

# Гистологические и иммуногистохимические особенности рецидивов диффузных астроцитарных опухолей III–IV степени злокачественности

Т.Н. Чертенко

Харьковская медицинская академия последипломного образования

**Цель исследования:** изучение случаев рецидивирования диффузных астроцитарных опухолей III–IV степени злокачественности с формированием рекомендаций для их последующей терапии.

**Материалы и методы.** Всего было изучено 25 случаев рецидивов, из них 15 случаев ранних рецидивов и 10 случаев поздних. Для оценки патоморфоза дополнительно были изучены первичные опухоли у пациентов из группы ранних рецидивов. Ретроспективно были проанализированы медицинские карты стационарных больных, проведено гистологическое исследование опухолей, иммуногистохимическое исследование с 12 маркерами: GFAP, Anti-IDH1R132H, vimentin, EGFR, Ki-67, MMP-9, VEGF, CD34, CD3, CD4, CD8, CD68. Также проводилось молекулярно-генетическое исследование для обнаружения мутации IDH1<sup>105GGT</sup>SNP. Методами математической статистики были проанализированы качественные и количественные показатели, при помощи теста Мак-Немара – опухолевый патоморфоз в парных случаях.

**Результаты.** В ходе исследования был выявлен один случай псевдопрогрессии. Посттерапевтический патоморфоз был более выражен в группе ранних рецидивов. В этой группе также отмечалось повышение уровня CD8 по сравнению с первичными опухолями (тест Мак-Немара,  $p < 0,05$ ). Индекс васкуляризации был достоверно выше в ранних рецидивах (U-критерий=32;  $p$  2-сторонний точный=0,016;  $p < 0,05$ ). Обнаружена сильная прямая связь между индексом васкуляризации и процентом опухолевых клеток экспрессирующих MMP-9 ( $r$ -Спирмена=0,893;  $p < 0,05$ ). Мутация IDH1<sup>105GGT</sup>SNP была связана с более отдаленными рецидивами диффузных астроцитарных опухолей III–IV степени злокачественности (U=36,5;  $p$  точное=0,043;  $p < 0,05$ ).

**Заключение.** Умение отличать случаи истинной прогрессии и псевдопрогрессии, а также знание особенностей пролиферации, васкуляризации, инвазивной активности и иммунного ответа в рецидиве позволит в будущем разрабатывать и внедрять в практику более эффективные тактики лечения анапластических астроцитом и глиобластом.

**Ключевые слова:** рецидив злокачественных глиом, глиобластома, анапластическая астроцитома, MMP-9, ангиогенез в глиобластомах, CD8, псевдопрогрессия глиобластомы, IDH1.

Анапластические астроцитомы (Grade III) и глиобластомы (Grade IV) относятся к одним из самых злокачественных опухолей головного мозга [19]. Анапластическая астроцитома прогрессирует в глиобластома, как правило, за 2 года [19]. Глиобластома, в свою очередь, является самой распространенной злокачественной опухолью головного мозга [2, 19]. Несмотря на прогресс в современных методах лечения, все диффузные астроцитомы III–IV степени злокачественности рецидивируют [19]. Поэтому на сегодняшний день изучение

случаев рецидивирования этих опухолей важно для полного понимания их патоморфоза, оценки эффективности проведенной терапии и разработки более индивидуализированных методов лечения, которые бы учитывали не только гистотип опухоли, но и ее пролиферативный потенциал, особенности ангиогенеза, уровень инфильтрации иммунными клетками и молекулярно-генетические особенности. Однако случаи рецидивирования все еще мало изучены, что связано как с тем, что хирургическое вмешательство не всегда проводится в случаях рецидивирования [5], так и с тем, что средняя продолжительность жизни пациентов с анапластическим астроцитомой составляет 2–3 года [16], а с глиобластомами – 15 мес [13, 14]. Следовательно, не все пациенты доживают до оперативного лечения рецидива.

В оценке ключевых особенностей опухолей кроме рутинной гистологии незаменимыми являются иммуногистохимический и молекулярно-генетический метод [17]. Так, для оценки эффективности проведенной терапии в случае рецидивов важным является определение пролиферативного потенциала опухоли (оценка экспрессии ядерного маркера Ki-67) и ее способности к активной инвазии (оценка экспрессии MMP-9). Перспективными для подбора более персонализированной терапии является оценка экспрессии рецептора эпидермального фактора роста (EGFR). А для назначения такого препарата, как бевацизумаб, важным является оценка активности ангиогенеза [5]. Активно ведутся исследования, направленные на разработку эффективной иммунотерапии глиом [12], поэтому уже сейчас важно понимать, какие звенья иммунной системы задействованы в опухолевой прогрессии [8], а какие способствуют более благоприятному течению злокачественных диффузных астроцитом [9].

Малая изученность случаев рецидивирования, а также перспективность исследований в данном направлении для разработки более эффективных тактик лечения и привела к проведению работы, направленной именно на изучение молекулярно-биологических особенностей рецидивов диффузных астроцитарных опухолей высокой степени злокачественности.

**Цель исследования:** изучение особенностей рецидивов диффузных астроцитарных опухолей III–IV степени злокачественности с формированием рекомендаций для их последующей терапии.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для анализа рецидивов диффузных астроцитарных опухолей III–IV степени злокачественности были изучены медицинские карты стационарного больного и отобраны парафиновые блоки с постоперационным материалом опухолей от 25 пациентов. Пациенты были разделены на две группы:

Основные клиничко-морфологические характеристики исследуемых групп

Группа	Первичные опухоли, от группы ранних рецидивов	Ранние рецидивы (рецидив в течение 1 года после первой операции)	Поздние рецидивы (рецидив после 3 лет и более после первой операции)
Признак			
<i>Пол</i>			
М	9 (60%)	9 (60%)	6 (60%)
Ж	6 (40%)	6 (40%)	4 (40%)
Возраст (М±σ)	50,13±10,86	51±10,66	45,5±10,78
<i>Локализация опухоли</i>			
Лобные доли	5 (33%)	5 (33%)	7 (70%)
Другая супратенториальная локализация	10 (67%)	10 (67%)	3 (30%)
<i>Grade (степень злокачественности)</i>			
III	1 (7%)	1 (7%)	0 (0%)
IV	14 (93%)	14 (93%)	10 (100%)
<i>Мутация IDH1R132H</i>			
Есть	2 (13%)	2 (13%)	3 (30%)
Нет	13 (87%)	13 (87%)	7 (70%)
<i>Мутация IDH1<sup>105GGT</sup>SNP</i>			
Есть	3 (20%)	4 (27%)	6 (60%)
Нет	12 (80%)	11 (73%)	4 (40%)

Таблица 2

Иммуногистохимические маркеры, использованные в исследовании

Название маркера	Клон	Разведение	Производитель
GFAP	ASTRO6	1:200	ThermoScientific, США
Anti-IDH1R132H	HMab-1	1:50	MERCK, Германия
Vimentin	SP20	1:200	ThermoScientific, США
EGFR	SP84	1:100	ThermoScientific, США
MMP-9	Ab-1 GE-213	1:200	ThermoScientific, США
Ki-67	SP6	1:400	ThermoScientific, США
VEGF	JH121	1:20	ThermoScientific, США
anti-CD34 antibody Class II	QBEnd 10	1:50	Dako, Дания
CD3 early T-cell marker	SP7	1:150	ThermoScientific, США
CD4	4B12	ready-to-use	Dako, Дания
CD8	SP16	1:50	ThermoScientific, США
CD68	KP1	ready-to-use	Dako, Дания

– 1-я группа состояла из 15 пациентов и включала 30 блоков с парными случаями опухолей, а именно 15 случаев первичных опухолей и 15 случаев их ранних рецидивов (между первичной операцией и рецидивом прошло менее 12 мес). Первичные опухоли были включены в исследования для того чтобы можно было оценить патоморфоз опухолей в ходе стандартной терапии (лучевая терапия и химиотерапия темазоламидом).

– 2-я группа состояла из 10 случаев поздних рецидивов (3 года и более после первичной операции) и была создана для оценки вероятных различий между ранними и поздними рецидивами при одинаковой нозологии.

Сбор материала проводили ретроспективно за период 2011–2016 гг. на базе Харьковской областной больницы и Харьковской городской клинической больницы № 7.

Критериями включения пациентов в исследование служили качество морфологического материала и пригодность его для проведения иммуногистохимического исследования.

Более подробная информация о составе групп представлена в табл. 1.

Из медицинских карт стационарного больного анализировали:

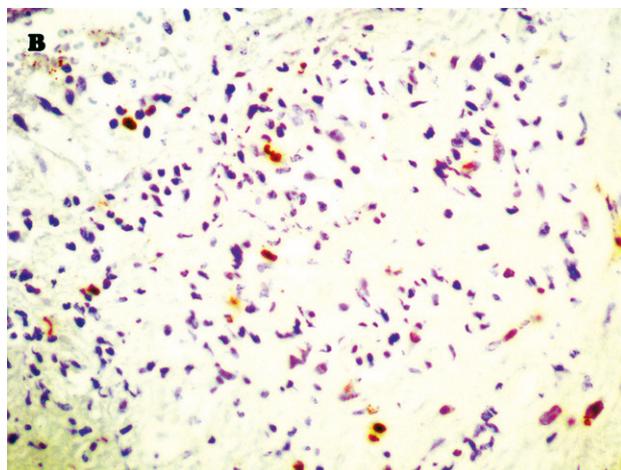
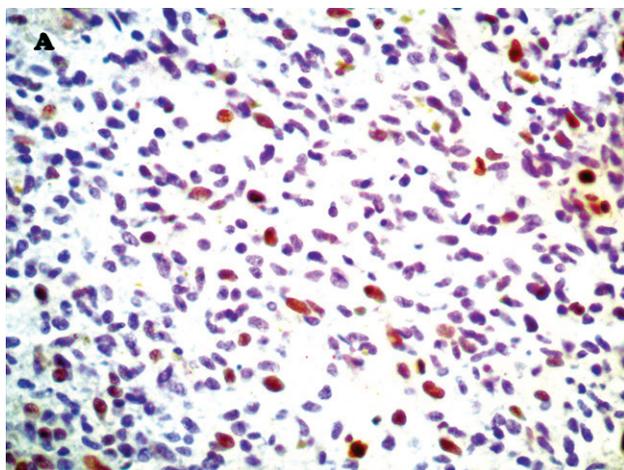
- пол,
- возраст пациентов,
- время, прошедшее между первичной операцией и рецидивом,
- локализацию опухоли,
- интраоперационный вид опухоли,
- гистологический диагноз относительно первичной опухоли (в случае поздних рецидивов).

Гистологический диагноз рецидива учитывался, однако был дополнительно пересмотрен автором в ходе исследования.

Методы, использованные в работе:

1. *Гистологическое и иммуногистохимическое исследование.*

Рутинное гистологическое исследование проводилось с использованием окраски гематоксилином и эозином. Иммуногистохимическое исследование – с использованием непрямого пероксидазно-антипероксидазного метода. Все этапы проведения иммуногистохимической реакции осуществля-



**Рис. 1. Ядерная экспрессия Ki-67 в глиобластоме у пациентки при первичной опухоли (А) и в случае псевдорцидива (В). Увеличение ×400, дополнительное окрашивание гематоксилином Майера. В случае А отмечается выраженная экспрессия маркера и высокая клеточность опухоли, в случае В – единичные опухолевые комплексы зажаты среди глиально-фиброзных масс, опухолевые клетки мелкие, с дистрофическими изменениями. Единичные опухолевые клетки экспрессируют Ki-67**

лись согласно протоколу Dako для ручного метода иммуногистохимического исследования. В качестве иммуногистохимических маркеров использовали панель первичных антител (табл. 2). Оценку реакции GFAP, IDH-1 R132H, EGFR и vimentin проводили качественным методом: оценивали наличие экспрессии маркера в ткани опухоли и силу экспрессии по шкале:

- «-» – экспрессия отсутствует;
- «+» – экспрессия слабо выражена;
- «++» – экспрессия умеренно выражена;
- «+++» – сильная экспрессия маркера.

Для маркера MMP-9 рассчитывался процент (%) опухолевых клеток, экспрессирующих маркер в «горячих очагах» (участках, где экспрессия была наиболее выражена. Как правило, это были участки биоптатов, взятых из периферической части опухоли).

Оценку экспрессии CD3, CD4, CD8 и CD68 проводили также по шкале 0–3+, однако реакция считалась:

- негативной – при отсутствии антиген-позитивных клеток («-»),
- слабопозитивной («+») – окрашены лишь единичные клетки в ткани опухоли,
- умереннопозитивной («++») – окрашено менее 30% клеток в «горячих очагах»,
- сильнопозитивной («+++») – окрашено более 30% клеток в «горячих очагах».

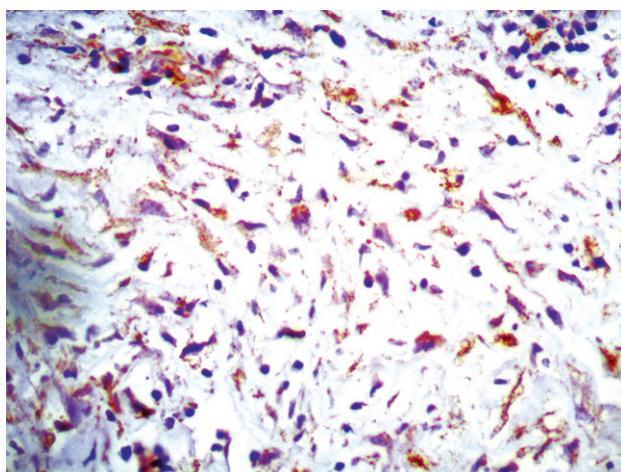
Для маркера Ki-67 учитывали уровень экспрессии 0%, до 4%, до 15%, более 15% опухолевых клеток [19].

Для каждого случая был рассчитан индекс васкуляризации, который определялся как отношение плотности микрососудистого русла по VEGF к плотности микрососудистого русла по CD34. Под плотностью микрососудистого русла подразумевается количество микрососудов, экспрессирующих VEGF или CD34 в 1 мм<sup>2</sup>.

Оценка результатов проводилась при увеличении 400. При количественной и полукачественной оценке результата он оценивался в местах наибольшей экспрессии маркера («горячих очагах») не менее чем в четырех полях зрения. Исследование проводили с использованием микроскопа ZEISS Primo Star и камеры ZEISS AxioCam ERc 5.

### 2. Молекулярно-генетическое исследование.

Для исследования второй по распространенности мутации в изоцитратдегидрогеназе-1 [15] (после мутации IDH-1 R132H), а именно мутации IDH1<sup>105GGT</sup>SNP, проводили молекулярно-генетическое исследование. Выделение ДНК



**Рис. 2. Формирующийся глиальный рубец, экспрессия виментина выражена в реактивно измененных астроцитах, их отростках. Среди глиальных масс присутствуют единичные опухолевые клетки. Увеличение ×400, дополнительное окрашивание гематоксилином Майера**

проводили с использованием набора QIAGEN, Valencia, CA. Изучение праймера IDH1 экзон 4:5' – ACGTTGGATGGC TTGTGAGTGGATGGTA-3' проводили методом полимеразно-цепной реакции на анализаторе Biograd. Исследование проводили в BioBank Association of Ukraine.

### 3. Статистический анализ.

Для анализа количественных показателей были использованы методы математической статистики. Оценку связи между признаками осуществляли при помощи точного критерия Фишера и  $\chi^2$ -Пирсона. Оценку патоморфоза проводили с помощью расчета критерия Мак-Немара. В отдельных случаях был рассчитан U-критерий Манна-Уитни. Для описания качественных характеристик был использован экстенсивный показатель (%). Корреляционную связь между количественными показателями устанавливали при помощи коэффициента корреляции Спирмена. Расчеты выполняли с помощью пакета «Microsoft Excel 2010». Статистическую обработку результатов исследования проводили по общепринятым методикам с использованием пакета «Statistica 10.0».

Патоморфоз экспрессии Ki-67 в случаях парных опухолей до и после рецидива

Номер наблюдения	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Ki-67 до	16,4%	18,3%	25,6%	11,2%	19,3%	19,2%	16,4%	23,2%	15,1%	18,8%	17,3%	19%	21,4%	15,7%	17,4%
Ki-67 после	19,3%	32%	8,7%	16,5%	22,5%	19,4%	17%	25%	21%	24%	17,8%	20,8%	27%	16,4%	20,1%

**РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

Патоморфоз опухолей до и после стандартной терапии в случаях ранних рецидивов был оценен в первую очередь. Статистически значимых изменений экспрессии таких маркеров, как GFAP и EGFR между первичной опухолью и ее ранним рецидивом выявлено не было (расчет  $\chi^2$  Мак-Немара,  $p > 0,05$ ). Экспрессия антитела anti-IDH1R132H было выявлено только у двух пациентов с ранними рецидивами. Экспрессия маркера была умеренно выражена и ее сила не изменилась в ходе лечения.

Гистологически в случаях ранних рецидивов наблюдались выраженные проявления посттерапевтического патоморфоза, а именно: явления реактивного глиоза, некрозы (как детрит, так и различные дистрофически измененные опухолевые клетки), толстостенные сосуды. 73,3% ранних рецидивов имели толстостенные сосуды, в то время как в первичных опухолях такие сосуды присутствовали лишь в 16,7% случаев. Расчет  $\chi^2$  Мак-Немара с поправкой Йейтса=5,042;  $p=0,025$  ( $p < 0,05$ ). Следовательно, в ранних рецидивах достоверно чаще встречаются толстостенные сосуды, чем в случаях предшествовавших им первичных опухолей. Статистически значимых изменений в индексе васкуляризации между первичными опухолями и случаями их рецидивов не выявлено (U-критерий Манна-Уитни;  $p > 0,05$ ).

В группах поздних рецидивов явления посттерапевтического патоморфоза были менее выражены, чем в группе ранних рецидивов. Отчасти это может быть объяснено тем, что первичной опухолью в группе поздних рецидивов в 80% случаев были анапластические астроцитомы, в то время как в группе ранних рецидивов 93% первичных опухолей были глиобластомами. Это могло привести к незначительным отличиям в лучевой и химиотерапии. У пациентов с глиобластомой обязательно применение комбинированной химиолучевой терапии с последующей химиотерапией темазоламидом. При анапластической астроцитоме назначают курс лучевой терапии в таких же дозах и количестве, как при глиобластоме с последующей химиотерапией темазоламидом [1].

При тщательном изучении всех рецидивов был выявлен один случай псевдопрогрессии. Это был единственный случай раннего рецидива, в котором экспрессия Ki-67 резко снизилась с 25,6% до 8,7% по сравнению с первичной опухолью, а также было отмечено снижение экспрессии MMP-9 с 35% (++) до 0%, и экспрессии EGFR с ++ до 0.

H.V. Rouleau и соавторы в своем исследовании утверждают, что высокий уровень пролиферативной активности в первичной опухоли может быть прогностическим маркером псевдопрогрессии [10]. В данном исследовании эта гипотеза подтвердилась, так как первичная опухоль у пациентки с псевдопрогрессией имела самый высокий уровень пролиферативной активности по сравнению с другими опухолями (табл. 3, рис. 1). Однако, по мнению автора, одной лишь оценки уровня экспрессии Ki-67 недостаточно для прогноза развития псевдопрогрессии, поскольку все еще не существуют четких критериев, которые бы однозначно указывали на прогностически значимый уровень экспрессии Ki-67 для диагностики возможного развития псевдопрогрессии.

В дополнение к уже названным изменениям, в исследуемом образце гистологически наблюдались явления реактивного глиоза со слабой экспрессией виментина (рис. 2), фиброза

и перифокального отека, среди массивного некроза встречались единичные живые опухолевые клетки в стадии дистрофических изменений. Важно отметить, что промежуточный филамент виментин может выполнять роль белка, ассоциированного с цитоскелетом в реактивно измененных астроцитах [7] и играет важную роль в формировании глиального рубца [11]. Интраоперационно только случай с псевдопрогрессией опухоли имел четкие контуры, в отличие от других случаев рецидивов, где контур опухоли всегда был нечетко дифференцирован. Из литературных данных известно, что на этапе компьютерной диагностики методом магнитно-резонансной томографии не существует четких критериев, позволяющих отличить псевдопрогрессию от истинного рецидива [3, 4].

I. Melguizo-Gavilanes и соавторы в своем исследовании продемонстрировали, что только в 32% случаев отмечалось совпадение диагноза псевдопрогрессии, установленного на МРТ и при гистологическом исследовании [3]. Однако для дальнейшего лечения пациента такие различия принципиальны, так как влияют на тактику лечения. В случае истинной прогрессии назначают новые курсы лучевой и химиотерапии, в то время как в случаях псевдопрогрессии их не назначают, и лечение направлено на купирование клинической симптоматики [3], как, например, назначение кортикостероидов для борьбы с отеком вещества мозга.

Повышение экспрессии Ki-67 в ткани опухоли отмечалось в 14 случаях ранних рецидивов (табл. 3). Согласно данным ВОЗ, такое повышение характерно для случаев рецидивирования и свидетельствует о неэффективности терапии [19]. В 9 из 14 случаев отмечалось одновременное увеличение экспрессии MMP-9 тканями опухоли. Следовательно, наблюдалось параллельное увеличение как пролиферативного потенциала, так и инвазивных свойств опухоли. Однако расчет точного критерия Фишера не показал достоверной значимости этого явления (критерий Фишера=0,4;  $p > 0,05$ ).

При сравнении групп ранних и поздних рецидивов в группе ранних рецидивов та или иная степень экспрессии EGFR наблюдалась в 66,7% случаях (10 наблюдений), при этом 40% (6 случаев) приходилось на слабовыраженную экспрессию (+). В то время как в случаях продолженного роста только 50% (5 случаев) опухолей экспрессировали EGFR, и все 50% это были случаи умеренной экспрессии маркера. Расчет точного критерия Фишера не показал достоверной значимости различий между экспрессией EGFR в группе ранних и поздних рецидивов (точный критерий Фишера=0,44;  $p > 0,05$ ). Автор предполагает, что преобладание в группе ранних рецидивов опухолей со слабой экспрессией EGFR может быть следствием пройденного курса лечения, в то время как в отдаленных рецидивах прошло больше времени между лечением и рецидивом, вследствие чего экспрессия EGFR могла начать нарастать. Также не было выявлено статистически значимых различий между экспрессией MMP-9 в ранних рецидивах и поздних рецидивах (U-критерий Манна-Уитни;  $p > 0,05$ ). Четкая взаимосвязь между уровнем экспрессии EGFR и MMP-9, а также Ki-67 и MMP-9 не установлена (U-критерий Манна-Уитни;  $p > 0,05$ ), хотя во всех случаях с отсутствием экспрессии EGFR не было выявлено и экспрессии MMP-9.

Расчет U-критерия Манна-Уитни показал, что индекс васкуляризации достоверно выше в ранних рецидивах (U-критерий=32;  $p$  2-сторонний точный=0,016;  $p < 0,05$ ). При

Характеристика основных показателей агрессивности в исследуемых рецидивах

Номер наблюдения	Уровень экспрессии EGFR	Экспрессия MMP-9 (%)	Индекс васкуляризации	Время прошедшее между первой операцией и рецидивом, годы
1	++	38	1,52	0,58
2	+	28	0,9	0,33
3	++	32	2,76	1,00
4	-	0	0,24	1,00
5	++	41,3	1,84	1,00
6	+	20	0,52	1,00
7	+	24	0,66	0,92
8	-	0	0,4	0,83
9	-	0	0,38	0,17
10	-	0	0,35	0,92
11	+	38	1,19	0,50
12	-	0	0,32	0,67
13	+	38	1,38	1,00
14	+++	45	1,44	0,25
15	+	25	0,77	0,42
16	++	22	0,38	5,00
17	++	41,3	0,66	4,00
18	-	0	0,23	13,00
19	-	0	0,32	10,00
20	-	0	0,28	3,00
21	-	0	0,27	8,00
22	++	37	0,65	3,00
23	-	0	0,24	5,00
24	++	28	0,53	3,00
25	++	27	0,54	3,00

анализе корреляционной связи между индексом васкуляризации и временем, прошедшим между первой операцией и рецидивом, была выявлена обратная корреляционная связь средней силы ( $r$  Спирмена = - 0,405), то есть чем больше времени прошло между первой операцией и рецидивом, тем ниже был индекс васкуляризации. Также была выявлена сильная прямая связь между индексом васкуляризации и процентом опухолевых клеток, экспрессирующих MMP-9 ( $r$  Спирмена = 0,893, число степеней свободы ( $f$ ) = 23). Уровень значимости -  $p < 0,05$ . Эти данные еще раз подтвердили тот факт, что процесс инвазии напрямую связан с ангионеогенезом в опухоли. Сводные данные по основным иммуногистохимическим параметрам опухолей представлены в табл. 4.

При оценке изменений со стороны иммунного профиля было отмечено увеличение экспрессии CD8 в ранних рецидивах (73% пациентов показали увеличение экспрессии). Экспрессия же других маркеров (CD3, CD4, CD68) в 60% и более случаев осталась без изменений (рис. 3). Для того чтобы удостовериться в статистической достоверности увеличения инфильтрации опухоли CD8 лимфоцитами был использован тест Мак-Немара. По данным этого теста  $\chi^2$  Мак-Немара с поправкой Йейтса равно 5,625; уровень значимости  $p < 0,05$ . Следовательно, в рецидивирующих в течение года опухолях достоверно точно наблюдается увеличение инфильтрации Т-киллерами (CD-8). К сожалению, опираясь на полученные нами данные, нельзя достоверно сказать, связано ли увеличение количества Т-киллеров с проводимой терапией, или же оно нарастает вне зависимости от метода лечения.

Было сделано предположение, что в группе поздних рецидивов будет выявлен большой процент опухолей экспрессирующих anti-IDH1R132H, однако экспрессия этого

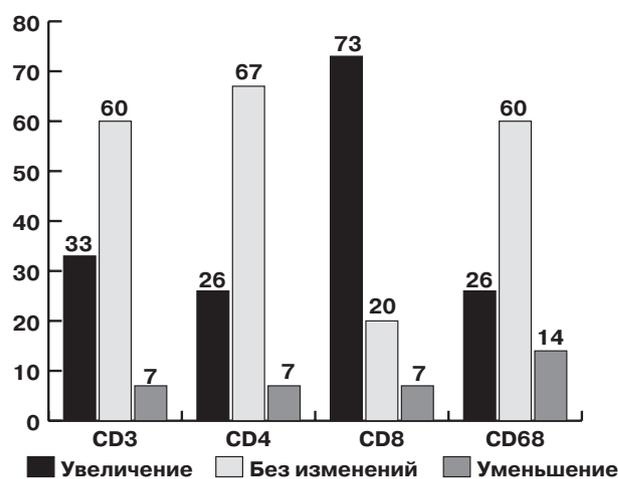


Рис. 3. Изменение экспрессии иммунных маркеров в случаях парных опухолей до и после рецидива (патоморфоз опухолей)

маркера была отмечена лишь в трех случаях позднего рецидивирования. В то время как при оценке дополнительной мутации в изоцитратдегидрогеназе-1 было выявлено, что мутация IDH1<sup>105GGT</sup>SNP достоверно чаще встречается в более отдаленных рецидивах. Для этого было проведено ранжирование по времени между первой операцией и рецидивом и рассчитан U-критерий Манна-Уитни (U=36,5;  $p$  точное=0,043  $p < 0,05$ ). Малочисленные литературные данные по изучению мутации IDH1<sup>105GGT</sup>SNP в злокачественных астроцитарных

опухолях или не обнаруживали связь этой мутации с прогнозом [15], или же, наоборот, говорили о более плохом прогнозе [18]. В связи с этим хотелось бы отметить, что показатель  $p$  в данном исследовании лишь незначительно меньше критического значения, а значит это наблюдение требует дополнительных исследований на более обширных группах.

### Выводы

1. Патоморфоз опухоли из-за пройденной химио- и лучевой терапии более выражен в случаях ранних рецидивов, что может быть связано с различиями в схеме лечения пациентов и сроке, прошедшем после последнего лечения.

2. В случаях ранних рецидивов отмечалось достоверное повышение количества Т-киллеров (CD-8) по сравнению с первичной опухолью (тест Мак-Немара,  $p < 0,05$ ). Это явление указывает на частичную активацию иммунной защиты в глиобластомах (возможно вследствие терапии), однако активация всего лишь одного звена иммунитета недостаточна для замедления опухолевой прогрессии.

3. Индекс васкуляризации был достоверно выше в ранних рецидивах ( $U$ -критерий=32;  $p$  2-х сторонний точный=0,016;  $p < 0,05$ ). Оценка индекса васкуляризации и определение экспрессии VEGF опухолевыми клетками важна при подборе дальнейшей схемы лечения, а именно назначении ингибиторов ангиогенеза – бевацицумаба.

### Гістологічні та імуногістохімічні особливості рецидивів дифузних астроцитарних пухлин III–IV ступеня злоякісності

Т.М. Чертенко

**Мета дослідження:** вивчення випадків рецидування дифузних астроцитарних пухлин III–IV ступеня злоякісності з формуванням рекомендацій для їхньої наступної терапії.

**Матеріали та методи.** Всього було вивчено 25 випадків рецидивів, з них 15 випадків – ранні рецидиви, 10 випадків – віддалені рецидиви. Для аналізу патоморфозу додатково були вивчені первинні пухлини у пацієнтів із групи ранніх рецидивів. Ретроспективно були вивчені медичні картки стаціонарного хворого, проведено гістологічне дослідження пухлин, імуногістохімічне дослідження з 12 маркерами: GFAP, Anti-IDH1R132H, vimentin, EGFR, Ki-67, MMP-9, VEGF, CD34, CD3, CD4, CD8, CD68. Також було проведено молекулярно-генетичне дослідження для виявлення мутації IDH1<sup>105GGT</sup>SNP. Методи математичної статистики застосовані для оцінювання кількісних та якісних показників. Пухлинний патоморфоз у парних випадках оцінювали за допомогою теста Мак–Немара.

**Результати.** Серед досліджуваних пухлин був виявлений один випадок псевдопрогресії. Посттерапевтичний патоморфоз був більш помітним у випадках ранніх рецидивів порівняно з віддаленими. Також ранні рецидиви демонстрували підвищення рівня CD8 порівняно з їхніми первинними пухлинами (тест Мак-Немара,  $p < 0,05$ ). Індекс васкуляризації був достовірно вищим у ранніх рецидивах ( $U$ -критерій=32;  $p$  двобічний точний=0,016;  $p < 0,05$ ). Виявлена сильна пряма залежність між індексом васкуляризації та відсотком пухлинних клітин, що експресували MMP-9 ( $r$  Спірмена=0,893;  $p < 0,05$ ). Мутація IDH1<sup>105GGT</sup>SNP була пов'язана з більш віддаленими рецидивами ( $U$ =36,5;  $p$  точне=0,043;  $p < 0,05$ ).

**Заключення.** Вміння відрізнити випадки справжньої прогресії та псевдопрогресії, а також знання особливостей проліферації, васкуляризації, інвазивної активності та імунної відповіді в рецидиві дозволить в майбутньому розробляти та впроваджувати в практику більш ефективні тактики лікування анапластичних астроцитом та гліобластом.

**Ключові слова:** рецидив злоякісних гліом, гліобластома, анапластична астроцитом, MMP-9, ангиогенез в гліобластомах, CD8, псевдопрогресія гліобластоми, IDH1.

4. Была выявлена сильная прямая связь между индексом васкуляризации и процентом опухолевых клеток, экспрессирующих MMP-9 ( $r$  Спирмена=0,893, число степеней свободы ( $f$ )=23). Уровень значимости  $p < 0,05$ . Это указывает на тесную связь между процессами инвазии и ангиогенеза и должно учитываться при разработке современных стратегий лечения рецидивов.

5. В группе рецидивов при детальном гистологическом и иммуногистохимическом изучении, а также при сопоставлении с клинико-морфологическими данными был выявлен один случай псевдопрогрессии опухоли. Важно уметь отличать случаи псевдопрогрессии от истинной прогрессии, так как в случаях псевдопрогрессии схема лечения более щадящая для пациента.

6. В случаях истинной прогрессии при ранних рецидивах в 100% случаев отмечалось повышение экспрессии Ki-67 опухолевыми клетками по сравнению с первичной опухолью, что указывает на недостаточную эффективность стандартной схемы терапии.

7. Мутация IDH1<sup>105GGT</sup>SNP может быть связана с более отдаленными рецидивами диффузных астроцитарных опухолей III–IV степени злокачественности ( $U$ =36,5;  $p$  точное=0,043;  $p < 0,05$ ). Поэтому необходима проверка наличия этой мутации наравне с мутацией IDH1R132H для более точного прогнозирования течения анапластических астроцитом и глиобластом.

### Histological and immunohistological features of recurrences in patients with high grade diffuse astrocytic tumors

T. Chertenko

**The objective:** to study recurrences of high grade diffuse astrocytic tumors and to attempt to create some recommendations for their following treatment.

**Materials and methods.** 25 relapsed cases were investigated. 15 of them were early recurrences and 10 were late recurrences. The primary tumor specimens from patients with early recurrences were additionally examined to value tumor transformation. Case histories of patients were studied retrospectively. The histological investigation and immunohistochemistry were performed. Immunohistochemical analysis included expression of 12 markers: GFAP, Anti-IDH1R132H, vimentin, EGFR, Ki-67, MMP-9, VEGF, CD34, CD3, CD4, CD8, CD68. Mutation IDH1105GGT SNP was detected through molecular analysis. Statistical analysis was used to value quantitative and qualitative data. Tumor transformation in paired samples was valued with the McNemar test.

**Results.** The one case of pseudoprogression was found among all studied recurrences. Post-treatment effects were more common in early recurrences rather than for late recurrences. In early relapsed tumors, a significant increase of CD8-cell infiltration was observed (McNemar test  $p$ -value=0,01343;  $p < 0,05$ ). The index of vascularisation was significantly higher in early recurrences (Mann-Whitney U test,  $p$  exact=0,016,  $p < 0,05$ ). There was a strong direct correlation between the index of vascularisation and the percentage of tumor cells expressed MMP-9 ( $r$ s=0,893,  $p < 0,05$ ). The mutation IDH1105GGT SNP related to cases of late recurrences (Mann-Whitney U test;  $p$ =0,043  $p < 0,05$ ).

**Conclusion.** It is important to distinguish pseudoprogression from true progression because it leads to a different treatment strategy. The knowledge of proliferative, vascular and invasive features of the relapsed tumor, the study of their immune response will make possible to create and to put into practice the effective personalized treatment for patients with high grade astrocytomas.

**Key words:** recurrence of high-grade glioma, glioblastoma, anaplastic astrocytoma, MMP-9, angiogenesis in glioblastomas, CD8, pseudoprogression of glioblastoma, IDH1.

### Сведения об авторе

Чертенко Таисия Николаевна – Кафедра патологической анатомии Харьковской медицинской академии последипломного образования, 61045, г. Харьков, проспект Московский, 195; тел.: (057) 756-26-07. E-mail: docpathomorph@gmail.com

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Практические рекомендации по лекарственному лечению первичных опухолей центральной нервной системы / [Г.Л. Кобяков, А.Х. Бекашев, А.В. Голанов и др.] // Злокачественные опухоли: Практические рекомендации RUSSCO / [Г.Л. Кобяков, А.Х. Бекашев, А.В. Голанов и др.]. – Москва, 2017. – С. 80–82.
2. CBTRUS statistical report: primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2010-2014. / [Q.T. Ostrom, H. Gittleman, P. Liao et al.] // Neuro-oncology. – 2017. – № 19. – P. 1–88.
3. Characterization of pseudoprogression in patients with glioblastoma: is histology the gold standard? / [I. Melguizo-Gavilanes, J. Bruner, N. Guha-Thakurta et al.] // J Neurooncol. – 2015. – № 123. – P. 141–150.
4. Differentiating pseudoprogression from true progression: analysis of radiographic, biologic, and clinical clues in GBM [Электронный ресурс] / [L. Rowe, J. Butman, M. Mackey et al.] // Journal of Neuro-Oncology. – 2018. – Режим доступа до ресурсу: <https://doi.org/10.1007/s11060-018-2855-z>.
5. Ellis L. VEGF-targeted therapy: mechanisms of anti-tumour activity / L. Ellis, D. Hicklin // Nature Reviews Cancer. – 2008. – № 8. – P. 579–591.
6. Expression of EGFR in paired new and recurrent glioblastomas / [A. Cioca, E.G. Olteanu, M.D. Gisca etc.] // Asian Pac J Cancer Prev. – 2016. – № 17. – P. 4205–4208.
7. Fuchs E. A structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease / E. Fuchs, D.W. Cleveland // Science. – 1998. – № 279. – P. 514–519.
8. Gomez G.G. Mechanisms of malignant glioma immune resistance and sources of immunosuppression / G.G. Gomez, C.A. Kruse // Gene Ther. Mol. Biol. – 2006. – № 10. – P. 133–146.
9. Haouraa Mostafa. Immune phenotypes predict survival in patients with glioblastoma multiforme. [Электронный ресурс] / Haouraa Mostafa, Andrej Pala, Josef Högel // Journal of Hematology & Oncology. – 2016. – Режим доступа к ресурсу: DOI 10.1186/s13045-016-0272-3.
10. High levels of cellular proliferation predict pseudoprogression in glioblastoma patients / [H.B. Pouleau, N. Sadeghi, D. Baleriaux et al.] // Int J Oncol. – 2012. – № 40. – P. 923–928.
11. Jiangkai L. Effect of vimentin on reactive gliosis: in vitro and in vivo analysis / L. Jiangkai, C. Wenqin. // Journal of Neurotrauma. – 2004. – № 11. – P. 1671–1682.
12. Magaña-Maldonado R. Immunological Evasion in Glioblastoma [Электронный ресурс] / R. Magaña-Maldonado, E.G. Chávez-Cortez, N.K. Olascoaga-Arellano // BioMed Research International. – 2016. – Режим доступа до ресурсу: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2016/7487313/cta/>.
13. Nana A.W. Overview of transforming growth factor  $\beta$  superfamily involvement in glioblastoma initiation and progression / A.W. Nana, P.M. Yang, H.Y. Lin // Asian Pac J Cancer Prev. – 2015. – № 16. – P. 6813–23.
14. Ohgaki H. Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas / H. Ohgaki, P. Kleihues. // J Neuropathol Exp Neurol. – 2005. – № 64. – P. 479–489.
15. Prevalence of the single-nucleotide polymorphism rs11554137 (IDH1105G-GT) in brain tumors of a cohort of Italian patients / [G. Acquaviva, M. Visani, D. de Biase et al.] // Scientific Reports. – 2018. – № 8. – P. 44–59.
16. Survival and Prognostic Factors of Anaplastic Gliomas / [M. Nuño, K. Birch, D. Mukherjee et al.] // Neurosurgery. – 2013. – № 73. – P. 458–465.
17. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary / [D. Louis, A. Perry, G. Reifenberger et al.] // Acta Neuropathologica. – 2016. – № 131. – P. 803–820.
18. Wang X.W. Prognostic impact of the isocitrate dehydrogenase 1 single-nucleotide polymorphism rs11554137 in malignant gliomas / Wang. // Cancer. – 2013. – № 119. – P. 806–813.
19. WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System / [D.N. Louis, H. Ohgaki, O.D. Wiestler et al.] – Lyon: IARC, 2007. – 312 p.

Статья поступила в редакцию 22.10.2018