doi: 10.17116/patol20177913-11

Ультраструктурная идентификация щелевых контактов в глиальных опухолях головного мозга человека

Е.Ю. КИРИЧЕНКО[1], А.Ф. САВЧЕНКО[2], Д.В. КОЗАЧЕНКО[2], А.Э. МАЦИОНИС[3], А.К. ЛОГВИНОВ[1]

[1]Академия биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского, Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону, Россия; [2]нейрохирургическое отделение МБУЗ «Городская больница скорой медицинской помощи», Ростов-на-Дону, Россия; [3]отдел экспериментальной патоморфологии и электронной микроскопии Ростовского областного патологоанатомического бюро, Ростов-на-Дону, Россия

Цель. Электронно-микроскопическое исследование межклеточной сообщаемости в образцах гемистоцитарной астроцитомы, олигодендроглиомы и глиобластомы. **Материал и методы.** Фрагменты ткани опухоли, резецированные оперативным путем, фиксировали в 2,5% растворе глутаральдегида, постфиксировали в 1% растворе OsO_4, обезвоживали и заливали в эпоксидную смолу. Ультратонкие срезы просматривали под электронным микроскопом Jem 1011 («Jeol», Япония). **Результаты.** В образцах астроцитом идентифицировали одиночные и близкорасположенные щелевые контакты (ЩК), сформированные тонкими отростками, имеющими ультраструктуру астроглиальных. При этом отмечено полное отсутствие химических синапсов в гемистоцитарной астроцитоме и глиобластоме. Выявленные ЩК имели небольшую длину и деформированные нексусы. В образцах олигодендроглиомы вокруг химических синапсов наблюдались сохранные астроглиальные отростки, однако межглиальные ЩК обнаружены не были. **Заключение.** Проведенное исследование показало присутствие межклеточных ЩК с некоторыми ультраструктурными отличиями в образцах опухолей астроглиального происхождения разной степени градации. По современным данным, ЩК в астроцитомах способны создавать устойчивую самоподдерживающуюся сеть, способствующую прогрессированию опухоли и обеспечивающую сопротивление терапевтическому воздействию. В то же время заметная редукция количества ЩК, наиболее выраженная в образце олигодендроглиомы, может способствовать ускорению миграции опухолевых клеток в окружающую паренхиму. Безусловно, изучение ЩК должно быть продолжено на большей по численности группе глиальных опухолей для подтверждения выявленных в настоящей работе особенностей межклеточной коммуникации.

Ключевые слова: щелевые контакты, глиомы, ультраструктура.

Ultrastructural characteristics of gap junctions in human glial brain tumors

E.YU. KIRICHENKO[1], A.F. SAVCHENKO[2], D.V. KOZACHENKO[2], A.E. MATSIONIS[3], A.K. LOGVINOV[1]

[1]D.I. Ivanovsky Academy of Biology and Biotechnology, Southern Federal University, Rostov-on-Don, Russia; [2]Department of Neurosurgery, City Emergency Medical Care Hospital, Rostov-on-Don, Russia; [3]Department of Experimental Pathomorphology and Electron Microscopy, Rostov Regional Postmortem Bureau, Rostov-on-Don, Russia

Objective: to conduct an electron microscopic study of intercellular communication in the samples of gemistocytic astrocytoma, oligodendroglioma, and glioblastoma. **Material and methods.** Surgically resected tumor tissue fragments were fixed in 2.5% glutaraldehyde solution, afterfixed in 1% OsO4 solution, dehydrated, and embedded in epoxy resin. Ultrathin sections were examined using a Jem 1011 electron microscope (Jeol, Japan). **Results.** Solitary and closely spaced gap junctions (GJs) formed by the thin processes that have the ultrastructure of an astroglial processes were identified in the astrocytoma samples. In this case, chemical synapses were noted to be completely absent in gemistocytic astrocytoma and glioblastoma. The identified GJs had a small length and deformed nexuses. The oligodendroglioma samples exhibited intact astroglial processes around the chemical synapses; however, interglial GJs were not found. **Conclusion.** The investigation showed the presence of intercellular GJs with some ultrastructural differences in the samples of low- and high-grade astroglial tumors. According to current data, astrocytomic GJs are able to create a stable self-sustaining network that promotes tumor progression and provides resistance to a therapeutic intervention. At the same time, the noticeable reduction in the number of GJs, which is most pronounced in the oligodendroglioma sample, can accelerate tumor cell migration into the surrounding parenchyma. The investigation of GJs should be, of course, continued using a group of a larger number of glial tumors to confirm the intercellular communication features revealed in this study.

Keywords: gap junctions, gliomas, ultrastructure.

По данным классификации Всемирной организации здравоохранения, глиальные опухоли мозга человека являются самыми распространенными опухолями центральной нервной системы (ЦНС) зрелого и детского возраста [1]. Среди них гемистоцитарная астроцитома относится к гистологическому варианту диффузных астроцитом и составляет 10—15% всех астроцитом мозга. Олигодендроглиома составляет 5% всех первичных опухолей головного мозга и относится к глиомам с низким потенциалом злокачественности. Глиобластома является наиболее агрессивной глиомой, составляя около 50% всех астроцитом мозга. При этом различают первичную (чаще) и вторичную глиобластому (как результат малигнизации диффузной или анапластической астроцитомы).

По современным данным, патогенез глиальных опухолей ЦНС может быть связан с нарушением межклеточных взаимодействий посредством щелевых контактов (ЩК, нексусов) [2, 3]. При этом ЩК занимают особое место среди различных типов межклеточных соединений

© Коллектив авторов, 2017

Кириченко Евгения Юрьевна — канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. функциональной геномики и морфологии; e-mail: kiriche.evgeniya@yandex.ru

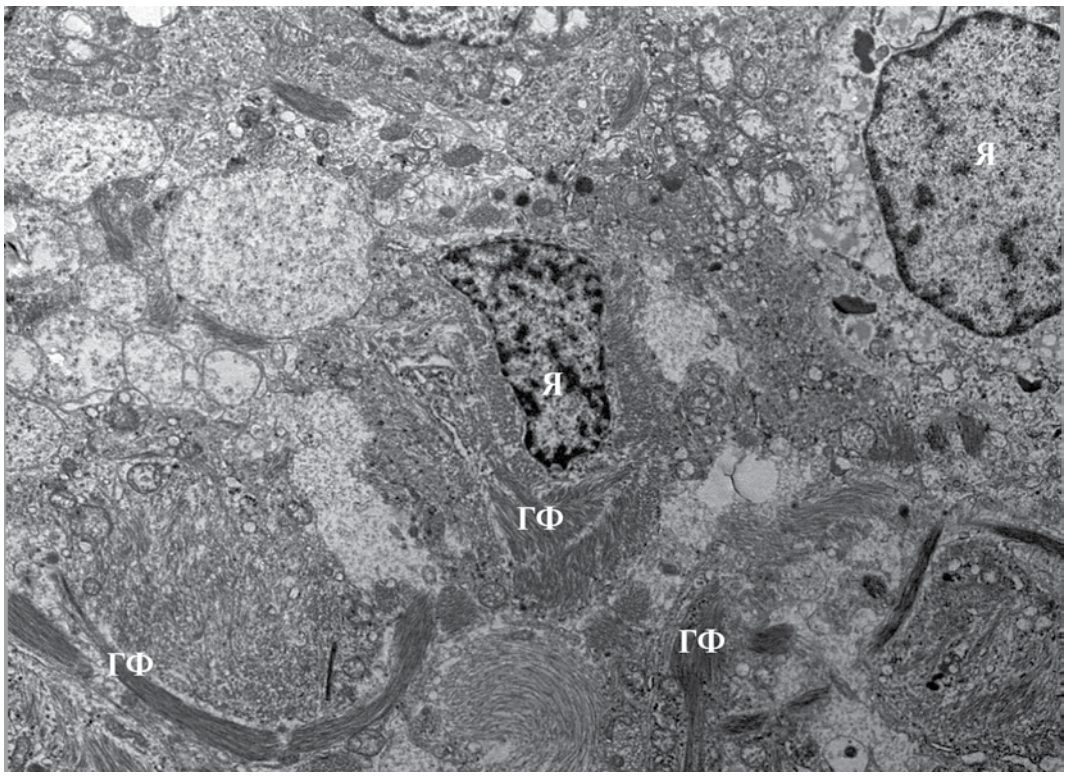


Рис. 1. **Ультраструктура гемистоцитарной астроцитомы.**

В поле зрения несколько трансформированных опухолевых клеток с повышенным содержанием глиофибрилл. Я — ядро; ГФ — глиофибриллы. ×10 000.

и являются ключевым структурно-функциональным фактором поддержания метаболического гомеостаза в органах и тканях [4, 5]. Они представляют собой гексаметрические мембранные поры, сформированные белками-коннексинами, которые напрямую соединяют цитоплазмы соседних клеток [6]. Таким образом, ЩК обеспечивают оптимальный путь прямого обмена биологически активными молекулами между цитоплазмами соседних клеток, в том числе сигнальными молекулами, влияющими на клеточную пролиферацию, дифференцировку и клеточную гибель [7].

Несмотря на возрастающий интерес к изучению ЩК и противоречивые данные об их сохранности при развитии глиальных опухолей мозга человека [8, 9], ультраструктурная идентификация нексусов при больших увеличениях в глиомах различной степени малигнизации ранее никем не проводилась.

Цель работы — электронно-микроскопическое исследование межклеточной сообщаемости в образцах гемистоцитарной астроцитомы (Grade II), олигодендроглиомы (Grade II) и глиобластомы (Grade IV).

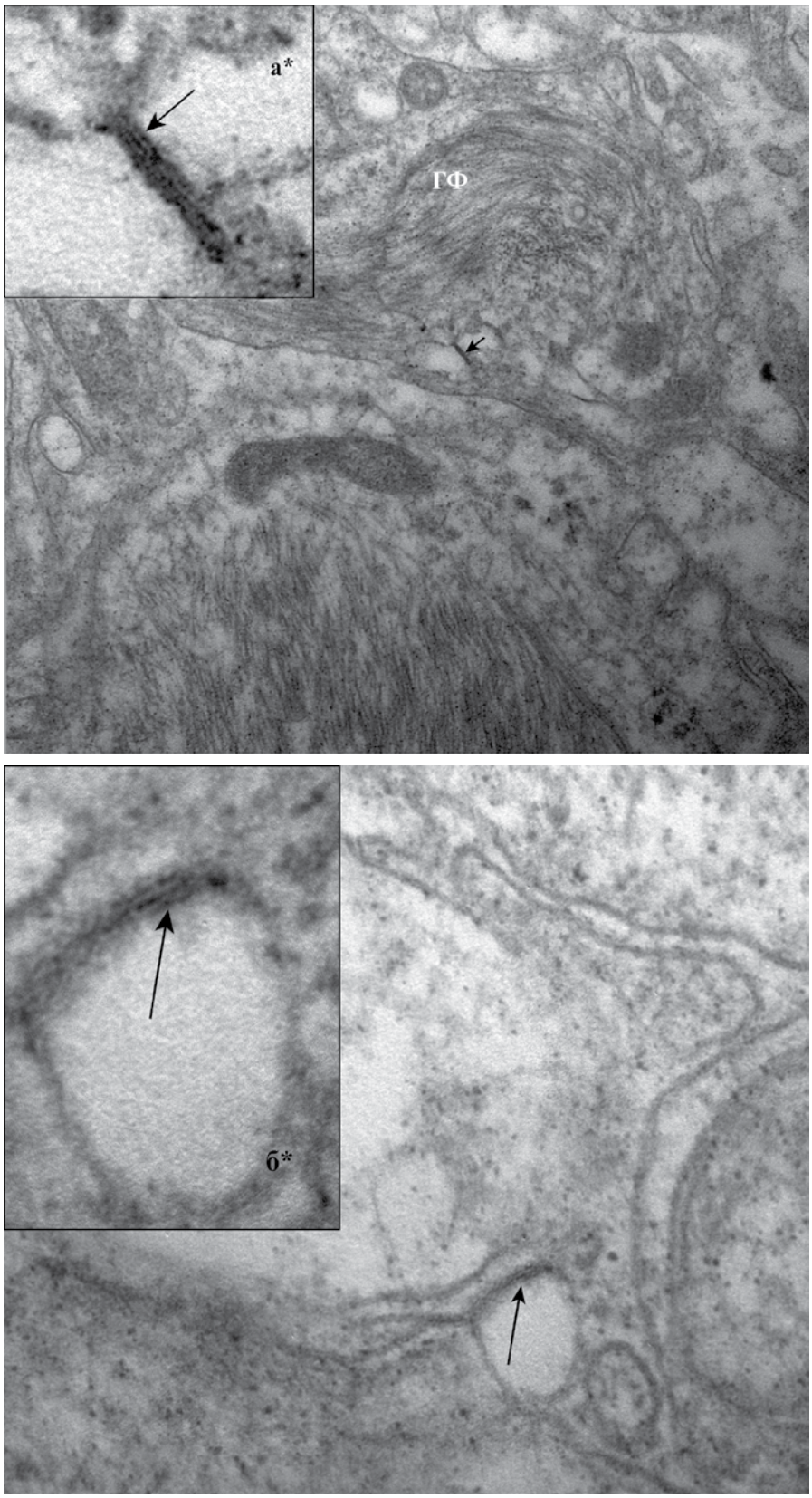
Материал и методы

Материалом для исследований служили фрагменты глиальных опухолей головного мозга человека, локализованных преимущественно в лобных долях, резецированные оперативным путем. Опухоли различались по степени злокачественности и включали гемистоцитарные астроцитомы (Grade II, n=2), олигодендроглиомы (Grade II, n=2), глиобластомы (Grade IV, n=3). Исследование одобрено этическим комитетом МБУЗ «Городская больница скорой медицинской помощи» Ростова-на-Дону.

Фрагменты ткани опухоли, резецированные оперативным путем, фиксировали в 2,5% растворе глутаральдегида («Aurion», США) на фосфатном буфере. После 24-часовой фиксации ткань постфиксировали в течение 1,5 ч в 1% растворе OsO_4, обезвоживали в спиртах восходящей концентрации и заливали в смолу EPON-812. Ультратонкие срезы толщиной 50 нм получали с помощью ультрамикротома (Ultracut-E, «Leica», Германия) и алмазного ножа ultra 45° («Diatome», Швейцария), контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца и просматривали под электронным микроскопом Jem 1011 («Jeol», Япония). Морфометрический анализ проводили с помощью лицензионной программы Digital Micrograph («Gatan», США).

Результаты

При увеличении 10 000 гемистоцитарная астроцитома представлена фибриллярными опухолевыми астроцитами с объемной угловатой цитоплазмой гемистоцитами. Гемистоциты расположены рыхло и разделены широкими межклеточными пространствами, однако в некоторых участках плотно прилегают друг к другу. Клетки содержат атипичные ядра с маргинированным хроматином и массивные пучки глиофибрилл в цитоплазме, которые при диагностической иммуногистохимии дают положительное окрашивание на GFAP **(рис. 1)**. Некоторые ветвящиеся клеточные отростки также заполнены глиофибриллами. При последовательном просмотре полей зрения для поиска специализированных межклеточных соединений



а

б

Рис. 2. **Щелевые контакты гемистоцитарной астроцитомы Grade II.**

а — щелевой контакт (стрелка) между отростками астроцитов, расположенный в нейропиле опухоли, среди участков опухоли, заполненных глиофибриллами (а* — увеличенный фрагмент рис. 2, а, демонстрирующий типичную ультраструктуру щелевого контакта — стрелка); б — щелевой контакт между тонкими отростками, не заполненными глиофибриллами (б* — увеличенный участок рис. 2, б). ГФ — глиофибриллы; а — ×80 000, а* — ×200 000; б — ×200 000, б* — ×250 000.

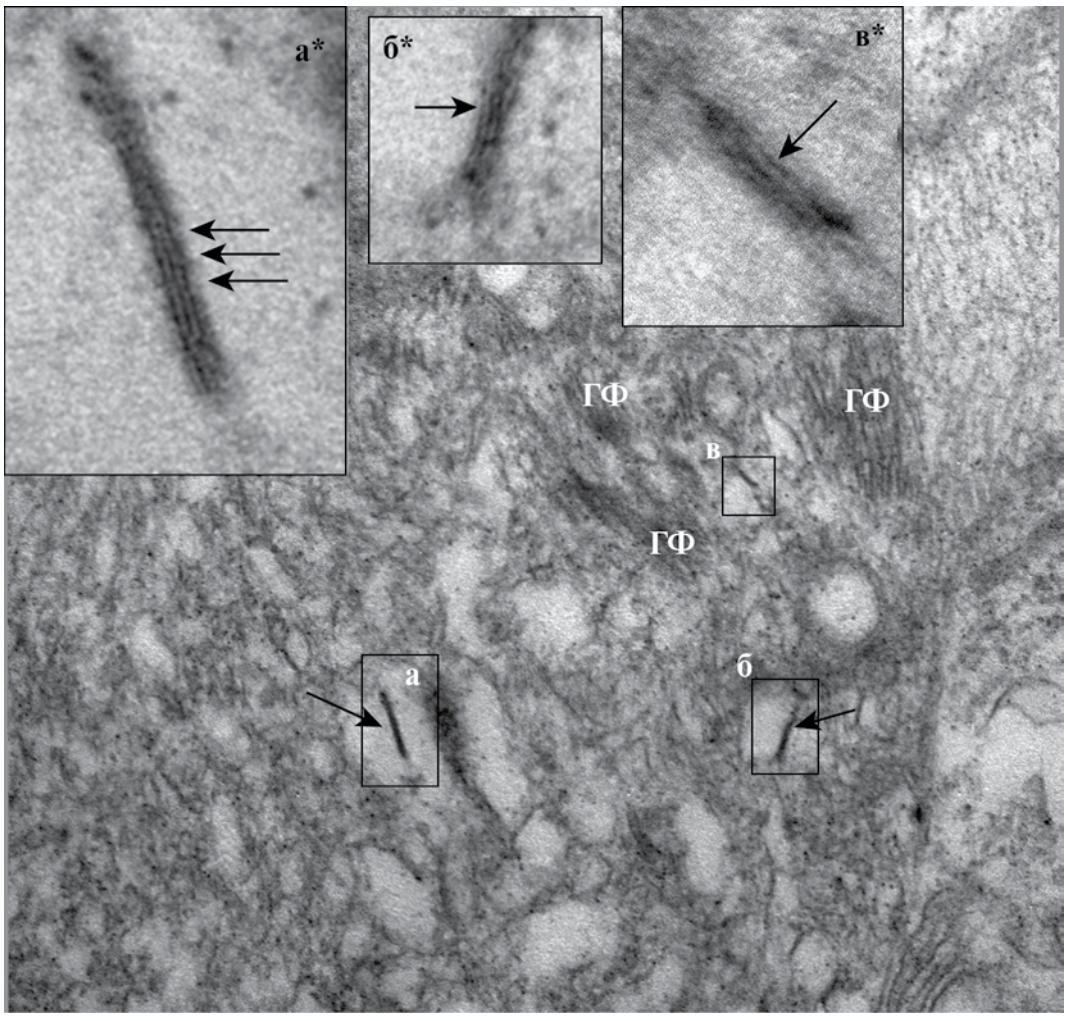


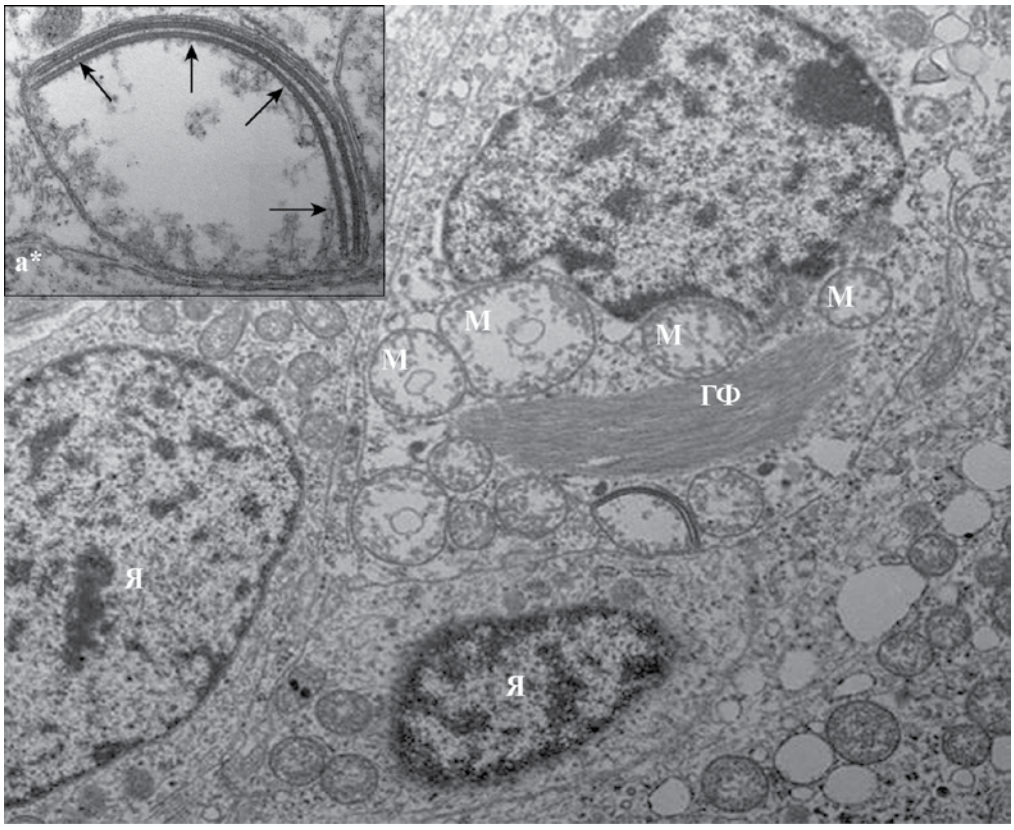
Рис. 3. **Три щелевых контакта в нейропиле гемистоцитарной астроцитомы Grade II.**

Нексусы контактов расположены в плоскости среза в одном поле зрения. ГФ — глиофибриллы, стрелками обозначены щелевые контакты, ×100 000. а* — увеличенный участок фрагмента а; б* —фрагмента б; в* — фрагмента в. Стрелки внутри увеличенных фрагментов указывают на места попадания нексуса в плоскость среза при повороте гониометра на ±15°. а* — ×250 000; б*, в* — ×300 000.

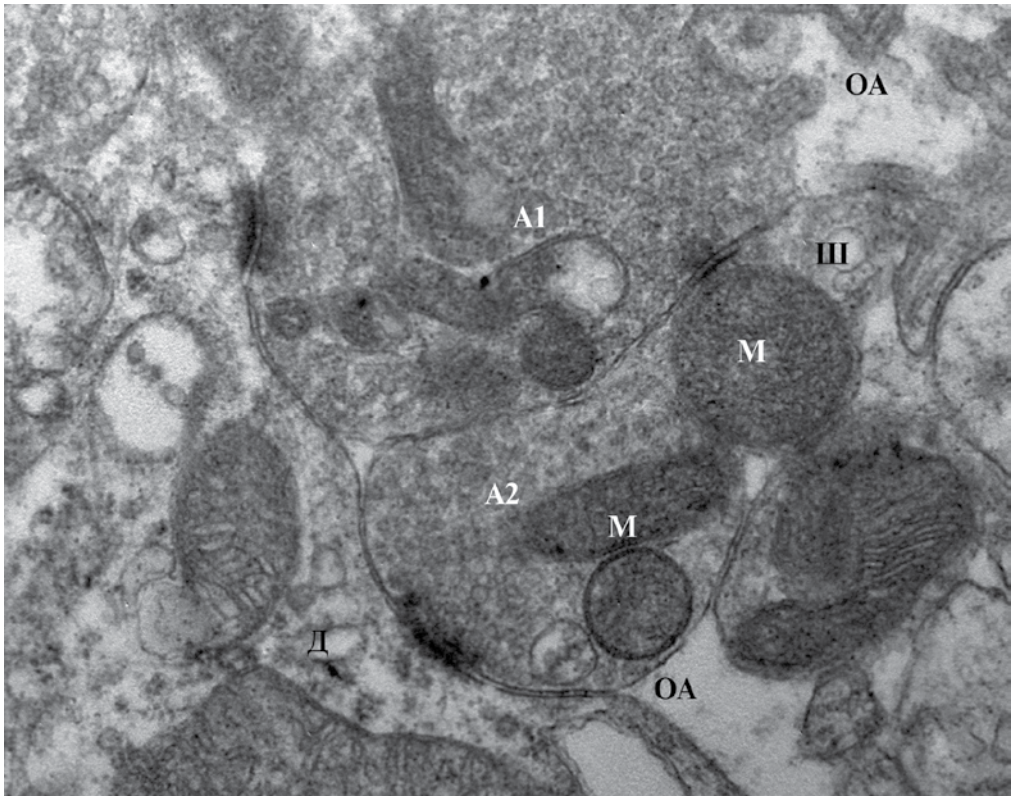
на фоне полного отсутствия химических синапсов в гемистоцитарной астроцитоме идентифицируются ЩК, сформированные тонкими отростками, имеющими ультраструктуру астроглиальных **(рис. 2, а, б)**. ЩК выявляются благодаря специфической ультраструктуре: две контактирующие плазматические мембраны, формирующие узкую, прямую зону нексус с электронно-плотной щелью шириной не более 2—3 нм. Обнаруженные ЩК в опухоли локализованы между не содержащими глиофибриллы отростками астроцитов. При этом в окружающем контакты нейропиле глиофибриллы имеются в большом количестве **(рис. 3)**. Помимо одиночных щелевых контактов в одном поле зрения встречаются несколько ЩК, бляшки которых попадают в плоскость среза при повороте гониометра на ±15° **(см. рис. 3)**. Длина бляшек всех обнаруженных ЩК в образцах гемистоцитарной астроцитомы не превышает 0,1 мкм.

При исследовании ультраструктуры олигодендроглиомы визуализируются плотно расположенные мономорфные опухолевые клетки, между которыми находятся компактно упакованные тонкие клеточные отростки. Ядра опухолевых клеток незначительно варьируют в размерах и форме. Сами клетки содержат клеточные органеллы — мелкие овальные везикулы, единичные рибосомы, полисомы, цистерны гладкого и шероховатого эндоплазматического ретикулума, пластинчатые комплексы. Отдельно следует отметить нетипичные изменения ультраструктуры митохондрий: они увеличены в размерах, выявляются деформация крист митохондрий и их преобразование в тубулоподобные вытянутые электронно-плотные структуры **(рис. 4, а)**. В нейропиле опухоли располагаются химические синапсы: пре- и постсинаптические отростки, активные зоны, везикулы. Вокруг аксошипиковых и аксодендритических синапсов наблюдаются сохраненные элементы астроглиальных отростков, однако при этом глиальные ЩК не обнаружены **(см. рис. 4, б)**.

При ультраструктурном исследовании клетки глиобластомы расположены очень рыхло, их цитоплазма сравнительно бедна органеллами, глиофибрилл немного, нередко обнаруживаются лизосомы, а также единичные нейроэндокринные гранулы. Для опухолевых клеток характерны выраженная изрезанность контуров ядер, от-



а



б

Рис. 4. **Ультраструктура олигодендроглиом Grade II.**

а — несколько компактно расположенных опухолевых клеток (а* — увеличенный участок рис. 4, а, демонстрирующий измененные тубулоподобные кристы в митохондрии опухолевой клетки); б — сохранность химических синапсов в образцах олигодендроглиомы: 2 аксодендритических и 1 аксошипиковый химические синапсы. ГФ — глиофибриллы; М — митохондрия; Я —ядро; А — аксон; Д — дендрит; Ш — шипик; ОА — отросток астроцита. а — ×20 000, а* — ×150 000, б — ×50 000.

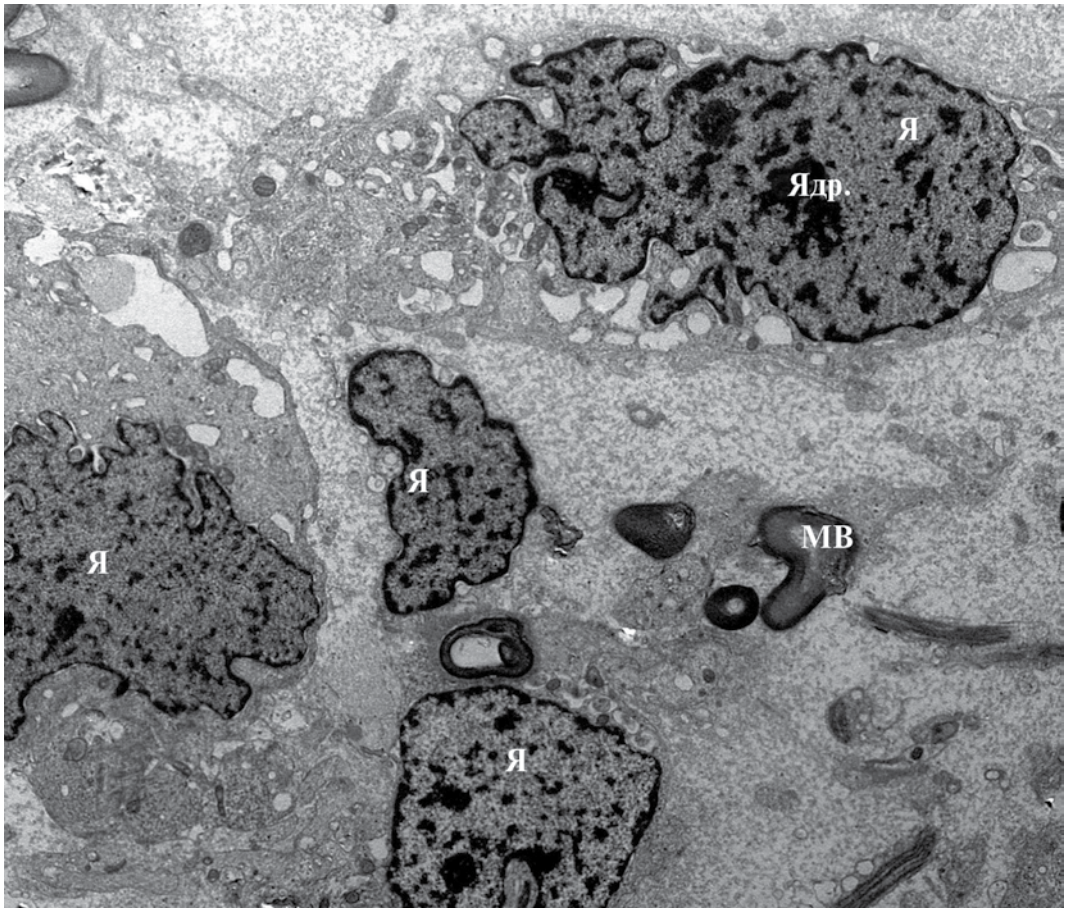


Рис. 5. **Ультраструктура глиобластом Grade IV — несколько опухолевых клеток глиобластомы с ветвящимися отростками и полиморфными электронно-плотными ядрами различных размеров. Клетки разделены широкими полями нейропиля.**

Я — ядро; Ядр. — ядрышко; МВ — миелиновое волокно; стрелкой обозначен участок отшнуровки ядра опухолевой клетки. ×10 000.

шнуровка фрагментов кариоплазмы, присутствие внутриядерных включений и нескольких ядрышек. Нейропиль опухоли представлен широкими межклеточными пространствами с немногочисленными миелинизированными и немиелинизированными отростками **(рис. 5)**. По нашим наблюдениям, основной тип межклеточных соединений в глиобластомах представлен десмосомоподобными контактами между опухолевыми клетками или между сомой и отростками клеток **(рис. 6, г, д)**. Вместе с тем обнаружены и типичные ЩК между тончайшими отростками опухолевых клеток **(см. рис. 6, а)**. Для демонстрации характерной ультраструктуры выявленных ЩК, как правило, необходимо подбирать оптимальный наклон объектодержателя с помощью гониометра (от 15° до –15°). Следует отметить, что особенностью ультраструктуры глиобластом являются заметное искривление и деформация зоны нексуса **(см. рис. 6, б, в)**.

Обсуждение

Ультраструктурная идентификация ЩК в глиальных опухолях человека ранее никем не проводилась. Судя по полученным данным, для гемистоцитарной астроцитомы как астроглиальной опухоли низкого грейда характерно сохранение межклеточных коммуникаций посредством ЩК. Следует отметить, что все обнаруженные ЩК, представленные небольшими по длине зонами нексуса, выявлялись только между отростками астроцитов без выраженной фибриллярности, характерной для опухолевых клеток. В астроцитоме высокой степени злокачественности, по нашим наблюдениям, происходит примитивизация межклеточных контактов, поскольку характерные для глиальных клеток соединения в значительной степени заменяются десмосомоподобными контактами. При этом в глиобластоме обнаружены и единичные типичные ЩК, имеющие заметное искривление и деформацию зоны нексуса. Присутствие функциональных ЩК в образцах опухолей астроглиального происхождения низких и высоких грейдов может иметь как положительное, так и отрицательное значение для процессов малигнизации. С одной стороны, по современным данным, редукция количества ЩК способствует ускорению миграции опухолевых клеток в окружающую паренхиму [10], с другой — именно наличие таких контактов между сложно переплетенными отростками опухолевых клеток позволяет им создавать устойчивую самоподдерживающуюся сеть, способствующую прогрессированию опухоли и обеспечивающую сопротивление терапевтическому воздействию [11]. Оче-

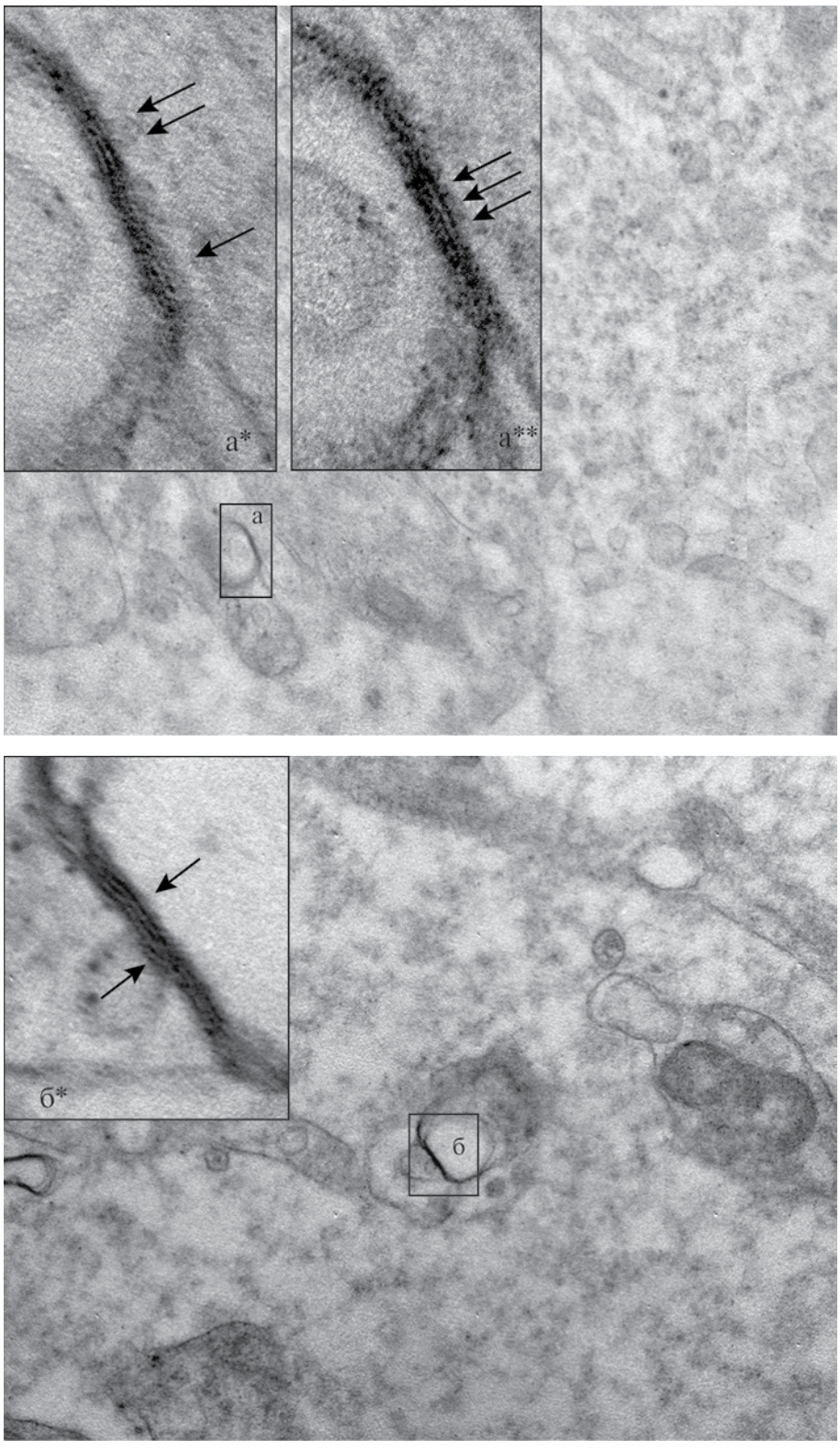
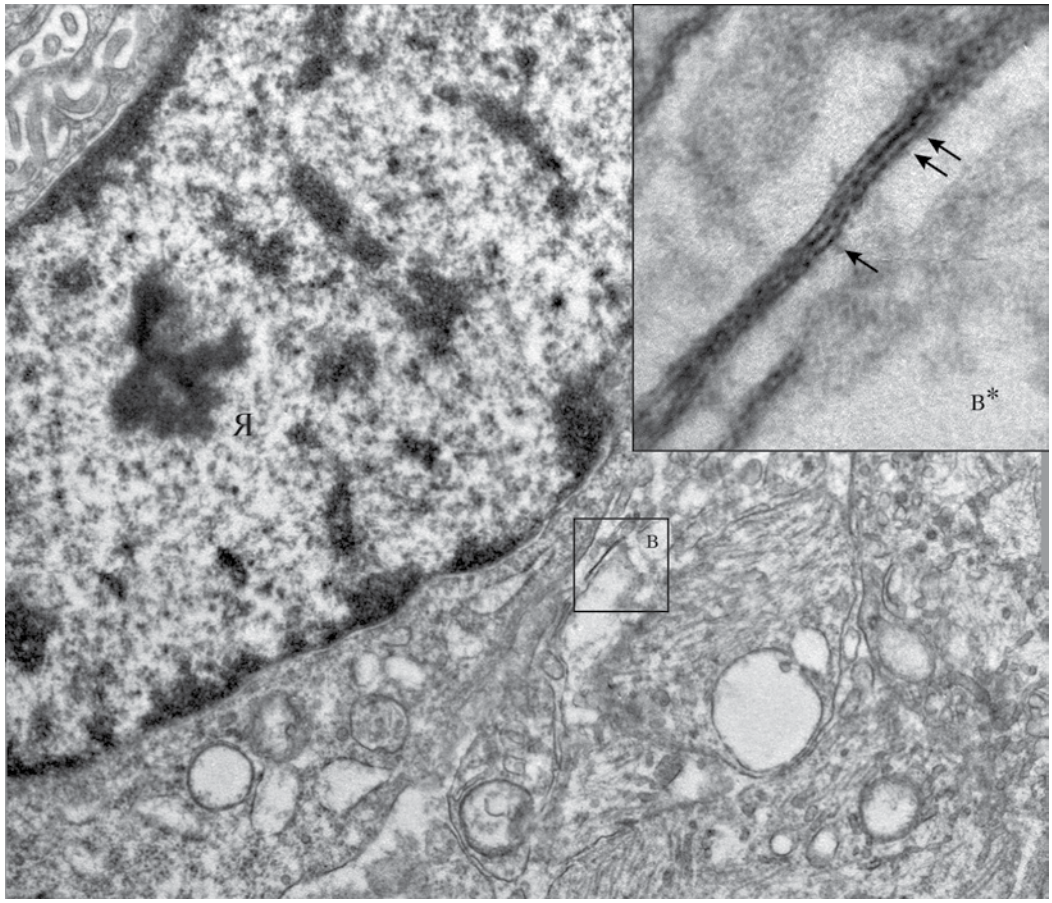


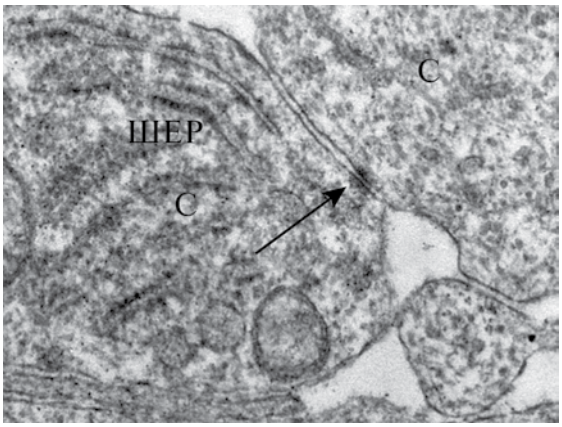
Рис. 6 (а, б). **Межклеточные контакты глиобластомы Grade IV.**

а — щелевой контакт (область а) между вдоль и поперек срезанными отростками опухолевой клетки, а* — увеличенный фрагмент а, демонстрирующий верхнюю часть нексуса в плоскости среза при повороте гониометра на 15°, а** — увеличенный фрагмент а, демонстрирующий нижнюю часть нексуса в плоскости среза при повороте гониометра на –15°; б — щелевой контакт (область б) с искривлением (стрелка) и деформацией (стрелка) нексуса между тонкими отростками опухолевых клеток, б* — увеличенный фрагмент участка б.

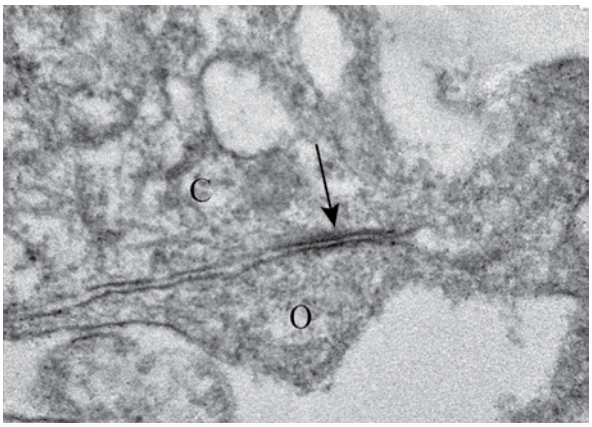
Окончание рис. 6 на след. стр.



в



г



д

Рис. 6 (в—д). **Межклеточные контакты глиобластомы Grade IV.**

в — щелевой контакт (область в) в непосредственной близости от сомы опухолевой клетки, в* — увеличенный фрагмент участка в; г — десмосомоподобный контакт (стрелка) между двумя сомами опухолевых клеток; д — десмосомоподобный контакт (стрелка) между сомой клетки и отростком; Я — ядро, С — сома клетки, О — отросток клетки, ШЕР — шероховатый эндоплазматический ретикулум; стрелками обозначены зоны нексуса в плоскости среза. а — ×50 000, а*, а** — ×250 000; б — ×50 000, б* — ×250 000; в — ×40 000, в* — ×250 000; г — ×80 000; д — ×60 000.

видное проонкогенное значение имеют только ЩК, образуемые между малигнизированными клетками и нормальными астроцитами [12, 13].

В образцах олигодендроглиом ЩК с типичной ультраструктурой обнаружены не были, что может являться ценным диагностическим критерием и важной характеристикой данной опухоли наравне с сохранением аксошипиковых и аксодендритических химических синапсов [14]. Нарушение межклеточной сообщаемости посредством ЩК в олигодендроглиоме, по-видимому, связано с

вытеснением астроцитов и их контактов в процессе роста опухоли, а также с редукцией ЩК между олигодендроцитами. Вероятно, в олигодендроглиоме, несмотря на сохранение химических контактов, отсутствие ЩК приводит к нарушению таких процессов, как пространственная буферизация для регуляции внеклеточной концентрации калия и других ионов, что может отражаться на активности нейронных сетей в окружающей ткани.

Заключение

Проведенное электронно-микроскопическое исследование показало присутствие межклеточных ЩК с некоторыми ультраструктурными отличиями в образцах опухолей астроглиального происхождения низких и высоких грейдов. По современным данным, ЩК в астроцитомах способны создавать устойчивую самоподдерживающуюся сеть, способствующую прогрессированию опухоли и обеспечивающую сопротивление терапевтическому воздействию. В то же время заметная редукция количества ЩК, наиболее выраженная в образце олигодендроглиомы, может способствовать ускорению миграции опухолевых клеток в окружающую паренхиму. Безусловно, изучение ЩК должно быть продолжено на большей по численности группе глиальных опухолей для подтверждения выявленных в настоящей работе особенностей межклеточной коммуникации.

Работа выполнена при поддержке внутреннего гранта Южного федерального университета №213.01-07-2014/05 ПЧВГ и гранта РФФИ №15-04-03035.

Участие авторов:
Концепция и дизайн исследования: Е.Ю.К., А.Э.М.
Сбор и обработка материала: А.Ф.С., Д.В.К., А.К.Л.
Статистическая обработка данных: А.К.Л., Е.Ю.К.
Написание текста: Е.Ю.К.
Редактирование: Е.Ю.К., А.Э.М.
Конфликт интересов отсутствует.

ЛИТЕРАТУРА

1. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, eds. WHO *Classification of tumours of the central nervous system*. 4th ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2016.
2. Trosko JE, Chang CC. Mechanism of up-regulated gap junctional intercellular communication during chemoprevention and chemotherapy of cancer. *Mutat Res*. 2001;480-481:219-229.
3. Zhang W, Couldwell WT, Simard MF, Song H, Lin JH, Nedergaard M. Direct gap junction communication between malignant glioma cells and astrocytes. *Cancer Res*. 1999;59(8):1994-2003.
4. Dere E, Zlomuzica A. The role of gap junctions in the brain in health and disease. *Neurosci Biobehav Rev*. 2012;36(1):206-217.
doi:10.1016/j.neubiorev.2011.05.015
5. Кириченко ЕЮ, Чурюмова ГА, Логвинов АК. Ультраструктурное исследование глиальных щелевых контактов в ядрах таламуса крысы. *Биологические мембраны*. 2016;33(3):194-206.
6. Fukuda T, Kosaka T, Singer W, Galuske RAW. Gap junctions among dendrites of cortical GABAergic neurons establish a dense and widespread intercolumnar network. *J Neurosci*. 2006;26(13):3434-3443.
doi:10.1523/JNEUROSCI.4076-05.2006
7. Söhl G, Maxeiner S, Willecke K. Expression and functions of neuronal gap junctions. *Nat Rev Neurosci*. 2005;6(3):191-200.
doi:10.1038/nrn1627
8. Tabernero A, Gangoso E, Jaraíz-Rodríguez M, Medina JM. The role of connexin43-Src interaction in astrocytomas: A molecular puzzle. *Neuroscience*. 2016;323:183-194.
doi:10.1016/j.neuroscience.2015.02.029
9. Cottin S, Gould PV, Cantin L, Caruso M. Gap junctions in human glioblastomas: implications for suicide gene therapy. *Cancer Gene Ther*. 2011;18(9):674-681.
doi:10.1038/cgt.2011.38
10. Aftab Q, Sin W-C, Naus CC. Reduction in gap junction intercellular communication promotes glioma migration. *Oncotarget*. 2015;6(13):11447-11464.
doi:10.18632/oncotarget.3407
11. Osswald M, Jung E, Sahm F, Solecki G, Venkataramani V, Blaes J, et al. Brain tumour cells interconnect to a functional and resistant network. *Nature*. 2015;528(7580):93-98.
doi:10.1038/nature16071
12. Hong X, Sin WC, Harris AL, Naus CC. Gap junctions modulate glioma invasion by direct transfer of microRNA. *Oncotarget*. 2015;6(17):15566-15577.
doi:10.18632/oncotarget.3904
13. Sin WC, Aftab Q, Bechberger JF, Leung JH, Chen H, Naus CC. Astrocytes promote glioma invasion via the gap junction protein connexin43. *Oncogene*. 2016;35(12):1504-1516.
doi:10.1038/onc.2015.210
14. Erlandson RA. *Diagnostic transmission electron microscopy of tumors: with clinicopathological, immunohistochemical, and cytogenetic correlations*. New York: Raven Press; 1994.

Поступила 04.10.2016