



Оригинальная статья

Роль ультраструктурных изменений гематоэнцефалического барьера в развитии радиорезистентности глиобластомы головного мозга

Балканов А.С.¹ • Черников В.П.² • Голанов А.В.³

Актуальность. Глиобластома (ГБ) – наиболее часто диагностируемая опухоль головного мозга, при лечении которой используются адъювантные методы лечения, включая лучевую терапию. Причиной высокой вероятности возникновения местного рецидива ГБ считается ее радиорезистентность, обусловленная в том числе развитием гипоксии в результате нарушения проницаемости гематоэнцефалического барьера в сосудах ГБ и перитуморальной зоны (ПЗ). **Цель** – изучить патогенез гипоксии в области резидуальной ГБ на основании данных об изменениях морфологических элементов сосудистой стенки капилляров, формирующих гематоэнцефалический барьер в капиллярах ГБ и ПЗ. **Материал и методы.** Морфологический материал был получен в процессе удаления ГБ головного мозга у 5 пациентов. Подготовку материала для исследования методом трансмиссионной электронной микроскопии осуществляли по стандартной методике с фиксацией образцов в 2% растворе глутаральдегида на фосфатном буфере, постфиксацией тетраоксидом осмия, заливкой в смесь эпона и аралдита и контрастированием

ультратонких срезов уранилацетатом и цитратом свинца. В двух группах капилляров – ГБ (n=38) и ПЗ (n=32) – оценивали наличие изменений в клеточных элементах капилляров (вакуолизация митохондрии и вакуолизация эндоплазматического ретикулума в эндотелиоците, периците и астроците), а также состояние неклеточного элемента капиллярной стенки – базальной мембраны. **Результаты.** Выявлено наличие характерных для апоптоза и онкоза изменений в таких клеточных элементах, формирующих гематоэнцефалический барьер в капиллярах ГБ и ПЗ, как эндотелиоциты и перициты. Однако в капиллярах ГБ такие изменения выявлялись значительно чаще (p < 0,001). Только в половине (52,6%) капилляров ГБ обнаружен перикапиллярный астроцитарный слой, находящийся в состоянии отека. В остальных случаях астроцитарные отростки либо визуализировались в виде отдельных структурных элементов (13,2%), либо вообще не были обнаружены (34,2%). В капиллярах ПЗ астроцитарный слой имел место во всех наблюдениях, его отек отмечен в 68,8% капилляров, при этом тотальный – только в 25%.

Расширение базальной мембраны отмечено в подавляющем большинстве (89,5%) капилляров ГБ и только в 25% капилляров ПЗ (p < 0,001). **Заключение.** Обнаруженные изменения клеточных элементов капилляров ГБ, обуславливающие формирование перитуморального отека и, как следствие, возникновение гипоксии, с высокой степенью вероятности служат причиной радиорезистентности резидуальной ГБ.

Ключевые слова: глиобластома, капилляр, перитуморальная зона, электронная микроскопия, эндотелиоцит, перицит, астроцит, базальная мембрана, гематоэнцефалический барьер, повторный курс лучевой терапии

Для цитирования: Балканов АС, Черников ВП, Голанов АВ. Роль ультраструктурных изменений гематоэнцефалического барьера в развитии радиорезистентности глиобластомы головного мозга. Альманах клинической медицины. 2018;46(7):682–9. doi: 10.18786/2072-0505-2018-46-7-682-689.

Поступила 16.02.2018;
принята к публикации 20.08.2018

Глиобластома (ГБ), относимая к глиомам 4-й степени злокачественности (Grade IV) – наиболее часто диагностируемый морфологический тип опухоли головного мозга [1]. Низкая экспрессия мутации гена изоцитратдегидрогеназы-1 (IDH1) в клетках ГБ, ее способность к инвазии, что проявляется отсутствием четкой границы между опухолью и веществом мозга, в сочетании с локализацией в непосредственной близости от жизненно важных центров обуславливают неудовлетворительный прогноз лечения ГБ, в том числе вследствие невозможности ее радикальной резекции [2, 3]. В случае резидуальной ГБ в послеоперационном периоде применяют адъювантные методы лечения, наиболее известный из которых – лучевая терапия [4].

Эффективность адъювантной лучевой терапии во многом зависит от оксигенации резидуальной ГБ, что, в свою очередь, определяется состоянием кровотока в ней. Микроциркуляторное русло в резидуальной ГБ формируется за счет ангиогенеза, то есть из сосудов вещества мозга, непосредственно прилежащих к периферической границе ГБ. Эта область вещества головного мозга получила название перитуморальной зоны (ПЗ). Считается, что границы ПЗ соответствуют границам перифокального отека, окружающего ГБ [5]. Появление перифокального отека связывают с повреждением гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) микроциркуляторного русла ГБ и ПЗ реактивными астроцитами, макрофагами или фибробластами [6]. Как следствие, развивается повышение интерстициального давления с последующей гипоксией в зоне



резидуальной ГБ, что и обуславливает ее высокую радиорезистентность [7]. В этой связи очевидны причины повышенного интереса к состоянию ГЭБ не только в опухолевых капиллярах, но и в сосудах ПЗ [8].

В литературе встречаются публикации, посвященные применению трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ) для исследования состояния капилляров в ГБ [9, 10]. Показано, что в них имеются признаки нарушения ГЭБ, высказаны предположения относительно возможного механизма таких нарушений. Вместе с тем анализ состояния капилляров в ПЗ проведен в единичных работах [10, 11]. Установлено, что в этих капиллярах также есть признаки нарушения ГЭБ, но не уточняются причины, лежащие в основе патогенеза выявленных изменений.

Цель настоящего исследования – изучить патогенез гипоксии в области резидуальной ГБ на основании данных ТЭМ об изменениях морфологических элементов сосудистой стенки капилляров, формирующих ГЭБ.

Материал и методы

Морфологический материал для проведения исследования был получен в процессе удаления ГБ головного мозга в нейрохирургическом отделении ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского у 5 пациентов.

Исследование капилляров ГБ выполнялось в образцах из ее периферической части. Для исследования капилляров ПЗ забор материала осуществлялся из стенки послеоперационной кисты после визуального контроля тотального удаления ГБ в предполагаемом месте забора материала. Дополнительным критерием, подтверждающим принадлежность исследуемого образца к ПЗ, было обнаружение при ТЭМ большого количества миелиновых структур без выраженных признаков повреждения. Основанием для выбора такого критерия послужили ранее полученные данные о деградации миелиновых структур в присутствии клеток ГБ [12, 13], что приводит к их полному исчезновению в ее границах. В итоге в группу капилляров ГБ включены результаты анализа 38 капилляров, в группу капилляров ПЗ – результаты анализа 32 капилляров.

Подготовку материала для исследования методом ТЭМ осуществляли по стандартной методике с фиксацией образцов в 2% растворе глутаральдегида на фосфатном буфере, постфиксацией тетраоксидом осмия, заливкой в смесь эпона и аралдита и контрастированием ультратонких срезов уранилацетатом и цитратом свинца. Просмотр

Балканов Андрей

Сергеевич – д-р мед. наук, заведующий радиологическим отделением¹
 ✉ 129110, г. Москва, ул. Щепкина, 61/2, Российская Федерация.
 Тел.: +7 (495) 681 19 07.
 E-mail: andreybalkanov@yandex.ru

Черников Валерий

Петрович – канд. мед. наук, заведующий лабораторией патологии клетки²

Голанов Андрей

Владимирович – чл.-корр. РАН, д-р мед. наук, профессор, заведующий отделением радиологии и радиохирургии³

препаратов проводили на электронном микроскопе Libra 120 (Zeiss, Германия).

Маркерами апоптоза считали визуализацию одного или нескольких из перечисленных ниже признаков: пузырчатость (англ. blebbing) клеточной плазмолеммы, конденсация цитоплазмы (сморщивание клетки и электроннопозитивное окрашивание ее цитоплазмы) и/или ядерного хроматина [14]. Вакуолизация (набухание) митохондрии диагностировалась в случае приобретения ею сферической формы и неструктурируемой конденсации ее крист, вакуолизация (расширение цистерн) эндоплазматического ретикулума – в случае тотального или локального расширения его поперечного размера. Наличие вышеперечисленных изменений оценивали в следующих клеточных элементах капилляров ГБ и ПЗ вещества головного мозга: эндотелиоците, периците и астроците. Отдельно оценивалось состояние неклеточного элемента капиллярной стенки – базальной мембраны (БМ).

Для статистического анализа данных были использованы критерий Пирсона и точный критерий Фишера. Статистически значимой считалась разница исследуемых показателей при $p < 0,05$.

Результаты

При исследовании 38 капилляров ткани ГБ признаки апоптоза выявлены в одном или нескольких эндотелиоцитах 20 (52,6%) капилляров. Отек всех или большинства эндотелиоцитов зафиксирован в 30 (78,9%) капиллярах (рис. 1, 2). В эндотелиоцитах 36 (97,4%) капилляров установлено наличие вакуолизации цитоплазматических органелл. Вакуолизация митохондрий эндотелиоцитов наблюдалась в 35 (92,1%) капиллярах, вакуолизация эндоплазматического ретикулума – в 24 (63,2%). Наличие межэндотелиальных плотных соединений установлено в 28 капиллярах ГБ, в 14 (50%) из которых обнаружены признаки дезорганизации межэндотелиальных плотных соединений, о чем свидетельствовали дискретные зоны электронной плотности и появление полостей в их проекции.

Утолщение БМ, в ряде случаев сопровождавшееся ее вакуолизацией, выявлено в 34 (89,5%) капиллярах ГБ.

Перициты были обнаружены в 32 капиллярах ГБ. Только в перицитах 5 (15,6%) капилляров патологии не выявлено. В 5 (15,6%) капиллярах наблюдался апоптоз перицитов, в 19 (59,4%) – их отек. В перицитах 24 (63,2%) капилляров имела место вакуолизация митохондрий, в перицитах 22 (57,9%) капилляров – вакуолизация эндоплазматического ретикулума.

¹ ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского»; 129110, г. Москва, ул. Щепкина, 61/2, Российская Федерация

² ФГБНУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека»; 117418, г. Москва, ул. Цюрупы, 3, Российская Федерация

³ ФГАУ «Научно-исследовательский институт нейрохирургии имени академика Н.Н. Бурденко» Минздрава России; 125047, г. Москва, ул. 4-я Тверская-Ямская, 16, Российская Федерация

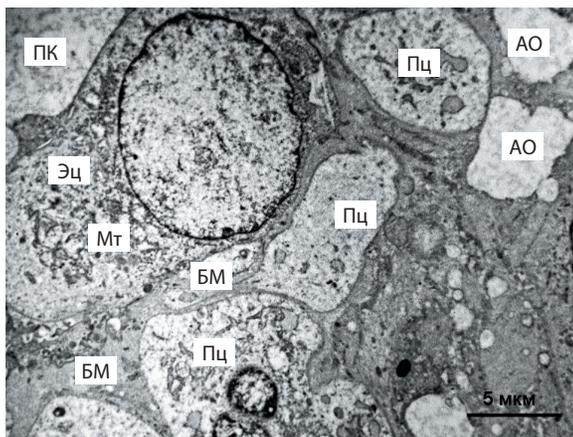


Рис. 1. Поперечный срез капилляра глиобластомы головного мозга человека. Трансмиссионная электронная микроскопия; ПК – просвет капилляра, Эц – эндотелиоцит, Пц – перицит, АО – астроцитарный отросток, БМ – базальная мембрана, Мт – митохондрии

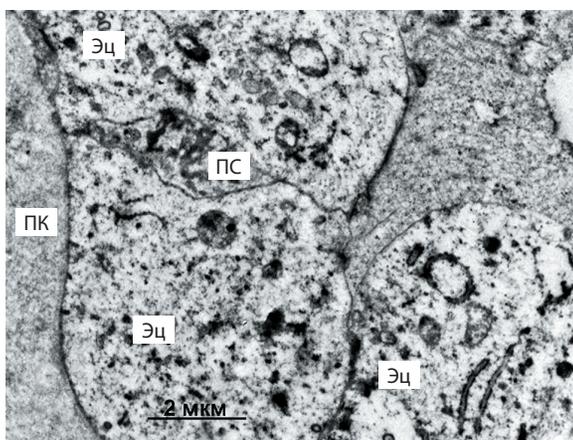


Рис. 2. Поперечный срез капилляра глиобластомы головного мозга человека, отек эндотелиоцитов. Трансмиссионная электронная микроскопия; ПК – просвет капилляра, Эц – эндотелиоцит, ПС – межэндотелиальное плотное соединение

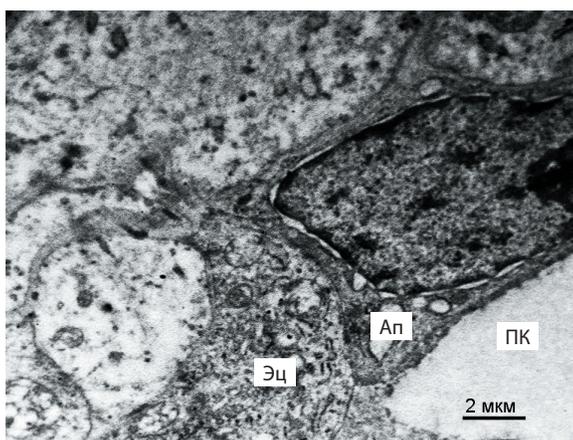


Рис. 3. Поперечный срез капилляра перитуморальной зоны глиобластомы головного мозга человека. Трансмиссионная электронная микроскопия; Ап – апоптоз эндотелиоцита, ПК – просвет капилляра, Эц – эндотелиоцит

Нарушение перикапиллярного астроцитарного слоя отмечено в 100% капилляров ГБ; в 13 (34,2%) капиллярах астроцитарные отростки не обнаружены, в 5 (13,2%) капиллярах астроцитарный слой, состоящий из отекавших или интактных астроцитарных отростков, наблюдался на протяжении только части периметра капилляра, в 20 (52,6%) капиллярах были единичные отекавшие астроцитарные отростки, не контактирующие друг с другом и БМ.

Исследование эндотелиоцитов сосудов ПЗ вещества головного мозга выполнено в 32 капиллярах (рис. 3). В 6 (19,4%) из них изменений в эндотелиоцитах не выявлено. Апоптоз одного или нескольких эндотелиоцитов наблюдался значительно реже, чем в ГБ, – только в 4 (12,5%) капиллярах ПЗ ($p < 0,001$). Отек эндотелиоцитов отмечен всего в 1 (3,1%) капилляре ПЗ, что также было существенно ниже, чем в капиллярах ГБ ($p < 0,001$). Вакуолизация цитоплазматических органелл имела место в эндотелиоцитах 26 (81,3%) капилляров ПЗ; вакуолизация митохондрий встречалась так же часто, как и в ГБ, – в 26 (81,3%) капиллярах ПЗ ($p = 0,28$), зато вакуолизация эндоплазматического ретикулума эндотелиоцитов отмечалась реже – в 11 (34,4%) капиллярах ПЗ ($p < 0,05$).

Дезорганизация межэндотелиальных плотных соединений в ПЗ по сравнению с ГБ встречалась реже и отмечена только в 2 (6,2%) капиллярах ($p < 0,001$).

В значительно меньшем числе сосудов ПЗ обнаружено утолщение БМ – всего в 8 (25%) капиллярах ($p < 0,001$).

Перициты визуализированы при исследовании 27 капилляров ПЗ. Апоптоз перицитов встречался так же часто, как и в ГБ, – в 9 (31,3%) капиллярах ($p = 0,11$). По сравнению с ГБ мы не обнаружили в капиллярах ПЗ отека перицитов ($p < 0,001$). Вакуолизация митохондрий и эндоплазматического ретикулума в перицитах капилляров ПЗ встречалась редко и была выявлена всего в 11 (34,3%) капиллярах ($p < 0,05$).

При анализе перикапиллярного астроцитарного слоя в капиллярах ПЗ установлено, что в отличие от ГБ этот структурный элемент в 10 (31,2%) капиллярах был верифицирован как интактный ($p < 0,001$), то есть визуализирован непрерывный слой из астроцитарных отростков, плотно примыкающий к периферической границе БМ. В 22 (68,8%) капиллярах имел место отек астроцитарных отростков, при этом тотальный отек наблюдался только в 8 капиллярах. В 14 капиллярах был отек лишь отдельных астроцитарных отростков.

Обсуждение

Считается, что нарушение микроциркуляции, важнейшей характеристикой которой является состояние проницаемости ГЭБ, – основной фактор, влияющий на формирование гипоксии в резидуальной ГБ, которая, в свою очередь, и предопределяет ее высокую радиорезистентность при проведении адъювантной лучевой терапии. В итоге рецидив ГБ, приводящий к гибели большинства пациентов



в этой группе, возникает в среднем через 15 месяцев после завершения лечения [15]. В этой связи становится понятным, что тщательное исследование сосудов микроциркуляторного русла в самой ГБ и ПЗ вокруг нее необходимо для оптимизации проведения адъювантной лучевой терапии.

В норме ГЭБ в мозговых капиллярах состоит из эндотелиоцитов, скрепленных между собой межэндотелиальных плотных соединений, БМ, перицитов и перикапиллярного слоя, состоящего из астроцитарных отростков [16]. Уже предпринимались попытки провести анализ состояния ГЭБ в капиллярах ГБ и ПЗ при помощи ТЭМ. Так, А.М. Rojiani и К. Dorovini-Zis, исследуя капилляры ГБ, установили, что в них имеются признаки нарушения проницаемости ГЭБ в виде отека эндотелиоцитов и отсутствия слоя из астроцитарных отростков вокруг них. Авторы не обнаружили повреждений межэндотелиальных плотных соединений в опухолевых капиллярах [17]. М. Bertossi и соавт., исследуя капилляры ПЗ, не выявили повреждений эндотелиоцитов и межэндотелиальных плотных соединений в ПЗ. Единственным признаком, свидетельствующим о нарушении ГЭБ в них, был отек некоторых астроцитарных отростков [18]. S. Roy и С. Sarkar, проводя анализ изменений структурных элементов капиллярной стенки ГБ и ПЗ вокруг нее, установили, что вне зависимости от места расположения капилляров в них имелись структурные изменения, вызывающие нарушение ГЭБ, а именно: отек эндотелиоцитов, наличие в цитоплазме эндотелиоцитов большого количества везикул и вакуолей, наличие псевдоподий и фенестр в люминальной плазмолемме эндотелиоцитов, утолщение БМ и отсутствие перикапиллярного слоя астроцитарных отростков. Единственным различием, по мнению авторов, было то, что дезорганизация межэндотелиальных плотных соединений обнаруживалась только в капиллярах ГБ [10]. Противоречивые данные о характере изменений ГЭБ в капиллярах ГБ и ПЗ затрудняют поиск решений, направленных на снижение радиорезистентности резидуальной ГБ. Все вышперечисленное справедливо и по отношению к использованию лучевой терапии при ее повторном применении у пациентов с рецидивом ГБ. По мере совершенствования технологии повторное применение лучевой терапии находит все больше сторонников [19], однако очевидна необходимость разработки критериев для ее успешного использования на практике.

Следует отметить, что в ряде экспериментальных исследований уже получены результаты, подтверждающие положительное влияние повышения оксигенации в зоне резидуальной ГБ на ее

радиочувствительность при использовании, например, бевацизумаба. Однако этот эффект носил лишь временный характер [7].

Мы обнаружили изменения ГЭБ как в клеточных, так и в неклеточных структурных элементах стенки капилляров ГБ и ПЗ, но в ГБ они были более выражены. Так, отек эндотелиоцитов наблюдался значительно чаще в капиллярах ГБ, чем ПЗ (78,9 и 3,1% соответственно). В эндотелиоцитах капилляров ГБ также значительно чаще, чем в капиллярах ПЗ, отмечены такие признаки программируемой клеточной смерти (апоптоза), как пузырчатость и конденсация цитоплазмы и хроматина (в 52,6 и 12,5% капилляров соответственно), а также дезорганизация межэндотелиальных плотных соединений (50 и 6,2% соответственно), которую, как полагают, можно рассматривать как один из признаков апоптоза [20]. Вакуолизация митохондрий и эндоплазматического ретикулума, по мнению многих авторов служащая проявлением непрограммированной клеточной гибели – онкоза [20–22], тоже была достоверно выше в эндотелиоцитах капилляров ГБ, чем ПЗ. Причины, приводящие к возникновению вышеописанных изменений в эндотелиоцитах, а в последующем – и к гибели капилляра, остаются неясными. Однако в последнее время получены данные о том, что секретруемые клетками ГБ микровезикулы (экзосомы), содержащие микроРНК, способны оказывать влияние на экспрессию некоторых генов в эндотелиоцитах [23], и не исключено, что описанные нами изменения служат следствием такого влияния. Полученные нами данные о наличии в эндотелиоцитах капилляров ГБ и ПЗ признаков как апоптоза, так и онкоза свидетельствуют о существенной роли вышеустановленных изменений в гибели капилляров и формировании зон гипоксии в опухолях этого морфологического типа. Тот факт, что признаки, указывающие на гибель эндотелиоцитов, достоверно чаще встречаются в капиллярах резидуальной ГБ,шний раз доказывает существенно более важное значение расстройства гемодинамики именно в этой зоне как фактора развития рецидива.

Схожие по характеру изменения были обнаружены и в перицитах капилляров ГБ и ПЗ. Необходимость изучения состояния перицитов в зоне ГБ диктуется их значимым влиянием на состояние опухолевого ангиогенеза [24]. Нечасто можно встретить публикации результатов анализа состояния перицитов в сосудах ГБ. Одни авторы сообщают о снижении количества перицитов в капиллярах ГБ в результате их апоптоза [18], другие – об увеличении их количества [17, 24], в том числе



за счет дифференцировки опухолевых стволовых клеток ГБ в перициты [25]. Наши наблюдения свидетельствуют о том, что часть перицитов в капиллярах ГБ и ПЗ находилась в состоянии апоптоза, при этом частота выявляемости признаков апоптоза в перицитах не зависела от того, где расположен капилляр – в ГБ или ПЗ. Одной из причин апоптоза перицитов может быть высокая концентрация в крови у пациентов с ГБ глюкокортикоидов, которые применяются в обязательном порядке с целью коррекции перифокального отека. К сожалению, прием этих медикаментов ведет к развитию инсулинорезистентности, что, в свою очередь, обуславливает апоптоз перицитов [26]. Изменения, характерные для онкоза перицитов, чаще наблюдались в капиллярах ГБ, что, как и в случае с эндотелиоцитами ГБ, служит, по нашему мнению, следствием более выраженного патогенного влияния со стороны опухоли на этот сегмент микроциркуляторного русла. Уже имеющиеся данные о существенной роли перицитов в формировании и поддержании в нормальном состоянии сосудистой стенки, в том числе капилляров ГБ головного мозга, а также наши результаты дают основание сделать вывод о том, что повреждение этого клеточного компонента может лежать в основе патологического механизма, проявляющегося вначале нарушением ГЭБ в капиллярах ГБ и в меньшей степени в сосудах ПЗ и заканчивающегося гибелью сосуда. В свою очередь, вышеуказанные события, как уже говорилось ранее, служат причиной гипоксии в ГБ, что и лежит в основе снижения ее радиочувствительности.

В исследуемых капиллярах мы наблюдали изменения и неклеточных элементов, таких как БМ, в виде ее расширения и вакуолизации, при этом в ГБ такие изменения имели место значительно чаще. Как показано ранее, увеличение толщины БМ имеет место в капиллярах злокачественных опухолей головного мозга [27]. Аналогичные изменения БМ в капиллярах головного мозга обнаружены при его травматическом поражении [28], эпилепсии [29] и некоторых формах энцефалопатий [30]. Складывается впечатление, что расширение БМ представляет собой лишь следствие нарушения проницаемости ГЭБ в сосудах головного мозга. Подтверждением такого вывода становится выявленная в некоторых исследованиях прямая зависимость между толщиной БМ и величиной отека вещества головного мозга [27]. С учетом всего вышесказанного не исключаем, что полученные нами данные можно использовать в качестве одного из критериев, позволяющего оценить степень гипоксии в зоне локализации резидуальной ГБ.

Как мы уже отмечали в своих более ранних работах, набухание астроцитарного слоя вокруг капилляров головного мозга, получившее название перикапиллярного отека, служит компенсаторным механизмом коррекции нарушения проницаемости ГЭБ и наблюдается при целом ряде патологических состояний, в том числе в капиллярах диффузной астроцитомы [31]. В нашем исследовании повреждение астроцитарного слоя отмечено вокруг капилляров как ГБ, так и ПЗ, однако степень и характер этих повреждений существенно различались. Так, в ПЗ слой из астроцитарных отростков визуализирован при исследовании всех капилляров, а его повреждение было исключительно в виде отека в 67,8% капилляров. В капиллярах ГБ повреждения этого структурного элемента носили значительно более выраженный характер. Так, в 34,2% капилляров ГБ слой из астроцитарных отростков вообще не был обнаружен. Сегментарно астроцитарный слой был сохранен вокруг 13,2% капилляров, а в 52,6% капилляров наблюдались единичные набухшие астроцитарные отростки, не контактирующие друг с другом. Результаты наших наблюдений согласуются с данными других авторов, которые либо вообще не обнаружили астроцитарного слоя вокруг капилляров ГБ [17] в отличие от ПЗ, либо фиксировали наличие лишь единичных астроцитов по ходу капилляров ГБ, которые получили обозначение опухолевых [32, 33]. В таких единичных опухолевых астроцитах была обнаружена гиперэкспрессия аквапорина-4, что, по мнению авторов, служит признаком их повреждения [16]. Более выраженные нарушения компенсаторных механизмов повреждения проницаемости ГЭБ на уровне астроцитарного слоя в сосудах ГБ, приводящие к формированию перифокального отека, еще сильнее усугубляют гипоксию в зоне резидуальной ГБ. Отметим: эти нарушения способствуют также снижению эффективности цитотоксического воздействия на клетки резидуальной ГБ.

Заключение

Мы установили, что в капиллярах ГБ и ПЗ имеются повреждения как клеточных (эндотелиоцит, перицит, астроцит), так и неклеточных (БМ) морфологических элементов, участвующих в организации ГЭБ и формировании компенсаторных механизмов коррекции его нарушения. Однако существенным отличием, характеризующим эти повреждения, является их большая выраженность в капиллярах ГБ. Возникновение вышеназванных изменений может быть следствием как взаимодействия с опухолью посредством экзосом, так и прямого влияния глюкокортикоидов. Именно изменения, обнаруженные

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование

Работа проведена без привлечения дополнительного финансирования со стороны третьих лиц.



нами в капиллярах ГБ, приводящие к повышению проницаемости ГЭБ, формированию перитуморального отека и образованию зон гипоксии в резидуальной ГБ (в том числе за счет гибели капилляров), по нашему мнению, и обуславливают ее высокую

резистентность к адьювантной лучевой терапии. Полученные результаты могут быть востребованы при формировании новых направлений лекарственного обеспечения в процессе применения адьювантной лучевой терапии у пациентов с ГБ. ☺

Литература

1. Балканов АС, Савкова РФ, Дударова РГ, Петрушкина НН, Качков ИА, Ананьева ИИ. Некоторые показатели заболеваемости опухолями ЦНС жителей Московской области с 1998 по 2003 г. *Нейрохирургия*. 2007;(3): 83–6.
2. Jiang H, Cui Y, Wang J, Lin S. Impact of epidemiological characteristics of supratentorial gliomas in adults brought about by the 2016 world health organization classification of tumors of the central nervous system. *Oncotarget*. 2017;8(12):20354–61. doi: 10.18632/oncotarget.13555.
3. Kuhnt D, Becker A, Ganslandt O, Bauer M, Buchfelder M, Nimsky C. Correlation of the extent of tumor volume resection and patient survival in surgery of glioblastoma multiforme with high-field intraoperative MRI guidance. *Neuro Oncol*. 2011;13(12):1339–48. doi: 10.1093/neuonc/nor133.
4. Paw I, Carpenter RC, Watabe K, Debinski W, Lo HW. Mechanisms regulating glioma invasion. *Cancer Lett*. 2015;362(1):1–7. doi: 10.1016/j.canlet.2015.03.015.
5. Ruiz-Ontañón P, Orgaz JL, Aldaz B, Elosegui-Artola A, Martino J, Berciano MT, Montero JA, Grande L, Nogueira L, Diaz-Moralli S, Esparís-Ogando A, Vazquez-Barquero A, Lafarga M, Pandiella A, Cascante M, Segura V, Martínez-Climent JA, Sanz-Moreno V, Fernández-Luna JL. Cellular plasticity confers migratory and invasive advantages to a population of glioblastoma-initiating cells that infiltrate peritumoral tissue. *Stem Cells*. 2013;31(6): 1075–85. doi: 10.1002/stem.1349.
6. Lemée JM, Clavreul A, Menei P. Intratumoral heterogeneity in glioblastoma: don't forget the peritumoral brain zone. *Neuro Oncol*. 2015;17(10):1322–32. doi: 10.1093/neuonc/nov119.
7. McGee MC, Hamner JB, Williams RF, Rosati SF, Sims TL, Ng CY, Gaber MW, Calabrese C, Wu J, Nathwani AC, Dunsch C, Merchant TE, Davidoff AM. Improved intratumoral oxygenation through vascular normalization increases glioma sensitivity to ionizing radiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2010;76(5):1537–45. doi: 10.1016/j.ijrobp.2009.12.010.
8. Jain R, Poisson LM, Gutman D, Scarpace L, Hwang SN, Holder CA, Wintermark M, Rao A, Colen RR, Kirby J, Freymann J, Jaffe CC, Mikelsen T, Flanders A. Outcome prediction in patients with glioblastoma by using imaging, clinical, and genomic biomarkers: focus on the nonenhancing component of the tumor. *Radiology*. 2014;272(2):484–93. doi: 10.1148/radiol.14131691.
9. Coomber BL, Stewart PA, Hayakawa K, Farrell CL, Del Maestro RF. Quantitative morphology of human glioblastoma multiforme microvessels: structural basis of blood-brain barrier defect. *J Neurooncol*. 1987;5(4):299–307.
10. Roy S, Sarkar C. Ultrastructural study of micro-blood vessels in human brain tumors and peritumoral tissue. *J Neurooncol*. 1989;7(3): 283–92.
11. Vaz R, Borges N, Sarmento A, Azevedo I. Reversion of phenotype of endothelial cells in brain tissue around glioblastomas. *J Neurooncol*. 1996;27(2):127–32.
12. Baertling F, Kokozidou M, Pufe T, Clarner T, Windoffer R, Wruck CJ, Brandenburg LO, Beyer C, Kipp M. ADAM12 is expressed by astrocytes during experimental demyelination. *Brain Res*. 2010;1326:1–14. doi: 10.1016/j.brainres.2010.02.049.
13. Kodama T, Ikeda E, Okada A, Ohtsuka T, Shimoda M, Shiomi T, Yoshida K, Nakada M, Ohuchi E, Okada Y. ADAM12 is selectively overexpressed in human glioblastomas and is associated with glioblastoma cell proliferation and shedding of heparin-binding epidermal growth factor. *Am J Pathol*. 2004;165(5):1743–53. doi: 10.1016/S0002-9440(10)63429-3.
14. Черников ВП, Белоусова ТА, Кактурский ЛВ. Морфологические и биохимические критерии клеточной гибели. *Архив патологии*. 2010;72(3):48–54.
15. Korshunov A, Sycheva R, Golanov A. The prognostic relevance of molecular alterations in glioblastomas for patients age < 50 years. *Cancer*. 2005;104(4):825–32. doi: 10.1002/cncr.21221.
16. Lee J, Lund-Smith C, Borboa A, Gonzalez AM, Baird A, Eliceiri BP. Glioma-induced remodeling of the neurovascular unit. *Brain Res*. 2009;1288:125–34. doi: 10.1016/j.brainres.2009.06.095.
17. Rojiani AM, Dorovini-Zis K. Glomeruloid vascular structures in glioblastoma multiforme: an immunohistochemical and ultrastructural study. *J Neurosurg*. 1996;85(6):1078–84. doi: 10.3171/jns.1996.85.6.1078.
18. Bertossi M, Virgintino D, Maiorano E, Occhiogrosso M, Roncali L. Ultrastructural and morphometric investigation of human brain capillaries in normal and peritumoral tissues. *Ultrastruct Pathol*. 1997;21(1):41–9.
19. Amelio D, Amichetti M. Radiation therapy for the treatment of recurrent glioblastoma: an overview. *Cancers (Basel)*. 2012;4(1):257–80. doi: 10.3390/cancers4010257.
20. Ziegler U, Groscurth P. Morphological features of cell death. *News Physiol Sci*. 2004;19:124–8.
21. Molnár PP, O'Neill BP, Scheithauer BW, Groothuis DR. The blood-brain barrier in primary CNS lymphomas: ultrastructural evidence of endothelial cell death. *Neuro Oncol*. 1999;1(2): 89–100. doi: 10.1093/neuonc/1.2.89.
22. Taatjes DJ, Sobel BE, Budd RC. Morphological and cytochemical determination of cell death by apoptosis. *Histochem Cell Biol*. 2008;129(1): 33–43. doi: 10.1007/s00418-007-0356-9.
23. Li CC, Eaton SA, Young PE, Lee M, Shuttleworth R, Humphreys DT, Grau GE, Combes V, Bebawy M, Gong J, Brammah S, Buckland ME, Suter CM. Glioma microvesicles carry selectively packaged coding and non-coding RNAs which alter gene expression in recipient cells. *RNA Biol*. 2013;10(8):1333–44. doi: 10.4161/rna.25281.
24. Wesseling P, Schlingemann RO, Rietveld FJ, Link M, Burger PC, Ruiter DJ. Early and extensive contribution of pericytes/vascular smooth muscle cells to microvascular proliferation in glioblastoma multiforme: an immunolight and immunoelectron microscopic study. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1995;54(3):304–10.
25. Cheng L, Huang Z, Zhou W, Wu Q, Donnola S, Liu JK, Fang X, Sloan AE, Mao Y, Lathia JD, Min W, McLendon RE, Rich JN, Bao S. Glioblastoma stem cells generate vascular pericytes to support vessel function and tumor growth. *Cell*. 2013;153(1):139–52. doi: 10.1016/j.cell.2013.02.021.
26. Hayden MR, Yang Y, Habibi J, Bagree SV, Sowers JR. Pericytopathy: oxidative stress and impaired cellular longevity in the pancreas and skeletal muscle in metabolic syndrome and type 2 diabetes. *Oxid Med Cell Longev*. 2010;3(5):290–303. doi: 10.4161/oxim.3.5.13653.
27. Castejón OJ. Ultrastructural alterations of human cortical capillary basement membrane in human brain oedema. *Folia Neuropathol*. 2014;52(1):10–21. doi: 10.5114/fn.2014.41740.
28. Castejón OJ, Castejón HV, Zavala M, Sánchez ME, Díaz M. A light and electron microscopic study of oedematous human cerebral cortex in two patients with post-traumatic seizures. *Brain Inj*. 2002;16(4):331–46. doi: 10.1080/02699050110088209.



29. Liwnicz BH, Leach JL, Yeh HS, Privitera M. Pericyte degeneration and thickening of basement membranes of cerebral microvessels in complex partial seizures: electron microscopic study of surgically removed tissue. *Neurosurgery*. 1990;26(3):409–20.

30. Fan YH, Sun J, Yuan Y, Chen L, Pei Z, Xing SH, Liao B, Zeng JS. Hereditary endotheliopathy with retinopathy and encephalopathy: patho-

logical and genetic studies of a family. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(8):9105–11.

31. Балканов АС, Черников ВП, Белоусова ТА, Киселев АМ. Морфологические проявления нарушения проницаемости гематоэнцефалического барьера в диффузной глиоме головного мозга. *Клиническая и экспериментальная морфология*. 2014;1(9):8–12.

32. Nduom EK, Yang C, Merrill MJ, Zhuang Z, Lonser RR. Characterization of the blood-brain barrier of metastatic and primary malignant neoplasms. *J Neurosurg*. 2013;119(2):427–33. doi: 10.3171/2013.3.JNS122226.

33. Saadoun S, Papadopoulos MC, Davies DC, Krishna S, Bell BA. Aquaporin-4 expression is increased in oedematous human brain tumours. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2002;72(2):262–5. doi: 10.1136/jnnp.72.2.262.

References

1. Balkanov AS, Savkova RF, Dudarova RG, Petrushkina NN, Kachkov IA, Ananyva II. Some incidence rates concerning CNS neoplasms in Moscow and Moscow region from 1998 to 2003. *The Russian Journal of Neurosurgery*. 2007;3(3):83–6. Russian.
2. Jiang H, Cui Y, Wang J, Lin S. Impact of epidemiological characteristics of supratentorial gliomas in adults brought about by the 2016 world health organization classification of tumors of the central nervous system. *Oncotarget*. 2017;8(12):20354–61. doi: 10.18632/oncotarget.13555.
3. Kuhnt D, Becker A, Ganslandt O, Bauer M, Buchfelder M, Nimsky C. Correlation of the extent of tumor volume resection and patient survival in surgery of glioblastoma multiforme with high-field intraoperative MRI guidance. *Neuro Oncol*. 2011;13(12):1339–48. doi: 10.1093/neuonc/nor133.
4. Paw I, Carpenter RC, Watabe K, Debinski W, Lo HW. Mechanisms regulating glioma invasion. *Cancer Lett*. 2015;362(1):1–7. doi: 10.1016/j.canlet.2015.03.015.
5. Ruiz-Ontañón P, Orgaz JL, Aldaz B, Elosegui-Artola A, Martino J, Berciano MT, Montero JA, Grande L, Nogueira L, Diaz-Moralli S, Eparís-Ogando A, Vazquez-Barquero A, Lafarga M, Pandiella A, Cascante M, Segura V, Martínez-Climent JA, Sanz-Moreno V, Fernández-Luna JL. Cellular plasticity confers migratory and invasive advantages to a population of glioblastoma-initiating cells that infiltrate peritumoral tissue. *Stem Cells*. 2013;31(6):1075–85. doi: 10.1002/stem.1349.
6. Lemée JM, Clavreul A, Menei P. Intratumoral heterogeneity in glioblastoma: don't forget the peritumoral brain zone. *Neuro Oncol*. 2015;17(10):1322–32. doi: 10.1093/neuonc/nov119.
7. McGee MC, Hamner JB, Williams RF, Rosati SF, Sims TL, Ng CY, Gaber MW, Calabrese C, Wu J, Nathwani AC, Dunsch C, Merchant TE, Davidoff AM. Improved intratumoral oxygenation through vascular normalization increases glioma sensitivity to ionizing radiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2010;76(5):1537–45. doi: 10.1016/j.ijrobp.2009.12.010.
8. Jain R, Poisson LM, Gutman D, Scarpace L, Hwang SN, Holder CA, Wintermark M, Rao A, Colen RR, Kirby J, Freymann J, Jaffe CC, Mikkelsen T, Flanders A. Outcome prediction in patients with glioblastoma by using imaging, clinical, and genomic biomarkers: focus on the nonenhancing component of the tumor. *Radiology*. 2014;272(2):484–93. doi: 10.1148/radiol.14131691.
9. Coomber BL, Stewart PA, Hayakawa K, Farrell CL, Del Maestro RF. Quantitative morphology of human glioblastoma multiforme microvessels: structural basis of blood-brain barrier defect. *J Neurooncol*. 1987;5(4):299–307.
10. Roy S, Sarkar C. Ultrastructural study of micro-blood vessels in human brain tumors and peritumoral tissue. *J Neurooncol*. 1989;7(3):283–92.
11. Vaz R, Borges N, Sarmiento A, Azevedo I. Reversion of phenotype of endothelial cells in brain tissue around glioblastomas. *J Neurooncol*. 1996;27(2):127–32.
12. Baertling F, Kokozidou M, Pufe T, Clarner T, Windoffer R, Wruck CJ, Brandenburg LO, Beyer C, Kipp M. ADAM12 is expressed by astrocytes during experimental demyelination. *Brain Res*. 2010;1326:1–14. doi: 10.1016/j.brainres.2010.02.049.
13. Kodama T, Ikeda E, Okada A, Ohtsuka T, Shimoda M, Shiomi T, Yoshida K, Nakada M, Ohuchi E, Okada Y. ADAM12 is selectively overexpressed in human glioblastomas and is associated with glioblastoma cell proliferation and shedding of heparin-binding epidermal growth factor. *Am J Pathol*. 2004;165(5):1743–53. doi: 10.1016/S0002-9440(10)63429-3.
14. Chernikov VP, Belousova TA, Kakturskiy LV. Morphological and Biochemical Criteria of Cell Death. *Arkhiv Patologii*. 2010;72(3):48–54. Russian.
15. Korshunov A, Sycheva R, Golanov A. The prognostic relevance of molecular alterations in glioblastomas for patients age < 50 years. *Cancer*. 2005;104(4):825–32. doi: 10.1002/cncr.21221.
16. Lee J, Lund-Smith C, Borboa A, Gonzalez AM, Baird A, Eliceiri BP. Glioma-induced remodeling of the neurovascular unit. *Brain Res*. 2009;1288:125–34. doi: 10.1016/j.brainres.2009.06.095.
17. Rojiani AM, Dorovini-Zis K. Glomeruloid vascular structures in glioblastoma multiforme: an immunohistochemical and ultrastructural study. *J Neurosurg*. 1996;85(6):1078–84. doi: 10.3171/jns.1996.85.6.1078.
18. Bertossi M, Virgintino D, Maiorano E, Occhiogrosso M, Roncali L. Ultrastructural and morphometric investigation of human brain capillaries in normal and peritumoral tissues. *Ultrastruct Pathol*. 1997;21(1):41–9.
19. Amelio D, Amichetti M. Radiation therapy for the treatment of recurrent glioblastoma: an overview. *Cancers (Basel)*. 2012;4(1):257–80. doi: 10.3390/cancers4010257.
20. Ziegler U, Groscurth P. Morphological features of cell death. *News Physiol Sci*. 2004;19:124–8.
21. Molnár PP, O'Neill BP, Scheithauer BW, Groothuis DR. The blood-brain barrier in primary CNS lymphomas: ultrastructural evidence of endothelial cell death. *Neuro Oncol*. 1999;1(2):89–100. doi: 10.1093/neuonc/1.2.89.
22. Taatjes DJ, Sobel BE, Budd RC. Morphological and cytochemical determination of cell death by apoptosis. *Histochem Cell Biol*. 2008;129(1):33–43. doi: 10.1007/s00418-007-0356-9.
23. Li CC, Eaton SA, Young PE, Lee M, Shuttleworth R, Humphreys DT, Grau GE, Combes V, Bebawy M, Gong J, Brammah S, Buckland ME, Suter CM. Glioma microvesicles carry selectively packaged coding and non-coding RNAs which alter gene expression in recipient cells. *RNA Biol*. 2013;10(8):1333–44. doi: 10.4161/rna.25281.
24. Wesseling P, Schlingemann RO, Rietveld FJ, Link M, Burger PC, Ruiter DJ. Early and extensive contribution of pericytes/vascular smooth muscle cells to microvascular proliferation in glioblastoma multiforme: an immunohistochemical and immunoelectron microscopic study. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1995;54(3):304–10.
25. Cheng L, Huang Z, Zhou W, Wu Q, Donnola S, Liu JK, Fang X, Sloan AE, Mao Y, Lathia JD, Min W, McLendon RE, Rich JN, Bao S. Glioblastoma stem cells generate vascular pericytes to support vessel function and tumor growth. *Cell*. 2013;153(1):139–52. doi: 10.1016/j.cell.2013.02.021.
26. Hayden MR, Yang Y, Habibi J, Bagree SV, Sowers JR. Pericytopathy: oxidative stress



- and impaired cellular longevity in the pancreas and skeletal muscle in metabolic syndrome and type 2 diabetes. *Oxid Med Cell Longev*. 2010;3(5):290–303. doi: 10.4161/oxim.3.5.13653.
27. Castejón OJ. Ultrastructural alterations of human cortical capillary basement membrane in human brain oedema. *Folia Neuropathol*. 2014;52(1):10–21. doi: 10.5114/fn.2014.41740.
28. Castejón OJ, Castejón HV, Zavala M, Sánchez ME, Díaz M. A light and electron microscopic study of oedematous human cerebral cortex in two patients with post-traumatic seizures. *Brain Inj*. 2002;16(4):331–46. doi: 10.1080/02699050110088209.
29. Liwnicz BH, Leach JL, Yeh HS, Privitera M. Pericyte degeneration and thickening of basement membranes of cerebral microvessels in complex partial seizures: electron microscopic study of surgically removed tissue. *Neurosurgery*. 1990;26(3):409–20.
30. Fan YH, Sun J, Yuan Y, Chen L, Pei Z, Xing SH, Liao B, Zeng JS. Hereditary endotheliopathy with retinopathy and encephalopathy: pathological and genetic studies of a family. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(8):9105–11.
31. Balkanov AS, Chernikov VP, Belousova TA, Kiselev AM. Morphological signs of the disorders of the blood-brain barrier permeability in brain diffuse glioma. *The Journal of Clinical and Experimental Morphology*. 2014;1(9):8–12. Russian.
32. Nduom EK, Yang C, Merrill MJ, Zhuang Z, Lonser RR. Characterization of the blood-brain barrier of metastatic and primary malignant neoplasms. *J Neurosurg*. 2013;119(2):427–33. doi: 10.3171/2013.3.JNS122226.
33. Saadoun S, Papadopoulos MC, Davies DC, Krishna S, Bell BA. Aquaporin-4 expression is increased in oedematous human brain tumours. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2002;72(2):262–5. doi: 10.1136/jnnp.72.2.262.

The role of ultrastructural abnormalities of the blood-brain barrier in the development of brain glioblastoma radioresistance

A.S. Balkanov¹ • V.P. Chernikov² • A.V. Golanov³

Background: Glioblastoma (GB) is the most commonly diagnosed brain tumor. Its management involves adjuvant therapies, such as radiation. The cause of high probability of GB local relapse is its radioresistance related to hypoxia arising from abnormal blood-brain barrier permeability in GB vessels and in the peritumoral zone (PZ). **Aim:** To study pathophysiology of hypoxia in the residual GB based on the abnormalities of the morphological elements of the capillary walls building up the blood-brain barrier in GB and PZ capillaries. **Materials and methods:** Samples for morphological evaluation were taken during surgery for GB in 5 patients. The samples were prepared for transmission electron microscopy according to the standard technique with fixation in 2% glutaraldehyde in phosphate buffer, post-fixation with osmium tetroxide, embedding in the epon-araldite mixture, and contrast staining of ultrathin sections with uranylacetate and lead citrate. Abnormalities of the capillary cells (mitochondrial vacuolization and vacuolization of endoplasmic reticulum in endothelial cells, pericytes and astrocytes), as well as of the acellular element of the capillary wall, i.e. basement membrane, were assessed in two groups of capillaries – those of GB (n=38) and those of PZ (n=32). **Results:** Abnormalities characteristic for apoptosis and oncosis were found in the cells of the GB and PZ capillaries of the blood-brain barrier, such as endothelial cells and pericytes.

However, in the GB capillaries these abnormalities were significantly more frequent (p<0.001). Only half (52.6%) of the GB capillaries had an edematous pericapillary astrocyte layer. In all other capillaries, astrocyte sprouts either were visualized as separate morphological elements (13.2%) or were not visualized at all (34.2%). All PZ capillaries had the astrocyte layer, being edematous in 68.8% of the capillaries and totally edematous only in 25%. Thickened basement membrane was found in the vast majority (89.5%) of the GB capillaries and only in 25% of the PZ capillaries (p<0.001). **Conclusion:** Findings of abnormal cell elements in the GB capillaries leading to peritumoral edema and consequent hypoxia are highly likely to be the cause of the remnant GB radioresistance.

Key words: glioblastoma, capillary, peritumoral zone, electron microscopy, endothelial cell, pericyte, astrocyte, basement membrane, blood-brain barrier, re-irradiation

For citation: Balkanov AS, Chernikov VP, Golanov AV. The role of ultrastructural abnormalities of the blood-brain barrier in the development of brain glioblastoma radioresistance. *Almanac of Clinical Medicine*. 2018;46(7):682–9. doi: 10.18786/2072-0505-2018-46-7-682-689.

Received 16 February 2018; accepted 20 August 2018

Andrey S. Balkanov – MD, PhD, Head of Department of Radiology¹
✉ 61/2 Shchepkina ul., Moscow, 129110, Russian Federation. Tel.: +7 (495) 681 19 07.
E-mail: andreybalkanov@yandex.ru

Valeriy P. Chernikov – MD, PhD, Head of Laboratory of Cell Pathology²

Andrey V. Golanov – Member-Correspondent of Russian Academy of Sciences, MD, PhD, Professor, Head of Department of Radiology and Radiosurgery³

¹ Moscow Regional Research and Clinical Institute (MONIKI); 61/2 Shchepkina ul., Moscow, 129110, Russian Federation

² Research Institute of Human Morphology; 3 Tsyurupy ul., Moscow, 117418, Russian Federation

³ N.N. Burdenko Neurosurgery Research Institute; 16 4-ya Tverskaya-Yamskaya ul., Moscow, 125047, Russian Federation

Conflict of interests

The authors declare that they have no conflicts of interest.