

АСТРОЦИТАРНАЯ РЕАКЦИЯ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС ПРИ ПРОГРЕССИРОВАНИИ ГЛИАЛЬНЫХ ОПУХОЛЕЙ



А. О. Чеботарь

Институт физиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

Введение. Исследование гетерогенности и пластичности астроцитов в головном мозге, в частности в перитуморозной зоне, на разных этапах роста новообразования поможет понять их значение в прогрессировании глиальных опухолей.

Цель. Морфометрическая оценка астроцитов в головном мозге грызунов при прогрессировании глиальной опухоли.

Материал и методы. Моделирование глиальной опухоли головного мозга грызунов с помощью имплантации клеток глиомы С6 с последующей иммуногистохимической оценкой GFAP⁺-астроцитов в перитуморозной зоне в правом полушарии и аналогичной зоне левого полушария головного мозга грызунов в разные сроки эксперимента.

Результаты. На ранних сроках роста глиальной опухоли отмечено статистически значимое преобладание клеточной плотности и различие морфометрических параметров клеток астроцитов в перитуморозной зоне правого полушария головного мозга крыс по сравнению с аналогичной зоной левого полушария. Прогрессирование глиальной опухоли сопровождалось достоверным снижением клеточной плотности астроцитов в перитуморозной зоне с нарастанием реактивных изменений астроцитов в аналогичной зоне контрлатерального полушария.

Выводы. Развитие опухолевых процессов в головном мозге грызунов сопровождается активацией астроцитов с приобретением клетками реактивного фенотипа в перитуморозной зоне. Вместе с тем дальнейшее прогрессирование новообразования подавляет активную пролиферацию астроцитов.

Ключевые слова: глиальные опухоли, глиома С6, перитуморозная зона, астроциты, GFAP.

Для цитирования: Чеботарь, А. О. Астроцитарная реакция головного мозга крыс при прогрессировании глиальных опухолей / А. О. Чеботарь // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. 2024. Т. 22, № 5. С. 430-434. <https://doi.org/10.25298/2221-8785-2024-22-5-430-434>

Введение

Глиомы – первичные опухоли центральной нервной системы, исходно возникающие из глиальных клеток вещества головного мозга. Среди всех внутричерепных образований глиальные опухоли составляют, по разным источникам, от 30 до 45%, при этом около 80% – злокачественные глиомы [1]. Общее количество злокачественных глиальных опухолей, диагностируемых ежегодно, составляет порядка 5,5-8,5 случаев на 100 000 населения [2]. Согласно последним мировым статистическим данным, Китай, США и Индия составляют тройку стран с наибольшим числом случаев заболевания злокачественными опухолями [3]. Интерес к проблеме глиальных опухолей головного мозга обусловлен несколькими факторами: стремительным нарастанием удельного количества пациентов с глиомами и отсутствием прорывных достижений в борьбе с этой патологией, несмотря на частные успехи в онкологии. За последнее десятилетие сделаны открытия, касающиеся метаболизма, развития, иммунного микроокружения глиом, однако взаимодействие опухолевых клеток с клеточным компонентом перитуморозной зоны остается

недостаточно изученным и требует дальнейших исследований [4].

Перитуморозная зона глиальных опухолей представляет собой сложную, гетерогенную систему, состоящую из опухолевых клеток, стволовых клеток глиомы, иммунных клеток, клеток нервной системы, сосудистой системы головного мозга, а также разных цитокинов и факторов прямой/непрямой межклеточной коммуникации (рис. 1) [5, 6]. Клетки перитуморозной зоны могут принимать участие в регуляции онкогенеза, прогрессировании, инвазии, ангиогенезе и резистентности к лечению глиом.

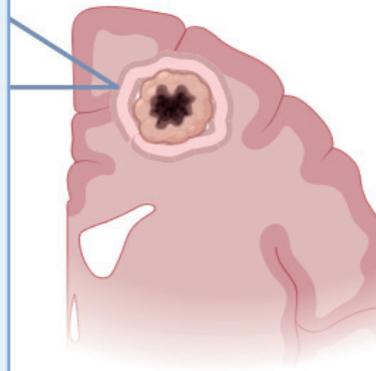


Рисунок 1. – Компоненты перитуморозной зоны глиальной опухоли (BioRender)

Figure 1. – Components of the peritumoral zone of a glioma (BioRender)

Одни из важных клеток в перитуморозной зоне – астроциты, которые составляют около 40-50% массы вещества головного мозга. Считалось, что они не принимают участия в опухолевом росте, однако появились новые данные, которые позволяют предположить, что опухолевые клетки взаимодействуют друг с другом и с астроцитами в микроокружении и перитуморозной зоне посредством щелевых соединений, интегринов и путем высвобождения сигнальных молекул (факторов роста и цитокинов) [7]. Так, при разных патологиях центральной нервной системы (ЦНС) астроциты приобретают реактивный фенотип, который характеризуется гипертрофией сом, активацией промежуточных филаментов, а также пролиферативной активностью клеток [8]. Такие астроциты увеличивают экспрессию разных цитокинов и усиливают пролиферацию и миграцию клеток глиомы в вещество головного мозга.

Цель исследования – морфометрическая оценка астроцитов в головном мозге грызунов при прогрессировании глиальной опухоли.

Материал и методы

Исследование проводилось на крысах Wistar обоего пола ($n=80$) с исходной массой 230-270 г. Эксперименты проводили согласно Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях. Протокол исследования одобрен комиссией по биоэтике Института физиологии НАН Беларуси (протокол от 25.05.22 № 3, протокол от 26.01.2023 № 1). В ходе оперативного вмешательства выполнялась имплантация опухолевых клеток в головной мозг грызунов. После наступления наркозного сна по средней линии головы крысы выполнялись разрез и скелетирование кости. Для определения точки трепанации использовали стереотаксический аппарат. Координата мишени на черепе устанавливалась в правом полушарии на 2 мм выше и правее от брегмы. Далее с помощью фрезы диаметром 2 мм в данной точке выполнялось отверстие. Клеточная суспензия глиомы С6 (1×10^6 клеток/мл, 10 мкл) с помощью дозатора вводилась в головной мозг. После введения клеток наконечник оставляется в месте инъекции на некоторое время для сбалансирования внутричерепного давления и уменьшения дальнейшего вытекания клеток вместе с черепно-мозговой жидкостью. Животные выводились из эксперимента на 7, 14, 21, 28, 35-е сутки, в соответствии со сроком выведения животных из эксперимента были сформированы пять групп исследования.

Для оценки клеточной плотности и морфологических характеристик клеток астроцитов в головном мозге подопытных животных проводилось иммуногистохимическое исследование с маркером к глиальному кисломому фибриллярному белку – GFAP (клон P14136, FineTest, в рабочем разведении 1:40000). Гистологические срезы после иммуногистохимического исследования сканировали на гистологическом

сканере AperioT2 фирмы Leica при увеличении $\times 20,0$. Для дальнейшего морфометрического анализа в приложении SlideViewer с помощью функции «TakeSnapshot» делали микрофотографии на большом увеличении $\times 40,0$. С помощью программы ImageJ (США) и функции «MultiPoint» в ручном режиме проводили подсчет GFAP⁺-клеток в поле зрения. Площадь поля зрения составила 1212871,09 мкм². В подсчет не входили клетки, которые частично находились за пределами поля зрения. Диаметр тел астроцитов, длина самого протяженного и диаметр самого широкого отростка клетки подсчитывались с помощью функции «Straight». Анализировались клетки в 10-ти неперекрывающихся полях зрения при большом увеличении ($\times 40$). Данные описательной статистики указаны в виде медианы (Me) и квартилей (Q25%; Q75%). 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 – непараметрический U-критерий теста Манна-Уитни, более двух групп – H-критерий теста Краскала-Уоллиса ($p < 0,05$).

Результаты и обсуждение

На седьмые сутки от начала эксперимента медиана клеточной плотности астроцитов в перитуморозной зоне глиальной опухоли составила 568,9 (474,4; 676,1) клеток/мм², диаметр тел GFAP⁺-астроцитов был 7,4 (5,9; 8,7) мкм, площадь тел составила 91,9 (66,7; 125,8) мкм². Медиана количества отростков у GFAP⁺-астроцитов достигала 3,0 (3,0; 4,0), протяженность самого длинного отростка составила 22,3 (16,7; 29,2) мкм, медиана максимального диаметра отростков была 2,5 (2,0; 3,3) мкм. В аналогичной зоне левого полушария медиана клеточной плотности астроцитов составила 107,2 (82,5; 156,6) клеток/мм² ($p < 0,0001$ при сравнении с плотностью астроцитов в перитуморозной зоне). Диаметр тел астроцитов был 3,1 (2,4; 3,9) мкм ($p < 0,001$), площадь – 16,6 (11,3; 22,9) мкм² ($p < 0,001$). Количество отростков астроцитов в аналогичной зоне – 3,0 (2,0; 4,0), $p < 0,01$. Максимальная длина отростков составила 15,5 (12,1; 19,6) мкм ($p < 0,0001$), ширина – 1,5 (1,1; 1,7) мкм, $p < 0,0001$.

На 14-е сутки у животных второй группы исследования медиана клеточной плотности GFAP⁺-астроцитов в перитуморозной зоне составила 453,5 (296,8; 577,2) клеток/мм², диаметр тел GFAP⁺-астроцитов был 7,1 (5,9; 8,5) мкм, площадь тел – 75,1 (58,5; 96,7) мкм². Максимальное количество отростков составило 4,0 (3,0; 4,0), медиана протяженности самых длинных отростков GFAP⁺-астроцитов была 26,2 (20,4; 32,5) мкм, максимальная ширина отростков астроцитов перитуморозной зоны достигала 2,8 (2,1; 3,7) мкм. В левом полушарии медиана плотности GFAP⁺-астроцитов составила 131,9 (82,5; 173,1) клеток/мм², $p < 0,0001$. Максималь-

ный диаметр сом был 4,5 (3,2; 5,6) мкм ($p < 0,01$), площадь – 32,3 (22,3; 43,4) мкм², $p < 0,0001$. При морфометрическом анализе отростков GFAP⁺-астроцитов левого полушария медиана максимальной длины составила 17,6 (11,8; 23,9) мкм ($p < 0,0001$), ширина – 1,4 (1,1; 1,7) мкм, $p < 0,01$, их количество – 3,0 (2,0; 4,0), $p < 0,01$.

На 21-е сутки после имплантации опухолевых клеток глиомы С6 в вещество головного мозга подопытных животных третьей группы исследования установлено, что медиана клеточной плотности GFAP⁺-астроцитов была 346,3 (247,6; 428,7) клеток/мм², диаметр тел астроцитов составил 5,9 (4,6; 7,6) мкм, площадь тел – 75,5 (45,4; 107,6) мкм². Медиана количества отростков у GFAP⁺-астроцитов достигала 3,0 (2,0; 4,0), протяженность самого длинного отростка составила 18,9 (15,2; 24,3) мкм, медиана максимального диаметра отростков была 2,3 (1,7; 2,9) мкм. Клеточная плотность GFAP⁺-астроцитов в интактном полушарии составила 173,1 (107,2; 247,4) клеток/мм², $p < 0,0001$. Максимальный диаметр тел клеток был 4,8 (3,7; 6,1) мкм, $p < 0,0001$, площадь – 33,6 (22,4; 44,8) мкм², $p < 0,001$. Медиана количества отростков составила 3,0 (2,0; 4,5), $p < 0,01$, максимальной длины отростков GFAP⁺-астроцитов – 18,4 (14,8; 22,8) мкм, $p > 0,05$, ширина – 1,5 (1,3; 1,9) мкм, $p < 0,0001$.

На 28-е сутки у животных четвертой группы исследования медиана клеточной плотности GFAP⁺-астроцитов в перитуморозной зоне глиальной опухоли составила 346,3 (272,1; 441,4) клеток/мм², диаметр тел GFAP⁺-астроцитов был 6,1 (5,2; 7,2) мкм, площадь тел клеток составила 84,9 (66,9; 112,6) мкм². Максимальное коли-

чество отростков составило 3,0 (2,0; 4,0), медиана протяженности самых длинных отростков GFAP⁺-астроцитов 19,4 (15,5; 24,8) мкм, максимальная ширина отростков астроцитов перитуморозной зоны достигала 2,4 (1,9; 3,0) мкм. В аналогичной зоне в левом полушарии клеточная плотность позитивных к исследуемому маркеру астроцитов была 189,6 (140,2; 263,8) клеток/мм², $p < 0,0001$. Диаметр тел астроцитов был 4,9 (3,9; 4,5) мкм, площадь – 47,8 (34,1; 62,7) мкм², $p < 0,0001$. Количество отростков GFAP⁺-астроцитов – 3,0 (2,0; 4,0), $p > 0,05$, максимальная длина отростков составила 17,8 (15,2; 22,1) мкм, $p > 0,05$, ширина – 1,7 (1,3; 2,0) мкм, $p < 0,0001$.

К 35-м суткам от момента имплантации опухолевых клеток глиомы С6 в вещество головного мозга подопытных животных пятой группы исследования установлено, что медиана клеточной плотности GFAP⁺-позитивных клеток была 272,1 (206,1; 362,8) клеток/мм², диаметр тел астроцитов составил 5,8 (4,3; 7,1) мкм, площадь тел – 79,3 (60,9; 99,6) мкм². Медиана количества отростков у GFAP⁺-астроцитов достигала 3,0 (2,0; 4,0), протяженность самого длинного отростка составила 20,4 (15,8; 25,6) мкм, медиана максимального диаметра отростков была 1,9 (1,4; 2,4) мкм. Плотность GFAP⁺-астроцитов в левом полушарии составила 230,9 (140,2; 280,3) клеток/мм², $p > 0,05$. Максимальный диаметр тел клеток был 5,4 (3,9; 7,0) мкм, $p > 0,05$, площадь – 39,2 (28,3; 57,8) мкм², $p < 0,0001$. При морфометрическом анализе отростков GFAP⁺-астроцитов левого полушария медиана максимальной длины составила 17,4 (12,9; 24,1) мкм, $p < 0,05$, ши-

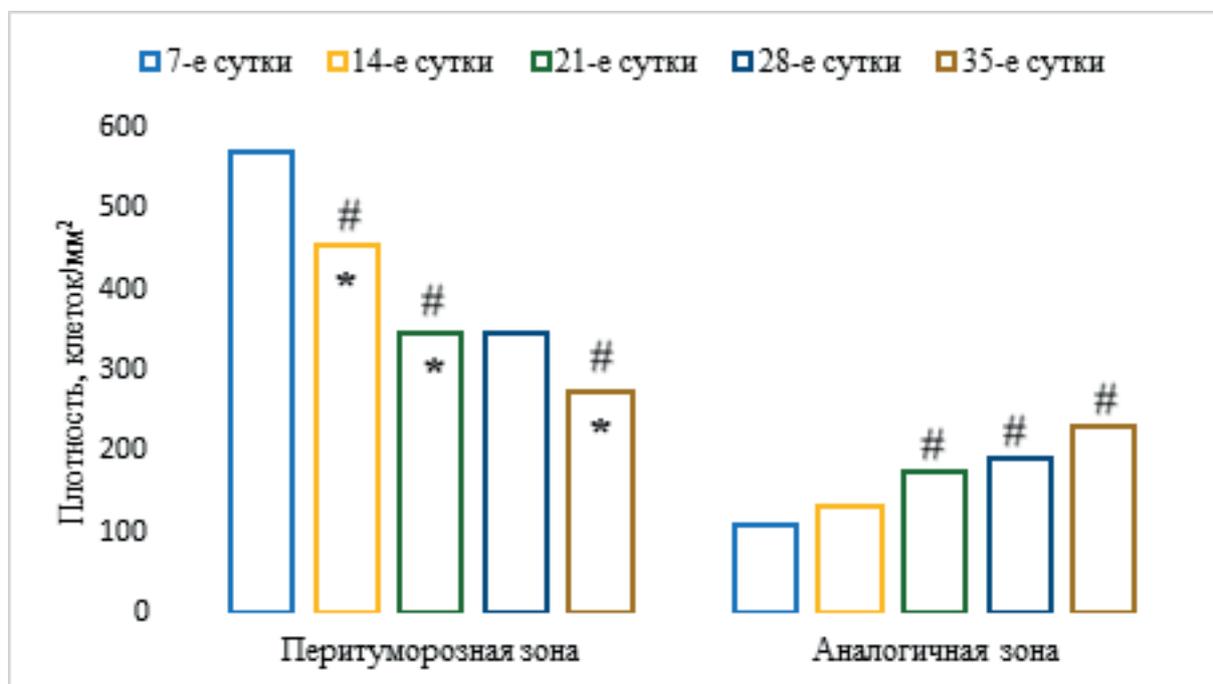


Рисунок 2. – Динамические изменения клеточной плотности GFAP⁺-астроцитов в головном мозге грызунов;

* – $p < 0,05$ при сравнении с предыдущими сутками; # – $p < 0,05$ при сравнении с седьмыми сутками

Figure 2. – Dynamic changes in the cell density of GFAP⁺-astrocytes in the brain of rodents; * – $p < 0,05$ when compared with the previous days; # – $p < 0,05$ when compared with the seventh day

рина – 1,8 (1,4; 2,1) мкм, $p < 0,01$, количество – 3,0 (2,0; 4,0), $p < 0,01$.

При межгрупповом статистическом анализе динамических изменений клеточной плотности GFAP⁺-астроцитов (от седьмых к 35-м суткам) в перитуморозной зоне правого и аналогичной зоне левого полушария было установлено достоверно значимое снижение показателя, $p = 0,0000$ и $p = 0,0000$, соответственно (рис. 2).

Заключение

Таким образом, на основании полученных данных об изменении морфометрических параметров GFAP⁺-астроцитов в перитуморозной зоне глиальной опухоли в правом полушарии и

аналогичной зоне в левом полушарии головного мозга грызунов отмечаются статистически достоверные различия по анализируемым параметрам на ранних сроках эксперимента, что указывает на приобретение клетками реактивного фенотипа в перитуморозной зоне. При дальнейшем прогрессировании опухолевого роста отмечено снижение клеточной плотности в правом полушарии и увеличением плотности в интактном полушарии, что может указывать на подавление активности астроцитов опухолевыми клетками в перитуморозной зоне и активацию данного типа глии в левом полушарии головного мозга грызунов.

Литература

1. Борисейко, А. В. Глиальные опухоли головного мозга: обзор литературы и перспективы лечения / А. В. Борисейко // Медицинские новости. – 2018. – № 1. – С. 8-13. – edn: YPPJBY.
2. Ostrom, Q. T. Epidemiology of Brain and Other CNS Tumors / Q. T. Ostrom, S. S. Francis, J. S. Barnholtz-Sloan // *Curr Neurol Neurosci Rep.* – 2021. – Vol. 21, № 12. – P. 68. – doi: 10.1007/s11910-021-01152-9.
3. Mesfin, F. B. Gliomas / F. B. Mesfin, T. Karsonovich, M. A. Al-Dhahir // StatPearls [Electronic resource]. – Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2024. – Mode of access: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK430685>. – Date of access: 01.06.2024.
4. Tumor-associated reactive astrocytes aid the evolution of immunosuppressive environment in glioblastoma / D. Henrik Heiland [et al.] // *Nat Commun.* – 2019. – Vol. 10, № 1. – P. 2541. – doi: 10.1038/s41467-019-10493-6.
5. Glioma: molecular signature and crossroads with tumor microenvironment / L. Barthel [et al.] // *Cancer Metastasis Rev.* – 2022. – Vol. 41, № 1. – P. 53-75. – doi: 10.1007/s10555-021-09997-9.
6. Tumor microenvironment in glioblastoma: Current and emerging concepts / P. Sharma // *Neurooncol Adv.* – 2023. – Vol. 5, № 1. – P: vdad009. – doi: 10.1093/oaajnl/vdad009.
7. Reactive Astrocytes in Glioblastoma Multiforme / X. Guan [et al.] // *Mol Neurobiol.* – 2018. – Vol. 55, № 8. – P. 6927-6938. – doi: 10.1007/s12035-018-0880-8.
8. Астроциты головного мозга человека: морфология и функции / С. Н. Рябцева [и др.] // *Медицинский журнал.* – 2023. – № 1. – С. 33-43. – doi: 10.51922/1818-426X.2023.1.33. – edn: SELEGI.

References

1. Boriseyko AV. Glial brain tumors: a literature review and prospects for treatment. *Meditsinskie novosti.* 2018;(1):8-13. edn: YPPJBY. (Russian).
2. Ostrom QT, Francis SS, Barnholtz-Sloan JS. Epidemiology of Brain and Other CNS Tumors. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2021;21(12):68. doi: 10.1007/s11910-021-01152-9.
3. Mesfin FB, Karsonovich T, Al-Dhahir MA. Gliomas. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441874/>
4. Henrik Heiland D, Ravi VM, Behringer SP, Frenking JH, Wurm J, Joseph K, Garrelfs NWC, Strähle J, Heynckes S, Grauvogel J, Franco P, Mader I, Schneider M, Potthoff AL, Delev D, Hofmann UG, Fung C, Beck J, Sankowski R, Prinz M, Schnell O. Tumor-associated reactive astrocytes aid the evolution of immunosuppressive environment in glioblastoma. *Nat Commun.* 2019;10(1):2541. doi: 10.1038/s41467-019-10493-6.
5. Barthel L, Hadamitzky M, Dammann P, Schedlowski M, Sure U, Thakur BK, Hetze S. Glioma: molecular signature and crossroads with tumor microenvironment. *Cancer Metastasis Rev.* 2022;41(1):53-75. doi: 10.1007/s10555-021-09997-9.
6. Sharma P, Aaroe A, Liang J, Puduvali VK. Tumor microenvironment in glioblastoma: Current and emerging concepts. *Neurooncol Adv.* 2023;5(1):vdad009. doi: 10.1093/oaajnl/vdad009.
7. Guan X, Hasan MN, Maniar S, Jia W, Sun D. Reactive Astrocytes in Glioblastoma Multiforme. *Mol Neurobiol.* 2018;55(8):6927-6938. doi: 10.1007/s12035-018-0880-8.
8. Rjabceva SN, Siamionik IA, Korneeva MA, Chabatar AO, Guzov SA, Nedzvedz MK. Human brain astrocytes: morphology and functions. *Medical journal.* 2023;(1):33-43. doi: 10.51922/1818-426X.2023.1.33. edn: SELEGI. (Russian).

ASTROCYTIC REACTION OF THE RAT BRAIN DURING THE PROGRESSION OF GLIAL TUMORS

A. O. Chabatar

Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

Background. The study of the heterogeneity and plasticity of astrocytes in the brain, in particular in the peritumoral zone, at different stages of neoplasm growth will help to understand their importance in the progression of glial tumors.

Aim. To perform morphometric assessment of astrocytes in the rodent brain during glial tumor progression.

Material and methods. Glial brain tumor was modeled in rodents using implantation of glioma C6 cells followed by immunohistochemical assessment of GFAP⁺-astrocytes in the peritumoral zone in the right hemisphere and a similar zone of the left hemisphere of the rodent brain at different experimental periods.

Results. In the early stages of glial tumor growth, there was a statistically significant predominance of cell density and a difference in the morphometric parameters of astrocyte cells in the peritumoral zone of the right hemisphere of the rat brain compared with a similar zone of the left hemisphere. The progression of the glial tumor was accompanied by a significant decrease in the cell density of astrocytes in the peritumoral zone with an increase in reactive changes of astrocytes in a similar zone of the contralateral hemisphere.

Conclusions. The development of tumor processes in the brain of rodents is accompanied by activation of astrocytes with the acquisition of a reactive phenotype by cells in the peritumoral zone. At the same time, further progression of the neoplasm suppresses active proliferation of astrocytes.

Keywords: glial tumors, glioma C6, peritumoral zone, astrocytes, GFAP.

For citation: Chabatar AO. Astrocytic reaction of the rat brain during the progression of glial tumors. *Journal of the Grodno State Medical University.* 2024;22(5):430-434. <https://doi.org/10.25298/2221-8785-2024-22-5-430-434>

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Financing. The study was performed without external funding.

Соответствие принципам биоэтики. Протокол исследования одобрен комиссией по биоэтике Института физиологии НАН Беларуси.

Conformity with the principles of ethics. The research protocol was approved by the Bioethics Commission of the Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus.

Об авторе/About the author

Чеботарь Анастасия Олеговна / Chabatar Anastasiya, e-mail: anastasia.parashchenko99@gmail.com, ORCID: 0000-0002-2611-9726

Поступила / Received: 26.06.2024

Принята к публикации / Accepted for publication: 24.09.2024