

А.О. Чеботарь, И.А. Семёник

ДИНАМИКА МИКРОГЛИАЛЬНОЙ РЕАКЦИИ ПРИ ПРОГРЕССИРОВАНИИ ГЛИАЛЬНЫХ ОПУХОЛЕЙ (ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

Научный руководитель: канд. мед наук С.Н. Рябцева

*Лаборатория «Центр электронной и световой микроскопии»,
Институт физиологии НАН Беларуси, г. Минск, Беларусь*

A.O. Chabatar, I.A. Siamionik

DYNAMICS OF MICROGLIAL REACTION OF GLIAL TUMORS PROGRESSION (EXPERIMENTAL STUDY)

Tutor: PhD S.N. Rjabceva

*Laboratory "Center for Electron and Light Microscopy",
Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk*

Резюме. Изучены реактивные изменения клеток микроглии в перитуморозной зоне правого (с формированием глиальной опухоли) и левого (контралатерального) полушария головного мозга крыс в разные сроки после имплантации опухолевых клеток.

Ключевые слова: глиома, перитуморозное микроокружение, микроглия.

Resume. Reactive changes in microglial cells in the peritumorous zone of the right (with the formation of a glial tumor) and left (contralateral) hemispheres of the rat brain at different times after tumor cell implantation were studied.

Keywords: glioma, peritumorous microenvironment, microglia.

Актуальность. Доля первичных опухолей головного мозга среди всех новообразований у человека составляет 6%. При этом глиобластома является наиболее распространенной, злокачественной и высокоинвазивной глиальной опухолью головного мозга с неблагоприятным исходом. Несмотря на агрессивную хирургическую резекцию и адъювантное лечение, средняя выживаемость пациентов с глиобластомами составляет около 14,6 месяцев [4]. В настоящее время стало ясно, что клетки опухоли и клетки микроокружения находятся в тесном контакте и активно взаимодействуют. Более того, опухоль активно привлекает иммунокомпетентные клетки путем секреции различных хемокинов, цитокинов и матриксных протеинов, где при взаимодействии с компонентами их внеклеточного матрикса происходит перепрограммирование клеток и манипулирование иммунным ответом хозяина в пользу роста рака и метастазирования [1,2].

Таким образом, проведение новых работ, которые позволят исследовать двустороннюю связь между глиомой и иммунными клетками, является актуальным направлением в изучении данной проблемы. Важно полностью понять влияние воспаления на канцерогенез, изучить клеточную взаимосвязь не только в злокачественных глиомах, но и на стадии инициации опухоли.

Цель: оценить динамику реактивных изменений клеток микроглии в перитуморозной зоне в экспериментальной модели глиомы.

Задачи:

1. Оценить клеточную плотность микроглии в перитуморозной зоне головного мозга подопытных животных по данным экспрессии маркера Iba-1 в разные сроки эксперимента.

2. Оценить морфологические профили микроглии в перитуморозной зоне головного мозга подопытных животных по данным экспрессии маркера Iba-1 в разные сроки эксперимента.

Материалы и методы. Эксперимент проводился на крысах линии Wistar массой 230-270 г обоего пола. Манипуляции с животными в ходе экспериментов осуществляли с соблюдением правовых и этических норм обращения с животными в соответствии с национальными и международными стандартами качества планирования и проведения исследований на животных (Межгосударственный стандарт ГОСТ 33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики»; European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimentation and other Scientific Purposes, N 123 of 18 March 1986, Strasbourg, France).

В ходе оперативного вмешательства, с помощью стереотаксического аппарата, по координатам атласа мозга крысы, животным проводилась имплантация опухолевых клеток. Точка мишени на черепе устанавливалась в правом полушарии на 2 мм выше и правее от брегмы (точки пересечения сагитального и венечного шва на черепе подопытного животного). Далее с помощью фрезы диаметром 2 мм в данной точке выполнялось фрезевое отверстие. Клеточная суспензия линии глиома С6 в рабочем разведении $1,0 \cdot 10^6$ клеток/мл в объеме 10 мкл с помощью дозатора вводилась в головной мозг подопытных животных.

Были сформированы 7 групп исследования в соответствии со сроком выведения животных из эксперимента ($n=5$ в каждой экспериментальной группе). Животные выводились из эксперимента на 10, 14, 21, 28, 35, 56 и 64 сутки с последующей оценкой микроокружения опухоли.

Для оценки клеточной плотности и морфологического профиля клеток микроглии в ткани опухоли и перитуморозной зоне головного мозга подопытных животных проводилось иммуногистохимическое исследование с маркером микроглиальных клеток (Iba-1, AIF1, NFab04096 FineTest, в рабочем разведении 1:800). После иммуногистохимического исследования срезы сканировали на гистологическом сканере AperioT2 фирмы Leica при увеличении $\times 20,0$.

Для подсчета клеток микроглии в приложении SlideViver, с помощью функции «TakeSnapshot», делали микрофотографии на увеличении $\times 40,0$. Подсчет клеток проводился с использованием программы Image J (США) и ее приложения «Multi-point». В подсчет не включали клетки, тела и/или отростки которых частично или полностью находились за рамками поля зрения, а также Iba-1-позитивные клетки, находящиеся в сосудах или в тесном контакте с ними. Площадь анализируемого поля составила $14361,527 \text{ мкм}^2$. Клетки микроглии были разделены на три типа: неактивный, промежуточный и активированный или амебоидный морфологический тип. Эти принципы классификации и категории были приняты на основе данных литературы с подробным описанием морфотипов клеток [3]. Процент каждого морфологического типа Iba-1-позитивных клеток рассчитывался от общего количества Iba-1-положительных клеток в поле зрения.

Статистический анализ полученных результатов проводился с использованием программы Statistica 10.0 (StatSoft, США). С целью проверки статистической нулевой гипотезы об однородности групп исследования использовались непараметрические методы: при сравнении двух групп с помощью непараметрического U-критерия теста

Манна–Уитни, более двух групп – Н-критерий теста Краскала–Уоллиса ($p < 0,05$). Данные описательной статистики указаны в виде медианы (Me) и квартилей (Q25%; Q75%).

Результаты и их обсуждение. Во всех исследованных образцах головного мозга подопытных животных наблюдалась положительная реакция с первичными антителами к микроглиальным клеткам. Выявленные Iba-1-позитивные клетки в обоих полушариях различались по морфологическим профилям. Клетки с округлым телом и длинными активно ветвящимися отростками были отнесены к неактивной (покоящейся) микроглии. Промежуточный тип характеризовался более крупными размерами с укороченными немногочисленными толстыми отростками. Активированный тип (амебоидный) представлял собой крупную клетку без явно выраженных отростков или очень коротких толстых отростков в виде бахромы.

На 10 сутки от начала эксперимента в первой группе исследования опухоль локализовалась в моторной зоне коры правого полушария, СА1 и СА2 зоне гиппокампа, а также в мозолистом теле с инвазией в левое полушарие. При гистологическом исследовании перитуморозной зоны обращала на себя внимание выраженная концентрация Iba-1-позитивных клеток в перитуморозной зоне, что говорит о преобладании микроглии среди клеточных популяций. При морфометрическом исследовании медиана клеточной плотности микроглии составила 811,19 (609,27; 1047,94) клеток/мм², при этом основной морфологической формой была активированная – 66,56%, промежуточная составила – 23,82% и покоящаяся – 9,62%.

Спустя две недели у животных второй группы исследования новообразованная ткань визуализировалась также в боковом желудочке правого полушария. Клеточная плотность микроглии в перитуморозной зоне составила 807,71 (640,60; 891,27) клеток/мм². Выявлено также преобладание активированного типа клеток, они составили порядка 47,3%, промежуточный тип выявлялся до 43,5%, наименьшее значение по процентному соотношению было у покоящейся микроглии – 9,2%.

На 21 сутки эксперимента в головном мозге грызунов третьей группы исследования комплексы опухолевых клеток все больше мигрируют в окружающую паренхиму головного мозга. Микроглиальные клетки же, следуя направлению инвазии, концентрировались в перитуморозной зоне. Клеточная плотность микроглиального компонента значительно снизилась и составила 529,19 (466,52; 800,75) клеток/мм². Преобладающей формой все также являлась активированная микроглия (54,39%), покоящийся тип выявлялся до 41,22% и наименьшую долю составляли неактивные формы клеток (4,39%).

В четвертой группе у животных, выведенных из эксперимента на 28 сутки, опухоль достигала больших размеров и прорастала в левое полушарие. Iba-1-позитивные клетки вместе с опухолевыми клетками окружали новообразованные кровеносные сосуды и зоны некроза. Более высокая плотность глиальных клеток была отмечена вблизи роста опухолевых клеток, их клеточная плотность была равна 285,49 (104,45; 396,89) клеток/мм². Среди морфологических форм стала преобладать промежуточная микроглия – 69,05%, содержание активных форм снизилось до 18,98%, покоящаяся микроглия составила 11,96%.

К 35 суткам от начала эксперимента клеточная плотность микроглии в опухолевом микроокружении пятой группы исследования составила 348,15 (313,34; 355,12) клеток/мм². Морфологическая картина распределения профилей микроглии практически не имела отличий от таковой, которая наблюдалась на 28 сутки.

Спустя два месяца с момента имплантации опухолевых клеток микроглиальная плотность в перифокальной зоне снизилась до 222,82 (208,89; 229,78) клеток/мм². Преобладающей морфологической формой была промежуточная микроглия (82,69%), активная и покоящаяся составляли 10,26% и 7,05%, соответственно.

Динамика анализируемых морфометрических показателей Iba1-позитивных клеток на различные сроки развития опухоли в группах исследования представлена в таблице 1.

Табл. 1. Морфометрическая характеристика микроглии перитуморозной зоны головного мозга подопытных животных групп исследования

Морфометрический критерий, Me (25%-75%)	Сутки						
	10	14	21	28	35	56	64
Клеточная плотность микроглии, клеток /мм ²	811,19 (609,27; 1047,94)	807,71 (640,60; 891,27)	529,19 (466,52; 800,75)	285,49 (104,45; 396,89)	348,15 (313,34; 355,12)	188,00 (174,08; 194,96)	222,82 (208,89; 229,78)
Процентное соотношение морфологических типов микроглии, п%/пр%/ак%*	9,62%/ 23,82%/ 66,56%	9,2%/ 43,5%/ 47,3%	4,39%/ 41,22%/ 54,39%	11,96%/ 69,05%/ 18,98%	13,79%/ 67,05%/ 19,16%	19,58%/ 74,12%/ 6,3%	10,26%/ 82,69%/ 7,05%

*Примечание: * – п – покоящаяся микроглия, пр – промежуточные формы микроглии, ак – активированная микроглия*

При межгрупповом статистическом анализе установлены достоверные различия по плотности Iba-1-позитивных клеток в перитуморозной зоне на разные сроки развития опухоли (p=0,000). Также установлены отличия по морфологическому составу микроглии (p<0,001 для всех типов микроглии).

Таким образом, в ходе проведенного исследования выявлены изменения микроглиальных клеток перитуморозной зоны правого полушария при прогрессировании глиальной опухоли. К 10-14 суткам от момента имплантации опухолевых клеток плотность микроглии достигала своего максимального значения, а преобладающим морфотипом был амебоидный, что вызвано иммунным ответом и миграцией клеток к области повреждения. Следовательно, именно в первые две недели формирования опухоли организм пытался максимально локализовать патологический процесс, что отражено в выраженной концентрации и активации клеток микроглии. По прошествии двух недель количество микроглиальных клеток в перитуморозной зоне начинает активно снижаться, очевидно, это связано с секрецией опухолевыми клетками цитокинов и приобретением микроглией альтернативного фенотипа с развитием иммуносупрессии и поддержанием опухолевого роста.

Выводы:

1. Начальный рост опухоли в головном мозге грызунов сопровождается реактивным увеличением клеточной плотности микроглии в перитуморозной зоне с

изменением процентного соотношения морфологических типов клеток в сторону активированных форм.

2. При прогрессировании опухолевого роста (начиная с 14 суток) в перитуморозной зоне отмечается снижение клеточной плотности микроглии, уменьшение морфологических профилей активированных клеток и увеличение промежуточных форм.

Литература

1. Borisov, K. E. The immunosuppressive microenvironment of malignant gliomas [Text] / K. E. Borisov, D. D. Sakaeva // *Arkh Patol.* – 2015. – № 77. – P. 54–63.
2. CX3CL1/CX3CR1 axis attenuates early brain injury via promoting the delivery of exosomal microRNA-124 from neuron to microglia after subarachnoid hemorrhage [Text] / X. Chen [et al.] // *J Neuroinflammation.* – 2020. – № 17. – P. 1–15.
3. Karperien, A. Quantitating the subtleties of microglial morphology with fractal analysis [Text] / A. Karperien, H. Ahammer, H. F. Jelinek // *Frontiers in Cellular Neuroscience.* – 2013. – № 7. – P. 1–18.
4. Brain and other central nervous system tumor statistics [Text] / K. D. Miller [et al.] // *CA Cancer J Clin.* – 2021. – № 71. – P. 381–406.