

*Н.А. Костеников, В.Ф. Дубровская, Е.Г. Кованько, О.Ю. Миролюбова, М.С. Мухина,
Ю.Р. Илющенко, А.А. Станжевский, Д.Н. Майстренко*

Динамика изменений структурных параметров периваскулярной инвазии глиомы С6 (экспериментальное исследование)

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий имени академика А.М. Гранова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «РНЦРХТ им. ак. А.М. Гранова» МЗ РФ), Санкт-Петербург

Проведено сравнительное изучение структурных характеристик микрососудов с периваскулярным расположением опухолевых клеток и микрососудов обычного строения в перитуморальных зонах интракраниально имплантированной глиобластомы («глиома С6»). Работа была выполнена на крысах. Морфометрическим методом определяли площади, внутренний диаметр и длину микрососудов на протяжении 21 суток после введения опухолевых клеток в головной мозг крысам. Зарегистрировано сохранение изменений в структуре микрососудов с клетками глиобластомы на протяжении всего срока наблюдения. Рассматривается активная роль периваскулярно расположенных опухолевых клеток в преобразовании структуры и свойств микрососудов, участвующих в процессе инвазии глиобластомы в ткань головного мозга.

Ключевые слова: глиобластома, микрососуды, морфометрия, перитуморальные зоны

Введение

Поиск новых методов и подходов к лечению глиобластомы (ГБ) головного мозга остаётся актуальной проблемой современной нейроонкологии. В комплексе противоопухолевого лечения антиангиогенная терапия обладает рядом значительных преимуществ перед традиционной цитотоксической [1]. Данное направление наиболее целесообразно для профилактики вторичного опухолевого роста, представляющего собой либо рецидив первичного очага, либо отдалённое распространение новообразования [2]. Однако изучение и использование целого ряда факторов ангиогенеза и применение как прямых, так и непрямых ингибиторов данного процесса [3, 4, 5, 6] до настоящего времени не привело к существенному замедлению роста опухоли и ее вторичных очагов [7, 8, 9]. Отсутствие клинически значимых результатов обуславливает необходимость дальнейшего выяснения роли взаимоотношений клеток опухоли и микрососудов в

увеличении объёма, инвазии и метастазировании ГБ в головном мозге.

Целью данной экспериментальной работы явилось сравнительное изучение структурных характеристик микрососудов с периваскулярным расположением опухолевых клеток (МК) и микрососудов обычного строения (МО) в перитуморальных зонах в динамике роста и инвазии глиобластомы («глиома С6»).

Материал и методы

В исследование было включено 27 белых беспородных крыс-самцов массой 200-220 г. Исследования 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 «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики». Перед имплантацией опухоли животных наркотизировали внутримышечным введением препаратов «Золетил-100» в дозе 40-50 мг/кг массы и «Рометар» (0,02-0,04 мл), после чего животных фиксировали в стереотаксическом адаптере. Шприцем Гамильтона в глубокую структуру ГМ (скорлупа) справа имплантировали 5,0 мкл культуры клеток глиомы С6 (глиобластомы) [10] с концентрацией клеток 50×10^6 на мл. Сразу после операции и далее в течение 3 дней крысам 1 раз в день производили внутримышечную инъекцию дексаметазона в дозе 0,2-0,4 мл.

На 3, 7, 14, 18 и 21 сутки животных выводили из опыта внутримышечным введением двойной дозы «Золетила-100» с добавлением 0,2-0,5 мл 10% раствора лидокаина. Материал фиксировали в 15% формалине и заливали в парафин. Срезы толщиной 6 мкм окрашивали гематоксилином и эозином, а также по Нисслю и исследовали в микроскопе «Olympus BX-50» (Япония).

Проведено сравнительное изучение двух видов капилляров в перитуморальных зонах: микрососудов с периваскулярным расположением опухолевых клеток и микрососудов обычного строения. Измерения всех показателей проводили морфометрическим методом у 4-5 животных на каждый срок постимплантационного периода с помощью программы для анализа изображений «CellSens» («Olympus»). Измеряли площади всех МК и МО, расположенных в перитуморальной зоне, на площади ткани мозга размером от 2,5 до 2,7 мм² на каждый срок наблюдения. Измеряли длину и внутренний диаметр всех МК и МО в перитуморальной зоне по периметру опухоли на расстоянии 500 мкм от её края. Каждая из сравниваемых групп была представлена от 90 до 130 значениями на каждый из указанных сроков наблюдения. Характер и направленность изменений анализируемых показателей у всех животных была идентичной.

Исследование препаратов с использованием иммуногистохимического метода проводили на парафиновых срезах толщиной 3 мкм с моноклональными кроличьими антителами Ki-67 (клон SP6) с рабочим разведением 1:200. Система визуализации EtVision™ 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. В силу небольшого объема исследованной выборки значимость различий между независимыми выборками оценивали с помощью непараметрического u-критерия Манна-Уитни. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Результаты

Изучена динамика изменений средних величин площадей ткани мозга, приходящихся на МК и МО на протяжении 21 суток после имплантации клеток ГБ. Через 3 суток среди слаборазвитой капиллярной сети по периметру опухоли наблюдались лишь единичные микрососуды с клетками ГБ. К 7 суткам (рис. 1) при незначительном увеличении размеров ГБ площадь ткани, приходящаяся на МК, была достоверно меньшей по сравнению с аналогичным показателем для МО.

По мере роста объёма ГБ возрастала и средняя площадь микрососудов с периваскулярно расположенными клетками опухоли, которая становилась максимальной к 18 суткам после

имплантации опухолевых клеток с последующим снижением ее размеров к 21 суткам.

Для выяснения структурных характеристик микрососудов перитуморальной зоны было проведено сравнительное морфометрическое исследование показателей длины и диаметра капилляров в группах МК и МО на протяжении 21 суток постимплантационного периода.

Через 3 суток опухолевый узел был представлен мелкими анапластическими элементами с ядерным полиморфизмом. По периметру ГБ регистрировались единичные свободно расположенные опухолевые клетки, которые оказались вне опухолевого конгломерата в результате пассивного отделения в момент имплантации культуры клеток ГБ. Часть из них, по-видимому, обладала высокой миграционной активностью и направленным движением к микрососудам [10;12;13]. Морфологическая картина опухоли и капиллярной системы перитуморальных зон свидетельствовали о включении механизмов ангиогенеза уже с первых суток после имплантации клеток ГБ. Несмотря на небольшой размер опухоли, единичные микрососуды с широкими просветами уже регистрировались как внутри самой опухоли, так и в прилегающих тканях мозга (рис. 2 а, б). Отдельные микрососуды разветвлялись, достигая длины 100-120 мкм с диапазоном диаметра от 6 до 15 мкм.

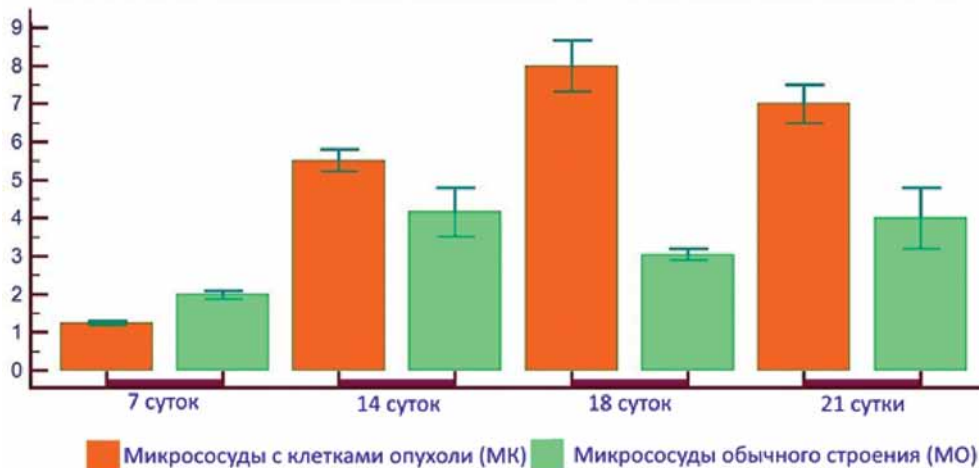


Рис. 1. Динамика изменений средних значений площадей микрососудов с клетками опухоли (МК), и микрососудов обычного строения (МО) в перитуморальной зоне мозга. По оси абсцисс: время после имплантации (сутки). По оси ординат: средние значения площадей микрососудов каждого вида в 1 мм² ткани мозга (M±m)

Таблица 1. Динамика изменений структурных параметров микрососудов с клетками опухоли (МК) и микрососудов обычного строения (МО)

Время после имплантации (сутки)	Длина сосудов (мкм) M±m		Диаметр сосудов (мкм) M±m	
	МК	МО	МК	МО
7	75±5,1	44±2,3	4,8±0,13	4,7±0,11
14	76±5,0	49±3,8	4,3±0,12	3,2±0,10
18	60±4,0	42±3,1	4,3±0,14	3,2±0,08
21	47±2,5	32±2,1	3,7±0,12	2,9±0,09

Примечание: при сравнении значений структурных параметров МК и МО во всех случаях различия оказались достоверными ($p < 0,01$), за исключением диаметра сосудов на 7 сутки ($p > 0,05$)

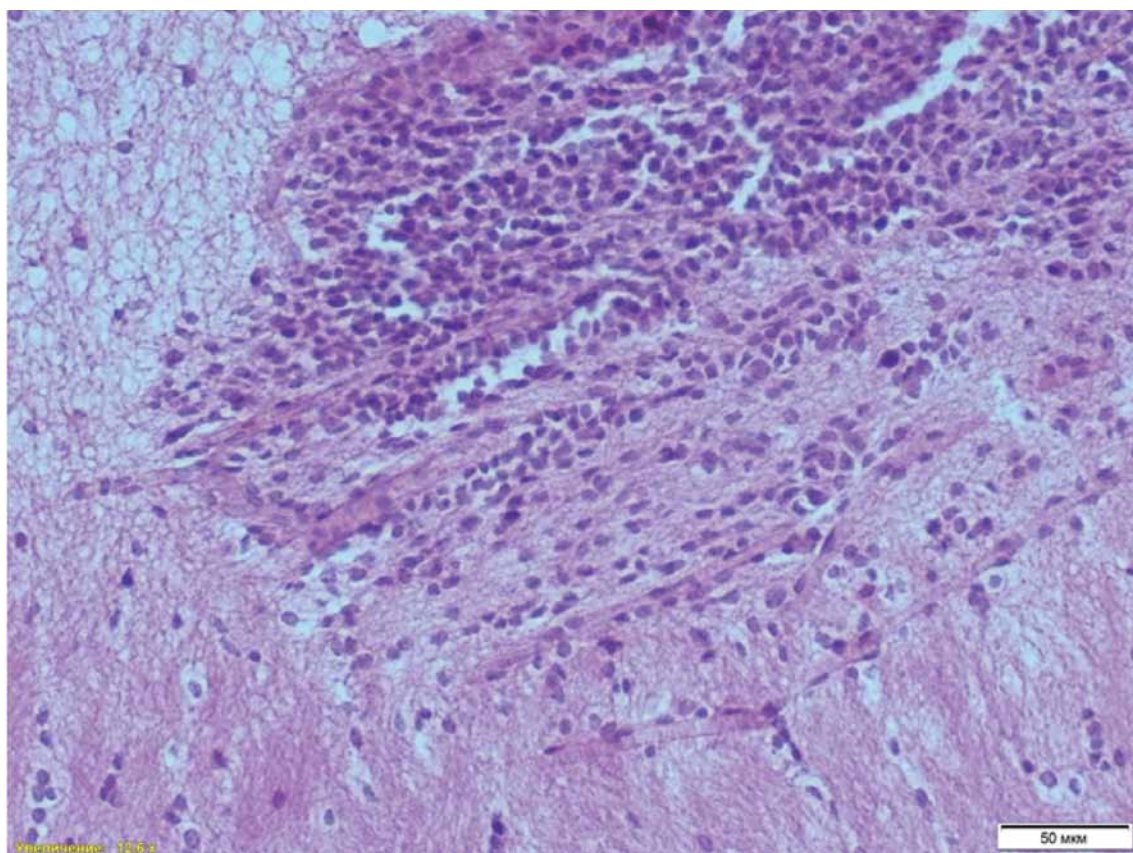


Рис. 2. Микрососуды с клетками глиобластомы (ГБ) через 3 суток после имплантации опухоли: (а) в ткани опухоли, (б) в перитуморальной зоне. Гематоксилин-эозин. $\times 220$

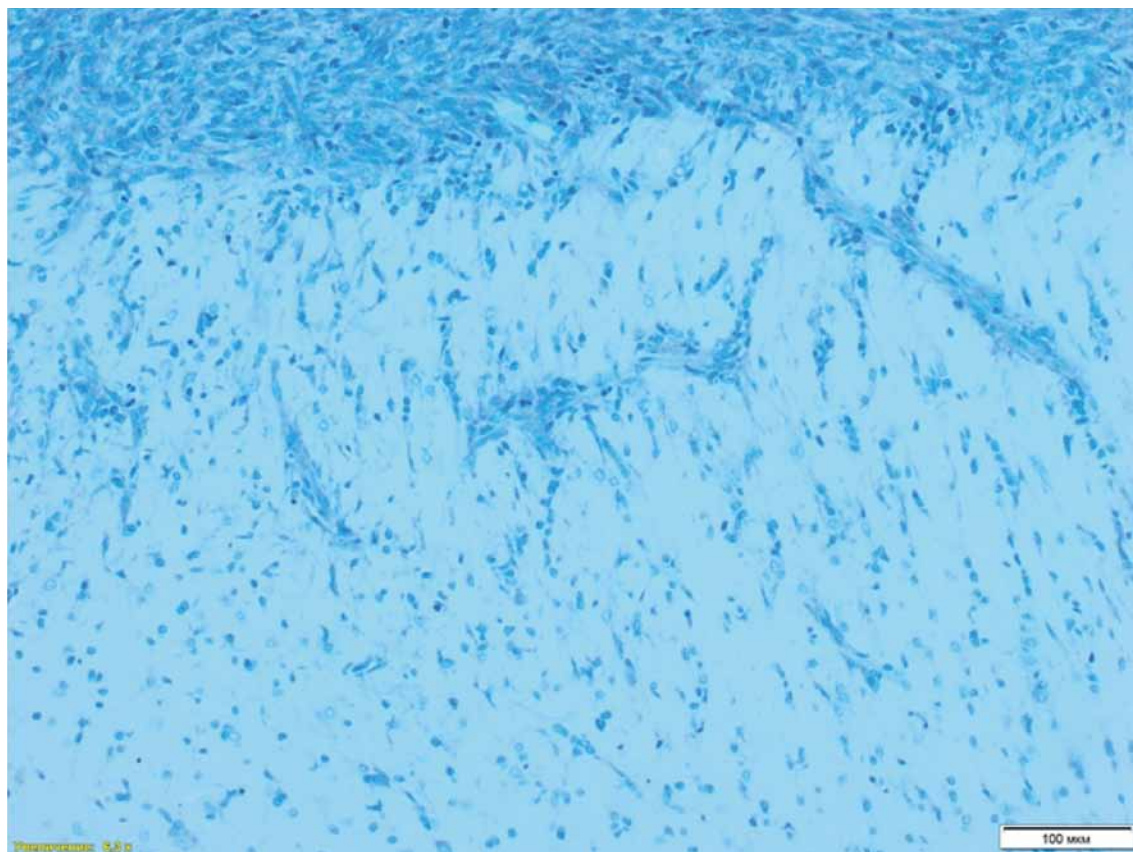


Рис. 3. Микрососуды с периваскулярным распространением клеток глиобластомы (ГБ) в перитуморальной зоне через 14 суток после имплантации. Окраска по Нислю. $\times 110$

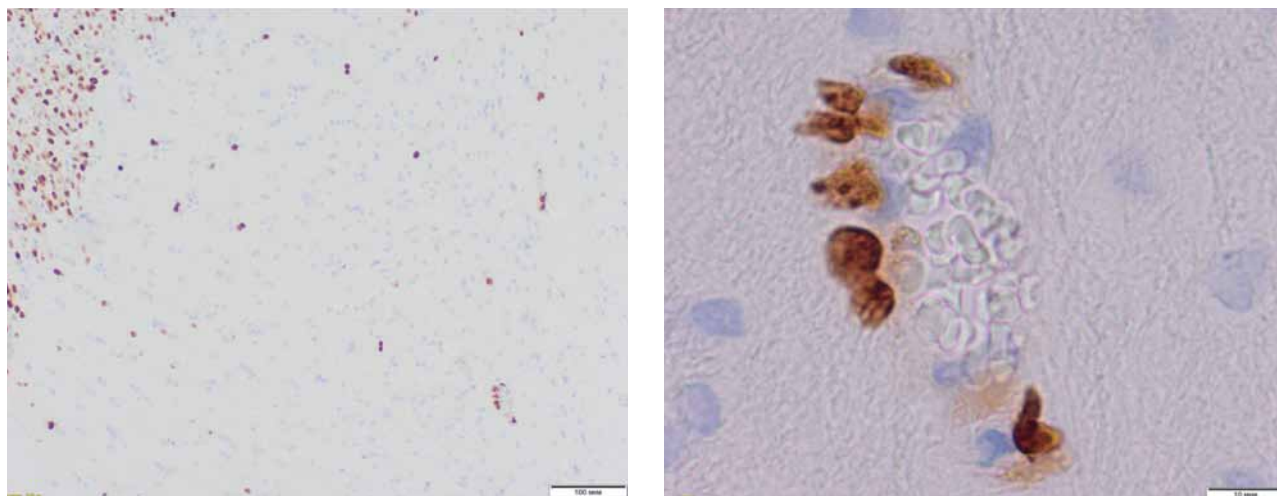


Рис. 4 (а, б). Отдельные опухолевые клетки в ткани мозга через 18 суток после имплантации глиобластомы (ГБ): (а) микрососуд с клетками опухоли, находящийся за пределами перитуморальной зоны. $\times 110$; (б) тот же микрососуд. $\times 1100$. Окраска антителами к Ki-67

К 7 суткам отмечалась тенденция к незначительному увеличению размеров опухолевого узла, тогда как микрососудистая сеть перитуморальных областей претерпевала существенные изменения. Сравнительное изучение структурных характеристик МК и МО позволило выявить ряд особенностей в динамике их преобразований по мере увеличения размера глиобластомы. Около 30% как предсуществующих микрососудов хозяина, так и вновь образованных микрососудов вследствие активации ангиогенеза были представлены МК. Длина таких микрососудов возрастала и превосходила аналогичные значения для МО (табл. 1).

Вместе с тем, капилляры всей микрососудистой сети перитуморальных областей на данный срок были расширены вследствие сохраняющегося реактивного ответа тканей на манипуляцию имплантации ГБ, сопровождавшуюся отёком, клеточной инфильтрацией (лимфоциты, макрофаги), диапедезом эритроцитов как в опухолевом узле, так и в окружающих тканях головного мозга.

К 14 суткам наряду с увеличением размеров глиобластомы интенсифицировались и инвазивные процессы в перитуморальных зонах (рис. 3).

Значительная доля капиллярной сети по периметру ГБ была представлена МК, средние показатели длины и диаметра микрокапилляров которых достоверно превосходили показатели для МО.

К 18 суткам размер опухоли еще более возрастал с сохранением эффектов удлинения и расширения просветов МК, в то время как диаметр МО не отличался от значений интактного контроля ($3,2 \pm 0,08$ и $2,8 \pm 0,07$ мкм соответственно, при $p > 0,05$). По сравнению с предыдущими сроками в ткани мозга увеличивалось число

свободно расположенных опухолевых клеток, их мелких комплексов, а также МК, которые располагались за пределами перитуморальной зоны (рис. 4 а, б).

Нередко извитые с широкими просветами МК регистрировались на большом удалении от границ опухолевого узла.

К 21 суткам в центральных областях опухоли, занимавшей около трети объема правой половины мозга, находились различные по размеру очаги некроза с кровоизлияниями и расширением микрососудов по краям ГБ. Значения исследуемых параметров для МК и МО в этот период несколько снижались, продолжая, однако, достоверно отличаться между собой с сохранением превосходящих величин для МК по сравнению с МО. В ткани мозга находились многочисленные клетки ГБ в виде небольших скоплений, либо расположенные периваскулярно в капиллярной сети.

Обсуждение

В проведенном исследовании в перитуморальных зонах ГБ выявлен ряд особенностей структуры микрососудов с периваскулярным расположением опухолевых клеток. В начальном периоде развития опухоли диаметр микрососудов всей капиллярной сети был увеличен по сравнению с показателями интактных животных, главным образом, вследствие реактивных процессов в ответ на интракраниальное введение клеток ГБ. Однако в дальнейшем вплоть до 21 суток наблюдения только МК сохраняли широкий просвет в сочетании с увеличением их длины. Динамика изменений совокупности данных параметров соответствовала росту показателей площадей МК на протяжении постимплантационного периода. Опухоли,

имплантированные в хорошо васкуляризированные ткани, первоначально растут, задействуя существующие сосуды хозяина и экспрессируют ангиогенные факторы на самых ранних стадиях своего развития [13]. Результаты исследования микропрепаратов и иллюстрация полученных данных через 3 суток после интратранскариального введения клеток ГБ свидетельствовали о наличии микрососудов с широким просветом как в ткани формирующейся опухоли, так и в перитуморальных областях ГМ. При этом на всем протяжении сосудов в их периваскулярных зонах располагались опухолевые клетки. Согласно данным ряда авторов [14], в экспериментальной ГБ («Глиома Сб») от 60% до 96% клеток являются стволовыми клетками. Будучи неоднородной по своим характеристикам, определенная часть данной популяции представлена опухолевыми стволовыми клетками. Возможно, именно эти клетки в составе клеток ГБ, мигрируя вдоль микрососудов, активно участвуют в перестройке микрососудистой сети с образованием «почек», удлинении, разветвлении и изменении ряда структурно-функциональных показателей сосудов с последующим их использованием в процессе инвазии опухоли в ткань мозга.

Заключение

Зарегистрированный рост площадей МК на протяжении постимплантационного периода сочетался с их стабильно увеличенной длиной и шириной просвета по сравнению со значениями для МО. Анализ представленных данных и наблюдения о постепенно увеличивающейся доле МК в капиллярной сети свидетельствуют о возрастании их численности и усилении интенсивности инвазии по мере роста глиобластомы. Микрососуды с опухолевыми клетками, имевшие аналогичные характеристики длины и диаметра, располагались и на значительном расстоянии от границ опухолевого узла. По-видимому, как предсуществующие микрососуды хозяина, так и вновь образованные вследствие индукции ангиогенеза магистралей, служат не только «трассами» для внедрения клеток глиобластомы в окружающие ткани [12, 13], но и сами являются объектом различных преобразований со стороны контактирующих клеток опухоли с последующим использованием таких микрососудов в инвазии и метастазировании глиобластомы в ткань мозга.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА

- Lombardi G., Pambuku A., Bellu L. et al. Effectiveness of antiangiogenic drugs in glioblastoma patients: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *Critical reviews in oncology/hematology*. 2017;111:94-102. doi: 10.1016/j.critrevonc.2017.01.018.
- Бывальцев В.А., Степанов И.А., Белых Е.Г. и др. Молекулярные аспекты ангиогенеза в глиобластомах головного мозга. *Вопросы онкологии*. 2017;63(1):19-27 [Byvaltsev V.A., Stepanov I.A., Belykh E.G. et al. Molecular aspects of angiogenesis in brain glioblastomas. *Vopr. Onkol.* 2017;63(1):19-27 (In Russ.)].
- Чертюк В.М., Захарчук Н.В., Чертюк 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 V.M., Zakharchuk N.V., Chertok A.G. The cellular and molecular mechanisms of angiogenesis regulation in the brain S.S. Korsakov Journal of Neurology and Psychiatry. *Zhurnal nevrologii i psikhiiatrii imeni S.S. Korsakova*. 2017;117(8): 43-55. doi: 10.17116/jnevro20171178243-55 (In Russ.)].
- Darland D.C., Massingham L.J., Smith S.R. 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.
- Staton C.A., Reed M.W., Brown N.J. 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.
- Майбородин И.В., Красильников С.Э., Козяков А.Е. и др. Целесообразность изучения опухолевого ангиогенеза, как прогностического фактора развития рака. *Новости хирургии*. 2015; 23 (3):339-347 [Maiborodin I.V., Krasilnikov S.E., Kozjakov A.E. 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.)].
- Бывальцев В.А., Степанов И.А., Шамеева М.А. и др. Эффективность применения ингибиторов фактора роста эндотелия сосудов в лечении глиобластомы: систематический обзор и метаанализ. *Вопросы онкологии*. 2019; 65(4):546-555 [Byvaltsev V.A., Stepanov I.A., Shameeva M.A. et al. Effectiveness of vascular endothelial growth factor inhibitors in the treatment of glioblastoma: a systematic review and meta-analysis. *Vopr. Onkol.* 2019; 65(4):546-555.
- Lacroix M., Abi-Said D., Fournay D.R. 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.
- Gilbert M.R., Dignam J.J., Armstrong T.S. 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.
- Grobben B., De Deyn P., Slegers H. Rat C6 glioma as experimental model system for the study of glioblastoma growth and invasion. *Cell and tissue research*. 2002;310(3):257-70. doi: 10.1007/s00441-002-0651-7.
- Петров С.В., Райхлин Н.Т., Ахметов Т.Р. и др. Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека. Казань: DESIGNstudio» RED», 2012:624

- [Petrov S.V., Raikhlin N.T., Akhmetov T.R. et al. Manual on immunohistochemical diagnostics of human tumors. Kazan: DESIGNstudio» RED», 2012:624 (In Russ.)].
12. Vajkoczy P., Farhadi M., Gaumann A. et al. Microtumor growth initiates angiogenic sprouting with simultaneous expression of VEGF, VEGF receptor-2, and angiopoietin-2. *The Journal of clinical investigation*. 2002;109(6):777-85. doi: 10.1172/JCI14105.
 13. Vajkoczy P., Schilling L., Ullrich A. et al. Characterization of Angiogenesis and Microcirculation of High-Grade Glioma: An Intravital Multifluorescence Microscopic Approach in the Athymic Nude Mouse. *The Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 1998;18(5):510-20. doi: 10.1097/00004647-199805000-00006.
 14. Брюховецкий И.С., Брюховецкий А.С., Кумейко В.В. и др. Стволовые клетки в канцерогенезе мультиформной глиобластомы. *Гены и клетки*. 2013; 8(2):13-19 [Bryukhovetskiy I.S., Bryukhovetskiy A.S., Kumeiko V.V. et al. Stem cells in carcinogenesis of glioblastoma multiforme. *Genes and Cells*. 2013; 8(2):13-19 (In Russ.)].

Поступила в редакцию 09.06.2020 г.

*N.A. Kostenikov, V.F. Dubrovskaya, E.G. Kovan'ko,
O.Yu. Mirolyubova, M.S. Mukhina, Yu.R. Ilyushchenko,
A.A. Stanzhevsky, D.N. Maistrenko*

Glioma C6 perivascular changes of invasion structural parameters variation (research study)

«Granov Russian Research Center of Radiology and Surgical Technologies» («Granov RRCRST», Russian Federation Ministry of Health), St. Petersburg

A comparative study of the structural characteristics of microvessels with a perivascular arrangement of tumor cells and microvessels with normal structure located in the peritumoral zones of an intracranially implanted glioblastoma («glioma C6») was conducted. The study was performed on rats. Morphometric method was used to determine the area, internal diameter and length of microvessels for 21 days after the introduction of tumor cells into the brain of rats. Changes in the structure of microvessels with glioblastoma cells were registered throughout the entire observation period. The active role of perivascularly located tumor cells in the transformation of the structure and properties of microvessels involved in the process of glioblastoma invasion into brain tissue is considered.

Key words: glioblastoma, microvessels, morphometry, peritumoral zones