

МИНОБРНАУКИ РОССИИ

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования

**«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»**

Кафедра физиологии человека и животных

**ИЗУЧЕНИЕ ЛИМФАТИЧЕСКИХ МЕХАНИЗМОВ
ПРОГРЕССИРОВАНИЯ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ**

АВТОРЕФЕРАТ

Студентки 4 курса 421 группы

Направления подготовки бакалавриата 06.03.01 Биология

Биологического факультета

Лаубертс Эльзы Артемовны

Научный руководитель

канд. биол. наук, доцент кафедры

физиологии человека и животных



Т. Д. Искра

Зав. кафедрой

д-р. биол. наук, доцент кафедры

физиологии человека и животных



О. В. Семячкина-Глушковская

Саратов 2019

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время понимание устройства и принципов работы головного мозга человека является одной из центральных проблем мировой науки. Мозг — крайне сложный и малоизученный отдел центральной нервной системы. Кроме собственно нервной ткани, в мозге присутствует эпителиальная ткань, сосуды, разные железы, — все эти образования подвержены патологическим процессам и именно они чаще всего являются причиной онкологии. К их числу относят глиальную опухоль. Опухоли этого типа образуются, из глиальных (нейроэпителиальных) клеток оболочек головного мозга. Глиома берет свое начало из дефектных глиоцитов, в которых генетические аномалии приводят к нарушению роста и функционирования.

Было доказано, что лимфатические сосуды способствуют метастазированию путем предоставления транспорта для распространения опухолевых клеток, но только в рамках соматических систем, так как существование менингеальной лимфатики стало известно только недавно и в связи с этим открытием появились новые пути изучения неизвестных механизмов менингеальной лимфатики в образовании нейроэпителиальной опухоли.

Выше изложенное, определило цель и задачи нашего исследования.

Целью исследования стало изучение эффектов менингеальной лимфатики при прогрессировании злокачественных опухолей головного мозга у крыс на примере флуоресцентной глиомы.

Задачи:

- Разработать модели нейроэпителиальной опухоли (флуоресцентная глиома) на лабораторных крысах.
- Определить влияние глиомы на лимфатическую систему с помощью оптической когерентной томографии и золотых наностержней.
- Выявить пути метастазирования глиомы, применяя метод флуоресцентной микроскопии и маркер Live-1.

Основная часть

Лимфатическая система является уникальным защитным механизмом в организме человека. Лимфоидная ткань рассредоточена по всему телу, находится в каждом органе и в каждой анатомической области в виде узловых скоплений – лимфатических узлов.

Лимфатическая система состоит из лимфатических сосудов и лимфатических узлов. Лимфатические сосуды начинаются тончайшими капиллярами, чрезвычайно тонкие сосуды, стенки которых состоят лишь из одного слоя клеток. Они напоминают кровеносные капилляры, но закрыты с одного конца. В эти капилляры проникает лимфа бесцветная жидкость, происходящая от крови и похожа на нее, только содержит гораздо меньше белка, и лишена эритроцитов. На другом конце капилляры сообщаются с лимфатическими венами, миллионы которых расположены повсеместно. Форма сосудов преимущественно цилиндрическая с чередованием многочисленных, сменяющих друг друга расширений и сужений, из-за клапанов, которые препятствуют обратному току лимфы. Эти вены, сливаясь, образуют последовательно все более крупные вены, самая крупная из которых впадает в левую плечевую вену кровеносной системы.

В местах слияния лимфатических сосудов образуются биологические фильтры – лимфатические сосуды, в которых образуются лимфоциты, а также отфильтровываются частицы пыли и бактерии, с тем, чтобы предотвратить их попадание в кровяное русло. Протоки, по которым лимфа проходит через эти узлы, настолько узки и извилисты, что она течет очень медленно и проникающие с нею бактерии могут быть задержаны и фагоцитированы лейкоцитами. Некоторые бактерии иногда проходят через первый лимфатический узел и задерживаются во втором или в третьем, то есть они замедляют распространение инфекции, дают организму время для накопления лейкоцитов и мобилизации их на борьбу с нею.

Лимфатическая система является уникальной и естественной защитной системой организма человека, прикрывающая щитом своих тканей каждый

участок нашего тела. Этот барьерный механизм играет не маловажную роль в предотвращении возникновения раковых опухолей и заслуживает тщательного изучения для правильной постановки диагноза онкологических заболеваний.

Несмотря на защитную роль, которую выполняет лимфатическая система при определённых условиях, она может способствовать распространению болезненного процесса. Через лимфатическую систему оторвавшиеся от основной опухоли клетки распространяются в другие места по лимфатическим сосудам, могут распространяться клетки злокачественной опухоли – метастазы. Когда лимфатическая система становится перегруженной, ее фильтрационная и нейтрализующая функции резко снижаются, повышение уровня токсинов создает повышенный риск воспаления, снижается иммунитет, а в дальнейшем возможно развитие рака (лимфомы).

Среди поверхностных лимфоузлов основное значение имеют следующие группы: шейные; подмышечные; паховые.

К глубоким лимфоузлам относят: внутригрудные узлы; узлы брюшной полости; узлы полости таза; забрюшинные узлы.

Крупные коллекторы лимфы, где всегда обнаруживаются метастазы при распространении рака, называют регионарными, то есть расположенными вблизи пораженного раком органа.

В экспериментах на мышях впервые показано, что лимфатические сосуды присутствуют не только в оболочках мозга, но и в его тканях. Эти научные данные говорят о новом понимании процессов дренажной и очистительной функций мозга через лимфатическую систему. Выявлено, что открытие гематоэнцефалического барьера является пусковым сигналом для активации менингеального дренажа, с помощью которого осуществляется очищение тканей мозга от соединений, проходящие через открытый гематоэнцефалического барьер. Установлена функциональная взаимосвязь между повреждением гематоэнцефалического барьера и изменениями в

диаметре менингеальных сосудов. Таким образом, впервые в мире установлена функциональная взаимосвязь между открытием гематоэнцефалического барьера и активацией менингеальной лимфатики, что является новой фундаментальной научной концепцией в нейрофизиологии.

Метастазирование — это высшее выражение автономности опухоли, главный отличительный признак злокачественного процесса. Способность к метастазированию позволяет опухолевым клеткам покидать первичную опухоль и колонизировать новые территории. Важным и необходимым условием метастазирования является способность опухоли формировать собственную сосудистую сеть.

Приблизительно 30% впервые выявленных злокачественных опухолей уже имеют метастазы. Вновь сформированные метастазы появляются как симбиоз опухолевых и поддерживающих клеток из нормальных тканей.

В целом метастазирование осуществляется 3 путями: гематогенным, лимфогенным и смешанным.

Лимфогенный путь предполагает метастазирование опухолевых клеток через лимфоток по лимфоузлам и далее в близлежащие ткани. Такой путь распространения метастаз характерен для внутренних опухолей характеризуется движением атипичных клеток вместе с лимфой по лимфатическим сосудам. Каждое образование имеет свой тип и путь метастазирования.

Метастазы злокачественной опухоли считаются самым опасным осложнением рака. Они намного опаснее, чем само первичное новообразование.

В целом, для злокачественных новообразований характерна последовательность распространения злокачественных клеток — вначале лимфогенного, затем гематогенного.

Развитие онкологии невозможно без постановки экспериментов, проведение которых на человеке недопустимо. Этим занимается экспериментальная онкология, используя многочисленные модели, каждая из

которых в определенной степени адекватна опухолям человека. Учитывая особенности моделей, полученные на них данные можно переносить в клинику, где они подвергаются корректировке или отвергаются вообще. В связи с этим выбор для исследования подходящей модели имеет исключительно важное значение.

Как правило, опухолевые клетки прививают в подкожную клетчатку или мышечную ткань животного. Тем не менее, наиболее широко распространенным методом трансплантации опухолей является инъекция опухолевых клеток в брюшную полость животных с последующим получением так называемых асцитных опухолей, т. е. опухолей, растущих в брюшной полости животных в виде суспензии размножающихся клеток в накапливающейся перитонеальной жидкости.

Метастазирование – это наиболее разрушительный аспект опухолевого процесса и основная причина неэффективности лечения. В настоящее время используют две различных модели метастазирования. Одна из них называется *экспериментальной*, или искусственной. Для создания такой модели опухолевые клетки вводят внутривенно или через левый желудочек. Инъецированные такими способами клетки, проникая в капиллярное русло, создают сайты экспериментальных метастаз. Такие метастазы образуются из первичных солидных опухолей, которые получены путем подкожной инъекции опухолевых клеток. Вследствие быстрого роста первичной опухоли зачастую происходит ее резекция, что позволяет расти метастазам.

Изобретения глиомных клеточных линий относятся к биотехнологии, в частности к генетической инженерии и может быть использована для получения генетически трансформированных клеток млекопитающих в культуре, для научных исследований *in vivo* и *in vitro*.

Наиболее известные флуоресцирующие клеточные линии:

1. Флуоресцирующая клеточная линия лейкоцитов человека myelodysplasticsyndrome.

2. Флуоресцирующие клеточные линии глиобластомы, экспрессирующие красные флуоресцентные белки mKate2 и mCherry.
3. Флуоресцирующая клеточная линия глиомы человека SU3-RFP, экспрессирующая красный флуоресцентный белок.
4. Флуоресцирующая клеточная линия метастатической гепатомы с белком Green Fluorescent Protein.

Материалы и методы исследования

Исследования *in vivo* были проведены на 32 половозрелых самках беспородных крыс. Животные содержались в стандартных лабораторных условиях с доступом к пище и воде. Эксперименты выполняли в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к приказу Министерства высшего и среднего образования СССР от 13.11.1984г. №742). Протокол эксперимента был одобрен комитетом по уходу и использованию лабораторных животных в Саратовском государственном университете (протокол Н-147, 07.02.2018).

Группы животных

Экспериментальные животные были разделены на три группы:

1. Контрольная группа (n=12) ложнооперированные животные, доведенные до стадии трепанации.
2. Крысы, которым вводили глиомную линию С6 (n=10) и через 14 суток проводили изучение состояния менингеальных сосудов, с помощью оптической когерентной томографии и золотых наночастиц.
3. Крысы, которым вводили глиомную линию С6 (n=10) и через 14 суток проводили визуализацию лимфатических сосудов и глиобластомы с помощью флуоресцентной микроскопии и маркера лимфатической системы Live-1.

Для расширения технологических возможностей изучения динамики развития опухоли мозга этого была использована новая флуоресцирующая

клеточная линия C6-TagRFP-TurboFP635 путём введения генов, кодирующих экспрессию красных флуоресцирующих белков TagRFP и TurboFP635 и используемая для исследования глиомы мозга *in vitro* и *in vivo* (Paneco, Россия).

Моделирование глиобластомы *in vivo* выполняли с помощью внутримозговой стереотаксической имплантации флуоресцентных клеток C6.

- Перед операцией крысе вводили седуксен (50 мкг/мл).
- Наркотизирование внутрибрюшинным введением Золетила (100 мкг/кг) + Рометар в соотношении 1:4 из расчета 10 мг/кг.
- Обездвиживание на стереотаксической столике фиксацией головы по методике.
- Кожа в месте планируемой операции выбрита на теменной части головы и обработана спиртом.
- Производили разрез в области планируемого введения по выбранным координатам размером длиной 2 мм.
- Формирование трепанационного отверстия, используя микродрель (Harvard Bioscience Company, США)
- Подготовленные клетки глиомы (5×10^5 клеток на крысу) с помощью стереотаксического аппарата Narishige (США) по следующим координатам Ap -1; L 3,0; V 4,5, TBS -2,4 мм. вводили с помощью гамильтоновского микрошприца, соединенного с инфузوماتом со скоростью 3 мкл/мин в объёме 1015кл/мл. в область каудопутамена.
- После введения клеток мышечные волокна и кожа сшивается, обрабатывали 2% раствором бриллиантового зеленого. Животное помещали в чистую клетку. Длительность имплантации не превышала 10-15 минут.
- Животное самостоятельно просыпалось через 30 минут после наркотизации. Болевых или иных неприятных проявлений при этом не отмечалось. Для верификации опухоли и мониторинга динамики неопластического процесса проводили магнитно-резонансную томографию головного мозга (МРТ).

МРТ головного мозга проводили еженедельно, под общей анестезией начиная с 7 суток после моделирования глиобластомы на томографе Brivo MR 355 1.5T в T2 режиме (GE Healthcare, Великобритания).

Для окраски лимфатических сосудов вводили маркер Live-1 – 5 мкл в течении 5 минут в цистерну magna. Флуоресцентный фрагмент переходит в возбужденное состояние в зелёном спектре.

Введение маркера проходит под общей анестезией у крыс с глиомой и контрольной группе. Расположение головы с помощью стереотаксического аппарата устанавливается под углом около 135 градусов. Выбривается и обрабатывается кожа в области теменной и затылочной части головы. Проводится саггитальный разрез кожи ниже затылка, мышцы разделяются с помощью пинцета. Становится видна твердая мозговая оболочка цистерны, которая похожа на прозрачный перевернутый треугольник, в который вводится Live-1 с помощью гамильтоновского микрошприца.

Как маркер для визуализации лимфатической системы использовались *золотые наностержни*. Их (17 мкл) вводили в паренхиму мозга (2 мм латеральнее и 2,5 мм каудальнее от брегмы) под общей анестезией. Введение осуществляли на глубину 2 мм с помощью иглы 34-G Hamilton со скоростью 0,1 мкл/ мин (Harvard Apparatus, США).

Были проведены исследования для визуализации и динамики глубоких шейных узлов у крыс с глиомой и без нее на коммерческом спектральном томографе фирмы Thorlabs, ОКТ проводилась под общей анестезией. Глубокие шейные узлы находятся глубоко в тканях поэтому проводится операция, чтобы их вытащить. Кожа в области шеи выбривается и обрабатывается спиртом, затем иссекается часть кожи, достаются глубокие шейные лимфоузлы, не повреждая при этом связывающий лимфатический сосуд и фиксируются на поверхности с помощью шелковых нитей.

Флуоресцентный микроскоп использовался для и визуализации лимфатических сосудов у крыс после инъекции красителя под общей анестезией. Самодельная установка состоит из объектива микроскопа с

увеличением 5,5 и числовой апертурой 0,12 и камеры CMOS (DCC1545M, Thorlabs Inc, США).

На первом этапе исследований нашей задачей было разработать модель глиомы у крыс *in vivo* и подтвердить, что она действующая. Для подтверждения развития у групп крыс с глиомой на 14 день после введения культуры глиальной линии, был использован метод магнитно-резонансной томографии. У крыс были показаны новообразования в месте введения глиальных клеток. Таким образом, мы можем сделать вывод, что наша модель действующая.

Следующей задачей исследования являлось выявление процессов, происходящих в лимфатической системе при развитой глиоме. Для визуализации лимфатики использовался метод ОКТ. Для данного эксперимента было взято 10 крыс с глиомой и 6 крыс из контрольной группы. Проведение ОКТ визуализации на 14 день после начала эксперимента показала, что у контрольных крыс менингеальные сосуды практически не видны, тогда как у крыс с глиомой они представлены в виде небольших полостей, следовательно при данной патологии происходит увеличение диаметров лимфатических сосудов в мозге.

Для изучения скорости лимфотока глиомным крысам ($n=10$), вводили золотые наностержни 10 нм в паренхиму мозга и наблюдали изменение интенсивности сигнала ОКТ в полости глубокого шейного узла, при накоплении в нем наночастиц. Через час ОКТ визуализации отмечено изменение интенсивности сигнала в исследуемой области, которое свидетельствует об накоплении наночастиц в полости узла.

Была получена динамика накопления золотых наностержней в полости глубокого лимфатического узла по средней интенсивности. В контрольной группе отмечено постепенное нарастание уровней сигнала в течении 60 минут ОКТ записи. В глубоких шейных узлах крыс с глиомой мы установили, что выведение наночастиц с лимфотоком протекало более интенсивно.

Следующее исследование было выполнено с помощью флуоресцентной микроскопии *in vivo*. Для визуализации лимфатической системы мы использовали специфический маркер Live-1. Данный маркер при флуоресцентной микроскопии визуализирует лимфатические сосуды в зеленом цвете. Глиома визуализируется в красном спектре.

При проведении флуоресцентной микроскопии у 3 из 10 крыс были обнаружены метастазы. по лимфатическим сосудам, следовательно, распространение клеток данной опухоли происходит по лимфатическому пути.

Лимфатический путь миграции опухолевых клеток является наиболее оптимальным для распространения, так как скорость лимфотока, которая увеличивается при развитии глиомы, остается гораздо ниже, чем скорость кровотока и у раковых клеток больше возможности для вживления в здоровую ткань.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По итогам исследования, была разработана модель на клеточной линии злокачественной глиомы для экспериментальной медицины, обеспечивающую развитие новых подходов к ранней диагностике опухоли мозга, а также создание эффективных методов лечения глиомы.

Получены новые результаты по динамике роста злокачественной формы флуоресцентной глиомы *in vivo*.

С помощью специально разработанных технологических решений с применением оптической когерентной томографии, флуоресцентной микроскопии и маркеров (золотые наностержни и Live-1) обнаружено увеличение скорости лимфотока при развитии патологии, а так же установлено, что миграция злокачественных клеток осуществляется по лимфатическим сосудам мозга.

Выводы

1. Разработана модель глиомы у крыс, подтвержденная магнитной резонансной томографии.

2. Выявлено, что менингеальная лимфатика активируется при развитии глиомы, что доказывает повышение скорости выведения золотых наночастиц у крыс с глиомой по сравнению с крысами контрольной группы.

3. Установлено, что менингеальная лимфатика участвует в метастазировании злокачественных клеток.

