

Б. Экспериментальные исследования

© Коллектив авторов, 2022
УДК 612.086.3-006
DOI 10.37469/0507-3758-2022-68-4-507-512

Вопросы онкологии, 2022, Том 68, №4

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

Сравнительное изучение метастазирования глиобластомы (глиома С6), имплантированной в мозг или скелетную мышцу крыс

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

Цель работы — установление органотропии метастазов глиобластомы (глиомы С6), имплантированной интракраниально или внутримышечно, а также определение диаметра магистралей кровеносной микрососудистой сети в органах животных-опухоленосителей.

Материалы и методы. Объектом изучения служили: головной мозг, органы грудной и брюшной полостей. Исследования проведены на гистологических препаратах визуально и морфометрическим методом на протяжении от 3 до 14 суток после имплантации опухоли.

Результаты. Диагностированы метастазы в легких крыс при обоих способах имплантации глиобластомы. Зарегистрировано увеличение доли (%) микрососудов с широким диаметром во всех исследованных органах на протяжении всего эксперимента.

Выводы. Органотропия метастазов глиобластомы не зависит от места ее имплантации. Расширение микрососудистой сети в органах опухоленосителей рассматривается как явление, относящееся к процессу метастазирования. Обсуждается целесообразность обследования легких на наличие метастазов у пациентов с диагностированной мультиформной глиобластомой.

Ключевые слова: глиобластома, имплантация, микрососуды, метастазирование, органотропия

Введение

Метастазы являются причиной смерти большинства больных злокачественными новообразованиями [1]. Биологические основы метастазирования стали предметом интенсивных исследований относительно недавно. Попытки объяснения столь сложного явления привели к возникновению множества моделей и гипотез [2-4], которые, однако, не позволили создать

как единую концепцию формирования метастазов, так и четкую патогенетическую картину распространения клеток отдельных типов злокачественных новообразований. Дальнейшее изучение процессов, вовлеченных в метастазирование, поможет привести к эффективным целевым подходам в его профилактике.

Задача работы состояла в сравнительном изучении органотропии метастазов глиобластомы (ГБ), имплантированной в разные области организма животного, а также в исследовании в органах опухоленосителей ряда структурных параметров кровеносных микрососудов, как важнейших путей транспорта клеток при метастазировании.

Материал и методы

В исследование были включены 36 белых беспородных крыс обоего пола массой тела 220–240 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 № 199 н от 01.04.2016 г. «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики». Интракраниально в область полосатого тела или в мышцу бедра задней лапы имплантировали клетки ГБ. Способ имплантации ГБ в мозг, метод морфометрического исследования и выведение крыс из опыта описаны нами ранее [5]. В мышцу лапы имплантировали клетки ГБ в объеме 0,3 мл с концентрацией 6,0 млн в 1 мл суспензии. Через 3, 7 и 14 суток производили забор материала. Контролем во всех опытах служили органы животных, которым интракраниально или внутримышечно вводили в аналогичном объеме раствор Хенкса, служивший средой для клеток ГБ. Исследования показателей производили морфометрическим методом у 4 подопытных и 2 контрольных крыс на каждый из указанных сроков с использованием программы для анализа изображений «CellSens (Olympus, Япония)». При патологоанатомическом вскрытии и на срезах органов диагностировали наличие метастазов. Объектом исследования служили: головной мозг, легкое, сердце, печень, поджелудочная железа, почки. С учетом архитектоники микрососудов легкого на срезах определяли их площади в стенках альвеол и подсчитывали долю (%) их числа с площадью $\geq 20 \mu\text{м}^2$ от числа всех исследованных микрососудов. В остальных органах измеряли ширину микро-

магистралей и определяли их долю (%) с шириной свыше определенных величин: для головного мозга ≥ 1 мкм, для сердца $\geq 1,5$ мкм, для печени $\geq 2,8$ мкм, для поджелудочной железы $\geq 1,6$ мкм.

Все сравниваемые группы на каждый срок и показатель были представлены 300 измерениями в опыте и 150 в контроле.

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

Результаты исследования

Через 3 суток перевитые в головной мозг клетки ГБ были представлены образованием со средней площадью среза $0,015$ мм². Опухолевые клетки с периваскулярным расположением начинали внедряться в перитуморальные зоны, находясь на расстоянии $3,5$ – $4,0$ мкм от края опухоли [6]. При внутримышечной имплантации опухолевый узел не превышал размеров $0,2 \times 0,3 \times 0,3$ см. Между тем, при обоих вариантах опыта в исследованных органах регистрировалось увеличение доли (%) микрососудов с широким просветом. В легких контрольных животных средняя доля микрососудов с площадью среза размером $\geq 20,0$ мкм² при интракраниальном или внутримышечном введении раствора Хенкса составляла соответственно (%): $2,0 \pm 0,6$ и $2,3 \pm 0,5$. При имплантации в мозг или в мышцу клеток ГБ показатели для таких сосудов возрастали соответственно до $21 \pm 2,1$ ($p < 0,01$) и $23 \pm 2,5$ ($p < 0,01$). Ткань легких полнокровна, с наличием нейтрофилов в составе клеток крови и в окружении микрососудов (рис. 1). Полагают, что данные элементы играют значительную роль в успешной экстравазации опухолевых клеток, в подготовке ниш для адаптации и последующего внедрения в ткань легкого [7]. Увеличен был просвет микрососудов и в других органах опухоленосителей. В контроле доля широких сосудов была представлена следующими значениями (%): в сердце $4,3 \pm 1,2$ и $3,9 \pm 1,0$, в печени $4,5 \pm 1,3$ и $3,3 \pm 1,0$, в поджелудочной железе $2,8 \pm 0,7$ и $3,2 \pm 0,6$. После имплантации клеток ГБ в мозг или в мышцу показатели составляли соответственно (%): в сердце $27 \pm 2,8$ ($p < 0,01$) и $26 \pm 1,9$ ($p < 0,01$), в печени $31 \pm 2,8$ ($p < 0,01$) и $27 \pm 1,9$ ($p < 0,01$), в поджелудочной железе $30 \pm 2,9$ ($p < 0,01$) и $28 \pm 2,7$ ($p < 0,01$). В ткани головного мозга в обоих вариантах опыта наблюдалось статистически незначимое увеличение доли широких магистралей в микрососудистой сети.

Через 7 суток независимо от места имплантации появлялись метастазы ГБ в легких, представлявшие собой скопления опухолевых

клеток вокруг кровеносных сосудов с распространением в ткань межальвеолярных перегородок (рис. 2). При имплантации ГБ в скелетную мышцу опухолевые клетки регистрировались также и в небольших участках мягкой мозговой оболочки вокруг микрососудов без проникновения в ткань мозга. Увеличение размеров опухолей в мозге и в мышце сочеталось с ростом долей широких микрососудов в органах грудной и брюшной полостей, величина которых не имела статистически значимых отличий от показателей в предыдущий срок исследования. Лишь в ткани головного мозга доля сосудов с широким просветом увеличивалась и составляла в обоих вариантах опыта соответственно (%): $31 \pm 2,4$ ($p < 0,01$) и $23 \pm 2,1$ ($p < 0,01$), против значений в контроле $10 \pm 1,2$ и $12 \pm 1,9$.

На 14-е сутки наибольшая площадь срезов опухоли в головном мозге составляла в среднем $0,16$ мм². Размер узла в мышце лапы достигал $0,7 \times 1,2 \times 0,8$ см. Метастазы в легких регистрировались при обоих вариантах имплантации во всех долях, но наибольшая распространенность диагностировалась у животных с опухолью в мышце. Необходимо отметить, что даже при значительной колонизации метастазами ткани легкого, в печени они отсутствовали, хотя фенестрированный эндотелий микрососудов органа является благоприятным условием для экстравазации опухолевых клеток в ткань печени [8]. Отсутствовали метастазы и в других органах грудной и брюшной полостей, включая почки. Рост опухоли в мышце приводил к дальнейшему распространению опухолевых клеток вдоль микрососудов мягкой мозговой оболочки с внедрением в ткань головного мозга при их периваскулярном расположении (рис. 3). В этом варианте опыта метастазы развивались в органе, клетки глии которого являются основой развития данного вида злокачественного новообразования. Доля микрососудов с широким просветом в органах грудной и брюшной полостей возрастала по сравнению с соответствующими показателями на сроке 3 суток в среднем в $1,4$ – $1,6$ раз. В ткани мозга доля расширенных микрососудов была аналогична по величине с предыдущим сроком исследования.

Таким образом, начиная со времени формирования и роста ГБ, имплантированной в головной мозг или в мышцу, зарегистрировано расширение значительной доли магистралей микрососудистой сети во всех исследованных органах опухоленосителей на протяжении всего срока эксперимента. Независимо от места имплантации опухоль метастазировала в легкие, тогда как в других органах грудной и брюшной полостей метастазы не развивались даже при распространенной колонизации легочной ткани.

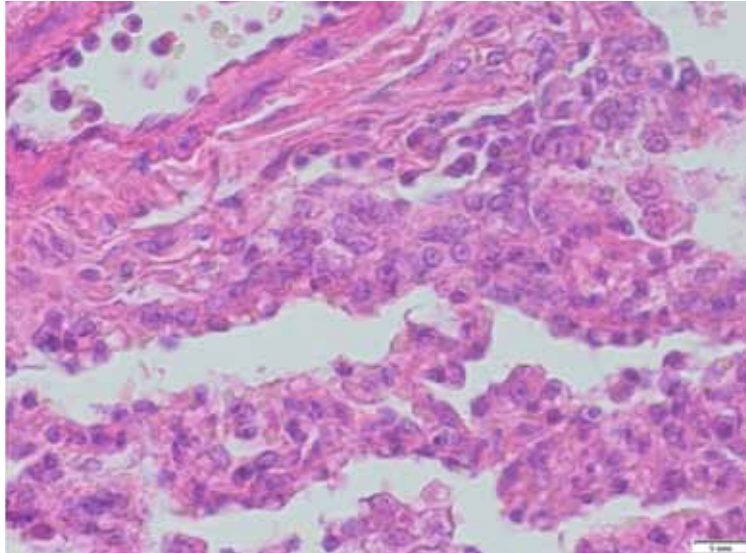


Рис. 1. Гиперемия легкого на 3 сутки после интракраниальной имплантации глиобластомы. Нейтрофилы среди клеток крови и в прилегающих к сосуду тканях. Гематоксилин–эозин. Ув. 320

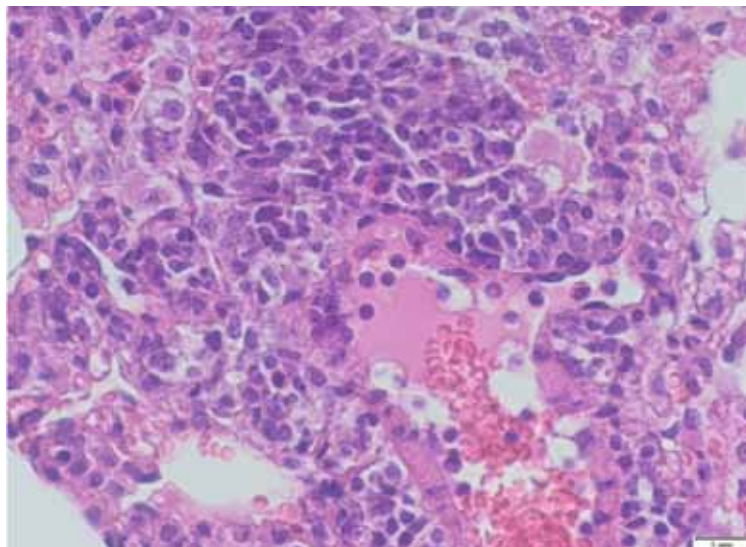


Рис. 2. Клетки опухоли вокруг сосуда легкого с распространением на стенки альвеол на 7 сутки после интракраниальной имплантации глиобластомы. Гематоксилин–эозин. Ув. 320

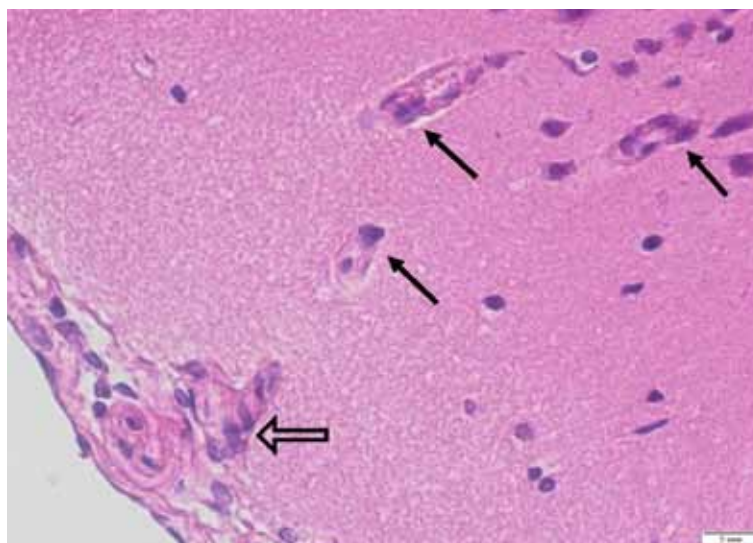


Рис. 3. Клетки опухоли вокруг микрососудов мягкой мозговой оболочки (двойная стрелка) с перивазальным их внедрением в ткань мозга (стрелки) на 14 сутки после внутримышечной имплантации глиобластомы. Гематоксилин–эозин. Ув. 320

Обсуждение

Уже через 3 суток после имплантации интракраниально или внутримышечно зарегистрировано увеличение просвета значительной доли микрососудистой сети во всех исследованных органах опухоленосителей с ростом данного показателя в течение периода наблюдения.

Известно, что основным путем распространения клеток большинства злокачественных опухолей служит кровеносное сосудистое русло. Однако кровоток - неблагоприятная среда для мигрирующих клеток (гидродинамические перегрузки, иммунные атаки, взаимодействие с элементами крови и т.д.). По сравнению с единичными клетками именно многоклеточные опухолевые кластеры наиболее приспособлены для преодоления таких препятствий, а также для процесса экстравазации, адаптации в преметастатических нишах с последующим распространением в паренхиме колонизируемых органов [9–10]. Наличие широких транспортных путей — одно из важных условий успешного продвижения отдельных клеток и их конгломератов к дистантным органам. В связи с этим, установленные изменения в структуре сосудистого русла расцениваются нами как одна из ранних и сохраняющихся в дальнейшем составляющих процесса метастазирования.

Определенный интерес представляет и характер метастазирования в головной мозг ГБ, имплантированной в мышцу. Первоначально опухолевые клетки находились вокруг сосудов мягкой мозговой оболочки с последующим внедрением в ткань мозга с периваскулярной их локализацией. Существуют наблюдения о метастазировании опухолей различного генеза (рака молочной железы, меланомы, и т.д.) в головной мозг с длительным расположением их клеток в контакте с сосудами мозга. Полагают, что именно около мозговых сосудов находятся ниши для первоначального самоподдержания мигрировавших клеток, их адаптации и последующего внедрения в ткань мозга [1, 10]. Однако в ранее проведенном нами исследовании показано, что уже через 6 часов после интракраниальной имплантации ГБ клетки самой опухоли располагались вдоль сосудов хозяина с дальнейшим продвижением их в перитуморальные, а затем и в более удаленные участки ткани мозга в тесном контакте с вновь образованными микрососудами [6]. По-видимому, данный эффект, а также периваскулярное расположение клеток различных по генезу злокачественных новообразований определяются структурно-функциональными особенностями микрососудов и ткани мозга, обеспечивающих деятельность гематоэнцефалического барьера. Выяснение причин особенности рас-

пространения мигрирующих опухолевых клеток в ткани головного мозга требует дальнейших исследований.

Следующим установленным фактом явилось метастазирование ГБ в легкое независимо от места ее имплантации. Данное наблюдение подтверждает предположение, что органотропность метастазирования определяется факторами, продуцируемыми самой опухолью (эпителиально-мезенхимальный переход, образование экзосом с генетическим и секреторным материалом и т.д.), которые в совокупности с элементами других тканевых систем обеспечивают успешное внедрение клеток той или иной опухоли в определенные органы [11].

В проведенном эксперименте выявлены метастазы в легкое глиомы С6, близкой по своим свойствам к ГБ человека [12]. Полученные данные в сочетании с единичными клиническими наблюдениями [13] позволяют рекомендовать исследования легких на наличие метастазов у пациентов с диагностированной мультиформной глиобластомой.

Заключение

Органотропия метастазов ГБ в органах грудной и брюшной полостей была идентична при ее интракраниальной или внутримышечной имплантации.

Зарегистрировано расширение просвета значительной доли микрососудистой сети в тканях головного мозга, в органах грудной и брюшной полостей у опухоленосителей на протяжении всего срока эксперимента (14 суток) независимо от места имплантации ГБ. Данный феномен рассматривается нами как составная часть метастатического процесса.

Наличие в легких метастазов глиомы С6, близкой по своим свойствам к опухоли мозга человека, наряду с единичными клиническими наблюдениями, позволяет рекомендовать диагностическое исследование ткани легких на наличие метастазов у пациентов с мультиформной глиобластомой.

Вклад авторов:

Дубровская В.Ф. — разработка концепции научной работы, получение научных данных, составление черновика рукописи, анализ и интерпретация данной работы, критический пересмотр статьи с внесением ценного интеллектуального содержания. Согласна принять на себя ответственность за все аспекты работы и гарантировать, что все вопросы, связанные с точностью и добросовестностью любой части работы, могут быть надлежащим образом исследованы и урегулированы. Долевое участие— 55%.

Костеников Н.А. — получение научных данных, анализ, обсуждение, и интерпретация работы, утверждение публикуемой версии рукописи. Согласен принять на себя ответственность за все аспекты работы и гарантировать, что все вопросы, связанные с точностью и добросовестностью любой части работы, могут быть надлежащим образом исследованы и урегулированы. Долевое участие — 15%.

Самойлович М.П. — получение научных данных, редактирование черновика рукописи, анализ и интерпретация данной работы, критический пересмотр статьи с внесением ценного интеллектуального содержания. Долевое участие — 15%.

Кованько Е.Г. — получение научных данных, критический пересмотр данных с внесением ценного интеллектуального содержания. Долевое участие — 5%.

Шашкова О.А. — получение научных данных, составление черновика рукописи, анализ и интерпретация результатов работы. Долевое участие — 5%.

Терехина Л.А. — получение научных данных, анализ и интерпретация результатов работы. Долевое участие — 5%.

Авторы заявляют об отсутствии в статье конфликта интересов.

Финансирование

Работа выполнена в рамках Государственного задания Министерства здравоохранения Российской Федерации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Харченко Е.П., Соловьев И.А. Метастазирование и раковая спячка //Онкология. Журнал им П.А. Герцена. 2016;5(5):72-77 [Kharchenko E.P., Soloviev I.A. Metastasis and cancer hibernation. Oncology. P.A. Herzen Journal. 2016; 5(5):72-77 (In Russ).]
2. Мнихович М.В. Межклеточные и клеточно-матриксные взаимодействия в опухолях: современное состояние проблемы //Российский медико-биологический вестник имени академика ИП Павлова. 2013;3:161-171 [Mnikhovich M.V. Intercellular and cell-matrix interactions in tumors: current state of the problem. The Russian Medico-biological Bulletin named after Academician I.P. Pavlov. 2013;3:161-171 (In Russ).]
3. Finley L. Metabolic signal curbs cancer-cell migration // Nature. 2019; 571: 39-40.
4. Cox T.R., Rumney R.M., Schoof E.M. et al. The hypoxic cancer secretome induces pre-metastatic bone lesions through lysyl oxidase //Nature. 2015;522(7554):106-110.
5. Костеников Н.А., Дубровская В.Ф., Кованько Е.Г. и др. Динамика изменений структурных параметров периваскулярной инвазии глиомы С6 (экспериментальное исследование) //Вопросы онкологии. 2021;67(1):144-149 [Kostenikov N.A., Dubrovskaya V.F., Kovan'ko E.G. et

al. Glioma C6 perivascular changes of invasion structural parameters variation (research study). Voprosy onkologii. 2021;67(1):144-149 (In Russ).]

6. Дубровская В.Ф., Самойлович М.П., Костеников Н.А. и др. Изменения параметров внутриопухолевых и дистанционно расположенных микрососудов в процессе роста глиобластомы, имплантированной в мозг крыс //Вопросы онкологии. 2022;68(1):113-117 [Dubrovskaya V.F., Samoylovich M.P., Kostenikov N.A. et al. Changes in the parameters of intra-tumor and remotely located microvessels during the growth of glioblastoma implanted in the brain of rats. Voprosy onkologii. 2022;68(1):113-117 (In Russ).]
7. Yates LR, Knappskog S., Wedge D. et al. Genomic evolution of breast cancer metastasis and relapse //Cancer cell. 2017;32(2):169-184.
8. Oskarsson T, Batlle E., Massagué J. Metastatic stem cells: sources, niches, and vital pathways //Cell stem cell. 2014;14(3):306-321.
9. Krakhmal N.V., Zavyalova M.V., Denisov E.V. et al. Cancer invasion: patterns and mechanisms //Acta Naturae. 2015;7(2 (25)):17-28.
10. Lambert A., Pattabiraman D., Weinberg R. Emerging biological principles of metastasis //Cell. Review. 2019;168(4):670-691.
11. Hoshino A., Costa-Silva B., Shen TL. et al. Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis //Nature. 2015;527(7578):329-335.
12. Giakoumettis D., Kritis A., Foroglou N. C6 cell line: the gold standard in glioma research //Hippokratia. 2018;22(3):105-112.
13. Жетписбаев Б.Б., Исакханова Б.А. Метастаз глиобластомы в легкое (случай из практики) //Журн. Медицина. 2015;5(155):29-31 [Zhetpisbaev B.B., Isakhanova B.A. Glioblastoma metastasis in the lung (a case from practice). Zhurn. Medicine. 2015;5(155):29-31 (In Russ).]

Поступила в редакцию 14.06.2022 г.

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

Comparative study of metastasis of glioblastoma (glioma C6) implanted in the brain or skeletal muscle of rats

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

The aim. The aim of the work was to establish the organotropy of metastases of glioblastoma (glioma C6) implanted intracranially or intramuscularly, as well as to determine the diameter of the blood vessels of the microvascular network in the organs of tumor-bearing animals (rats).

Materials and methods. The objects of the study were: the brain, organs of the thoracic and abdominal cavities in rats. The studies were carried out on histological preparations visually and morphometrically from the 3 up to 14 day after implantation of the tumor.

Results. With both methods of glioblastoma implantation, metastases in the lung were diagnosed. An increase in the pro-

portion (%) of microvessels with a wide diameter was recorded in all the organs studied and throughout the entire duration of the experiment.

Conclusions. The organotropy of glioblastoma metastases does not depend on the place of its implantation. The expansion of the microvascular network in the organs of tumor car-

riers is considered as a phenomenon related to the process of metastasis. The expediency of lung examination for the presence of metastases in patients with diagnosed glioblastoma multiforme is discussed.

Key words: glioblastoma, implantation, microvessels, metastasis, organotropy

Сведения об авторах

Дубровская Виолетта Фёдоровна, д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории гибридной технологии ФГБУ «РНЦРХТ им. ак. А.М. Гранова» Минздрава России, 197758, Россия, г. Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская д. 70, dubrovskaya_vf@mail.ru

Костеников Николай Анатольевич, д.м.н., главный научный сотрудник лаборатории радиофармацевтических технологий ФГБУ «РНЦРХТ им. ак. А.М. Гранова» Минздрава России, 197758, Россия, г. Санкт-Петербург, п. Песочный, ул. Ленинградская д. 70, nkostenikov@yandex.ru

Самойлович Марина Платоновна, д.м.н., главный научный сотрудник, руководитель лаборатории гибридной технологии ФГБУ «РНЦРХТ им. ак. А.М. Гранова» Минздрава России, 197758, Россия, г. Санкт-Петербург, п. Песочный, ул. Ленинградская д. 70, mpsamoylovich@gmail.com

Кованько Елена Георгиевна, к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории радиофармацевтических технологий ФГБУ «РНЦРХТ им. ак. А.М. Гранова» Минздрава России, 197758, Россия, г. Санкт-Петербург, п. Песочный, ул. Ленинградская д. 70, egkovanko@mail.ru

Шашкова Ольга Александровна, старший научный сотрудник лаборатории гибридной технологии ФГБУ «РНЦРХТ им. ак. А.М. Гранова» Минздрава России, 197758, Россия, г. Санкт-Петербург, п. Песочный, ул. Ленинградская д. 70, ujinolga@yandex.ru

Терехина Лидия Александровна, научный сотрудник лаборатории гибридной технологии ФГБУ «РНЦРХТ им. ак. А.М. Гранова» Минздрава России, 197758, Россия, г. Санкт-Петербург, п. Песочный, ул. Ленинградская д. 70, terehina.l@list.ru

Dubrovskaya Violetta Fyodorovna, Doct. Med. Sci., Leading researcher Hybridom technology Lab, Granov Russian Research Center of Radiology and Surgical Technologies, Russian Federation Ministry of Health, 197758, Russia, Saint-Petersburg, Pesochny Vill., Leningradskai Str. 70, dubrovskaya_vf@mail.ru

Kostenikov Nikolay Anatol'evitch, Doct. Med. Sci., Chief Researcher of Radiopharmaceutical technologies Lab, Granov Russian Research Center of Radiology and Surgical Technologies, Russian Federation Ministry of Health, 197758, Russia, Saint-Petersburg, Pesochny Vill., Leningradskai Str. 70, nkostenikov@yandex.ru

Samoylovich Marina Platonovna, Doct. Med. Sci., Chief Researcher, Chief of Hybridom technology Lab, Granov Russian Research Center of Radiology and Surgical Technologies, Russian Federation Ministry of Health, 197758, Russia, Saint-Petersburg, Pesochny Vill., Leningradskai Str. 70, mpsamoylovich@gmail.com

Kovan'ko Elena Georgievna, Cand. Biol. Sci., Senior Research of Radiopharmaceutical technologies Lab, Granov Russian Research Center of Radiology and Surgical Technologies, Russian Federation Ministry of Health, 197758, Russia, Saint-Petersburg, Pesochny Vill., Leningradskai Str. 70, egkovanko@mail.ru

Shashkova Olga Aleksandrovna, Senior Research Hybridom technology Lab, Granov Russian Research Center of Radiology and Surgical Technologies, Russian Federation Ministry of Health, 197758, Russia, Saint-Petersburg, Pesochny Vill., Leningradskai Str. 70, ujinolga@yandex.ru

Terekhina Lidia Aleksandrovna, Researcher of Hybridoma Technology Lab, Granov Russian Research Center of Radiology and Surgical Technologies, Russian Federation Ministry of Health, 197758, Russia, Saint-Petersburg, Pesochny Vill., Leningradskai Str. 70, terehina.l@list.ru