

ДАЙДЖЕСТИ

In-vivo аналіз з високим розрізненням реакції нормального мозку на опромінення голови

Оригінальна стаття: High-Resolution *in-vivo* Analysis of Normal Brain Response to Cranial Irradiation. PLoS ONE 7(6): e38366. doi:10.1371/journal.pone.0038366

Дата публікації: 4 червня 2012 р.

Автори: Burrell K, Hill RP, Zadeh G – Brain Tumor Research Centre, SickKids Research Institute, Ontario Cancer Institute, Princess Margaret Hospital and Campbell Family Institute for Cancer Research, University of Toronto, Toronto Western Hospital University Health Network, Toronto, Canada.

Редактор: Marc Tjwa, University of Frankfurt – University Hospital Frankfurt, Germany.

Авторські права © 2012 Burrell et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Вступ

Променева терапія є загальноживим способом лікування при багатьох патологічних станах центральної нервової системи. Але попри відомі терапевтичні успіхи, черепно-мозковому опроміненню властиві значні негативні ефекти, пов'язані, насамперед, із набряком головного мозку та ослабленням мислення, які проявляються через місяці або роки по завершенні лікування. Парадоксально, пацієнти, які успішно перенесли основне захворювання, стикаються із прогресивним погіршенням здатності до навчання, послабленням пам'яті та інших функцій мозку. Патолофізіологія і молекулярні процеси з кульмінацією пізніх ефектів черепно-мозкового опромінення мало відомі, хоча вважається, що ключову роль у цьому відіграє пошкодження ендотелію. Виходячи з цього міркування, автори дослідження вивчили роль клітин кістково-мозкового походження (bone marrow derived cells, BMDC) у відновленні та неоваскуляризації після черепно-мозкового опромінення та дійшли неочікуваного висновку, що останні не тільки не беруть участі у неоваскуляризації після опромінення, а, навпаки, ймовірно, стають єдиною причиною запальних процесів у мозкових тканинах.

Крім гістологічного аналізу опромінених тканин автори застосовували прижиттєву двофотон-

ну лазерну мікроскопію тканин живих хімеризованих мишей. Така тактика надала їм можливість візуалізувати клітини кістково-мозкового походження у нормальному мозку та мозковій судинній сітці в реальному часі та детально визначити у просторі та часі роль цих клітин у відповіді на променеву терапію (ПТ). Автори продемонстрували існування просторово-, часово- та дозовозалежного рекрутування клітин кістково-мозкового походження після опромінення мозку (рисунком 1). Такі клітини залишаються в ділянці опромінення тривалий час, мігрують поза межі просвіту судин і частково оточують останні у вигляді гладком'язових клітин, проте не формують ендотелію. Дослідники також наводять докази того, що понад 50% мікроглії у опроміненій ділянці мозку становлять клітини, рекрутовані з кісткового мозку. І найголовніше, результати дослідження стали доказом того, що попередники запалення не є резидентними запальними клітинами, а мобілізуються саме з кісткового мозку.

Методи

Модельні хімеризовані миші із генами зеленого або червоного флюоресцентного протеїну у клітинах кісткового мозку були отримані шляхом заміщення кісткового мозку трансплантатом від трансгенних мишей-донорів. У правій лобній ділянці черепа вирізували отвір, який закривали

склом. Мишей розташовували на іммобілізаційній платформі всередині мікроопромінювача, за допомогою якого імітували ПТ крізь коліматор двома зустрічними полями при напрузі на променевій трубці у 225 кVp. У певні моменти часу — через 1 годину, 1, 3, 7, 10, 14 та 21 добу — мишей анестезували та розміщували у двофотонному лазерному мікроскопі.

Результати

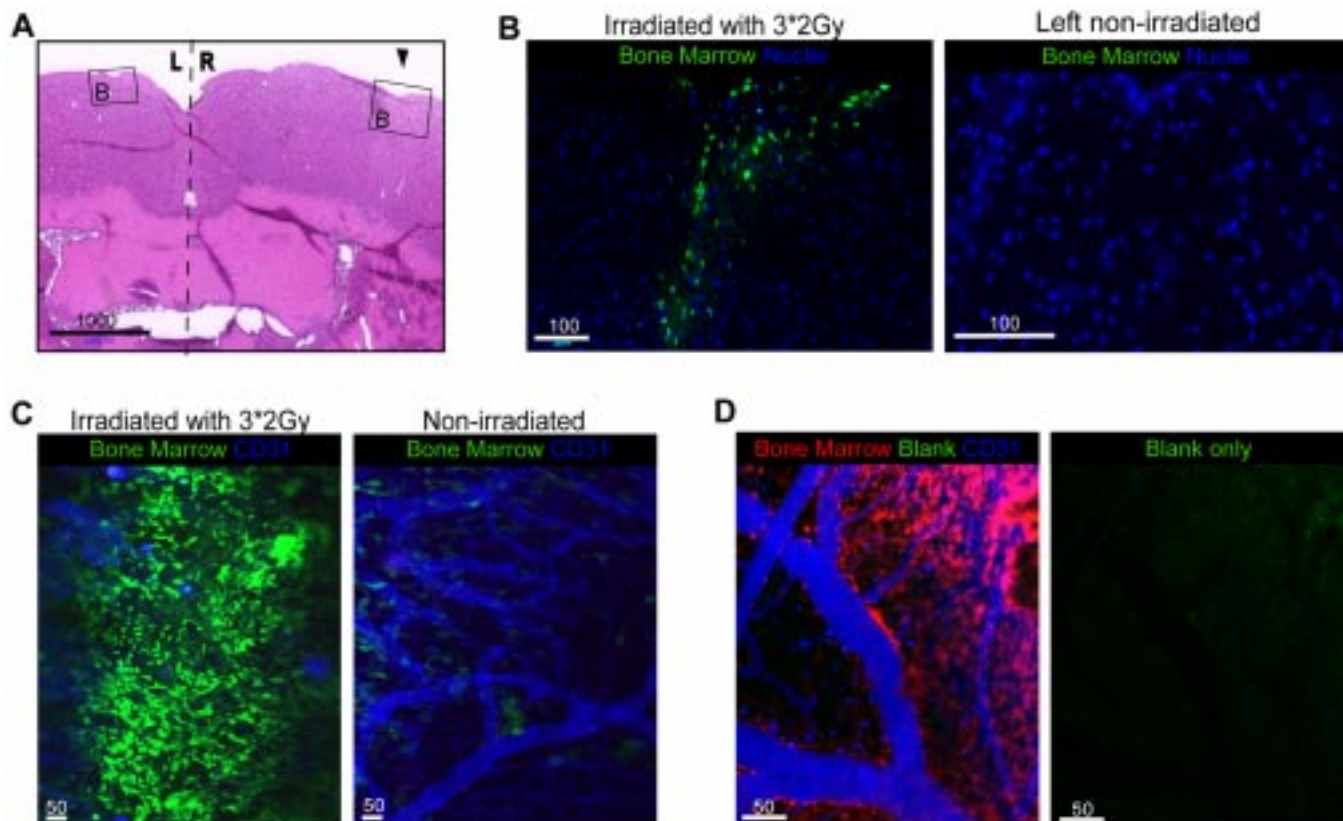
Клітини кістковомозкового походження рекрутуються безпосередньо до місця опромінення

Автори спостерігали чітку картину рекрутування клітин кістковомозкового походження до місця опромінення, про що свідчила присутність зеленого флуоресцентного протеїну вже через годину після ПТ (рисунк 1В). У просторовому розподілі інфільтрація клітинами кістковомозко-

вого походження чітко відповідала осередку опромінення із мінімальним вмістом їх у неопромінених ділянках мозку, як і у контролі (рисунк 1С). Такий характер розподілу рекрутованих клітин зберігався з плином часу після опромінення.

Рекрутування клітин кістковомозкового походження залежить від дози опромінення

Автори використовували одноразове опромінення в різних дозах (від 2 до 15 Гр) та у двох режимах фракціонування: 3-денні фракції по 2 Гр та 3-денні фракції по 5 Гр. Подальші результати двофотонної лазерної мікроскопії показали збільшення кількості рекрутованих клітин у прямій залежності від дози опромінення в усіх досліджених інтервалах часу (підтверджено підрахунком та статистичним аналізом) (рисунках 2 А, В, С). Слід зазначити, що фракціоноване опромінення відзначалося менш інтенсивною кінетикою накопичення клітин, що, ймовірно, пояснюється відновленням радіаційного ураження між фракціями.



Рисунк 1. Рекрутування клітин кістковомозкового походження до місць опромінення: А — на зрізі нормального мозку вказані місця, звідки отримано зображення; В — ліве зображення демонструє розподіл клітин кістковомозкового походження: максимум — біля кори мозку та поступове зменшення з глибиною, порівняно із неопроміненою тканиною, де рекрутування відсутнє (зелені клітини кістковомозкового походження, сині — ядра); С — *in-vivo* зображення через 7 днів після опромінення 3 фракціями по 2 Гр; показано присутність клітин кістковомозкового походження у місці опромінення, тоді як неопромінений контроль показує їх мінімальну кількість (зеленим: *BMDC*, синім: *CD31-антитіла*). D — аналогічна картина рекрутування клітин кістковомозкового походження у хімеризованих червоним флуоресцентним протеїном мишей та пустий зелений спектр для підтвердження методу (зелений відсутній, червоний — *BMDC*, синій — *CD31-антитіла*)

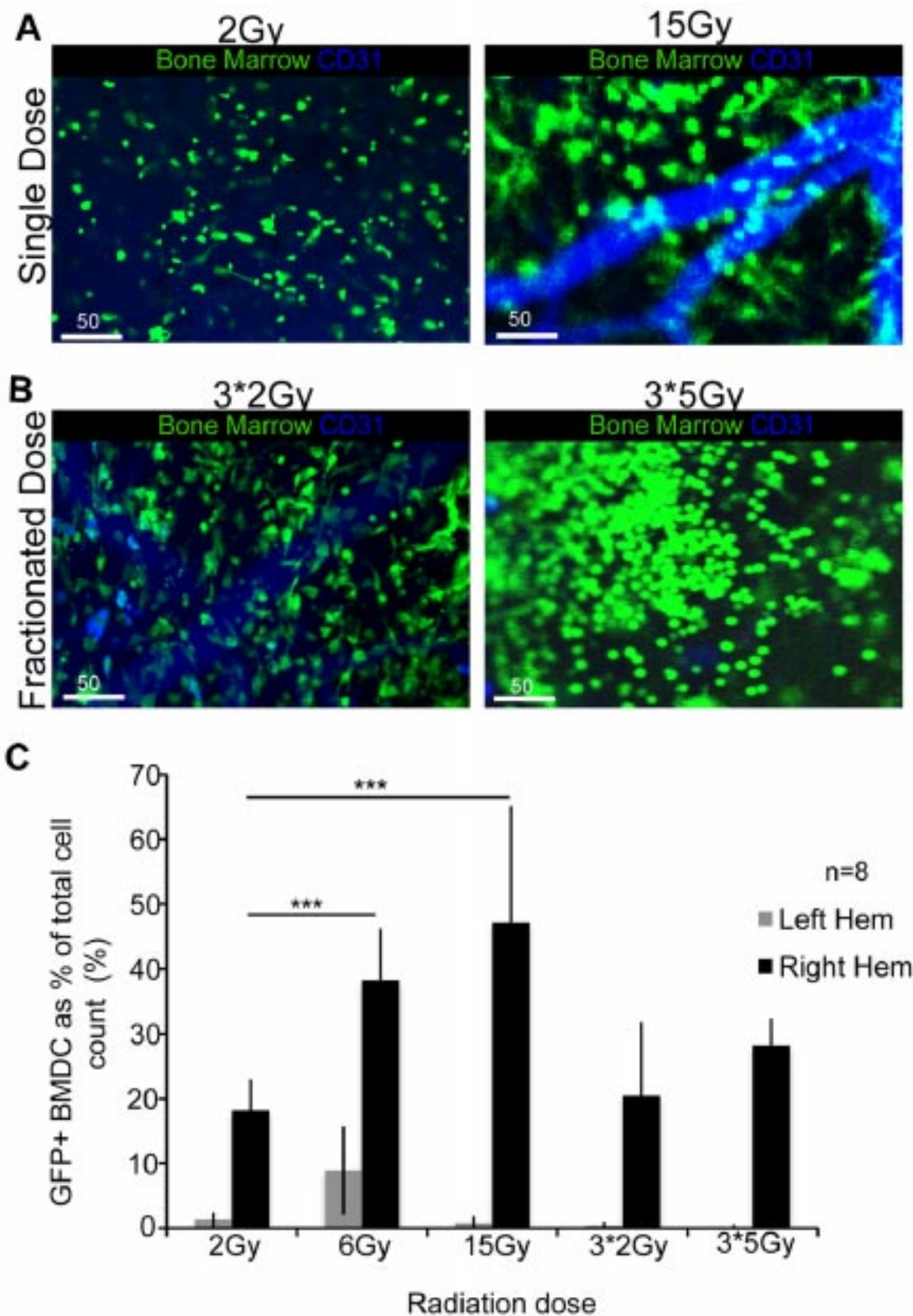


Рисунок 2. Підвищення кількості клітин кістковомозкового походження через 7 днів після опромінення при зростанні дози опромінення (зелений — BMDC, синій — CD31-антитіла): А — одноразове опромінення в дозах у 2 та 15 Гр; В — фракціонування дози — 6 Гр та 15 Гр за 3 фракції, в усіх режимах опромінення встановлено збільшення рекрутування із зростанням доз; С — графік залежності кількості клітин від дози опромінення (статистично значуще збільшення рекрутування при зростанні дози) та мінімальної кількості клітин у контролі (позначено сірим кольором). Накопичення рекрутованих клітин відзначалося через 1 годину, 1 і 21 добу

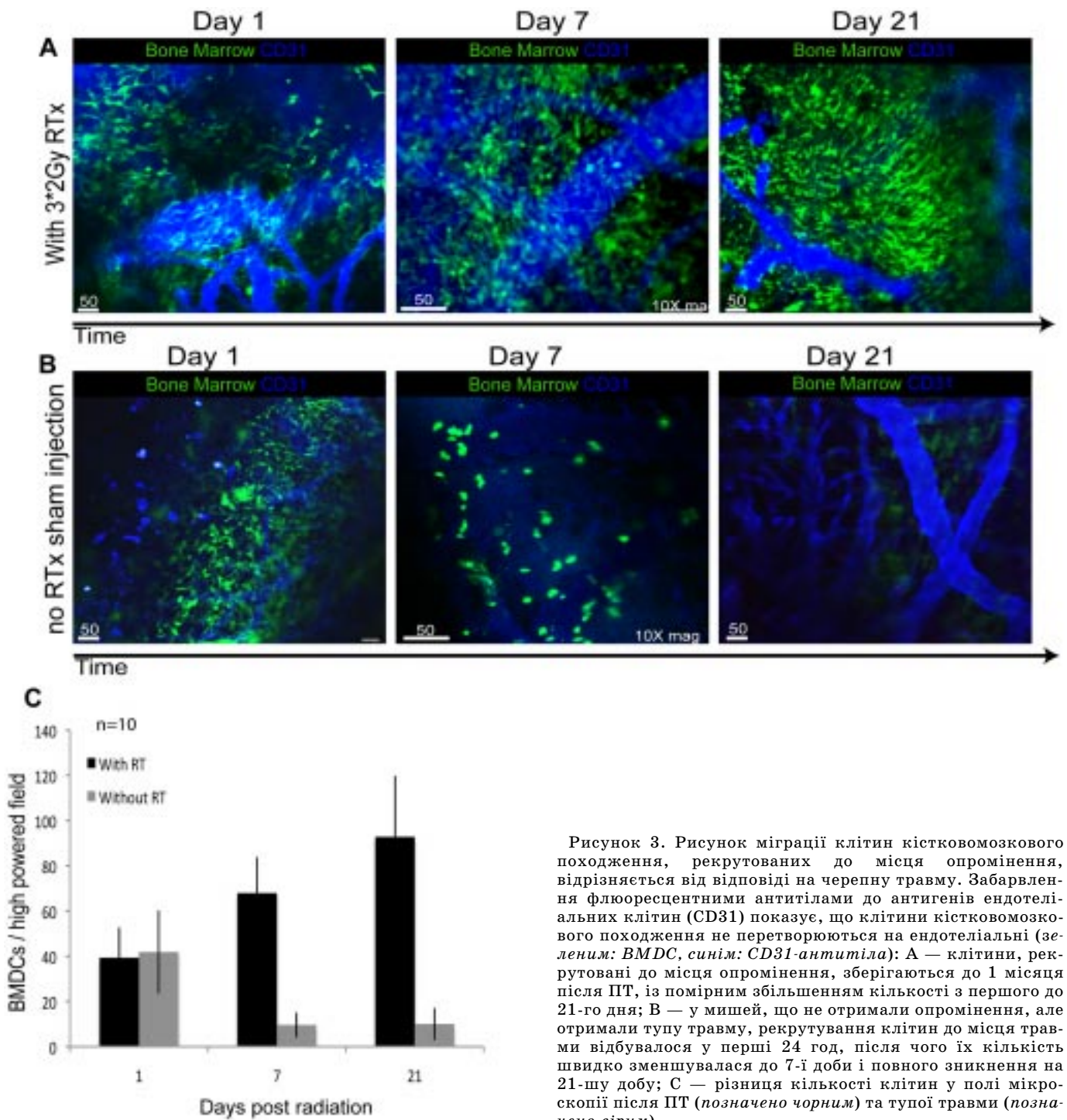


Рисунок 3. Рисунок міграції клітин кісткомозкового походження, рекрутованих до місця опромінення, відрізняється від відповіді на черепну травму. Забарвлення флуоресцентними антитілами до антигенів ендотеліальних клітин (CD31) показує, що клітини кісткомозкового походження не перетворюються на ендотеліальні (зеленим: BMDC, синім: CD31-антитіла): А — клітини, рекрутовані до місця опромінення, зберігаються до 1 місяця після ПТ, із помірним збільшенням кількості з першого до 21-го дня; В — у мишей, що не отримали опромінення, але отримали тупу травму, рекрутування клітин до місця травми відбувалося у перші 24 год, після чого їх кількість швидко зменшувалася до 7-ї доби і повного зникнення на 21-шу добу; С — різниця кількості клітин у полі мікроскопії після ПТ (позначено чорним) та тупої травми (позначено сірим)

Рекрутування клітин кісткомозкового походження залежить від часу, що минув після опромінювання

Автори простежили процес рекрутування клітин кісткомозкового походження у ділянці опромінення протягом тривалого часу: від 1 години до 1 місяця після ПТ. Рекрутування спостерігалось вже через 1 годину після опромінення, значно посилювалось до 7-ї доби, а потім залишалось

на одному рівні до 1 місяця (рисунок 3 А, С). Автори також провели порівняння між опроміненням та механічною тупою травмою нормального (неопроміненого) мозку — патоморфологічний рисунок при останній був схожим з картиною після опромінення у перші 24 години, проте надалі відрізнявся швидким зменшенням кількості рекрутованих клітин до 7-ї доби і повного зникнення через 21 добу (рисунок 3 В, С).

Мікрovasкулярні зміни, викликані опроміненням

Мікрovasкулярні пошкодження, зокрема апоптоз ендотеліальних клітин, вважаються ключовими у викликаних опроміненням мозкових пору-

шеннях. Автори визначили поширеність апоптозу ендотеліальних клітин залежно від дози опромінення мозку за допомогою подвійного імуногістохімічного забарвлення нормальних (CD31) та апоптотичних (TUNEL) ендотеліальних клі-

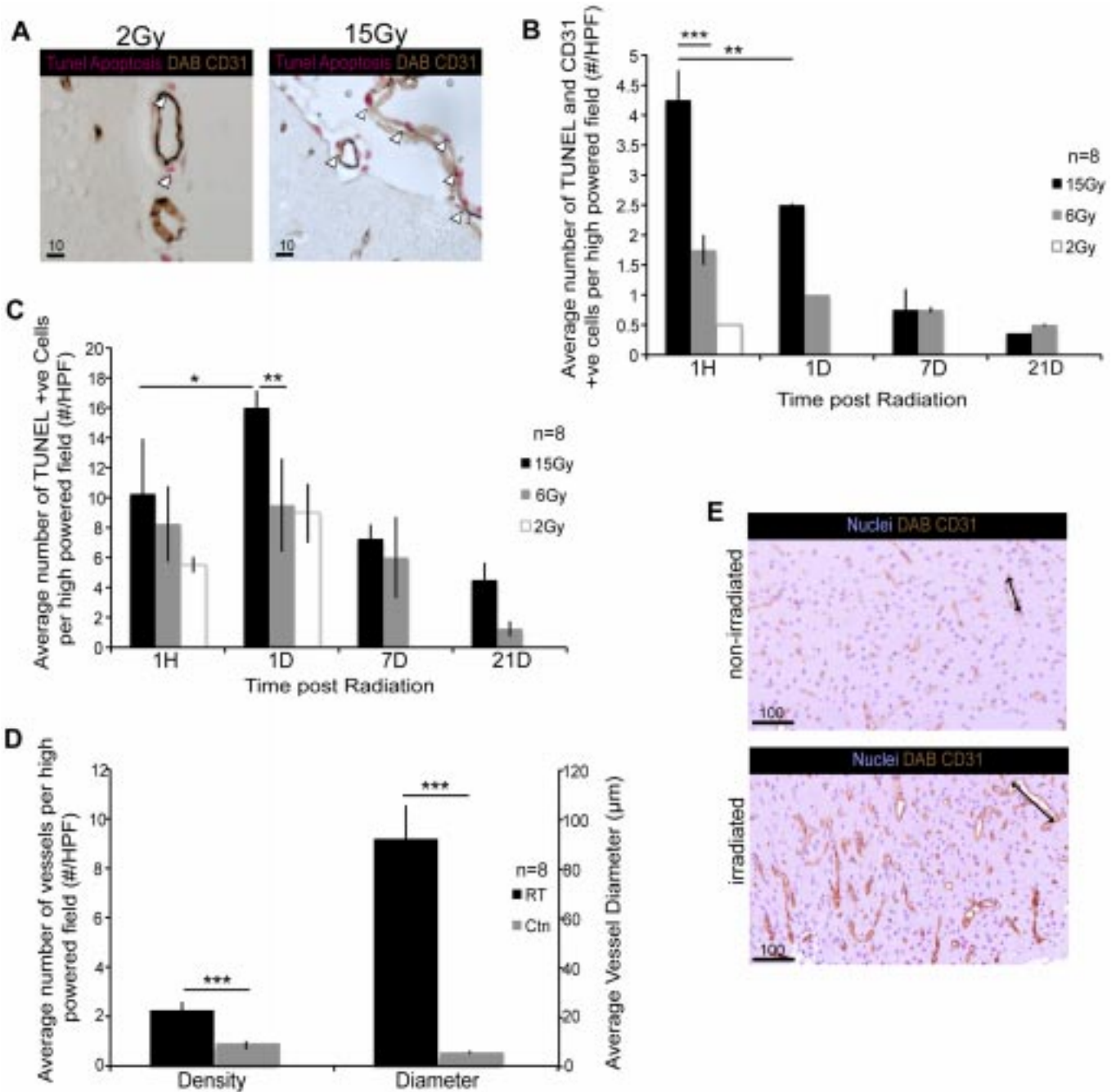


Рисунок 4. Статистично значуще зростання інтенсивності апоптозу ендотеліальних клітин залежно від дози опромінення мозку: А — зростання радіаційної дози від 2 до 15 Гр супроводжується підвищенням інтенсивності апоптозу ендотеліальних клітин, що демонструється імуногістохімічним забарвленням (жоричневий: CD31, рожевий: TUNEL); В — графічне відображення ендотеліального апоптозу CD31+ та TUNEL+, встановлена різниця інтенсивності апоптозу при дозах у 15, 6 та 2 Гр через 1 год, 1, 7 та 21 добу після опромінення; С — залежність кількості паренхіматозних клітин у стані апоптозу від дози і часу після опромінення — найбільше таких клітин спостерігається через 1 добу після опромінення; D — аналіз структури судин в осередку опромінення: через 7 дб після опромінення в режимі 3 фракції по 2 Гр на добу — значне збільшення водночас щільності ($p < 0,0001$) та діаметра судин ($p < 0,0001$) порівняно із неопроміненим контролем; E — імуногістохімічне дослідження (CD31) підтверджує зміни у щільності та діаметрі судин через 7 дб після опромінення в режимі 3 добові фракції по 2 Гр порівняно із неопроміненою тканиною

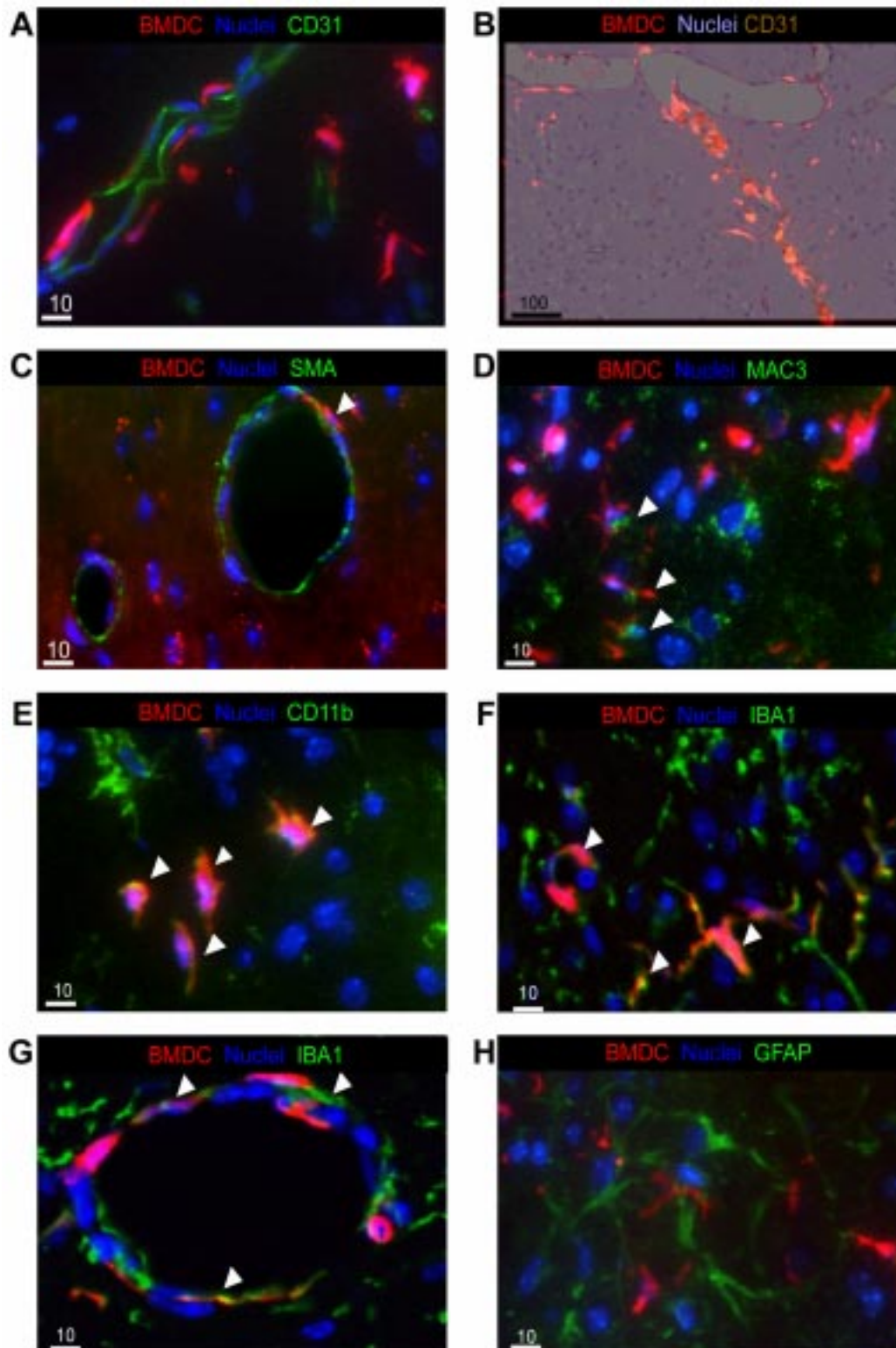


Рисунок 5. Імунофлуоресцентний аналіз зрізів мозку у хімеризованих червоним флуоресцентним протеїном мишей для визначення типу клітин, у які диференціюються клітини кісткомозкового походження в місці опромінення через 7 днів після опромінення (зеленим: забарвлення (?), червоною: BMDC, синім: ядра): А, В — підтвердження відсутності диференціації рекрутованих клітин кісткомозкового походження в ендотеліальні клітини: на зображеннях, отриманих за допомогою двофотонної лазерної мікроскопії *in vivo*, клітини кісткомозкового походження (А) не збігаються з розподілом ендотеліального маркера CD31; В, С — деякі клітини кісткомозкового походження збігаються з гладком'язовим маркером (стрілка); D, E — приблизно 40 % рекрутованих клітин забарвлюються запальними маркерами: D — MAC3 (стрілки); E — CD11b (стрілка); F, G — розташування 50 % рекрутованих клітин, що містяться у паренхімі, збігається з розташуванням мікрогліального маркера IBA1 (стрілка); H — диференціація в астроцити відсутня, як і гліальне рубцювання, що демонструється відсутністю збігу з розташуванням маркера GFAP

тин. Статистично значуще ($p < 0,0001$) зростання інтенсивності апоптозу ендотеліальних клітин (CD31 + TUNEL +) спостерігалось із підвищенням дози опромінення від 2 до 15 Гр (рисунок 4 А, В). Найбільш виражений апоптоз ендотеліальних клітин спостерігався через 1 годину після опромінення в дозі 15 Гр, зменшуючись із часом та практично зникаючи через 1 добу. При дозах, менших 6 Гр, апоптоз спостерігався лише в поодиноких клітинах. Автори також підраховали загальну кількість апоптичних клітин у клітинах паренхіми (TUNEL+): пік апоптозу припав на значно пізніший час, досягаючи найвищого рівня через добу після опромінення. Найзначніша кількість апоптичних паренхіматозних клітин спостерігалась у відповідь на опромінення в дозі 15 Гр (рисунок 4 С).

Автори проаналізували зміни в мікросудинній структурі у відповідь на опромінення, вимірюючи щільність, діаметр та проникність судин. Спостерігалось статистично значуще ($p < 0,0001$) збільшення їх діаметра через 7 днів після опромінення із одночасним збільшенням їх щільності та проникності (рисунок 4 D, E).

Внесок клітин кістково мозкового походження до судинних елементів після опромінення

Науковці використали імуногістохімічний аналіз для вивчення типів клітин, у які диференціювалися рекрутовані клітини кістково мозкового походження, за допомогою низки флуоресцентно-мічених антитіл до антигенів запальних, імунних, судинних клітин та клітин мозку (SMA, MAC3, CD11b, CD11c, F4/80, IBA1, GFAP), звертаючи особливу увагу на диференціацію в ендотеліальні клітини (CD31). Незалежно від дози опромінення або часу, що минув після нього, рекрутовані клітини мігрували до місця опромінення, виходили з просвіту судин, після чого їх субпопуляція оточувала судини, але не формувала ендотеліальних клітин (рисунок 5 А, В). У місці опромінення майже всі запальні маркери або їх переважна частка просторово збігалися із маркерами клітин кістково мозкового походження, що визначає відповідальність рекрутованих клітин за початок запальної реакції після ПТ (рисунок 5 D, E). Серед усіх типів рекрутованих клітин домінували дві популяції: запальні клітини та мікроглія (рисунок 5 F, G).

Підготував І. М. Пилипенко