

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии
им. В.П. Сербского»

Министерства здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи

Зоркина Яна Александровна

**Проницаемость гематоэнцефалического барьера млекопитающих после
воздействия редко ионизирующего фотонного излучения**

03.01.04 – Биохимия

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
Член-корр. РАН, проф., д.м.н. О.И. Гурина

Москва, 2017

Оглавление

Список сокращений	4
Введение	6
Глава 1. Обзор литературы	12
1.1. Гематоэнцефалический барьер и эффекты ионизирующего излучения на его структуру и функции	12
1.2. Биохимические эффекты ионизирующего излучения	20
1.3. Фракционированное облучение	25
1.4. VEGF как биомаркер радиационного повреждения головного мозга	28
1.5. GFAP как биомаркер радиационного повреждения головного мозга	31
Глава 2. Материалы и методы	36
2.1. Клеточные методы	36
2.1.1. Характеристика модели ГЭБ <i>in vitro</i>	36
2.1.2. Исследование функционирования щелевых контактов в культуре астроцитов крысы	36
А. Приготовление и окраска культур клеток	37
Б. Проточная цитофлуориметрия	38
2.2. Экспериментальные животные	40
2.2.1. Характеристика и условия содержания	40
2.2.2. Подготовка биологического материала	41
2.2.3. Внутривенное введение препаратов меченых антител	41
2.3. Протокол облучения	42
2.3.1. Облучение культур клеток	43
2.3.2. Облучение животных	43
2.4. Иммунохимические методы	44
2.4.1. Иммуноцитохимический анализ	45
2.4.2. Иммуноблот анализ	45
2.4.3. Иммуногистохимический анализ	46
2.4.4. Иммуноферментный анализ (Сэндвич-вариант)	46
2.4.5. Конъюгация препаратов антител с флуоресцентной меткой	52

2.4.6. Исследование деградации в крови антител, меченных флуоресцентной меткой	53
2.5. Количественный ПЦР-анализ в реальном времени	54
2.6. Статистический анализ	57
РЕЗУЛЬТАТЫ	59
Глава 3. Исследование проницаемости ГЭБ на модели <i>in vitro</i>	60
3.1. Морфологический анализ клеток HUVEC	60
3.2. Исследование изменения экспрессии белков плотных, адгезивных и щелевых контактов	67
3.3. Исследование изменения экспрессии мРНК белков плотных и адгезивных контактов	68
3.4. Влияние облучения на структуру и функции щелевых контактов	71
3.4.1. Исследование передачи красителя через щелевые контакты	71
3.4.2. Исследование изменения экспрессии белка Sx43 и соответствующего гена	80
Глава 4. Исследование проницаемости ГЭБ на модели <i>in vivo</i>	82
4.1. Исследование проницаемости ГЭБ в направлении мозг–кровь	83
4.2. Исследование проницаемости ГЭБ в направлении кровь–мозг	85
4.2.1. Исследование деградации антител в крови	86
4.2.2. Исследование проникновения через ГЭБ меченых антител	89
Глава 5. Качественный и количественный анализ экспрессии белков VEGF и GFAP и соответствующих генов	94
5.1. Исследование изменения экспрессии мРНК VEGF и GFAP	94
5.2. Исследование изменения экспрессии белка VEGF и GFAP	98
Глава 6. Обсуждение	104
Заключение	116
Выводы	118
Список литературы	119

Список сокращений

Ang-1 – ангиопоэтин 1

APe – апурин/апиримидин эндонуклеаза

CAM – флуоресцентный краситель кальцеин-ацетоксиметил

CBX – динатриевая соль карбенексола

Cx43 – коннексин 43

DAPI – флуоресцентный ядерный краситель 4',6-диамино-2-фенилиндо

Dil – флуоресцентный краситель 1,1'-октадецил 3,3,3',3'-тетраметилиндокарбоцианин перхлорат

DMEM/F12 – среда Игла в модификации Дульбекко

GAPDH – глицеральдегид 3-фосфат дегидрогеназа

GFAP – глиофибрилярный кислый белок

HPRT1 - гипоксантин фосфорибозилтрансфераза 1

HRP – пероксидаза хрена

HUVEC – культура эндотелиальных клеток пупочной вены человека

IgG – иммуноглобулины класса G

Mab – моноклональные антитела

MAPK – митоген-активируемая протеинкиназа

Pab – поликлональные антитела

PBS – фосфатно-солевой буфер pH 7.4

Tie-2 – тирозинкиназный рецептор ангиопоэтина

VE кадгерин – кадгерин 5 2-го типа или кадгерин сосудистого эндотелия

VEGF – фактор роста эндотелия сосудов A

ZO – zonula occludens, плотный контакт

АМФ – аденозин монофосфат

АТФ – аденозин трифосфат

БЭД – биологически эффективная доза

Гр - Грэй

ГЭБ – гематоэнцефалический барьер

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ИГХ – иммуногистохимический анализ

ИИ – ионизирующее излучение

ИФА – иммуноферментный анализ

ИЦХ – иммуноцитохимический анализ

ЛК-модель – линейно-квадратичная модель

мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота

МРТ – магнитно-резонансная томография

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПЭТ – позитронно-эмиссионная томография

РНК – рибонуклеиновая кислота

РОД – разовая общая доза

СОД – суммарная общая доза

ТМБ – 3,3',5,5'-тетраметилбензидин

ЦНС – центральная нервная система

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

Введение

Актуальность темы и степень ее разработанности

Ионизирующее излучение широко используется в медицине для диагностики и терапии. В основном лучевую терапию назначают пациентам со злокачественными новообразованиями. Для большинства пациентов с глиобластомой, наиболее часто встречающейся и агрессивной опухолью головного мозга, фракционированная лучевая терапия является основным компонентом лечения. Она часто необходима и при лечении других злокачественных опухолей [5].

Повреждение церебрального сосудистого русла является лимитирующим фактором при лечении онкологических заболеваний головного мозга. Нарушение гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) – ключевая особенность радиационного поражения центральной нервной системы (ЦНС) [94]. Это ведет к многочисленным осложнениям радиотерапии, таким как отек и последующий фиброз головного мозга [106].

В течение многих лет исследования, посвященные воздействию различных видов ионизирующего излучения (ИИ) на ткани нервной системы, были сосредоточены на поиске основных структур и клеток, отвечающих за радиационные повреждения ткани и нарушения функции органа. На данный момент считается, что повреждение тканей после облучения – это специфический патологический процесс, протекающий во всех клетках, составляющих ткань мозга [127]. И в центре внимания находятся клетки, входящие в структуру ГЭБ.

Для оценки проницаемости ГЭБ в направлении кровь-мозг используют качественные, количественные и косвенные показатели. Качественные показатели – это изменение проникновения через барьер витальных красителей и меченых белков, в норме не проникающих через ГЭБ. Количественные оценки основаны на разнице величин радиационно-индуцированных изменений проницаемости до и после облучения. Косвенные оценки базируются на исследованиях фармакологических эффектов веществ, действующих на ЦНС [114].

В оценке проницаемости ГЭБ в направлении мозг-кровь может применяться метод количественного определения в плазме крови нейроспецифических белков, например, глиофибрилярного кислого белка (GFAP). Мониторинг уровня GFAP в крови широко описано при многих патологиях ЦНС, в том числе при патологических процессах в ткани мозга, вызванных гамма облучением [7]. Это позволяет охарактеризовать как степень изменений в ЦНС, так и оценить прогноз того или иного состояния.

Характер и площадь повреждения ГЭБ при ИИ зависят как от коэффициента качества облучения, дозы, так и от времени, прошедшего после воздействия. Повреждения головного мозга, возникающие после облучения, принято разделять на ранние и поздние. Признаки, появляющиеся в течение 3 недель после облучения, считаются ранними проявлениями [114]. Ранние эффекты воздействия облучения на ГЭБ проявляются спустя 24 часа после большой разовой дозы (более 10 Гр) или в течение первой недели после фракционированного облучения ЦНС (с дозами 1,8-2 Гр за одну фракцию), и их связывают с апоптозом эндотелиальных клеток [94]. Поздние описываются морфологически как дилатации, телеангиоэктазии и гиалиноз стенки сосудов, ее истончение и фибриноидный некроз [102]. Поздние повреждения, приводящие к нарушению проницаемости ГЭБ, связаны не только с поражением церебральных эндотелиоцитов, но и со многими другими клетками и межклеточными контактами, образующими ГЭБ, а также с комплексом белков, регулирующих прямо или косвенно проницаемость микрососудов.

Для нормального функционирования головной мозг нуждается в поддержании стабильной внутренней среды, которая устанавливается благодаря ГЭБ. Однако эффективности химиотерапии при лечении злокачественных опухолей мозга часто мешает присутствие ГЭБ. Поэтому исследование проницаемости ГЭБ на разных сроках после фракционированного облучения, используемого в клинике, может иметь потенциальную ценность для терапевтического применения [119].

Множество фундаментальных исследований по воздействию облучения на нервную ткань проведено при однократном воздействии, однако в клинике в ос-

новном применяется фракционированная радиотерапия [19]. Определение способа фракционирования дозы, сравнение режимов фракционирования, в особенности для минимизации побочных эффектов, возникающих после лучевых повреждений – актуальная задача для современной радиологии. Существующие радиобиологические модели не всегда пригодны для этих целей. Следовательно, для улучшения результатов лучевой терапии различные режимы фракционирования должны быть проверены в доклинических испытаниях на модели здоровой ткани мозга животного [37].

Целью исследования явился анализ биохимических маркеров нарушения проницаемости ГЭБ после воздействия редко ионизирующего фотонного излучения в экспериментах *in vitro* и *in vivo*.

В связи с этим были поставлены следующие **задачи**:

1. Изучить изменение морфологии клеток, количественно и качественно оценить экспрессию белков плотных и адгезивных контактов, а также соответствующих генов на модели *in vitro*
2. Исследовать влияние облучения на структуру и функцию щелевых контактов в культуре клеток астроцитов крысы
3. Провести количественный динамический анализ в плазме крови крыс нейроспецифического белка GFAP как биохимического маркера нарушения проницаемости ГЭБ *in vivo* в направлении мозг-кровь после фракционированного облучения
4. Провести иммуногистохимическую оценку накопления высокомолекулярных веществ в ткани мозга крыс как показатель проницаемости ГЭБ *in vivo* в направлении кровь-мозг после фракционированного облучения
5. Количественно и качественно оценить экспрессию фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) и глиофибриллярного кислого белка (GFAP), как белков основных клеток, формирующих ГЭБ, при различных режимах фракционированного облучения

Научная новизна:

1. Впервые проведена оценка изменения экспрессии белков межклеточных контактов, формирующих ГЭБ, а также соответствующих генов после воздействия различных доз облучения на ранних и поздних сроках на модели *in vitro*.
2. Впервые проведена оценка изменения экспрессии белка щелевых контактов Cx43 и соответствующего гена, а также показано ингибирование передачи красителя через щелевые контакты при различных дозах облучения.
3. Впервые проведена качественная и количественная оценка экспрессии VEGF и GFAP при сравнении трех различных режимов фракционирования с единой СОД.

Теоретическая и научно-практическая значимость:

1. Кокультура клеток пупочной вены человека с аллогенными астроцитами может являться моделью для изучения влияния ИИ на структурные компоненты ГЭБ *in vitro*
2. Мониторинг уровня GFAP как биохимического маркера нарушения проницаемости ГЭБ при фракционированном облучении позволит подобрать оптимальные сроки проведения химиотерапии в комбинированном лечении пациентов с опухолями головного мозга.
3. Сравнение различных схем фракционирования на здоровой ткани животного поможет уменьшить побочные эффекты лучевой терапии путем подбора оптимального режима фракционирования.

Методология и методы исследования

В диссертации использованы современный метод моделирования ГЭБ в условиях *in vitro*, метод проточной цитофлуориметрии для регистрации переноса цитоплазматического красителя САМ через щелевые контакты астроцитов крысы. Для оценки экспрессии белков в клетках и тканях животных применялись иммунохимические методы: иммуноцито- и гистохимический анализ с визуализацией

на конфокальном микроскопе Nicon, иммуноблот анализ. Для анализа количества белка GFAP в плазме крови крыс разработана тест-система с использованием сэндвич-варианта иммуноферментного анализа. Для оценки экспрессии генов в клетках и тканях животных использовался ПЦР-анализ в реальном времени.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту:

1. Воздействие редко ионизирующего фотонного излучения дозами 2, 4 и 6 Гр на культуру клеток HUVEC (культура эндотелиальных клеток пупочной вены человека), кокультивированных с аллогенными астроцитами, приводит к изменению морфологии клеток HUVEC, увеличению межклеточных промежутков, снижению уровня экспрессии белков межклеточных контактов и соответствующих им генов.
2. При облучении культуры клеток астроцитов крысы *in vitro* дозами 0,5, 2 и 6 Гр происходит нарушение экспрессии коннексина 43 (Cx43) и соответствующего гена, снижение передачи красителя через щелевые контакты.
3. В плазме крови крыс после фракционированного облучения по трем различным схемам (2Гр 18 фракций, 4Гр 9 фракций и 6Гр 6 фракций) происходит увеличение количества нейроспецифического белка GFAP на 2-4 и 8-12 неделе после облучения, что свидетельствует об увеличении проницаемости ГЭБ в направлении мозг-кровь;
4. После фракционированного облучения дозой 6 Гр 6 фракций показано проникновение через ГЭБ высокомолекулярных веществ – анти-VEGF и анти-GFAP антител, что свидетельствует об увеличении проницаемости ГЭБ в направлении кровь-мозг.
5. После фракционированного облучения по трем схемам с единой СОД (суммарная общая доза) показано снижение уровня мРНК *VEGF* в гиппокампе и префронтальной коре на 4 неделе после облучения и его восстановление к 12 неделе в префронтальной коре. Уровень мРНК *GFAP* в префронтальной коре повышался на 4 неделе после облучения, восстанавливаясь до нормы к 12 неделе.

Степень достоверности и апробация результатов

В работе применялись современные биохимические методы. Обзор литературы и обсуждение результатов проведены с использованием актуальных литературных данных. Выводы, изложенные в диссертации, обоснованы и подтверждены.

Основные положения диссертационной работы доложены и обсуждены на межлабораторных семинарах Отдела фундаментальной и прикладной нейробиологии ФГБУ «НМИЦ ПН им. В.П.Сербского», VIII Международной (XVII Всероссийской) Пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых ученых г. Москва 2013, XIX Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2013» г. Москва, Московском международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития» г. Москва 2017.

Глава 1. Обзор литературы

1.1 Гематоэнцефалический барьер и эффекты ионизирующего излучения на его структуру и функции

В норме ГЭБ препятствует проникновению в головной мозг большинства веществ из крови, кроме O_2 и CO_2 и маленьких липофильных молекул. Структурными компонентами ГЭБ являются три типа клеток: эндотелиальные клетки, астроциты и перициты [20]. Схема строения ГЭБ представлена на рисунке 1. Благодаря наличию межклеточных контактов, отсутствию фенестр и межклеточных щелей и сплошной выстилке эндотелиоциты головного мозга приобретают барьерные свойства. Кроме того, к особым фенотипическим особенностям эндотелиальных клеток следует отнести низкий уровень пиноцитоза и экспрессию транспортеров обратного выброса [96]. Благодаря этому, ГЭБ обладает значительным электрическим сопротивлением — около 1500—2000 Ом [38].

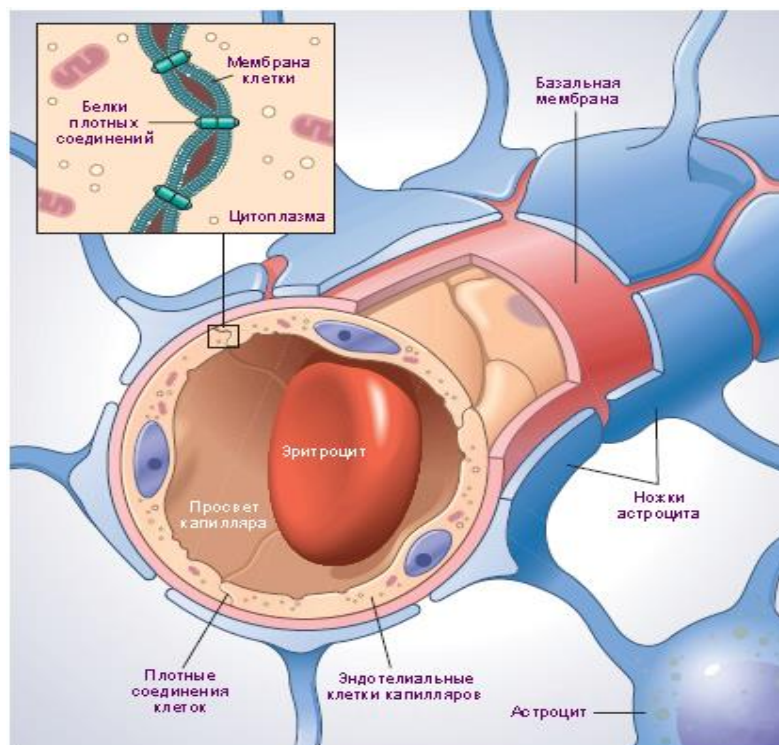


Рисунок 1. Схема строения ГЭБ

Межклеточные контакты, являющиеся структурными компонентами ГЭБ, подразделяются на плотные и адгезивные. Плотные контакты состоят из интегральных мембранных белков, таких как клаудин, окклюдин и трансмембранные адгезивные молекулы, а также из цитоплазматически связанных белков ZO-1, ZO-2, ZO-3, цингулина и других [51]. Цитоплазматические белки связывают мембранные белки с актином, который является основным белком цитоскелета и поддерживает структурную и функциональную целостность эндотелия. Плотные контакты играют основную роль в поддержании гомеостаза ЦНС [49].

Адгезивные контакты состоят из комплекса кадгерина, катенина и связанных с ними других белков. Межклеточные контакты, известные как зона прилипания, характеризуются внутриклеточными вставками микрофиламентов. Если промежуточные филаменты вставлены вместо микрофиламентов, результирующие контакты называют десмосомами. Известно, что плотные и адгезивные контакты взаимодействуют, особенно ZO-1 и катенины, и влияют на сборку плотных контактов [87]. Взаимодействия основных белков плотных и адгезивных контактов в ЦНС представлены на рисунке 2.

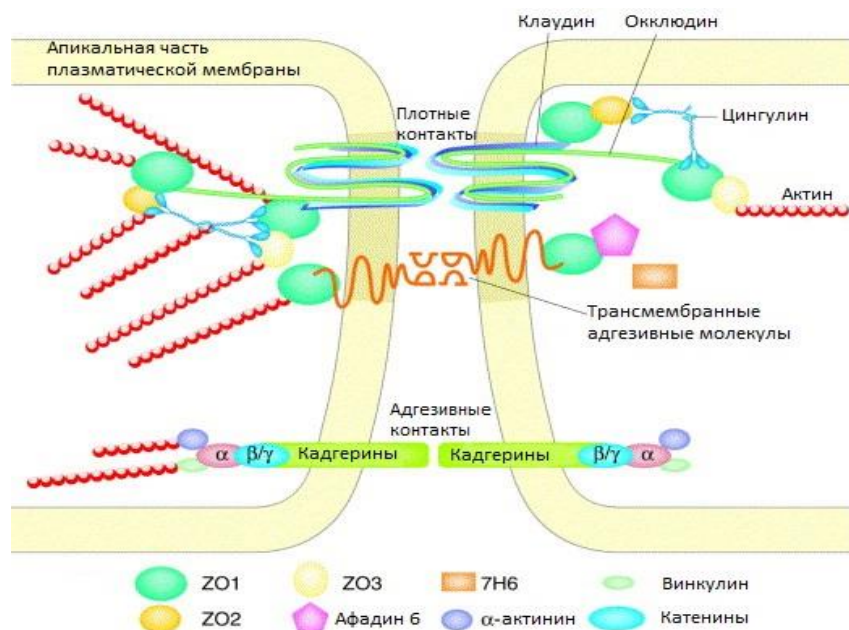


Рисунок 2. Взаимодействия основных белков плотных и адгезивных контактов в структуре ГЭБ. [124]

С учетом сложности барьерных свойств ГЭБ не удивительно, что они связаны более чем с одним типом клеток – церебральными эндотелиоцитами [1]. Еще несколько столетий назад было обнаружено, что капилляры мозга окружены или тесно связаны с несколькими типами клеток, в том числе периваскулярными отростками астроцитарной глии, перицитами и микроглия. Эти тесные межклеточные связи, в частности, астроцитов и эндотелиоцитов, являются посредниками индукции особенностей барьерного фенотипа в эндотелии капилляров мозга [124]. Так, культура астроцитов, имплантированная в места с нормальными проницаемыми сосудами, индуцирует уплотнение эндотелия [53].

Помимо физического соединения клеток, контакты также играют роль в трансдукции сигнала через плазматическую мембрану. Щелевые контакты можно рассматривать как органеллы химической межклеточной коммуникации.

Щелевые контакты являются ключевыми для межклеточных взаимодействий. Они образованы путем олигомеризации шести мономеров коннексина в клеточной мембране. Размер пор такого канала приблизительно 2-3 нм в диаметре, что позволяет осуществлять двунаправленный межклеточный транспорт малых молекул размером около 1,2 кДа [89]. Щелевые контакты участвуют в межклеточной коммуникации в различных типах клеток, таких как нервные клетки, ооциты, стромальные клетки костного мозга, эндотелий сосудов, кардиомиоциты. Также выступают в качестве каналов для обмена молекул с сигнальными свойствами между цитоплазмой и внеклеточной средой [117]. Проницаемость каналов регулируется различными внутриклеточными сигнальными путями, например, такими как увеличение внутриклеточного Ca^{2+} и полимеризация актина [34].

Щелевые контакты астроцитов в основном характеризуются экспрессией белка Cx43 [103]. На кокультивированных *in vitro* крысиных астроцитах и первичных крысиных эндотелиальных клетках капилляров головного мозга показана передача сигнала посредством кальциевой сигнальной системы, что осуществляется, как известно, благодаря щелевым контактам [Ошибка! Источник ссылки

не найден.]. Таким образом, прямой контакт между церебральными эндотелиоцитами и астроцитами необходим для формирования нормального ГЭБ.

Астрогиальные коннексины необходимы для поддержания целостности ГЭБ. Было показано, что у мышей, лишенных астроцитарных коннексинов Cx30 и Cx43, увеличена проницаемость ГЭБ из-за возрастающего гидростатического сосудистого давления. [39]

В формировании и поддержании нормального функционирования ГЭБ участвуют несколько типов клеток и все типы межклеточных контактов (плотные, щелевые и адгезивные). Так, плотные и адгезивные контакты формируют плотное смыкание клеток, формирующих ГЭБ, а щелевые и плотные контакты участвуют в передаче сигналов между астроцитами и церебральными эндотелиоцитами. Поэтому только комплексное изучение влияния облучения на все типы клеточных контактов способно выявить молекулярные механизмы увеличения проницаемости ГЭБ и нарушения взаимодействия структурных компонентов ГЭБ.

Из трех видов клеток в ЦНС (эндотелиальные клетки, глиальные, и нейроны), изменения в эндотелиальных клетках являются самыми ранними признаками радиационного воздействия. Расширение кровеносных капилляров наблюдается во всех тканях мозга на ранней стадии. В некоторых исследованиях продемонстрировано, что микрососуды являются наиболее чувствительной частью мозга при радиационном воздействии и играют критическую роль в патогенезе радиационно-индуцированных повреждений нормальных тканей [71].

Увеличение проницаемости ГЭБ и нерегулируемая пролиферация эндотелиальных клеток микрососудов наблюдается после облучения нормальных тканей [92,54]. Ранние и поздние эффекты после воздействия ИИ на нормальные микрососуды выражаются в изменении структуры и функции микрососудов. Происходит существенное уменьшение диаметра сосудов и площади поверхности капилляров, существенное увеличение сосудистого гематокрита, уменьшение потока крови в месте локального воздействия ИИ [63]. Показано, что фракционированное облучение головного мозга по протоколам, используемых для терапевтического

лечения пациентов с опухолями головного мозга (с СОД 40 Гр и фракционированием по 5 Гр), существенно уменьшает как плотность сосудов, так и их длину в мозге крысы через 10 недель после радиационного воздействия [28]. В другой работе [81] обнаружили уменьшение плотности эндотелиальных клеток в мозге крысы спустя 24 часа после облучения разовой дозой ИИ 5 Гр. Также отмечено существенное уменьшение количества эндотелиальных клеток через 24 часа и между 26 и 52 неделями после получения большой разовой дозы 25 Гр [84]. Результаты данных исследований показывают, что радиационно-индуцированные ранние и устойчивые повреждения микрососудов ведут к повышенной сосудистой проницаемости, что в дальнейшем приводит к поздним повреждениям мозга [71].

Ранние изменения в ГЭБ происходят в первые 24 часа после большой разовой дозы или в первую неделю фракционированного облучения. Радиационно-индуцированные изменения в морфологии эндотелиальных клеток в остром периоде заключаются в истончении базальной мембраны, вакуолизации цитоплазмы и набухании клеток [92]. Также наблюдается отек, периваскулярная экссудация белка и эритроцитов, адгезия и инфильтрация лимфоцитами [98]. В остром периоде отмечается дозозависимое уменьшение количества эндотелиальных клеток, гибель которых происходит путем апоптоза [98]. Механизм этого явления опосредуется вторичным мессенжером, церамидом, генерируемым из сфингомиелина после активации сфингомиелиназы [61]. Так, апоптоз был существенно меньше у мышей нокаутных по кислоте сфингомиелиназе [98]. Таким образом, апоптоз в эндотелиальных клетках после радиационного воздействия осуществляется по сфингомиелиновому сигнальному пути. Однако механизм взаимосвязи между ранней гибелью эндотелиоцитов и поздним повреждением ткани месяцы спустя неизвестен [94]. Изменения в функционировании ГЭБ начинаются в эндотелиальных клетках и выражаются в изменении ультраструктурной локализации активности фосфатаз, активации пиноцитозного везикулярного транспорта в эндотелии и осаждением гликогена в цитоплазме астроцитов. Нарушения усугубляются с увеличением дозы излучения от 5 к 960 Гр [114]. Однако другими авторами было по-

казано, что спустя 24 часа после облучения дозами 20-25 Гр процесс клеточной гибели HUVEC происходит не путем апоптоза [103].

В работе [103] описаны морфологические повреждения, возникающие после облучения, которые могут быть связаны с некрозом и митотической катастрофой в клетках HUVEC. Например, после облучения дозой 0,5 Гр происходит повреждение клеточной мембраны. Увеличение количества многоядерных клеток происходит с ростом дозы ИИ, что является индикатором нарушений митоза в клетках [46]. Повреждение ДНК были индуцированы в клетках HUVEC уже после воздействия таких низких доз, как 0,05 Гр. Низкие дозы спустя 24 часа индуцируют повреждения ДНК без существенного нарушения клеточного цикла. После воздействия дозы ИИ 0,5 Гр апоптоз был индуцирован при не нарушенном клеточном цикле.

Поздние сосудистые эффекты возникают на сроке от нескольких недель до нескольких месяцев после облучения и включают коллапс капилляров, утолщение базальных мембран, рубцевание и фиброз, телеангиэктазии, потерю клоногенной мощности. Уменьшение количества эндотелиальных клеток как путем апоптоза, так и без него, ставит под угрозу целостность и сохранение функции эндотелия.

Результаты исследования [78] показали, что облучение в дозах до 10 Гр индуцирует активацию микроглии и увеличение продукции провоспалительных цитокинов, которые затем запускают активацию астроглии и снижение количества нейрональных клеток *in vitro*.

Радиационное воздействие на плотные контакты и комплекс эпителиальных межклеточных контактов может принимать участие в патогенезе воспалительных процессов. Следует отметить, что NO-опосредованная система играет роль в патологическом механизме воспаления после облучения, следовательно, важна для увеличения проницаемости, ассоциированного с позже появившимся воспалением.

На монокультуре церебральных эндотелиоцитов показано уменьшение экспрессии трансмембранного белка молекула адгезии тромбоцит-эндотелиальных

клеток (PESAM-1), одного из белков межклеточных контактов, на сроке 3 часа после облучения дозой 5 Гр [106].

Согласно экспериментальным данным биологически активные молекулы (свободные радикалы, молекулы передачи сигнала), появляющиеся в ответ на радиационное воздействие, могут передаваться в соседние клетки через щелевые контакты, которые отвечают за межклеточное взаимодействие. В таких клетках происходят изменения, характерные для радиационного поражения («эффект свидетеля»). Щелевые контакты также участвуют в так называемой радиоадаптации клеток. Показано, что увеличение экспрессии белков щелевых контактов сопровождается снижением восприимчивости клетки к ионизирующему излучению [76]. Так, повреждения ДНК также возникают и в необлученных клетках, благодаря «эффекту свидетеля» [77]. Через щелевые контакты после облучения осуществляется влияние радиационного воздействия на опухолевую трансформацию или клеточную гибель [115]. Коммуникация клеток через щелевые контакты может иметь как позитивные, так и негативные эффекты в ответ на стресс испытываемый клеткой после воздействия на нее ионизирующего излучения [16].

Структурные и функциональные изменения клеточных контактов имеют существенное значение в развитии тканевых и органных изменений. Изменения в межклеточных контактах ведут к формированию как ранних, так и поздних эффектов радиационного облучения. Важная роль контактов подтверждается и тем, что они способствуют изменению эффекта облучения, играют роль в радиопротекции или в увеличении эффективности радиотерапии, делая клетки более чувствительными к радиационному повреждению. Потенциально это может быть полезным для терапии. Так ингибиторы NO-синтазы, стабилизирующие плотные контакты, обладают радиопротекторным эффектом. Результаты таких исследований могут быть полезными как для профилактики побочных эффектов облучения при терапии, так и после радиационного облучения в результате аварии [109].

Не вызывает сомнений, что регуляция проницаемости ГЭБ – это комплексный мульти уровневый процесс. Однако не существует детального описания воз-

мощного механизма радиационного эффекта [109]. Известно, что повышение проницаемости ГЭБ инициирует серию реакций, вызывающих изменения в гомеостазе ткани мозга, нейронов, функциях глии и миелина.

Увеличение проницаемости ГЭБ под воздействием облучения показано во многих экспериментальных работах на животных, путем использования различных методик, как например, сцинтиграфия [100], МРТ [29], ПЭТ [67], иммуногистохимический анализ с антителами к сывороточному альбумину [91], измерение концентрации альбумина [110] и метотрексата в спинномозговой жидкости [80] и др. Похожие результаты были продемонстрированы и у пациентов. Показано увеличение проницаемости ГЭБ в нормальной ткани мозга, находящейся рядом с полем облучения, причем степень увеличения была прямо пропорциональна дозе ИИ [100]. В этом же исследовании показано, что для увеличения проницаемости ГЭБ необходима доза от 20 до 30 Гр с фракционированием 3 Гр [100]. Для уменьшения долгосрочных негативных эффектов облучения предпочтительнее фракционирование с ежедневной дозой меньше 2,5 Гр [69]. Увеличение проницаемости ГЭБ было показано многими исследователями для терапевтических доз радиационного воздействия [38, 119, 132].

Эффективности воздействия большего числа химиотерапевтических агентов препятствует ГЭБ [116]. В нескольких работах показано открытие барьера после интракаротидного введения гиперосмолярных растворов [101, 64]. Механизм этого явления включает фосфорилирование белка адгезивных контактов β -катенина [40]. В исследовании Wei [125] продемонстрировано, что увеличение проницаемости ГЭБ после ультразвукового воздействия повышает накопление темозоломида, химиотерапевтического препарата, используемого при лечении глиобластом, с 22.7% до 38.6%, уменьшает 7-дневную прогрессию опухоли и увеличивает медиану выживаемости.

Увеличение проницаемости ГЭБ после облучения и выяснение молекулярных механизмов данного явления может улучшить доставку лекарственных препаратов в головной мозг для терапии злокачественных опухолей путем оптималь-

ного совмещения сроков проведения химио- и радиотерапии. Qin и соавт. заметили, что проницаемость ГЭБ внутри и вокруг опухоли только на 20 % больше, чем в нормальной ткани мозга [100]. В исследовании этой же группы исследователей показано, что фракционная доза в 2 Гр может оптимизировать эффект химиотерапии вследствие изменения проницаемости ГЭБ [99]. Нарушение проницаемости ГЭБ может привести к улучшению результатов химиотерапевтического лечения, однако, несмотря на то, что существуют данные об этом явлении после радиотерапии, этот метод до сих пор не используется в клинике [119]. Также совмещение химио- и радиотерапии поможет увеличить гибель опухолевых клеток, и реакцию на воздействие облучения благодаря синергическому эффекту химио- и радиотерапии [24]. В настоящее время возможность использования одновременной химиорадиотерапии становится объектом исследований еще и благодаря работам ученых, определивших механизмы опухолевой устойчивости к ИИ, что дает дополнительные возможности объединения лечения химиопрепаратами и радиационного воздействия [99]. Однако главным недостатком такого комбинированного лечения является обострение острой и поздней токсичности ИИ для нормальных тканей [36]. Таким образом, исследование механизмов повреждения нормальных тканей после облучения может быть полезно в свете изучения проблемы комбинации химио- и радиотерапии.

1.2 Биохимические эффекты ионизирующего излучения

После воздействия ионизирующего излучения обратимые и необратимые процессы выявляются как на клеточном, так и на тканевом и органном уровнях. Радиобиологический парадокс действия ИИ на биологические объекты состоит в том, что ничтожное количество поглощенной энергии приводит к экстремальным эффектам. В ответ на радиационное воздействие возникает последовательность физических, химических и биологических реакций, меняющихся в зависимости от коэффициента качества облучения, дозы и срока, прошедшего после воздействия [109].

Классическим объяснением первичных механизмов воздействия ИИ на живую систему являются принцип попаданий (дискретность поглощенной энергии) и принцип мишени (структурная и функциональная гетерогенность клетки, наличие в ней определенных участков – мишеней, при попадании в которые ИИ и происходит поражение). Энергия ИИ переносится в дискретном виде, акты взаимодействия не зависят друг от друга и подчиняются пуассоновскому распределению. Эффект наступает, если число попаданий в мишень по крайней мере составляет единицу [6].

Действие ионизирующего излучения может быть как прямым, так и косвенным. Энергия ИИ превышает энергию внутримолекулярных и внутриатомных связей. Прямое действие облучения – поглощение энергии самими молекулами-мишенями. Будучи поглощенной молекулой энергия мигрирует, реализуя свое действие в наиболее уязвимых местах. Результатом являются ионизация, возбуждение, разрыв наименее прочных связей, образование свободных радикалов [58].

Косвенное действие ионизирующего излучения идет через процессы взаимодействия органических молекул с продуктами радиолиза воды (H_2O_2 , $\text{HO}_2^\bullet$, $\text{O}^\bullet$, $\text{OH}^\bullet$, $\text{H}^\bullet$, $\text{O}_2^{\bullet-}$), которая, как известно, составляет около 70-80% объема клетки. За счет неспаренных электронов на внешнем энергетическом уровне продукты радиолиза обладают чрезвычайно высокой радиационной способностью, что оказывает повреждающее воздействие на высокомолекулярные соединения [10]. Косвенные эффекты обусловлены диффузией продуктов радиолиза внутрь клетки, которые вступают в реакцию с функциональными химическими группами. При этом образуются органические радикалы с неспаренными электронами, они также являются высоко реактоспособными и могут приводить к разрыву химических связей в жизненно важных макромолекулах. Радиационная чувствительность белков зависит от числа химических групп, которые не только способны вступить в реакцию с первичными и вторичными радиационными продуктами, но также доступны растворителю. И в клетках, и в растворе белков, эти реакции могут приводить к потере биохимической активности. С точки зрения сохранения биологиче-

ской функции белков, 90% радиационных эффектов возникают за счет взаимодействия молекул с активными формами кислорода. [5].

Патологические эффекты, вызванные ИИ, связаны с воздействием облучения на биологически важные молекулы: ДНК, РНК, АТФ, белки, липиды и др.

При анализе причин летального радиационного поражения клетки следует рассмотреть вопрос о радиочувствительности двух ее компонентов: ядра и цитоплазмы. Многочисленные экспериментальные доказательства свидетельствуют о гораздо большей чувствительности ядра [10].

На клеточном уровне ДНК является критической мишенью для ионизирующего излучения и может повреждаться как прямыми, так и косвенными механизмами, взаимодействуя с активными формами кислорода, которые формируются в клетке, после воздействия облучения [104]. Последующие клеточные реакции на повреждение ДНК включают изменения экспрессии генов, которые вызывают остановку клеточного цикла, репарацию ДНК и, если восстановление не удастся, апоптоз [112]. Исследования показали, что ИИ изменяет экспрессию генов гораздо больше на уровне транскрипции, чем на уровне трансляции мРНК [82]. Ионизирующее излучение может вызывать широкий спектр повреждений ДНК, включая повреждение нуклеотидных последовательностей, поперечные сшивки и одиночные и двойные разрывы ДНК [77]. С увеличением дозы возникает повреждение нуклеотидных последовательностей, и одонитевые разрывы необходимо устранить для восстановления ДНК после действия ИИ. Удаление поврежденного основания осуществляется гликозилазами, в частности с помощью апурин/апириимидин эндонуклеазы (APE также известные как APEX1). Полученная ДНК подвергается дальнейшему процессингу полимеразами при подготовке к лигированию лигазами. Также может потребоваться концевой процессинг при помощи APE или полинуклеотид киназы. Одонитевые разрывы, поврежденные нуклеотидные основания также могут вызывать нарушение вилки репликации, что ведет к формированию двунитевых разрывов ДНК. При дозах до 20 Гр двойные разрывы – это одновременное повреждения обеих нитей ДНК. С увеличением

дозы облучения возрастает переход однонитевых разрывов в двойные, так как увеличивается вероятность совпадения независимо образовавшихся одиночных разрывов. Двунитевые разрывы ДНК узнаются и стабилизируются MRE11–RAD50–нибрин (также известным как NBS1) комплекс (MRN комплекс), который является важным для активации регуляторных пептидов, координирующих восстановление клеточного цикла и апоптотический ответ. Формирование двунитевых разрывов запускает активацию мутантной киназы ATM (ataxia telangiectasia mutated), которая фосфорелирует широкий спектр белков, которые сигнализируют о повреждениях или способствуют восстановлению молекулы ДНК.

Также ATM положительно регулирует АМФ-активируемую протеинкиназу, которая участвует в регуляции энергетического обмена. Как правило, активация АМФ-активируемой протеинкиназы стимулирует катаболические пути, контролируемые гликолиз, окисление жирных кислот и митохондриальный биогенез и ингибирует анаболические пути, участвующие в глюконеогенезе, образовании гликогена, жирных кислот и синтезе белка [31]. Замедление анаболических путей, задержка роста являются отличительной чертой ответов на воздействие радиации при средних и больших дозах, и дает время для ликвидации повреждений ДНК и других восстановительных процессов, которые поддерживают геномную стабильность [42, 83, 120]. Задержка клеточного цикла вследствие облучения, косвенно влияет на общий обмен веществ, и облучение запускает p53 зависимые и независимые пути, контролируемые эти задержки [31].

Двунитевые разрывы в большинстве случаев восстанавливаются посредством негомولوجичного присоединения к концу цепочки или гомологичной рекомбинации. В первом случае двунитевые разрывы устраняются посредством прямого лигирования конца ДНК после концевой процессинга. При гомологичной рекомбинации используется сестринская хроматида в качестве шаблона для обеспечения точного восстановления, ограничивая этот способ восстановления в S и G2 фазах клеточного цикла [22]. Также ИИ индуцирует образование точечных мутаций, которые иногда включают ген целиком [77].

Повреждения клетки, вызванные воздействием ИИ, которые обычно приводят к гибели, при определенных условиях могут быть устранены системами ферментной репарации. Они называются потенциальными и делятся на сублетальные и потенциально летальные. Методом фракционированного облучения выявляют сублетальные повреждения, а по изменению выживаемости под влиянием условий, в которых они находятся в первые часы облучения – потенциально летальные. Часть двойных разрывов, образовавшихся в предсинтетический период, может быть восстановлена за время, оставшееся до репликации ДНК, а те, что остались, становятся летальными и приводят к гибели клетки. Поэтому радиочувствительность клетки различна на разных стадиях ее жизненного цикла: она максимальна во время митоза и минимальна в конце S-стадии, где она ниже на порядок [10].

ИИ это физиологически важный стресс, на который клетки отвечают активацией нескольких сигнальных путей [31, 25]. Например, взаимодействие с сигнальными молекулами кислой сфингомиелинидазой и церамидом, ведет к активации рецепторов клеточных мембран, в том числе и для факторов роста, цитокинов и связанных с апоптозом лигандов, и запускает активацию клеточных сигнальных путей. Сигнал от факторов роста может влиять на PI3K/AKT сигнальный путь, который отвечает за синтез белков и энергообмен. Активные формы кислорода напрямую ингибируют активность тирозин фосфатазы, участвующей в тирозинкиназном пути распространения сигнала [31].

В случае клеточных мембран, и в частности, плазматической мембраны, воздействие ИИ вызывает реакции перекисного окисления липидов. ИИ запускает быструю кислород-зависимую активацию рецепторов семейства эпидермального фактора роста и других тирозинкиназ, вовлеченных в сигнальные пути [118]. ИИ может также запускать лиганд-независимую активацию поверхностных клеточных рецепторов. В мембранах митохондрий нарушается окислительное фосфорилирование. При повреждении мембран лизосом из них освобождаются рибону-

клеаза, дезоксирибонуклеаза, катепсины, обладающие повреждающим действием на нуклеиновые кислоты, цитоплазматические и ядерные белки [5].

1.3 Фракционированное облучение

Многие фундаментальные исследования по влиянию облучения на нервную ткань на моделях *in vitro* и *in vivo* проведены при воздействии однократной дозы облучения. Однако в клинической практике в основном применяется фракционированная радиотерапия, при которой суммарная доза разделяется на фракции, получаемые пять раз в неделю. Фракционированная терапия позволяет достичь лучших результатов в борьбе с опухолевыми новообразованиями с одновременным снижением токсичности для нормальной ткани по сравнению с одноразовым облучением высокой дозой, даже при использовании современной стереотаксической техники.

При фракционированном подходе к облучению ставится вопрос об определении биологически эффективной дозы облучения (БЭД), выборе изоэффективных режимов и сравнении режимов фракционирования. Современный подход к определению дозы и режима фракционирования индивидуален для каждого пациента, и в его определении участвуют несколько специалистов, таких как онколог, лучевой терапевт, медицинский физик и медицинский дозиметрист. Для наилучшей борьбы с опухолью при одновременной минимизации побочных эффектов, особенно рисков поздней токсичности, используются различные радиобиологические модели. Пригодность данных моделей, а также выбор режимов фракционирования является актуальной задачей для современной радиобиологии.

Необходимость расчета биологически эффективных доз при нескольких вариантах фракционирования возникла из-за различного восстановления клеток от сублетальных повреждений после облучения. Явление восстановления облученных клеток от летальных повреждений обнаружил российский ученый В. И. Корогодин в 1958 г., изучая действие радиации на клетки дрожжей [62]. Для восстановления требуется время, которое по данным экспериментальных исследований,

составляет более 6 часов. Но восстановление имеет разную эффективность в зависимости от вида и дозы излучения: чем больше линейная передача энергии, тем хуже происходит пост радиационное восстановление. При расчете дозы при фракционированном облучении, то есть при разделении суммарной дозы облучения на порции или фракции, учитывается явление восстановления от сублетальных повреждений.

Для сравнения режимов фракционирования и определения изоэффективных режимов учитывают параметры время – доза – фракционирование. Кроме того, возникает необходимость предсказания эффектов лучевой терапии, в том числе поздней токсичности для нормальных тканей в режиме фракционирования дозы. В связи с этим в 1980х годах была создана линейно-квадратичная модель (ЛК-модель). Линейно квадратичная модель описывает соотношение между общей изоэффективной дозой и дозой за одну фракцию в пределах от 1 до 6 Гр [4]. Поражение ДНК после радиационного воздействия может быть летальным и не летальным, однако сублетальные поражения, например однонитевые разрывы ДНК, могут стать и летальными при условии совпадения однонитевых разрывов в каждой из противоположных нитей ДНК. Так два однонитевых сублетальных разрыва становятся двунитевым, приводящим к летальному повреждению. Гибель клеток от летальных повреждений, то есть от одномоментных двунитевых разрывов, характеризуется функцией, линейно зависящей от дозы излучения.

ЛК-модель описывается следующей формулой:

$$-\ln(S) = \alpha D + \beta D^2$$

S — выживаемость клеток, D — доза излучения

Гибель клеток от сублетальных повреждений, то есть при совпадении одноцепочечных разрывов в противоположных нитях ДНК, линейно нарастает с квадратом дозы. Эти процессы обозначаются в ЛК-модели параметрами α и β . Их значения определяются экспериментальным путем по кривым выживаемости стволовых клеток после радиационного воздействия. Однако определение величины α и β отдельно для клеток в составе ткани невозможно, в связи с этим определяют

значение отношения α/β при изоэффективных режимах. Оно измеряется в Грехах и численно соответствует дозе, при которой линейная функция, описывающая гибель клеток αD эквивалентна квадратичной βD^2 . Кроме того, существует зависимость времени полувосстановления клеток от сублетальных повреждений и от времени облучения. После воздействия разовой дозы в клетках возникают сублетальные повреждения, но времени между ежедневными фракциями недостаточно для полного восстановления клеток. Поэтому при расчете БЭД вводят коэффициент неполного восстановления hm , который зависит от времени между фракциями и времени полувосстановления. Существуют формулы для расчетов с учетом поправки на неполную репарацию, также были введены параметры фактора времени для конкретной ткани. [32]

В клинической практике при фракционировании дозы даже при использовании стереотаксической лучевой терапии, которая уменьшает воздействие на здоровые ткани, существуют риски поздней токсичности. На основе ЛК-модели созданы таблицы биологически изоэффективных доз относительно принятого стандартного фракционирования на основе возникновения поздних лучевых повреждений различных тканей. Однако пригодность данной модели для прогнозирования поздних эффектов радиационного воздействия вызывает сомнения, так как она основана на лабораторном анализе выживаемости линий опухолевых клеток *in vitro*, и это вовсе не значит, что токсичность нормальных тканей *in vivo* окажется релевантной, а новые радиобиологические модели только разрабатываются. Таким образом, клинические данные оценки риска поздних лучевых осложнений имеют первостепенное значение [90]. Кроме того, ЛК-модель обладает ограниченным числом радиобиологических параметров, что ставит вопрос о ее пригодности в тех или иных случаях [32].

Многие клинические врачи используют ЛК-модель и рассчитанную с ее помощью БЭД, чтобы оценить влияние различных схем облучения. Однако последние экспериментальные исследования показали, что ЛК-модель переоценивает влияние высоких дробных доз радиации. Рассчитанная БЭД особенно неправиль-

на, когда она используется для оценки ответа опухоли *in vivo*, так как при этом не принимается во внимание реоксигенация. Для оценки ответа нормальной ткани были предложены улучшенные модели, но для оценки ответа опухоли *in vivo* имеющиеся в настоящее время модели не являются удовлетворительными, и будущие исследования должны быть направлены на поиск более адекватных моделей [107].

1.4 VEGF как биомаркер радиационного повреждения головного мозга

Ангиогенез – это процесс образования новых кровеносных сосудов. Известно, что он играет важную роль не только во многих физиологических процессах, таких как эмбриональное развитие или восстановительных процессах, например, регенерация тканей после повреждения, воспаления, образование рубца, заживления ран, но и в развитии ряда патологических состояний, например при прогрессировании опухолей [43]. Регуляция ангиогенеза характеризуется динамическими, во времени и пространстве скоординированными взаимодействиями между эндотелиальными клетками, ангиогенными факторами и белками внеклеточного матрикса [130]. VEGF является центральным белком, участвующим в регуляции данного процесса [86]. VEGF рассматривается как фактор, участвующий в выживании эндотелиальных клеток посредством влияния на апоптоз через сигнальные пути MAPK (митоген-активируемая протеинкиназа) [14], а также в миграции предшественников эндотелиоцитов из костного мозга в очаги ангиогенеза.

Экспрессия VEGF повышается при гипоксии и по периферии некротических областей [74]. Этот белок также известен как фактор проницаемости сосудов. Это первая обнаруженная функция данного белка. Первоначально было установлено, что вены и малые вены становятся проницаемы для циркулирующих макромолекул, выделяемых опухолевыми клетками под действием VEGF [105].

Кроме того, VEGF является также и трофическим фактором для нервных клеток. Он играет роль в нейрогенезе, участвует в восстановлении нейронов после

травмы и принимает участие в патогенезе болезни Альцгеймера и болезни моторных нейронов [47].

VEGF взаимодействует с двумя основными мембранными рецепторами эндотелиальных клеток: рецепторами первого (Flt-1) и второго типов (KDR).

Взаимодействие VEGF с его рецепторами вызывает аутофосфорилирование тирозинкиназных рецепторов с последующим связыванием и фосфорилированием их медиаторами. Это приводит к увеличению проницаемости. Так в монослой клеток HUVEC, проницаемость для [14C] альбумина увеличивается при воздействии VEGF [59]. Увеличение проницаемости связано с дезорганизацией белков клеточных контактов и сигнальным путем MAPK [122].

Влияние на апоптоз происходит также благодаря взаимодействию VEGF с рецептором VEGFR2, что приводит к запуску сигнального пути PI3K/v-akt. Akt является главным внутриклеточным медиатором сигнального пути выживания. В результате запускается каскад реакций, ведущих к увеличению экспрессии анти-апоптотических белков, активации циклинов и циклин-зависимых протеинкиназ. Все это приводит к выходу эндотелиальных клеток из G0-фазы и вступлению в клеточный цикл. Также происходит активация интегринов, стимулирующих клеточную адгезию, миграцию и рост эндотелиоцитов [8].

Воздействие VEGF на монокультуру клеток церебральных микрососудов нарушает непрерывность перичеллюлярного распределения белков плотных контактов ZO-1 и окклюдина, также как и распределение актиновых филаментов. При иммуноферментном анализе культуры клеток церебральных микрососудов после воздействия VEGF было выявлено снижение экспрессии окклюдина. Уровни белков ZO-1, актина или тубулина не изменились. VEGF вызывает нарушение проницаемости эндотелиального барьера путем влияния на организацию белков плотных контактов [122].

При радиационном воздействии нарушается проницаемость сосудов. Также существует явление пострadiационного некроза, по периферии которого возникают области с гипоксией. VEGF, как фактор, участвующий в данных процессах,

может играть значительную роль и в пострadiационных повреждениях [60]. Увеличение проницаемости ГЭБ согласуется с увеличением экспрессии VEGF [54].

В ряде работ [60, 126] показано увеличение экспрессии VEGF при различных вариантах облучения (от 10 до 75 Гр). После радиохирургии ограниченной зоны мозга дозой 75 Гр экспрессия VEGF также увеличивается в ткани нормального облученного мозга в подострой стадии, достигая максимального уровня к 12 неделе после радиохирургии [126]. В этом же исследовании показано, что уровень экспрессии мРНК в облученных тканях сопровождается таким же увеличением уровня экспрессии белка. Максимальная экспрессия VEGF совпала с пиком отека мозговой ткани. Временная и пространственная ассоциация повышенной экспрессии белка VEGF и сосудистых поражений предполагает, что VEGF регуляция связана с увеличением проницаемости сосудов и отеком после радиохирургии [126]. Увеличение экспрессии мРНК VEGF после радиационного воздействия было продемонстрировано на неонатальном спинном мозге крыс после дозы ионизирующего излучения 55 Гр. Это сопровождалось увеличением плотности сосудов спустя 4 и 5 недель после воздействия [21]. Напротив, в другой работе показана дегенеративная реакция сосудов во взрослой ткани мозга после облучения [111].

В исследовании Kim и соавт. [60] производилась интракраниальная имплантация в полушарие мозга крыс радионуклида (гамма излучателя) иридий-192 до достижения поглощенной дозы в 10 Гр, помимо этого второй группе животных проводилась операция, имитирующая имплантацию. Иммуноферментный анализ показал увеличение уровня VEGF в сыворотке крови в обеих группах, причем разница между группами крыс с истинной и ложной имплантацией была незначительной. Это, вероятно, можно объяснить травматизацией ткани при ложной операции, что также индуцирует экспрессию VEGF. Однако, по данным ИГХ окрашивания, количество VEGF-позитивных клеток, начиная с первой недели после имплантации радионуклида, отличалось достоверно. Динамика увеличения экспрессии VEGF после облучения гамма ножом на сроках до 6 месяцев после облучения показана в исследовании Chang L. и соавт. [30]. Патологический ангиоге-

нез, показанный в этом же исследовании, согласуется с изменениями в экспрессии VEGF. Авторы предполагают важную роль VEGF в ангиогенезе после травмы, вызванной гамма облучением.

Однако показано и уменьшение экспрессии мРНК *VEGF*, а также других сосудистых факторов, таких как Ang-1 и его рецептора Tie-2, в головном мозге крыс после облучения дозой 10 Гр в первые сутки после воздействия [70]. Оценка интенсивности иммунофлуоресценции также показала резкое снижение экспрессии VEGF (до 10 раз), по сравнению с контролем. Такое уменьшение экспрессии VEGF в сочетании с увеличением экспрессии Ang-2 по предположению исследователей может инициировать увеличение проницаемости сосудов за счет уменьшения пролиферации эндотелиальных клеток и увеличения апоптоза. Это может быть причиной ослабления физиологического ангиогенеза в результате увеличения проницаемости сосудов в облученном мозге.

Конечно, детальные механизмы радиационно-индуцированного нарушения проницаемости сосудов в мозге требуют дальнейшего изучения. Однако восстановление цереброваскулярного сосудистого русла путем влияния на физиологический ангиогенез – новая терапевтическая стратегия для лечения радиационно-индуцированной травмы головного мозга [123].

1.5 GFAP как биомаркер радиационного повреждения головного мозга

Глия центральной нервной системы представлена преимущественно тремя типами клеток: астроцитами, олигодендроцитами и микроглией. Астроциты обособлено являются наиболее важными клетками, поддерживающими функционирование нейронов. Они также контактируют с капиллярами головного мозга и участвуют в формировании ГЭБ. GFAP – основной белок цитоскелета астроцитов.

Роль GFAP в ЦНС включает в себя подавление пролиферации нейронов, формирование физического барьера для изоляции поврежденного участка нервной ткани, участие в механизмах моторной памяти, регулирование потока крови

после ишемии, формирование ГЭБ, участие в процессе миелинизации и обеспечение механической прочности ткани [26].

Большое количество работ посвящено развитию реактивного астроглиоза при разнообразных повреждениях ЦНС [26,97,129]. Реактивный астроглиоз характеризуется пролиферацией и гипертрофией астроцитов. И гипертрофия, и пролиферация астроцитов играют протективную и репаративную роль после повреждений ЦНС посредством контроля и мониторинга содержания молекул и ионов в экстрацеллюлярном пространстве ЦНС через секрецию нейротрофических факторов и удаление токсических продуктов после повреждения клеток. Все это способствует восстановлению нейронов. Явления реактивного астроглиоза могут быть обнаружены как рядом, так и далеко от места повреждения. Активация этого процесса представлена разнообразными клеточными, биохимическими и гистохимическими трансформациями, одним из важных маркеров астроглиоза является повышение синтеза GFAP [108]. Изменение экспрессии GFAP может использоваться для количественного и полуколичественного анализа степени повреждения ЦНС [128].

Уменьшение или повышение плотности глиальных клеток, таких как астроциты и олигодендроциты, показано во многих фундаментальных работах на животных, проведенных с целью исследования последствий облучения [65, 131].

Реакция астроглии с повышением GFAP в ткани мозга наблюдается также и после воздействия ионизирующего излучения при дозах от 0,25 до 160 Гр на сроках от 1 часа до 90 дней [13]. При дозе в 0,25 Гр через 1 час с помощью ИФА было обнаружено дифференцированное изменение количества GFAP в зависимости от структуры мозга. Так в мосте, стриатуме и мозжечке было зафиксировано падение уровня GFAP примерно в 2 раза уже в первый час, а в среднем мозге в 3 раза на первые сутки после облучения по сравнению с контролем. Через 7 дней уровень GFAP в мозжечке принял контрольные значения, в стриатуме и мосте оставался примерно в 2 раза ниже, а в среднем мозге незначительно увеличился по сравнению с контролем. В коре головного мозга в течение 7 дней изменений за-

фиксировано не было, а в гиппокампе с первых часов был зафиксирован рост уровня GFAP, который через сутки в 4 раза, а через 7 дней в 2 раза превышал контрольное значение [73]. Однократная доза в 8 Гр приводит к увеличению уровня экспрессии GFAP в 2 раза на четвертый день после облучения спинного мозга, на 9 день отличий от контроля не наблюдаюсь [13]. Однократная доза в 160 Гр приводит к развитию некроза менее чем на 30 день после облучения и значительному повышению уровня GFAP [85].

В гиппокампе здоровых крыс при фракционированном гамма облучении (СОД 4 Гр) наблюдалось уменьшение количества GFAP-положительных астроцитов через 30 дней, а также постепенное увеличение в течение 60 дней после облучения. Вторичное и более значительное снижение наблюдалось между 60 и 90 днем после окончания облучения [19]. Однако спустя 100 дней после облучения снижения экспрессии GFAP-положительных астроцитов в гиппокампе те же авторы не наблюдали [18].

Изменение уровня GFAP после воздействия ИИ происходит неравномерно в разных структурах мозга, причем в одних происходит падение, а в других увеличение его экспрессии. Это говорит о разном ответе структур мозга на радиационное повреждение.

В исследовании Yang и соавт. [128] при облучении единой дозой 100 Гр через 6 часов начинается пролиферация, гиперплазия и гипертрофия астроцитов в коре, мозолистом теле с пиком через 3 дня после воздействия и продолжается до 30 суток. В этом же исследовании было замечено, что гиперплазия и гипертрофия астроцитов раньше всего появляется в белом веществе (мозолистое тело и бахромка гиппокампа) и затем только в сером (кора, гиппокамп и хвостатое ядро). Гипертрофия астроцитов быстрее идет на спад в белом, нежели в сером веществе. Астроглиальная реакция развивается преимущественно в регионах рядом с зоной повреждения в ипсилатеральном полушарии, однако также присутствует и в контралатеральном полушарии по сравнению с нормальными необлученными животными. Эти наблюдения свидетельствует о потенциальной поддерживающей роли

сильного гуморального ответа, который способствует привлечению реактивных астроцитов с отдаленных регионов, где астроциты (или зрелые глиальные прогениторные клетки), которые не были подвержены радиационному воздействию, могли бы пролиферировать и потенциально мигрировать в зону повреждения.

Было продемонстрировано, что развитию астроглиоза в головном мозге крысы, сопровождаемого увеличением экспрессии GFAP, способствует радиационно-индуцированная активация микроглии [52]. Добавление облученной микроглии в культивируемые астроциты вызвало астроглиальную активацию, в то время как очевидной активации не было найдено в облученных культивируемых астроцитах. Облучение оказывает незначительное влияние на морфологию культур астроцитов, но существенно влияет на морфологию астроцитов в смешанных культурах [52].

Таким образом, на ранних сроках после облучения активированная микроглия, вероятно, играет важную роль в иницировании и поддержании позднего начала реактивного астроглиоза после облучения всего мозга. Также провоспалительные цитокины, индуцированные активированной микроглией, необходимы для перехода покоящихся астроцитов в реактивное состояние.

Кроме того, облучение повышает экспрессию молекулы внутриклеточной адгезии в астроцитах, что способствует развитию воспаления [93].

При разрушении астроцитов и увеличении проницаемости ГЭБ, нейроспецифические белки, в частности GFAP, проникают в кровь. Определение концентрации сывороточного уровня GFAP может использоваться как диагностический фактор при злокачественных астроцитомах, степень повышения которого коррелирует с объемом опухоли и некроза [27]. Также сывороточный GFAP может быть использован для мониторинга терапевтических эффектов и может иметь прогностическое значение [55]. Повышение GFAP в плазме крови после однократного гамма облучения показано Чехониным и соавт. [5].

Мониторинг сывороточного уровня GFAP как косвенный параметр при оценке проницаемости ГЭБ может быть в дальнейшем использовано для улучшения лечения путем оптимальной комбинации с химиотерапией [99].

Из приведенного обзора литературы следует, что повреждение ГЭБ после воздействия ИИ является ключевой особенностью радиационного поражения ткани головного мозга [94]. Исследование биохимических маркеров нарушения проницаемости ГЭБ может быть актуально для практикующих врачей-радиологов. Например, мониторинг сывороточной концентрации нейроспецифических белков, определение изоэффективных режимов радиотерапии или улучшение доставки лекарственных препаратов в ткани мозга посредством использования увеличения проницаемости ГЭБ после ИИ. Изучение передачи сигналов от одной клетке к другой после воздействия ИИ и эффектов радиоблучения на модель ГЭБ *in vitro* может быть полезны для исследования фундаментальных основ воздействия ИИ на живые объекты.

Глава 2. Материалы и методы

2.1 Клеточные методы

2.1.1 Характеристика модели ГЭБ *in vitro*

Исследование проницаемости ГЭБ на модели *in vitro* проводили на культуре клеток HUVEC, кокультивированных с аллогенными астроцитами. Модель ГЭБ *in vitro* была любезно предоставлена Н.Е. Волгиной. Подробная характеристика модели и способы получения отдельных компонентов изложены в работе [1]. Данная модель характеризуется параметрами, сходными с таковыми для эндотелиоцитов головного мозга, которые формируют ГЭБ [1,1].

2.1.2 Исследование функционирования щелевых контактов в культуре астроцитов крысы

Влияние различных доз облучения на функциональную активность межклеточных щелевых контактов астроцитов исследовали с помощью метода, разработанного Goldberg и соавт. [45] в некоторой модификации. Клетки метили двумя флуоресцентными красителями: гидрофильным цитоплазматическим красителем САМ (кальцеин-ацетоксиметил) с пиками поглощения и эмиссии 494 и 517 нм, соответственно, и гидрофобным красителем 1,1'-октадецил 3,3,3',3'-тетраметилиндокарбоцианин перхлорат (Dil) с пиками экстинкции и эмиссии 549 и 565 нм, соответственно. В клетке под действием неспецифических эстераз происходит гидролиз САМ до флуоресцентного кальцеина, который передается от клетки к клетке через щелевые контакты, не проходит через мембрану. Липофильный мембранный краситель Dil не проникает через щелевые контакты клеток. Распространение кальцеина от клеток, содержащих два флуорофора, красный (Dil) и зеленый (САМ) (донорные клетки), в окружающие неокрашенные (реципиентные) клетки свидетельствует о формировании между клетками функционально активных контактов, через которые передается зеленый краситель. САМ (Invitrogen, США) и Dil (Sigma-Aldrich, США) растворяли в диметилсульфоксиде

(hybridoma grade, Sigma) до концентрации 1 мг/мл (1 ммоль/л). Аликвоты стоковых растворов хранили при -20°C . Рабочие растворы красителей (10 $\mu\text{моль/л}$ раствор CAM и 5 $\mu\text{моль/л}$ раствор Dil) готовили в среде DMEM/F12 (среда Игла в модификации Дульбекко) без сыворотки. Блокатор щелевых контактов карбеноксолон (Sigma, США) (CBX)–растворяли в воде до концентрации 10 ммоль/л. Передачу CAM регистрировали на флуоресцентном инвертированном микроскопе Leica DM IL (Leica Microsystems, Германия) с фотокамерой Leica DFC 420 C и с помощью проточной цитофлуориметрии.

Культура донорных и реципиентных клеток была любезно предоставлена Н.Ф. Гриненко. Протокол приготовления и окраски культуры приведен ниже.

2.1.2.А Приготовление и окраска культур клеток

Донорные клетки. Окраска CAM: Клетки астроцитов крысы выращивали в среде DMEM/F12 с 10% FBS (фетальная бычья сыворотка во флаконах 25 см² до образования 80-90% монослоя. Далее ростовую среду удаляли, проводили промывку средой DMEM/F12 без сыворотки, добавляли 10 $\mu\text{моль/л}$ раствор CAM (2 мл/фл) и инкубировали 30 минут при 37°C во влажной атмосфере с 5% CO_2 . По окончании инкубации среду с красителем удаляли, клетки промывали 2 раза фосфатно-солевым буфером Дульбекко (DPBS) (Gibco, Life Technologies, США) и регистрировали флуоресценцию на флуоресцентном микроскопе (контроль окраски клеток CAM в монослое). Монослой промывали раствором версена (Gibco, Life Technologies, США) и проводили кратковременную обработку клеток раствором 0,05% Трипсин-ЭДТА (Gibco, Invitrogen, США). Как только клетки начинали отделяться друг от друга и отслаиваться от пластика, раствор полностью удаляли, клетки суспендировали в среде без сыворотки и осаждали центрифугированием при 150 g. Осадок клеток суспендировали в среде без сыворотки, и клетки подсчитывали в камере Горяева.

Окраска Dil: Меченные CAM клетки осаждали центрифугированием, проводили суспендирование в 5 $\mu\text{моль/л}$ растворе Dil (концентрация клеток при окраске Dil - 10^3 клеток/ $\mu\text{л}$) и инкубировали 10 минут при 37°C . Суспензию мече-

ных клеток центрифугировали 5-7 минут при 1000 150 g, супернатант удаляли, клетки ресуспендировали в среде без сыворотки; процедуру промывания клеток проводили дважды. Осажденные клетки, меченых CAM и Dil, суспендировали в ростовой среде DMEM/F12 с 10% FBS до концентрации $4,4 \cdot 10^4$ клеток/мл. Для контроля окраски регистрировали флюоресценцию меченых клеток с последующим совмещением флюоресценции CAM и Dil. Аликвоты суспензии донорных клеток по $2,2 \cdot 10^3$ клеток в 50 μ l переносили в пробирки и использовали для проведения эксперимента. Донорные клетки облучали и через 1 час после облучения с ними проводили эксперимент по передаче красителя. Опытные и контрольные клетки при проведении эксперимента находились в одинаковых условиях; образцы каждой пробы исследовали в трех повторах.

Реципиентные клетки. Клетки астроцитов крысы выращивали в среде DMEM/F12 с 10% FBS до образования монослоя во флаконах 75 см². Проводили удаление ростовой среды, клетки промывали DPBS, затем версенном и подвергали короткой обработке раствором 0,05% Трипсин-ЭДТА. Диссоциирующий буфер полностью удаляли, клетки суспендировали в ростовой среде DMEM/F12 с 10% FBS и осаждали центрифугированием. Осадок суспендировали в ростовой среде и подсчитывали клетки в камере Горяева. Нужно количество клеток осаждали центрифугированием, суспендировали в ростовой среде и готовили суспензию с концентрацией $2,2 \cdot 10^5$ клеток /мл. Для блокировки переноса красителя с помощью CBX донорные и реципиентные клетки предварительно инкубировали 30-60 минут в ростовой среде, содержащей 100 μ моль/л CBX, и далее в процессе всего эксперимента клетки постоянно находились в присутствии этой концентрации ингибитора.

2.1.2.Б Проточная цитофлуориметрия

Для совместного культивирования донорные и реципиентные клетки смешивали в соотношении 1: 100, используя высокую плотность засева. К аликвоте донорных облученных и контрольных клеток ($2,2 \cdot 10^3$ клеток в 50 μ l), окрашенных двумя флуоресцентными красителями CAM и Dil, добавляли $2,2 \cdot 10^5$ не-

окрашенных клеток (100 μ l приготовленной суспензии реципиентных клеток). Клетки осторожно перемешивали, суспензию переносили в лунку 96-луночной плашки (Greiner Bio-One) и культивировали при 37°C во влажной атмосфере с 5% CO₂. Распространение красителя от меченых CAM и Dil клеток к реципиентным клеткам в процессе эксперимента контролировали с помощью флуоресцентного микроскопа.

Через 5 часов после начала совместного культивирования клетки каждой пробы клетки обрабатывали раствором 0,25% Трипсин-ЭДТА, осаждали центрифугированием, суспендировали в 200 μ l ростовой среды и анализировали на проточном цитофлуориметрии Beckman MoFlo XDP (Becton Counter, США).

В работе изучали перенос флуоресцентного красителя CAM от донорных клеток, меченных Dil и CAM к реципиентным (немеченым).

Проточная цитометрия выполнялась на приборе Beckman MoFlo XDP (клеточный сортер). В работе использовали два лазера с длинами волн 488 нм и 561 нм. Лазер с длиной волны 488 нм использовался для регистрации событий по боковому и прямому светорассеиванию и для возбуждения флуоресцентного красителя CAM. Максимальное возбуждение флуоресцентного красителя возможно при длине волны 495 нм, максимальная флуоресценция приходится же на 515 нм.

Лазер с длиной волны 561 нм использовался для возбуждения флуоресцентного красителя Dil. Максимальное возбуждение флуоресцентного красителя возможно при длине волны 549 нм, максимальная флуоресценция приходится на длину волны 565 нм.

Первоначально осуществлялась регистрация событий по прямому и боковому светорассеиванию на двумерной гистограмме FSC-Height против SSC-Height. Height означает измерение интенсивности флуоресценции в линейном масштабе. Расставляли границы выбранной области и получали двумерную гистограмму FSC-Height против FSC-Area. При этом Area - площадь флуоресценции. Используя эту гистограмму, мы имели возможность отличить одинарные клетки от кле-

точных дуплетов или слипшихся клеток. На гистограмме они выходят за область линейной зависимости.

Расставляли границы выбранной области и получали двумерные гистограммы FL1-Log_Height/FL2-Log_Height для флуоресцентного красителя CAM и FL12-Log_Height/FL13-Log_Height для флуоресцентного красителя DiI. Log_Height означает измерение интенсивности флуоресценции в логарифмическом масштабе.

Комбинация светофильтров прибора дает пропускание следующих длин волн к ФЭУ: на канал FL1 попадает флуоресценция с длинами волн 515-543 нм, FL2 – 563-588 нм, FL12 – 559-592 нм, FL13 – 612-638 нм, что соответствует спектральным характеристикам используемых флуоресцентных красителей.

Для статистической обработки набиралось по 20 тысяч событий, после на двумерных диаграммах FSC-Height/SSC-Height и FSC-Height/FSC-Area.

2.2 Экспериментальные животные

2.2.1 Характеристика и условия содержания

Эксперименты были проведены на 84 белых беспородных самцах крыс, весом 200 ± 20 г, возраст на начало эксперимента составил 2 месяца. Крысы были предоставлены Исследовательским центром биомедицинских технологий РАН. Животные были разделены на 8 групп. Крыс содержали в условиях лабораторного вивария в клетках по 8 особей в каждой при режиме день/ночь равный 12 часам на стандартной диете, содержащей сухой и мокрый корм, со свободным доступом к воде. Условия содержания крыс и все экспериментальные процедуры соответствовали международным правилам обращения с животными (Директива 20106/63/EU от 22 сентября 2010 г.).

2.2.2 Подготовка биологического материала

Для исследования содержания GFAP в плазме крови крыс было проведено взятие крови из кончика хвоста животного. Крыса подвергалась обездвигиванию в рестейнере для лабораторных животных (OpenScience, Россия). Хвост помещался под ИК-лампу для кровенаполнения. Кончик хвоста обрезали на 1-2 мм. Далее отбирали по 1,0-1,5 мл крови в пробирки, обработанные гепарином, центрифугировали при 1000 g в течение 5 минут. Плазму отбирали, замораживали при -20°C и хранили до проведения исследования.

Для получения срезов мозга для проведения ИГХ-анализа крыс умерщвляли путем декапитации с предварительной прижизненной фиксацией органов 4% параформальдегидом. После глубокой наркотизации путем интраперитонеального введения 5% кетамина (100 мг/кг) крысу фиксировали на операционном столике. Вскрывали грудную и брюшную полости, накладывали зажим на брюшную аорту. Далее выпускали кровь из сердца путем вскрытия ушка правого предсердия. В полость сердца через его верхушку вводили канюлю, присоединенную к шприцу Жане. Перфузия головного мозга начиналась с введения 100 мл физиологического раствора и далее 100 мл 4% параформальдегида. Далее мозг извлекали и помещали в 4% параформальдегид и проводили пост фиксацию в течение 24 часов при +40°C. После чего приготавливали срезы толщиной 50 мкм с помощью замораживающего микротом (Leica, Германия). Срезы хранили в PBS с 0,09% азидом натрия при +4°C.

Взятие тканей мозга для ПЦР анализа в реальном времени проводили путем извлечения структур мозга на охлажденном столике после декапитации крыс с предварительной глубокой наркотизацией путем интраперитонеального введения 5% кетамина (100 мг/кг).

2.2.3 Внутривенное введение препаратов меченых антител

Препараты первично меченых флуоресцентными красителями Alexa Fluor 488 и Alexa Fluor 660 антител вводили животным с облучением дозой 6Гр*6 фракций на 10 неделе после облучения в бедренную вену. Предварительно жи-

вотных наркотизировали путем интраперитонеального введения кетамина (50 мг/кг) и реланиума (5 мг/кг), далее проводили подкожную инъекцию 0,1 мл атропина. Для обеспечения доступа к бедренной вене животное закрепляли на операционном столе, перед этой процедурой определяли глубину наркоза по выраженности моргательного и вибрисс рефлексов. Выполняли небольшой разрез в паховой области, отслаивали мышцы и фасции, открывая доступ к бедренной вене. Препараты вводили внутривенно инсулиновым шприцом в объеме 0,5-1 мл.

2.3 Протокол облучения

Облучение проводили на линейном ускорителе «PRIMUS» (Siemens) на базе НИИ нейрохирургии им. Н.И. Бурденко тормозным излучением 6 МэВ. Мощность дозы – 2 Гр/мин. Расстояние от источника излучения до плоскости, где располагались клеточные препараты или животные составляло 100 см. Размер квадратного поля на уровне изоцентра составлял 140 мм.

2.3.1 Облучение культур клеток

Облучение культур клеток проводили однократно для модели ГЭБ *in vitro* дозами 2, 4 и 6 Гр, для культур клеток астроцитов крысы использовались дозы 0,5, 2 и 6 Гр.

Для проведения иммуноцитохимического анализа клетки HUVEC облучали на покровных стеклах в 48-луночной планшете. Культуру клеток HUVEC высаживали на покровные стёкла ($2 \cdot 10^4$ кл/см²), покрытые раствором фибронектина-коллагена в небольшом объёме ростовой среды. По прошествии 12 часов объем среды увеличивали до 0,4 мл для 48-луночной плашки. Клетки HUVEC культивировали 2-3 дня до образования 70-80% монослоя.

Для проведения количественной ПЦР и иммуноблот анализа клетки HUVEC и астроциты облучали в культуральном матрасе. Для этого $8 \cdot 10^5$ клеток засеивали в культуральные пластиковые флаконы площадью 75 см² и культивировали 6 дней в среде DMEM/F12 с 10% FBS. За 24 часа до облучения клеток ростовую среду собирали и заменяли на свежую. Собранную среду фильтровали через

фильтр 0,22µm (Corning, Германия), добавляли глютамин (2mM) (Gibco, Life Technologies), хранили при +4°C и использовали как кондиционированную среду в процессе эксперимента.

В облученных культурах проводили замену ростовой среды на свежую с добавлением 20% собранной кондиционированной среды, и клетки продолжали инкубировать при 37°C. Через 2, 24 и 48 часов после облучения клетки обрабатывали раствором 0,05% Трипсин-ЭДТА и готовили пробы для анализа. Ростовую среду удаляли, монослой промывали DPBS 2 раза. Клетки обрабатывали раствором 0,05% Трипсин-ЭДТА, суспендировали в DPBS и осаждали центрифугированием. Супернатант удаляли и клетки дважды промывали DPBS. Для приготовления лизатов осадки клеток растворяли в RIPA буфере (150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0,1% додецилсульфат натрия, 0,5 % диоксихолата натрия 50 mM Tris pH=8,0, 5mM ЭДТА) (Sigma, США) с добавлением коктейля ингибиторов протеаз (ProteoBlock, Fermentas, США), перемешивали и инкубировали на льду в течение 5 минут. После этого клетки вновь тщательно перемешивали для более полного лизирования клеток, подвергали быстрой заморозке в жидком азоте и хранили при -196°C.

2.3.2 Облучение животных

Облучение проводилось без наркоза, для обеспечения необходимой иммобилизации животных, они помещались в рестейнеры DecapiCones (Braintree scientific, США). Крысы были помещены в форму из пенопласта, носами к центру поля, что позволило проводить облучение одновременно четверем животным (Рисунок 3). Граница поля, определяемая по полувысоте дозового распределения, проходила позади головного мозга с запасом 5 мм, что обеспечило облучение всего головного мозга у всех крыс. 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.

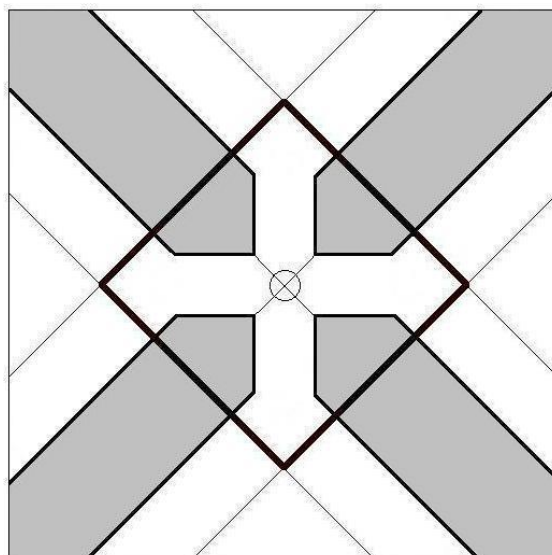


Рисунок 3. Схема формы из пенопласта, где осуществлялось облучение животных. Крысы были помещены в области, обозначенные серым цветом.

Крысы подвергались фракционированному облучению с одинаковой СОД, но различной БЭД в количестве 5 фракций в неделю (по данным ЛК-модели с $\alpha/\beta=3\text{Гр}$):

18 фракций с РОД=2Гр до СОД=36Гр, БЭД=36Гр;

9 фракций с РОД=4Гр до СОД=36Гр, БЭД=50,4Гр;

6 фракций с РОД=6Гр до СОД=36Гр, БЭД=64,8Гр.

Все расчеты проводились с использованием дозиметрических протоколов от Международного агентства по атомной энергии и после проверялись с помощью ионизационной камеры.

2.4 Иммунохимические методы

2.4.1 Иммуноцитохимический анализ

После облучения спустя 2, 24 и 48 часов клетки отмывали от DPBS, проводили фиксацию 4% параформальдегидом, 30 минут при $+4^{\circ}\text{C}$, после чего отмывали 3 раза. Проводили инкубацию культуры клеток с первичными антителами: 1-5 мкг/мл моноклональных антител к клаудину-5 (Invitrogen, США), Сх43 (антитела получены в лаборатории иммунохимии ФМИПЦН им.В.П.Сербского [3]) и одним

из видов поликлональных антител: к ZO-1 (Abcam, Великобритания), β -катенину (Invitrogen, США), VE кадгерину (Abcam, Великобритания), в течение 18 часов при $+4^{\circ}\text{C}$, отмывали и добавляли антивидовые антитела в соотношении 1:500, конъюгированные с Alexa Fluor 488 и Alexa 594 (Invitrogen, США). Отмывки проводили буфером PBS (pH 7,4) с 0,2% Твин-20, 0,2% Triton X и 1% нормальной сыворотки козы. Ядра были окрашены DAPI (Invitrogen, США).

После иммуноцитохимического окрашивания покровные стекла монтировали на предметные стекла при помощи 80% глицерина и хранили при -20°C . Анализ связывания антител с клетками HUVEC и со срезами мозга животных проводили на сканирующем лазерном конфокальном микроскопе Nikon (Japan).

2.4.2 Иммуноблот анализ

Экстракцию белков проводили путем лизиса клеток астроцитов крысы буфером RIPA (150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0,1% додецилсульфат натрия, 0,5 % диоксихолата натрия 50 mM Tris pH=8,0, 5mM ЭДТА), в который были добавлены ингибиторы протеаз (ProteoBlock, Fermentas). Далее проводили белковый электрофорез в полиакриаамидном геле, для этого был подготовлен 12% разделяющий гель. С использованием модуля для «мокрого» переноса Bio-Rad (США) проводили перенос белков с геля на поливинилиденфторидную мембрану. Блокирование неспецифического связывания осуществляли путем инкубации мембраны в PBS с 5% сухим молоком при $+4^{\circ}\text{C}$ в течение ночи. Далее мембрану инкубировали с первичными моноклональными антителами к Cx43 (MabCx43), полученными в лаборатории иммунохимии ФГБУ «НМИЦ ПН им.В.П.Сербского», и с антителами к β -актину (Abcam, Великобритания) в качестве референсного белка в количестве 0.5 $\mu\text{g}/\text{мл}$ в течение часа при комнатной температуре, отмывали троекратно PBS с 0,5% Tween. Первичные антитела проявляли антивидовыми антителами к Fab-фрагменту иммуноглобулинов мыши (A3682, «Sigma», США) в разведении 1:100000. Далее снова проводили отмывку по вышеуказанной методике. Проявление осуществляли методом хемилюминесценции с помощью набора ECL Advance Western Blotting Detection Kit («GE Healthcare», Великобритания) по методике

фирмы - производителя. Детекцию проводили при помощи прибора ImageQuant LAS 4000 («GE Healthcare», Великобритания). Анализ полученных изображений проводили при помощи программы Gel Analyzer.

2.4.3 Иммуногистохимический анализ

Срезы мозга толщиной 50 мкм помещали в раствор с первичными антителами MabVEGF и RabGFAP (антитела получены в лаборатории иммунохимии ФГБУ «НМИЦ ПН им. В.П. Сербского»), в разведении 1:200 для MabVEGF и 1:1000 RabGFAP при концентрации 1 мг/мл и 0,1 мг/мл соответственно и инкубировали при температуре 40⁰С в течение 18 часов. Далее отмывали троекратно раствором PBS с 0,2% Твин-20 и 0,2% Тритоном. Далее инкубировали с антивидовыми антителами козы к иммуноглобулинам мыши, мечеными Alexa 488 (Invitrogen, США) и к иммуноглобулинам кролика, мечеными Alexa 594 (Invitrogen, США) в разведении 1:500 в течение 1 часа. После чего проводили отмывку аналогичным образом. Ядра клеток докрашивали DAPI (Invitrogen, США), добавляя его в разведении 1:1000 в PBS с 0,2% Твин-20 и 0,2% Тритоном к срезам мозга после последней отмывки. Далее срезы монтировали на предметные стекла, покрывали 80% глицерином и хранили при -20⁰С.

Анализ проводили на конфокальном микроскопе Nicon (Japan). Интенсивность флюоресценции была измерена при помощи программного обеспечения для конфокального микроскопа NIS Elements.

2.4.4 Иммуноферментный анализ (Сэндвич-вариант)

Для определения GFAP в сыворотке крови использовался сэндвич-вариант твердофазного иммуноферментного анализа, который выполняли по следующему протоколу. Сначала проводили активацию полистироловой планшеты моноклональными анти-GFAP антителами (MabGFAP), полученными в лаборатории иммунохимии ФМИПЦН им. В.П. Сербского. В полистироловый планшет (Costar, USA) вносили по 50 мкл раствора антител (10 мкг/мл) в 0,1 М бикарбонатном буфере (pH 9,6) и инкубировали при +4⁰С в течение 18 часов. Далее антитела 3-хкратно отмывали PBS с 0,5% Твин-20 с помощью восьмиканального промывателя

планшетов (Bio-Tek Instruments, США). В ячейки вносили по 25 мкл исследуемого образца плазмы крови, разведенной в 2 раза PBS с 0,5% Твин-20, и инкубировали при комнатной температуре один час, после чего троекратно отмывали. Далее вносили по 50 мкл раствора поликлональных анти-GFAP антител (PabGFAP), полученных в лаборатории иммунохимии ФГБУ «НМИЦ ПН им.В.П.Сербского», в PBS с 0,5% Твин-20 (0,1 мкг/мл), предварительно инкубированными в течение 30 минут в 0,2% растворе плазмы крови крысы в PBS, разведенной в растворе PBS с 0,5% Твин-20. Инкубацию с Pab GFAP проводили один час при комнатной температуре, после чего троекратно отмывали. Далее вносили по 50 мкл антител козы к иммуноглобулинам кролика, конъюгированных с пероксидазой хрена (Goat antirabbit IgG-HRP, Sigma). Инкубировали при комнатной температуре один час, после чего троекратно отмывали. Для определения активности фермента вносили по 50 мкл субстратной смеси с ТМБ (Ready-to-use, Invitrogen, США). Реакцию останавливали добавлением 50 мкл 0,1 н HCl. Оптическую плотность раствора определяли с помощью Victor™ x3 Multilabel plate reader (Perkin Elmer, США). По данным оптической плотности с помощью калибровочной кривой вычисляли количественное значение концентрации GFAP.

В результате была построена калибровочная кривая — график зависимости оптической плотности раствора от концентрации антигена в исследуемом образце (Рисунок 4). Наблюдалась линейная зависимость оптической плотности (OD) от концентрации GFAP (в диапазоне 0,05 до 50 нг/мл).

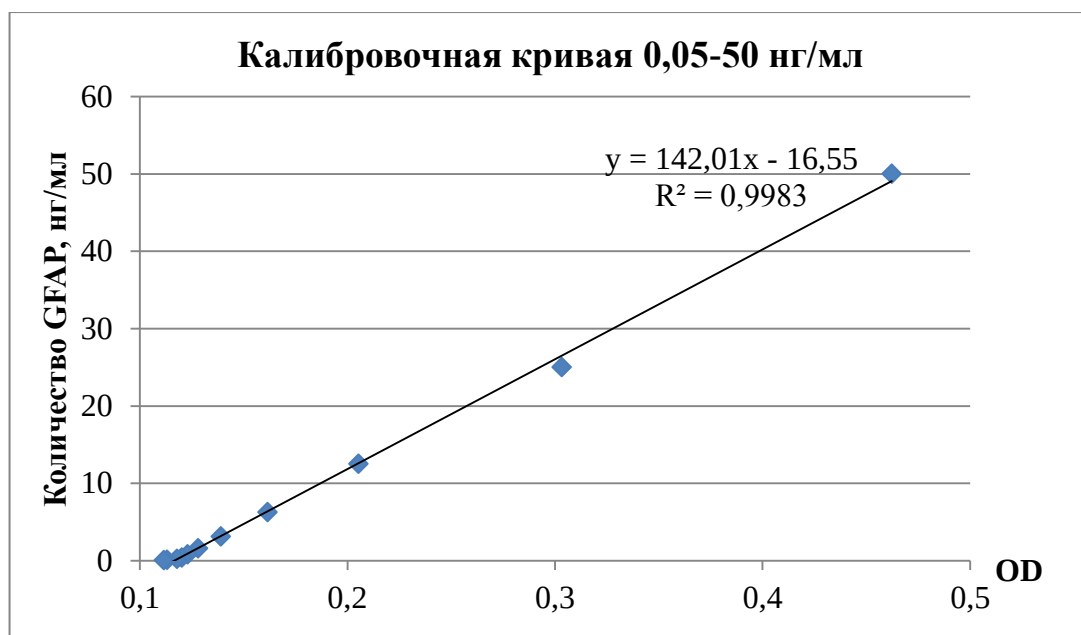


Рисунок 4. Калибровочная кривая иммуноферментной тест-системы определения GFAP (Сэндвич вариант ИФА)

С учетом необходимости определения низких уровней GFAP в плазме крови для получения более точных результатов использовали участок прямой от t 0 до 1,5 нг/мл (Рисунок 5). В качестве нулевой точки было выбрано значение оптической плотности при добавлении нормальной плазмы, отцентрифугированной через фильтр 30 кДа.

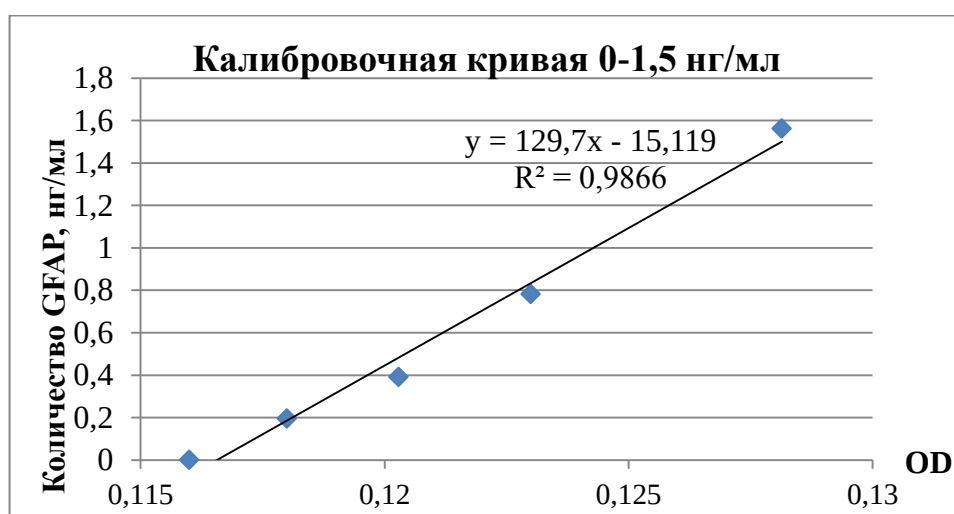


Рисунок 5. Калибровочная кривая иммуноферментной тест-системы определения GFAP (Сэндвич вариант ИФА)

Далее проводили оценку разработанной тест-системы на специфичность, точность, надежность и воспроизводимость.

Проверка тест-системы на специфичность

Крайне важным элементом на этапе разработки тест – системы является исключение неспецифической сорбции ее компонентов. Специфичность тест-системы - это ее способность выявлять в анализируемых смесях только то вещество, для определения которого эта система разрабатывалась. Среди веществ, на которые может реагировать вновь созданная иммуноферментная система, можно выделить:

1) Вещества, чрезвычайно сходные по своим физико-химическим свойствам и химической характеристике с основным веществом (на которое разрабатывалась система). Как правило, они способны непосредственно реагировать с АТ или их фрагментами.

2) Вещества, не реагирующие с антителом или его фрагментами непосредственно, но способные оказывать влияние на реакцию антиген-антитело.

Высокая специфичность тест-систем достигнута путем применения моноклональных анти-GFAP антител. Поликлональные GFAP антитела очищены на иммуносорбенте (GFAP-CN-Bg сефароза). Все антисыворотки, полученные от кроликов, иммунизированных GFAP, а также супернатанты гибридом, содержащих MabGFAP протестированы на специфичность иммуногистохимическим методом. Очистка антител на иммуносорбенте позволила практически исключить возможность неспецифических взаимодействий между рабочими компонентами тест-системы.

Проверка тест-системы на точность и воспроизводимость

Точность тест- системы определяется степенью воспроизводимости получаемых результатов при анализе одной и той же пробы как в одной, так и в различных опытных постановках. При нескольких постановках проб в различных кон-

центрациях стандартная ошибка среднего составила не более 5%, что говорит о высокой точности разработанной тест-системы (Таблица 1).

Таблица 1. Описательная статистика определений оптической плотности при различных разведениях антигена с помощью разработанной тест-системы

Концентрация GFAP (нг/мл)	Число определений	Средняя OD450	Доверительный интервал ($\alpha=0,05$)	Стандартное отклонение	Стандартная ошибка	Стандартная ошибка среднего, %
100	7	0,785	0,0506	0,0682	0,0258	3,29%
50	7	0,462	0,0267	0,0359	0,0136	2,94%
25	7	0,303	0,0172	0,0232	0,0088	2,89%
12,5	7	0,205	0,0106	0,0143	0,0054	2,63%
6,25	7	0,162	0,0104	0,0140	0,0053	3,28%
3,125	7	0,139	0,0082	0,0111	0,0042	3,01%
1,5625	7	0,128	0,0082	0,0111	0,0042	3,28%
0,78	7	0,123	0,0066	0,0089	0,0034	2,75%
0,39	7	0,120	0,0056	0,0075	0,0028	2,36%
0,195	7	0,118	0,0071	0,0096	0,0036	3,08%
0,098	7	0,113	0,0051	0,0069	0,0026	2,31%
0,049	5	0,111	0,0057	0,0065	0,0029	2,59%
0	6	0,117	0,0051	0,0064	0,0026	2,21%

Проверка тест-систем на надежность.

Надежность тест-системы определяется по степени отклонения количественного результата, полученного с ее помощью, от заранее известного истинного значения.

Проверку надежности принято осуществлять с помощью тестов на «открытие» и «параллелизм».

1. Тест на "открытие" (тест возврата)

К стандартным образцам плазмы с известным содержанием определяемого при помощи данной тест-системы вещества прибавляют различные концентрации этого вещества и измеряют его суммарные концентрации. Надежность тест-системы считают удовлетворительной, если полученная при помощи тест-системы концентрация не превышает 10 % от внесенной. Разработанная тест-система соответствует и этому критерию (Таблица 2).

Таблица 2. Тест возврата

Концентрация GFAP, нг/мл	Полученная концентрация	Количество повторов	Фактическая концентрация (% от ожидаемой)
15	14,30	4	4,64%
5	5,42	4	7,75%
2	2,11	4	5,22%

2. Тест на "параллелизм".

Данный тест заключается в сравнении кривых зависимости концентрации определяемого вещества от оптической плотности получаемых при анализе разведений стандартных образцов самого вещества. О надежности тест-системы говорят в том случае, если кривая зависимости концентрации определяемого вещества в различных разведениях плазмы от оптической плотности является параллельна подобной кривой для разведения стандартных образцов (Рисунок 6).

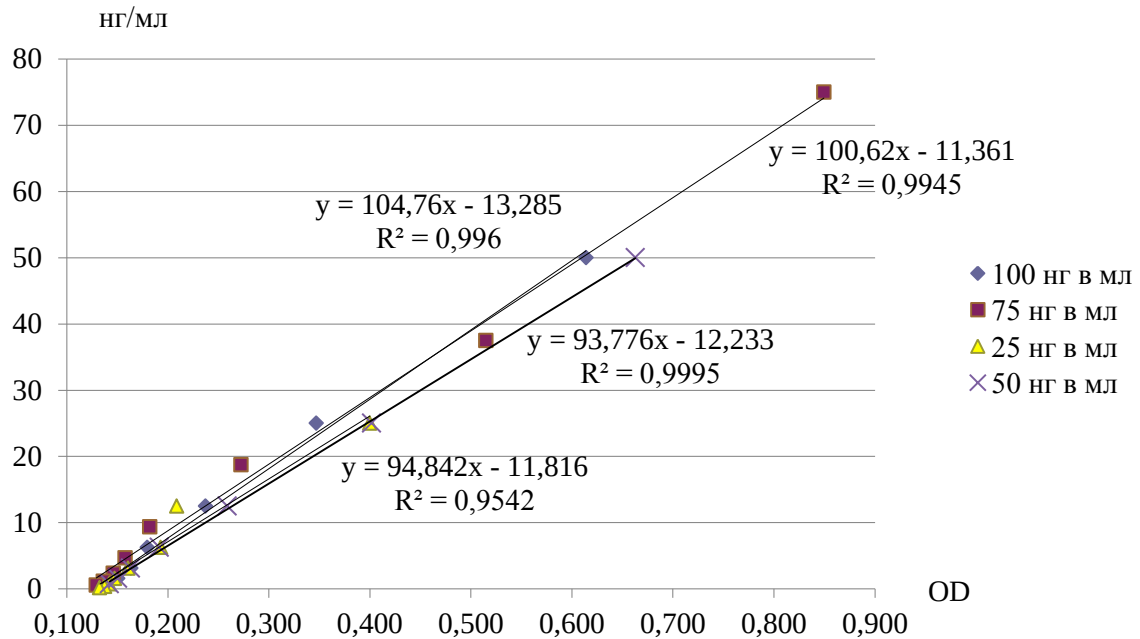


Рисунок 6. Кривые зависимости разведений антигена от оптической плотности при разных изначальных разведениях образца

При сравнении данных кривых при помощи дисперсионного анализа значение критерия Фишера составило $F=0,7$, что соответствует вероятности 0,42. Следовательно, кривые не отличаются между собой.

Таким образом, полученные результаты позволяют характеризовать полученную тест-систему для определения GFAP в плазме крови как высокоспецифичную, обладающую высокой воспроизводимостью, точностью и надежностью.

2.4.5 Конъюгация препаратов антител с флуоресцентной меткой

Для получения IgG, MabVEGF и MabGFAP, первично меченных флуоресцентным красителем Alexa Fluor 488 и Alexa Fluor 660 (Molecular Probes®, США), имеющим длину волны возбуждения/эмиссии 663/690 и 495/519 соответственно, использовали набор Alexa Fluor Protein Labeling Kit (Invitrogen, США). Поскольку конъюгация флуоресцентного красителя происходит через аминокислотные группы, важно очистить препараты антител от низкомолекулярных примесей, содержащих в своем составе амины. Поэтому до связывания препараты антител диализовали в 500 мл PBS 4 раза в течение 20 минут. Далее антитела концентрировали в центрифужном концентраторе Amicon Ultra с диаметром пор 30 кДа (Millipore, США) до

получения концентрации 2 мг/мл со скоростью 500g на центрифуге (Eppendorf, Германия) при +4С в течение 1-1,5 часов. Связывание проводили по протоколу фирмы-производителя. В 500 мкл раствора антител с концентрацией 2 мг/мл добавляли 50 мкл бикарбонатного буфера и 100 мкг красителя (Alexa Fluor 488 или Alexa Fluor 660) и инкубировали в течение часа при комнатной температуре. После чего проводили отделение связавшихся антител от свободного красителя путем гель-фильтрации, используя гель Biorad BioGel P-30 Fine (Molecular Probes®, США).

2.4.6 Исследование деградации в крови меченых антител

При анализе деградации в крови меченных Alexa Fluor 488 антител IgG и Mab GFAP использовали следующую последовательность действий:

1. Связывание IgG и Mab GFAP с Alexa Fluor 488
2. Измерение интенсивности флуоресценции при помощи флуориметра VICTOR™ X3 Multilabel Plate Reader (Perkin Elmer, США) в полученных образцах в различных разведениях
3. Разведение меченых антител в плазме крови с учетом обнаружения 5% потери флуоресценции
4. Инкубация в плазме крови, забор проб на сроках 18, 24, 48 и 72 часа
 - Измерение интенсивности флуоресценции в образце
 - Центрифугирование в центрифужном концентраторе Amicon Ultra с диаметром пор 30 кДа (Millipore, США) со скоростью 2500 g на центрифуге Eppendorf Minispin (Германия) при комнатной температуре в течение 7 минут (Alexa Fluor 488 – 0,7 кДа)
 - Измерение интенсивности флуоресценции низкомолекулярных компонентов в растворе, прошедшем через мембрану

2.5 Количественный ПЦР-анализ

1. Выделение тотальной РНК из образцов клеток HUVEC и тканей мозга осуществляли при помощи TRIzol Reagent (Invitrogen, США) по протоколу фирмы-производителя. Выделение РНК проводили при комнатной температуре. Образцы тканей (около 30 мг) и клеток ($5 \cdot 10^6$) гомогенизировали в 1 мл раствора TRIzol Reagent и оставляли на 5-10 минут при комнатной температуре. Далее добавляли 200 мкл хлороформа, встряхивали и оставляли на 2-3 минуты. После чего центрифугировали 15 мин при 16000 g на центрифуге Eppendorf (Германия) при $+4^{\circ}\text{C}$. Отбирали водную фазу и переносили в стерильную пробирку. Добавляли равный объем изопропанола и оставляли на 5 минут. Далее центрифугировали на 11000 g в течение 10 минут. Осадок отмывали 1 мл 75% этанола и центрифугировали при 6300 g в течение 5 минут. Осадок просушивали и растворяли в 50 мкл воды, очищенной от РНКаз, и прогревали 10 минут при $+60^{\circ}\text{C}$. Отбирали аликвоты по 5 мкл и измеряли концентрацию РНК с помощью прибора Nanovue Plus (GE Healthcare, США).

2. Обработку ДНКазой осуществляли путем добавления в образцы ДНКазы с буфером, содержащим MgCl_2 (Thermo Scientific, США), прогревали при температуре 37°C в течение 30 минут, далее добавляли 1 мкл ЭДТА и прогревали 10 минут при $+65^{\circ}\text{C}$.

3. Реакцию обратной транскрипции осуществляли при помощи набора «Евроген» для синтеза первой цепи кДНК на матрице РНК по протоколу фирмы-производителя (MMLV kit, Евроген, Россия). Готовили смесь, состоящую из следующих компонентов (на 1 реакцию): 4 мкл 5 кратного буфера для синтеза первой цепи, 2 мкл DTT (дитиотреитол) (20 ммоль/л), 2 мкл dNTP (дезоксинуклеозидтрифосфат), 2 мкл случайного декануклеотидного праймера (20 мкмоль/л), MMLV ревертаза (обратная транскриптаза вируса лейкемии мышей) 1 мкл (100 ед/мкл). Далее добавляли 1000 нг РНК-матрицы в объеме 9 мкл. Реакцию проводили при температуре 37°C в течение 1 часа.

4. ПЦР в реальном времени проводили на амплификаторе Step One Plus (Applied Biosystems, США) с использованием готовой смеси для ПЦР qPCRmix-NS SYBR+HighROX (Евроген, Россия). Постановку реакции осуществляли по протоколу фирмы-производителя.

В каждую лунку вносили по 9 мкл смеси 5X буфера qPCRmix-NS SYBR+HighROX (2мкл), воды, очищенной от РНКаз (5мкл) и смеси праймеров (2 мкл). Далее в каждую лунку вносили 1 мкл ДНК-матрицы с концентрацией 200 нг/мл.

Смесь праймеров готовили по следующей методике: форвард и реверс праймеры разводили водой, очищенной от РНКаз, до 100 мкМ и к 90 мкл воды, очищенной от РНКаз, добавляли по 5 мкл раствора каждого праймера. Нуклеотидные последовательности праймеров приведены в таблице 3, их подбирали при помощи программы Primer Blast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>). При анализе экспрессии белков плотных и адгезивных контактов на модели ГЭБ *in vitro* в качестве референса использовали ген *HPRT1*, кодирующий гипоксантин фосфорибозилтрансферазу 1. Референсным геном при анализе экспрессии *Cx43* в культуре клеток астроцитов крысы был выбран β -актин. Референсным геном при анализе генов *VEGF*, *GFAP* в тканях мозга крыс был выбран *GAPDH*. Синтез праймеров осуществлялся компанией Евроген (Россия).

Протокол проведения ПЦР в реальном времени: предварительная денатурация при температуре 95°C 5 минут, далее 40 циклов амплификации:
денатурация при температуре 95°C 20 секунд,
отжиг праймеров при температуре 55°C 1 минута.

Относительный уровень экспрессии генов рассчитывали по следующей формуле: $2^{-\Delta\Delta C_t} \pm SD$ [79].

Таблица 3. Нуклеотидные последовательности праймеров для постановки ПЦР в реальном времени

Праймер	Нуклеотидная последовательность
VE-кадгерин	
- прямой	TCTACTCCTTATCCCTTGGTTT
- обратный	ATGAGTGGGTTTGGACATTG
β -катенин	
- прямой	ATGAGGACCTATACTTACGA
- обратный	CTTATTACTAGAGCAGACAGATA
Клаудин 5	
- прямой	TTAACAGACGGAATGA
- обратный	AAGCGAAATCCTCAG
ZO-1	
- прямой	ATTCCTTAGTGTCCAA
- обратный	CCTGAGCAGTATCTT
HPRT-1	
- прямой	GTCAGGCAGTATAATCCA
- обратный	GGCTTATATCCAACACTTC
Cx43	
- прямой	GCACTTGAAGCAGATTGAGAT
- обратный	ATGATGTAGGTTTCGCAGCAA
β -актин	
- прямой	ATGAGATGCGTTGTTACAGGAAG
- обратный	GTGGACTTGGGAGAGGACTG
VEGF	
- прямой	AAGACCGATTAAACCATGTCA
- обратный	ATGTCAGGCTTTCTGGATTA
GFAP	
- прямой	TAAGCGTCCATCCTCCTGTTTGAAAG
- обратный	ACACTAATACGAAGGCACTCCA
GAPDH	
- прямой	AAGTTCAACGGGCACAGTTCAA
- обратный	CTCCTGGAAGATGGTGATGG

2.6 Статистический анализ

При анализе экспрессии мРНК белков плотных и адгезивных контактов в облученных клетках монокультуры HUVEC или HUVEC, кокультивированных с астроцитами, использовался критерий Краскелла-Уоллисса и далее критерий Даннетта для post hoc анализа. Анализ экспрессии мРНК β -катенина на сроке 2 часа после облучения проводился при помощи критерия Манна-Уитни. Данные представлены как медиана $\pm$ квартиль.

В опыте по исследованию переноса красителя САМ при помощи проточной цитофлуориметрии при сравнении соотношений между процентом донорных и реципиентных клеток использовали критерий Фишера.

При исследовании тест-системы на точность и воспроизводимость использовалось вычисление стандартных показателей описательной статистики. В тесте на параллелизм – дисперсионный анализ (критерий Фишера).

При определении уровня GFAP в плазме крови крыс использовалось вычисление стандартных показателей описательной статистики. Сравнение уровня GFAP в плазме крови крыс с нормальным уровнем данного белка у здоровых животных проводился при помощи критерия Краскелла-Уоллисса и далее критерий Даннетта для post hoc анализа.

Исследование деградации меченых антител в крови проводилось при помощи вычисления стандартных показателей описательной статистики, а сравнение уровня флуоресценции на разных сроках проводилось при помощи критерия Бонферрони.

Анализ экспрессии генов проводился методом множественного сравнения при помощи критерия Краскела-Уоллисса для поиска межгрупповых различий и при помощи критериев Дункана и Даннетта для сравнения опытных групп с контролем при post hoc анализе. Для анализа наличия упорядоченности использовали критерий Джонкхиера-Терпстра. Данные представлены как медиана $\pm$ квартиль.

При сравнении интенсивности флуоресценции при иммунохимическом анализе использовали критерий Фишера.

Достоверными считались различия при $p < 0,05$. При статистической обработке данных использовалась программа STATISTICA 7.0 и Microsoft Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Редко ионизирующее фотонное излучение применяется в линейных ускорителях для лечения большинства опухолей головного мозга. С одной стороны, возникают позитивные эффекты такого воздействия, как гибель опухолевых клеток, но с другой стороны, облучение несет в себе вред для нормальных тканей и прежде всего для клеток, составляющих структуру ГЭБ [94]. В данной работе проводился анализ изучения биохимических маркеров нарушения проницаемости ГЭБ после воздействия редко ионизирующего фотонного излучения в экспериментах *in vitro* и *in vivo*. Схема проведенных экспериментов представлена на рисунке 7.



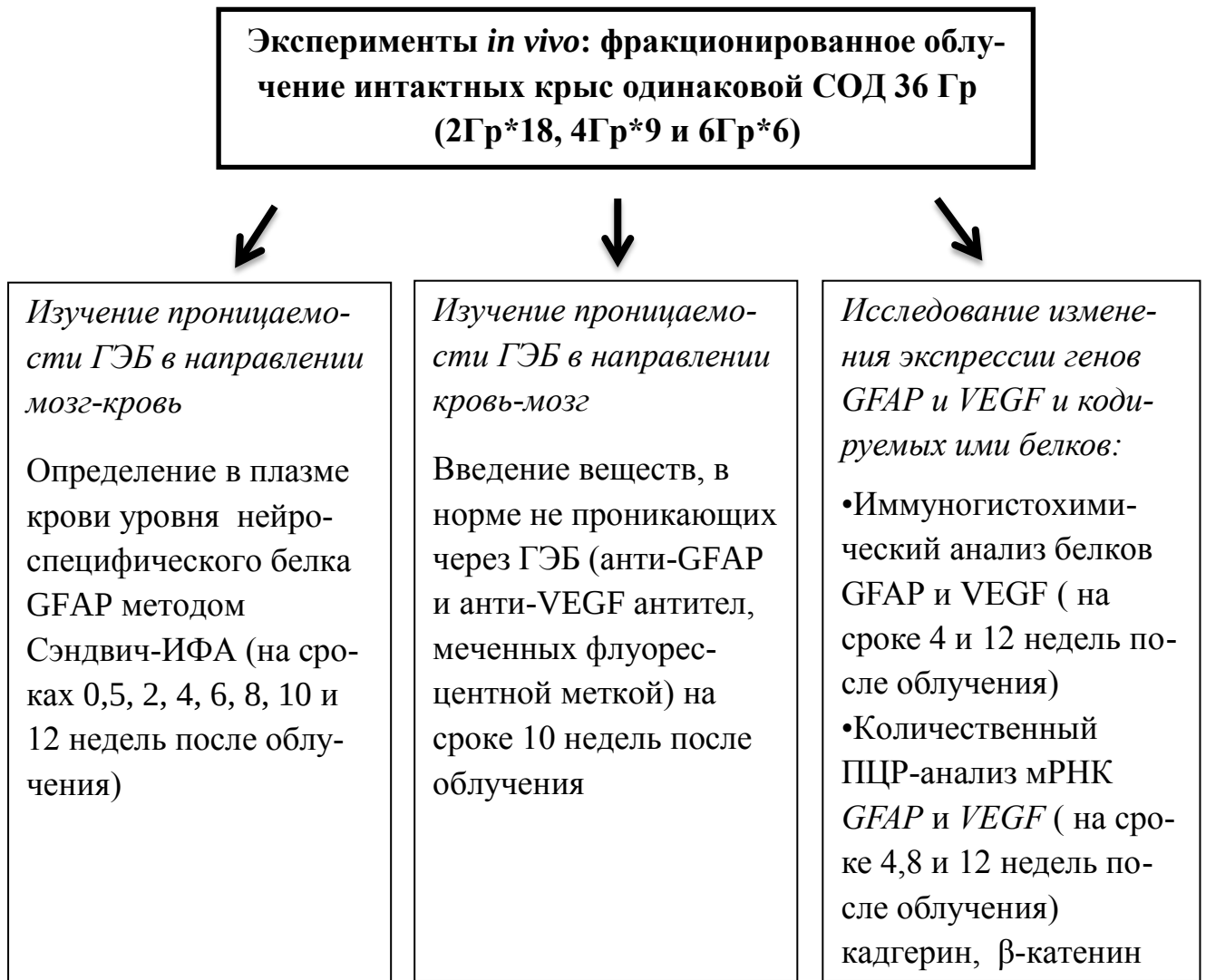


Рисунок 7. Схема проведенных экспериментов.

Глава 3. Эксперименты *in vitro*

Для экспериментов *in vitro* были выбраны два объекта исследования: культура клеток HUVEC с аллогенными астроцитами и астроциты крысы. На культивированных клетках проводили качественную и количественную оценку изменения экспрессии белков и генов адгезивных и плотных контактов, формирующих структуру ГЭБ, а также морфологический анализ эндотелиоцитов после облучения. На культуре астроцитов крысы было проведено изучение влияния облучения на щелевые контакты. Для этого был проведен эксперимент, по передаче красителя САМ, разработанный Goldberg и соавт. [45] в некоторой модификации, и по оценке экспрессии одного из основных белков щелевых контактов Сх43 и соответствующего гена.

3.1. Морфологический анализ клеток HUVEC

Для проведения исследования использовали модель ГЭБ *in vitro*, представляющую собой клетки пупочной вены человека, кокультивированные с аллогенными астроцитами.

В связи со сложностью доклинических испытаний на животных и с необходимостью оценки влияния различных факторов на проницаемость ГЭБ для лекарственных препаратов появилась потребность создания моделей для воспроизведения свойств ГЭБ *in vitro*. Такие модели должны иметь некоторые свойства: полноценно развитые плотные контакты, не позволяющие проходить через барьер высокомолекулярным веществам, экспрессия специфических транспортеров и белков, высокое трансэндотелиальное сопротивление [1]. Эндотелиоциты мозговых сосудов непосредственно контактируют с отростками астроцитарной глии. Это позволяет предположить, что астроциты являются важнейшим фактором для формирования барьерных свойств эндотелия. Это и происходит при имплантации астроцитов в области с изначально проницаемым эндотелием. В результате в этих участках сосудов повышается экспрессия белков межклеточных контактов [50,53]. Также важным параметром для выбора способа моделирования барьера является источник эндотелиальных клеток. В основном это первичные культуры эндотелиальных клеток, полученные из мозга млекопитающих: грызунов и крупного рогатого скота. Однако сложность их получения и короткий жизненный цикл клеток с сохранением их барьерных характеристик послужили началом создания и развития моделей, основанных на клетках не церебрального происхождения, например, клетках из пупочной вены человека. Несмотря на ряд недостатков и отсутствие свойств, характерных для клеток, обладающих барьерными свойствами, клетки HUVEC все же являются подходящей моделью для изучения цитоархитектуры и формирования межклеточных контактов [68].

Используемая в этом исследовании модель ГЭБ *in vitro*, основанная на приобретении клетками HUVEC барьерного фенотипа при совместном кокультивировании с аллогенными астроцитами, ранее применялась для оценки проницаемо-

сти различных фармакологических препаратов и показала свою пригодность в исследованиях, проведенных в нашей лаборатории [66].

В связи с вышеизложенным мы выбрали данную кокультуру клеток для анализа маркеров проницаемости ГЭБ после воздействия редко ионизирующего фотонного излучения.

При конфокальной микроскопии необлученной культуры клеток HUVEC, кокультивированных с аллогенными астроцитами, можно увидеть плотно сомкнутые клетки, при этом межклеточные промежутки отсутствуют. Это является характерным признаком формирования барьерного фенотипа эндотелиальных клеток. Монокультура не обладает такими характеристиками и представляет собой разрозненные клетки (Рисунок 8).

При иммуноцитохимическом анализе клеток после кокультивирования на мембране наблюдается яркая флуоресценция белков плотных (ZO-1, клаудин 5) и адгезивных контактов (VE кадгерин, β -катенин), а также характерная флуоресценция белка щелевых контактов Cx43 (Рисунок 8).

При облучении эндотелиоцитов дозами 2, 4 и 6 Гр исследовали изменение морфологии клеток и наличие межклеточных промежутков, изменение характера иммуноцитохимического окрашивания при анализе экспрессии белков плотных (ZO-1, клаудин 5) и адгезивных контактов (VE кадгерин, β -катенин), а также изменение экспрессии генов, кодирующих данные белки на сроках 2, 24 и 48 часов после облучения.

На всех сроках после облучения наблюдались изменения в морфологии клеток, возрастающие с увеличением дозы и срока, прошедшего после воздействия. Расстояние между клетками увеличивалось прямо пропорционально времени, прошедшему после облучения, однако зависимости от дозы выявлено не было.

Через 2 часа после облучения дозой 2 Гр морфология клеток не изменилась, при облучении дозами 4 и 6 Гр наблюдались веретенообразные клетки. На сроках 24 и 48 часов набухание ядер и увеличение клеток в объеме обнаружено при всех

исследованных дозах облучения. На сроке 48 часов после воздействия при облучении дозой 6 Гр были замечены многоядерные клетки, после облучения дозами 4 и 6 Гр – клетки с разрушенными ядрами, а также апоптотические клетки. При дозе 2 Гр такие клетки обнаружены не были.

Таким образом, радиационно-индуцированные деструктивные изменения в морфологии клеток нарастают с течением времени и увеличением дозы облучения. Культура перестает представлять собой плотно сомкнутые клетки, расстояния между ними увеличивается со сроком облучения, но данные изменения не зависят от дозы облучения. Все это свидетельствует о нарушении барьерных эндотелиальных клеток (Рисунок 9,10,11).

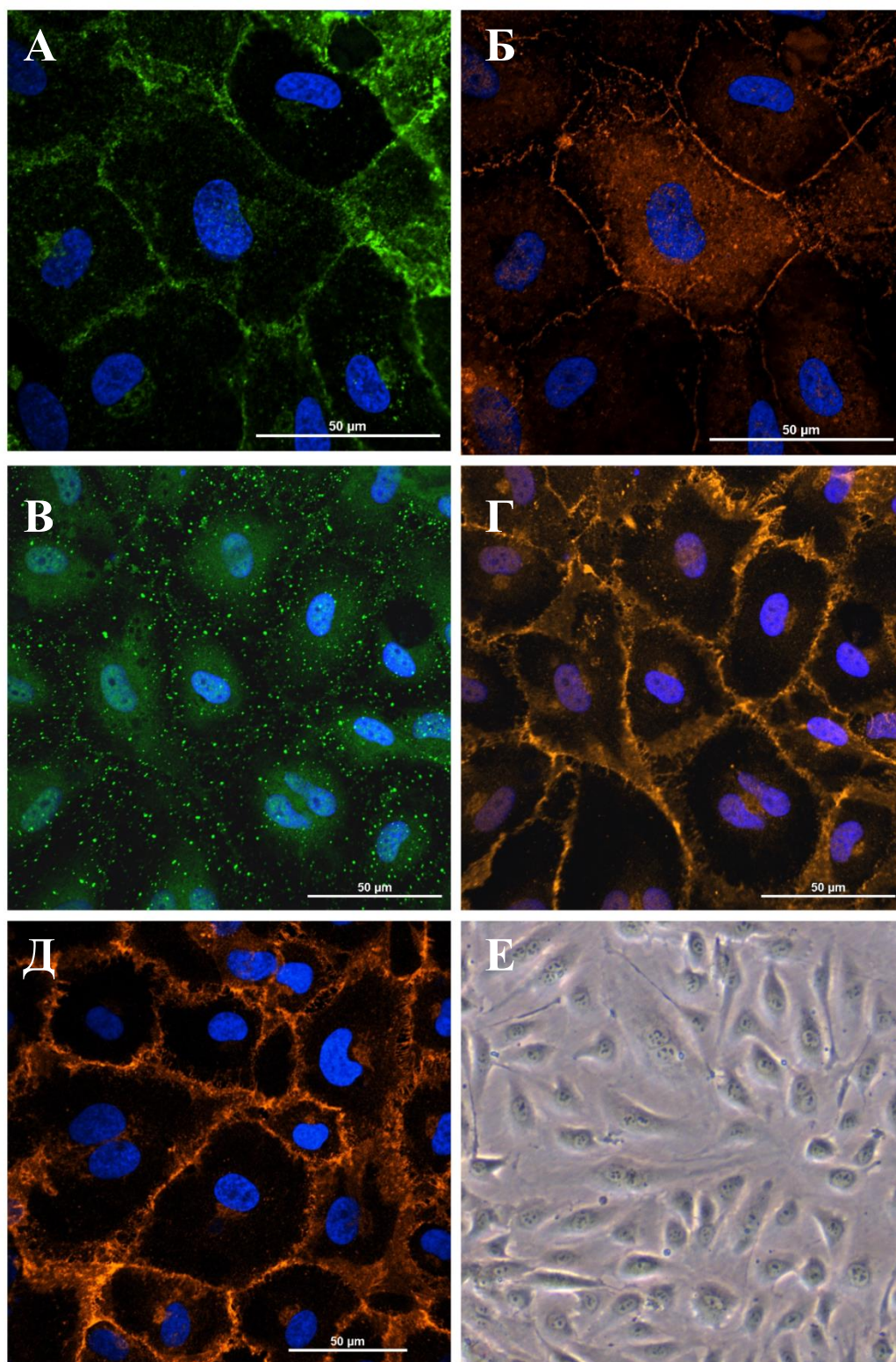


Рисунок 8. Иммуноцитохимический анализ клеток HUVEC, кокультивированных с астроцитами и световая микроскопия монокультуры HUVEC.

A- Mab клаудин 5 + Anti-mouse Alexa 488, Б- Pab ZO-1 + Anti-rabbit Alexa 594, В- Mab Cx43 + Anti-mouse Alexa 488, Г- Pab VE кадгерин + Anti-rabbit Alexa 594, Д- Pab β -катенин + Anti-rabbit Alexa 594, Е – монокультура клеток HUVEC

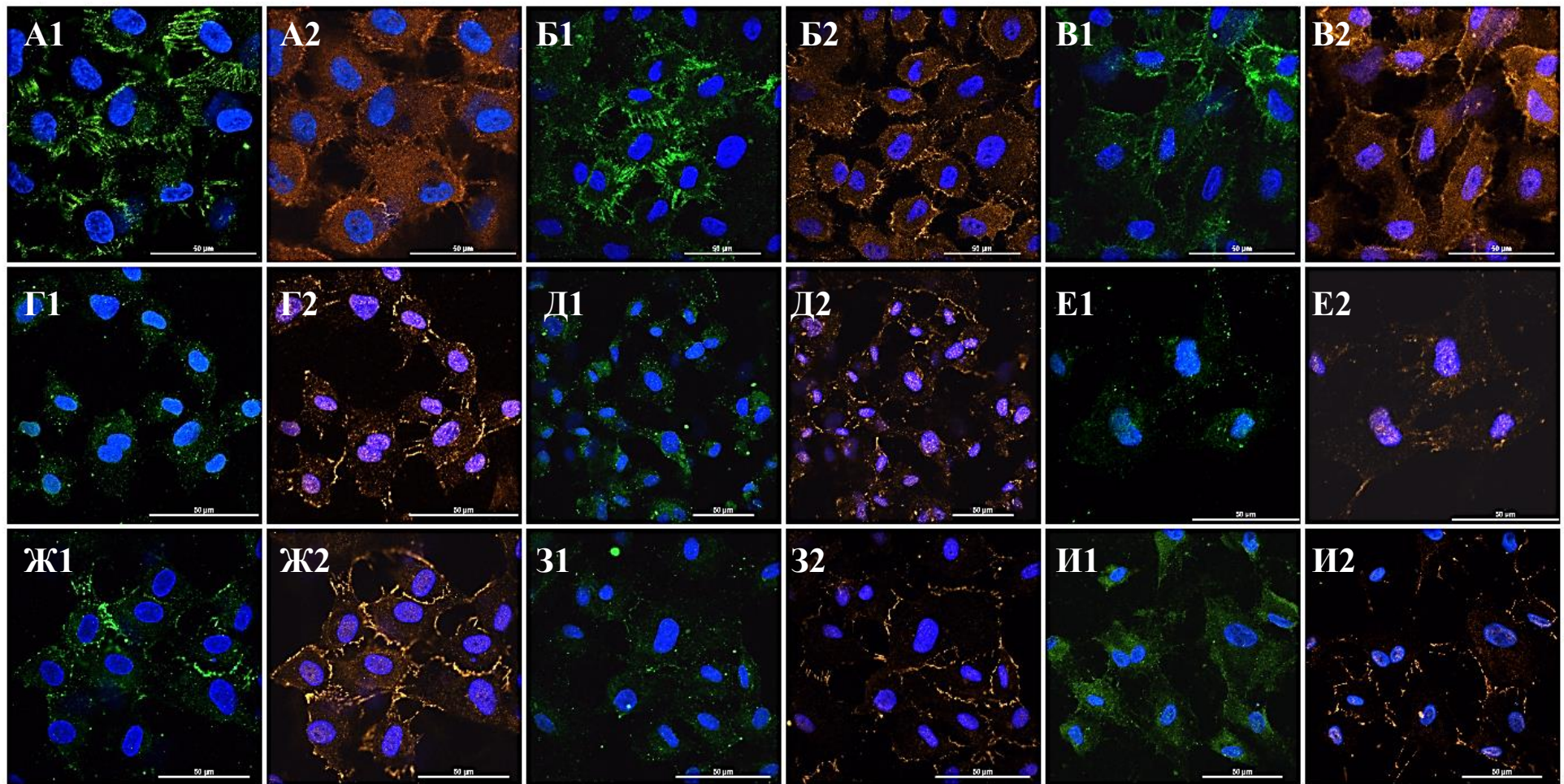


Рисунок 9. Иммуноцитохимический анализ HUVEC, кокультивированных с астроцитами, после облучения.

Зеленый - Mab клаудин 5 + Anti-mouse Alexa 488, Оранжевый – Rab ZO-1 + Anti-rabbit Alexa 594. А- 2Гр 2 часа, Б- 4Гр 2 часа, В- 6Гр 2 часа, Г- 2Гр 24 часа, Д- 4Гр 24 часа, Е- 6Гр 24 часа, Ж- 2Гр 48 часов, З- 4Гр 48 часов, И- 6Гр 48 часов. 50мкм

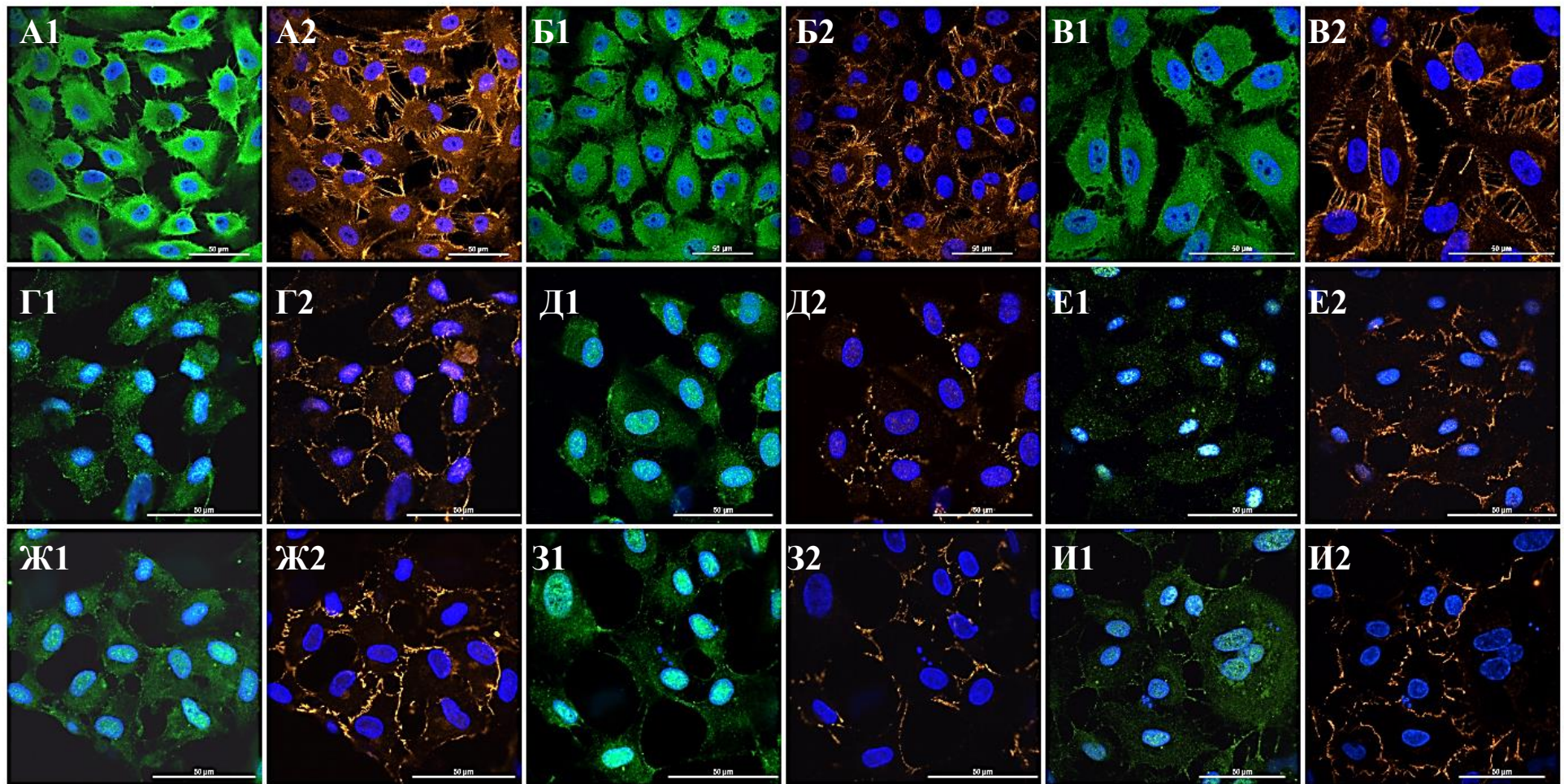


Рисунок 10. Иммуноцитохимический анализ HUVEС, кокультивированных с астроцитами, после облучения.

Зеленый – Mab Cx43 + Anti-mouse Alexa 488, Оранжевый- Pab VE кадгерин + Anti-rabbit Alexa 594. А- 2Гр 2 часа, Б- 4Гр 2 часа, В- 6Гр 2 часа, Г- 2Гр 24 часа, Д- 4Гр 24 часа, Е- 6Гр 24 часа, Ж- 2Гр 48 часов, З- 4Гр 48 часов, И- 6Гр 48 часов. 50 мкм

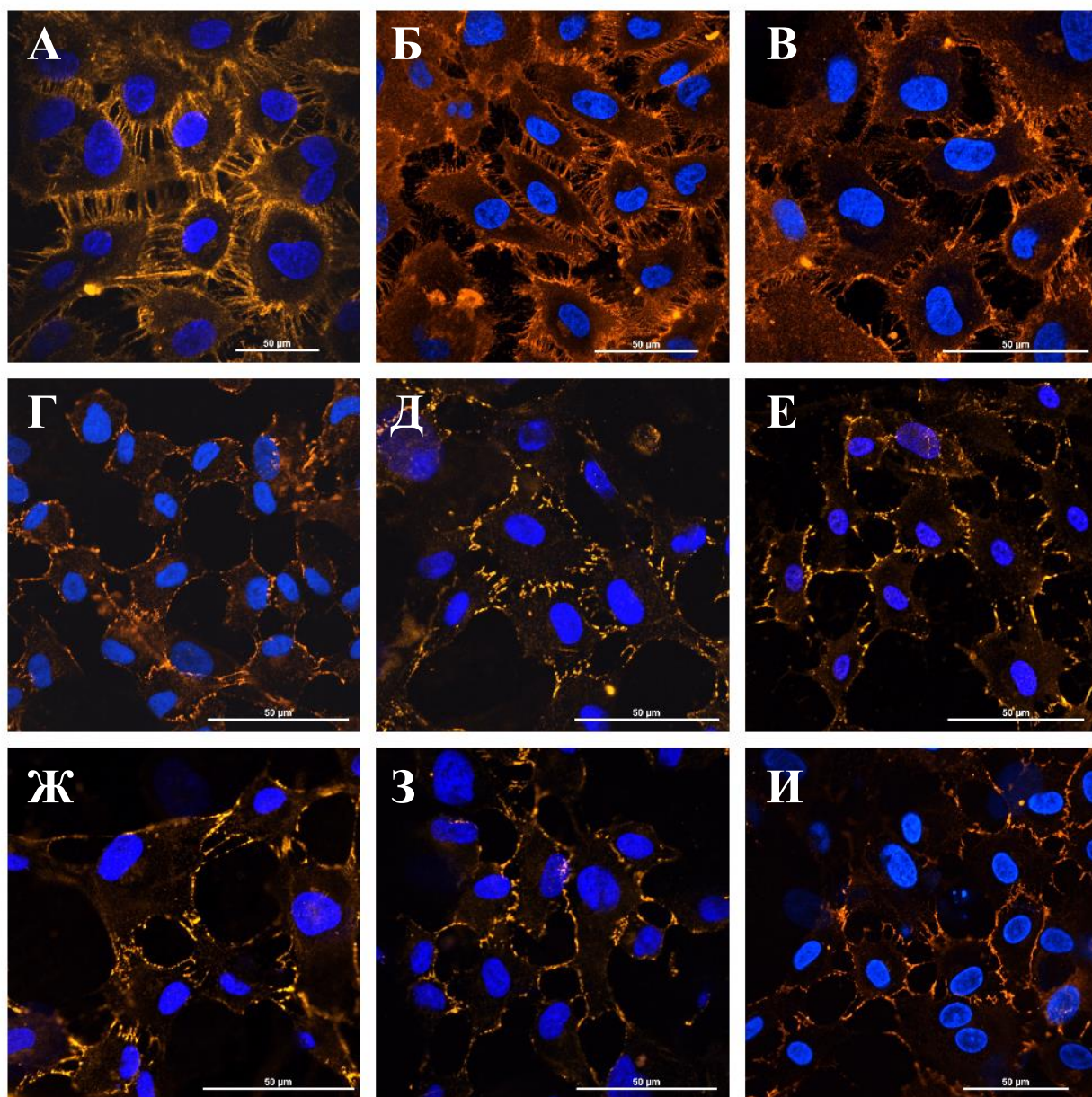


Рисунок 11. Иммуноцитохимический анализ β -катенина в клетках HUVEC, кокультивированных с астроцитами, после облучения.

А- 2Гр 2 часа, Б- 4Гр 2 часа, В- 6Гр 2 часа, Г- 2Гр 24 часа, Д- 4Гр 24 часа, Е- 6Гр 24 часа, Ж- 2Гр 48 часов, З- 4Гр 48 часов, И- 6Гр 48 часов. 50 мкм

3.2 Исследование изменения экспрессии белков плотных, адгезивных и щелевых контактов

Изучение механизмов проницаемости барьера на модели *in vitro* невозможно без оценки влияния облучения на его структурные компоненты, а именно белки межклеточных контактов. При иммуноцитохимическом анализе белков плотных контактов (ZO-1, клаудин 5) мы заметили уменьшение их экспрессии на мем-

бране и в цитоплазме клеток. Интенсивность флуоресценции снижается с увеличением времени, прошедшего после воздействия ионизирующего излучения. Через 48 часов после облучения белок ZO-1 в цитоплазме практически не обнаруживается, а мембрана прокрашена лишь частично. Однако различий в интенсивности флуоресценции между клетками, облученными тремя различными дозами, не выявлено (Рисунок 9).

Схожую картину уменьшения интенсивности флуоресценции на мембране и в цитоплазме клеток мы наблюдали при иммуногистохимическом анализе белков адгезивных контактов (VE кадгерин, β -катенин). Однако здесь наблюдается слабый дозозависимый эффект. После воздействия дозами 4 и 6 Гр клетки с полностью отсутствующей на мембране флуоресценцией белков адгезивных контактов обнаружены уже спустя 24 часа после облучения (Рисунок 10, 11).

При иммуноцитохимическом анализе Сх43, белка щелевых контактов, обнаружена зависимость снижения интенсивности флуоресценции от срока, прошедшего после облучения. Различий между дозами не выявлено (Рисунок 10).

Таким образом, при иммуногистохимическом анализе клеток HUVEC, облученных дозами 2, 4 и 6 Гр наблюдалось снижение экспрессии белков плотных, адгезивных и щелевых контактов с увеличением срока, прошедшего после воздействия ИИ, и показан слабый дозозависимый эффект.

3.3 Исследование изменения экспрессии мРНК белков плотных и адгезивных контактов

При количественном ПЦР-анализе генов плотных контактов (ZO-1, клаудин 5) показано снижение их экспрессии до уровня мРНК в монокультуре HUVEC после воздействия дозами 2 и 4 Гр на всех сроках после облучения (ZO-1: Критерий Краскела-Уоллиса: $H(9, N=34) = 24,68$ $p < 0,001$ – для всех групп, Критерий Краскела-Уоллиса: $H(8, N=25) = 0,00$ $p = 1,0$ – для групп 2Гр, 4Гр, HUVEC. клаудин 5: Критерий Краскела-Уоллиса: $H(9, N=44) = 31,13$ $p < 0,001$ – для всех групп, Критерий Краскела-Уоллиса: $H(6, N=30) = 10,14$ $p = 0,12$ – для групп 2Гр, 4Гр, HUVEC).

В клетках, облученных дозой 2 и 4 Гр, уровень мРНК *ZO-1* не отличался от экспрессии этого гена в монокультуре HUVEC и в кокультивированных с астроцитами клетках, не подвергшихся облучению. Для образцов, получивших дозу 6Гр, уровень экспрессии мРНК *клаудина 5* был достоверно выше такового в клетках монокультуры HUVEC и достоверно ниже, чем у кокультивированных клеток (Таблица 4, Рисунок 12).

Таблица 4. Достоверности отличий экспрессии генов плотных контактов.

	Экспрессия мРНК <i>ZO-1</i>		Экспрессия мРНК <i>клаудин 5</i>	
	Вероятности отличия от HUVEC	Вероятности отличия от кокультуры	Вероятности отличия от HUVEC	Вероятности отличия от кокультуры
Кокультура	0,04		<0,001	<0,001
2 Гр 2 часа	0,52	<0,01	0,42	<0,001
2 Гр 24 часа	0,08	<0,001	0,37	<0,001
2 Гр 48 часа	0,39	<0,01	0,7	<0,001
4 Гр 2 часа	0,33	<0,001	0,09	<0,001
4 Гр 24 часа	0,53	<0,01	0,12	<0,001
4 Гр 48 часа	0,35	<0,001	0,30	<0,001
6 Гр 2 часа	0,98	0,21	<0,05	<0,001
6 Гр 24 часа	0,97	0,19	<0,01	<0,001

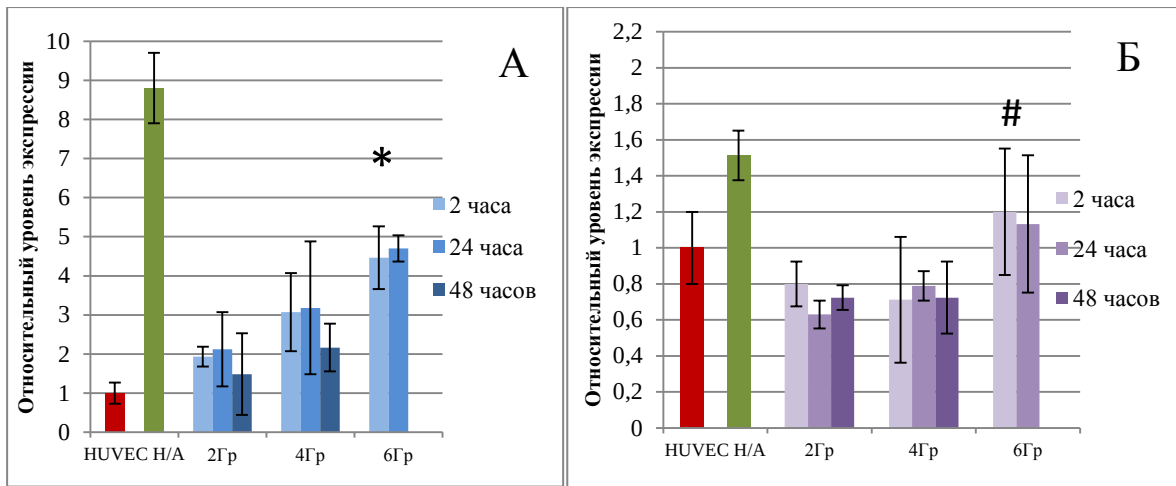


Рисунок 12. Количественный ПЦР-анализ генов белков плотных контактов в клетках HUVEC, кокультивированных с астроцитами, после облучения

А- клаудин 5, Б- ZO-1 * $p < 0,05$ по сравнению с группами 2Гр и 4Гр на всех сроках # $p < 0,05$ по сравнению с группами 2Гр и 4Гр на всех сроках и монокультурой HUVEC. H/A – HUVEC, кокультивированные с астроцитами

Далее проводили количественный ПЦР-анализ генов адгезивных контактов (*VE кадгерин*, β -катенин).

Показано снижение уровня мРНК *VE кадгерина* ниже такового в монокультуре клеток HUVEC после воздействия всех исследуемых доз ИИ на сроках 2 и 24 часа после облучения (Критерий Краскела-Уоллиса: $H(7, N=26) = 21,01$ $p < 0,01$). Различий между группами, которых подвергали облучению, обнаружено не было (Критерий Краскела-Уоллиса: $H(6, N=19) = 0,00$ $p = 1,0$).

Изменение уровня мРНК β -катенина на сроке 2 часа после облучения показало дозозависимый эффект (Критерий Краскела-Уоллиса: $H(7, N=31) = 19,79$ $p < 0,01$ – для всех групп). Так, в клетках, облученных дозой 6Гр, экспрессия была достоверно ниже, чем в клетках, получивших дозу 2 и 4 Гр ($p < 0,05$). На сроке 24 часа в образцах, подвергшихся воздействию дозами 4 и 6 Гр показано снижение экспрессии до 0,6 уровня монокультуры. Различий между группами, на которые действовали ИИ, не выявлено ($p > 0,05$). Также не обнаружено различий между клетками, облученными дозами 2 и 4 Гр ($p > 0,05$). Уровень мРНК β -катенина в клетках, после воздействия дозой 2 Гр не отличался от контроля (Таблица 5, Рисунок 13).

Таблица 5. Достоверности отличий экспрессии гена β -катенин в кокультуре клеток и опытных группах от экспрессии в монокультуре HUVEC.

HUVEC, кокультивированные с астроцитами	0,95
2 Гр 2 часа	0,16
2 Гр 24 часа	0,25
4Гр 2 часа	0,05
4Гр 24 часа	<0,01
6Гр 2 часа	<0,001
6Гр 24 часа	0,01

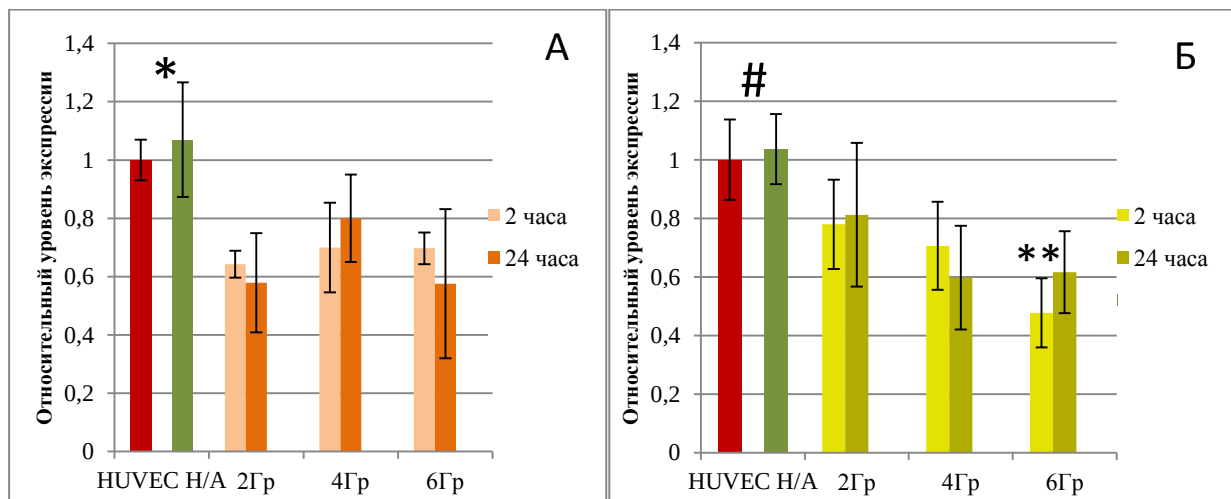


Рисунок 13. Количественный ПЦР-анализ генов белков адгезивных контактов в клетках HUVEC, кокультивированных с астроцитами, после облучения
 А- VE кадгерин, Б- β -катенин * $p < 0,05$ по сравнению со всеми опытными группами
 # $p < 0,05$ по сравнению с группами 4Гр и 6Гр на всех сроках ** $p < 0,05$ по сравнению с группами 2 Гр 2 и 24 часа и 4Гр 2 часа. Н/А – HUVEC, кокультивированные с астроцитами

3.4 Влияние облучения на структуру и функции щелевых контактов

Щелевые контакты обеспечивают межклеточную коммуникацию. В структуре ГЭБ взаимодействие между церебральными эндотелиоцитами, астроцитами исключительно важно для формирования нормально функционирующего ГЭБ. Влияние радиационного воздействия также осуществляется через щелевые кон-

такты [115]. Таким образом, изучение структур и функций щелевых контактов необходимо для понимания механизмов увеличения проницаемости барьера после воздействия редко ионизирующего фотонного излучения.

3.4.1 Исследование передачи красителя через щелевые контакты

На культуре клеток астроцитов крысы было проведено исследование по влиянию облучения на функционирование щелевых контактов в эксперименте по Goldberg. Клетки были разделены на две группы: донорные и реципиентные.

Донорные клетки были окрашены мембранным красителем Dil и цитоплазматическим красителем САМ, далее подвергнуты облучению дозами 0,5 Гр, 2 Гр и 6 Гр.

Через час после облучения в культуру донорных клеток были добавлены немеченые астроциты (реципиентные). Через 4 часа после совместного культивирования была проведена флуоресцентная микроскопия. Донорная культура окрашена мембранным красителем Dil, который не передается от одной клетке к другой и цитоплазматическим красителем САМ, передающимся исключительно через щелевые контакты. Клетки, получившие данный краситель от донорной, становятся видны во флуоресцентный микроскоп как зеленые клетки без какой-либо иной метки. Отдавшие метку донорные астроциты становятся красными, а не передавшие краситель – желтыми.

В контрольной культуре обнаруживается большое число реципиентных клеток, окружающих донорную, имеющую две метки. После культивирования донорных астроцитов, облученных дозой 0,5 Гр, наблюдаются лишь единичные участки переноса (Рисунок 14).

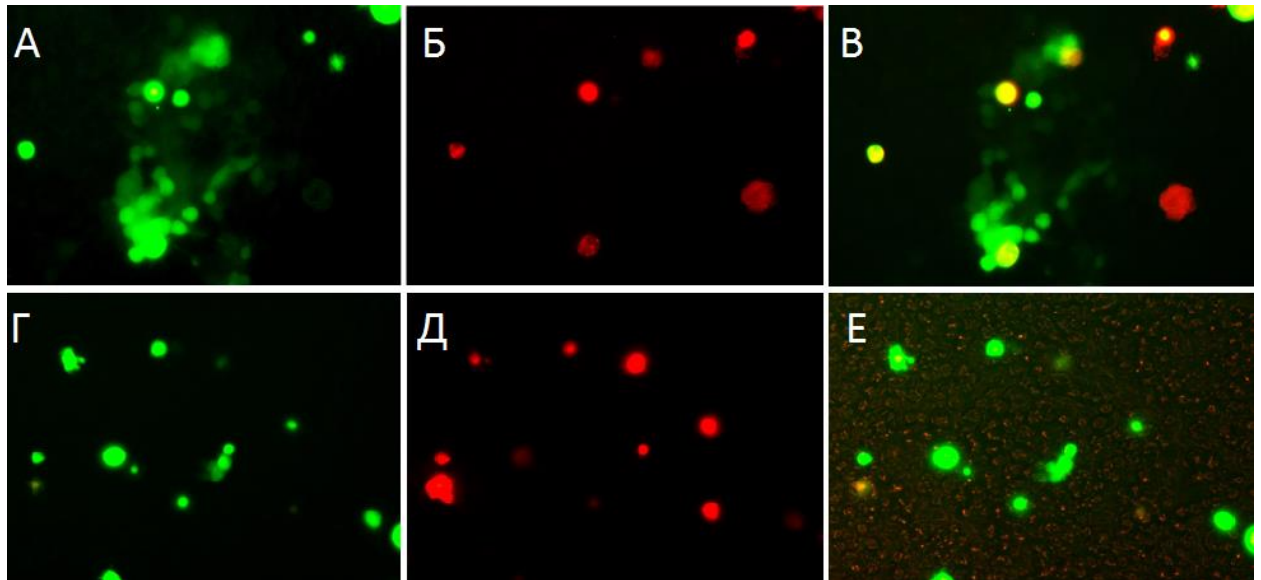


Рисунок 14. Перенос красителя САМ в культуре астроцитов крысы после облучения.

Зеленый - САМ, Красный – Dil. В, Е – совмещенное изображение. А,Б,В – контроль – необлученные клетки, Г, Д, Е – Клетки облученные дозой 2 Гр.

Далее перенос красителя САМ изучали при помощи проточной цитофлуориметрии. Для этого вначале на двумерной гистограмме FL1-Log_Height/FL2-Log_Height при помощи отрицательного контроля с неокрашенными клетками выставлялась граница, куда в последующем попадали клетки с флуоресцентным красителем. Это позволяло нам определить процент САМ позитивных событий (клеток), среди событий, отобранных по морфологии и не являющихся клеточными дуплетами. Зачастую интенсивность флуоресценции, особенно для донорных клеток, находилось на очень высоком уровне, такие клетки располагались ближе к правому верхнему углу двумерной гистограммы.

Отрицательный контроль также использовался для выставления границы на двумерной гистограмме FL12-Log_Height/FL13-Log_Height. В последующем это позволяло нам определить процент Dil-позитивных событий среди событий, отобранных по морфологии и не являющихся дуплетами (Рисунок 15).

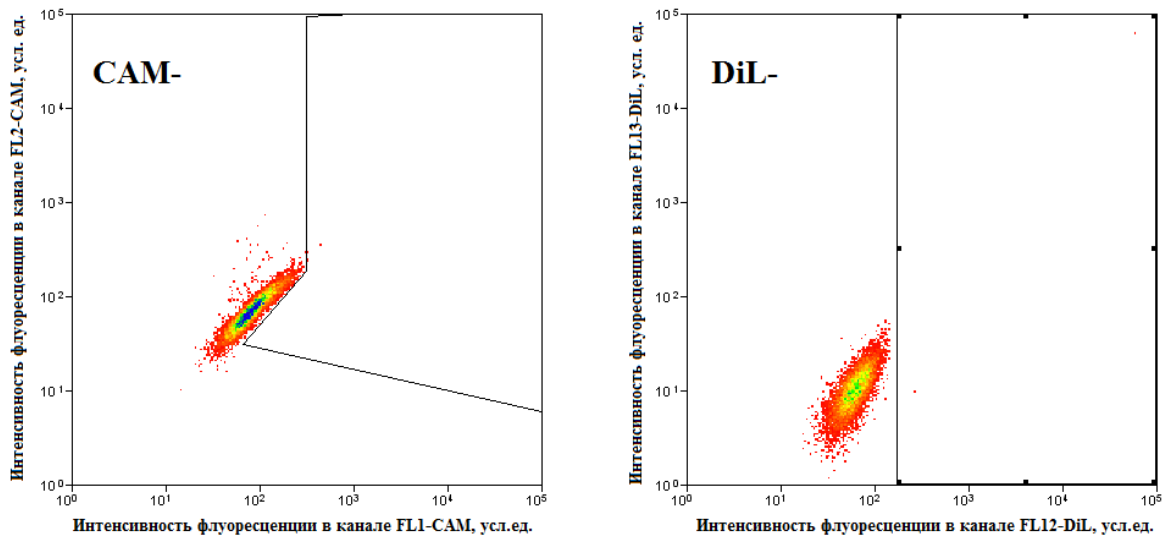


Рисунок 15. Точечные диаграммы, построенные в каналах флуоресценции CAM и DiL для неокрашенных клеток.

По полученным данным выставлялись границы CAM-негативных и DiL-негативных событий. На канал FL1 попадает флуоресценция с длинами волн 515-543 нм, FL2 – 563-588 нм, FL12 – 559-592 нм, FL13 – 612-638 нм.

По ранее созданным двумерным гистограммам можно определить количество DiL+/DiL– клеток и CAM+/CAM– клеток. Для оценки переноса флуоресцентного красителя CAM дополнительно была создана двумерная гистограмма FL12-Log_Height/FL13-Log_Height, но границы были подобраны так, что сюда попадали только CAM+ клетки. С помощью этой диаграммы мы получили возможность определять соотношение CAM+DiL+ и CAM+DiL– клеток, то есть соотношение донорных и реципиентных клеток, соответственно.

При этом для характеристики переноса был выбран такой показатель как процент реципиентных клеток CAM+DiL–, нормированный по проценту DiL+ клеток (DiL+CAM+ и DiL+CAM–).

Соотношение DiL+CAM+ и DiL+CAM– определялось по новой двумерной гистограмме FL1-Log_Height/FL2-Log_Height, границы были подобраны так, что сюда попадали только DiL+ клетки. DiL+CAM– это либо донорные клетки, отдавшие весь краситель CAM, либо обычные клетки культуры, получившие краситель DiL от DiL-позитивных клеток, но не получившие CAM. При проточной цитофлуо-

риметрии окрашенных клеток, не подвергшихся облучению, через 5 часов после кокультивирования, на точечных диаграммах обнаруживается большое количество клеток, позитивных по CAM и негативных по Dil, что говорит о хорошей передаче красителя через щелевые контакты (Рисунок 16).

При проточной цитофлуориметрии окрашенных клеток, не подвергшихся облучению, но в среду к которым был добавлен ингибитор щелевых контактов СВХ, через 5 часов после кокультивирования на точечных диаграммах практически нет клеток, получивших краситель. Следовательно, в данном случае обмен сигналом через щелевые контакты в культуре астроцитов крысы практически не идет. Цитометрически это выражается почти полным отсутствием событий на диаграмме, построенной в каналах флуоресценции Dil с CAM+ событиями. (Рисунок 17).

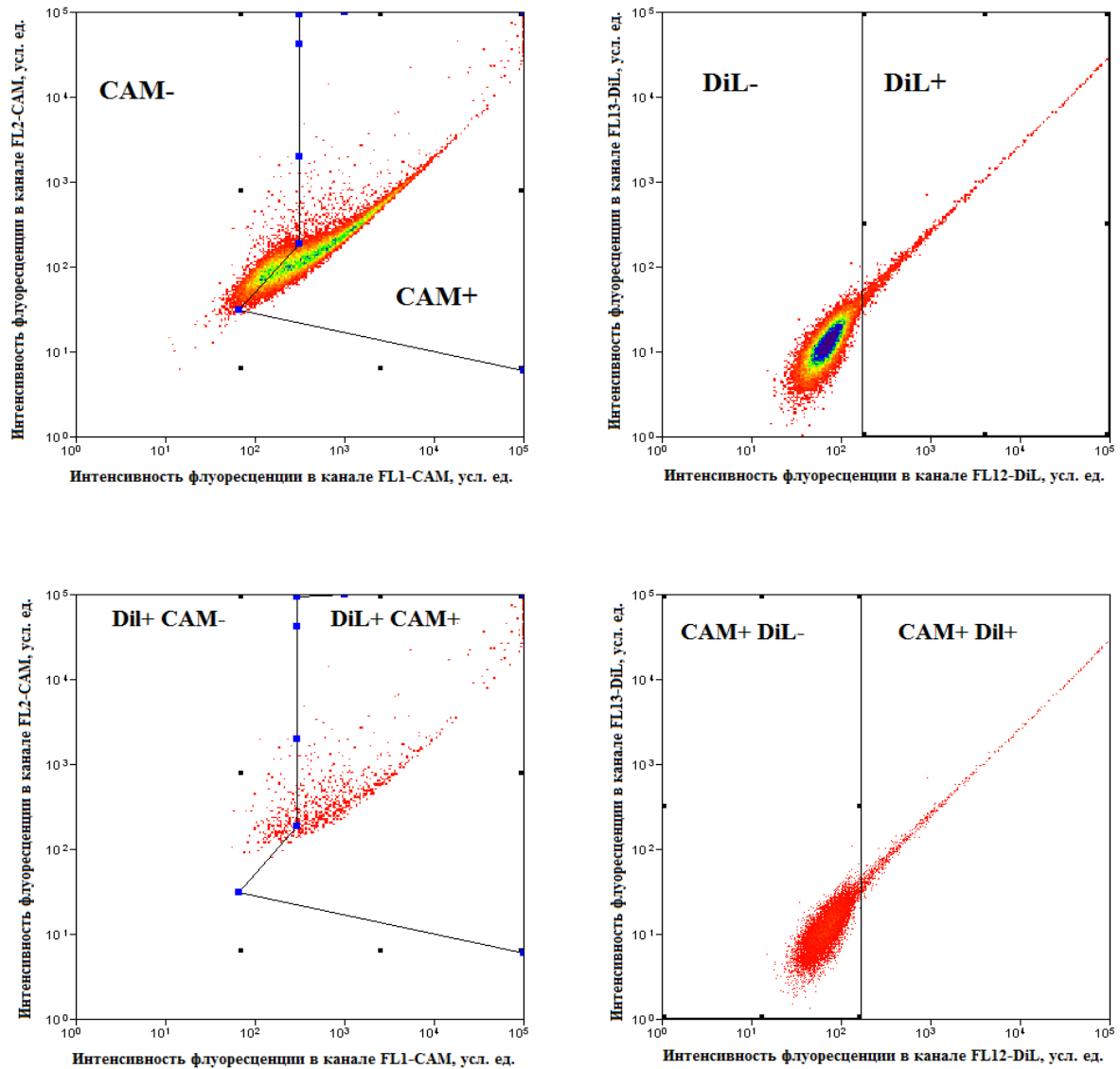


Рисунок 16. Точечные диаграммы, построенные в каналах флуоресценции CAM и DiL для клеток положительного контроля, то есть для окрашенных клеток, не подвергшихся облучению.

Цитометрия выполнялась через 4 часа после кокультивирования. По двум верхним диаграммам определяется количество CAM+ клеток и DiL+ клеток. На левой нижней диаграмме расположены только DiL+ события с верхней правой диаграммы. На правой нижней диаграмме расположены только CAM+ события с верхней левой диаграммы. На канал FL1 попадает флуоресценция с длинами волн 515-543 нм, FL2 – 563-588 нм, FL12 – 559-592 нм, FL13 – 612-638 нм.

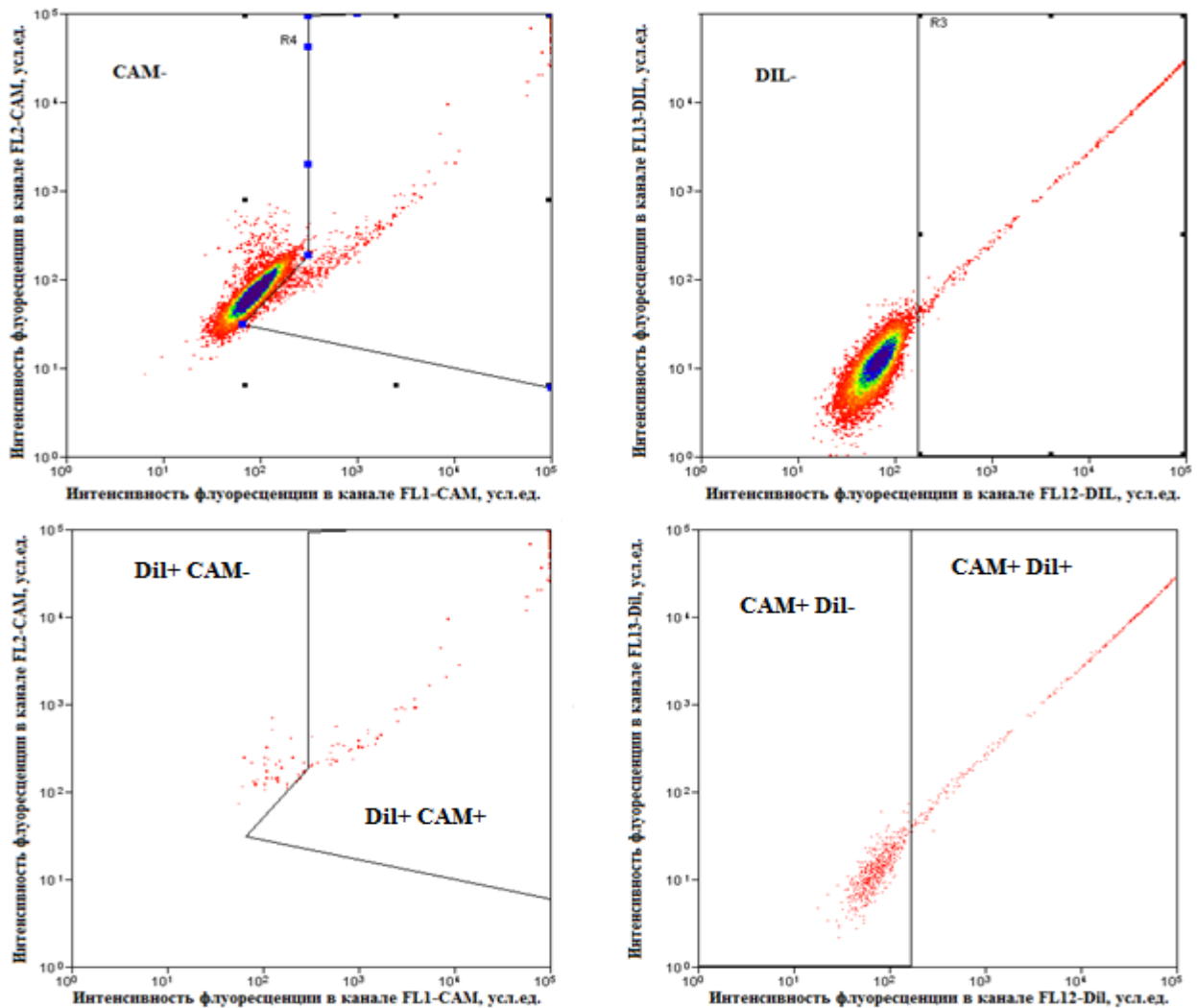


Рисунок 17. Точечные диаграммы, построенные в каналах флуоресценции CAM и DiI для окрашенных клеток, не подвергшихся облучению, после добавления в среду CBX.

На канал FL1 попадает флуоресценция с длинами волн 515-543 нм, FL2 – 563-588 нм, FL12 – 559-592 нм, FL13 – 612-638 нм.

При проточной цитофлуориметрии окрашенных клеток после облучения через 4 часа после кокультивирования с реципиентными на точечных диаграммах видно некоторое количество клеток, позитивных по CAM и негативных по DiI, что говорит о значительном снижении передачи красителя через щелевые контакты (Рисунок 18).

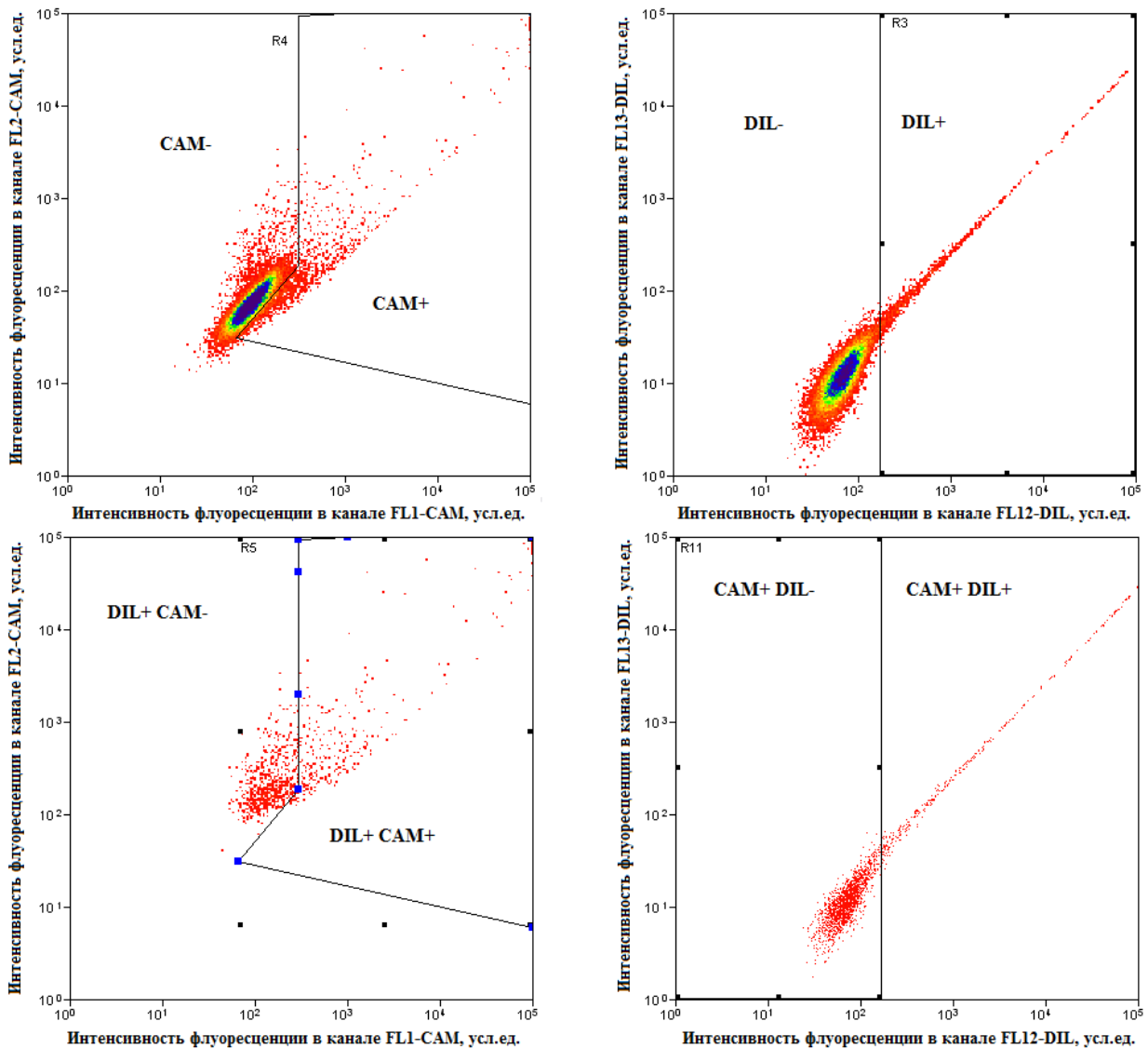


Рисунок 18. Точечные диаграммы, построенные в каналах флуоресценции CAM и Dil для окрашенных клеток после облучения дозой 0,5 Гр.

По двум верхним диаграммам определяется количество CAM+ клеток и Dil+ клеток. На левой нижней диаграмме расположены только Dil+ события с верхней правой диаграммы. На правой нижней диаграмме расположены только CAM+ события с верхней левой диаграммы. На канал FL1 попадает флуоресценция с длинами волн 515-543 нм, FL2 – 563-588 нм, FL12 – 559-592 нм, FL13 – 612-638 нм.

Далее по данным проточной цитофлуориметрии высчитывали процентное отношение реципиентных и донорных клеток. Оно было максимально в контрольной необлученной культуре ($23,8 \pm 2,6$). В отрицательном контроле - необлученные клетки, где после смешивания донорных и реципиентных клеток был сразу же добавлен ингибитор щелевых контактов карбенексон, такое соотношение

$1,8 \pm 0,02$. $F(1;4) = 15,97$ $p < 0,001$ – критерий различий при сравнении всех групп. Спустя 5 часов после облучения донорных астроцитов и 4 часов кокультивирования с реципиентными перенос красителя существенно снижается ($p < 0,01$ по сравнению с положительным контролем для всех доз облучения), однако не достигается полного ингибирования переноса ($p < 0,01$ по сравнению с отрицательным контролем для всех доз облучения). После воздействия дозой 0,5 Гр процентное отношение реципиентных и донорных клеток составило $7,2 \pm 0,02$, для дозы 2 Гр $5,5 \pm 0,3$ и для дозы 6 Гр $5,8 \pm 0,4$. Отличия между дозами 2 и 6 Гр не обнаружены. В клетках, получивших дозу 0,5 Гр перенос красителя был статистически больше, чем в астроцитах, облученных дозами 2 и 6 Гр ($p < 0,01$). (Рисунок 19). Таким образом, показан дозозависимый эффект снижения передачи красителя.

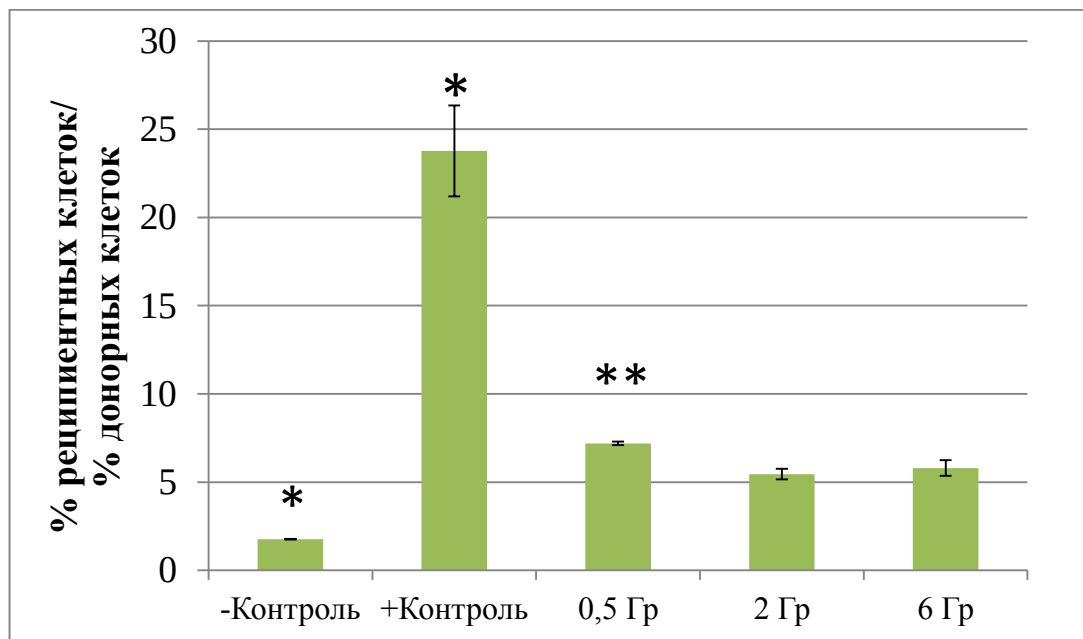


Рисунок 19. Процентное отношение реципиентных и донорных клеток астроцитов крысы после 4 часовой совместной инкубации по данным проточной цитофлуориметрии. Реципиентные клетки смешивали с донорными спустя 1 час после облучения последних.

– *Контроль* – добавление СВХ после смешивания донорных и реципиентных клеток, + *Контроль* – клетки, не подвергшиеся облучению. * $p < 0,001$ по сравнению со всеми остальными группами, ** $p < 0,01$ по сравнению с группами, получившими дозу 2 и 6 Гр.

3.4.2 Исследование изменения экспрессии белка Сх43 и соответствующего гена

Сх43 – один из основных компонентов щелевых контактов между астроцитами, структурными компонентами ГЭБ. При иммуноблот анализе экспрессии белка Сх43 в культуре астроцитов после облучения отмечено дозозависимое снижение экспрессии. На сроке 5 часов после облучения экспрессия белка была снижена во всех группах. На сроке 24 и 48 часов после облучения экспрессия возрастала, но сохранялась ниже уровня контроля при дозах облучения 2 и 6 Гр (Рисунок 20,21).



Рисунок 20. Иммуноблот анализ белка Сх43 в культуре клеток астроцитов крысы. А - 5 часов после облучения, Б – 24 и 48 часов после облучения

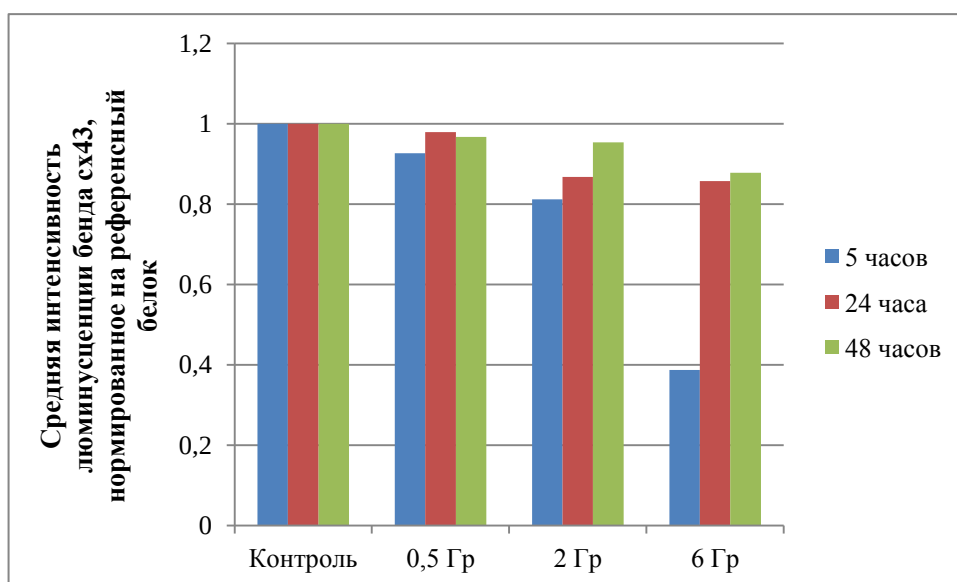


Рисунок 21. Средняя интенсивность люминесценции бэнда белка Сх43, нормированная на среднюю интенсивность люминесценции бэнда референсного белка β -актина.

При количественном ПЦР-анализе гена *Cx43* на сроке 5 часов после облучения выявлено уменьшение экспрессии (Критерий Краскела-Уоллиса: $H(3, N=14)=9,97$ $p=0,018$). Различий между опытными группами не обнаружено (Критерий Краскела-Уоллиса: $H(2, N=10)=3,76$ $p=0,15$). На сроке 24 часа произошло увеличение уровня мРНК по сравнению с нормальной необлученной культурой прямо пропорционально дозе облучения (Критерий Краскела-Уоллиса: $H(3, N=14)=12,2$ $p=0,007$ – для всех групп). Вероятности различий между каждой из групп $p<0,001$. Через 48 часов экспрессия была равна в необлученных клетках и у культуры, получившей 0,5 Гр. В других группах экспрессия все еще оставалась немного повышена (в 1,6 раз). (Критерий Краскела-Уоллиса: $H(3, N=12)=9,97$ $p=0,02$ - для всех групп). Вероятности различий между группами 0,5 Гр и 2Гр, 0,5 Гр и 6 Гр, между контролем и группами 2Гр и 6Гр $p<0,001$. (Рисунок 22).

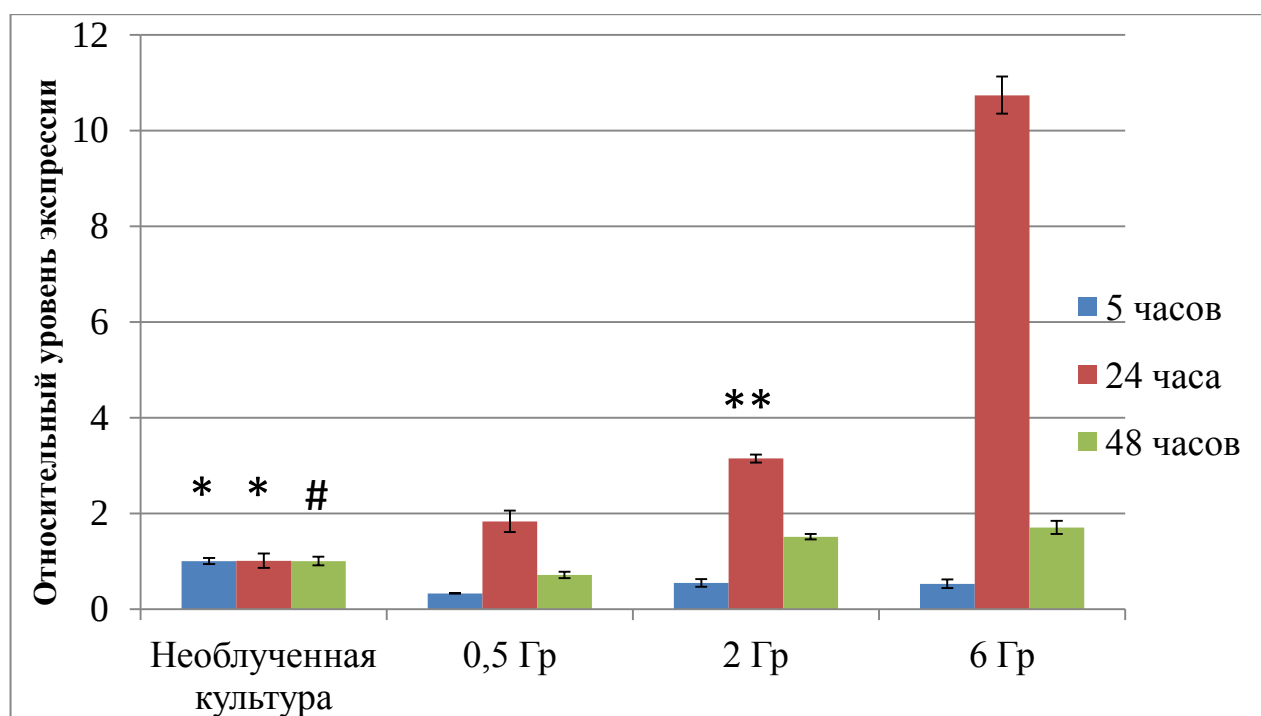


Рисунок 22. Количественный ПЦР-анализ гена *Cx 43* после облучения дозами 0,5 Гр, 2 Гр, 6 Гр на сроках 5, 24 и 48 часов после воздействия ИИ.

** $p<0,001$ по сравнению со всеми опытными группами, ** $p<0,001$ по сравнению с группами, получившими дозу 0,5 и 6 Гр, # $p<0,01$ по сравнению с группами, получившими дозу 2 и 6 Гр,*

Таким образом, облучение кокультуры HUVEC и астроцитов приводит к изменению морфологии клеток HUVEC, изменению синтеза белков межклеточных контактов, формирующих структуру ГЭБ. В частности:

- Показано уменьшение экспрессии генов и белков плотных (ZO-1, клаудин 5) и адгезивных (VE Кадгерин, β -катенин) контактов на всех сроках после облучения (2, 24 и 48 часов) в клетках, которые были подвергнуты воздействию дозами 2, 4 и 6 Гр
- Показано уменьшение экспрессии генов плотных контактов до уровня монокультуры HUVEC на всех сроках и при воздействии дозами 2, 4 и 6 Гр
- Показано уменьшение экспрессии *VE кадгерина* до 0,6 уровня монокультуры при облучении дозами 2, 4 и 6 Гр и мРНК *β -катенина* для доз 4 и 6 Гр, причем степень уменьшения была прямо пропорциональна дозе облучения
- Показано изменение структуры и функции щелевых контактов после воздействия редко ионизирующего фотонного излучения: дозозависимое ингибирование передачи красителя, уменьшение экспрессии белка Сх43 и изменение экспрессии гена Сх43 на сроках 5, 24 и 48 часов после облучения.

Глава 4. Исследование проницаемости ГЭБ на модели *in vivo*

Полученные результаты экспериментов *in vitro* позволили перейти нам к исследованию биохимических маркеров проницаемости ГЭБ у животных после воздействия редко ионизирующего фотонного излучения по трем схемам фракционированного облучения с единой СОД. Нами выполнены три группы экспериментов:

1. Исследование проницаемости ГЭБ в направлении мозг-кровь проводилось при помощи оценки в динамике уровня нейроспецифического белка GFAP в плазме крови крыс после фракционированного облучения по трем различным схемам (2Гр*18 фракций, 4Гр*9, 6Гр*6) с единой СОД.

2. Исследование проницаемости ГЭБ в направлении кровь-мозг проводилось путем оценки накопления в ткани мозга высокомолекулярных белков (анти-VEGF и анти-GFAP антител и неспецифических иммуноглобулинов), в норме не проникающих через ГЭБ, после фракционированного облучения дозой 6Гр*6 на 10 недель после облучения.
3. Исследование изменения экспрессии белков основных клеток, формирующих ГЭБ, VEGF и GFAP и соответствующих генов.

4.1 Исследование проницаемости ГЭБ в направлении мозг-кровь

При нарушении проницаемости ГЭБ в крови обнаруживаются нейроспецифические белки, не проходящие через барьер при интактом барьере. В нашем исследовании мы определяли концентрацию в плазме крови GFAP, основного белка астроцитов, клеток, образующих ГЭБ. Для этого была разработана тест-система, характеризующаяся точностью, надежностью и воспроизводимостью. Далее проводился забор крови крыс на разных сроках после облучения. По увеличению уровня GFAP определялась динамика нарушений проницаемости ГЭБ в направлении мозг-кровь.

При анализе концентрации GFAP в плазме крови крыс, подвергшихся облучению, получена кривая изменения уровня GFAP в зависимости от времени, прошедшего после воздействия, нормированная на базальный уровень GFAP в плазме крови, взятой у этих же крыс до начала облучения (Рисунок 23).

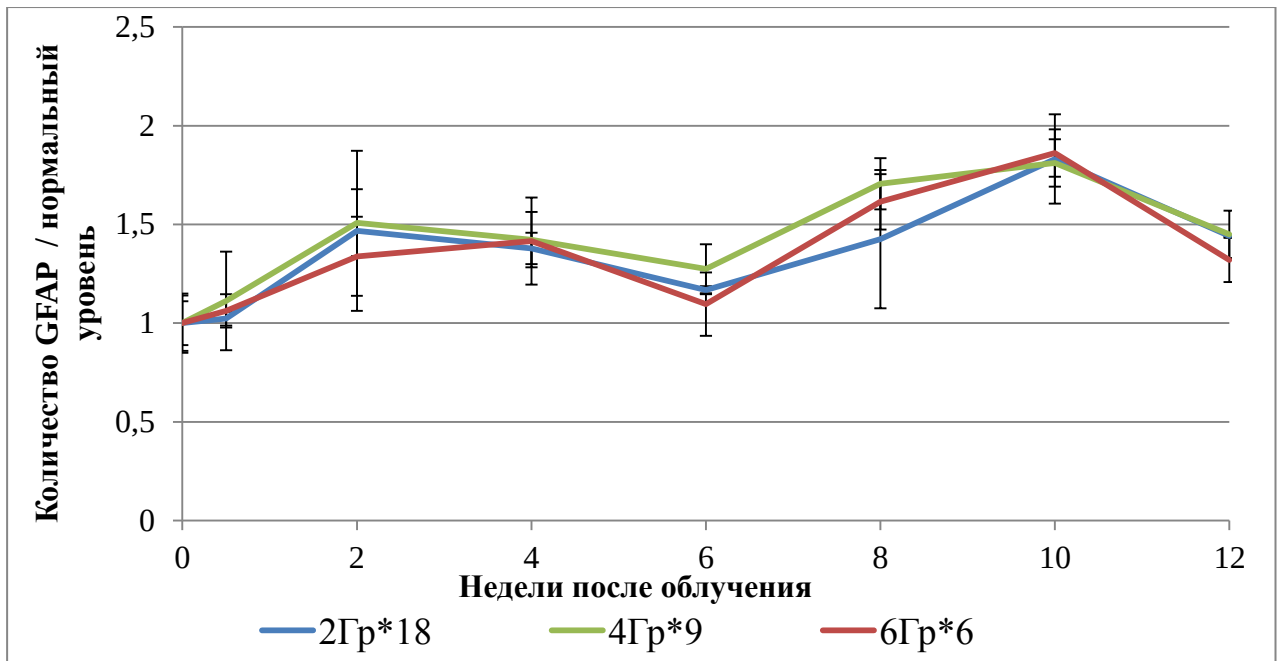


Рисунок 23. Нормированное на базальный уровень количество GFAP в плазме крови крыс после фракционированного облучения.

По результатам анализа нейроспецифического белка GFAP в плазме крови крыс, облученным по различным протоколам, его количество возрастало в 1,5-2 раза, однако отличий между вариантами фракционирования не выявлено. Увеличение концентрации GFAP наблюдалось на со 2 по 4 и с 8 по 12 неделю после облучения. Максимальная концентрация GFAP в плазме была обнаружена на 10 неделе. Следует заметить, что на 6 неделе уровень GFAP не отличался от нормы. Достоверности отличий значений в каждой точке от базального уровня приведены в таблице 6 (критерий Даннетта). Критерий Краскела-Уоллиса: $H(8, N=37) = 24,83$ $p < 0,01$ для группы 2Gr*18 с контролем, Критерий Краскела-Уоллиса: $H(7, N=54) = 29,28$ $p < 0,001$ для группы 4Gr*9 с контролем, Критерий Краскела-Уоллиса: $H(7, N=54) = 41,38$ $p < 0,001$ для группы 6Gr*6 с контролем.

Таблица 6. Достоверности отличий от нормального уровня GFAP.

2Гр*18	0,5 недель	0,992
	2 недели	0,019
	4 недели	0,096
	6 недель	0,791
	8 недель	0,044
	10 недель	<0,01
	12 недель	0,032
4Гр*9	0,5 недель	0,849
	2 недели	<0,01
	4 недели	<0,01
	6 недель	0,130
	8 недель	<0,01
	10 недель	<0,01
	12 недель	<0,01
6Гр*6	0,5 недель	0,913
	2 недели	0,100
	4 недели	<0,01
	6 недель	0,890
	8 недель	<0,01
	10 недель	<0,01
	12 недель	0,183

4.2 Исследование проницаемости ГЭБ в направлении кровь-мозг

Нарушение проницаемости ГЭБ позволяет проходить в ткань мозга высокомолекулярным веществам. В нашем исследовании мы исследовали проникно-

вление через ГЭБ анти-GFAP и анти-VEGF антител, меченных флуоресцентной меткой, после внутривенного введения. GFAP и VEGF являются белками астроцитов и эндотелиоцитов - клеток, образующих структуру ГЭБ, поэтому обнаружение флуоресценции от антител к этим белкам в тканях мозга может свидетельствовать об увеличении проницаемости ГЭБ.

Перед экспериментом по выявлению накопления высокомолекулярных белков в ткани мозга облученных крыс, мы провели эксперимент по деградации иммуноглобулинов, меченных Alexa 488, в плазме крови. Целью этого эксперимента было доказательство того, что видимая нами флуоресценция в ткани мозга – флуоресценция комплекса антитело-краситель, а не отщепившейся низкомолекулярной метки.

4.2.1 Исследование деградации меченых антител в крови

При анализе интенсивности флуоресценции препаратов меченых антител в различных разведениях получена линейная зависимость флуоресценции от разведения образца (Рисунок 24). Фоновое значение, измеренное в нормальной плазме крови крысы, составило $724,8 \pm 223,2$.

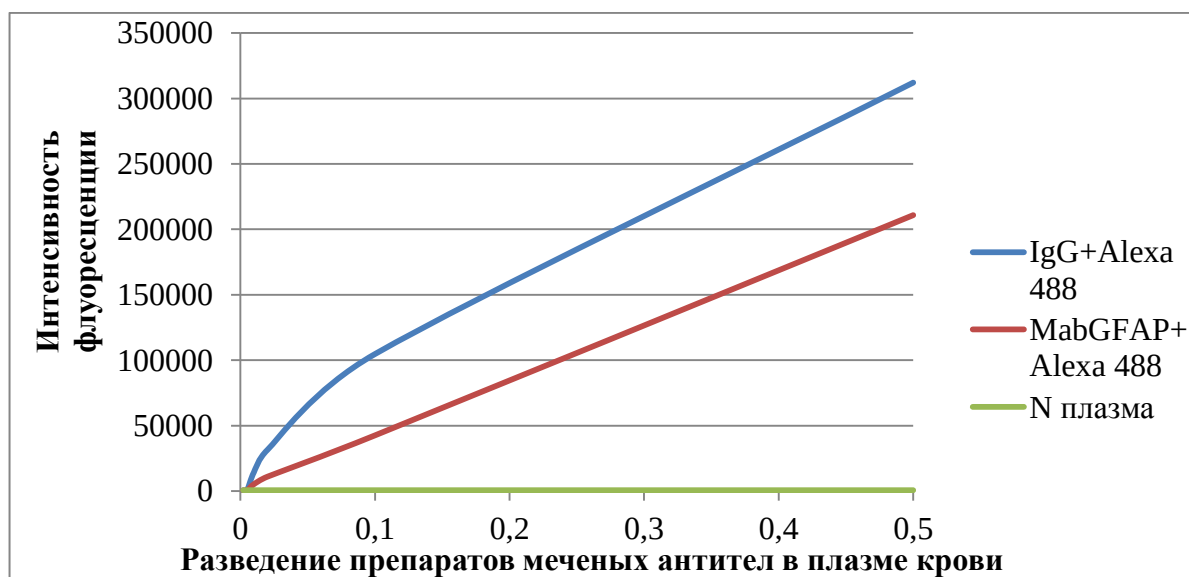


Рисунок 24. Интенсивность флуоресценции препаратов меченых антител в различных разведениях в плазме крови.

Минимально детектируемое значение принимали таким, чтобы оно в пять раз превышало фоновое. Оно составило 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 составить минимум 94802.

После разведения в плазме крови интенсивность флуоресценции IgG, меченных Alexa 488, составила $126473,6 \pm 1385$, а MabGFAP, меченных Alexa 488 – $131541,6 \pm 1694$.

Интенсивность флуоресценции в пробах, отобранных на сроках 18, 24, 48 и 72 часа падала с течением времени и на сроке 72 часа составила для IgG, меченных Alexa 488, 111814 ± 9245 , а для MabGFAP, меченных Alexa 488 – 112340 ± 9552 . Падение интенсивности флуоресценции составило $11,6\% \pm 7\%$ и $14,6\% \pm 7\%$ для IgG, меченных Alexa 488, и MabGFAP, меченных Alexa 488, от изначального значения соответственно (Рисунок 25).

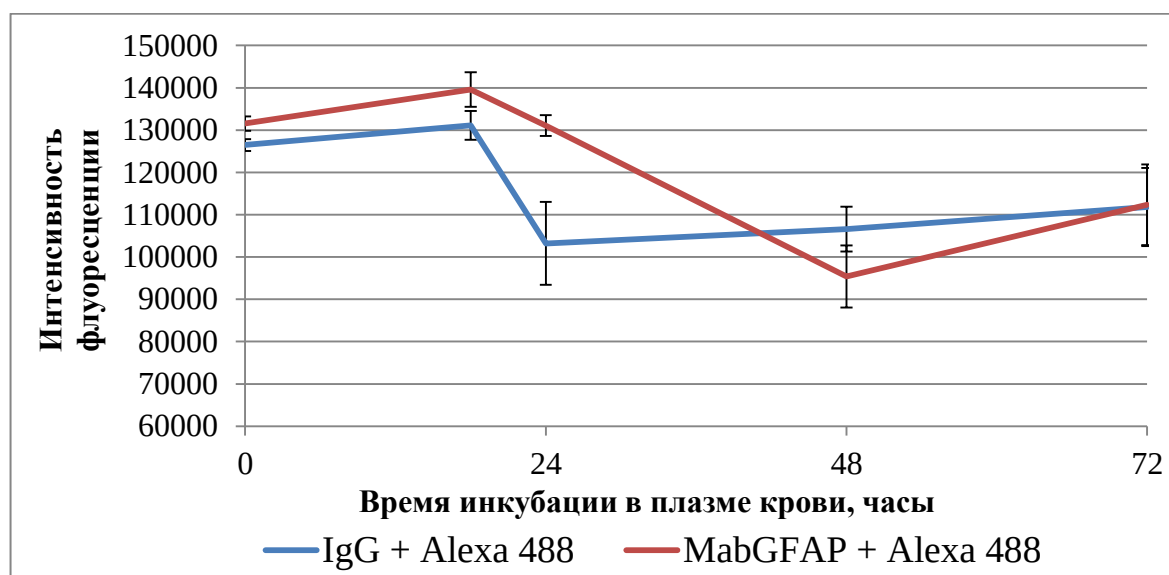


Рисунок 25. Динамика изменения интенсивности флуоресценции в ходе инкубации меченых антител в плазме крови.

Интенсивность флуоресценции в образцах после центрифугирования через фильтр 30 кДа отличалась от фонового значения на сроках 24, 48 и 72 часа (Таб-

лица 7,8, Рисунок 26) $F=93,22$. Стоит заметить, что интенсивность флуоресценции на сроке 18 часов для обоих видов антител и 48 часов для MabGFAP + Alexa 488 была даже статистически значимо ниже фонового значения плазмы крови.

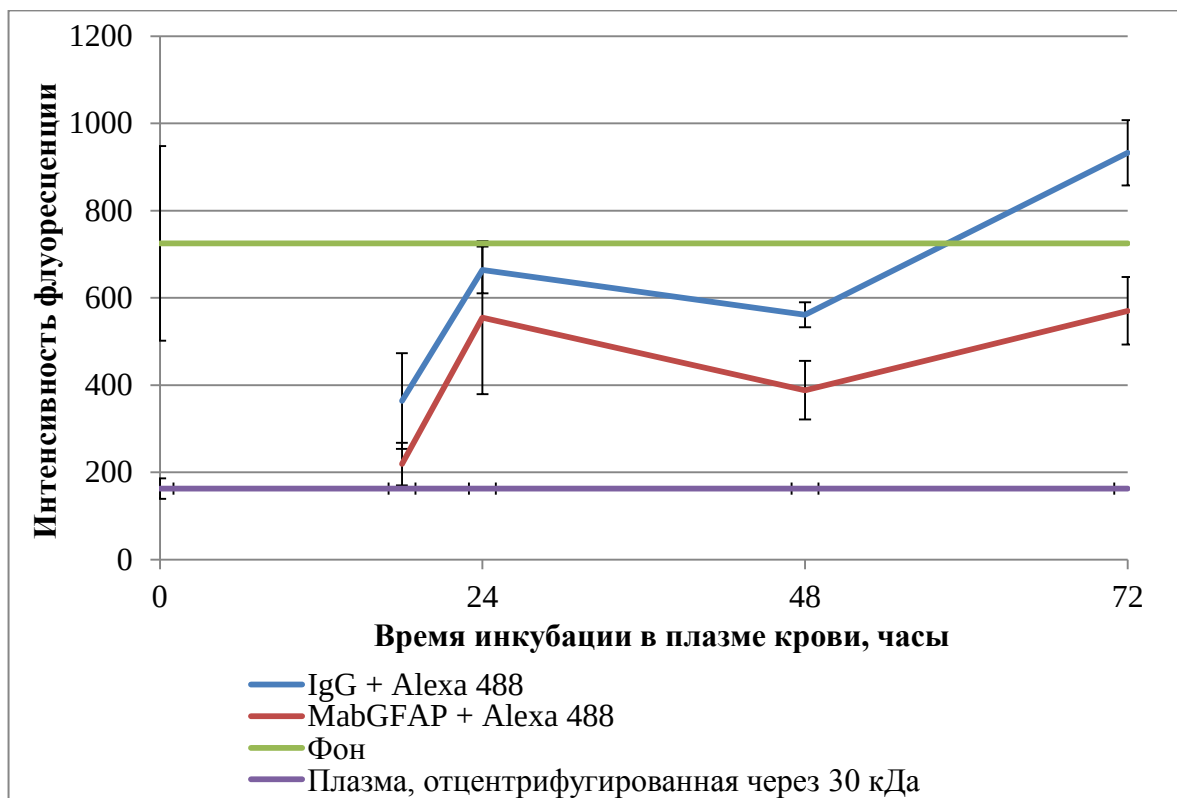


Рисунок 26. Динамика изменения интенсивности флуоресценции после центрифугирования через фильтр 30 кДа.

Таблица 7. Достоверности отличий от фонового значения интенсивности флуоресценции в проскоках после центрифугирования через 30 кДа.

18 часов	IgG	0,001
	MabGFAP	<0,001
24 часа	IgG	1,000
	MabGFAP	0,301
48 часов	IgG	0,515
	MabGFAP	<0,001
72 часа	IgG	0,137
	MabGFAP	0,646

Таблица 8. Достоверности отличий интенсивности флуоресценции образцов после центрифугирования через 30 кДа. Критерий Бонферрони

	Фон	18ч IgG	18ч GFAP	24ч IgG	24ч GFAP	48ч IgG	48ч GFAP	72ч IgG	72ч GFAP
Фон		0,001	<0,001	1,000	0,301	0,515	<0,001	0,137	0,646
18ч IgG	0,001		1,000	0,001	0,225	0,227	1,000	<0,001	0,134
18ч GFAP	<0,001	1,000		<0,001	<0,001	<0,001	0,656	<0,001	<0,001
24ч IgG	1,000	<0,001	<0,001		1,000	1,000	<0,001	0,001	1,000
24ч GFAP	0,301	0,225	<0,001	1,000		1,000	0,114	<0,001	1,000
48ч IgG	0,515	0,227	<0,001	1,000	1,000		0,129	<0,001	1,000
48ч GFAP	<0,001	1,000	0,656	<0,001	0,114	0,129		<0,001	0,062
72ч IgG	0,137	<0,001	<0,001	0,001	<0,001	<0,001	<0,001		<0,001
72ч GFAP	0,646	0,134	<0,001	1,000	1,000	1,000	0,062	<0,001	

В ходе инкубации в плазме крови антител, меченных флуоресцентной меткой:

- Показано падение интенсивности флуоресценции при инкубации в плазме крови IgG и MabGFAP, меченных Alexa 488, до 11,6% и 14,6% соответственно на сроках до 72 часов
- В пробах, отобранных на различных сроках после начала инкубации и отцентрифугированных через фильтр 30 кДа, 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.

4.2.2 Исследование проникновения через ГЭБ меченых антител

Для исследования накопления высокомолекулярных веществ в ткани мозга на 10 неделе после облучения, на пике увеличения проницаемости по данным иммуноферментного анализа, были введены неспецифические и специфические иммуноглобулины, меченные флуоресцентной меткой.

Через 72 часа после введения неспецифических иммуноглобулинов флуоресценция в ткани мозга практически отсутствовала, единичные участки флуоресценции наблюдались внутри сосудов (Рисунок 27). В связи с практически полным отсутствием накопления неспецифических иммуноглобулинов на сроке 72 часа после введения, эксперимент по введению специфических антител было решено провести на данном сроке.

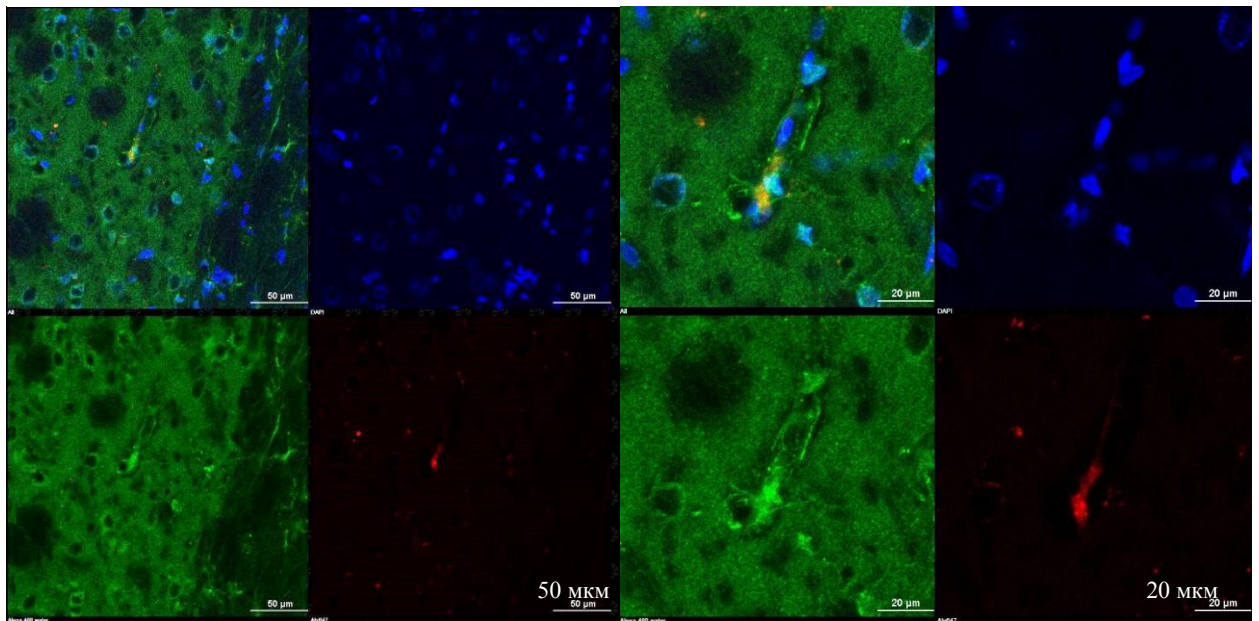


Рисунок 27. Анализ накопления неспецифических иммуноглобулинов, меченных Alexa 660, в префронтальной коре головного мозга крыс. 72 часа после внутривенного введения.

Красный - IgG + Alexa660, введенные внутривенно. Зеленый – Mab GFAP + Anti-mouse Alexa 488. Ядра докрашены DAPI

При анализе накопления специфических иммуноглобулинов Mab GFAP и Mab VEGF, связанных с красителем, флуоресценция наблюдалась тех структурах мозга, где экспрессируются белки-мишени.

При иммуногистохимическом анализе показано накопление внутривенно введенных Mab GFAP в GFAP-позитивных астроцитах (Рисунок 28).

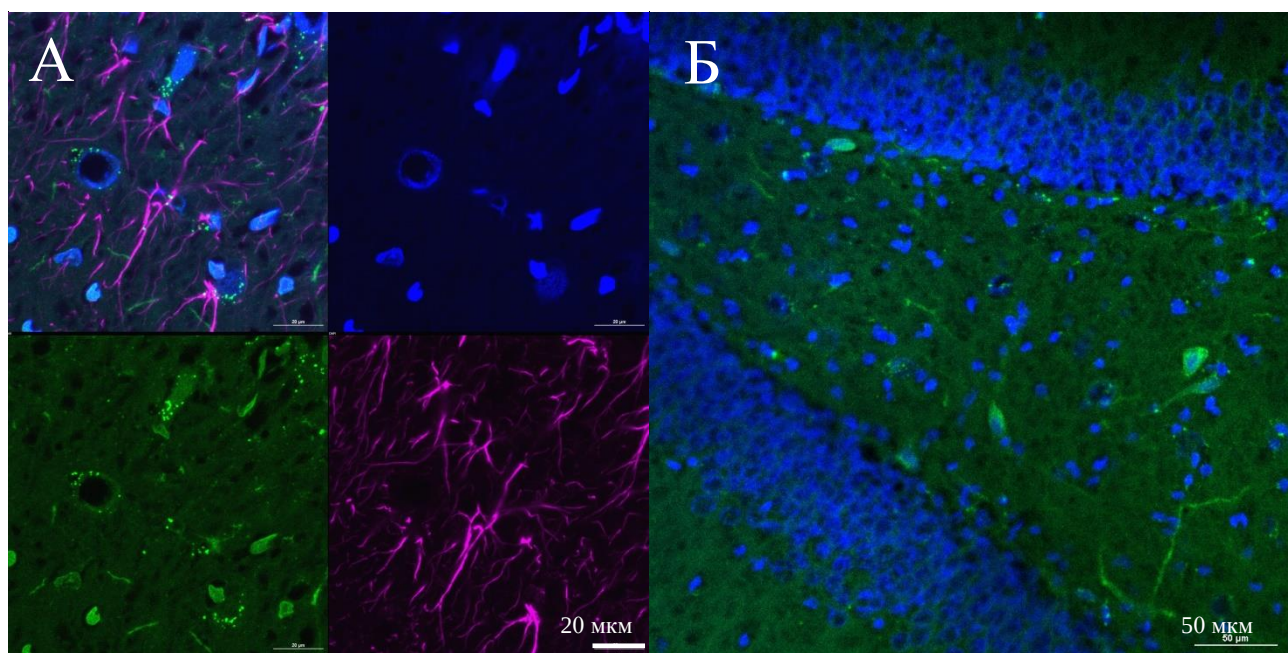


Рисунок 28. Анализ накопления Mab GFAP, меченных Alexa488, в мозолистом теле (А) и гиппокампе (Б) головного мозга крыс. 72 часа после внутривенного введения.

Зеленый – Mab GFAP + Alexa488, введенные внутривенно. Фиолетовый – Pab GFAP + Anti-mouse Alexa594. Ядра докрашены DAPI

Флуоресценцию Mab VEGF, меченных Alexa 660, наблюдали в клетках экспрессирующих данный белок: как в астроцитах стриатума, так и в GFAP-негативных клетках, в тех же областях, окрашенных иммуногистохимически антителами к фактору фон Виллебранда, маркеру эндотелиоцитов (Рисунок 29,30). Колокализация с фактором фон Виллебранда также показана в мозжечке облученных крыс (Рисунок 31).

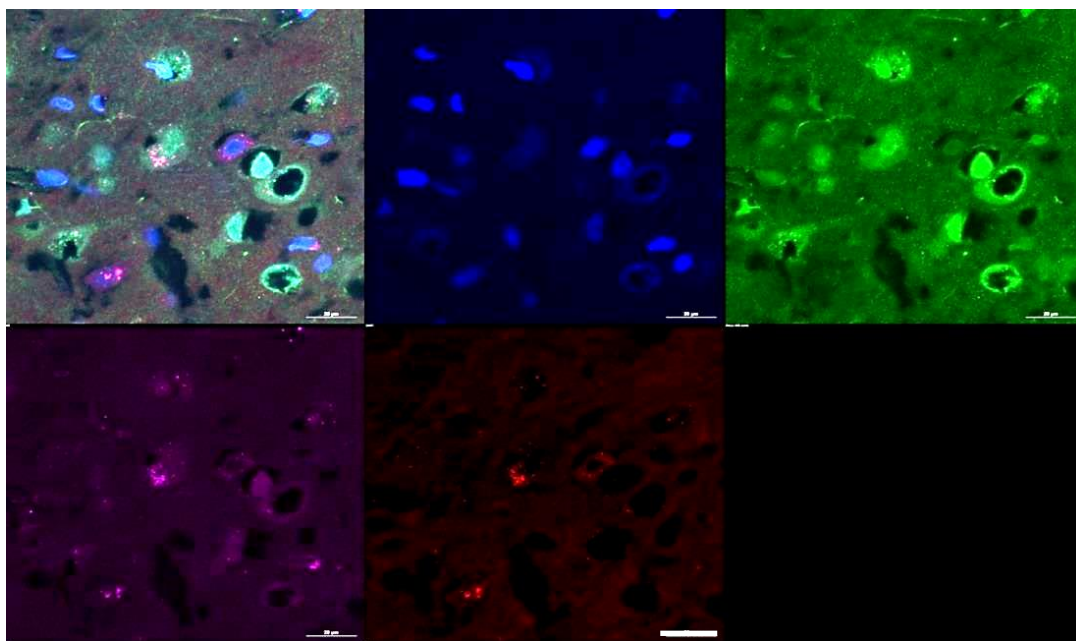


Рисунок 29. Анализ накопления Mab VEGF, меченных Alexa660, в стриатуме головного мозга крыс. 72 часа после внутривенного введения.

Зеленый – Mab GFAP + Anti-mouse Alexa 488. Фиолетовый – Pab Willebrand factor + Anti-rabbit Alexa 594. Красный – Mab VEGF + Alexa 660, введенные внутривенно. Ядра докрашены DAPI. 20 мкм

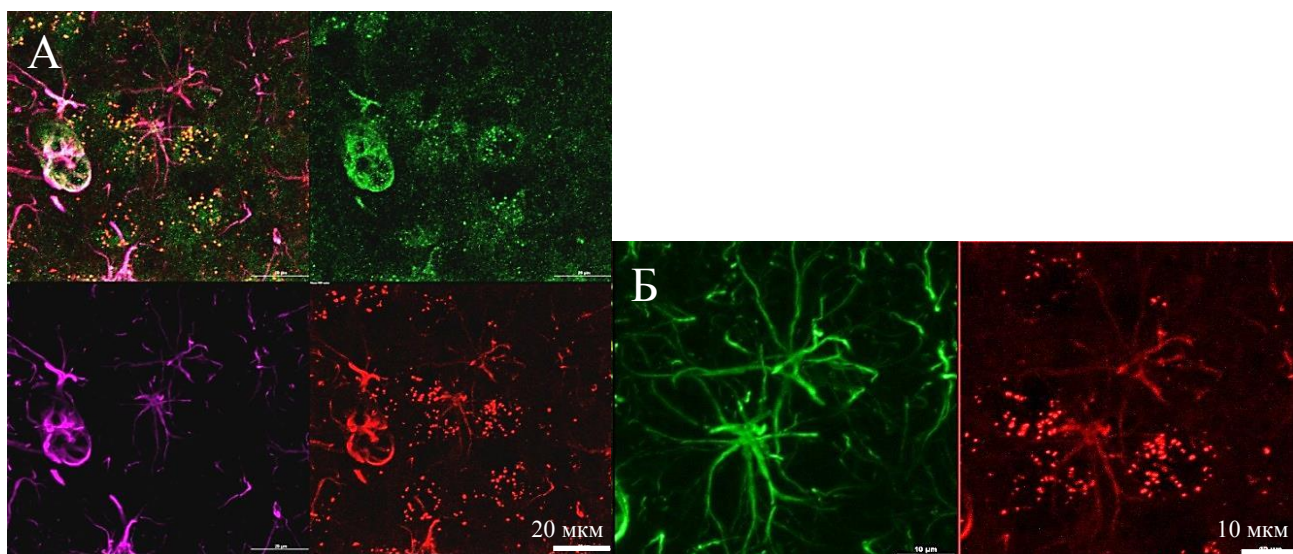


Рисунок 30. Анализ накопления Mab VEGF, меченных Alexa660, в стриатуме головного мозга крыс. 72 часа после внутривенного введения.

(А): Зеленый – Mab2B6 + Anti-mouse Alexa 488. Фиолетовый – Pab GFAP + Anti-rabbit Alexa 594. Красный – Mab VEGF + Alexa 660, введенные внутривенно.

(Б): Зеленый – Pab GFAP + Anti-rabbit Alexa 594. Красный – Mab VEGF + Alexa 660, введенные внутривенно.

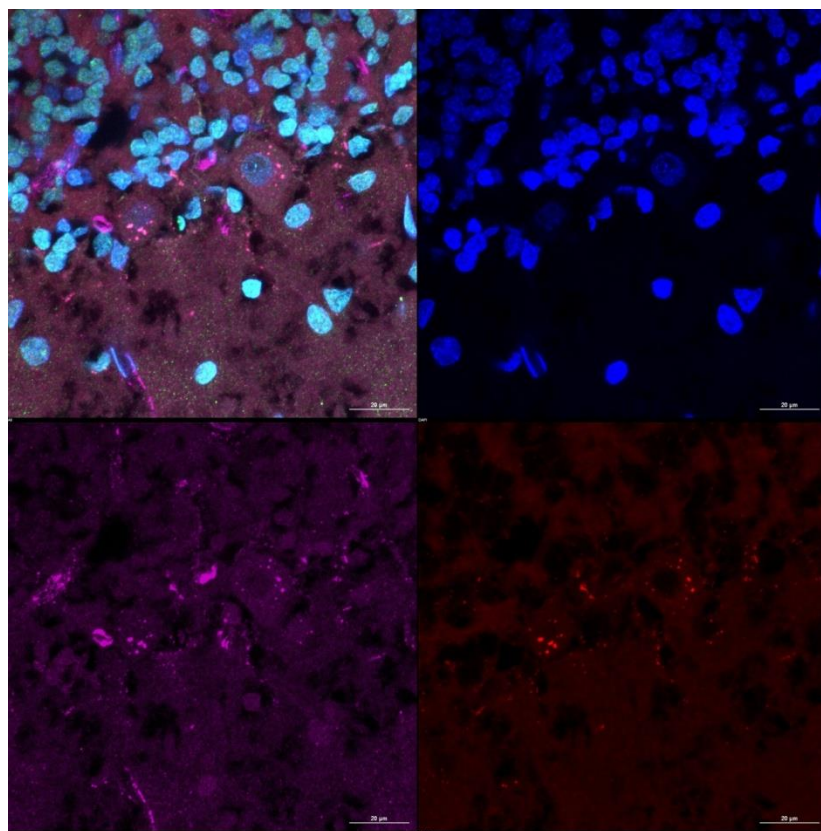


Рисунок 31. Анализ накопления MabVEGF, меченных Alexa660, в мозжечке головного мозга крыс. 72 часа после внутривенного введения.

Фиолетовый – Pab Willebrand factor + Anti-rabbit Alexa 594. Красный – Mab VEGF + Alexa 660, введенные внутривенно Ядра докрашены DAPI. 20 мкм

Таким образом, фракционированное облучение всего головного мозга приводит к изменению проницаемости ГЭБ:

- Показано увеличение проницаемости в направлении мозг-кровь путем определения концентрации в плазме крови нейроспецифического белка GFAP с пиком между 2 и 4 неделями (в 1,5 раза), спадом до нормы на 6 неделе и дальнейшим увеличением с пиком на 10 неделе (в 2 раза) после окончания облучения, причем различий между вариантами фракционирования не обнаружено.
- Показано увеличение проницаемости ГЭБ в направлении кровь-мозг путем анализа на срезах головного мозга флуоресценции от внутривенно введенных белков (MabGFAP, MabVEGF), меченных флуоресцентным красителем, в норме не проникающих через ГЭБ.

Глава 5. Качественный и количественный анализ экспрессии белков VEGF и GFAP и соответствующих генов

Влияние редко ионизирующего фотонного излучения на проницаемость ГЭБ невозможно без изучения изменения клеточных компонентов барьера, в нашем исследовании белков астроцитов и эндотелиоцитов GFAP и VEGF, а также соответствующих им генов. Иммуногистохимический анализ белков и количественный ПЦР-анализ генов GFAP и VEGF проводился на 4-12 неделе после облучения по трем схемам фракционированного облучения (2Гр*18, 4Гр*9, 6Гр*6) с единой СОД 36 Гр.

5.1 Исследование изменения экспрессии мРНК VEGF и GFAP

Уровень мРНК VEGF в гиппокампе облученных крыс был снижен у всех опытных групп. Значение экспрессии на уровне 0,7 по отношению к контрольным образцам было у групп 2Гр*18 и 4Гр*9 на 4, 8 и 12 неделе. Между группами 2Гр*18 и 4Гр*9 на всех сроках после облучения отличия не обнаружены. В группе 6Гр*6 уровень мРНК VEGF в гиппокампе был значимо ниже, чем в группах 2Гр*18 и 4Гр*9 и достиг их значений только на 12 неделе. Вероятности различий приведены в таблице 10. Отличия от уровня экспрессии в контрольных образцах, взятых у здоровых необлученных животных, были обнаружены во всех группах и на всех сроках после облучения ($p < 0,05$ для группы 2Гр*18 на всех сроках и 4Гр*9 8 недель, $p < 0,01$ для 4Гр*9 4 недели, 4Гр*9 12 недель, $p < 0,001$ для 6Гр*6 4 недели и 6Гр*6 8 недель). Критерий Краскела-Уоллиса: $H(9, N=76) = 36,87$ $p < 0,001$. (Рисунок 32А). Таким образом, мы наблюдали дозозависимый эффект уменьшения экспрессии VEGF, а также увеличение уровня мРНК со сроком, прошедшим после облучения у группы 6Гр*6.

Таблица 9. Достоверности отличий экспрессии гена *VEGF* в гиппокампе между опытными группами.

	2Гр*18 4 нед	2Гр*18 8 нед	2Гр*18 12 нед	4Гр*9 4 нед	4Гр*9 8 нед	4Гр*9 12 нед	6Гр*6 4 нед	6Гр*6 8 нед	6Гр*6 12 нед
2Гр*18 4 нед		0,750	0,504	0,358	0,912	0,440	0,005	0,020	0,631
2Гр*18 8 нед	0,750		0,725	0,403	0,737	0,636	0,001	0,100	0,850
2Гр*18 12 нед	0,504	0,725		0,613	0,457	0,909	0,002	0,080	0,913
4Гр*9 4 нед	0,358	0,403	0,613		0,125	0,647	0,021	0,163	0,498
4Гр*9 8 нед	0,912	0,737	0,457	0,125		0,273	<0,001	0,039	0,523
4Гр*9 12 нед	0,440	0,636	0,909	0,647	0,273		0,001	0,078	0,811
6Гр*6 4 нед	0,005	0,001	0,002	0,021	<0,001	0,001		0,072	<0,001
6Гр*6 8 нед	0,020	0,100	0,080	0,163	0,039	0,078	0,072		0,028
6Гр*6 12 нед	0,631	0,850	0,913	0,498	0,523	0,811	<0,001	0,028	

При анализе уровня мРНК *VEGF* в префронтальной коре головного мозга облученных крыс максимальное снижение экспрессии обнаружилось на 4 неделе (0,43 по сравнению с контролем) и далее возрастало: на 8 неделе поднялось до уровня 0,8 и к 12 неделе было равно значению экспрессии в контрольных образцах. Различий между вариантами фракционирования обнаружено не было. Межгрупповые различия для срока 4 недели: Критерий Краскела-Уоллиса: $H(3, N=25) = 9,68$ $p=0,02$ – для всех групп, Критерий Краскела-Уоллиса: $H(2, N=22) = 2,66$ $p=0,26$ – для опытных групп. Межгрупповые различия для срока 8 недель: Критерий Краскела-Уоллиса: $H(3, N=29) = 5,93$ $p=0,015$, Критерий Краскела-Уоллиса: $H(2, N=26) = 0,58$ $p=0,75$ – для опытных групп. Межгрупповые различия для срока

12 недель: Критерий Краскела-Уоллиса: $H(3, N=17) = 5,85$ $p = 0,12$. (Рисунок 32Б). Вероятности отличия от контроля: у группы 2Гр*18 на всех сроках $p < 0,05$, у группы 4Гр*9 $p < 0,01$ на сроке 4 недели и $p < 0,05$ на сроке 8 недель, у группы 6Гр*6 $p < 0,001$ на сроках 4 и 8 недель.

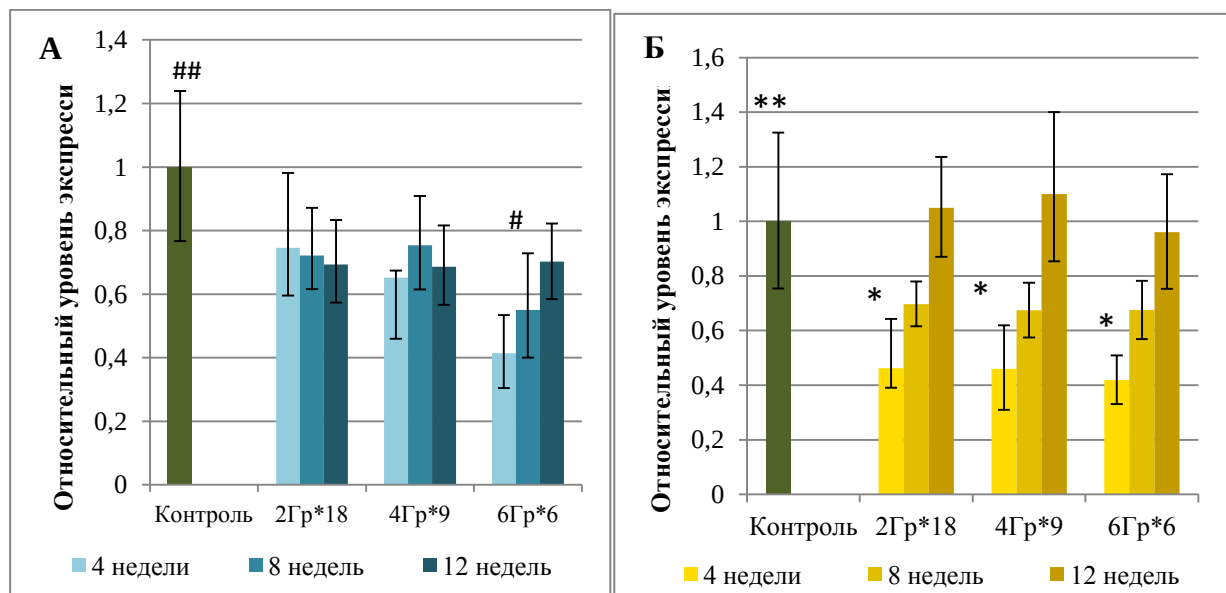


Рисунок 32. Количественный ПЦР-анализ мРНК VEGF в гиппокампе (а) и префронтальной коре (б) крыс, подвергнутых фракционированному облучению по схемам с фиксированной СОД и различной БЭД.

$p < 0,05$ по сравнению с каждой из опытных групп на сроках 4, 8 и 12 недель. # $p < 0,05$ по сравнению с 2Гр*18 на сроке 4, 8 и 12 недель, 4Гр*9 на сроке 8 и 12 недель, 6Гр*6 на сроке 12 недель. ** $p < 0,05$ по сравнению с каждой из опытных групп на сроках 4 и 8 недель. * $p < 0,05$ по сравнению с аналогичной группой на сроке 8 и 12 недель

Уровень мРНК GFAP в гиппокампе на 4 и 8 неделе после облучения не отличался от уровня экспрессии в контрольных образцах. Критерий Краскела-Уоллиса: $H(3, N=29) = 2,67$ $p = 0,44$ – для срока 4 недели, Критерий Краскела-Уоллиса: $H(3, N=26) = 1,452767$ $p = 0,6932$ – для срока 8 недель. Через 12 недель экспрессия GFAP падает в 2 раза по сравнению с контролем (для каждой из опытных групп $p < 0,01$). Между тремя опытными группами с различными вариантами фракционирования различий не обнаружено. Критерий Краскела-Уоллиса: $H(3,$

$N=27$) $=14,86$ $p=0,0019$ – для всех групп, Критерий Краскела-Уоллиса: $H(2, N=21) = 2,32$ $p=0,31$ – для опытных групп. (Рисунок 33А).

Уровень мРНК *GFAP* в префронтальной коре на 4 неделе после окончания облучения увеличивается прямо пропорционально БЭД (Критерий Краскела-Уоллиса: $H(3, N=31) = 13,14$ $p = 0,0043$ – для всех групп). При анализе упорядоченности обнаружена зависимость повышения экспрессии в ряду 2Гр*18, 4Гр*9, 6Гр*6 (критерий Джонхиера 48, $p < 0,05$, $p < 0,001$ по сравнению с контролем у 4Гр*9 и 6Гр*6), однако уровень мРНК *GFAP* в группе 2Гр*18 не отличался от контроля. К 8 неделе экспрессия снижается до значений контрольных крыс у группы 4Гр*9, но у группы 6Гр*6 все еще остается значимо выше контроля ($p < 0,01$) (Критерий Краскела-Уоллиса: $H(3, N=42) = 30,39$ $p < 0,001$) и становится равным значению экспрессии у здоровых необлученных крыс только к 12 неделе (Критерий Краскела-Уоллиса: $H(3, N=33) = 2,55$ $p = 0,46$). (Рисунок 34Б). Таким образом, достоверно показано, что увеличение уровня мРНК *GFAP* в префронтальной коре головного мозга прямо пропорционально БЭД. Так, у группы 2Гр*18 он не поднимается выше контрольных значений на всех сроках после облучения, у группы 4Гр*9 достигает значения 1,64 и к 8 неделе снижается до уровня контрольных животных, у группы 6Гр*6 на 8 неделе повышен так же, как у группы 4Гр*9 на 4 неделе и достигает значений контрольных животных к 12 неделе. На 12 неделе экспрессия мРНК *GFAP* не отличается в опытных и контрольной группе. (Рисунок 33Б).

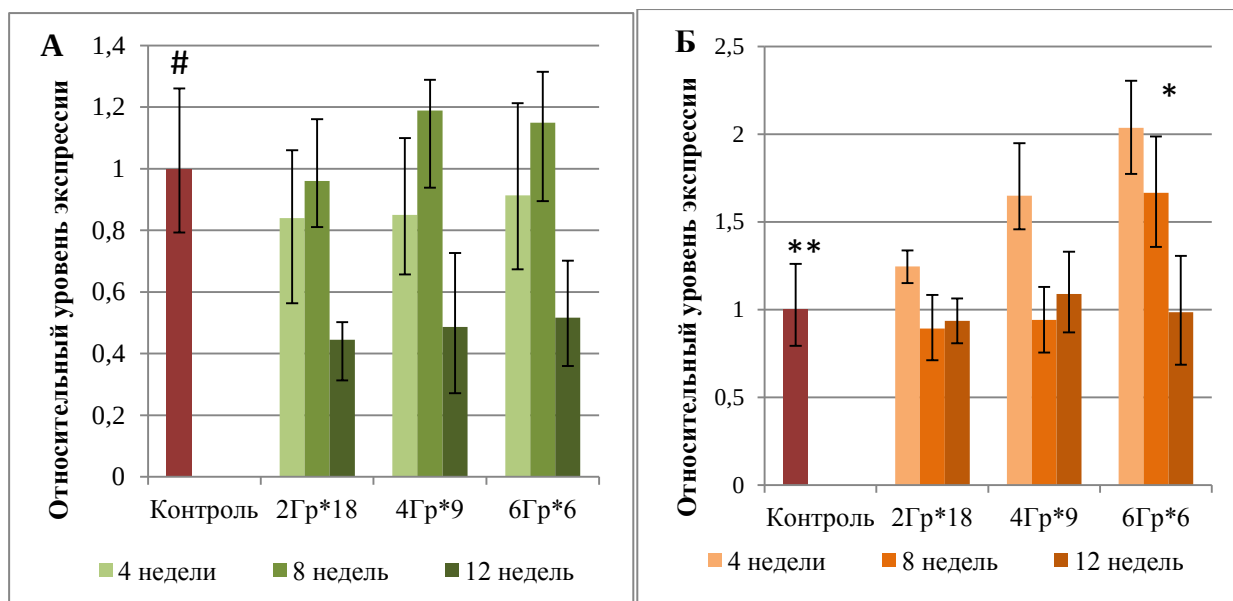


Рисунок 33. Количественный ПЦР-анализ мРНК *GFAP* в гиппокампе (а) и префронтальной коре (б) крыс, подвергнутых фракционированному облучению по схемам с фиксированной СОД и различной БЭД.

*#p<0,01 по сравнению с каждой из опытных групп на сроке 12 недель. **p<0,05 по сравнению с 4Гр*9 на сроке 4 недели и 6Гр*6 на сроке 4 и 8 недель. *p<0,05 по сравнению с 6Гр*6 на сроке 4 недели*

Исходя из приведенных данных, можно говорить о различном влиянии трех протоколов облучения с фиксированной СОД и различной БЭД на снижение экспрессии гена *VEGF* в гиппокампе и повышение экспрессии гена *GFAP* в префронтальной коре на 4 и 8 неделе. В тоже время, следует отметить, что снижение уровня экспрессии гена *GFAP* в гиппокампе на 12 неделе после облучения, *VEGF* в префронтальной коре на 4 и 8 неделе не зависело от варианта фракционирования фиксированной суммарной дозы.

5.2 Исследование изменения экспрессии белков *VEGF* и *GFAP*

При анализе экспрессии белков *VEGF* и *GFAP* в головном мозге крыс после воздействия фракционированного облучения с фиксированной СОД и различной БЭД на сроке 4 недели при иммуногистохимическом исследовании в передней коре крыс отмечено уменьшение количества *VEGF*-позитивных сосудов по сравнению с контрольными образцами срезов мозга, однако отсутствуют дозозависи-

мые изменения исследуемого антигена. Зависимость от варианта фракционирования наблюдается при анализе экспрессии GFAP. В срезах передней коры наблюдается увеличение GFAP-позитивных астроцитов с нарастанием БЭД (в ряду 2Гр*18, 4Гр*9, 6Гр*6) (Рисунок 34).

При иммуногистохимическом анализе срезов мозга на уровне гиппокампа на сроке 4 недели после облучения интенсивность флуоресценции VEGF была также снижена во всех опытных группах по сравнению со здоровыми необлученными животными. Отличия в интенсивности флуоресценции GFAP по данным иммуногистохимического анализа не выявлены (Рисунок 35).

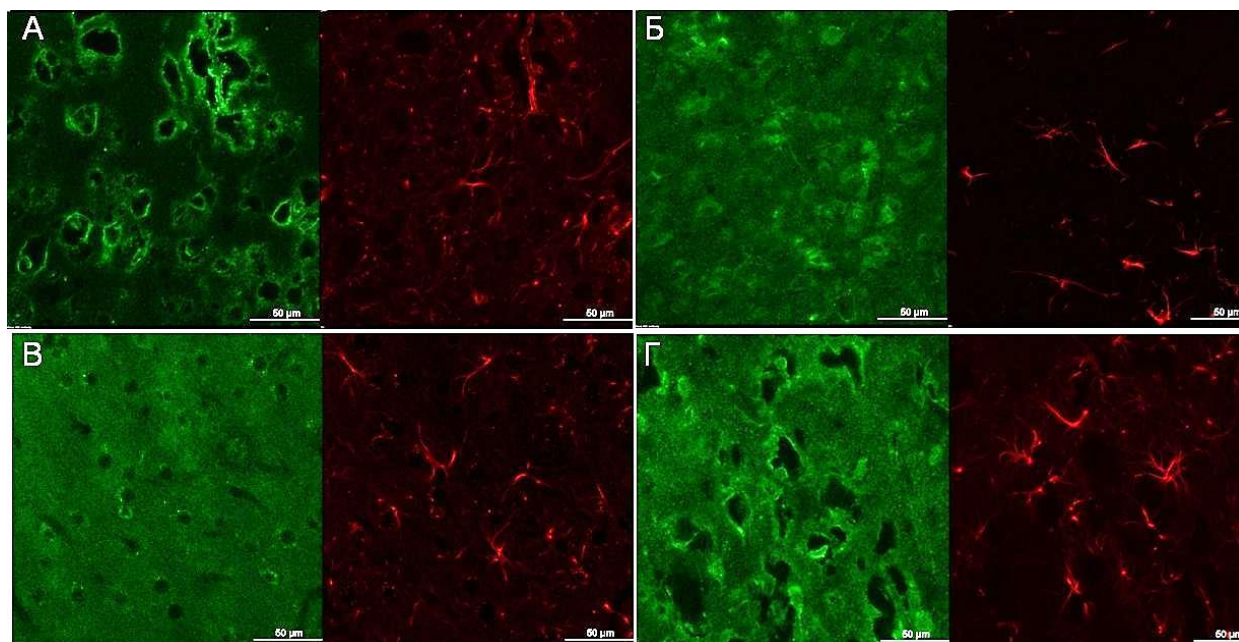


Рисунок 34. Иммуногистохимический анализ VEGF и GFAP в передней коре головного мозга крыс после различных вариантов фракционированного облучения на сроке 4 недели после воздействия.

Зеленая флуоресценция – MabVEGF + Anti-mouse Alexa 488, красная флуоресценция – RabGFAP + Anti-rabbit Alexa 594

*А – контроль; Б – 2Гр*18; В – 4Гр*9; Г – 6Гр*6. 50мкм*

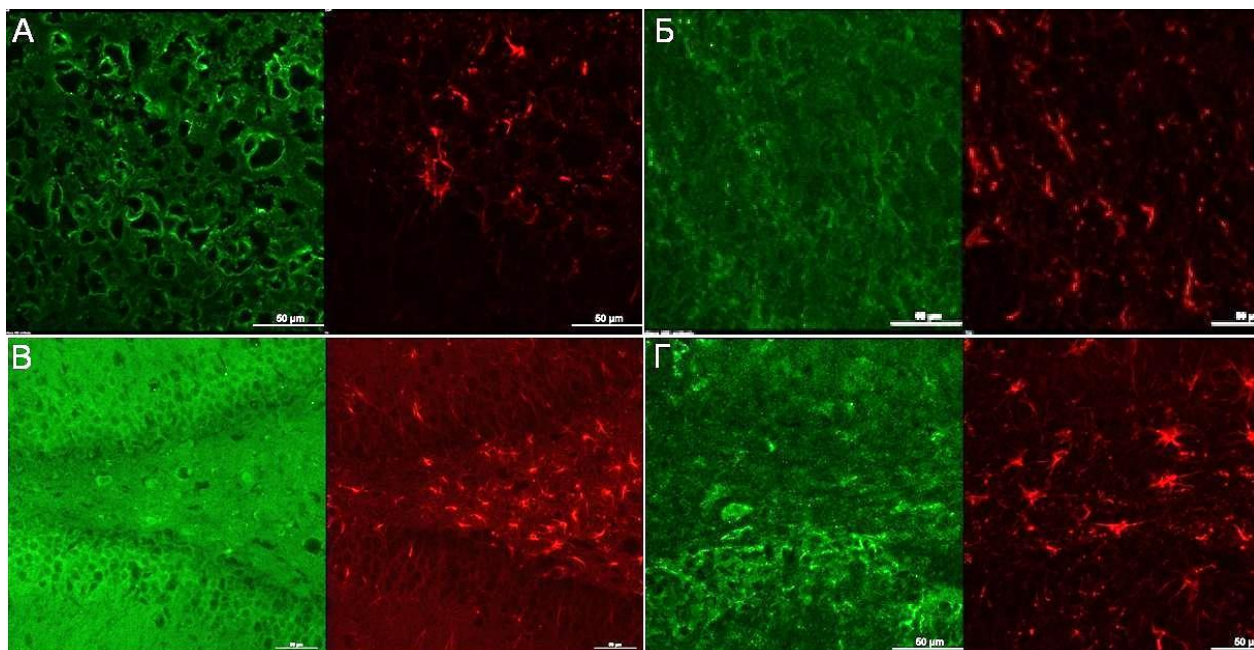


Рисунок 35. Иммуногистохимический анализ VEGF и GFAP в гиппокампе головного мозга крыс после различных вариантов фракционированного облучения на сроке 4 недели после воздействия.

Зеленая флуоресценция – MabVEGF + Anti-mouse Alexa 488, красная флуоресценция – PabGFAP + Anti-rabbit Alexa 594

*А – контроль; Б – 2Гр*18; В – 4Гр*9; Г – 6Гр*6. 50мкм*

На сроке 12 недель после облучения проводился программный обсчет интенсивности флуоресценции в иммунохимическом анализе. Экспрессия VEGF была снижена для группы 6Гр*6 (межгрупповые различия $F=40,2$ (1;3) $p<0,001$ – для всех групп, $F=1,33$ (1;2) $p=0,29$ – без группы 6Гр*6). Экспрессия GFAP в передней коре не различалась между опытными и контрольной группой $F=2,18$ (1;3) $p=0,10$ (Рисунок 36, 37).

В гиппокампе на сроке 12 недель после облучения экспрессия VEGF была дозозависимо снижена. Межгрупповые различия $F=164,77$ (1;3) $p<0,001$. Для каждой из групп при попарном сравнении $p<0,01$, группы 2Гр*18 и контроль $p=0,65$. Уровень экспрессии GFAP также был дозозависимо снижен во всех опытных группах. (Рисунок 38, 39). Межгрупповые различия $F=58,98$ (1;3) $p<0,001$. Для каждой из групп при попарном сравнении $p<0,01$, группы 4Гр*9 и 6Гр*6 $p=0,5$.

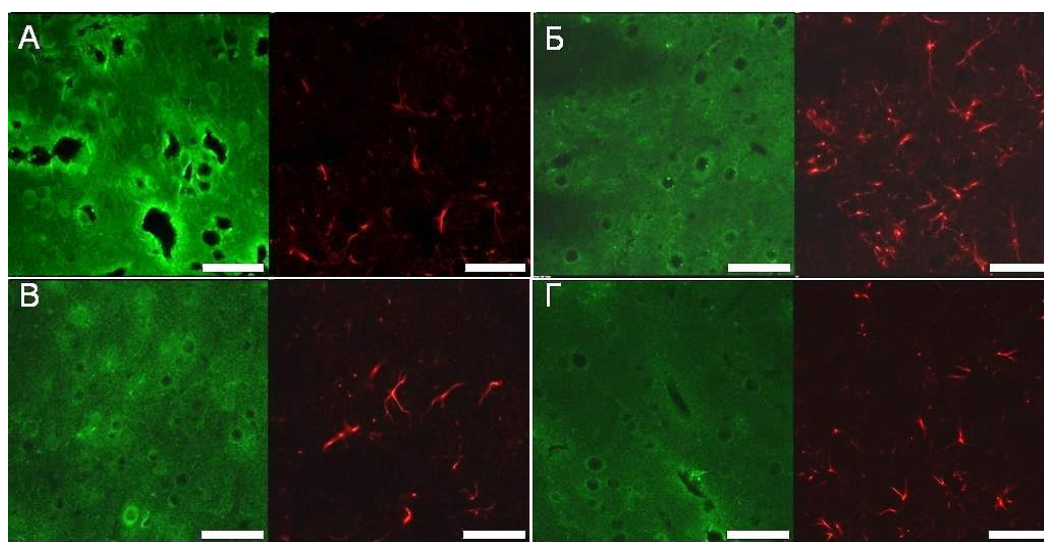


Рисунок 36. Иммуногистохимический анализ VEGF и GFAP в передней коре головного мозга крыс после различных вариантов фракционированного облучения на сроке 12 недель после воздействия.

Зеленая флуоресценция – MabVEGF + Anti-mouse Alexa 488, красная флуоресценция – PabGFAP + Anti-rabbit Alexa 594

*А – контроль; Б – 2Гр*18; В – 4Гр*9; Г – 6Гр*6. 50мкм*

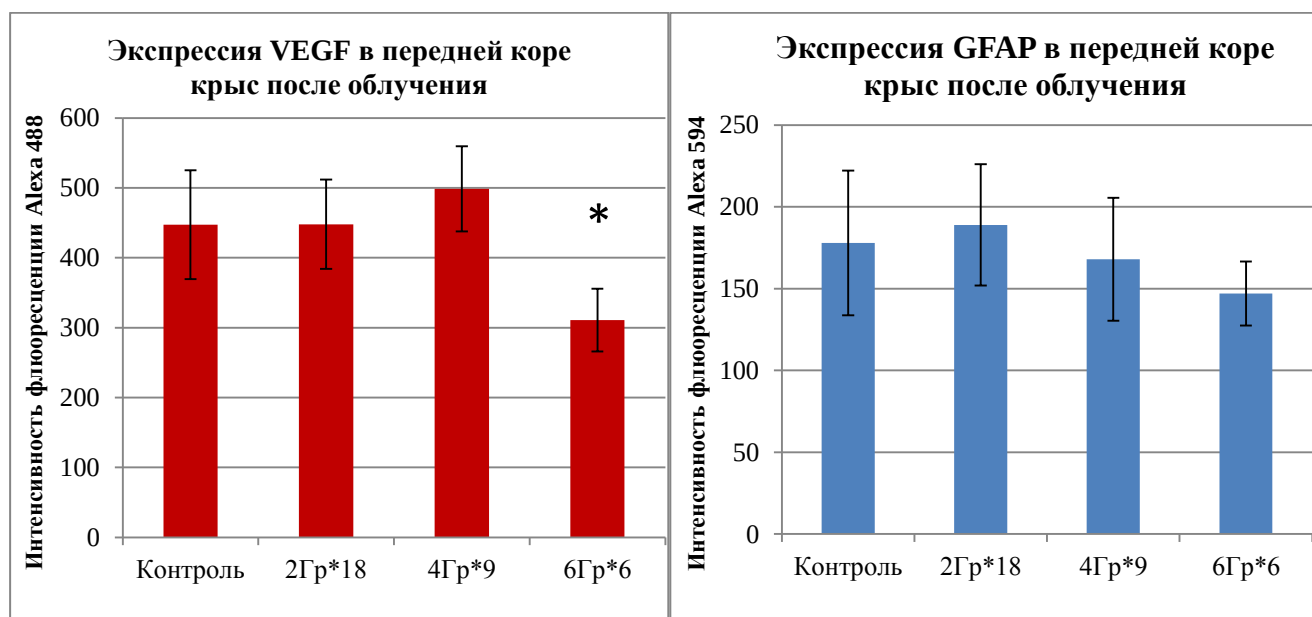


Рисунок 37. Анализ интенсивности флуоресценции Alexa 488 и 594 в составе комплексов PabGFAP + Anti-rabbit Alexa 594 и MabVEGF + Anti-mouse Alexa 488 в префронтальной коре головного мозга крыс после различных вариантов фракционированного облучения на сроке 12 недель после воздействия.

** $p < 0,01$ по сравнению со всеми группами*

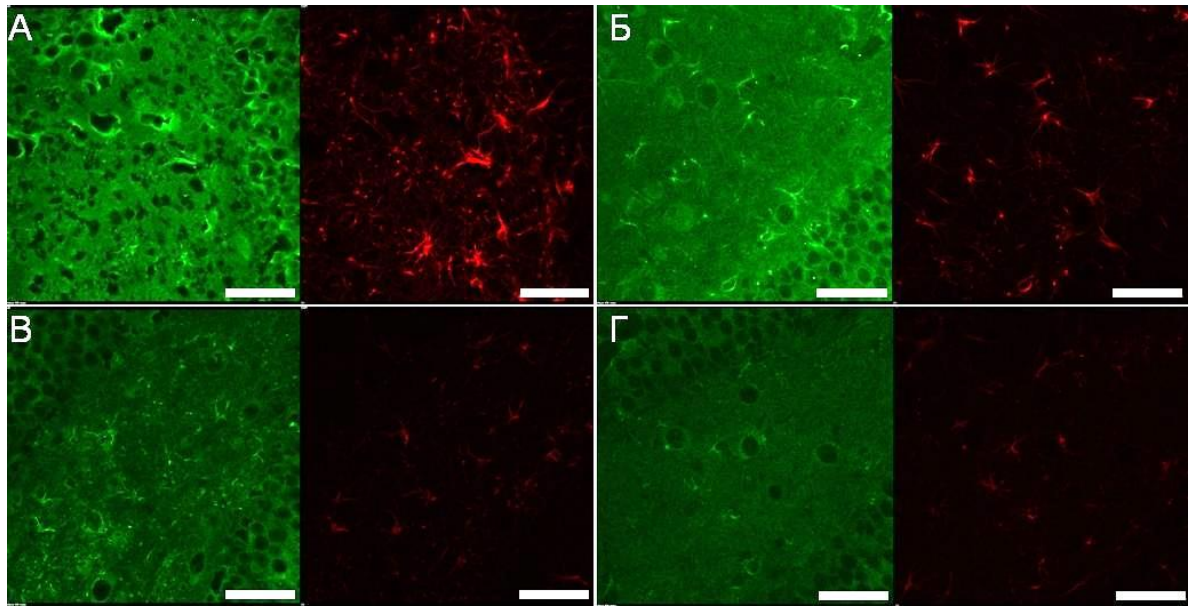


Рисунок 38. Иммуногистохимический анализ VEGF и GFAP в гиппокампе головного мозга крыс после различных вариантов фракционированного облучения на сроке 12 недель после воздействия.

Зеленая флуоресценция – MabVEGF + Anti-mouse Alexa 488, красная флуоресценция – PabGFAP + Anti-rabbit Alexa 594

*А – контроль; Б – 2Гр*18; В – 4Гр*9; Г – 6Гр*6. 50мкм*

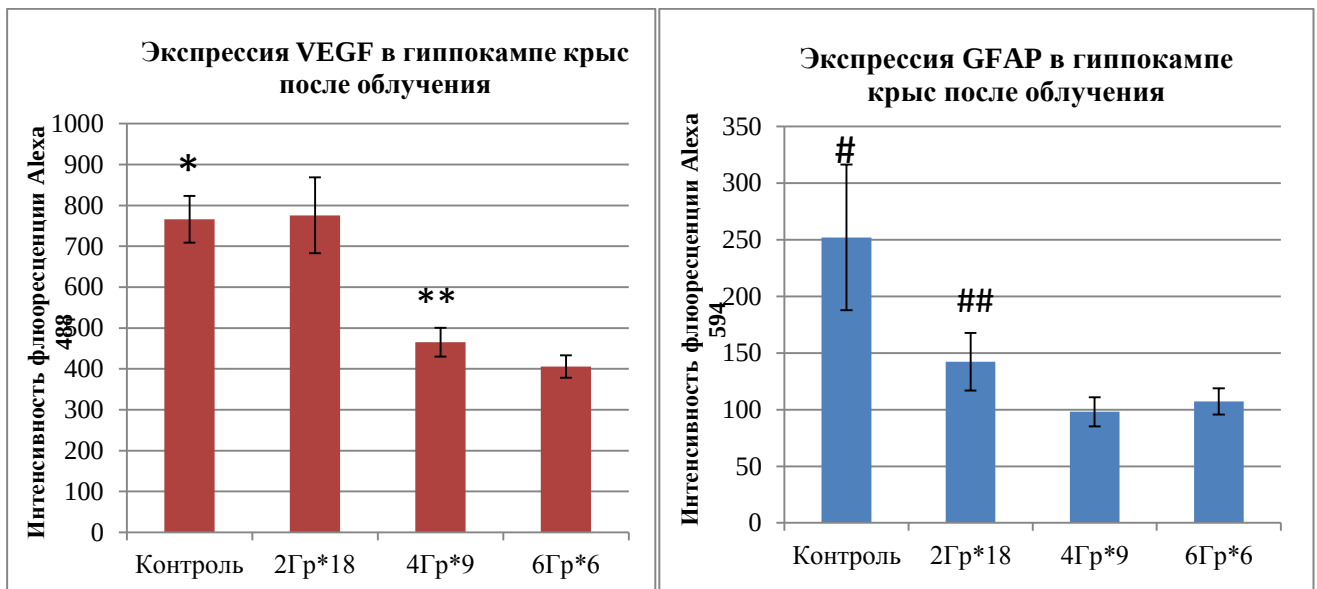


Рисунок 39. Анализ интенсивности флуоресценции Alexa 488 и 594 в составе комплексов PabGFAP + Anti-rabbit Alexa 594 и MabVEGF + Anti-mouse Alexa 488 в гиппокампе головного мозга крыс после различных вариантов фракционированного облучения на сроке 12 недель после воздействия.

** $p < 0,01$ по сравнению с группами 4Гр*9 и 6Гр*6, * $p < 0,05$ по сравнению с группами 2Гр*18 и 6Гр*6, # $p < 0,01$ по сравнению со всеми опытными группами, ## $p < 0,01$ по сравнению с группами 4Гр*9 и 6Гр*6*

Таким образом, фракционированное облучение вызывает изменение экспрессии генов и белков GFAP и VEGF в гиппокампе и в префронтальной коре головного мозга крыс. При фракционировании фиксированной СОД в соответствии с тремя различными протоколами:

- Показано **снижение** экспрессии белка и гена VEGF в префронтальной коре на 4 неделе, причем степень снижения не зависела от варианта фракционирования и дальнейшее увеличение экспрессии, уровень мРНК равный контролю регистрировался на 12 неделе; экспрессия белка VEGF у группы 6Гр*6 оставалась понижена на сроке 12 недель.
- Показано **снижение** экспрессии белка и гена VEGF в гиппокампе на всех сроках, причем уменьшение уровня мРНК VEGF на 4 неделе прямо пропорционально РОД; обнаружено снижение экспрессии белка в зависимости от дозы облучения.
- Показано **увеличение** экспрессии белка и гена GFAP в префронтальной коре, уровень мРНК равный контролю регистрировался на сроке 8 недель у групп 2Гр*18 и 4Гр*9 и 12 недель у группы 6Гр*6; степень увеличения прямо пропорциональна ежедневной дозе.
- Показано **снижение** экспрессии белка и гена GFAP в гиппокампе на 12 неделе, причем степень снижения мРНК GFAP не зависела от варианта фракционирования и была выше у группы 2Гр*18 по сравнению группами 4Гр*9 и 6Гр*6 при анализе экспрессии белка.

Глава 6. Обсуждение

Редко ионизирующее фотонное излучение широко используется в медицине для терапии опухолей головного мозга [5]. Побочные эффекты воздействия ИИ в первую очередь затрагивают структуру и функции ГЭБ [106]. Поэтому в данном исследовании мы изучали биохимические маркеры нарушения проницаемости ГЭБ *in vitro* и *in vivo*.

Модель ГЭБ *in vitro*, используемая в данной работе и представляющая собой кокультуру клеток HUVEC и астроцитов, обладает всеми свойствами барьерного эндотелия: повышенным трансэндотелиальным сопротивлением, снижением диффузной проницаемости, а также наличием экспрессии белков плотных и адгезивных контактов [1]. Основываясь на предыдущих результатах применения данной модели [1,2,66], мы использовали ее для изучения процессов нарушения проницаемости ГЭБ при воздействии редко ионизирующего фотонного излучения. Полученные нами результаты могут быть спроецированы на процессы, происходящие *in vivo*. В литературе также встречается исследование влияния ИИ на такие модели, как и использованием HUVEC, так и с препаратом кокультуры астроцитов и церебральных эндотелиоцитов [106].

По литературным данным, радиационно-индуцированные нарушения морфологии клеток характеризуются истончением базальной мембраны, вакуолизацией цитоплазмы и набуханием клеток [92]. Такие изменения обнаруживались нами на сроках 24 и 48 часов после воздействия ИИ при всех исследуемых дозах 2, 4 и 6 Гр. Через два часа после облучения мы наблюдали появление веретеновидных клеток при дозах 4 и 6 Гр, при самой маленькой исследованной дозе (2 Гр) такие клетки не визуализировались.

В нашем исследовании мы обнаружили многоядерные клетки только при самой большой дозе облучения (6 Гр) на сроке 48 часов, что говорит о дозозависимом эффекте. Аналогичный эффект был показан в работе Rombouts соавт. [103]. Увеличение в объеме и появление многоядерных клеток являются признаком нарушения митоза [46]. В нашей работе через 48 часов после воздействия визуализируются клетки в стадии апоптоза, характерном явлении при облучении [4].

Появление апоптотических клеток также зависит от дозы облучения: они не обнаруживаются при дозе 2 Гр и заметны при больших дозах 4 и 6 Гр.

Уже через два часа после облучения культур клеток дозами 2, 4 и 6 Гр ранее плотно прилегающие друг к другу клетки начинают разобщаться, межклеточные промежутки увеличиваются с течением времени. Плотнo сомкнутые клетки – характерный признак формирования барьерного фенотипа HUVEC. Нарушение данного свойства говорит об увеличении проницаемости барьера. Схожие изменения, сопровождающиеся снижением трансэндотелиального сопротивления и увеличением проницаемости для 10 кДа декстрана и 70 кДа овальбумина в моно-слое церебральных эндотелиоцитов и клеток HUVEC после гамма облучения показаны и в литературе [106].

Благодаря наличию плотных и адгезивных контактов, тесно взаимодействующих друг с другом, реализуется барьерная функция эндотелиоцитов. Поэтому изучение их структурных компонентов важно для понимания механизмов увеличения проницаемости после воздействия редко ионизирующего фотонного излучения. В нашей работе мы исследовали изменение экспрессии ZO-1, клаудина 5, β -катенина и VE кадгерина, а также соответствующих им генов. ZO-1 является первым обнаруженным компонентом плотных контактов [1]. Клаудин 5 – наиболее распространенный в эндотелиоцитах белок семейства клаудинов, важных компонентов плотных контактов, непосредственно образующих барьер, ограничивающий параклеточный транспорт [15]. VE кадгерин – белок адгезивных контактов семейства кадгеринов, типичный только для эндотелиоцитов. Кадгерины являются трансмембранными белками, непосредственно обеспечивающих и контролирующих плотное соединение клеток [121]. β -катенин – белок адгезивных контактов, связанный с цитоплазматическим доменом кадгерина. Взаимодействие всех указанных выше белков в структуре ГЭБ изображено на рисунке 2. Таким образом, выбранные нами белки непосредственно участвуют в соединении эндотелиоцитов, образующих ГЭБ. Следовательно, уменьшение синтеза этих белков и соответствующих им генов является объяснением некоторых механизмов нарушения барьерных свойств кокультуры клеток.

Проведенный нами иммунофлуоресцентный анализ белков плотных контактов показал уменьшение их экспрессии с течением срока, прошедшего после облучения. Уровень мРНК *ZO-1* и *клаудина 5* стал равен экспрессии в монокультуре HUVEC, которая не обладает необходимыми свойствами для формирования барьера. Иммунофлуоресцентный анализ белков адгезивных контактов показал такой же характер изменения экспрессии, как и для плотных контактов. Выявлено снижение уровня мРНК *β -катенина* и *VE кадгерина* ниже уровня монокультуры. Это предположительно связано с тем, что HUVEC, кокультивированные с аллогенными астроцитами, не показывают увеличения экспрессии данных генов. Уменьшение синтеза белков межклеточных контактов после гамма облучения также показано другими исследователями [106].

Дозозависимые эффекты редко ионизирующего фотонного излучения выявлены при анализе экспрессии *β -катенина* на сроке 2 часа после облучения. Можно предположить, что наблюдаемый дозозависимый эффект на экспрессию *β -катенина* говорит о его, возможно, большем вкладе в формирование повреждения, вызванного воздействием редко ионизирующего фотонного излучения. Таким образом, описанные нами изменения экспрессии белков межклеточных контактов и соответствующих генов, отражают биохимические изменения структурных компонентов ГЭБ.

Немаловажным компонентом ГЭБ являются щелевые контакты между астроцитами. Щелевые контакты в нервной системе функционируют как электрические синапсы, играющие ключевую роль в межклеточных взаимодействиях. Они также выступают в качестве каналов для обмена молекул с сигнальными свойствами между цитоплазмой и внеклеточной средой [33]. Воздействие ИИ на функциональную активность щелевых контактов важно для понимания механизмов увеличения проницаемости ГЭБ. При воздействии редко ионизирующего излучения на культуру астроцитов нарушается структура и функционирование щелевых контактов [16,17], необходимых для передачи сигнала посредством кальциевой сигнальной системы [35].

В нашем исследовании показано влияние ионизирующего излучения и на структуру (анализ экспрессии гена и белка *Cx43*, одного из основных белков щелевых контактов) и на функции щелевых контактов методом проточной цитофлуориметрии и флуоресцентной микроскопии в культуре астроцитов крысы.

Эксперимент по изучению функционирования щелевых контактов мы проводили при помощи исследования переноса красителя САМ от облученных (донорных) клеток к реципиентным (необлученным). САМ передается из одной клетки в другую только посредством щелевых контактов и, соответственно, отражает их функционирование [11,17, 44,72].

Воздействие ИИ на перенос красителя САМ посредством щелевых контактов оценивалось путем измерения соотношения процента донорных к проценту реципиентных клеток. Этот показатель снизился на сроке 2 часа после облучения в 3 раза по сравнению с контролем для доз 2 и 6 Гр, и в 4 раза при дозе 0,5 Гр. Однако полного блокирования функции щелевых контактов, как при воздействии карбеноксолона на культуру клеток астроцитов крысы, не происходит. Это говорит о дозозависимом снижении функциональной активности щелевых контактов и нарушении взаимодействия друг с другом астроцитов – структурных компонентов ГЭБ.

Cx43 является одним из основных белков, входящих в состав щелевых контактов. При анализе уровня мРНК *Cx43* в культурах облученных и необлученных клеток показано, что снижение экспрессии происходило на сроке 5 часов после облучения, и далее возрастало с увеличением дозы на сроке 24 часа (более чем в 10 раз для дозы 6 Гр). На сроке 48 часов уровень мРНК *Cx43* не отличался от контроля для дозы 0,5 Гр и был немного повышен для доз 2 и 6 Гр.

В нашей работе показано дозозависимое снижение экспрессии белка *Cx43*. На сроке 5 часов после облучения оно соотносится с изменением экспрессии гена данного белка. На более длительных сроках экспрессия белка постепенно возрастает, оставаясь сниженной в клетках, облученных дозами 2 и 6 Гр. При возросшей экспрессии гена это говорит о возможном нарушении в процессе трансляции белка. Также быстрое выключение трансляции белка – вариант ответа на поврежде-

ние клетки от внешнего воздействия, в том числе облучения. Это позволяет клетке экономить ресурсы и энергию для устранения повреждений [113]. Таким образом, дозозависимый эффект был продемонстрирован во всех экспериментах по изучению влияния ИИ на щелевые контакты. Нарушение экспрессии белка Sx43 и соответствующего ему гена свидетельствует о нарушении структуры межклеточных контактов и может являться объяснением некоторых механизмов изменения их функциональной активности.

В литературе, эксперименты по влиянию ИИ на структуру и функцию щелевых контактов рассмотрен только с точки зрения возникновения так называемого «эффекта свидетеля» [17], который реализуется благодаря ключевой роли щелевых контактов в межклеточных взаимодействиях [33]. Суть его состоит в том, что эффекты, вызванные воздействием ИИ, могут затрагивать не только непосредственно облученные клетки, но и взаимодействующие с ними. В данной работе этот эффект не был изучен, однако полученные дозозависимые эффекты ИИ на структуру и функции щелевых контактов могут явиться первым шагом на пути изучения этой проблемы.

Также щелевые контакты между клетками глиомы и реактивными астроцитами вовлечены в механизмы инвазии глиомы [95]. Радиотерапия, являясь одним из основных методов лечения данной патологии, несомненно, влияет в том числе и на щелевые контакты, как показано в нашем исследовании. Изучение данного вопроса в дальнейшем может помочь поиску более эффективных методов лечения злокачественных опухолей головного мозга.

Таким образом, эксперименты *in vitro* показали зависимое от дозы и срока после облучения нарушение биохимических маркеров проницаемости ГЭБ: уменьшение экспрессии белков плотных, адгезивных и щелевых контактов и соответствующих генов, а также действие ИИ на морфологию эндотелиоцитов, потерю их барьерного фенотипа и значительное снижение функциональной активности щелевых контактов.

На основании полученных данных были запланированы и проведены исследования на животных, которые включали в себя исследование маркеров наруше-

ния проницаемости ГЭБ в двух направлениях: мозг-кровь и кровь-мозг, а также исследование изменение экспрессии VEGF и GFAP, как белков основных клеток, формирующих ГЭБ. Эксперименты *in vivo* ставили перед собой задачу изучения биохимических маркеров нарушения проницаемости ГЭБ после различных вариантов фракционированного облучения, применяющегося в клинике для достижения желаемых эффектов по терапии опухоли и снижением токсичности для нормальных тканей мозга.

Известно, что нарушение проницаемости ГЭБ в направлении мозг-кровь ведет к увеличению количества нейроспецифических белков в крови [5]. GFAP является основным белком астроцитов и наиболее часто определяемым белком, свидетельствующим о нарушении целостности ГЭБ при различных патологиях, например, ишемии [88], глиобластоме [55]. Кроме того, степень увеличения сывороточного GFAP используется как прогностический фактор, коррелирует с объемом опухоли и степенью злокачественности [27].

В нашем исследовании фракционированное воздействие редко ионизирующего фотонного излучения вызывает повышение уровня GFAP в плазме крови. Однако повышение концентрации было различно на сроках от 0,5 до 12 недель после облучения. Увеличение концентрации GFAP было зарегистрировано с 2 по 4 и с 8 по 12 неделю после облучения с максимумом на 10 неделе. На 6 неделе после облучения концентрация GFAP не была повышена. Это связано двумя волнами раннего и позднего ответов ткани на лучевое повреждение. Вероятным объяснением такого феномена могут служить иммунные механизмы. При нарушении ГЭБ в плазме крови появляется нейроспецифический белок GFAP. Ранее этот антиген был недоступен контакту с факторами иммунитета, поэтому после увеличения его концентрации в кровотоке, появляется иммунный ответ. Появление в крови ауто-антител к нейроспецифическим белкам, в частности, к GFAP, описано при патологиях головного мозга [56,57]. Действием ауто-антител можно объяснить механизм вторичных поздних повреждений ткани головного мозга. Два пика увеличения сывороточной концентрации GFAP после облучения было показано после однократного гамма облучения [5]. После воздействия однократной дозы 75

Гр наблюдалось увеличение проницаемости для красителя Evans Blue в коре на 8 и 12 неделе после облучения, с отсутствием такого эффекта на 1 и 4 неделе [75]. В нашем исследовании при анализе GFAP в плазме крови максимальное увеличение проницаемости также было замечено на сроках от 8 до 12 недель.

Отсутствие дозозависимого эффекта связано, вероятно, с тем, что сывороточный уровень GFAP является косвенным показателем нарушения проницаемости ГЭБ. По литературным данным, нарастание проницаемости вовсе не обязательно является дозозависимым при облучении. Так при анализе проницаемости для [14C]-сахарозы через 24 и 48 часов после облучения при дозах 4, 12 и 25 Гр различий выявлено не было[41].

Увеличение проницаемости ГЭБ, возникающее после облучения, помимо патологических эффектов, как проникновение в головной мозг чужеродных веществ, может также нести и позитивные эффекты, благодаря улучшенной доставке в ткани мозга агентов для химиотерапии опухолей. Для реализации этой задачи необходимо выработать стратегии по простым и доступным методам анализа увеличения проницаемости ГЭБ. Простота определения и широкое использование измерения сывороточной концентрации GFAP в клинике может применяться для определения ответов ткани на лучевое воздействие у каждого конкретного пациента. Мониторинг сывороточной концентрации нейроспецифических белков как параметра оценки проницаемости ГЭБ при лучевой терапии может использоваться при комбинировании химио и лучевой терапии, что является одной из стратегий по улучшению лечения пациентов с опухолями головного мозга [99,100].

Прямым показателем увеличения проницаемости ГЭБ в направлении кровь-мозг является обнаружение в ткани мозга веществ, в норме не проникающих через барьер. В нашем исследовании мы использовали в качестве таких препаратов анти-GFAP и анти-VEGF антитела, меченные флуоресцентными красителями. Обнаружение их флуоресценции в ткани мозга, а не в сосудистом русле, свидетельствует о прохождении этих веществ через ГЭБ.

Для того чтобы убедиться в том, что обнаруженная флуоресценция не является светимостью отщепившейся низкомолекулярной метки, было проведено ис-

следование по деградации меченых антител в плазме крови, где было зафиксировано отделение не более 5% метки от комплекса антитело-краситель на сроке 72 часа после начала инкубации. Полученный результат позволяет нам принимать флуоресценцию на срезах мозга за флуоресценцию комплекса антитело-краситель и, следовательно, не может быть связан с прохождением низкомолекулярной метки, отделившейся от высокомолекулярного комплекса.

Внутривенное введение неспецифических и специфических иммуноглобулинов, меченных флуоресцентной меткой, проводилось на 10 неделе после облучения, на пике увеличения проницаемости ГЭБ по данным иммуноферментного анализа. Флуоресценция неспецифических иммуноглобулинов визуализировалась только в микроциркуляторном русле и практически полностью отсутствовала спустя 72 часа после введения. В связи с этим введение специфических иммуноглобулинов, проводили на этом сроке. После введения анти-GFAP и анти-VEGF антител равномерно на срезах мозга на уровне различных отделов (префронтальная кора, гиппокамп, мозолистое тело, стриатум, мозжечок) была обнаружена флуоресценция меченых белков, в норме не проходящих через ГЭБ. После иммуногистохимического анализа данных срезов показано, что флуоресценция от внутривенно введенных антител обнаруживается в клетках-мишенях, экспрессирующих VEGF и GFAP, а не в микроциркуляторном русле, что свидетельствует о нарушении ГЭБ в направлении кровь-мозг. В литературе показано, что увеличение проницаемости ГЭБ наблюдается и при терапевтических дозах облучения [38, 119, 132]. Для увеличения проницаемости необходима доза от 20 до 30 Гр с фракционированием 3 Гр [100]. В данном эксперименте была использована схема фракционированного облучения дозой 6 Гр в количестве 6 фракций. Таким образом, полученные нами данные по увеличению проницаемости ГЭБ после воздействия ИИ согласуются с данными мировой литературы. Результаты, показывающие способность высокомолекулярных веществ проходить через ГЭБ на определенных сроках после облучения, могут помочь исследовать новые терапевтические стратегии для лечения патологий головного мозга.

Одной из причин увеличения проницаемости ГЭБ является нарушение структур клеток, образующих барьер. В нашем исследовании изменение экспрессии белков эндотелиоцитов и астроцитов, VEGF и GFAP, а также кодирующих их генов в здоровой ткани мозга крыс, обнаружено на поздних сроках после фракционированного облучения – от 4 до 12 недель.

Данные сроки проведения исследования были выбраны, поскольку нас интересовали поздние эффекты облучения, актуальные для практикующих врачей-радиологов при выборе доз и схемы фракционирования у пациентов. Ранние лучевые повреждения возникают в течение первых нескольких часов до нескольких недель после облучения. У людей возникает две волны поздних лучевых повреждений: ранние отсроченные от 1 до 6 месяцев после радиационного воздействия и поздние отсроченные, возникающие более чем через 6 месяцев [48].

Различные структуры мозга по-разному реагируют на радиационное воздействие. Следует ожидать, что наибольший эффект облучение окажет на пролиферирующие клетки. Во взрослом мозге к таким структурам относятся субвентрикулярная зона и гиппокамп. Однако при рассмотрении полной картины лучевого повреждения мозга ключевая роль негативных эффектов воздействия ИИ на эндотелиальные клетки и клетки глии в этих отделах мозга не подтверждена [23].

По классическим представлениям, радиационно-индуцированное повреждение головного мозга рассматривается как потеря пролиферативной способности глиальных и эндотелиальных клеток [48]. Радиационно-индуцированное повреждение эндотелиоцитов головного мозга ведет к появлению участков некроза и развитию ишемии и, следовательно, должно ожидается увеличение экспрессии VEGF в тканях мозга, что и показано исследователями [60,126]. Кроме того VEGF вызывает пролиферацию, миграцию эндотелиоцитов, а также образование новых капилляров в ответ на повреждающее воздействие. Также увеличение экспрессии белка и мРНК *VEGF* показано после радиохирургического лечения на гамма ноже [30]. Повышение проницаемости ГЭБ с увеличением экспрессии VEGF после облучения показано в коре головного мозга [54]. В исследовании Wei и соавт. [127]

увеличение экспрессии наблюдалось только на 8 и 12 неделе после получения значительно большей, чем в нашем исследовании, разовой дозы в 75 Гр.

Нами было показано снижение экспрессии VEGF в гиппокампе и префронтальной коре на 4 и 8 неделе, к 12 неделе восстанавливалась до нормы в префронтальной коре, и была все еще снижена в гиппокампе при схемах фракционирования с единой СОД 36 Гр. В исследовании Lee и соавт. при облучении всего головного мозга дозой 10 Гр также показано уменьшение экспрессии гена *VEGF* и кодируемого им белка со снижением пролиферации и увеличением апоптоза эндотелиоцитов [70]. Кроме того, снижение экспрессии белка и кодирующего его белка может быть связано с нарушением процессов транскрипции и трансляции белка вследствие лучевого воздействия. Таким образом, литературные данные противоречивы, и это связано прежде всего с различными видами и схемами облучения, а также наблюдаемыми сроками.

При сравнении схем фракционирования нами было выявлена зависимость экспрессии *VEGF* от полученной БЭД в гиппокампе. Максимально низкий уровень зафиксирован при схеме облучения 6 Гр 6 фракций на сроке 4 недели после облучения. К 12 неделе экспрессия возрастала до значений других опытных групп, но все еще оставалась снижена. В префронтальной коре экспрессия *VEGF* также была снижена на 4 неделе и возросла до значений в контрольной необлученной группе к 12 неделе. В гиппокампе различий между вариантами фракционирования мы не обнаружили. В литературе фракционированное облучение всего головного мозга крыс применяется значительно реже, чем однократное воздействие. Схем фракционирования с единой суммарной общей дозой в литературе не встречается, в этом наше исследование является уникальным, поэтому сравнение полученных данных с работами других исследователей невозможно.

Показано, что радиационное воздействие вызывает реакцию астроглии, сопровождающуюся повышением GFAP в ткани мозга как на ранних, так и на поздних сроках после облучения [13,85,128]. Так, пролиферация, гиперплазия, гипертрофия астроцитов раньше появляется в белом веществе (мозолистое тело и ба-

хромка гиппокампа) и затем только в сером (кора, гиппокамп и хвостатое ядро). Гипертрофия астроцитов быстрее идет на спад в белом, нежели в сером веществе. В нашей работе показаны схожие результаты. По данным количественного ПЦР-анализа, экспрессия гена *GFAP* в префронтальной на 4 неделе после фракционированного облучения возрастала в зависимости от БЭД. Кроме того, было обнаружено увеличение количества GFAP-позитивных астроцитов при иммуногистохимическом анализе по сравнению с контролем. Далее к 12 неделе после воздействия экспрессия гена *GFAP* и кодируемого им белка восстанавливается до уровня необлученных животных.

Однако динамика изменения уровня GFAP в ткани мозга в течение времени и в разных структурах мозга не всегда однозначна. В нашем исследовании в гиппокампе было зафиксировано падение уровня мРНК *GFAP* на 12 неделе после фракционированного облучения. В мировой литературе также есть данные об уменьшении экспрессии GFAP [92,65], в том числе в мозжечке, мосте и стриатуме [73]. Объяснение такого эффекта, вероятно, связано как с неодинаковым ответом различных структур мозга на повреждающее воздействие ИИ, так и со сроками, прошедшими после облучения. Так, по литературным данным в гиппокампе здоровых крыс после фракционированного гамма облучения наблюдалась следующую динамику изменения экспрессии GFAP: уменьшение количества GFAP-положительных астроцитов через 30 дней, а также постепенное увеличение в течение 60 дней после облучения и вторичное более значительное снижение между 60 и 90 днем после облучения [18]. Следует отметить, что на том же сроке после облучения (12 недель), где авторы наблюдали вторичное значительное снижение GFAP-положительных астроцитов, в нашем исследовании также показано снижение экспрессии GFAP и соответствующего гена в гиппокампе, до этого срока экспрессия не отличалась от контроля. Вероятно, появление изменений в экспрессии GFAP на 12 неделе после облучения в гиппокампе и отсутствие таковых до этого срока также может свидетельствовать об иммунной природе таких повреждений, вызванных воздействием ауто-антител на ткани мозга.

При сравнении режимов фракционирования дозозависимый эффект показан не во всех случаях. Уровень VEGF в префронтальной коре и GFAP в гиппокампе не показал зависимость от БЭД. Эти данные говорят о том, что дозы, рассчитанные с помощью широко применяемой в настоящее время ЛК-модели, и, следовательно, предсказанные эффекты радиотерапии не всегда согласуются с экспериментальными данными, хоть и не противоречат им полностью. Вероятно, это связано с тем, что ЛК-модель была основана на выживаемости опухолевых клеток *in vitro*, поэтому не может полностью воспроизводить процессы, протекающие *in vivo*. В связи с этим результаты нашего исследования, как и данные мировой литературы [32, 37, 107], ставят вопрос об адекватности использования радиобиологических моделей, в частности ЛК-модели, для расчета доз и схем фракционированной радиотерапии и для оценки поздней токсичности. Это говорит о необходимости доклинических экспериментов на здоровых животных для сравнения повреждающего эффекта режимов фракционирования, а также выбора изоэффективных режимов.

Заключение

Воздействие редко ионизирующего фотонного излучения, полученного на линейном ускорителе мощностью 6 МэВ, привело к увеличению проницаемости ГЭБ в экспериментах *in vitro* и *in vivo*. На клетках HUVEC, кокультивированных с человеческими астроцитами, показано зависимое от дозы и от времени прошедшего после воздействия радиационно-индуцированное изменения морфологии клеток с увеличением межклеточных промежутков, а также снижение экспрессии белков плотных, адгезивных и щелевых контактов и соответствующих им генов, что говорит о нарушении структурных компонентов ГЭБ и является одним из механизмов нарушения его проницаемости. Дальнейшее применение модели ГЭБ *in vitro* после облучения возможно для испытания лекарственных средств, препятствующих увеличению проницаемости ГЭБ или исследования комбинированного химио- и радиотерапевтического лечения. На культуре клеток астроцитов крысы показано нарушение функционирования щелевых контактов, необходимых для формирования нормально функционирующего ГЭБ, а также основных компонентов межклеточной коммуникации при радиационном воздействии, что может явиться толчком для изучения механизмов инвазии опухоли при облучении и поиску новых терапевтических стратегий. В экспериментах на животных показано увеличение проницаемости ГЭБ при фракционировании по трем различным схемам единой СОД. Сравнение режимов фракционирования может применяться практикующими врачами-радиологами для подбора изозффективных режимов фракционирования. На моделях *in vivo* показано увеличение проницаемости ГЭБ в направлении мозг-кровь путем обнаружения в плазме нейроспецифического белка GFAP, основного белка астроцитов. Мониторинг его концентрации может служить простым и доступным методом изучения нарушения проницаемости ГЭБ и использовано в клинической практике для исследования индивидуального ответа пациентов при радиотерапии, а также в перспективе к улучшению эффективности комбинированного лечения опухолей головного мозга путем подбора оптималь-

ного времени введения химиотерапевтических веществ. При фракционированном облучении показано увеличение проницаемости ГЭБ в направлении кровь-мозг путем обнаружения в ткани мозга высокомолекулярных веществ, что также может использоваться для более эффективной доставки лекарственных веществ в ткани мозга после облучения. Нарушение структуры ГЭБ, выражающееся в изменении экспрессии белков астроцитов и эндотелиоцитов VEGF и GFAP, а также соответствующих генов является объяснением некоторых механизмов увеличения проницаемости барьера.

Выводы

1. Однократное воздействие редко ионизирующего фотонного излучения дозами 2, 4 и 6 Гр вызывает нарушения проницаемости ГЭБ, характеризующееся морфологическими изменениями эндотелиальных клеток (вакуолизация цитоплазмы и набухание клеток), снижением уровней экспрессии белков плотных и адгезивных контактов, а также соответствующих генов.
2. Исследование переноса цитоплазматического (САН) и мембранного (Dil) красителей при кокультивировании донорных и реципиентных астроцитов выявило феномен нарушения структуры и функций щелевых контактов после однократного облучения редко ионизирующим излучением дозами 0,5, 2 и 6 Гр.
3. Иммуноферментный анализ глиального фибриллярного кислого белка, специфичного для реактивных астроцитов, в сыворотке крови крыс после фракционированного облучения редко ионизирующим излучением по трем схемам с суммарной общей дозой (36Гр) позволил детектировать достоверное повышение его концентрации в 2 раза, что свидетельствует о нарушении проницаемости ГЭБ в направлении мозг-кровь.
4. Иммуноморфологический анализ анти-GFAP и анти-VEGF антител, меченных Alexa 488 и 660, после их внутривенного введения крысам, фракционировано облученных редко ионизирующим излучением (6 фракций по 6 Гр) позволил детектировать феномен их связывания с антигенами астроцитов, что свидетельствует о прорыве ГЭБ в направлении кровь-мозг.
5. Иммунофлюоресцентный анализ GFAP и VEGF и количественный ПЦР-анализ мРНК *GFAP* и *VEGF* в клетках основных структур мозга крыс на различных сроках (4 -12 недель) после фракционированного облучения редко ионизирующим излучением по трем схемам с общей дозой 36 Гр позволил выявить достоверное снижение уровня мРНК *VEGF* в гиппокампе и префронтальной коре на 4 неделе после облучения и его восстановление к 12 неделе. Уровень мРНК *GFAP* в префронтальной коре, напротив, достоверно повышен на 4 неделе после облучения, восстанавливаясь до нормы к 12 неделе.

Список литературы

1. Волгина Н.Е. / Биохимические аспекты формирования барьерного фенотипа эндотелиоцитов человека при совместном культивировании с аллогенными астроцитами // Дисс. канд. биол. наук - 03.01.04- Биохимия / ФГБУ «ИБМХ» РАН, – Москва. – 2013. – С.101
2. Волгина Н.Е., Гурина О.И., Гриненко Н.Ф., Баклаушев В.П., Иванова Н.В., Чехонин В.П. / Экспрессия белков плотных контактов эндотелиоцитами почечной вены человека, сокультивированными с аллогенными астроцитами // Клеточные технологии в биологии и медицине – 2012. - N3. - С.129-135
3. Гурина О.И. / Моноклональные антитела к нейроспецифическим белкам (НСБ). Получение, иммунохимический анализ, исследование гематоэнцефалического барьера // Дисс. доктора мед. наук - 03.00.04- Биохимия / РУДН. Москва. - 2005. - 269 с.
4. Джойнер М.С., ван дер Когель О. / Основы клинической радиобиологии // Москва: Бином – 2013. — С. 175-178
5. Кобяков Г.Л., Абсалямова О.В., Бекашев А.Х., Голанов А.В., Коновалов А.Н., Насхлеташвили Д. Р., Потапов А. А., Рыжова М. В., Смолин А. В., Трунин Ю. Ю. / Практические рекомендации по лекарственному лечению первичных опухолей центральной нервной системы // Злокачественные опухоли. – 2016. – No 4. Спецвыпуск 2. –С.64–84
6. Кудряшов Ю.Б., Мазурик В.К., Ломанов М.Ф./ Радиационная биофизика (ионизирующие излучения) // Физматлит – 2004. 448 с.
7. Чехонин В. П., Морозов Г. В., Рябухин И. А. / Иммуноферментная детекция специфических антигенов мозга как критерий проницаемости гематоэнцефалического барьера крыс после острого гамма-облучения // Бюл. эксперим. биологии и медицины – 1989. - №107(4). - С. 464-466
8. Чехонин В. П., Шеин С. А., Корчагина А. А., Гурина О. И. / Роль VEGF в развитии неопластического ангиогенеза // Вестник РАМН – 2012. - №67(2). - С.23-33

9. Чехонин В.П., Гурина О.И., Дмитриева Т.Б., Шепелева И.И., Рябухин И.А., Бабич Г.Н. / Моноклональные анти-GFAP-антитела: получение, характеристика и иммуноферментный анализ // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 2001. - №132(2). - С.772-775
10. Ярмоненко С.П., Вайнсон А.А. / Радиобиология человека и животных// М.: Высшая школа – 2004. – 424 с.
11. Abbaci M., Barberi-Heyob M., Blondel W., Guillemin F., Didelon J. / Advantages and limitations of commonly used methods to assay the molecular permeability of gap junctional intercellular communication // BioTechniques – 2008. - №45. - P.33-62
12. Abbott N.J., Ronnback L., Hansson E. / Astrocyte–endothelial interactions at the blood–brain barrier // Nature Reviews/Neuroscience – 2006. - №7.- P.41-53
13. Ahn M., Kim H., Kim J.T., Lee J., Hyun J.W., Park J.W., 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). – P.309–314.
14. Alavi A., Hood J.D., Frausto R., Stupack D.G., Cheresch D.A. / Role of Raf in vascular protection from distinct apoptotic stimuli // Science – 2003. - №301. – P.94-96.
15. Anderson J.M., Van Itallie C.M. / Physiology and function of the tight junction. // Cold Spring Harb Perspect Biol – 2009. - 1:a002584
16. Autsavapromporn N., de Toledo S.M., Jay-Gerin J.P., Harris A.L., Azzam E.I. / Human cell responses to ionizing radiation are differentially affected by the expressed connexions // Journal of Radiation Research – 2013. – №54. – P.251–259
17. Azzam E.I., de Toledo S.M., Little J.B. / Expression of connexin 43 is highly sensitive to ionizing radiation and other environmental stresses // Cancer Research – 2003. - №63. – P.7128–7135
18. Balentova S., Hajtmanova E., Filova B., Borbelyova V., Lehotský J. / Effect of Fractionated Irradiation on the Hippocampus in an Experimental Model // Klin Onkol – 2015. - №28(3). – P.191-199

19. Balentova S., Hajtmanova E., Kinclova I., Lehotsky J., Dobrota D., Adamkov M. / Radiation-induced Long-term Alterations in Hippocampus under Experimental Conditions // *KlinOnkol* – 2012. - № 25(2). - P.110–116
20. Ballabh P., Braun A., Nedergaard M. / The blood–brain barrier: an overview Structure, regulation, and clinical implications // *Neurobiology of Disease* – 2004. - №16. – P.1–13
21. Bartholdi D., Rubin B.P., Schwab M.E. / VEGF mRNA induction correlates with changes in the vascular architecture upon spinal cord damage in the rat // *Eur J Neurosci* – 1997. - №9. – P.2549-2560
22. Begg A.C., Fiona A.S. and Vens C. / Strategies to improve radiotherapy with targeted drugs // *Nat Rev Cancer* – 2011. - №11. – P.239-253
23. Belka C., Budach W., Kortmann R.D., Bamberg M. / Radiation induced CNS toxicity-molecular and cellular mechanisms // *Br J Cancer* – 2001. - №85(9). – P.1233-1239
24. Bernier J., Hall E.J., Giaccia A. / Radiation oncology: a century of achievements // *Nat Rev Cancer* – 2004. - №4. – P.737–747
25. Braunstein S., Badura M.L., Xi Q., Formenti S.C., Schneider R.J. / Regulation of Protein Synthesis by Ionizing Radiation // *Molecular and cellular biology* – 2009. - №29(21). - P.5645–5656
26. Brenner M. / Role of GFAP in CNS injuries // *Neurosci Lett.* – 2014. -№565. - P.7-13
27. Brommeland T., Rosengren L., Fridlund S., Hennig R., Isaken V. / Serum levels of glial fibrillary acidic protein correlate to tumor volume of high – grade gliomas // *Acta Neurol. Scand.* — 2007. — №116. — P.380-384
28. Brown W.R., Thore C.R., Moody D.M., Robbins M.E. and Wheeler K.T. / Vascular damage after fractionated whole-brain irradiation in rats // *Radiat. Res.* – 2005. - №164. - P.662-668
29. Cao Y., Tsien Ch.I., Shen Zh., Tatro D.S., Haken R.T., Kessler M.L., Chenevert T.L., Lawrence T.S. / Use of Magnetic Resonance Imaging to Assess Blood-

- Brain/Blood-Glioma Barrier Opening During Conformal Radiotherapy // *Journal of Clinical Oncology* – 2005. - №23(18). - P.4127-4136
30. Cheng L., Ma L., Ren H., Zhao H., Pang Y., Wang Y., Wei M. / Alterations in the expression of vascular endothelial growth factor in the rat brain following gamma knife surgery // *Mol Med Rep* – 2014. - №10(5). - P.2263-2270
 31. Coy S.L., Cheema A.K., Tyburski J.B., Laiakis E.C., Collins S.P., Fornace A.Jr. / Radiation metabolomics and its potential in biodosimetry // *Int J Radiat Biol* – 2011. - №87(8). - P.802–823
 32. Dale R.G., Bleddyn J. / *Radiobiological Modelling in Radiation Oncology* // British Inst of Radiology, 2007. – 292 P.
 33. Dbouk Hashem A., Mroue Rana M., El-Sabban Marwan E. and Talhouk Rabih S. / Connexins: a myriad of functions extending beyond assembly of gap junction channels // *Cell Communication and Signaling* – 2009/ - 7:4 doi: 10.1186/1478-811X-7-4
 34. Derangeon M., Bourmeyster N., Plaisance I., Pinet-Charvet C., Chen Q., Duthe F., Popoff M.R., Sarrouilhe D., Hervé J.C. / RhoA GTPase and F-actin dynamically regulate the permeability of Cx43-made channels in rat cardiac myocytes // *J Biol Chem* – 2008 - №283 - P.30754–30765
 35. Dere E. / *Gap Junctions in the Brain 1st Edition. Physiological and Pathological Roles* // Academic Press – 2013. – 304 P.
 36. Deutsch E., Soria J.C., Armand J.P. / New concepts for phase I trials: evaluating new drugs combined with radiation therapy // *Nature Clinical Practice Oncology* // 2005 - №2(9). - P.456-465
 37. Dilworth J.T., Krueger S.A., Wilson G.D., Marples B. / Preclinical Models for Translational Research Should Maintain Pace With Modern Clinical Practice // *Int J Radiation Oncol Biol Phys* – 2014. - №88(3). - P.540-544
 38. 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. - P.670–678.

39. Ezan P., André P., Cisternino S., Saubaméa B., Boulay A.C., Dautremer S., Thomas M.A., Quenech'du N., Giaume C., Cohen-Salmon M. / Deletion of astroglial connexins weakens the blood-brain barrier // *J Cereb Blood Flow Metab* – 2012. - №32(8). - P.1457-1467.
40. Farkas A., Szatmári E., Orbók A., Wilhelm I., Wejksza K., Nagyoszi P., Hutamekalin P., Bauer H., Bauer H.C., Traweger A., Krizbai I.A. / Hyperosmotic mannitol induces Src kinase-dependent phosphorylation of β -катенин in cerebral endothelial cells // *J. Neurosci. Res.* – 2005. - №80. - P.855–861.
41. Fauquette W., Amourette C., Dehouck M.P., Diserbo M. / Radiation-induced blood-brain barrier damages: an in vitro study // *Brain Research* – 2012. - №1433. - P.114-126
42. Feng Z., Levine A.J. / The regulation of energy metabolism and the IGF-1/mTOR pathways by the p53 protein // *Trends Cell Biol* – 2010. - №20. -P.427–434
43. Ferrara N., Gerber H.P., LeCouter J. / Thebiology of VEGF and its receptors // *Nature Medicine* – 2003. - №9. - P.669 - 676
44. Fonseca P.C., Nihei O.K., Savino W., Spray D.C., Alves L.A. / Flow Cytometry Analysis of Gap Junction-Mediated Cell–Cell Communication: Advantages and Pitfalls // *Cytometry Part A* – 2006. - №69A. - P.487–493
45. Goldberg S., Bechberger J., Naus C. / A pre-loading method of evaluating gap junctional communication by fluorescent dye transfer // *Biotechniques* – 1995. - №18. - P.490-497
46. Golden E.B., Pellicciotta I., Demaria S., Barcellos-Hoff M.H., Formenti S.C. / The convergence of radiation and immunogenic cell death signaling pathways // *Frontiers in Oncology* – 2012. - №2. - P.1–13
47. Greenberg D.A., Jin K. / From angiogenesis to neuropathology // *Nature* – 2005. - №438(7070). - P.954–959
48. Greene-Schloesser D., Robbins M.E., Peiffer A.M., Shaw E.G., Wheeler K.T., Chan M.D. / Radiation-induced brain injury: A review // *Front Oncol* – 2012. - №2(73). - doi: 10.3389/fonc.2012.00073.

49. Haseloff R.F., Dithmer S., Winkler L., Wolburg H., Blasig I.E. / Transmembrane proteins of the tight junctions at the blood–brain barrier: Structural and functional aspects // *Semin Cell Dev Biol* - 2015 - №38. - P.16-25
50. Hayashi Y., Nomura M., Yamagishi S., Harada S., Yamashita J., Yamamoto H. / Induction of various blood-brain barrier properties in non-neural endothelial cells by close apposition to co-cultured astrocytes // *Glia* – 1997. - №19. - P.13-26
51. Huber J.D., Egleton R.D. and Davis T.P. / Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions in the blood–brain barrier // *TRENDS in Neurosciences* – 2001. - №24(12)/ - P. 719-725
52. Hwang S.Y., Jung J.S., Kim T.H., Lim S.J., Oh E.S., Kim J.Y., Ji K.A., Joe E.H., Cho K.H., Han I.O. / Ionizing radiation induces astrocyte gliosis through microglia activation // *Neurobiol. Dis* – 2006 - №21. - P.457–467
53. Janzer R., Raff M. / Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells // *Letters to Nature* – 1987. - №325. - P.253-257
54. Jin X., Liang B., Chen Z., Liu X., Zhang Z. / The dynamic changes of capillary permeability and upregulation of VEGF in rats following radiation-induced brain injury // *Microcirculation* – 2014. - №21(2). - P.171-177
55. Jung C.S., Foerch C., Schanzer A., Heck A., Plate K.H., Seifert V., Steinhilber H., Raabe A., Sitzer M. / Serum GFAP is a diagnostic marker for glioblastoma multiforme // *Brain* – 2007. - №130. - P.3336-3341
56. Kamchatnov P.R., Chugunov A.V., Ruleva N.Yu., Dugin S.F., Basse D.A., Abusueva B.A., Buriachkovskaya L.I., Gusev E.I. / Autoantibodies to GFAP (glial fibrillary acidic protein) and to dopamine in patients with acute and chronic cerebrovascular disorders // *Health* – 2010. - №2(12). - P.1366-1371
57. Kamchatov P.R., Ruleva N.Iu., Dugin S.F., Buriachkovskaia L.I., Chugunov A.V., Mikhaïlova N.A., Basse D.A. / Neurospecific proteins and autoantibodies in serum of patients with acute ischemic stroke // *Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova* – 2009. - №109(5 Suppl 2). - P.69-72
58. Kempner E.S. / Effects of High-Energy Electrons and Gamma Rays Directly on Protein Molecules // *J Pharm Sci.* – 2001. - №90(10). - P.1637-1646

59. Kevil D.G., Payne D.K., Mire E., Alexander J.S. / Vascular permeability factor/vascular endothelial cell growth factor-mediated permeability occurs through disorganization of endothelial junctional proteins // *J BiolChem* – 1998. - №273. - P.15099–151103
60. Kim J.H., Chung Y.G., Kim C.Y., Kim H.K., Lee H.K. / Upregulation of VEGF and FGF2 in Normal Rat Brain after Experimental Intraoperative Radiation Therapy // *J Korean Med Sci* – 2004. - №19. - P.879-886
61. Kolesnick R.N., Fuks Z. / Radiation and ceramide-induced apoptosis // *Oncogene* – 2003. - №22. - P.5897-5906
62. Korogodin V.I. / Certain rules in post-irradiation changes in resting yeast cells // *Biofizika* – 1958. - №3(6). - P.703-710
63. Korpela E., Liu S.K. / Endothelial perturbations and therapeutic strategies in normal tissue radiation damage // *Radiat. Oncol.* – 2014. - №9(266). - doi: 10.1186/s13014-014-0266-7
64. Kraemer D.F., Fortin D., Neuwelt E.A. / Chemotherapeutic dose intensification for treatment of malignant brain tumors: recent developments and future directions // *Curr.Neurol. Neurosci. Rep.* – 2002. - №2. - P.216–224
65. Kurita H., Kawahara N., Asai A., Ueki K., Shin M., Kirino T. / Radiation-induced apoptosis of oligodendrocytes in the adult rat brain // *NeurolRes* – 2001. - №23(8). - P.869–874
66. Lagunin A.A., Glorizova T.A., Dmitriev A.V., Volgina N.E., Poroikov V.V. / Computer evaluation of drug interactions with P-glycoprotein // *Bull Exp Biol Med* // 2013. - №154(4). - P.521-524
67. Lam S., Lin Y., Warnke P.C. / Permeability imaging in pediatric brain tumors // *Transl Pediatr.* – 2014. - №3(3). - P.218–228
68. Langford D., Hurford R., Hashimoto M., Digicaylioglu M., Masliah E. / Signalling crosstalk in FGF2-mediated protection of endothelial cells from HIV-gp120 // *BMC Neurosci* – 2005. - №6. - P.8

69. Lawrence Y.R., Li X.A., el Naqa I., Hahn C.A., Marks L.B., Merchant T.E., Dick-
er A.P. / Radiation dose-volume effects in the brain // *Int J Radiat Oncol Biol Phys*
– 2010. - №76 (3 Suppl):S20-7. - doi: 10.1016/j.ijrobp.2009.02.091
70. Lee W.H., Cho H.J., Sonntag W.E., Lee Y.W. / Radiation attenuates physiological
angiogenesis by differential expression of VEGF, Ang-1, tie-2 and Ang-2 in rat
brain // *Radiat. Res.* – 2011. - №176. - P.753-760
71. Lee Y.W., Cho H.J., Lee W.H., Sonntag W.E. / Whole Brain Radiation-Induced
Cognitive Impairment: Pathophysiological Mechanisms and Therapeutic Targets //
BiomolTher – 2012.- №20(4). - P.357-370
72. Leopold A., Grinenko N.F., Yusubalieva G.M., Cherepanov S., Baklaushev V.P.,
Chekhonin V.P. / Blockade of connexin-43 gap-junctions with the single chain an-
tibody against connexin-43 // *European Neuropsychopharmacology* – 2015. - №25
Supplement 2. - P. S208
73. Leshchinskaya I.A., Douka T.I., Chernaya V.I. / Neurophysiology Behavioral Re-
actions of Rats and the Contents of Neurospecific Proteins in Their Brain after
Single X-Ray Irradiation // *Neurophysiology* – 2000. - №32(1). - P.17-22
74. Levy A.P., Levy N.S., Goldberg M.A. / Post-transcriptional regulation of vascular
endothelial growth factor by hypoxia // *J BiolChem* – 1996. - №271(5). - P.2746-
2753
75. Li H., Wei M., Li S., Zhou Z., Xu D. / Increased CD147 and MMP-9 expression in
the normal rat brain after gamma irradiation // *J Radiat Res.* – 2013. - №54(1). -
P.27-35
76. Lin J.H., Yang J., Liu S., Takano T., Wang X., Gao Q., Willecke K., Nedergaard
M.J. / Connexin mediates gap junction-independent resistance to cellular injury //
Neurosci – 2003. - №23. - P.430-441
77. Little JB. / Radiation cancerogenesis // *Cancerogenesis* – 2000. - №21(3). - P.397-
404
78. Liu J.L., Tian D.S., Li Z.W., Qu W.S., Zhan Y., Xie M.J., Yu Z.Y., Wang W., Wu
G. / Tamoxifen alleviates irradiation-induced brain injury by attenuating microglial

- inflammatory response in vitro and in vivo // *BrainResearch* – 2010. - №1316. - P.101–111
79. Livak K., Schmittgen Th. / Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} Method // *Methods* – 2001. - №25. - P.402–408
 80. Livrea P., Trojano M., Simone I.L., Zimatore G.B., Logroscino G.C., 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. - P.336-339
 81. Ljubimova N.V., Levitman M.K., Plotnikova E.D., Eidus L.Kh. / Endothelial cell population dynamics in rat brain after local irradiation // *Br J Radiol* – 1991. - №64. - P.934–940
 82. Lu X., de la Pena L., Barker C., Camphausen K., Tofilon P.J. / Radiation-induced changes in gene expression involve recruitment of existing messenger RNAs to and away from polysomes // *Cancer Res.* – 2006. - №66. - P.1052– 1061
 83. Luo Z., Zang M., Guo W. / AMPK as a metabolic tumor suppressor: control of metabolism and cell growth // *Future Oncol.* – 2010. - №6. - P.457–470
 84. Lyubimova N., Hopewell J.W. / Experimental evidence to support the hypothesis that damage to vascular endothelium plays the primary role in the development of late radiation-induced CNS injury // *Br. J. Radiol.* – 2004. - №77. - P.488-492
 85. Ma Z.M., Jiang B., Ma J.R. / Alterations of glial fibrillary acidic protein in rat brain after gamma knife irradiation // *Hunan Yi Ke Da XueXueBao* – 2001. - №26(4). - P.309-312
 86. Masabumi Sh. / Vascular endothelial growth factor and its receptor system: physiological functions in angiogenesis and pathological roles in various diseases // *J Biochem* – 2013. - №153(1). - P.13-19
 87. Matter K., Balda M.S. / Signalling to and from tight junctions // *Nat.Rev. Mol. Cell Biol.* – 2003. - №4. - P.225–236
 88. Mayer C.A., Brunkhorst R., Niessner M., Pfeilschifter W., Steinhilber H., Foerch C. / Blood levels of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in patients with neuro-

- logical diseases // PLoS One — 2013. — №8(4) — e62101. - doi: 10.1371/journal.pone.0062101
89. Mese G., Richard G., White T.W. / Gap junctions: basic structure and function / J Invest Dermatol – 2007. - №127. - P.2516–2524
 90. Milano M.T., Usuki K.Y., Walter K.A., Clark D., Schell M.C. / Stereotactic radiosurgery and hypofractionated stereotactic radiotherapy: Normal tissue dose constraints of the central nervous system // Cancer Treatment Reviews – 2011. -№37. - P.567–578
 91. 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 // ActaNeurochir Wien – 1995. - №136. - P.82-86
 92. Nieder C., Milas L., Ang K.K. / Modification of Radiation Response Cytokines, Growth Factors, and Other Biological Targets // Springer-Verlag Berlin Heidelberg – 2003. – 284 P.
 93. Nordal R.A., Wong C.S. / Intercellular adhesion molecule-1 and blood-spinal cord barrier disruption in central nervous system radiation injury // J NeuropatholExpNeurol – 2004. - №63. - P.474-483
 94. Nordal R.A., Wong C.S. / Molecular targets in radiation-induced blood–brain barrier disruption // Int. J. RadiatOncol. Biol. Phys. – 2005. - №62. - P.279–287
 95. Oliveira R, Christov C, Guillamo JS, DeBoüard S, Palfi S, Venance L, Tardy M and Peschanski M. / Contribution of gap junctional communication between tumor cells and astroglia to the invasion of the brain parenchyma by human glioblastomas // BMC Cell Biology – 2005. - №6:7. - doi: 10.1186/1471-2121-6-7
 96. Pavelka M., Roth. J. / Functional Ultrastructure // Verlag Springer — 2015. -402 P.
 97. Pekny M., Pekna M. / Astrocyte Reactivity and Reactive Astrogliosis: Costs and Benefits // Physiological Reviews – 2014. - №94(4). - P.1077-1098
 98. Pena LA, Fuks Z, Kolesnick RN. / Radiation-induced apoptosis of endothelial cells in the murine central nervous system: Protection by fibroblast growth factor and sphingomyelinase deficiency // Cancer Res – 2000. - №60. - P.321–327

99. 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 RadiatOncolBiolPhys* – 2001. - № 5. - P.959-962
100. Qin D.X., Zheng R., Tang J., Li J.X., Hu Y. / Influence of radiation on the blood-brain barrier and optimum time of chemotherapy // *Int J RadiatOncolBiolPhys* – 1990. - №19. - P.1507-1510
101. Rapoport S.I. / Advances in osmotic opening of the blood–brain barrier to enhance CNS chemotherapy // *Expert Opin. Invest. Drugs* – 2001. - №10. - P.1809–1818
102. Reinhold H.S., Calvo W., Hopewell J.W., van der Berg A.P. / Development of blood vessel-related radiation damage in the fimbria of the central nervous system // *Int J RadiatOncolBiolPhys* – 1990. - №18. - P.37– 42
103. Rombouts C., Aerts A., Beck M., De Vos W.H., Van Oostveldt P., Benotmane M.A., Baatout S. / Differential response to acute low dose radiation in primary and immortalized endothelial cells // *International Journal of Radiation Biology* – 2013. - 89(10). - P.841-850
104. Santivasi W.L., Xia F. / Ionizing radiation-induced DNA damage, response, and repair // *Antioxid Redox Signal* – 2014. - №21(2). - P. 251– 259
105. Senger D.R., Galli S.J., Dvorak A.M., Perruzzi C.A., Harvey V.S., Dvorak H.F. / Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid // *Science* – 1983. - №219(4587). - P.2746-53
106. Sharma P., Templin T., Grabham P. / Short term effects of gamma radiation on endothelial barrier function: Uncoupling of PECAM-1 // *Microvascular Research* – 2013. - №86. - P.11-20
107. Shibamoto Y., Otsuka S., Iwata H., Sugie C., Ogino H., Tomita N. / Radiobiological Evaluation of the Radiation Dose as Used inHigh-precision Radiotherapy: Effect of Prolonged DeliveryTime and Applicability of the Linear-quadratic Model // *J. Radiat. Res.* – 2012. - №53. - P.1–9
108. Sofroniew M.V., Vinters H.V. / Astrocytes: biology and pathology // *Acta Neuropathol.* – 2010. - №119(1). - P.7-35

109. Somosy Z., Horvath G., Bogнар G., Koteles G. / Structural and functional changes of cell junctions on effect of ionizing radiation // *ActaBiologicaSzegediensis* – 2003. - №47(1-4). - P.19-25
110. Stephani U., Rating D., Korinthenberg R., Siemes H., Riehm H., Hanefeld F. / Radiation related disturbance of blood/brain barrier during therapy of acute lymphoblastic leukaemia // *Lancet* – 1983. - №2. - P.1036-1037
111. Stewart P.A., Vinters H.V., Wong C.S. / Blood-spinal cord barrier function and morphometry after single doses of x-rays in rat spinal cord // *Int J Radiat Oncol Biol Phys* – 1995. - №32. - P.703-711
112. Tichy A., Vavrova J., Pejchal J., Rezacova M. / Ataxia-telangiectasia mutated kinase (ATM) as a central regulator of radiation-induced DNA damage response // *ActaMedica (Hradec Kralove)* – 2010. - №53. - P.13– 17
113. Trivigno D., Bornes L., Huber S.M., Rudner J. / Regulation of protein translation initiation in response to ionizing radiation // *Radiation Oncology* – 2013. - №8. - P.35
114. Trnovec T., Kallay Z., Bezek S. / Effects of ionizing radiation on blood brain barrier permeability to pharmacologically active substances // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* – 1990. - №19. - P.1581–1587
115. Trosko J.E., Inoue T. / Oxidative stress, signal transduction, and intercellular communication in radiation carcinogenesis // *Stem Cells* – 1997. - №15(Suppl 2). - P.59-67
116. Tseng Y.Y., Huang Y.C., Yang T.Ch., Yang Sh.T., Liu Sh.Ch., Chang T.M., Kau Y.Ch., Liua Sh.J / Concurrent Chemotherapy of Malignant Glioma in Rats by Using Multidrug-Loaded Biodegradable Nanofibrous Membranes // *Sci Rep.* – 2016. - №6(30630). - doi:10.1038/srep30630
117. Vaiyapuri S., Jones C.I., Sasikumar P., Moraes L.A., Munger S.J., Wright J.R., Ali M.S., Sage T., Kaiser W.J., Tucker K.L., Stain C.J., Bye A.P., Jones S., Oviedo-Orta E., Simon A.M., Mahaut-Smith M.P., Gibbins J.M / Gap Junctions and Connexin Hemichannels Underpin Haemostasis and Thrombosis // *Circulation* – 2012. - №125(20). -P.2479–2491

118. Valerie K., Yacoub A., Hagan M.P., Curiel D.T., Fisher P.B., Grant S., Dent P. / Radiation-induced cell signaling: inside-out and outside-in // *Mol Cancer Ther.* – 2007. - №6. - P.789–801
119. Van Vulpen M., Kal H.B., Taphoorn M.J., El-Sharouni S.Y. / Changes in blood–brain barrier permeability induced by radiotherapy: implications for timing of chemotherapy? (Review)// *Oncol. Rep.* – 2002. - №9. - P.683–688
120. Vander Heiden M.G., Cantley L.C., Thompson C.B. / Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation // *Science* – 2009. - №324. - P.1029–1033
121. Vincent P.A., Xiao K., Buckley K.M., Kowalczyk A.P. / VE-cadherin: adhesion at arm's length // *Am J Physiol Cell Physiol* – 2004. - №286 (5). - P.987–997
122. Wang W., Dentler W.L., Borchardt R.T. / VEGF increases BMEC monolayer permeability by affecting occludin expression and tight junction assembly // *Am J Physiol Heart CircPhysiol* – 2001. - №280. - P.434–P.440
123. Warrington J.P., Csiszar A., Johnson D.A., Herman T.S., Ahmad S., Lee Y.W., Sonntag W.E. / Cerebral microvascular rarefaction induced by whole brain radiation is reversible by systemic hypoxia in mice // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2011. - №300. - P.736-744
124. Watson Marc , Paterson Judy C, Thom George, Gihman Ulrika, Lundquist Stefan, Webster and Carl I / Modelling the endothelial blood-CNS barriers: a method for the production of robust in vitromodels of the rat blood-brain barrier and blood-spinal cord barrier // *BMC Neuroscience* – 2013. - №14(59). - doi: 10.1186/1471-2202-14-59
125. Wei K.C., Chu P.C., Wang H.Y., Huang C.Y., Chen P.Y., Tsai H.C., Lu Y.J., Lee P.Y., Tseng I.C., Feng L.Y., Hsu P.W., Yen T.C., Liu H.L. / Focused ultrasound-induced blood-brain barrier opening to enhance temozolomide delivery for glioblastoma treatment: a preclinical study // *PLoS One* – 2013. -№8(3):e58995/ - doi: 10.1371/journal.pone.0058995

126. Wei M., Li H., Huang H., Xu D., Zhi D., Liu D., Zhang Y. / Increased Expression of EMMPRIN and VEGF in the Rat Brain after Gamma Irradiation // J Korean Med Sci – 2012. - №27. - P.291-299
127. Wong C.S., Vander Kogel A.J. / Mechanisms of radiation injury to the central nervous system: implications for neuroprotection // Mol. Interv. – 2004. - №4. - P.273–284
128. Yang T., Wu S.L., Liang J.C., Rao Z.R., Ju G. / Time-dependent astroglial changes after gamma knife radiosurgery in the rat forebrain // Neurosurgery – 2000. - №47(2). - P.407-415
129. Yang Z., Wang K.K. / Glial fibrillary acidic protein: from intermediate filament assembly and gliosis to neurobiomarker // Trends Neurosci. – 2015. - №38(6). - P.364-374
130. Yong T., Lee W., Cho H.J., Lee W.H., Sonntag W.E. / Cognitive Impairment: Pathophysiological Mechanisms and Therapeutic // Biomol Ther – 2012. - №20(4). - P.357-370
131. Yuan H., Gaber M.W., Boyd K., Wilson C.M., Kiani M.F., Merchant T.E. / 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. - №66(3). - P.860–866
132. Yuan H., Gaber M.W., McColgan T., Naimark M.D., Kiani M.F., Merchant T.E. / Radiation-induced permeability and leukocyte adhesion in the rat blood-brain barrier: modulation with anti-ICAM-1 antibodies // Brain Res – 2003. - №969. - P.59-69