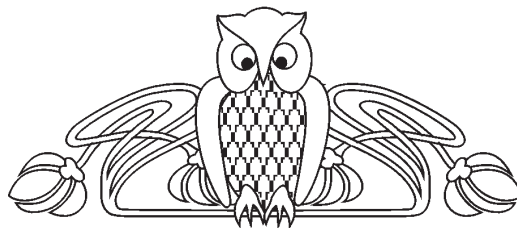




УДК 612.42

## Изменения проницаемости гематоэнцефалического барьера под воздействием громкого звука

А. Е. Шариф, А. С. Абдурашитов, А. А. Намыкин, А. А. Широков, Е. Ю. Лыкова, Е. И. Саранцева, Т. Д. Искра, Е. Л. Водовозова, А. С. Хороводов, А. В. Терсков, А. Т. Мамедова, И. М. Агранович, М. М. Климова, О. В. Семячкина-Глушковская



Шариф Али Есмаат, аспирант биологического факультета, Междисциплинарный центр критических технологий в медицине, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, esmtshareef@yahoo.co.uk

Абдурашитов Аркадий Сергеевич, аспирант физического факультета, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, abdurashitof-optics@mail.ru

Намыкин Антон Александрович, аспирант физического факультета, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, anton-namikin@bk.ru

Широков Александр Александрович, руководитель центра коллективного пользования (ЦКП) «Симбиоз» ИБФРМ РАН, кандидат биологических наук, Институт биохимии, физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов, shirokov\_a@ibppm.ru

Лыкова Екатерина Юрьевна, кандидат биологических наук, доцент кафедры физиологии человека и животных, Междисциплинарный центр критических технологий в медицине, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, eckaterina\_lykova@mail.ru

Саранцева Елена Ивановна, кандидат биологических наук, доцент кафедры физиологии человека и животных, Междисциплинарный центр критических технологий в медицине, Саратовский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, sophora68@mail.ru

Искра Татьяна Дмитриевна, кандидат биологических наук, доцент кафедры физиологии человека и животных, Междисциплинарный центр критических технологий в медицине, доцент кафедры физиологии человека и животных, Саратовский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, tata-isk@yandex.ru

Водовозова Елена Львовна, доктор химических наук, руководитель лаборатории химии липидов, Институт биоорганической химии имени академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва, elvod@lipids.ibch.ru

Хороводов Александр Петрович, магистрант биологического факультета, Междисциплинарный центр критических технологий в медицине, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, khorovodov2012@yandex.ru

Терсков Андрей Витальевич, магистрант биологического факультета, Междисциплинарный центр критических технологий в медицине, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, terskow.andrey@gmail.com

Мамедова Айсел Тофик кызы, магистрант биологического факультета, Междисциплинарный центр критических технологий в медицине, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, mamedovaysel95@gmail.com

Агранович Илана Михайловна, аспирант биологического факультета, Междисциплинарный центр критических технологий в медицине, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, ilana.agranovich@yandex.ru

Климова Мария Максимовна, студент биологического факультета, Междисциплинарный центр критических технологий в медицине, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, mari-1997@mail.ru

Семячкина-Глушковская Оксана Валерьевна, доктор биологических наук, заведующий кафедрой физиологии человека и животных, Междисциплинарный центр критических технологий в медицине, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, glushkovskaya@mail.ru

В данной статье впервые рассматривается возможность применения громкого прерывистого звука (100 дБ, 370 Гц, 60 с – звук и 60 с – пауза в течение 2 ч) в качестве неинвазивного метода открытия гематоэнцефалического барьера (ГЭБ). Результаты исследований, выполненных на половозрелых самцах мышей с применением *ex vivo* (спектрофлуориметрический метод определения экстравазации красителя Evans Blue и конфокальный анализ проницаемости ГЭБ для FITC-декстрана 70 кДа) и *in vivo* (двухфотонная микроскопия прохождения липосом через ГЭБ) опытов, демонстрируют, что звук значительно увеличивает проницаемость ГЭБ для указанных маркеров. Индуцированное звуком открытие ГЭБ является безопасным (по оценке отсутствия периваскулярного отека и апоптоза) и обратимым (открытие/закрытие ГЭБ через 1 ч/4 ч после воздействия звука соответственно), сопровождаемым компенсаторными изменениями церебрального кровотока. Таким образом, звук как естественный фактор может явиться новым и прогрессивным методом для успешной доставки лекарств в мозг, который может быть применен в повседневной клинической практике. Его экономическая выгода и простота выполнения делает данный метод двигателем прогресса в области преодоления ГЭБ и лечения болезней центральной нервной системы (ЦНС).

**Ключевые слова:** звук, гематоэнцефалический барьер, FITC-декстран 70 кДа, GM1-липосомы, Evans Blue dye.

DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2019-19-3-312-321>



## Введение

Гематоэнцефалический барьер является совокупностью морфологических структур, образованной эндотелиальными клетками микрососудов, окруженными перицитами и периваскулярной астроглией. Он контролирует прохождение переносимых кровью агентов в ткани мозга или высвобождение метаболитов и ионов из него. ГЭБ играет жизненно важную роль в нормальном функционировании ЦНС, защищая мозг от патогенов. Однако это также создает серьезную помеху для введения лекарств в ткани мозга при лечении его заболеваний.

Известно, что среди 7000 зарегистрированных в мировой статистической базе лекарственных средств только 5% позволяют успешно лечить неврологические заболевания по причине того, что многие из них не могут проходить через ГЭБ [1–3]. В этой связи подходы к преодолению ГЭБ привлекают внимание в исследованиях последних четырех десятилетий.

Период 1880–1980 гг. был посвящен изучению анатомической структуры и функций ГЭБ. В последующие три десятилетия исследовали механизмы, лежащие в основе работы ГЭБ. Сегодня внимание ученых сфокусировано на развитии методов преодоления ГЭБ. Так, предложено более 70 различных методов доставки лекарственных средств в ткани мозга, включая физические, химические и биологические [4–6]. Однако все эти методы требуют дальнейших исследований для улучшения воспроизводимости, а также количественной и качественной оценки проницаемости ГЭБ.

## Материалы и методы

### Объекты исследования

Во всех экспериментах использовали самцов белых беспородных мышей (с массой тела 20–25 г) в количестве 140 шт. Животные содержались в стандартных лабораторных условиях с доступом к пище и воде. Протокол эксперимента был одобрен комитетом по уходу и использованию лабораторных животных в Саратовском государственном университете (протокол Н-147, 07.02.2018).

В серии экспериментов было изучено влияние громкого звука (100 дБ 370 Гц продолжительностью 2 ч) на открытие ГЭБ для молекул с высоким весом, таких как Evans Blue Albumin Complex (ЕВАС, 68,5 кДа) и FITC-декстран (70 кДа), вводимых внутривенно в экспериментах *ex vivo* и *in vivo*.

*Оценка экстравазации Evans Blue dye с помощью спектрофлуориметрического анализа.* На первом этапе эксперимента мы проанализировали экстравазацию ЕВАС с помощью спектрофлуориметрического анализа. Для этого были

сформированы 4 группы экспериментальных животных: контрольная ( $n = 15$ ), которая не подвергалась звуковой стимуляции, и три опытные группы, животные в которых подвергались звуковому воздействию ( $n = 15$  в каждой). Громкий звук экспонировался в течение 2 ч в прерывистом режиме: 60 с – звук и 60 с – пауза. Время и доза воздействия звука были установлены случайным экспериментальным отбором значительной проницаемости ГЭБ для ЕВАС. Данная процедура проводилась с помощью звукового преобразователя (7а, 12 вольт, ПАО «АвтоВАЗ», Тольятти, Россия). Определение концентрации красителя *Evans Blue* в тканях мозга проводили на спектрофлуориметре (620 nm/680 nm, Agilent Cary Eclipse, Agilent, USA).

Мыши помещались на нагревательную платформу для поддержания температуры тела на всех этапах экспериментов. Имплантация полиэтиленового катетера (PE-10 tip, Scientific Commodities Inc., Lake Navasu City, Arizona) проводилась под ингаляционной анестезией (2% изофлуран, 1л/мин  $N_2O/O_2 - 70 : 30$ ) в правую бедренную вену. ЕВАС (Sigma Chemical Co. Сент-Луис, штат Мичиган, США) вводили внутривенно в разовой дозе (2 мг/25 г, мышь, 1% раствор в 0,9% физиологическом растворе). ЕВд циркулировал в крови в течение 30 мин в соответствии с рекомендуемым протоколом [7].

В завершение мышей декапировали с последующим извлечением мозга – через 1 ч ( $n = 15$ ), через 4 ч ( $n = 15$ ) и через 24 ч ( $n = 15$ ) после эксперимента. Мозг быстро извлекали и помещали на лед (антикоагуляция не использовалась во время сбора крови). Подробный протокол извлечения и визуализации ЕВАС был опубликован Wang et al. [8]. Для измерения концентрации ЕВАС (мкг на г тканей) использовалась стандартная калибровочная кривая.

*Оценка экстравазации FITC-декстрана 70 кДа с помощью конфокальной микроскопии.* Следующим этапом экспериментов был анализ экстравазации FITC-декстрана 70 кДа с помощью конфокальной микроскопии. Для характеристики проницаемости ГЭБ к молекулам с высокой молекулярной массой использовался флуоресцеин изотиоцианат (FITC)-декстран 70 кДа. Для данного опыта были сформированы четыре группы мышей ( $n = 10$  в каждой группе). В контрольной группе животные не подвергались звуковому воздействию. Остальные три группы находились под воздействием громкого звука. Через 1, 4 и 24 ч после эксперимента животным внутривенно вводили FITC-декстран (1 мг/25 г мыши, 0,5% раствор в 0,9% физиологическом растворе, Sigma-Aldrich), который циркулировал 2 мин. Сразу после этого животных декапитировали. Мозг быстро удаля-



ли, фиксировали его в 4% параформальдегиде в течение 24 ч и далее делали срезы толщиной 60 мкм на вибротоме (Микросистема Leica VT 1000S, Германия). Анализ результатов проводили на конфокальном микроскопе (Olympus FV10i-W, Olympus, Япония). На каждое животное было сделано 8–12 срезов из корковых и подкорковых областей.

Дополнительным методом оценки проницаемости ГЭБ послужила *двухфотонная лазерная сканирующая микроскопия (2ФЛСМ) в режиме реального времени*. Проницаемость ГЭБ непрерывно контролировалась путем измерения флуоресценции периваскулярной ткани мышей в разные моменты времени. За три дня до визуализации готовили оптическое окно (3 мм) путем истончения черепа.

Во время визуализации мыши находились под ингаляционной анестезией с 2% изофлураном при 1 л/мин  $N_2O/O_2 - 70 : 30$ . Температура тела поддерживалась на уровне  $37,5^\circ C$  с помощью гомеотермической системы с ректальным зондом. FITC-декстран 70 кДа (1 мг/25 г мыши, 0,5% раствор в 0,9% физиологическом растворе, Sigma-Aldrich) вводили через хвостовую вену (~ 100 мкл) при начальной концентрации в сыворотке крови 150 мкМ. Анализ проницаемости ГЭБ проводили сразу и в течение 20 мин после введения FITC-декстрана.

*Обработка изображений с использованием системы Prairie View Ultima*. Для количественной оценки экстравазации FITC-декстрана из церебральных сосудов в ткани мозга применяли систему Prairie View Ultima, а также программу Image J.

*Метод изучения проницаемости ГЭБ с помощью флуоресцентных GM1-липосом*.

В состав липосом входит ганглиозид GM1, полученный из головного мозга крупного рогатого скота. Очищенный ганглиозид GM1 из головного мозга был любезно предоставлен доктором Илей Михалёвым (Институт биоорганической химии им. Шемякина – Овчинникова РАН). Высокоэффективный флуоресцентный зонд (lex = 497 нм, lem = 504 нм), синтезированный, как описано ранее [9], любезно предоставлен доктором Иваном Болдыревым (Институт биоорганической химии им. Шемякина – Овчинникова РАН). Липосомы получали стандартным методом экструзии после гидратации липидной пленки [10]. После экструзии через мембранные фильтры с диаметром пор 100 нм (Extruder Lipex, Northern Lipids, Canada) липосомные дисперсии помещали в физиологический солевой раствор (фосфатный буфер, pH 7,1, всего концентрация липидов 25 мМ). Измеренный методом динамического рассеяния света (BI9000, Brookhaven

Instruments, США) средний диаметр и индекс полидисперсности для липосом составляли 104 и 0,076 нм соответственно.

Для получения флуоресцентного сигнала в липосомы был встроен 1 моль BODIPY-фосфатидилхолина. Флуоресцентно меченные липосомы в физиологическом растворе (0,2 мл/25 г) вводили мышам через хвостовую вену в следующих группах: первая контрольная группа ( $n = 10$  в каждой группе) без звукового воздействия; вторая, третья и четвертая – экспериментальные группы, находившиеся под воздействием звука.

Липосомы вводили внутривенно (0,2 мл/100 г) и давали циркулировать в течение 2 мин. После этого мышей декапитировали и анализировали срезы мозга на конфокальном микроскопе. Чтобы исследовать проницаемость ГЭБ для липосом, применялись три различных маркера, которые наносились на срезы мозга: 1) антиген эндотелиального барьера, конъюгированный с антителами SMI-71, в качестве маркера цереброваскулярного эндотелия; 2) антиглиальный фибриллярный кислый белок (GFAP), метящий астроциты; 3) ламинин, маркирующий базальные мембраны. Экстравазация липосом оценивалась через 1, 4 и 24 ч после воздействия звука.

### Результаты и их обсуждение

*Ex vivo анализ проницаемости ГЭБ для высокомолекулярных соединений*

На первом этапе исследований изучали проницаемость ГЭБ для ЕВАС. ЕВАС является классическим инертным индикатором проницаемости сосудов для молекул с высокой молекулярной массой. ЕВАС – неметаболически активная краска (961 Да), которая прочно связывается с альбумином сыворотки, формируя высокомолекулярный комплекс массой 68,5 кДа [11–13]. Таким образом, ЕВд не проникает через интактный ГЭБ, а его появление в тканях мозга указывает на нарушение ГЭБ [14, 15]. Мы обнаружили, что продолжительность звука (100 и 90 дБ) в течение 2 ч сопровождалась значительным увеличением утечки ЕВАС, в то время как меньшее время воздействия звука (0,5 ч и 1 ч) не было связано с какими-либо изменениями в проницаемости ГЭБ для ЕВАС.

Экстравазацию ЕВАС из церебральных сосудов в ткани мозга определяли после его внутривенного введения мышам до и после звукового воздействия. Данные спектрофлуориметрического анализа показали (рис. 1), что концентрация ЕВАС в интактном мозге была близка к нулю ( $0,42 \pm 0,02$  мкг/г ткани). Это минимальное количество красителя в интактном мозге можно объяснить небольшим содержанием красителя, который может оставаться на стенках сосудов головного мозга после процедуры перфузии [8, 16].

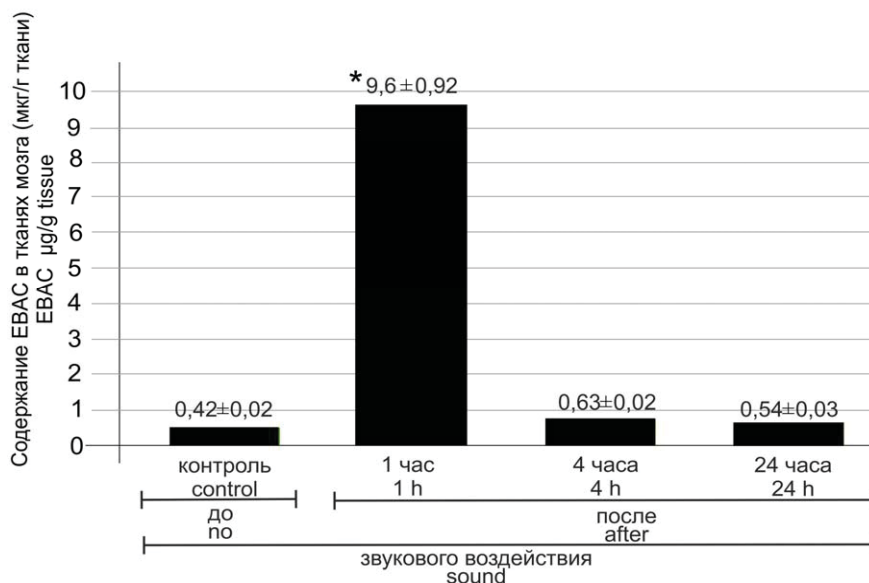


Рис. 1. Данные спектрофлуориметрического анализа проницаемости ГЭБ для альбуминового комплекса Evans Blue (ЕВАС)

Fig. 1. Data spectrofluorimetric analysis for permeability of the BBB for the albumin complex Evans Blue (EBAC)

Прохождение ЕВд существенно возросло у каждого животного после воздействия звуком (см. рис. 1). Так, через 1 ч после звуковой стимуляции наблюдалось 22,8-кратное увеличение прохождения ЕВАС ( $9,6 \pm 0,92$  мкг/г ткани против  $0,42 \pm 0,02$  мкг/г ткани,  $p < 0,05$ ). Важно отметить, что через 4 и 24 ч после звукового воздействия проницаемость ГЭБ для ЕВАС полностью нормализовалась, а экстравазация красителя в мозг была аналогична нормальному состоянию ( $0,63 \pm 0,02$  и  $0,54 \pm 0,03$  мкг/г соответственно).

С целью оценки проницаемости ГЭБ для веществ с высокой молекулярной массой было дополнительно использовано внутривенное введение (FITC)-декстрана 70 кДа. Короткое

время циркуляции (2 мин) было выбрано для (FITC)-декстрана потому, что этот индикатор выводится из крови быстрее, чем ЕВАС. Это также стало причиной выбора высокомолекулярного (FITC)-декстрана 70 кДа, поскольку декстран с молекулярной массой  $< 50$  кДа быстро выводится почками [7].

Конфокальный анализ экстравазации (FITC)-декстрана подтвердил данные спектрофлуориметрического анализа проницаемости ГЭБ для ЕВАС, а именно тот факт, что ГЭБ открывается через 1 ч и закрывается через 4 ч после звукового воздействия. Экстравазация (FITC)-декстрана определялась как четкая флуоресценция, видимая вокруг стенок сосуда (рис. 2, б). В конт-

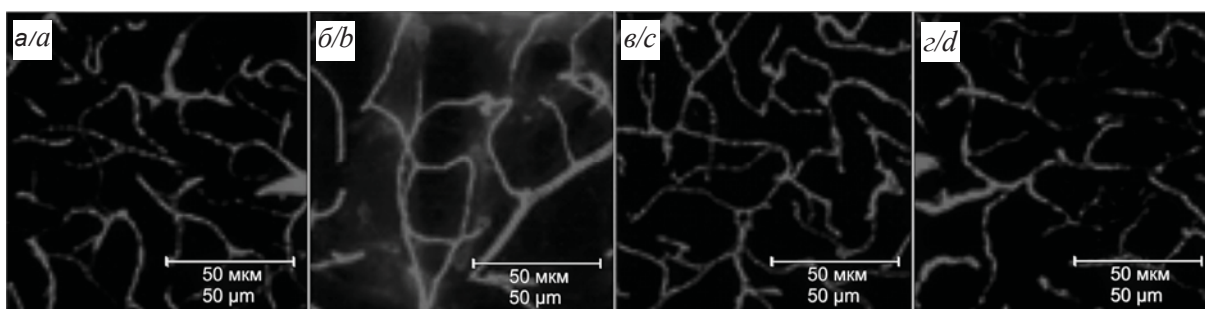


Рис. 2. Данные конфокальной микроскопии проницаемости ГЭБ к (FITC)-декстрану 70 кДа: а – контроль (декстран внутри сосудов мозга), б – экстравазация декстрана из крови в ткани мозга (определяли по появлению вокруг церебральных сосудов флуоресценции); в и г – 4 и 24 ч после воздействия звуком, (FITC)-декстран внутри церебральных сосудов, в этот период ГЭБ закрыт

Fig. 2. Data confocal microscopy of BBB permeability to FITC-dextran 70 kDa: a – control (dextran inside brain vessels), b – extravasation of dextran from the blood into the brain tissue (determined by fluorescence around cerebral vessels); c and d – 4 and 24 hours after sound exposure to, FITC-dextran inside the cerebral vessels, during this period the BBB is closed



рольной группе (без звука), а также через 4 и 24 ч после воздействия звука не наблюдалось экстравазации (FITC)-декстрана, т. е. целостность ГЭБ быстро восстанавливалась после звукового воздействия (рис. 2, а, б, в).

Данные 2ФЛСМ сочетались с результатами конфокальной микроскопии (рис. 3). Так,

2ФЛСМ показала открытие ГЭБ через 1 ч после звуковой стимуляции и нормализацию проницаемости ГЭБ для этого индикатора через 4 и 24 ч после звукового воздействия.

Как показано на рис. 3, а и б, в контрольной группе после внутривенного введения индикатора на темном фоне ткани мозга отчетливо видны

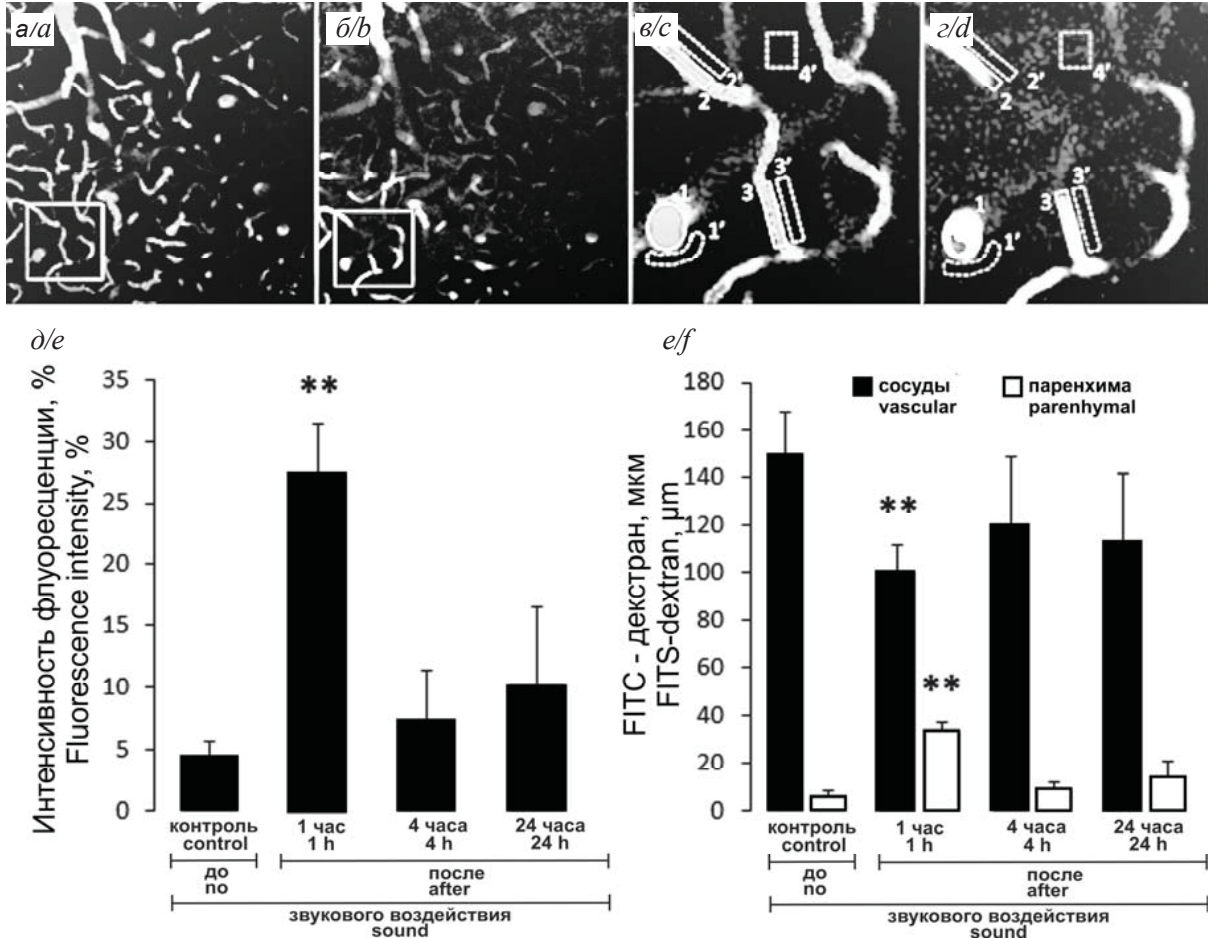


Рис. 3. Данные двухфотонной лазерной сканирующей микроскопии проницаемости ГЭБ к (FITC)-декстрану 70 кДа: а – микрофотографии подкорковой структуры головного мозга мыши через 1 ч после воздействия звука сразу после введения (FITC)-декстрана 70 кДа; б – та же область через 20 мин после инъекции (FITC)-декстрану 70 кДа; в – кортикальная область при большем увеличении от (а), изображающая количественную оценку микрососудистой проницаемости для (FITC)-декстрану 70 кДа. Площадь кровеносных сосудов (1–3) и интерстициальное пространство (1'–4') определяли вручную, а интенсивность флуоресценции в каждой области оценивали с использованием программного обеспечения Image J; г – та же площадь при большем увеличении от (б); д – процентная интенсивность флуоресценции (рассчитанная от сосудистой) в периваскулярной области, отражающая максимальную концентрацию (FITC)-декстрана 70 кДа через 1 ч после воздействия звука. Данные представлены в виде среднего ± SEM, n = 7, \*\* p < 0,01; е – оценка концентрации FITC-декстрана в паренхиме головного мозга и микрососудах через 20 мин после инъекции. Данные представлены в виде среднего ± SEM, n = 7, \*\* p < 0,01

Fig. 3. Data of two-photon laser scanning microscopy of BBB permeability to (FITC)-dextran 70 kDa: а – micrographs of the subcortical structure of the mouse brain 1 hour after sound exposure immediately after the injection of (FITC)-dextran 70 kDa, б – the same area 20 minutes after injection (FITC)-dextran 70 kDa; в – cortical area with a higher magnification from (а), representing the quantitative assessment of microvascular permeability for (FITC)-dextran 70 kDa. The area of blood vessels (1–3) and the interstitial space (1'–4') were determined manually, and the fluorescence intensity in each area was estimated using the Image J software; г – the same area with a larger increase from (б); д – percentage fluorescence intensity (calculated from the vascular) in the perivascular region, reflecting the maximum concentration of (FITC)-dextran 70 kDa 1 h after sound exposure. Data are presented as mean ± SEM, n = 7, \*\* p < 0.01; е – evaluation of the concentration of FITC-dextran in the brain parenchyma and microvessels 20 minutes after injection. Data are presented as mean ± SEM, n = 7, \*\* p < 0.01



яркие сосуды, заполненные (FITC)-декстраном 70 кДа. Через 1 ч в той же области мозга наблюдалась повышенная периваскулярная флуоресценция ткани из-за прохождения (FITC)-декстрана 70 кДа из микрососудов в паренхиму мозга, указывающего на открытие ГЭБ (см. рис. 3, б и в). Количественная оценка сосудистой проницаемости через 20 мин после инъекции (FITC)-декстрана, представленная на рис. 3, д, показывает увеличение ее до  $27,2 \pm 4,2\%$  через 1 ч ( $p < 0,01$ ),  $7,3 \pm 4\%$  через 4 ч ( $p = 0,12$ ) и  $10,1 \pm 6,4\%$  через 24 ч ( $p = 0,08$ ) после звукового воздействия по сравнению с интактным мозгом ( $4,4 \pm 1,2\%$ ). Концентрация (FITC)-декстрана в паренхиме мозга через 1 ч после звукового воздействия существенно увеличилась и составила  $33,7 \pm 3$  мкм и уменьшилась до  $100,6 \pm 10,9$  мкм в сосудах ( $p < 0,01$  для обоих случаев) по сравнению с неповрежденным мозгом, где расчетные концентрации составили  $5,2 \pm 2,8$  мкм и  $149,8 \pm 17,1$  мкм в паренхиме и сосудистой сети соответственно (см. рис. 3, е). Таким образом, 2ФЛСМ показала, что ГЭБ обратимо открывается через 1 ч после звукового воздействия, закрывается через 4 ч, с сохранением нормальной барьерной функции через 24 ч после звука.

В целом результаты трех серий экспериментов первого этапа с применением *ex vivo* и *in vivo* оценки проницаемости ГЭБ к комплексу ЕВ-альбумина (68 кДа) и (FITC)-декстрану (70 кДа) показали, что звук индуцирует значительное, но обратимое открытие ГЭБ через 1 ч для высокомолекулярных веществ, имитирующих высокую проницаемость барьера к белкам.

#### Проницаемость ГЭБ к липосомам

Результаты анализа проницаемости ГЭБ к GM1-липосомам с помощью конфокальной микроскопии (*ex vivo*) представлены на рис. 4. Экстравазацию GM1-липосом из сосудов головного мозга в паренхиму изучали с применением трех разных маркеров: 1) антигена эндотелиального барьера, конъюгированного с антителами SMI-71, в качестве маркера цереброваскулярного эндотелия; 2) антиглиального фибриллярного кислого белка (GFAP), метящего астроциты; 3) ламинина, маркирующего базальные мембраны.

Максимальная концентрация липосом в тканях головного мозга наблюдалась через 1 ч после звукового воздействия (см. рис. 4), до звукового воздействия, а также после 4 и 24 ч. После 24 ч экстравазация GM1-липосом не наблюдалась.

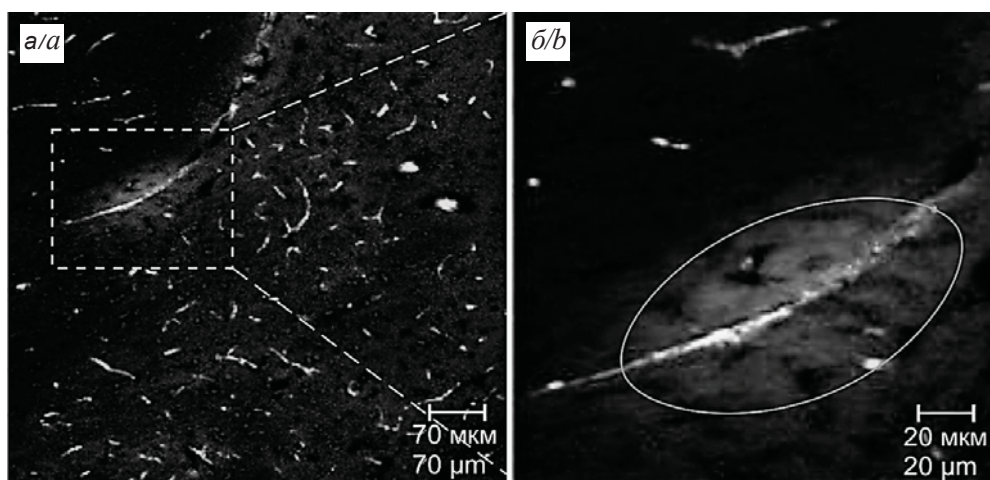


Рис. 4. Конфокальная микроскопия проницаемости ГЭБ для GM1-липосом 100 нм у мышей, подвергнутых звуковому воздействию с применением маркера эндотелия церебральных сосудов SMI-71 и GFAP: через 1 ч после звука. Слева на малом и справа – на большом увеличении

Fig. 4. Confocal microscopy of BBB permeability for GM1-liposomes 100 nm in mice subjected to sound using the endothelial marker of cerebral vessels SMI-71 and GFAP: 1 hour after the sound. Left on low and on the right – at high magnification

Через 1 ч после воздействия звука липосомы наблюдали вне эндотелиальных клеток и между астроцитами, помеченными SMI-71 и GFAP соответственно, но не было экстравазации липосом до, а также через 4 и 24 ч после воздействия звука. Результаты двухфотонной микроскопии

*in vivo* подтвердили данные о прохождении липосом конфокальной *ex vivo*. Открытие ГЭБ наблюдалось только через 1 ч после стимуляции звуком (рис. 5, б).

Как показано на рис. 5, а, через 1 ч после звукового воздействия сразу после внутривенного

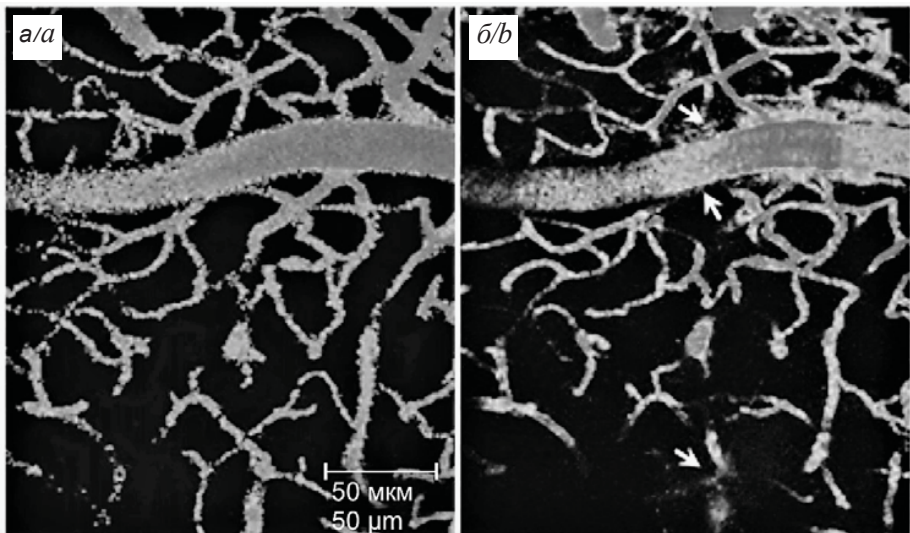


Рис. 5. *In vivo* двухфотонная лазерная сканирующая микроскопия проницаемости ГЭБ для GM1-липосом у мышей, подвергнутых звуковому воздействию: а – GM1-липосомы внутри сосудов мозга в момент их введения в кровь; б – экстравазация GM1-липосом из крови в ткани мозга, что оценивалось по появлению флуоресцентного сигнала от GM1-липосом в тканях мозга

Fig. 5. *In vivo* two-photon laser scanning microscopy of BBB permeability for GM1-liposomes in mice subjected to sound: a – GM1-liposomes inside the brain vessels at the first moment of their injection in blood; b – extravasation of GM1-liposomes from the blood into brain tissue, which was estimated by the appearance fluorescent signal GM1-liposomes in the brain tissues

введения липосом на темном фоне ткани мозга отчетливо видны яркие сосуды, заполненные флуоресцентными липосомами. Через 20 мин наблюдения регистрировали выход GM1-липосом из микрососудов в паренхиму мозга, что определяли по появлению флуоресцентного сигнала от GM1-липосом вокруг сосудов, указывающего на открытие барьера (см. рис. 5, б). В неповрежденном мозге экстравазации не наблюдалось.

На рис. 6 показано увеличение флуоресценции периваскулярной паренхимы до  $15,9 \pm 5,2\%$  через 1 ч ( $p < 0,01$ ),  $3,4 \pm 2,8\%$  через 4 ч и  $5,4 \pm 4,1\%$  через 24 ч после звукового воздействия по сравнению с интактным мозгом ( $2,2 \pm 1,3\%$ ). Таким образом, данные двухфотонной микроскопии *in vivo* подтвердили, что ГЭБ обратимо открывается через 1 ч после звукового воздействия, закрывается через 4 ч и незначительно открывается снова через 24 ч.

Таким образом, результаты, полученные *ex vivo* и *in vivo*, предполагают, что GM1-липосомы диаметром 100 нм пересекают ГЭБ через 1 ч после звукового воздействия, что также было показано в других исследованиях, использующих внутриартериальную инъекцию GM1-липосом (100 нм) [16].

Следовательно, применение конфокальной (*ex vivo*) и двухфотонной (*in vivo*) микроскопии

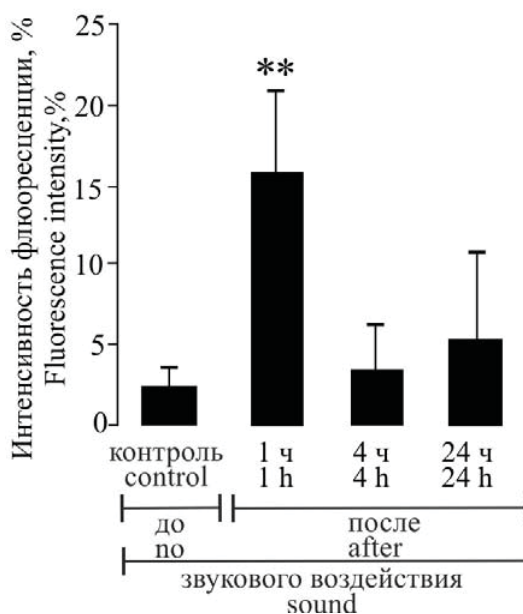


Рис. 6. Количественная оценка экстравазации GM1-липосом

Fig. 6. Quantification extravasation of GM1-liposomes

показало эффективность использования звукового воздействия для обратимого повышения проницаемости ГЭБ к GM1-липосомам. Периваскулярный отек во всех сериях экспериментов не наблюдался.



### Заключение

В данной работе, выполненной на здоровых самцах крыс, впервые показано, что применение слышимого прерывистого звука (100 дБ, 370 Гц, продолжительностью 2 ч) приводит к обратимому повышению проницаемости ГЭБ к высокомолекулярным соединениям, таким как ЕВАС (68,5 кДа), (FITC)-декстран (70 кДа) и флуоресцентным GM1-липосомам через 1 ч после воздействия с последующим быстрым (через 4 ч) восстановлением барьерной функции мозга. Звук как естественный фактор может явиться новым прогрессивным методом для успешной доставки лекарств в мозг. Этот метод может быть применен в повседневной клинической практике.

### Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 17-15-01263).

### Список литературы

1. *Pardridge W.M.* Blood-brain barrier delivery // *Drug Discov Today*. 2007. Vol. 12. P. 54–61.
2. *Pardridge W. M.* Brain drug targeting : the future of brain drug development. Cambridge : Cambridge University Press, 2001. 111 p.
3. *Ghose A. K., Viswanadhan V. N., Wendoloski J. J.* A knowledge-based approach in designing combinatorial or medicinal chemistry libraries for drug discovery 1. A qualitative and quantitative characterization of known drug databases // *J. Comb Chem*. 1999. Vol. 1. P. 55–68.
4. *Hammarlund-Udenaes M., Lange E. de, Thorne R. G.* Drug Delivery to the Brain : Physiological Concepts, Methodologies and Approaches. N.Y. : Springer; L. : Heiderberg Dordrecht, 2014. 658 p.
5. *Mitragotri S.* Devices for overcoming biological barriers : The use of physical forces to disrupt the barriers // *Adv. Drug. Deliv. Rev*. 2013. 65. P. 100–103.
6. *Pandey P. K., Sharma A. K., Gupta U.* Blood brain barrier : An overview on strategies in drug delivery, realistic in vitro modeling and in vivo live tracking // *Published in Tissue Barriers*. 2016. DOI: 10.1080/21688370.2015.1129476
7. *Hoffmann A.* High and low molecular weight fluorescein isothiocyanate (FITC)-dextran to assess blood-brain barrier disruption: technical consideration // *Transl Stroke Res*. 2011. Vol. 2, iss. 1. P. 106–111.
8. *Wang H.-L., Lai T. W.* Optimization of Evans blue quantitation in limited rat tissue samples // *Sci. Rep*. Vol. 4. P. 6588. Published online 2014 Oct. 10. DOI: 10.1038/srep06588
9. *Boldyrev I. A., Zhai X., Momsen M. M., Brockman H. L., Brown R. E., Molotkovsky J. G.* New BODIPY lipid probes for fluorescence studies of membranes // *J. Lipid Res*. 2007. Vol. 48. P. 1518–1532.
10. *Olson F., Hunt C. A., Szoka F. C., Vail W. J., Papahadjopoulos D.* Preparation of liposomes of defined size distribution by extrusion through polycarbonate membranes // *Biochim. Biophys. Acta*. 1979. Vol. 557. P. 9–23.
11. *Rawson R. A.* The binding of T-1824 and structurally related diazo dyes by the plasma proteins // *Am. J. Physiol*. 1943. Vol. 138. P. 708–717.
12. *Gregersen M. I., Gibson J. J., Stead E. A.* Plasma volume determination with dyes: errors in colorimetry; use of the blue dye T-1824 // *Am. J. Physiol*. 1935. Vol. 113. P. 54–55.
13. *Belyaev L., Busto R., Zhao W., Ginsberg M. D.* Quantitative evaluation of blood-brain barrier permeability following middle cerebral artery occlusion in rats // *Brain Res*. 1996. Vol. 739. P. 88–96.
14. *Chen K. B.* Increase in Evans blue dye extravasation into the brain in the late developmental stage // *Neuroreport*. 2012. Vol. 23. P. 699–701.
15. *Saria A., Lundberg J. M.* Evans blue fluorescence: quantitative and morphological evaluation of vascular permeability in animal tissues // *J. Neurosci. Methods*. 1983. Vol. 8. P. 41–49.
16. *Mora M.* Design and characterization of liposomes containing long-chain N-AcylPEs for brain delivery: penetration of liposomes incorporating GM1 into the rat brain // *Pharm. Res*. 2002. Vol. 19, iss. 10. P. 1430–1438.

### Образец для цитирования:

Шариф А. Е., Абдурашитов А. С., Намыкин А. А., Широков А. А., Лыкова Е. Ю., Саранцева Е. И., Искра Т. Д., Водовозова Е. Л., Хороводов А. С., Терсков А. В., Мамедова А. Т., Агранович И. М., Климова М. М., Семычкина-Глушковская О. В. Изменение проницаемости гематоэнцефалического барьера под воздействием громкого звука // *Изв. Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология*. 2019. Т. 19, вып. 3. С. 312–321. DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2019-19-3-312-321>

### Changes in Blood-Brain Barrier Permeability under the Influence of Loud Sound

A. E. Sharif, A. S. Abdurashitov, A. A. Namykin, A. A. Shirokov, E. Yu. Lykova, E. I. Sarantseva, T. D. Iskra, E. L. Vodovozova, A. P. Khorovodov, A. V. Terskov, A. T. Mamedova, I. M. Agranovich, M. M. Klimova, O. V. Semyachkina-Glushkovskaya

Sharif Ali Esmat, <https://orcid.org/0000-0002-0500-1390>, Saratov State University, Interdisciplinary Center of Critical Technologies in Medicine, 83 Astrakhanskaya St., Saratov 410012, Russia, [esmtshareef@yahoo.co.uk](mailto:esmtshareef@yahoo.co.uk)

Arkady S. Abdurashitov, <https://orcid.org/0000-0003-0731-8364>, Saratov State University, Institute of Optics and Biophotonics, Interdisciplinary Center of Critical Technologies in Medicine, 83 Astrakhanskaya St., Saratov 410012, Russia, [abdurashitov-optics@mail.ru](mailto:abdurashitov-optics@mail.ru)





Anton A. Namykin, <https://orcid.org/0000-0002-9945-8542>, Saratov State University, Institute of Optics and Biophotonics, Interdisciplinary Center of Critical Technologies in Medicine, 83 Astrakhanskaya St., Saratov 410012, Russia, anton-namikin@bk.ru

Alexander A. Shirokov, <https://orcid.org/0000-0003-3239-7877>, Institute of Biochemistry, Physiology of Plants and Microorganisms, RAS, 13 Entuziastov Ave., Saratov 410049, Russia, shirokov\_a@ibppm.ru

Ekaterina Yu. Lykova, <https://orcid.org/0000-0002-7285-7025>, Saratov State University, Interdisciplinary Center of Critical Technologies in Medicine, 83 Astrakhanskaya St., Saratov 410012, Russia, eckaterina\_lykova@mail.ru

Elena I. Sarantseva, <https://orcid.org/0000-0002-3507-7708>, Saratov State University, Interdisciplinary Center of Critical Technologies in Medicine, 83 Astrakhanskaya St., Saratov 410012, Russia, sophora68@mail.ru

Tatyana D. Iskra, <https://orcid.org/0000-0002-1895-8159>, Saratov State University, Interdisciplinary Center of Critical Technologies in Medicine, 83 Astrakhanskaya St., Saratov 410012, Russia, tata-isk@yandex.ru

Elena L. Vodovozova, <https://orcid.org/0000-0003-0164-7423>, Moscow Institute of Bioorganic Chemistry M. M. Shemyakin and Y. A. Ovchinnikov Russian Academy of Sciences, 16/10 GSP-7, Miklukho-Maklaya St., Moscow 117997, Russia, elvod@lipids.ibch.ru

Aleksandr P. Khorovodov, <https://orcid.org/0000-0002-5318-5200>, Saratov State University, Interdisciplinary Center of Critical Technologies in Medicine, 83 Astrakhanskaya St., Saratov 410012, Russia, khorovodov2012@yandex.ru

Andrey V. Terskov, <https://orcid.org/0000-0003-1111-9990>, Saratov State University, Interdisciplinary Center of Critical Technologies in Medicine, 83 Astrakhanskaya St., Saratov 410012, Russia, terskov.andrey@gmail.com

Aysel T. Mamedova, <https://orcid.org/0000-0002-0229-0801>, Saratov State University, Interdisciplinary Center of Critical Technologies in Medicine, 83 Astrakhanskaya St., Saratov 410012, Russia, mamedovaysel95@gmail.com

Ilana M. Agranovich <https://orcid.org/0000-0002-7903-3897>, Saratov State University, Interdisciplinary Center of Critical Technologies in Medicine, 83 Astrakhanskaya St., Saratov 410012, Russia, ilana.agranovich@yandex.ru

Maria M. Klimova, <https://orcid.org/0000-0002-2606-8797>, Saratov State University, Interdisciplinary Center of Critical Technologies in Medicine, 83 Astrakhanskaya St., Saratov 410012, Russia, mari-1997@mail.ru

Oksana V. Semyachkina-Glushkovskaya, <https://orcid.org/0000-0001-6753-7513>, Saratov State University, Interdisciplinary Center of Critical Technologies in Medicine, 83 Astrakhanskaya St., Saratov 410012, Russia, glushkovskaya@mail.ru

The development of methods of drug delivery to the brain is one of the priorities of the therapy of most cerebral diseases. There are more than 70 technologies to overcome the blood-brain barrier (BBB), but many of them are not widely used in daily clinical practice, as they lead to negative consequences. Here we propose a new method of overcoming the BBB using loud sound (110 dB, 370 Hz, duration – 2 hours). Independent results on mice obtained in several experimental groups clearly demonstrate that sound significantly increases the permeability of BBB to high-molecular substances, as well as to liposomes (100 nm) simulating the delivery to the brain of solutes, proteins and materials with nanocarriers. Sound-induced BBB opening is safe (according to the assessment of the absence of perivascular edema and apoptosis) and reversible (opening / closing of BBB after 1 h/4 h after exposure to sound, respectively) due to compensatory changes in cerebral blood flow. Thus, sound as a natural factor is a new and promising easily feasible method for the successful delivery of drugs to the brain.

**Keywords:** sound, blood-brain barrier, dextran, brain, GM 1-liposomes, Evans Blue dye.

**Acknowledgements:** This work was supported by the Russian Science Foundation (project No. 17-15-01263).

## References

1. Pardridge W. M. Blood-brain barrier delivery. *Drug Discov Today*, 2007, vol. 12, pp. 54–61.
2. Pardridge W. M. *Brain drug targeting: the future of brain drug development*. Cambridge, Cambridge University Press, 2001. 111 p.
3. Ghose A. K., Viswanadhan V. N., Wendoloski J. J. A knowledge-based approach in designing combinatorial or medicinal chemistry libraries for drug discovery. 1. A qualitative and quantitative characterization of known drug databases. *J. Comb Chem.*, 1999, vol. 1, pp. 55–68.
4. Hammarlund-Udenaes M., Lange E. de, Thorne R. G. *Drug Delivery to the Brain: Physiological Concepts, Methodologies and Approaches*. New York, Springer, London, Heidelberg Dordrecht, 2014. 658 p.
5. Mitragotri S. Devices for overcoming biological barriers: The use of physical forces to disrupt the barriers. *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, 2013, vol. 65, pp. 100–103.
6. Pandey P. K., Sharma A. K., Gupta U. Blood brain barrier: An overview on strategies in drug delivery, realistic in vitro modeling and in vivo live tracking. *Published in Tissue Barriers*. 2016. DOI: 10.1080/21688370.2015.1129476
7. Hoffmann A. High and low molecular weight fluorescein isothiocyanate (FITC)-dextran to assess blood-brain barrier disruption: technical consideration. *Transl Stroke Res.*, 2011, vol. 2, iss. 1, pp. 106–111.
8. Wang H.-L., Lai T. W. Optimization of Evans blue quantitation in limited rat tissue samples. *Sci. Rep.*, vol. 4, pp. 6588. Published online 2014 Oct 10. DOI: 10.1038/srep06588
9. Boldyrev I. A., Zhai X., Momsen M. M., Brockman H. L., Brown R. E., Molotkovsky J. G. New BODIPY lipid



- probes for fluorescence studies of membranes. *J. Lipid Res.*, 2007, vol. 48, pp. 1518–1532.
10. Olson F., Hunt C. A., Szoka F. C., Vail W. J., Papahadjopoulos D. Preparation of liposomes of defined size distribution by extrusion through polycarbonate membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1979, vol. 557, pp. 9–23.
  11. Rawson R. A. The binding of T-1824 and structurally related diazo dyes by the plasma proteins. *Am. J. Physiol.*, 1943, vol. 138, pp. 708–717.
  12. Gregersen M. I., Gibson J. J., Stead E. A. Plasma volume determination with dyes: errors in colorimetry; use of the blue dye T-1824. *Am. J. Physiol.*, 1935, vol. 113, pp. 54–55.
  13. Belyaev L., Busto R., Zhao W., Ginsberg M. D. Quantitative evaluation of blood-brain barrier permeability following middle cerebral artery occlusion in rats. *Brain Res.*, 1996, vol. 739, pp. 88–96.
  14. Chen K. B. Increase in Evans blue dye extravasation into the brain in the late developmental stage. *Neuroreport*, 2012, vol. 23, pp. 699–701.
  15. Saria A., Lundberg J. M. Evans blue fluorescence: quantitative and morphological evaluation of vascular permeability in animal tissues. *J. Neurosci. Methods*, 1983, vol. 8, pp. 41–49.
  16. Mora M. Design and characterization of liposomes containing long-chain N-AcylPEs for brain delivery: penetration of liposomes incorporating GM1 into the rat brain. *Pharm. Res.*, 2002, vol. 19, iss. 10, pp. 1430–1438.

---

**Cite this article as:**

Sharif A. E., Abdurashitov A. S., Namykin A. A., Shirokov A. A., Lykova E. Yu., Sarantseva E. I., Iskra T. D., Vodovozova E. L., Khorovodov A. P., Terskov A. V., Mamedova A. T., Agranovich I. M., Klimova M. M., Semyachkina-Glushkovskaya O. V. Changes in Blood-Brain Barrier Permeability under the Influence of Loud Sound. *Izv. Saratov Univ. (N. S.), Ser. Chemistry. Biology. Ecology*, 2019, vol. 19, iss. 3, pp. 312–321 (in Russian). DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2019-19-3-312-321>

---