной меткой моноклональных антитител в головном мозге крыс, подвергнутых облучению (проницаемость ГЭБ для BMC).* Мечение специфических и неспецифических иммуноглобулинов (Ig) флуоресцентной меткой Alexa различной длины волны проводилось по протоколу фирмы-производителя (Invitrogen, США). Антитела к GFAP (PabGFAP, MabGFAP), VEGF (MabVEGF), AMVB1(Mab 2B6) и коннексину-43 (Cx43) — MabVEGF, были получены в лаборатории иммунохимии ФГБУ «ФМИЦПН» Минздрава России. Дополнительно приобретены коммерческие неспецифические Ig («Sigma», США) и антитела к фактору вон Виллебранда (vWF) («Abcam», США).

Крысам в бедренную вену под общим наркозом вводились Ig, меченные флуоресцентной меткой Alexa 660. Накопление в структурах головного мозга меченых антител *in vivo* оценивали с помощью лазерной конфокальной микроскопии. С этой целью через 24, 48 и 72 ч после введения меченых антител крысам под глубоким наркозом проводили трансаортальную перфузию 4% раствором параформальдегида, декапитировали, извлекали головной мозг и приготовляли срезы толщиной 150—200 мк. Для визуализации на срезах головного мозга крыс клеточных структур с позитивным сигналом от Alexa 660, срезы экспонировали в растворе с поликлональными anti-GFAP (астроциты), anti-vWF (эндотелиоциты) и иммунопроявляли антивидовыми антителами («Invitrogen», США).

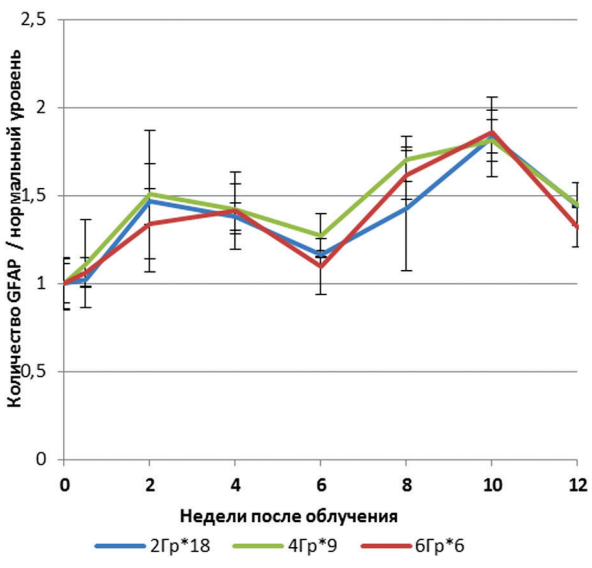
*Анализ деградации в крови IgG и MabGFAP, ковалентно связанных с Alexa Fluor 488.* Связывание IgG и MabGFAP с Alexa Fluor 488 проводили по протоколу фирмы-производителя («Invitrogen», США). Измеряли интенсивность флуоресценции при помощи флуориметра VICTOR X3 Multilabel Plate Reader в полученных образцах в различных разведениях. Меченые антитела разводились в плазме крови с учетом обнаружения 5% потери флуоресценции. Инкубация в плазме крови, забор на сроках 18, 24, 48 и 72 ч с последующим измерением интенсивности флуоресценции в образце. Центрифугирование через фильтр 30 кДа (Alexa Fluor 488 — 0,7 кДа) и измерение интенсивности флуоресценции в проскоке.

*Статистический анализ.* Сравнение с контрольным уровнем GFAP проводилось с помощью параметрического критерия Даннета. Данные представлены средним индексом накопления и его стандартным отклонением (*Mean±SD*).

## Результаты

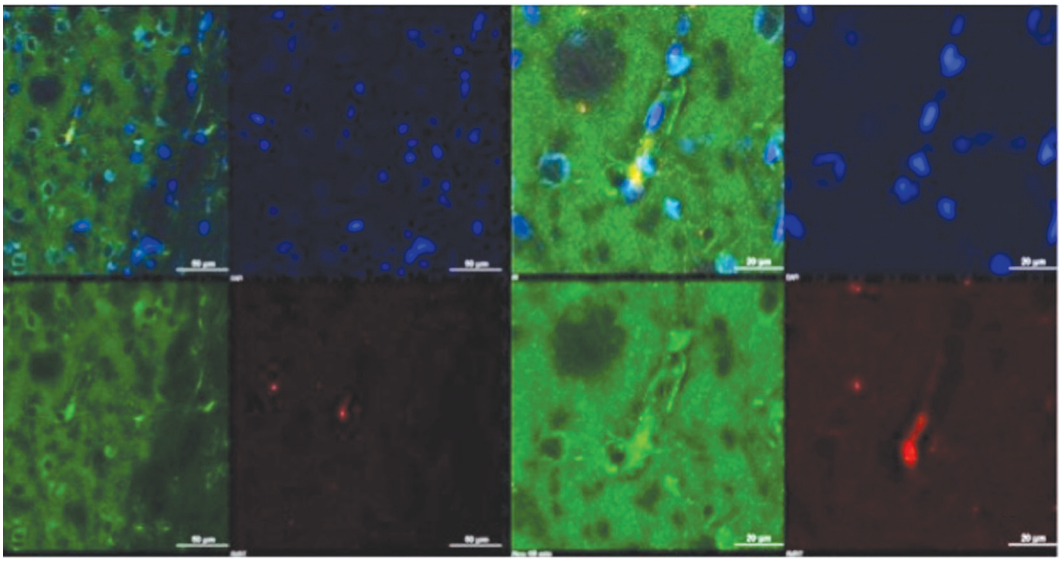
Количественный анализ GFAP в плазме крыс из 2-й группы, подвергнутых фракционированному облучению, проведен на 23 крысах. По результатам ELIZA, уровень GFAP в плазме крови возрастал в 1,5—2 раза по сравнению с нормой. Наибольшие значения белка в сыворотке крыс отмечены на 3—4-й и на 8—12-й неделях. На 6-й неделе после радиотерапии уровень GFAP возвращался к исходным значениям нормы. А на 10-й неделе в плазме крови наблюдалось максимальное увеличение GFAP. Достоверных различий в концентрации белка в плазме крови крыс из групп, варьированных по разовой дозе радиотерапии, не выявлено **(рис. 1)**.

Ориентируясь на количественные показатели GFAP методом иммуноферментного анализа, исследование проницаемости ГЭБ для высокомолекулярных биологических молекул в направлении




| | | |
|---|---|---|
| 2Гр*18 | 0,5 нед | 0,992 |
| | 2 нед | 0,019 |
| | 4 нед | 0,096 |
| | 6 нед | 0,791 |
| | 8 нед | 0,044 |
| | 10 нед | <0,01 |
| | 12 нед | 0,032 |
| 4Гр*9 | 0,5 нед | 0,849 |
| | 2 нед | <0,01 |
| | 4 нед | 0,003 |
| | 6 нед | 0,130 |
| | 8 нед | <0,01 |
| | 10 нед | <0,01 |
| | 12 нед | 0,009 |
| 6Гр*6 | 0,5 нед | 0,913 |
| | 2 нед | 0,100 |
| | 4 нед | 0,004 |
| | 6 нед | 0,890 |
| | 8 нед | <0,01 |
| | 10 нед | <0,01 |
| | 12 нед | 0,183 |

***Рис. 1.*** **Нормированное на базальный уровень количество GFAP в плазме крови крыс после фракционированного облучения, достоверности отличий от нормального уровня GFAP.**



а б

***Рис. 2.*** **Микроскопия накопления IgG, меченных на срезах головного мозга крыс, через 72 ч после внутривенного введения IgG Alexa 660 (красная флуоресценция), срезы дополнительно иммунопроявлены *ex vivo* с помощью MabVEGF+Anti-mouse Alexa 488 (сосуды — зеленая), ядра докрашивали DAPI (синяя).**

а — обзорная микроскопическая картина среза головного мозга крысы с глиомой (бар — 10 мкм), б — увеличение разрешения микроскопии до 20 мкм.

«кровь—мозг» проводили на сроке 2 и 10 нед после завершения цикла радиотерапии.

Учитывая, что повышение проницаемости ГЭБ при радиоактивном облучении для высокомолекулярных биологических веществ может не быть избирательным, было важно дифференцировать селективное от неселективного накопления антител. С этой целью в эксперименте применили специфические и неспецифические Ig, меченные флуоресцентной меткой Alexa (Dye Alexa 488 absorb 495 nm, emit 519 nm; dye Alexa 660 absorb 663, emit 690 nm; «Life Technologies Corporation», США).

На первом этапе мы оценили накопление неспецифических Ig в головном мозге крыс после облучения *in vivo* через 24, 48 и 72 ч после их введения в системный кровоток в каждой экспериментальной группе **(рис. 2, а, б)**. Выяснилось, что через 72 ч сигнала от флуоресценции неспецифических Ig в ткани головного мозга практически не остается, а местами сохранившаяся флуоресценция наблюдалась только в полости сосудов **(см. рис. 2, б)**.

Кроме того, эксперимент с введением неспецифических Ig с меткой показал, что ГЭБ способен пропускать вещества с весом более 150 кДа при всех применимых нами вариантах радиотерапии (2 Гр×18 фракций, 4 Гр×9 фракций, 6 Гр×6 фракций). Исходя из предыдущих опубликованных данных по исследованию когнитивных функций после радиотерапии и положительного эффекта последней в отношении глиомы, на втором этапе применяли для крыс разовую фракцию не более 4 Гр. Таким образом, флуоресцентный сигнал при введении специфических антител к VEGF, GFAP и Cx43 регистрировали только спустя 72 ч после введения.

При выборе антигенов-мишеней для флуоресцентной визуализации *in vivo* руководствовались количеством синтеза белка в нервной ткани, специфичностью и доступностью. Уровень экспрессии GFAP возрастает в астроцитах при реактивном глиозе, Cx43 является мембранным белком гомо- и гетерологичных щелевых контактов между астроцитами, эндотелиоцитами и опухолевыми клетками [18—21]. Синтез VEGF (vascular endothelial growth factor) увеличивается в ответ на гипоксию, воспалительные процессы, в том числе при радиоактивном облучении [22].

Согласно полученным данным микроскопии, проницаемость ГЭБ оказалась повышена для моноклональных антител в течение длительного времени. На сроке 2 нед после фракционной радиотерапии мы зарегистрировали пропускную способность ГЭБ для меченых Ig вне зависимости от величины разовой дозы фракции. Спустя 10 нед со дня завершения радиотерапии пропускная способность для моноклональных антител не изменилась.

При введении моноклональных анти-GFAP- и анти-VEGF-антител в системный кровоток крыс и циркуляции в крови 72 ч наблюдали интенсивный флуоресцентный сигнал на срезах переднего и среднего отделов головного мозга и мозжечка. При анализе накопления моноклональных анти-GFAP-антител, меченных Alexa 488, *in vivo,* срезы головного мозга крыс дополнительно экспонировали в растворе с поликлональными антителами к GFAP и

проявляли антивидовыми Anti-mouse Alexa 594. Согласно результатам конфокальной микроскопии по локализации моно- и поликлонов к GFAP, моноклональные анти-GFAP-антитела накапливались в реактивных астроцитах **(рис. 3)**.

Для определения видовой принадлежности структурных элементов, где регистрируется флуоресцентный сигнал от введенных в кровоток крысы анти-VEGF-антител, срезы головного мозга докрасили антителами к vWF и Mab2B6. Результаты иммуногистохимии свидетельствуют о селективном накоплении анти-VEGF-антител в церебральных эндотелиоцитах, положительных на vWF и AMVB1 **(рис. 4, 5)**.

Таким образом, мы продемонстрировали, что, подвергнув фракционированной радиотерапии головной мозг здоровых крыс, наблюдается длительное повышение проницаемости гематоэнцефалического барьера для BMC.

Дополнительно для достоверности полученных результатов по накоплению меченых антител в нервной ткани провели эксперимент по деградации метки Alexa 660, ковалентно связанных с антителами, в сыворотке крови крыс. При анализе интенсивности флуоресценции препаратов меченых антител в различных разведениях была получена линейная зависимость флуоресценции от разведения образца **(рис. 6)**. Фоновое значение, измеренное в нормальной плазме крови крысы, составило 724,8±223,2.

Минимально детектируемое значение рассчитывали как пятифоновое значение и оно равнялось 4740. Для обнаружения 5% потери флуоресценции от меченых антител в ходе инкубации в плазме крови данное значение было принято за 5%. Следовательно, интенсивность флуоресценции в конечном образце должна быть как минимум 94 802. После разведения в плазме крови интенсивность флуоресценции равнялась для меченных Alexa 488 IgG и MabGFAP соответственно 126473,6±1385 и 131541,6±1694. Интенсивность флуоресценции в пробах плазмы, отобранных на сроках 18, 24, 48 и 72 ч, падала с течением времени.

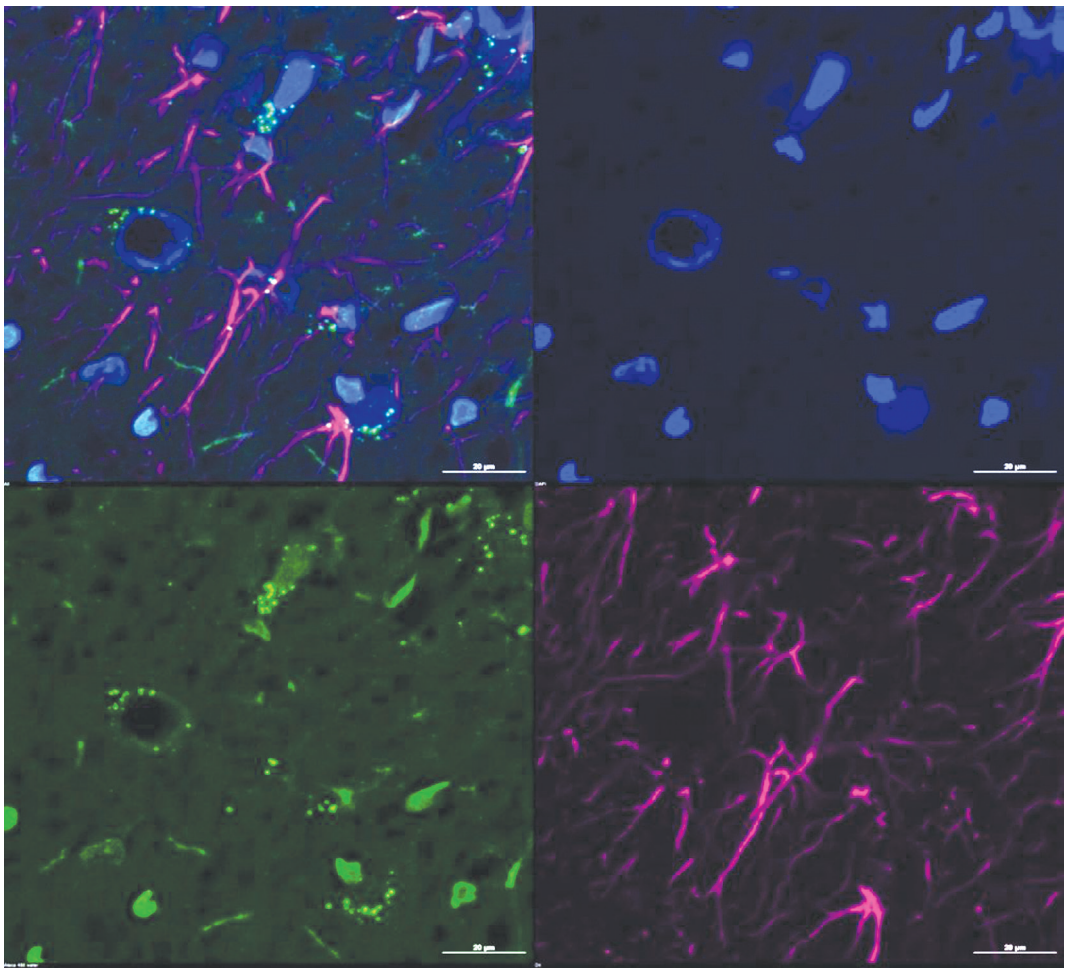


***Рис. 3.*** **Микроскопия накопления MabGFAP, меченных Alexa 488, на срезах головного мозга крыс через 72 ч после внутривенного введения (corpus callosum): MabGFAP Alexa 488 (зеленая флуоресценция), срезы доиммунопроявлены с помощью PabGFAP+ Anti-mouse Alexa 594 (фиолетовая), ядра докрашены DAPI (синяя).**

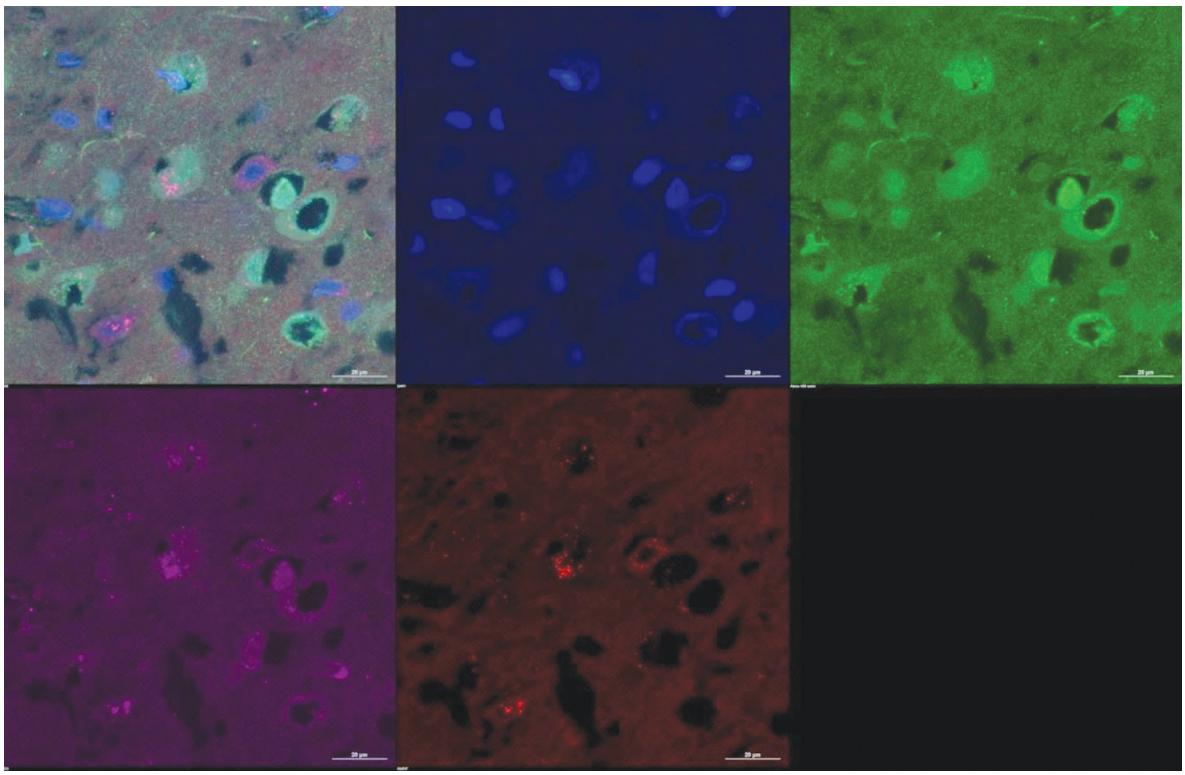


***Рис. 4.*** **Анализ накопления MabVEGF, меченных Alexa 660, в стриатуме головного мозга крыс через 72 ч после внутривенного введения MabGFAP+Anti-mouse Alexa 488 (зеленая флуоресценция), MabVEGF +Alexa 660 (красная), срезы доиммунопроявлены с помощью PabvWF + Anti-rabbit Alexa 594 (фиолетовая), ядра докрашены DAPI (синяя).**

**Достоверности отличий от фонового значения интенсивности флуоресценции в проскоках после центрифугирования через 30 кДа**

| Время инкубации меченых Ig в сыворотке крови, ч | Препараты меченных флуоресцентной меткой специфических и неспецифических Ig | Значения интенсивности флуоресцентного сигнала, условные единицы |
|---|---|---|
| 18 | IgG | 0,001 |
| | MabGFAP | <0,001 |
| 24 | IgG | 1,000 |
| | MabGFAP | 0,301 |
| 48 | IgG | 0,515 |
| | MabGFAP | <0,001 |
| 72 | IgG | 0,137 |
| | MabGFAP | 0,646 |

Таким образом, на сроке 72 ч интенсивность флуоресценции равнялась для меченных Alexa 488 IgG и MabGFAP соответственно 111 814±9245 и 112 340±9552. При этом степень падения флуоресценции от изначального значения составила 11,6 и 14,6% для меченных Alexa 488 IgG, и MabGFAP соответственно **(см. рис. 6, таблицу)**. После фильтрации препаратов меченых антител через фильтры с размером пор 30 кДа значения флуоресценции в полученных проскоках значительно снизились (размер антител с меткой — больше 150 кДа). Интенсивность флуоресценции отличалась от фонового значения на сроках 24, 48 и 72 ч **(см. таблицу)**.

Таким образом, в образцах проскоков, отобранных на различных сроках после начала инкубации, интенсивность флуоресценции не превышает фоновых значений. Это свидетельствует об отсутствии флуоресценции низкомолекулярных компонентов до 30 кДа, что говорит об отщеплении не более 5% метки от комплекса антитело—Alexa 488.

В оценке улучшения проходимости ГЭБ при экспериментальной глиоме для диагностических и

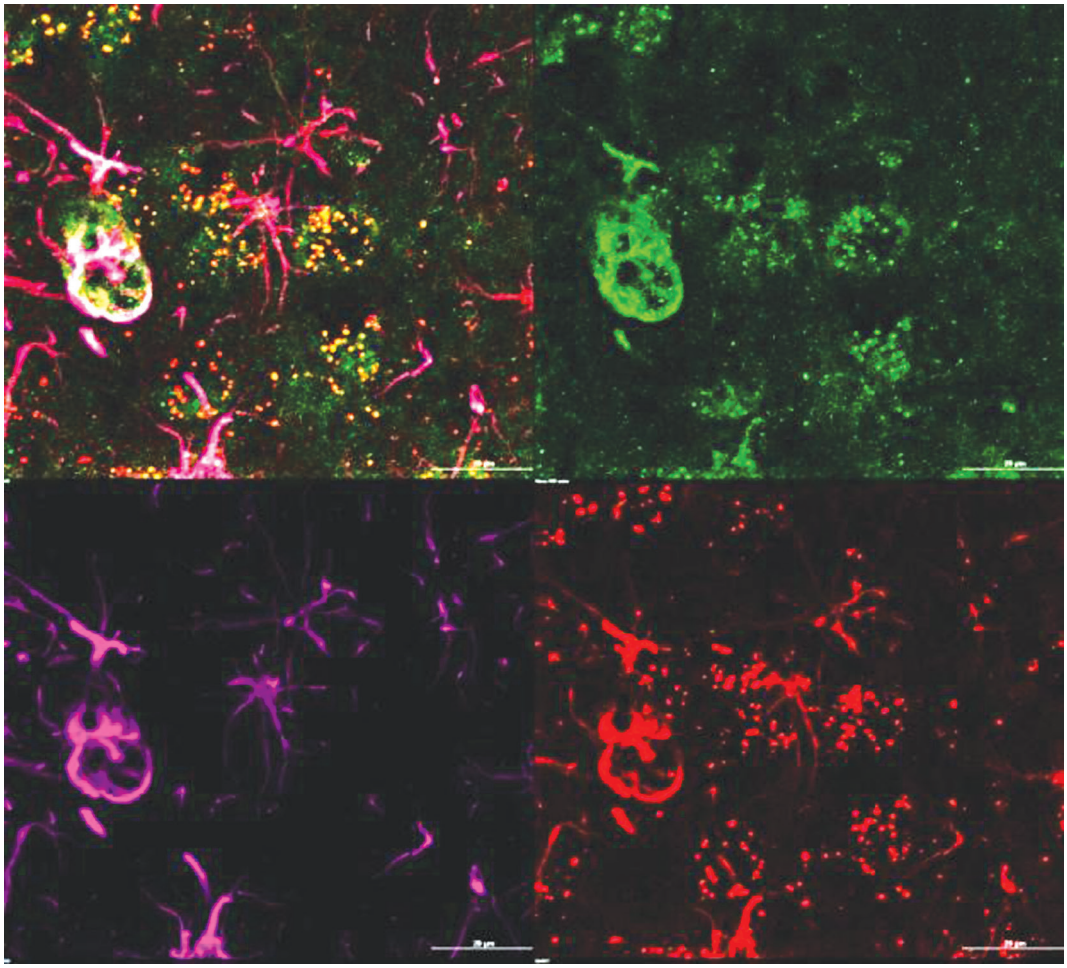


***Рис. 5.*** **Микроскопия накопления MabVEGF, меченных Alexa 660, на срезах головного мозга крыс через 72 ч после внутривенного введения (corpus callosum) Mab2B6 + Anti-mouse Alexa 488 (зеленая флуоресценция), PabGFAP + Anti-rabbit Alexa 594 (фиолетовая), MabVEGF + Alexa 660 (красная).**

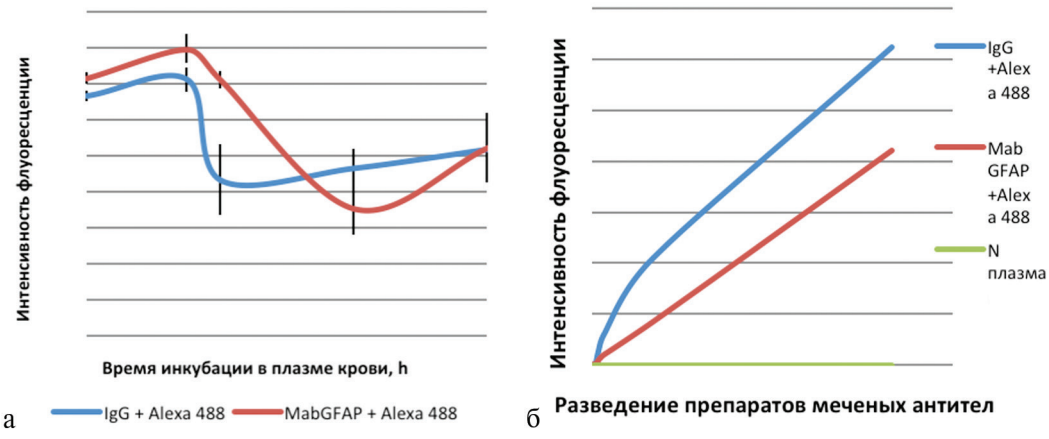



***Рис. 6.*** **Динамика изменения интенсивности флуоресценции препаратов меченых антител.**

а — в ходе инкубации меченых антител в плазме крови; б — в различных разведениях в плазме крови.

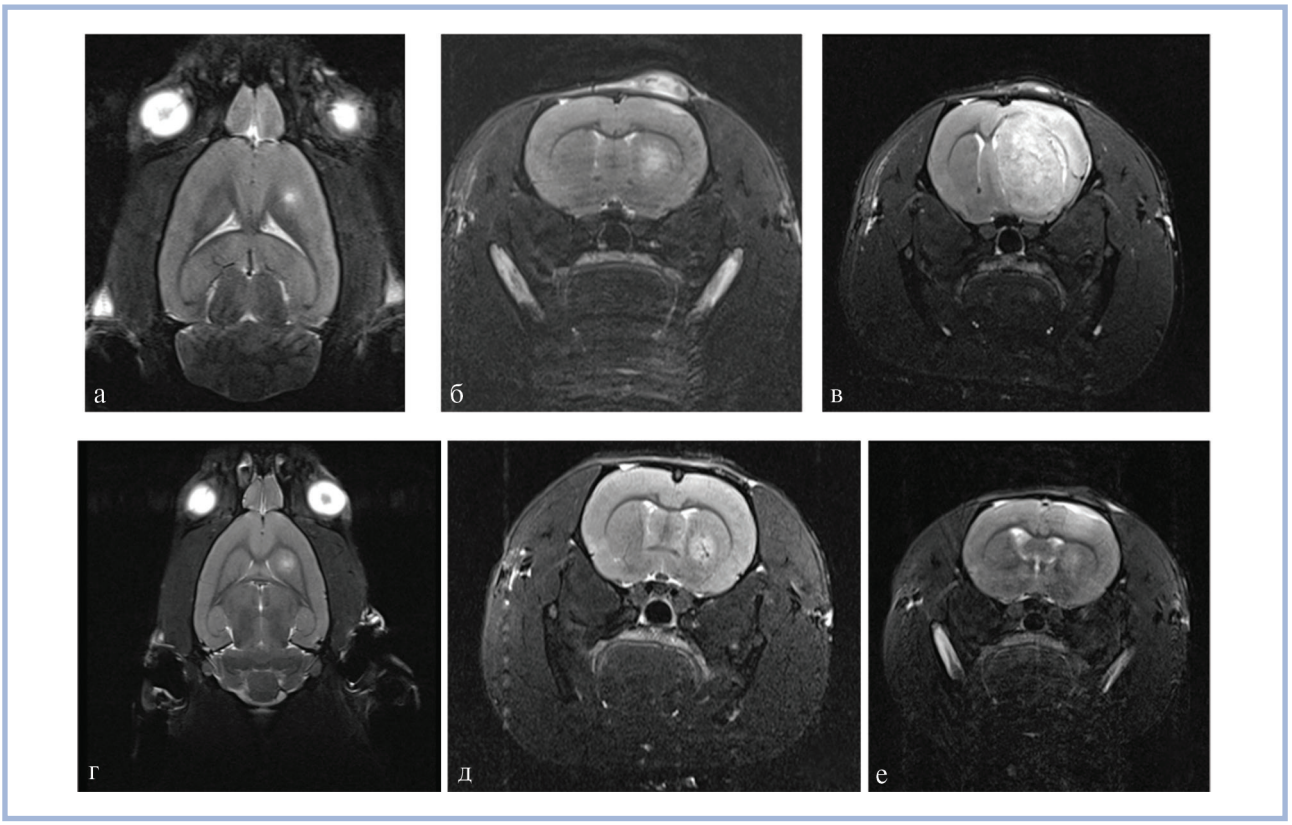



***Рис. 7.*** **МРТ-картина головного мозга крысы с глиомой С6 после радиотерапии по схеме 4 Гр×9 дней.**

а, б, в — 1-й, 7-й и 14-й дни после радиотерапии и после радиотерапии по схеме 4 Гр×9 дней с последующим введением MabCx43; г, д, е — 1-й, 7-й и 14-й дни после радиотерапии.

лекарственных средств на фоне радиотерапии мы опирались на полученные результаты радиотерапии в дозозависимом эксперименте: чем выше доза разовой фракции, тем очевиден противоопухолевый эффект [27]. При 6-дневном облучении разовой дозой в 6 Гр объем глиомы не увеличивался с начала радиотерапии, но по завершению эксперимента крысы в течение 2—3 дней погибали от побочных эффектов. Выживаемость в группе крыс с радиотерапией по схеме 4 Гр×9 фракций по ее завершению составляла 100%, и эффективность в отношении роста опухоли была очевидна. Однако через неделю рост опухоли возобновлялся, при этом интенсивность инвазии в окружающие ткани была такова, что спустя еще 1 нед крыса погибала от внутричерепной дислокации **(рис. 7, а—в)**.

Если в течение 1 нед с момента завершения облучения подключить иммунотерапию, в частности MabCx43, с продемонстрированной ранее противоопухолевой эффективностью в монотерапии, то мы наблюдали дальнейшее торможение роста опухоли **(см. рис. 7)** [27]. При этом однократное введение антител в дозе 1 мг увеличивало продолжительность жизни животных до 56 дней. При монотерапии в той же дозировке подобный эффект наблюдался при его еженедельном введении.

Дополнительно представлены результаты микроскопии среза головного мозга с глиомой, выполненные методом конфокальной микроскопии. Ранее для визуализации перитуморальной зоны с помощью MabCx43 с ковалентно пришитой флуоресцентной меткой Alexa необходимо было ввести крысе *in vivo* в системный кровоток не менее 500 мкг. После радиотерапии ( 4 Гр×9 фракций и 2 Гр ×18 фракций) введение меченых антител в дозе 40 мкг позволило зарегистрировать сигнал флуоресценции в зоне реактивного астроглиоза (вокруг глиомы) **(рис. 8)**.

Резюмируя полученные результаты, можно говорить о повышении пропускной способности ГЭБ для диагностических и терапевтических агентов после проведенной фракционированной радиотерапии.

## Обсуждение

Проблема проницаемости гематоэнцефалического барьера для терапевтических и диагностических агентов актуальна по настоящее время и активно решается исследователями и клиницистами всего мира. Ранее для оценки повышения проницаемости ГЭБ при радиотерапии головного мозга тера-

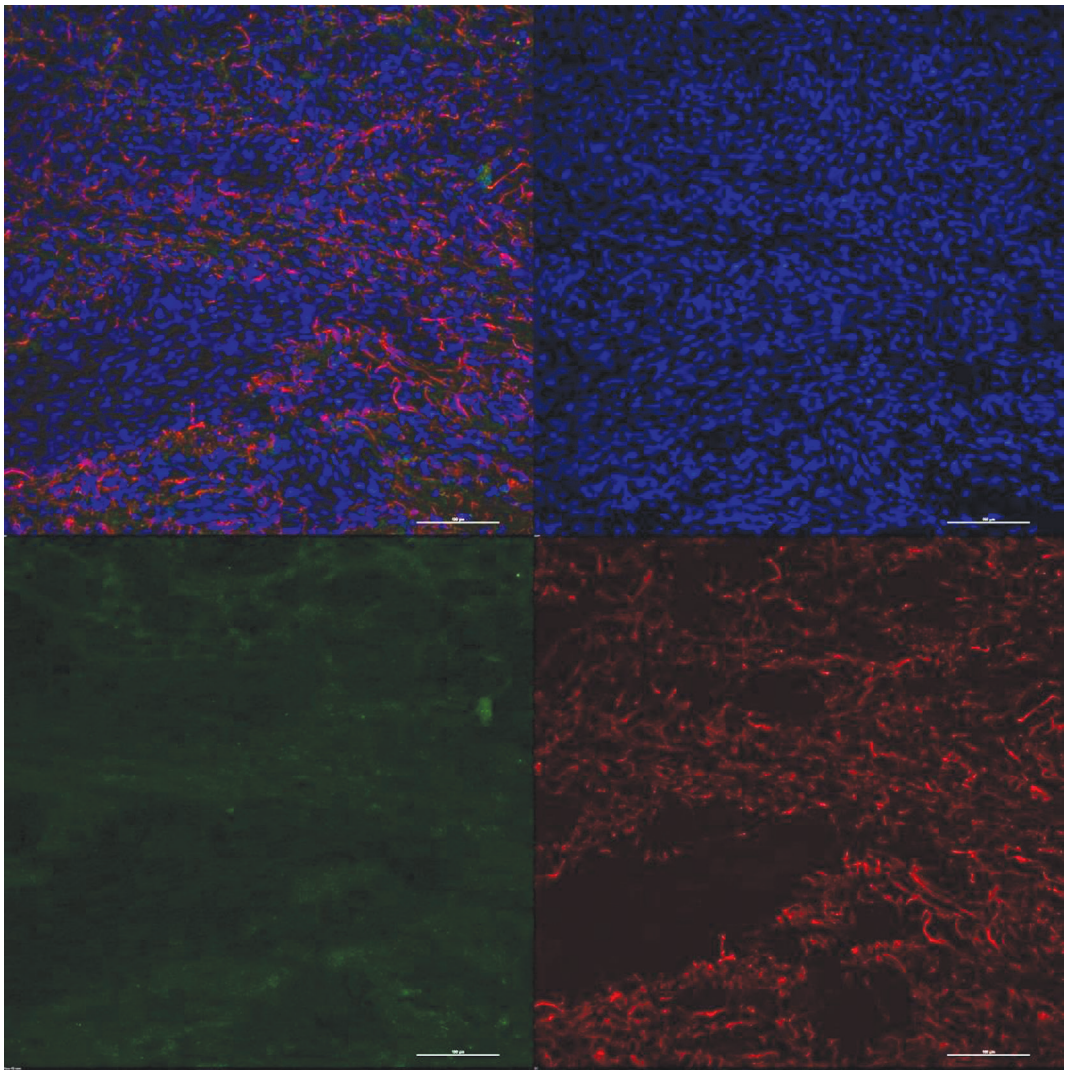


***Рис. 8.*** **Микроскопия периглиомной зоны с помощью меченых MabCx43 в дозе 40 мкг, введенных в системный кровоток крысе после завершения фракционной радиотерапии с разовой дозой 4 и 2 Гр.**

певтическими дозами в эксперименте исследователи уже применяли, в частности, радиоактивные маркеры [23], МРТ-мониторирование [24], методы иммуногистохимии [25], позитронно-эмиссионную томографию, количественный анализ альбумина [26] и др. Аналогичные исследования в единичных случаях уже проводятся на пациентах. Было показано увеличение проницаемости при ежедневном фракционировании в 3 Гр и по достижению суммарной дозы в 30 Гр, в области головного мозга, пограничных с полем облучения, причем степень увеличения была прямо пропорциональна дозе ионизирующего излучения [10]. Для уменьшения долгосрочной токсичности предпочтительнее фракционирование с разовой ежедневной дозой 2 Гр [27]. В другом исследовании [12] показано, что фракционная доза 2 Гр для изменения проницаемости ГЭБ может оптимизировать эффект химиотерапии. D. Qin и соавт. заметили, что проницаемость ГЭБ внутри и вокруг опухоли только на 20% больше, чем в нормальной ткани мозга [12]. Однако, несмотря на исследования в этой области, радиотерапия в целях увеличения проницаемости ГЭБ и эффективности химиотерапии до сих пор применяется ограниченно [7, 28].

Использование ионизирующих излучений в клинике основано на различиях в радиочувствительности опухоли и нормальных тканей [7, 28]. При воздействии ионизирующих излучений возникают альтернативные процессы повреждения и восстановления. Нормальные ткани за счет стойких нейрогуморальных связей с организмом-носителем восстанавливают лучевые повреждения быстрее и полнее, чем опухоль. Используя эти различия и

управляя ими, можно добиться тотального разрушения опухоли, сохранив нормальные ткани, а при адекватно подобранном варианте дробления дозы — существенного повышения повреждения опухоли.

В России в случаях радикального лечения традиционным считается фракционирование 5 раз в неделю по 1,8—2 Гр 1 раз в день до суммарных доз, которые определяются морфологической структурой опухоли и толерантностью нормальных тканей в зоне облучения (обычно в пределах 60—70 Гр). Стандартным режимом дистанционной фракционированной лучевой терапии является облучение ложа удаленной опухоли (или опухоли) плюс 2 см вокруг с суммарной очаговой дозой 55—60 Гр за 25—30 фракций (по 1,8—2,0 Гр на фракцию), подведенных за 5—6 нед. Зона патологического сигнала определяется по МРТ в Т2-режиме (или в режиме FLAIR для доброкачественных глиом) [7]. Кроме классической (конвенциональной) схемы радиотерапии у пациентов с опухолями головного мозга могут применяться другие режимы фракционирования доз облучения [7]. Медиана выживаемости при одновременной химиолучевой терапии составила 14,6 мес по сравнению с 12,1 мес в группе лучевого лечения [7]. При тяжелом соматическом статусе пациента в ряде случаев химиотерапия не проводится (радиотерапия не показана пациентам с внутричерепной гипертензией до ее разрешения).

Изучение различных режимов сочетания химио- и лучевой терапии у пациентов со злокачественными глиомами является важной клинической задачей. В нашем экспериментальном исследовании показано, что после проведения радиотерапии у крыс с глиомой С6 отмечается повышение проницаемости ГЭБ. В клинических условиях это может способствовать проникновению химиопрепаратов в опухоль в больших концентрациях. Ранее было показано, что в клинической практике возможен прорыв ГЭБ у пациентов с лимфомами головного мозга с помощью болюсного интраартериального введения маннитола [1].

Исследование проницаемости ГЭБ в клинике возможно благодаря мониторированию в сыворотке крови различных нейроспецифических белков, находящихся в плазме в низких количествах в норме и значительно увеличивающихся при патологии ЦНС вследствие увеличения проницаемости ГЭБ. В роли такого маркера может выступать GFAP. Повышенное содержание GFAP наблюдается в экспериментальных моделях астроглиоза в результате криогенных поражений головного мозга, колотых ран, экспериментального аллергического энцефалита, гипертермии, поражений электрическим током и токсических поражений, а также при воздействии ионизирующего излучения. Изменения в экспрессии GFAP используются для качественной или количественной оценки тяжести травмы головного мозга, а также при злокачественных опухолях [22, 24, 25].

Повышение GFAP в различных структурах мозга и крови после однократного γ-облучения уже исследовалось В.П. Чехониным и соавт. [29]. В плазме крови было выявлено увеличение концентрации GFAP, свидетельствующее о повышении проницаемости ГЭБ для нейроспецифических белков в направлении «мозг—кровь». Повторив данный эксперимент, подвергнув крыс тотальному облучению всей поверхности тела однократно в дозе около 30 Гр, нам не удалось зарегистрировать повышение проницаемости ГЭБ для меченных радиоактивной меткой антител в направлении «кровь—мозг». В отличие от однократного тотального облучения головного мозга большой дозой фракционная радиотерапия небольшими дозами обеспечила длительное повышение проницаемости ГЭБ с пропускной способностью для биологических молекул с молекулярным весом более 150 кДа.

В то же время мы показали, что эффективность фракционной радиотерапии глиомы С6 коррелирует с величиной разовой дозы [22]. Чем выше ее величина, тем быстрее тормозится опухолевый рост, но возрастает число побочных эффектов и риск быстрой смерти животного. При величине фракции в 4 Гр глиома практически не увеличивалась в объеме, однако по завершению облучения опухолевый рост возобновлялся с удвоенной скоростью [27, 31].

Проведение нейрофизиологических тестов на крысах контрольной группы (без глиомы) выявило наличие когнитивного дефицита при всех применимых нами вариантах радиотерапии (2 Гр×18 фракций, 4 Гр×9 фракций, 6 Гр×6 фракций). С увеличением разовой дозы одной фракции возрастает степень выраженности когнитивных расстройств [22, 29, 30], поэтому в исследованиях по проницаемости ГЭБ у предварительно здоровых крыс (без глиомы) были выбраны режимы фракционирования, показавшие свою эффективность в быстрой стабилизации объема глиомы С6, но без остро выраженных побочных эффектов, а именно: 4 Гр×6 фракций и длительное облучение небольшими дозами 2 Гр×9 фракций [31].

Показано, что длительное фракционированное облучение головного мозга небольшими дозами приводит к открытию ГЭБ в направлениях «кровь—мозг» и «мозг—кровь» у здоровых крыс и улучшению проницаемости при экспериментальной глиоме. При тотальном облучении головного мозга крыс увеличение проницаемости ГЭБ для высокомолекулярных веществ наблюдалось во всех отделах мозга, но в случае применения таргетных систем — в зоне презентации необходимого антигена (т.е. работает селективность накопления). В частности, мы показали возникшее в ответ на радиоактивное облучение накопление в зоне астроглиоза меченых анти-

GFAP- и анти-Cx43-антител, а также смогли визуализировать сосуды коры, гиппокампа и мозжечка при введении меченых анти-VEGF-антител.

## Заключение

Результаты конфокальной микроскопии глиомы показали возможность визуализации глиомы после радиотерапии с помощью меченых антител в десятикратно меньшей дозе, чем до облучения. Снижается и количество диагностической метки. Согласно результатам количественного анализа GFAP в плазме крови крыс, накопления в мозге крыс меченных флуоресцентной меткой антител при внутривенном введении и нейрофизиологических тестов, пропускная способность ГЭБ зависят в большей степени от продолжительности фракционированного облучения, чем от величины разовой дозы. При комбинированной терапии глиомы С6 предварительная радиотерапия позволила уменьшить дозу терапевтических антител в 2 раза. Таким образом, предварительное воздействие на ГЭБ облучения в терапевтических дозах может улучшить доставку лекарственных и диагностических препаратов в головной мозг и тем самым минимизировать риск серьезных побочных явлений, связанных чаще всего с дозой лекарственного средства.

*Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научного проекта № 13-00-12000 КОМФИ.*

## ЛИТЕРАТУРА


1. Аронов М.С. *Методика интраартериальной химиотерапии в условиях временного гиперосмолярного открытия гематоэнцефалического барьера при лимфомах головного мозга*: Дис. ... канд. мед. наук. М. 2009. Доступно по: http://www.dissercat.com. Ссылка активна на 2.04.2015.
2. Rapoport SI. Advances in osmotic opening of the blood-brain barrier to enhance CNS chemotherapy. *Expert Opin Invest Drugs.* 2001;10:1809-1818.
3. Farkas A, Szatmári E, Orbók A, Wilhelm I, Wejksza K, Nagyoszi P, Hutamekalin P, Bauer H, Bauer HC, Traweger A, Krizbai IA. Hyperosmotic mannitol induces Src kinase-dependent phosphorylation of β-catenin in cerebral endothelial cells. *J Neurosci Res.* 2005;80:855-861.
4. Yang W, Barth RF, Huo T, Nakkula RJ, Weldon M, Gupta N, Agius L, Grecula JC. Radiation therapy combined with intracerebral administration of carboplatin for the treatment of brain tumors. *Radiation Oncology.* 2014;9:25.
5. Qin D, Ou G, Mo H, Song Y, Kang G, Hu Y, Gu X. Improved efficacy of chemotherapy for glioblastoma by radiation-induced opening of blood-brain barrier: clinical results. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2001;5:959-962.
6. Hingorani M, Colley WP, Dixit S, Beavis WD. Hypofractionated radiotherapy for glioblastoma: strategy forpoor-risk patients or hope for the future? *Br J Radiol.* 2012 Sep; 85(1017): e770–e781. Доступно по: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3487099. Ссылка активна на 02.04.2015.
7. Абсалямова О.В., Аникеева О.Ю., Голанов А.В., Кобяков Г.Л., Коновалов А.Н., Корниенко В.Н., Кривошапкин А.Л., Лошаков В.А., Олюшин В.Е., Потапов А.А., Рыжова М.В., Таняшин С.В., Трунин Ю.Ю., Улитин А.Ю., Шишкина Л.В. *Стандарты, опции и рекомендации в лечении первичных опухолей ЦНС.* Ассоциация нейрохирургов России, Москва-2012. Доступно по: http://nsicu.ru/uploads/attachment/file/97/Recommendations-Brain-Tumors.pdf. Ссылка активна на 02.04.2015.
8. Prados MD, Larson DA, Lamborn K, McDermott MW, Sneed PK, Wara WM, Chang SM, Mack EE, Krouwer HG, Chandler KL, Warnick RE, Davis RL, Rabbitt JE, Malec M, Levin VA, Gutin PH, Phillips TL, Wilson CB. Radiation therapy and hydroxyurea followed by the combination of 6thioguanine and BCNU for the treatment of primary malignant brain tumors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1998;40(1):57-63.
9. vanVulpen M, Kal HB, Taphoorn MJ, El-Sharouni SY. Changes in blood-brain barrier permeability induced by radiotherapy: implications for timing of chemotherapy? *Oncol Rep.* 2002;9:683-688.
10. Diserbo M, Agin A, Lamproglou L, Mauris J, Staali F, Multon E, Amourette C. Blood-brain barrier permeability after gamma whole-body irradiation: an in vivo microdialysis study. *Can J Physiol Pharmacol.* 2002;80:670-678.
11. Yuan H, Gaber MW, McColgan T, Naimark MD, Kiani MF, Merchant TE. Radiation-induced permeability and leukocyte adhesion in the rat blood-brain barrier: modulation with anti-ICAM-1 antibodies. *Brain Res.* 2003;969:59-69.
12. Qin DX, Zheng R, Tang J, Li JX, Hu Y. Influence of radiation on the blood-brain barrier and optimum time of chemotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1990;19:1507-1510.
13. Krueck WG, Schmiedl UP, Maravilla KR, Spence AM, Starr FL, Kenney J. MR assessment of radiation-induced blood-brain barrier permeability changes in rat glioma model. *AJNR Am J Neuroradiol.* 1994;15(4):625-632.
14. Stephani U, Rating D, Korinthenberg R, Siemes H, Riehm H, Hanefeld F. Radiation related disturbance of blood/brain barrier during therapy of acute lymphoblastic leucaemia. *Lancet.* 1983;2:1036-1037.
15. Livrea P, Trojano M, Simone IL, Zimatore GB, Logroscino GC, Pisicchio L, Lojacono G, Colella R, Ceci A. Acute changes in blood-CSF barrier permselectivity to serum proteins after intrathecal methotrexate and CNS irradiation. *J Neurol.* 1985;231:336-339.
16. Hilverda K, Bosma I, Heimans JJ, Postma TJ, Peter Vandertop W, Slotman BJ, Buter J, Reijneveld JC, Klein M. Cognitive functioning in glioblastoma patients during radiotherapy and temozolomide treatment: initial findings. *J Neurooncol.* 2010 Mar;97(1):89-94.
17. DeAngelis LM, Delattre JY, Posner JB. Radiation-induced dementia in patients cured of brain metastases. *Neurol.* 1989;39:789-796.
18. Ahn M, Kim H, Kim JT, Lee J, Hyun JW, Park JW, Shin T. Gamma-ray irradiation stimulates the expression of caveolin-1 and GFAP in rat spinal cord: a study of immunoblot and immunohistochemistry. *J Vet Sci.* 2006;7(4):309-314.
19. Yang T, Wu SL, Liang JC, Rao ZR, Ju G. Time-dependent astroglial changes after gamma knife radiosurgery in the rat forebrain. *Neurosurgery.* 2000;47(2):401-407.
20. Ma ZM, Jiang B, Ma JR. Alterations of glial fibrillary acidic protein in rat brain after gamma knife irradiation. *Bulletin of Hunan Medical University.* 2001;28:26(4):309-312.
21. Yuan H, Gaber MW, Boyd K, Wilson CM, Kiani MF, Merchant TE. Effects of fractionated radiation on the brain vasculature in a murine model: blood-brain barrier permeability, astrocyte proliferation, and ultrastructural changes. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2006 Nov 1;66(3):860-866.
22. Zorkina YaA., Yusubalieva GM., Koshkin FA., Chamorsov AYu., Kistenev AV., Gorlachev GE, Golanov AV, Potapov AA, Chekhonin VP. Expression of VEGF, GFAP, and BDNF genes in the brain of rats after fractionated γ-irradiation according to different protocols. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine.*2014 August;157:4.
23. Jung CS, Foerch C, Schanzer A, Heck A, Plate KH, Seifert V, Steinmetz H, Raabe A, Sitzer M. Serum GFAP is a diagnostic marker for glioblastoma multiforme. *Brain.* 2007;130: 3336-3341.
24. Wang S, Qiu D, So KF, Wu EX, Leung LH, Gu J, Khong PL. Radiation induced brain injury: assessment of white matter tracts in a pre-clinical animal model using diffusion tensor MR imaging. *J Neurooncol.* 2013 Mar;112(1):9-15.
25. Yusubalieva GM, Baklaushev VP, Gurina OI, Tcitrin EB, Chekhonin VP. Immunochemical analysis of glial fibrillary acidic protein as a tool to assess astroglial reaction in experimental C6 glioma. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine.* 2010 July;149(1):125-130.
26. Nakata H, Yoshimine T, Murasawa A, Kumura E, Harada K, Ushio Y, Hayakawa T. Early blood-brain barrier disruption after high-dose single-fraction irradiation in rats. *Acta Neurochir. (*Wien) 1995;136:82-86.

27. Kraemer DF, Fortin D, Neuwelt EA. Chemotherapeutic dose intensification for treatment of malignant brain tumors: recent developments and future directions. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2002 May;2(3):216-224.

28. Виноградов В.М., Карташов А.В. Химиолучевая терапия опухолей головного мозга. *Практическая онкология*. 2008;9(1):47-56.

29. Chekhonin V.P., Morozov GV, Riabukhin IA. Immunoenzyme detection of specific brain antigens as a criterion of the permeability of the hemato-encephalic barrier in rats following acute gamma irradiation. *Biull Eksp Biol Med.* 1989;107(4):464-466.

30. Leshchinskaya IA, Douka TI, Chernaya VI. Neurophysiology behavioral reactions of rats and the contents of neurospecific proteins in their brain after single x-ray irradiation. *J Neurosurgery.* 2000;32.

31. Yusubalieva GM, Baklaushev VP, Gurina OI, Zorkina YaA, Gubskii IL, Kobyakov GL, Golanov AV, Goryainov SA, Gorlachev GE, Konovalov AN, Potapov AA. Treatment of poorly differentiated glioma using a combination of monoclonal antibodies to extracellular connexin-43 fragment, temozolomide, and radiotherapy. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine.* 2014;157(4):510-515.

## Комментарий

Стабильность внутренней среды головного мозга в норме обеспечивается целостностью ГЭБ. Опухоли головного мозга сопровождаются нарушением функций ГЭБ, однако поступление лекарственных препаратов в клетки-мишени остается по-прежнему затрудненным.

В задачи исследования входило оценить временные параметры повышения проницаемости ГЭБ для высокомолекулярных веществ *in vivo* после фракционированной радиотерапии. Облучение головного мозга крыс выполнялось на линейном ускорителе PRIMUS («Siemiens», США) на базе НИИ нейрохирургии им. Н.Н. Бурденко. Увеличение проницаемости ГЭБ при глиоме С6 оценивали методом динамического МРТ-мониторирования (объем глиомы до и после радиотерапии в комбинации с иммунотерапией; $n$=30) и конфокальной микроскопии (флуоресцентная визуализация границ опухолевой инвазии в дозозависимом эксперименте по количеству вводимых антител). На здоровых крысах оценку проницаемости ГЭБ для высокомолекулярных веществ проводили методом ELIZA ($n$=23; 192 образца плазмы крови) и конфокальной микроскопии ($n$=7). Было показано повышение проницаемости ГЭБ после фракционированной радиотерапии в направлениях «кровь—мозг» и «мозг—кровь» для высокомолекулярных биологических молекул. Дополнительно проведена оценка стабильности конъюгата при длительной инкубации в сыворотке крови: анализ деградации антител, ковалентно связанных с Alexa Fluor 488.

Проблема проницаемости ГЭБ для терапевтических и диагностических агентов актуальна по настоящее время. Аналогичные исследования проводятся в мировых лабораториях, в единичных случаях на пациентах [5, 6, 14, 19, 20]. Было показано увеличение проницаемости при ежедневном фракционировании в 3 Гр в области головного мозга, пограничной с полем облучения [14]. Исследователи показали возникшее в ответ на радиоактивное облучение накопление в зоне астроглиоза меченых анти-GFAP- и анти-Cx43-антител, а также смогли визуализировать сосуды коры, гиппокампа и мозжечка при введении меченых анти-VEGF-антител. При комбинированном лечении экспериментальной глиомы предварительная радиотерапия позволила уменьшить дозу терапевтических антител в 2 раза.

Таким образом, в случае необходимости проведения комбинированной терапии глиобластом воздействие на ГЭБ облучением в терапевтических дозах может улучшить доставку лекарственных препаратов в головной мозг и тем самым минимизировать риск развития серьезных побочных явлений, связанных чаще всего с дозой лекарственного средства.

Резюмируя сказанное, можно утверждать, что проблема преодоления и патологического барьера является актуальной и решение данной проблемы имеет очевидные перспективы практического внедрения.

*А.В. Ревищин* (Москва)