

## Б. Экспериментальные исследования

© Коллектив авторов, 2022  
УДК 616-006.484:612.086  
DOI 10.37469/0507-3758-2022-68-1-113-117

Вопросы онкологии, 2022. Том 68, № 1

*В.Ф. Дубровская, М.П. Самойлович, Н.А. Костеников, Е.Г. Кованько, О.А. Шашкова,  
Л.А. Терехина, М.С. Мухина*

### **Изменения параметров внутриопухолевых и дистанционно расположенных микрососудов в процессе роста глиобластомы, имплантированной в мозг крыс**

ФГБУ «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий имени академика А.М. Гранова»  
Минздрава Российской Федерации, Санкт-Петербург

Целью работы явилось изучение размеров микрососудов в имплантированной в мозг глиобластоме в процессе ее роста, а также в удаленно расположенных зонах мозга и в тканях, не имеющих общего кровообращения с мозгом у крыс с глиобластомой.

**Материалы и методы.** Исследования проведены на гистологических препаратах морфометрическим методом на протяжении от 6 ч до 18 сут после имплантации опухоли в мозг крыс.

**Результаты.** Зарегистрировано нарастание доли (%) микрососудов с широким диаметром как в самой опухоли, так и в удаленных зонах ткани обоих полушарий мозга. Аналогичная направленность изменений имела место и в динамике площадей микрососудов на срезах ушной раковины крыс, не имеющей общего кровообращения с головным мозгом.

**Выводы.** Полученные данные позволяют обосновать целесообразность дальнейшего выявления дистанционных тестов для оценки размеров опухоли в ходе разработки новых лечебных мероприятий.

**Ключевые слова:** глиобластома, морфометрия, диаметр микрососудов

#### **Введение**

Глиобластома (ГБ), являясь первичной злокачественной опухолью головного мозга, встречается с частотой не менее 15% среди всех первичных опухолей ЦНС [1]. Широкий спектр клинико-неврологической симптоматики, выявляемой, главным образом, на поздних стадиях развития опухоли, затрудняет раннюю диагностику и снижает эффективность лечебных мероприятий. Несмотря на использование современных методов воздействия на опухоль, таких как нейро- и радиохirurgия, химиотерапия, лучевое лечение, продолжительность жизни пациентов с

ГБ IV степени злокачественности не превышает 14 мес [1, 2]. В последние годы внимание экспериментаторов и клиницистов привлечено к изучению методов блокады ангиогенеза как способу замедления роста опухоли [3–6]. Однако использование различных по химическому составу и механизму действия ингибиторов ангиогенеза до настоящего времени не позволило кардинально решить проблему торможения роста и раннего метастазирования ГБ [1, 7, 8]. Имеющиеся данные недостаточны для понимания действия образуемых ГБ медиаторов на ангиогенез и на структурно-функциональные характеристики микрососудистой сети как в самой опухоли, так и в ткани мозга.

Задачей работы явилось изучение размерных характеристик микрососудов в имплантированной ГБ в процессе ее роста, а также в удаленно расположенных зонах мозга и в тканях, не имеющих общего кровообращения с мозгом у крыс с ГБ.

#### **Материалы и методы**

В исследование было включено 45 белых беспородных крыс-самцов с массой тела 200–220 г. Опыты проводились в соответствии с требованиями и условиями, изложенными в «Международных рекомендациях по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» и приказом Минздрава РФ № 199н от 01.04.2016 г. «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики». Крысам интракраниально имплантировали клетки глиомы С6, которая по своим свойствам наиболее близка мультиформной глиобластоме человека [9]. Способ имплантации ГБ и метод морфометрического исследования описаны нами ранее [10]. Через 6 ч, а также на 1-, 3-, 7-, 14-е и 18-е сутки животных выводили из опыта внутримышечным введением двойной дозы «Золетила-100» с добавлением 0,2–0,5 мл 10% раствора лидокаина. Исследование всех показателей проводили морфометрическим методом у 5–6 подопытных и 3 контрольных животных на каждый из вышеуказанных сроков с использованием программы для анализа изображений «CellSens» («Olympus»). Изучали расположение и измеряли диаметр сосудов опухоли после трансплантации. Определяли диаметр микрососудов в участках ткани мозга

правой гемисферы, отстоящих на 1 мм и более от края опухоли, а также в левой интактной доле мозга. Контролем во всех экспериментах служили соответствующие показатели крыс, которым одновременно с подопытными животными интракраниально в аналогичном объеме вводили раствор Хэнкса, служивший средой для клеток ГБ. Каждая из сравниваемых групп на каждый срок была представлена 215 значениями измеряемого показателя в контроле и 450 — в опыте. Характер и направленность изменений показателей были аналогичными у всех крыс в каждой из групп как для данных при обследовании сосудов в опухоли, так и в ткани мозга. У каждого животного определяли долю (в %) микрососудов с диаметром от 1 мкм от всех исследованных микрососудов в соответствующих зонах мозга. Для изучения микрососудов органа, не связанного кровоснабжением с головным мозгом, исследовали ткань ушной раковины крыс. Учитывая особенности архитектоники сосудов уха, срезы в контрольных и опытных образцах производили в одном блоке в перпендикулярной плоскости по отношению к расположению ушной раковины на одном уровне от ее края. Определяли сумму площадей всех микрососудов в срезе (в мкм<sup>2</sup>) и среди них долю (%) сосудов с площадью от 100 мкм<sup>2</sup>. Исследования препаратов с использованием гистохимического метода проводили на парафиновых срезах толщиной 3 мкм с моноклональными кроличьими антителами Ki-67 (клон SP6) с рабочим разведением 1:200. Система визуализации ErVision™ Flex (Dako). Демаскировка антигенов проведена путём нагревания срезов в трис-ЭДТА буфере (pH=9,0) при температуре 95 °C [11].

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы Statistica 10.0. Данные представлены в виде среднего значения ± стандартная ошибка среднего. Значимость различий между независимыми выборками оценивали с помощью *u*-критерия Манна–Уитни. Статистически значимыми считали различия при  $p < 0,05$ .

## Результаты

Уже через 6 ч после имплантации в небольших скоплениях клеток ГБ встречались микрососуды, к стенкам которых прилегали опухолевые клетки. Диаметр используемых опухолью сосудов хозяина в этот период превышал среднюю величину показателя для магистралей в ткани мозга интактных крыс, равную  $0,86 \pm 0,04$  мкм (рис. 1).

Через 1–3 сут в медленно увеличивающихся свою массу опухолях нарастала численность микрососудов, доля которых с диаметром от 1 мкм варьировала в диапазоне от  $58 \pm 6,5$  до  $69 \pm 5,4\%$ , против  $14 \pm 1,7\%$  в контроле. Более интенсивный процесс ангиогенеза в этот период наблюдался в перитуморальных зонах, где наряду с внедрением магистралей из опухоли в ткань мозга появлялись и хаотично расположенные микрососуды с широкими просветами и периваскулярно расположенными опухолевыми клетками (рис. 2). Присутствовали и отдельные клетки ГБ, расположенные диффузно в окружающей ткани мозга.

Васкуляризация опухоли нарастала к 7 сут с увеличением доли микрососудов с широким просветом. Причем между 7 и 18 сут в период наиболее интенсивного роста размера опухоли статистически значимых изменений исследован-

ного показателя не происходило. Его величины находились в пределах от  $85 \pm 4,6$  до  $89 \pm 3,4\%$ . К 18-м суткам постимплантационного периода васкуляризация в отдельных участках центральной зоны в крупных опухолях практически отсутствовала. По направлению к маргинальным областям васкуляризация нарастала при сохраняющемся процессе перитуморальной инвазии.

В следующем разделе работы были исследованы параметры микрососудов в ткани правого полушария головного мозга на значительном удалении от края опухоли, а также в левом интактном полушарии мозга. Через 1 сут после имплантации доля сосудов с просветом от 1 мкм статистически значимо не превышала контрольных значений. Через 3 сут данный показатель для правого полушария возрастал по сравнению с предыдущим сроком исследования. К 7-м суткам доля микрососудов с широким диаметром резко нарастала и продолжала оставаться на высоком уровне вплоть до 18 сут с некоторым уменьшением на 14-е сутки. Аналогичные показатели параметров микрососудов в левом полушарии мозга имели сходную динамику изменений, отличаясь лишь меньшей их величиной (рис. 3).

При исследовании срезов ткани обоих полушарий мозга после гистохимической обработки на Ki67 были обнаружены следующие взаимоотношения между клетками ГБ и микрососудами. В правой половине мозга, начиная со срока в 7 сут и до 18 сут, помимо диффузно расположенных опухолевых клеток и их небольших скоплений, большинство элементов ГБ находилось в периваскулярных зонах сосудов с увеличенным диаметром (рис. 4, а). В левом полушарии такие микрососуды были как свободными от опухолевых клеток, так и с наличием клеток ГБ в периваскулярных зонах (рис. 4, б).

Данная картина была сходной во всех участках исследуемой ткани мозга. При этом в течение постимплантационного периода нарастала лишь численность микрососудов с периваскулярным расположением клеток ГБ. Таким образом, были получены данные об изменениях в структуре микрососудов, находящихся в удаленных от ГБ зонах мозга.

Известно, что растущая опухоль воздействует не только на структурно-функциональные параметры пораженного органа, но и на состояние всего организма в целом. В связи с этим в следующем разделе работы были изучены возможные изменения в микрососудистой сети органа, не связанного кровообращением с кровеносной системой мозга. Таким органом служила ушная раковина крысы. Морфометрические исследования были проведены на 11-е и 18-е сутки постимплантационного периода. На 11-е

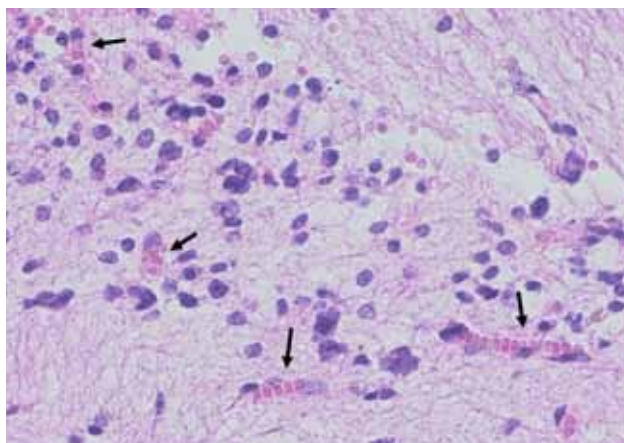


Рис. 1. Микрососуды среди опухолевых клеток через 6 ч после имплантации глиобластомы. Диаметр микрососудов 1,66–1,70 мкм. Микрососуды указаны стрелками. Гематоксилин — эозин. Ув. 200

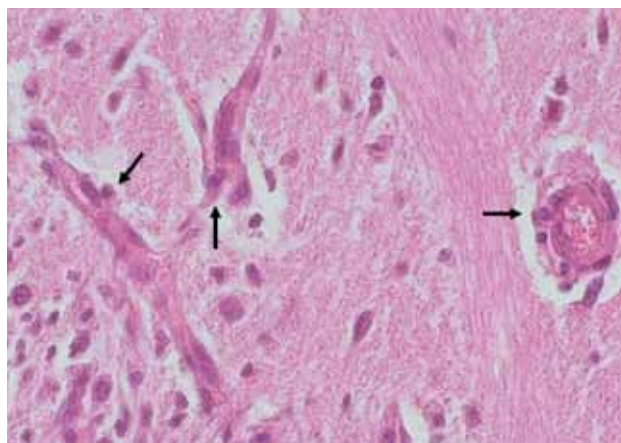


Рис. 2. Микрососуды с прилежащими опухолевыми клетками в перитуморальной зоне через 3 сут после имплантации глиобластомы. Диаметр микрососудов 1,57–1,71 мкм. Микрососуды указаны стрелками. Гематоксилин — эозин. Ув. 320

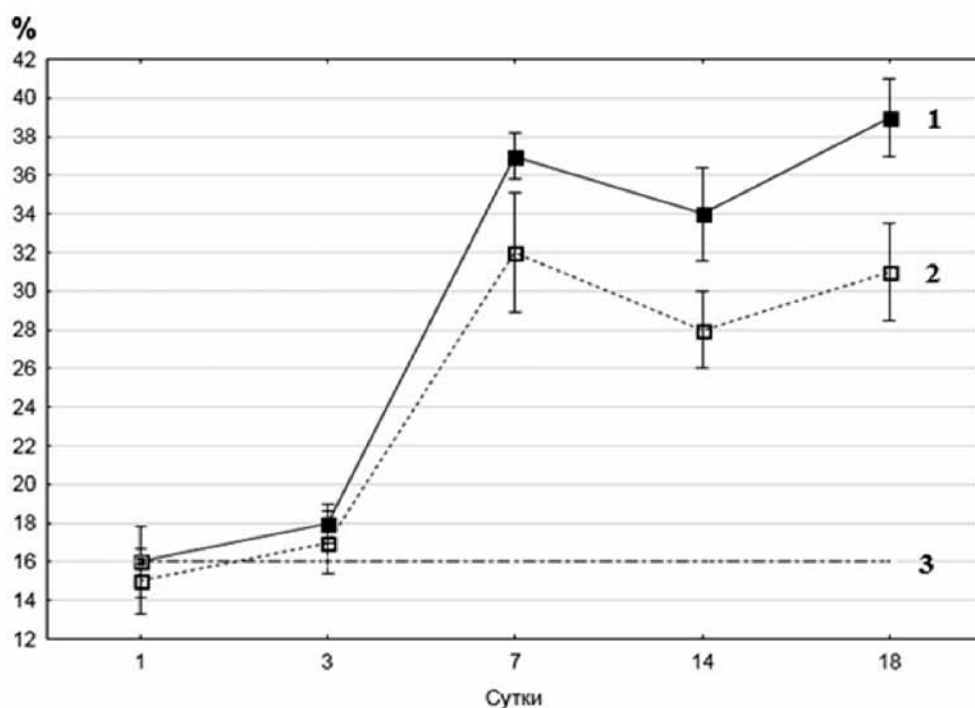


Рис. 3. Доля микрососудов с диаметром от 1 мкм в правом полушариях мозга в процессе роста глиобластомы. По оси абсцисс: время после имплантации глиобластомы (сутки). По оси ординат: доля (в %) сосудов с диаметром от 1 мкм ( $M \pm m$ ). 1 — правое полушарие; 2 — левое полушарие; 3 — верхняя граница 95% доверительного интервала (ДИ) контрольных значений

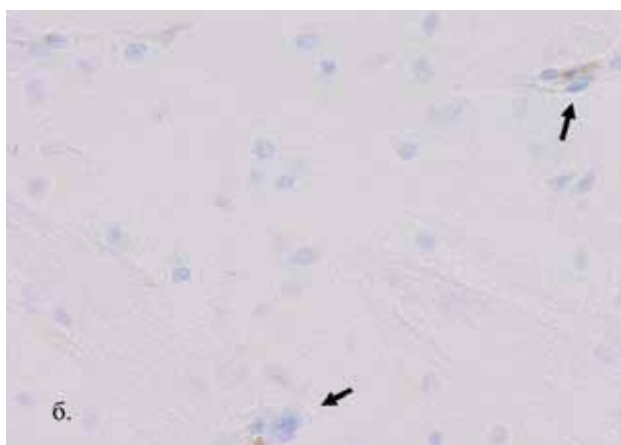
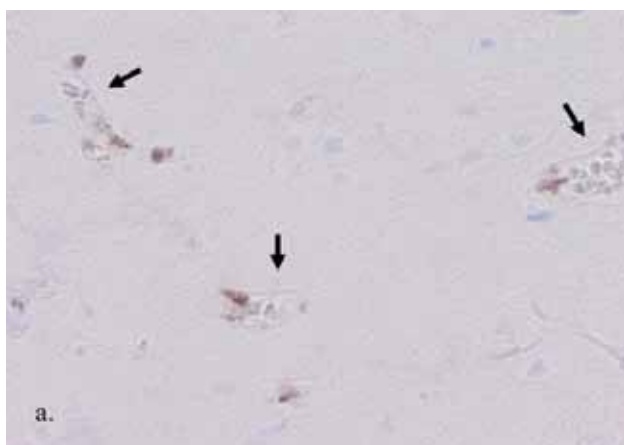


Рис. 4. Ткань мозга с микрососудами и клетками опухоли в периваскулярных зонах (стрелки) через 14 сут после имплантации. а — правое полушарие; б — левое полушарие. Окраска антителами к Ki-67. Ув. 320

сутки доля площади, приходящаяся на крупные микрососуды (от 100 мкм<sup>2</sup>), от площади, занимаемой всеми микрососудами на срезах ткани ушной раковины, составляла 30±2,5%, тогда как в контроле — 19±2,3%. Через 18 сут соответствующие показатели для крыс с ГБ были равны 37±3,7 против 21±2,0% в контроле.

Таким образом, в данном разделе работы зарегистрирован дистанционный эффект влияния растущей ГБ на микрососудистую сеть органа, не связанного общим кровоснабжением с мозгом животного с ГБ.

### Обсуждение

Известно, что на первых этапах своего развития интракраниально перевитая ГБ для своего роста использует сосуды хозяина с последующей активацией процесса ангиогенеза [1, 3]. В работе было показано, что уже через 6 часов после имплантации в небольших скоплениях клеток ГБ регистрируются микрососуды с тесно прилегающими к их стенкам клетками опухоли. Причем, такие сосуды животных с ГБ превосходят по своему диаметру микрососуды ткани головного мозга интактных крыс. По-видимому, за столь короткий временной промежуток клетки ГБ не только начинают использовать, но и преобразуют как структурные, так, возможно, и структурно-функциональные характеристики сосудов хозяина. Далее, в первые 3 сут микрососуды с широким диаметром внедрялись в окружающие ткани мозга. Наиболее интенсивная васкуляризация в этот период происходила не в опухолевой ткани, а в перитуморальных зонах. Ранее нами морфометрическим методом было показано, что в процессе перитуморальной инвазии опухолевые клетки располагались периваскулярно на микрососудах с широким диаметром [10].

С началом процесса ангиогенеза в ткани опухоли появлялись сосуды разного диаметра. Однако доля магистралей с широким просветом увеличивалась и становилась преобладающей в период с 7-х по 18-е сутки. Подобные, хотя и менее выраженные явления, были зарегистрированы и в микрососудах ткани мозга как в правом, так и в левом (интактном) полушарии с совпадением по динамике с процессом в ткани растущей опухоли. Именно такие сосуды, как правило, содержали в периваскулярных зонах опухолевые клетки.

Следует отметить, что визуально наблюдаемое увеличение размеров ГБ от 7 до 18 сут не сопровождалось подобным же нарастанием доли широких микрососудов в ткани мозга. Причиной могла быть вариабельность в размерах ГБ вследствие разных условий роста опухоли, свя-

занных с состоянием отдельных животных в момент имплантации и, в частности, с их иммунным статусом. Установление такой зависимости между диаметром микрососудов и размером опухоли может служить предметом дальнейших исследований.

Дистанционный эффект влияния растущей ГБ на микрососуды органа, не связанного с кровоснабжением мозга, зарегистрирован в ткани ушной раковины крыс. Полученные данные соответствуют представлениям о наличии альтераций не только в органе с развивающейся злокачественной опухолью, но и в отдаленных от опухоли органах и тканях [12]. Результаты работы рассматриваются как основание для поиска характеристик микрососудов в дистанционно расположенных от опухоли тканях и медиаторов в составе крови для оценки изменений в процессе роста опухоли при разработке новых лечебных мероприятий.

### Заключение

В первые часы и сутки после имплантации ГБ в мозг крыс клетки опухоли не только используют, но и модифицируют структуру микрососудов хозяина, а затем и значительную долю вновь образованных сосудов опухоли, а также микрососудов в ткани мозга. Как правило, именно микрососуды с широким диаметром были задействованы при периваскулярной инвазии в перитуморальные зоны, а затем и при метастазировании в ткань мозга. Увеличение доли крупных микрососудов наблюдалось и в ткани ушной раковины, не связанной с мозгом общим кровоснабжением.

Полученные результаты служат основанием для выявления структурно-функциональных характеристик микрососудов в отдаленно расположенных от опухоли тканях и медиаторов крови. Такие показатели позволили бы дистанционно оценивать динамику роста новообразования при разработке новых противоопухолевых мероприятий.

#### *Конфликт интересов*

Авторы заявляют об отсутствии в статье конфликта интересов.

#### *Финансирование*

Работа выполнена в рамках Государственного задания Министерства здравоохранения Российской Федерации.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Яковенко Ю.Г. Глиобластомы: современное состояние проблемы // Медицинский вестник Юга России. 2019;10(4):28–35 [Yakovenko YuG. Glioblastomas: the

- current state of the problem // *Meditsinskii vestnik Yuga Rossii*. 2019;10(4):28–35 (In Russ.).
2. Brown TJ, Brennan MC, Li M et al. Association of the extent of resection with survival in glioblastoma: a systematic review and meta-analysis // *JAMA oncology*. 2016;2(11):1460–1469.
  3. Бывальцев В.А., Степанов И.А., Белых Е.Г. и др. Молекулярные аспекты ангиогенеза в глиобlastомах головного мозга // *Вопросы онкологии*. 2017;63(1):19–27 [Bvaltsev VA, Stepanov IA, Belykh EG et al. Molecular aspects of angiogenesis in brain glioblastomas // *Voprosy onkologii*. 2017;63(1):19–27 (In Russ.)].
  4. Черток В.М., Захарчук Н.В., Черток А.Г. Клеточно-молекулярные механизмы регуляции ангиогенеза в головном мозге // *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С.Корсакова. Спецвыпуски*. 2017;117(8):43–55. doi:10.17116/jnevro20171178243-55 [Chertok VM, Zakharchuk NV, Chertok AG. The cellular and molecular mechanisms of angiogenesis regulation in the brain // *S.S. Korsakov Journal of Neurology and Psychiatry // Zhurnal nevrologii i psikiatrii imeni S.S.Korsakova*. 2017;117(8):43–55 (In Russ.)]. doi:10.17116/jnevro20171178243-55
  5. Darland DC, Massingham LJ, Smith SR et al. Pericyte production of cell-associated VEGF is differentiation-dependent and is associated with endothelial survival // *Developmental biology*. 2003;264(1):275–88. doi:10.1016/j.ydbio.2003.08.015
  6. Staton CA, Reed MW, Brown NJ. A critical analysis of current in vitro and in vivo angiogenesis assays // *International journal of experimental pathology*. 2009;90(3):195–221. doi:10.1111/j.1365-2613.2008.00633.x
  7. Lacroix M, Abi-Said D, Fournier DR et al. A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival // *Journal of neurosurgery*. 2001;95(2):190–8. doi:10.3171/jns.2001.95.2.0190
  8. Gilbert MR, Dignam JJ, Armstrong TS et al. A randomized trial of bevacizumab for newly diagnosed glioblastoma // *New England Journal of Medicine*. 2014;370(8):699–708. doi:10.1056/NEJMoa1308573
  9. Giakoumettis D, Kritis A, Foroglou N. C6 cell line: the gold standard in glioma research // *Hippokratia*. 2018;22(3):105–112.
  10. Костеников Н.А., Дубровская В.Ф., Кованько Е.Г. и др. Динамика изменений структурных параметров периваскулярной инвазии глиомы C6 (экспериментальное исследование) // *Вопросы онкологии*. 2021;67(1):144–149 [Kostenikov NA, Dubrovskaya VF, Kovan'ko EG et al. Glioma C6 perivascular changes of invasion structural parameters variation (research study) // *Voprosy onkologii*. 2021;67(1):144–149 (In Russ.)].
  11. Петров С.В., Райхлин Н.Т., Ахметов Т.Р. и др. Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека. Казань: DESIGNstudio RED, 2012 [Petrov SV, Raikhlin NT, Akhmetov TR et al. Manual on immunohistochemical diagnostics of human tumors. Kazan: DESIGNstudio RED, 2012 (In Russ.)].
  12. Майбородин И.В., Красильников С.Э., Козьяков А.Е. и др. Целесообразность изучения опухолевого ангиогенеза, как прогностического фактора развития рака // *Новости хирургии*. 2015;23(3):339–347 [Maiborodin IV, Krasilnikov SE, Kozjakov AE et al. The Feasibility of Tumor-Related Angiogenesis Study as a Prognostic Factor for Cancer Development // *Novosti Khirurgii*. 2015;23(3):339–347 (In Russ.)].

Поступила в редакцию 15.11.2021 г.

*V.F. Dubrovskaya, M.P. Samoylovich, N.A. Kostenikov,  
E.G. Kovan'ko, O.A. Shashkova, L.A. Terekhina,  
M.S. Mukhina*

### **Changes in the parameters of intra-tumor and remotely located microvessels during the growth of glioblastoma implanted in the brain of rats**

Granov Russian Research Center of Radiology and Surgical Technologies Russian Federation Ministry of Health, St Petersburg

**The aim.** The aim of the work was to study the parameters of microvessels in the implanted GB during its growth, as well as in remotely located areas of the brain and in tissues that do not have a common blood circulation with the brain of tumor-bearing rats.

**Materials and methods.** The studies were carried out on histological preparations by morphometric method for 6 hours to 18 days after implantation of the tumor into the brain of rats.

**Results.** An increase in the proportion (%) of microvessels with a wide diameter was recorded both in the tumor itself and in remote areas of the tissue of both hemispheres of the brain. A similar trend of changes took place in the dynamics of microvascular areas on sections of the auricle of rats that do not have a common blood circulation with the brain.

**Conclusions.** The obtained data will make it possible to substantiate the expediency of further identification of remote tests to assess the size of the tumor during the development of new therapeutic measures.

**Key words:** glioblastoma, morphometry, diameter of microvessels