

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
ЗАПОРІЗЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

ШИНКАРЕНКО ТИМОФІЙ ВІКТОРОВИЧ



УДК 616.831-006:576.31-076-091.8

**ПАТОМОРФОЛОГІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА ТА ОПТИМІЗАЦІЯ
ДІАГНОСТИКИ ДИФУЗНИХ ГЛІОМ ГОЛОВНОГО МОЗКУ
(ІМУНОГІСТОХІМІЧНІ АСПЕКТИ)**

14.03.02 – патологічна анатомія

Автореферат дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата медичних наук

Запоріжжя – 2018

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в ДЗ «Дніпропетровська медична академія Міністерства охорони здоров'я України».

Науковий керівник: доктор медичних наук, професор, Заслужений діяч науки і техніки України **Шпонька Ігор Станіславович**, ДЗ «Дніпропетровська медична академія Міністерства охорони здоров'я України», перший проректор, професор кафедри патологічної анатомії і судової медицини.

Офіційні опоненти:

доктор медичних наук, професор **Тертишний Сергій Ігорович**, Запорізький державний медичний університет МОЗ України, завідувач кафедри патологічної анатомії і судової медицини;

доктор медичних наук, професор **Яковцова Ірина Іванівна**, Харківська медична академія післядипломної освіти МОЗ України, завідувач кафедри патологічної анатомії.

Захист дисертації відбудеться « 3 » травня 2018 р. о 14⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 17.600.04 при Запорізькому державному медичному університеті МОЗ України (69035, м. Запоріжжя, пр. Маяковського, 26).

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Запорізького державного медичного університету МОЗ України (69035, м. Запоріжжя, пр. Маяковського, 26).

Автореферат розісланий « 28 » березня 2018 року.

Учений секретар
спеціалізованої вченої ради, к.мед.н.



Т.В. Іваненко

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Обґрунтування вибору теми дослідження. Дифузні гліоми головного мозку (ДГ ГМ) є надзвичайно злоякісними неопластичними процесами з надзвичайно малою однорічною виживаністю, яка коливається у різних країнах в межах 40-50 %, і становлять до 80 % усіх первинних злоякісних пухлин ЦНС (Crocetti E. et al., 2012; Fedorenko Z.P. et al., 2017). Первинна захворюваність зростає на 1-2 % щорічно через збільшення частки людей похилого віку у популяції та впровадження новітніх методів візуалізації (McNeill K.A., 2016; Ostrom Q.T. et al., 2016).

У 2016 році вийшло нове, 4-е переглянуте, видання класифікації пухлин ЦНС. Експерти ВООЗ впровадили масштабні зміни у розділі гліальних пухлин головного мозку, додаючи для окремих нозологічних форм молекулярно-генетичні критерії, зокрема мутацію генів ізоцитратдегідрогенази (ІДГ) (Louis D.N. et al., 2016). З одного боку, експерти ВООЗ звертають увагу до провізорного (попереднього) характеру класифікації, яка потребує подальшого перегляду під дією зростаючого розуміння онкогенезу пухлин ЦНС. З іншого боку, широке застосування імуногістохімічних (ІГХ) методів для визначення облігатного діагностичного критерія (експресії мутованих генів ІДГ) надало новий поштовх для досліджень властивостей ДГ з використанням маркерів Ki-67, p53, GFAP, EGFR, MGMT та інших (Mishra S. et al., 2017; Mellai M., 2017).

Подібність морфологічних проявів дифузних гліом призводить до сумнівності патологоанатомічного висновку, який зроблений на основі звичайного фарбування зрізів (гематоксиліном і еозином). Диференційна діагностика дифузних гліальних пухлин ГМ за ступенем злоякісності (Grade II, III чи IV за ВООЗ) та типом пухлини (астроцитарна чи олігодендрогліальна) ускладнена нечіткістю суб'єктивних критеріїв, частим поєднанням рис притаманних різним пухлинам в одному зразку, численними гістологічними артефактами властивими нервовій тканині (Louis D.N. et al., 2016). Поєднання у патологоанатомічному діагнозі вказівок на Grade двох чи навіть трьох градацій не рекомендується. Останніми роками дискусійним стало питання наявності вилучених з сучасної класифікації категорій «олігоастроцитома» і «анапластична олігоастроцитома», до яких раніше відносили пухлини, які демонстрували одночасно астроцитарний та олігодендрогліальний фенотип. Олігоастроцитарні (змішані) форми дифузних гліом за рідкісним виключенням є результатом онкогенетичних механізмів, які властиві астроцитарним або олігодендрогліальним пухлинам (Huse J.T., 2015; Zülch K.J., 2013).

Таким чином, зростаюча зацікавленість дослідників до вивчення ДГ ГМ пояснюється відносною частотою виникнення цих пухлин у людській популяції в Україні та світі, низьким рівнем виживаності пацієнтів, появою в 2016 р. нової класифікації пухлин ЦНС ВООЗ. ІГХ технології необхідні у диференційній діагностиці морфологічно близьких пухлин ГМ, які характеризуються різними прогнозом натурального перебігу захворювання і відповіддю на лікування, а тому потребують диференційованої тактики ведення пацієнтів.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Представлена робота є фрагментом 2-х науково-дослідних робіт кафедри патологічної анатомії і

судової медицини ДЗ «Дніпропетровська медична академія Міністерства охорони здоров'я України»: «Патоморфологічна діагностика та прогноз перебігу новоутворень різних локалізацій з урахуванням маркерів біологічних властивостей», 2012-2015 рр. (№ держреєстрації 0112U006965) і «Розробка діагностичних та прогностичних критеріїв новоутворень різних локалізацій з урахуванням біологічних показників активності пухлинного процесу», 2016-2018 рр. (№ держреєстрації 0116U002827), в яких дисертант є безпосереднім виконавцем досліджень імуногістохімічних властивостей гліальних пухлин головного мозку. Автором особисто проведено гістологічне та імуногістохімічне дослідження матеріалу, виконано статистичний аналіз результатів.

Мета і завдання дослідження. Оптимізувати діагностику дифузних гліом головного мозку шляхом уточнення диференційних морфологічних критеріїв на підставі вивчення особливостей імуногістохімічної експресії маркерів біологічних властивостей тканин.

Для досягнення поставленої мети були сформульовані наступні завдання:

1. Визначити діагностичне значення порушень регуляції клітинного циклу в дифузних гліомах головного мозку на основі вивчення проліферативної активності (Ki-67) та особливостей експресії рецептору епідермального фактору росту (EGFR).

2. Проаналізувати порушення апоптозу та репарації ДНК у різних формах дифузних гліальних пухлин на основі досліджень експресії TP53 та MGMT.

3. Вивчити рівні імунореактивності дифузних астроцитарних та олігодендрогліальних пухлин головного мозку за маркерами гістогенезу (GFAP, віментин, цитокератин AE 1/3) та їх диференційно-діагностичний потенціал.

4. Встановити особливості експресії IDH1 R132H у дифузних гліальних пухлинах головного мозку та діагностичну значущість IDH1 R132H-статусу.

5. Дослідити рівень інвазивного потенціалу шляхом аналізу експресії матриксних металопротеїназ (MMP3, MMP9) у дифузних гліомах головного мозку астроцитарного та олігодендрогліального типів різного ступеня злоякості.

6. Оцінити інтенсивність ангиогенезу в залежності від гістологічної форми дифузних гліальних пухлин головного мозку на основі визначення кількісних характеристик мікросудин з використанням імуногістохімічного методу.

7. Уточнити основні та додаткові диференційно-діагностичні імуноморфологічні властивості дифузних гліальних пухлин головного мозку в верифікації їх морфологічного типу (астроцитарна чи олігодендрогліальна) та ступеня злоякості за ВООЗ (Grade II, III чи IV).

Об'єкт дослідження – дифузні астроцитарні та олігодендрогліальні пухлини головного мозку.

Предмет дослідження – гістологічні та імуноморфологічні особливості гліальних пухлин головного мозку.

Методи дослідження: гістологічний та імуногістохімічний – для вивчення характеристик дифузних гліом головного мозку; морфометричний – для кількісної оцінки імуноморфологічних параметрів; статистичний – для обробки та аналізу отриманих даних.

Наукова новизна одержаних результатів. У роботі вивчено широкий комплекс гістологічних та імуногістохімічних ознак, уточнено критерії, які вказують на ступінь злякості за ВООЗ (Grade II, III чи IV) і тип пухлини (астроцитарний чи олігодендрогліальний). Удосконалено алгоритми диференційної діагностики дифузних гліом з впровадженням основних і додаткових критеріїв при імуноморфологічному дослідженні біопсійного та операційного матеріалу. Запропоновано досліджувати морфометричні характеристики мікросудин пухлинної тканини на основі їх GFAP-імунонегативності при вираженій або помірній експресії генів проміжних філаментів в оточуючих пухлинних клітинах дифузних гліальних пухлин, що дозволяє звзвити діагностичну панель за рахунок виключення судиноспецифічних маркерів. Розроблено категорії оцінки експресії досліджуваних імуногістохімічних маркерів на основі аналізу цифрових зображень програмним забезпеченням ImageJ з об'єктивізацією результатів досліджень. З приводу розробленого авторського способу діагностики отримано патент України на корисну модель №113278 «Спосіб діагностики пухлин головного мозку астроцитарного походження».

Практичне значення одержаних результатів. Представлені в роботі результати є об'єктивною характеристикою імуноморфологічних властивостей дифузних астроцитарних та олігодендрогліальних пухлин, що стало основою для рекомендацій щодо використання в якості основних та додаткових диференційно-діагностичних критеріїв особливостей експресії генів, пов'язаних з метаболічними змінами, інвазивними властивостями, репарацією ДНК, регуляцією клітинного циклу та апоптозу. На основі визначення ІГХ характеристик у гліальних пухлинах головного мозку уточнені алгоритми використання ІГХ дослідження у клініці для підвищення точності патоморфологічного висновку. Розроблені алгоритми дозволили оптимізувати діагностичну схему з наступним підвищенням ступеня вірогідності діагнозу, що необхідно для корекції хіміотерапевтичного та радіологічного лікування з прогностичними, економічними та соціальними перевагами для хворих. Отримані дані є доцільними для використання у практичній діяльності лікарів-патологоанатомів, нейрохірургів, онкологів, при викладанні на кафедрах патологічної анатомії, нейрохірургії, онкології.

Результати проведених досліджень впроваджені в роботу КЗ «Дніпропетровське обласне патологоанатомічне бюро», КУ «Одеське обласне патологоанатомічне бюро», Полтавського обласного патологоанатомічного бюро, навчально-наукового медичного центру «Університетська клініка» ЗДМУ.

Теоретичні та практичні положення дисертації використовуються в навчальному процесі кафедри патологічної анатомії і судової медицини ДЗ «Дніпропетровська медична академія Міністерства охорони здоров'я України», кафедри патологічної анатомії з секційним курсом ВДНЗУ «Українська медична стоматологічна академія», м. Полтава, кафедри патологічної анатомії Сумського державного університету, кафедри патологічної анатомії Харківського національного медичного університету, кафедри патологічної анатомії та судової медицини ДВНЗ «Івано-Франківський національний медичний університет», кафедри патологічної анатомії і судової медицини Запорізького державного медичного університету.

Особистий внесок здобувача. Дисертаційна робота є самостійним дослідженням автора з розробкою та втіленням оригінальних ідей та задумів. За допомогою наукового керівника складено програму дослідження та визначено основні етапи роботи. Автором особисто проведений аналіз операційного матеріалу, виконані гістологічні й імуногістохімічні дослідження, аналіз, узагальнення та статистична обробка отриманих результатів, сформульовані висновки й рекомендації, підібраний й оформлений ілюстративний матеріал, написані всі розділи дисертації. Результати роботи відображені в публікаціях, представлені на наукових з'їздах, конференціях і конгресах. У роботах, виконаних у співавторстві, ідеї та основні положення належать дисертантові. Автором не були використані результати та ідеї співавторів публікацій. Співавторами здійснювались консультації стосовно проведення ПХ досліджень та статистичної обробки результатів.

Апробація результатів дисертації. Матеріали дисертації та її фрагменти були представлені та обговорені на науково-практичній конференції «Актуальні проблеми сучасної патологічної анатомії» (Київ, 26-27 квітня 2017 року), підсумковій науково-практичній конференції «Здобутки клінічної та експериментальної медицини» (Тернопіль, 16 березня 2017 року), V Міжнародній науково-практичній конференції студентів та молодих вчених (Суми, 20-21 квітня 2017 року), науково-практичній конференції з міжнародною участю «Теорія та практика сучасної морфології» (Дніпро, 5-7 жовтня 2016 року), XX Міжнародному медичному конгресі студентів та молодих вчених (Тернопіль, 25-27 квітня 2016 року), XVI і XVII Міжнародних конференціях студентів та молодих учених «Новини і перспективи медичної науки» (Дніпро, 2016; 2017), Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених та студентів «Здобутки теоретичної медицини – в практику охорони здоров'я» (Запоріжжя, 24-25 березня 2016 року).

Апробація дисертаційного дослідження була проведена на спільному засіданні кафедр патологічної анатомії і судової медицини, гістології, клінічної анатомії, анатомії і оперативної хірургії, медичної біології, фармакогнозії та ботаніки ДЗ «Дніпропетровська медична академія Міністерства охорони здоров'я України» 29 листопада 2017 р.

Публікації. За темою дисертації опубліковано 17 наукових праць, які повністю відображають зміст проведеного дослідження. Із них 8 статей, виданих у наукових фахових журналах (у тому числі дві – одноосібно та одна – у закордонному фаховому журналі), 8 тез матеріалів наукових конференцій та конгресів, 1 патент на корисну модель.

Обсяг та структура дисертації. Дисертація викладена на 212 сторінках, включає вступ, огляд літератури, опис матеріалів і методів, 3 розділи власних досліджень, аналіз та узагальнення результатів дослідження, висновки, практичні рекомендації, список літератури та додатки. Роботу ілюстровано 27 таблицями та 56 рисунками. Список використаних літературних джерел містить 293 найменування (36 – кирилицею, 257 – латиницею).

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріал і методи дослідження. Для вирішення сформульованих задач були відібрані 52 гістологічно діагностовані ДГ різних ділянок ГМ. Співвідношення чоловіків і жінок, включених у дослідження, склало 1,08:1 (27 чоловіків і 25 жінок). Вік пацієнтів у відібраній групі коливався в діапазоні 22 – 73 років, середній вік склав $43,12 \pm 11,20$ років. Було сформовано дві групи за віком пацієнтів: старші та молодші 50 років (31 і 21 відповідно). За гістологічною будовою спостереження були представлені астроцитарними пухлинами Grade II-IV та олігодендрогліальними пухлинами Grade II-III: 7 дифузних астроцитом (Grade II), 9 анапластичних астроцитом (Grade III), 24 гліобластоми (Grade IV), 7 олігодендрогліом (Grade II), 5 анапластичних олігодендрогліом (Grade III). Серед дифузних астроцитом були також 2 випадки гемістоцитарних астроцитом. Гігантоклітинні гліобластоми (3 спостереження) та 1 гліосаркому віднесли до гліобластом згідно з класифікацією пухлин ЦНС WHO (Louis D.N. et al., 2016). Для дослідження впливу різноманітних морфологічних факторів на прогресування ДГ і визначення їх діагностичної ролі було сформовано групи пацієнтів за ступенем злоякісності: Grade II – 14 пацієнтів, Grade III – 14 пацієнтів, Grade IV – 24 пацієнта. Також випадки були розділені за типом пухлини: 40 астроцитарних та 12 олігодендрогліальних ДГ. В якості контролю були використані зразки нормальної тканини ГМ (аутопсійний матеріал), а також зразки, отримані у пацієнтів з реактивним гліозом (при енцефаліті).

Парафінові зрізи товщиною 4 μm , отримані на мікромомі Microm HM-340 з сформованих за стандартним алгоритмом охолоджених гістологічних блоків, фарбували гематоксиліном і еозином. Світлова мікроскопія проводилась за допомогою мікроскопу Axio Scope.A1 з використанням об'єктивів Ч10, Ч20, Ч40, Ч100. Під час мікроскопічного дослідження враховували наступні характеристики ДГ ГМ: гістологічний тип будови, особливості інфільтрації перитуморальної зони, морфотип мікросудин, кальцифікати, некротичні вогнища, мітози. На основі мікроскопічного дослідження обиралися найкращі блоки для подальшого ІГХ дослідження.

Зрізи відібраних парафінових блоків розташовували на спеціальних адгезивних предметних скельцях SuperFrost Plus (ThermoScientific ((TS)). Після спиртової обробки зрізів (депарафінізації та регідратації), обробки детергентом (ксилол) проводили температурне демаскування антигенів у цитратному буфері з рН 6.0 і підігрівали протягом 20 хвилин в мікрохвильовій печі (+100°C). Зниження активності ендогенної пероксидази проводили Ultra Vision Quanto Peroxidase Blok, TS протягом 10 хвилин при температурі 21-22°C. У подальшому відбувалась інкубація підготовлених зрізів з первинними антитілами у вологих камерах протягом 30 хвилин при температурі 20-25°C. В якості первинних антитіл використовували моноклональні антитіла до Ki-67 (маркеру проліферативної активності), p53 (маркеру апоптозу), MGMT (маркеру репарації ДНК), EGFR (рецептору епідермального фактору росту), віментину (протеїну переважно мезенхімальних проміжних філаментів), цитокератину AE1/AE3 (протеїнів епітеліальних проміжних філаментів), IDH1 R132H (продукту експресії мутованого гену IDH1), MMP3 та MMP9 (матриксних металопротеїназ 3 та 9), поліклональні антитіла до GFAP (протеїну

проміжних філаментів глії). Титр антитіл був підібраний індивідуально для кожного маркеру, спираючись на рекомендації виробників та результати контрольних досліджень, які включали зовнішній та/або внутрішній контроль. У якості розчинника використовували спеціальний розчин Antibody Diluent (DakoCytomation, Данія). Наступний крок – інкубація зрізів з Ultra Vision Quanto Amplifier (TS) та Ultra Vision Quanto Polymer (TS) по 10 хвилин на тих же умовах. Далі, для ідентифікації реакцій наносився розчин хромогену 3-діамінобензидин тетрахлориду (ДАБ) (Quanto, LabVision) під контролем мікроскопу від 20 секунд до 3 хвилин, з проявом у вигляді коричневого забарвлення специфічних структур в залежності від маркеру (ядерна, цитоплазматична, мембранна реакція). Для ідентифікації тканинних структур зрізи додатково забарвлювали гематоксиліном Майєра протягом 1 хвилини. Наступна дегідратація і включення у бальзам здійснювалися згідно з загальноприйнятими стандартами. Диференційоване фарбування тканини слугувало внутрішнім контролем (наприклад, негативна реакція ендотелію при позитивній реакції пухлинних клітин і навпаки), в окремих випадках був застосований зовнішній контроль.

Для оцінки ІГХ забарвлення був використаний напівкількісний аналіз цифрових зображень. Імуногістохімічно забарвлені тканинні зрізи під збільшенням Ч400 світлового мікроскопу були зафіксовані, як цифрові зображення JPEG формату при однакових умовах освітлювання (ручний режим фотографування A/N/M: світлочутливість ISO 100, експозиція 1/15 секунди, діафрагма 1,6мм), за допомогою цифрової фотокамери Canon 1200D. В кожному зрізі 3 репрезентативні ділянки (3 мікрофотографії) підлягали дослідженню в поширеній програмі для аналізу та обробки цифрових зображень ImageJ. Плагін «Point Picker» використовували для ручного найточнішого підрахунку імунореактивних та імунонегативних пухлинних клітин та ендотелію при інтрануклеарній реакції (Ki-67, p53, MGMT). На основі отриманих кількостей підраховували індекс проліферації (PI) за Ki-67 та подібні йому індекси експресії p53 і MGMT. Плагіном «ImmunoRatio» був проведений автоматичний підрахунок частки площі імунореактивних ядер по відношенню до загальної нуклеарної площі. Плагін «Colour Deconvolution» має вбудовану схему кольорів для аналізу забарвлень «Гематоксилін» і «ДАБ», щоб розділити зображення на синій та коричневий колір, тобто відокремити ДАБ-пофарбовані від гематоксилін-пофарбованих ділянок. Після бінаризації ДАБ-пофарбованих ділянок за допомогою гістограми кольорів отримували площу таких ділянок. Підраховували відсоток площі зрізу, зайнятий імунореактивними протеїнами. Така технологія була використана для протеїнів з цитоплазматичним або мембранно-цитоплазматичним розташуванням (EGFR, GFAP, віментину, цитокератину AE1/AE3, MMP3 та MMP9). Щільність розташування мікросудин (ЩРМ) у зразках ДГ ГМ підраховували за формулою: кількість судин в трьох ділянках ділили на площу сфотографованих ділянок у мм².

Для статистичної обробки даних використовували можливості ліцензійної програми STATISTICA 6.1 (StatSoftInc., серійний №AGAR909E415822FA). На першому етапі обробки отриманих числових даних перевіряли нормальність розподілу за допомогою критерію Шапіро-Вілка (Shapiro-Wilk). Залежно від результатів перевірки в подальшому підраховували параметричні та непараметричні

(переважно) статистичні критерії та представляли дані у вигляді $M \pm m$ (M – середнє арифметичне значення, m – стандартна похибка середнього) або медіана з інтерквартильним інтервалом – Me (25 %; 75 %) відповідно. Для перевірки наявності різниці між показниками незалежних груп використовували U критерій Манн-Уїтні, для залежних груп – критерій Вілкоксона. Для виявлення та аналізу сили і напрямку кореляційних зв'язків між числовими параметрами знаходили значення рангового коефіцієнту кореляції Спірмена (r) та його достовірність. У ході роботи числові показники (відносна площа імунореактивної тканини, індекс експресії певного гену) були переведені у порядкову шкалу – MMR^+ та MMR^{3++} , $PI > 10\%$ та $PI < 10\%$ тощо. Для аналізу таблиць спряженості використовували критерій χ^2 Пірсона; у випадку малих значень (≤ 5) у хоча б одній комірці застосовували критерій χ^2 Пірсона з поправкою Йетса, а при нульових значеннях – точний тест Фішера. При всіх статистичних розрахунках результати вважали достовірними при $p < 0,05$.

Результати дослідження та їх обговорення. Дослідження присвячено оптимізації діагностики дифузних гліом головного мозку шляхом визначення диференційних морфологічних критеріїв на підставі вивчення особливостей імуногістохімічної експресії маркерів біологічних властивостей тканин.

Аналіз процесів регуляції клітинного циклу та репарації ДНК. Індекс проліферації (Ki-67) варіював від 2,8 (2,4; 3,7) % у дифузних гліомах Grade II до 15,1 (13,1; 20,1) % у гліобластомах. Таким чином, PI пухлинних клітин прямо пов'язаний із ступенями злоякісності гліоми ($r = +0,756$; $p < 0,05$), проте статистична значущість відмінностей була зафіксована тільки між низькозлоякісними (Grade II) гліальними пухлинами, з одного боку, і анапластичними (Grade III) гліомами ($p < 0,0001$) та гліобластомами ($p < 0,0001$) з іншого. PI за Ki-67 був вищим в астроцитарних пухлинах ($p = 0,034$), але при порівнянні гліом, які належать тільки до Grade II-III, різниця нівелювалась ($p = 0,576$), що свідчить про непридатність цього параметру для диференційної діагностики між пухлинами астроцитарного та олігодендрогліального типів. Потрібно зазначити, що Skjulsvik et al. (2014) та інші групи дослідників незалежно один від одного прийшли до схожих висновків.

Більшість імунореактивних за Ki-67 клітин (84,5 %) не продемонстрували специфічних для мітозу морфологічних характеристик, що пояснює значно вищі показники PI в порівнянні з мітотичним індексом при високій кореляції цих індексів проліферативного потенціалу. Саме тому, значення мітотичного індексу та щільності розташування мітотичних фігур не задовольняють потребу в точному визначенні інтенсивності поділу клітин, і можуть свідчити на користь окремих діагностичних форм тільки в комплексі з іншими критеріями.

Відмічено значну неоднорідність мітотичної активності у різних ділянках зразків, що може бути причиною помилкової інтерпретації Grade за VOOЗ, особливо у біоптатах, але ІГХ аналіз дозволяє вирішити вказану проблему. Високий рівень PI при загалом доброякісному фенотипі свідчив в бік більшого Grade за VOOЗ; в такому випадку зразок ймовірно був взятий з периферії пухлини, зона інфільтративного росту якої гістологічно більш мономорфна, ніж центр. А низький рівень Ki-67-імунореактивності на фоні високої щільності клітин з досить плеоморфним складом може бути результатом гліозу, який є характерним як для

ДГ ГМ, так і непухлинних захворювань і є стереотипною реакцією мозкової тканини на пошкодження різної етіології.

В дослідженнях Olar A. et al. (2015) відмічено значимість ІІ для прогнозу захворювання, незалежно від інших клініко-морфологічних параметрів. Таким чином, підвищується важливість об'єктивного визначення ІІ у зразках ДГ ГМ, навіть при безсумнівності гістологічного діагнозу. Для забезпечення повторюваності результатів імуногістохімічних досліджень є доцільним використання цифрових технологій. Плагін «ImmunoRatio» програмного забезпечення ImageJ дозволяє визначити у мікрофотографії зрізу відсоток площі імунореактивних ядер (пофарбованих ДАБ), по відношенню до загальної площі ядер (пофарбованих гематоксиліном та ДАБ). Результати обчислення ІІ у дифузних астроцитарних та олігодендрогліальних пухлинах при застосуванні плагіну «ImmunoRatio» сильно прямо ($r=+0,732$, $p<0,05$) корелювали з ідеальним підрахунком, що дозволяє рекомендувати цифрове напівавтоматичне визначення індексів експресії генів ядерних протеїнів для впровадження у ІГХ лабораторіях. Недоліками такого методу треба вважати наявність ядер безсумнівно непухлинних клітин (нейронів, макрофагів, ендотелію), неядерних (кальцифікати) та артефактних (у крайових ділянках зрізу) базofilних ділянок, що іноді призводить до неможливості обчислення ІІ (в зразках невеликого розміру). У інших пухлинах вибір суперечливих ділянок може призводити до зниження значення ІІ (Ki-67), а свідоме уникання таких ділянок в деяких випадках є причиною вибору нерепрезентативних полів зору.

Інтенсивне ядерне фарбування протеїну p53 за допомогою ІГХ технологій у значній частці пухлинних клітин характеризує стан апоптичних механізмів, а саме змін відповідного гену (TP53). Таке визначення базується на значно збільшеному періоді напіврозпаду білкових продуктів генів TP53 з найбільш поширеними мутаціями в гліомах. Інтенсивне інтрануклеарне накопичення протеїна-регулятора апоптозу p53 (більше 10% ядер) характерне для половини ДГ ГМ, що підтверджує важливість уникнення від апоптозу для онкогенезу цієї групи пухлин. Навпаки, контрольні зразки ГМ показали слабке ядерне забарвлення лише в деяких клітинах, як в нашому дослідженні, так і в інших. При гліозі відзначалися більші значення індексу експресії p53 в порівнянні з нормальною тканиною, що Kurtkaуа-Үарісієг Ö. et al. (2002) пояснюють епігенетичними механізмами регуляції при «диких» генах TP53. Відсутність високих значень показника p53-імунореактивності при реактивних змінах мозкової тканини дозволяє диференціювати останні від гліальних пухлин, за виключенням зони інфільтративного росту, а також p53-імунонегативних неоплазій. Позитивна реакція ядер ендотеліоцитів, лейкоцитів, нейронів за маркером p53 не впливає на індекс експресії через слабкість забарвлення і відносну нечисленність клітин вказаних диферонів.

Продукт експресії дикого гену TP53 не тільки впливає на механізми апоптозу, а й блокує процеси клітинного поділу в фазі G1. Інактивація цього механізму передбачувано призводить до підвищення здатності клітин до самовідтворення. Втім, не було знайдено значущої залежності рівня p53-імунореактивності при розподілі

випадків за ІІ пухлинних клітин ($p=0,158$) та Grade за ВООЗ ($p=0,231$). Значно більше експресували TP53 астроцитарні пухлини (57,5 %), ніж олігодендрогліальні (25,0 %), $p=0,048$, проте при вилученні гліобластом така закономірність втратила статистичну достовірність.

Для адекватного вибору хіміотерапевтичного лікування велике значення має визначення наявності метилювання гену-промотора гена O-6-метилгуанін-DNA метилтрансферази (MGMT), що призводить до зниження експресії гену відповідного протеїну-репаратора і підвищення нестабільності геному. Такі епігенетичні зміни вкрай полегшують прогресування пухлини, але в той же час роблять пухлинні клітини вразливими до метилюючого агенту темозоламід. Найбільші індекси експресії MGMT спостерігалися в гліобластомах – 9,5 (0; 20,7) %, а також астроцитарних пухлинах загалом – 8,4 (0; 19,3) %, що відображає меншу частоту метильованих геномів у первинних гліобластомах. Однак, суттєвого діагностичного значення виявлених відмінностей MGMT-імунореактивності виявлено не було: всі клініко-морфологічні параметри (вік та стать пацієнтів, ІІ, Grade та тип пухлини) були статистично незалежними від рівня експресії гену MGMT ($p<0,05$). Суперечливість даних щодо діагностичної цінності MGMT-статусу, які надані різними групами дослідників (Q. Yuan et al., 2003; S. Nakasu et al., 2004; D. Capper et al., 2008), може бути пояснена різними варіантами оцінки та нерівнозначними вибірками пацієнтів.

Мембранне або мембранно-цитоплазматичне накопичення рецептору епідермального фактору росту (EGFR), так як і наступних досліджуваних протеїнів, аналізували на основі обчислення відносної площі забарвлення хромогеном діамінобензидином (ДАБ) у %. Для надекспресії EGFR за порогове значення прийняли 50 % площі. Аналіз розподілу випадків за рівнем імунореактивності показав прямі зв'язки надекспресії EGFR з Grade ($p<0,001$) та ІІ пухлинних клітин ($p=0,002$) дифузних гліом. Значуща відмінність за надекспресією EGFR була зафіксована між групами анапластичних та дифузних гліом головного мозку Grade ІІ ($p=0,022$). Надекспресію EGFR частіше реєстрували у астроцитарних пухлинах (65,0 %), ніж в олігодендрогліальних (58,3 %). Потрібно відмітити, що виключивши гліобластоми (Grade IV) із підгрупи астроцитарних, відмінність між типами гліом залишалася статистично незначущою, $p=0,152$. Наведені закономірності частково підтверджуються даними Birner P. et al. (2011) та повністю узгоджуються з думкою Horbinski C. et al. (2011) про виражене зростання інтенсивності експресії EGFR при трансформації низькозлоякісних гліом у відповідні анапластичні форми при подібних показниках в астроцитарних та олігодендрогліальних пухлинах Grade ІІ-ІІІ.

Аналіз експресії генів проміжних філаментів. Неопластично-трансформовані клітини дифузних гліальних пухлин характеризуються синтезом проміжних філаментів, які складаються з гліального фібрилярного кислого протеїну (GFAP) та віментину, іноді – додатково нестину та сіменину. GFAP надмірно накопичувалась у перикаріоні та потовщено-вкорочених відростках астроцитарних неопластичних клітин, що дозволяє відрізнити їх від нормальних та реактивних астроцитів оточуючої мозкової тканини.

Гліальні пухлини характеризувались високим рівнем експресії GFAP, але

олігодендрогліальні пухлини відзначалися суттєво меншою GFAP-імунореактивністю в порівнянні з астроцитарними ($p=0,004$), до того ж навіть при виключенні з групи астроцитарних пухлин гліобластом ця відмінність зберігалась ($p=0,024$). Існують спостереження (Zhou R., Skalli G., 2000), що вказують на зменшення експресії GFAP у гліобластомах в порівнянні з більш диференційованими пухлинами, що не знайшло свого підтвердження при аналізі відносних площ імунореактивної тканини: взаємозв'язок інтенсивності експресії GFAP з ступенем злоякісності пухлини за класифікацією WHO був несуттєвим.

Віментин є основним проміжним філаментом клітин мезенхімального походження, а тому асоціюється з рухливістю клітин, які його експресують, в тому числі при інвазії у перитуморальну тканину. Підвищення рівня експресії віментину зустрічають при епітеліально-мезенхімальній трансформації, тому закономірно визначалась Grade-залежність віментин-імунореактивності у ДГ ГМ. Нами було показано, що віментин в більшій мірі надекспресується (відносна площа імунореактивної тканини $>40\%$) у гліобластомах, ніж у менш злоякісних гліальних пухлинах ($p<0,001$).

Переважаання астроцитарних пухлин серед гліом з високими рівнями експресії віментину ($p=0,003$) зникало при виключенні гліобластом ($p=0,989$). При цьому олігодендрогліальні пухлини виявились взагалі не схильними до експресії віментину, більшість з них (58,3%) продемонструвала віментин-негативність пухлинних клітин при вираженому фарбуванні судинної стінки (внутрішній контроль), що підкріплюється даними літератури (Ikota H. et al., 2006). Використанню віментину у диференційній діагностиці астроцитарних та олігодендрогліальних пухлин треба віддавати перевагу через високу відтворюваність результатів, забезпечену простою інтерпретацією результатів ІГХ реакцій.

Результати імуноблотових досліджень Kriho V. K. et al. (1997), показали, що неопластичні астроцити в гліомах не виробляють молекул цитокератину і що ІГХ результати базуються на перехресній реактивності між GFAP, виробленим неопластичними астроцитами, і фракцією AE3 цитокератину AE1/AE3. Крім того, у гліобластомах можуть зустрічатися епітеліоїдні ділянки, клітини яких експресують цитокератини. Відзначалась Grade-залежність цитокератин-позитивного статусу зразків при пороговому значенні $>10\%$ площі ($p=0,013$) з переважанням цитокератин-позитивних гліобластом над такими анапластичними гліомами ($p=0,042$), що підтверджується попередніми роботами Terada T. (2015). Нижча частка імунореактивних олігодендрогліальних пухлин все ж не мала статистичної відмінності від астроцитарних (на умовах неврахування гліобластом серед останніх), $p=0,378$. Максимальна площа цитокератин-імунореактивної тканини вогнищево склала 24,7% при варіабельній за інтенсивністю ІГХ реакції на цитокератин у епітеліальних злоякісних новоутвореннях (Vora H. N. et al., 2009; Shi, Y. et al., 2013). Наведені результати потребують врахування та ускладнюють диференційну діагностику гліобластом (особливо при наявності епітеліоїдних рис) і метастазів раку з низьким рівнем диференціювання.

Аналіз показників мікросудинного русла дифузних гліом. Проліферація із збільшенням щільності розташування пухлинних клітин призводить спочатку до

залучення вже існуючих судин (інкорпорація), а потім викликає брунькування останніх і формування численних відгалужень (ангіогенез). ПІ ендотелію мікросудин, який характеризує напруженість процесів ангіогенезу, визначався на основі Ki-67-імунореактивності. Потрібно відмітити істотний взаємозв'язок показників проліферації ендотелію мікросудинного русла та пухлинних клітин ($p=0,001$), а встановлені суттєві відмінності за вказаним параметром серед пухлин Grade II і Grade III ($p=0,023$) надають можливість рекомендувати визначення ПІ мікросудин тільки у якості допоміжного критерію через відносну складність підрахунку та обчислення, а також низький рівень достовірності відмінності. Астроцитарні та олігодендрогліальні пухлини Grade II-III характеризувалися подібними значеннями ПІ ендотелію ($p=0,274$).

Щільність розташування мікросудин (ЩРМ) вивчали на основі GFAP-імунонегативності мікросудин при вираженій або помірній експресії відповідного гену пухлинними клітинами. Перевагою цього методу можна визнати одночасну диференціацію пухлинної тканини від оточуючої інфільтрованої тканини головного мозку, що дозволяє вивчати судини саме центральної частини пухлин Grade III-IV. ЩРМ прямо сильно корелювала з Grade за ВООЗ ($r=+0,726$; $p<0,05$), що пояснюється більшою потребою компактніших анапластичних пухлин у кисні та поживних речовинах. Високі значення ЩРМ ($>100/\text{мм}^2$) достовірно частіше зустрічали у пухлинах Grade III та Grade IV, ніж у дифузних гліомах Grade II ($p=0,018$ і $p=0,003$ відповідно). Подібні результати, отримані Voguah D. et al. (2014), не мали статистичної значущості, можливо, через менший розмір вибірки і недосконалі морфометричні алгоритми. Дослідження морфології мікросудин дозволило визначити переважання прямих дрібних мікросудин у дифузних гліомах Grade II, велику поширеність мікроваскулярних скупчень («гірлянд») у анапластичних гліомах та гліобластомах; характерні виключно для гліобластом гломерулоїдні структури (діагностичний критерій за класифікацією ВООЗ) спостерігалися у невеликій кількості гістологічних зразків (29,2 %).

Аналіз метаболічних змін у гліальних пухлинах. Загальновідомо, що інвазивні властивості клітин забезпечуються численними механізмами, серед яких найдослідженішим є руйнування навколишньоклітинного матриксу під впливом ферментів, які входять здебільшого до родини матриксних металопротеїназ (ММР), надмірний синтез яких зафіксовано у солідних новоутвореннях.

Серед маркерів інвазивних властивостей пухлинних клітин особлива увага приділяється експресії ММР2 та ММР9, що пояснюється їх внеском у ангіогенез та переміщення неопластичних клітин у навколишньоклітинному матриксі головного мозку. Thorns V. et al. (2003), як і ми, спостерігали концентрування ММР периваскулярно, а також у перифокальних зонах пухлин. Локалізація ММР у пухлинних клітинах і в ендотелії судин пояснюється їх підвищеним інтрацелюлярним синтезом з наступним виділенням у навколишньоклітинний простір, де відбувається накопичення, в тому числі у некротичних вогнищах і кальцифікатах. За розташуванням у досліджуваних зразках ММР3 (стромелізін-1) та ММР9 (желатіназа В/колагеназа IV) дещо відрізнялись: в реактивних астроцитах у перифокальній зоні олігодендрогліом відзначали значну перинуклеарну експресію

ММР3, дещо інтенсивнішу за експресію ММР9; протилежне співвідношення накопичення вказаних протеїнів було зафіксовано в гемістоцитах.

Проведений аналіз рівня внутрішньоклітинного і навколишньоклітинного накопичення ММР3 і ММР9 дозволив виділити групи пухлин з високою і низькою протеолітичною активністю. При такому розподілі було зафіксовано виражений зв'язок накопичення ММР та Grade пухлини за класифікацією ВООЗ ($p < 0,05$), при цьому відмінності були між групами низькозлоякісних і анапластичних гліом за ММР3 ($p = 0,018$), та між анапластичними пухлинами і гліобластомами за ММР9 ($p = 0,017$). Якщо подібні висновки щодо ММР9 були опубліковані Хуе Q. et al. (2017), то особливості експресії ММР3 фактично досі не були описані, а тому потребують подальших досліджень з огляду на перспективи застосування з метою диференційної діагностики та прогнозування перебігу ДГ. Астроцитарні та олігодендрогліальні пухлини характеризувалися подібними показниками протеолітичної активності, $p > 0,05$, а при виключенні гліобластом ступінь подібності навіть зросла для обох ензимів. 76,9 % ДГ ГМ характеризувалися подібними рівнями експресії ММР3 і ММР9, а взаємозв'язок надекспресії ММР3 та ММР9 був статистично достовірним ($p < 0,05$).

Мутація IDH1 R132H, точкова (R) зміна в 132 кодоні гену ізоцитрат дегідрогенази-1 (IDH1), що призводить до зміни амінокислотного залишка у ланцюгу кодованого протеїну на гістидин (H), вважається раннім етапом онкогенезу дорослих типів дифузних гліом, окрім первинних гліобластом. Часткова або тотальна експресія відповідного протеїну пухлиною свідчить з високою ймовірністю про відповідні онкогенетичні механізми.

Хоча IDH1 R132H-імунореактивність зазвичай легко ідентифікується за цитоплазматичним та слабким ядерним забарвленням, слід уважно виконувати інтерпретацію, тому що позитивні пухлинні клітини можуть бути слабо забарвлені або присутні, як інфільтрати, поодинокими клітинами. Крім того, гранульована позитивність в макрофагах та позитивність периваскулярних волокон можуть бути помилково враховані як клітини пухлини з ІГХ міткою. Реактивно змінені астроцити, які дуже часто нагадують дифузну астроцитому за патоморфологічною картиною, не експресують IDH1 R132H, тому IDH1 R132H-позитивність біопсійного чи операційного матеріалу допомагає диференціювати гліоми від реактивного гліозу навіть у зразках після променевої терапії.

При аналізі IDH1 R132H-імунореактивності був виявлений зворотній зв'язок ІГХ статусу за IDH1 R132H і Grade пухлини ($p < 0,001$), хоча істотні відмінності були зареєстровані тільки між групою анапластичних пухлин (Grade III) і групою гліобластом, Grade IV ($p < 0,001$). Схожі результати були продемонстровані Agarwal S. et al. (2013), Mellai M. et al. (2017). Показники пухлин, віднесених до астроцитарного та олігодендрогліального типів, були подібними при виключенні з астроцитарної підгрупи гліобластом.

Вік хворих досліджуваної вибірки корелював з Grade пухлини за ВООЗ, що пояснює взаємозв'язок даного клінічного параметра з імуноморфологічними властивостями, для яких властива пряма чи зворотня залежність від ступеня злоякісності пухлини (високий III, надекспресія EGFR, IDH1 R132H-

імунопозитивність). Було підтверджено гендерну індивергентність онкогенетичних механізмів, що знайшло своє відображення у відсутності відмінностей особливостей експресії у зразках, отриманих у чоловіків і жінок, $p > 0,05$.

Таким чином, за результатами проведених досліджень були визначені основні та додаткові діагностичні імуноморфологічні критерії дифузних астроцитарних та олігодендрогліальних пухлин на основі визначення особливостей імуногістохімічної експресії маркерів біологічних властивостей тканин, а також встановлено особливості проявів підтримки проліферативного сигналювання, супротиву загибелі клітин, дерегуляції клітинної енергетики, нестабільності геному та інших важливих для онкогенезу властивостей у дифузних гліомах головного мозку астроцитарного та олігодендрогліального типів Grade II-IV.

ВИСНОВКИ

Дифузні гліальні пухлини є найпоширенішими первинними неопластичними процесами власне головного мозку (65,6 %) з високим рівнем летальності. Незважаючи на значний прогрес, який спостерігається у вивченні патоморфологічних властивостей дифузних гліом, залишається високий ризик помилкового діагнозу при застосуванні виключно гістологічних критеріїв через їх суб'єктивність. Тому вивчення морфологічних характеристик і оптимізація діагностики дифузних гліом головного мозку із використанням особливостей експресії імуногістохімічних маркерів є актуальною задачею сучасної патологічної анатомії.

1. Проліферативна активність пухлинних клітин у дифузних гліомах головного мозку корелює зі ступенем злоякісності пухлини (коефіцієнт рангової кореляції Спірмена $r = +0,756$; $p < 0,05$): високий рівень (PI > 10 %) характерний для 78,6 % анапластичних гліом (Grade III за класифікацією WHO) та 83,3 % гліобластом (Grade IV). При цьому показники низькозлоякісних дифузних гліом (Grade II) значно нижчі, ніж анапластичних ($p < 0,0001$) та гліобластом ($p < 0,0001$), а останні дві групи гліом характеризуються подібними значеннями PI ($p > 0,05$), що вірно і при порівнянні астроцитарних (43,8 %) та олігодендрогліальних пухлин (33,3 %) на умовах урахування пухлин, що належать лише до Grade II-III. Надекспресія EGFR (>50 % площі зрізу) більш характерна для олігодендрогліальних (58,3 %), ніж для астроцитарних пухлин Grade II-III (31,3 %), але різниця не вірогідна. Також зі збільшенням Grade гліом спостерігається суттєве зростання частки пухлин з надекспресією EGFR ($p < 0,001$): 21,4 % низькозлоякісних гліом, 64,3 % анапластичних гліом та 87,5 % гліобластом; між першими двома групами різниця є достовірною ($p < 0,05$).

2. Зі збільшенням ступеню Grade відзначається тенденція до зростання частки p53-імунопозитивних пухлин (Grade II – 35,7 %, Grade III – 42,9 %, Grade IV – 62,5 % пухлин), $p > 0,05$. Експресія p53 (>10 %) спостерігається переважно в астроцитарних пухлинах Grade II-IV (57,5 %) та не характерна для олігодендрогліальних пухлин (25,0 %), $p < 0,05$, але значущість відмінності олігодендрогліальних та астроцитарних пухлин забезпечена більш високою часткою гліобластом з експресією p53. Експресія MGMT характерна для 38,5 % дифузних гліом, частка MGMT-позитивних

гліом не залежить від Grade та типу пухлини.

3. В астроцитарних і олігодендрогліальних гліомах Grade II-III надекспресія GFAP реєструється відповідно в 92,5 % і 58,3 %, $p < 0,01$. Дифузні гліоми не демонструють Grade-залежності рівнів експресії GFAP: Grade II – 85,7 %, Grade III – 71,4 %, Grade IV – 91,7 % пухлин. Надекспресія віментину властива для 7,1 % пухлин, віднесених до Grade II, 14,3 % анапластичних дифузних гліом та 85,7 % гліобластом. Відмінність інтенсивності експресії віментину у гліобластомах та анапластичних гліальних пухлинах є статистично значущою ($p < 0,0001$). Відсутність експресії віментину (< 10 %) демонструється виключно олігодендрогліальними пухлинами, серед яких 58,3 % є віментин-негативними (при порівнянні з астроцитомами Grade II-III: $p = 0,001$). Відзначається Grade-залежність цитокератин-позитивного статусу ($p < 0,05$) з переважанням цитокератин-позитивних гліобластом (66,7 %) над такими анапластичними гліомами (28,6 %, $p < 0,05$) та дифузними гліальними пухлинами Grade II (21,4%). Хибно-позитивний статус за протеїнами епітеліальних проміжних філаментів (цитокератин AE1/AE3) є характерним для 16,7 % олігодендрогліальних та 31,3% астроцитарних пухлин Grade II-III ($p > 0,05$).

4. Експресія IDH1 R132H характерна для більшості дифузних гліальних пухлин Grade II і III (відповідно – 85,7 % і 78,6 % пухлин), а також 12,5 % гліобластом, що є достовірно менше ніж анапластичних пухлин Grade III ($p < 0,001$). 91,7 % олігодендрогліальних та 75,0 % астроцитарних пухлин Grade II-III є позитивними за R132H IDH1 ($p > 0,05$).

5. Відсутність експресії GFAP, IDH1 R132H, EGFR ендотеліоцитами і перицитами при позитивному статусі пухлинних клітин у дифузних гліомах дозволяє на підставі негативного контрастування мікросудин оцінити і виміряти морфометричні показники без застосування додаткових судиноспецифічних маркерів. Висока щільність розташування мікросудин ($> 100/\text{мм}^2$) має місце у гліомах Grade III (64,3 %) і Grade IV (66,7 %) значно частіше, ніж в пухлинах Grade II (14,3 %), $p < 0,05$ і $p < 0,01$ відповідно. Визначено сильний прямий зв'язок індексу проліферації ендотелію (Ki-67) і Grade за VOO3 ($r = +0,746$, $p < 0,05$). Високий рівень проліферативної активності ендотелію є властивим для 28,6 % дифузних гліом Grade II і для більшості пухлин Grade III і гліобластом (відповідно 78,6 % і 91,7 %), різниця є статистично вірогідною ($p < 0,05$ і $p < 0,001$). Щільність розташування мікросудин та індекс проліферації ендотелію є незалежними від типу гліоми (Grade II-III) параметрами ($p > 0,05$).

6. У дифузних гліальних пухлинах визначається однакове за локалізацією накопичення MMP3 і MMP9, а для 76,9 % дифузних гліом характерна також подібна інтенсивність експресії MMP3 і MMP9. Виражена експресія MMP3 характерна для 70,8 % гліобластом (Grade IV) і 57,1 % анапластичних гліом (Grade III), що достовірно більше ($p < 0,05$) ніж низькозлоякісних дифузних гліом (14,3 %). Високий рівень експресії MMP9 має місце у 42,9 % дифузних гліом і 35,7 % анапластичних гліальних пухлин Grade III, що значно менше ($p < 0,05$), ніж гліобластом (75,0 %). В астроцитарних пухлинах Grade II-III виражена експресія MMP3 і MMP9 спостерігається так же часто (37,5 % для обох протеїнів), як і в олігодендрогліальних (33,3 % та 41,7 % відповідно), всі $p > 0,05$.

7. Основним ІГХ маркером для диференційної діагностики гліом Grade II і III є Ki-67 (індекс проліферації пухлинних клітин), додатковими – GFAP (з визначенням щільності розташування мікросудин), MMP3, EGFR, непоказовими – p53, MGMT, віментин, цитокератин AE1/AE3, MMP9, IDH1 R132H. Допоміжне діагностичне значення має визначення ІІ ендотелію (Ki-67). Основними маркерами для диференційної діагностики гліом Grade III і IV є IDH1 R132H, віментин; додатковими – цитокератин AE1/AE3, MMP9; непоказовими – Ki-67, p53, MGMT, EGFR, GFAP, MMP3. Основним маркером для диференційної діагностики гліом олігодендрогліального та астроцитарного типу (Grade II-III) є віментин; додатковими – GFAP; непоказовими – Ki-67, p53, MGMT, EGFR, цитокератин AE1/AE3, MMP, IDH1 R132H.

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

1. При виявленні ДГ ГМ необхідно проводити додаткове ІГХ дослідження з діагностичною метою, використовуючи комплекс маркерів для уточнення Grade та гістологічного типу пухлини.

2. Для диференційної діагностики ДГ ГМ Grade II і III необхідно використовувати Ki-67 з визначенням ІІ пухлинних клітин та ендотелію, а також GFAP (з оцінкою ЩРМ), MMP3, EGFR. Основними маркерами для диференційної діагностики гліом Grade III і IV є IDH1 R132H, віментин; додатковими – цитокератин AE1/AE3, MMP9.

3. При сумнівному типі пухлини (астроцитарний чи олігодендрогліальний) для підвищення ступеня верифікації діагнозу потрібно використовувати особливості експресії віментину та GFAP.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Шпонька І. С., Шинкаренко Т. В., Пославська О. В. Характеристика та аналіз Ki-67-імунореактивності в астроцитомах головного мозку. *Морфологія*. 2016. Т. 10, № 1. С. 96-101. (Дисертантом самостійно проведено пошук матеріалу, проведення імуногістохімічного та статистичного аналізу, підготовка статті до друку).

2. Шинкаренко Т. В., Шпонька І. С., Корнілов Б. Ю. Алгоритми діагностики астроцитарних пухлин головного мозку у дорослих з урахуванням перегляду класифікації пухлин центральної нервової системи. *Морфологія*. 2016. Т. 10, № 3. С. 46-52. (Дисертантом самостійно проведено пошук літературних джерел та їх аналіз, підготовка статті до друку).

3. Шпонька І.С., Гриценко П. О., Шинкаренко Т. В. Морфологічна характеристика первинної дифузної крупноклітинної В-клітинної лімфоми ЦНС. *Морфологія*. 2016. Т. 10, № 3. С. 330-335. (Дисертантом самостійно проведено пошук літературних джерел, підготовку статті до друку).

4. Шинкаренко Т. В., Шпонька І.С. Аналіз p53-імунореактивності в астроцитарних пухлинах головного мозку. *Медицинські перспективи*. 2016. Т. XXI, № 4.

С. 72-77. (Дисертантом самостійно проведено імуногістохімічний та статистичний аналіз, підготовку статті до друку).

5. Шинкаренко Т. В. Експресія матриксних металопротеїназ у дифузних гліомах: діагностична роль. *Патологія*. 2017. Т. 14, № 2. С. 167-171.

6. Shpon'ka I. S., Shynkarenko T. V. Diagnostic value of microvessel structure in brain glial tumors. *Російський медико-біологічний вестник ім. акад. І.П. Павлова*. 2017. Т. 25, № 3. С. 357-361. (Дисертантом самостійно проведено імуногістохімічний, морфометричний та статистичний аналіз, підготовку статті до друку).

7. Шинкаренко Т. В. Імуногістохімічна експресія проміжних філаментів у діагностиці дифузних гліом. *Медичні перспективи*. 2017. Т. XXII, № 3. С. 93-98.

8. Шинкаренко Т. В., Шпонька І. С. Комплексний імуногістохімічний аналіз дифузних гліом головного мозку. *Морфологія*. 2017. Т. 11, № 3. С. 39-46. (Дисертантом самостійно проведено імуногістохімічний, морфометричний та статистичний аналіз, підготовку статті до друку).

9. Спосіб діагностики пухлин головного мозку астроцитарного походження: пат. 113278 Україна. № u201606590; заявл. 16.06.16; опубл. 25.01.17, Бюл. № 2, 2017. (Дисертантом самостійно проведено патентний пошук).

10. Шинкаренко Т. В., Мальцев І. О., Чекан С. М. Дослідження рівня експресії кі-67 в астроцитомах головного мозку. *Матеріали ХХ Міжнародного медичного конгресу студентів та молодих вчених*. Тернопіль: Укрмедкнига, 2016. С. 326. (Дисертантом самостійно проведено пошук матеріалу, проведення імуногістохімічного та статистичного аналізу, підготовка тез до друку).

11. Шинкаренко Т. В., Алексеєнко О. А., Бондарева В. О. Характеристика р53-імунореактивності в астроцитомах головного мозку різного ступеня злоякісності. *Новини і перспективи медичної науки*: зб. мат. XVI конф. студ. та мол. учених: під ред. проф. І. В. Твердохліба. Дніпропетровськ, 2016. С. 72-73. (Дисертантом самостійно проведено імуногістохімічний та статистичний аналіз, підготовку тез до друку).

12. Шинкаренко Т. В., Чекан С. М., Мальцев І. О. Імуногістохімічне дослідження проліферативної активності в астроцитомах головного мозку. *Здобутки теоретичної медицини – в практику охорони здоров'я – 2016*: мат. Всеукр. наук.-практ. конф. молодих вчених та студентів (24-25 березня 2016 року). Запоріжжя, 2016. С. 21-22. (Дисертантом самостійно проведено пошук матеріалу, проведення імуногістохімічного та статистичного аналізу, підготовка тез до друку).

13. Шинкаренко Т. В., Алексеєнко О. А., Мальцев І. О. Загальний алгоритм діагностики астроцитарних пухлин головного мозку у відповідності з переглядом класифікації пухлин центральної нервової системи. *«Теорія та практика сучасної морфології»*: зб. мат. наук.-практ. конф. з міжн. участю, 5-7 жовтня 2016 р. Дніпро, 2016. С. 188-189. (Дисертантом самостійно проведено пошук літературних джерел та їх аналіз, підготовка тез до друку, виконано усну доповідь).

14. Шинкаренко Т. В., Шпонька І. С., Гриценко П. О. Характеристика будови мікросудинного русла дифузних гліом головного мозку. *Актуальні питання теоретичної та клінічної медицини*: збірник тез доповідей V Міжнародної науково-

практичної конференції студентів та молодих вчених, м. Суми, 20–21 квітня 2017 року. Суми, 2017. С. 210. *(Дисертантом самостійно проведено імуногістохімічний, морфометричний та статистичний аналіз, підготовку тез до друку).*

15. Шинкаренко Т. В. Діагностичні аспекти експресії желатинази-*b* у дифузних гліомах головного мозку. «Здобутки клінічної та експериментальної медицини»: матеріали підсумкової науково-практичної конференції, присвяченої 60-річчю ТДМУ (Тернопіль, 14 черв. 2017 р.). Тернопіль, 2017. С. 185.

16. Шинкаренко Т. В., Шпонька І. С., Алексеєнко О. А. Рідкісний випадок поєднання первинної гліобластоми з судинною мальформацією. *Актуальні проблеми сучасної патологічної анатомії*: матеріали наук.-практ. конф. (Київ, 26–27 квітня 2017 р.). Київ, 2017. С. 118-119. *(Дисертантом самостійно проведено аутопсію, аналіз літератури, підготовку тез до друку).*

17. Шинкаренко Т. В., Новіков Я. К., Хвалько Ю. О. Аналіз структури захворюваності дифузними гліомами у дніпровському регіоні *Новини і перспективи медичної науки*: зб. мат. XVI конф. студ. та мол. учених: під ред. проф. І. В. Твердохліба. Дніпро, 2017. С. 88. *(Дисертантом самостійно проведено аутопсію, аналіз літератури, підготовку тез до друку).*

АНОТАЦІЯ

Шинкаренко Т.В. Патоморфологічна характеристика і оптимізація діагностики дифузних гліом головного мозку (імуногістохімічні аспекти). – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.03.02 «Патологічна анатомія» (222 – Медицина). – ДЗ «Дніпропетровська медична академія Міністерства охорони здоров'я України». Запорізький державний медичний університет, МОЗ України. Дніпро, 2017.

Дисертація присвячена вивченню діагностичного значення особливостей експресії онкогенез-залежних маркерів в дифузних гліомах головного мозку та встановленню основних та додаткових імуноморфологічних критеріїв для визначення Grade та типу пухлини. Запропоновано оцінку ЦРМ з використанням негативного контрастування стінки і просвіту судин (GFAP, EGFR, IDH1 R132H). Для диференційної діагностики ДГ ГМ Grade II і III запропоновано використовувати Ki-67 з визначенням III пухлинних клітин ($p < 0,0001$) та ендотелію ($p < 0,05$), а також GFAP (з метою точної оцінки ЦРМ, $p = 0,01$), MMP3 ($p < 0,05$), EGFR ($p < 0,05$). Основними маркерами для диференційної діагностики гліом Grade III і IV є IDH1 R132H ($p < 0,001$) та віментин ($p = 0,00001$); додатковими – цитокератин AE1/AE3 ($p < 0,05$), MMP9 ($p < 0,05$). При сумнівному типі пухлини (астроцитарний чи олігодендрогліальний) для підвищення ступеня верифікації діагнозу потрібно використовувати рівень експресії віментину ($p = 0,001$) та GFAP ($p < 0,05$).

Ключові слова: дифузна гліома, гліальна пухлина, дифузна астроцитома, анапластична астроцитома, гліобластома, анапластична олігодендрогліома, олігодендрогліома, імуногістохімія, морфологічна характеристика, діагностика.

АННОТАЦИЯ

Шинкаренко Т.В. Патоморфологическая характеристика и оптимизация диагностики диффузных глиом головного мозга (иммуногистохимические аспекты). - Квалификационная научная работа на правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.03.02 «Патологическая анатомия» (222 - Медицина). - ГУ «Днепропетровская медицинская академия Министерства здравоохранения Украины». Запорожский государственный медицинский университет МЗ Украины. Днепр, 2017.

Диссертация посвящена изучению диагностического значения особенностей экспрессии онкогенез-зависимых маркеров в диффузных глиомах головного мозга и установлению основных и дополнительных иммуноморфологических критериев для определения Grade и типа опухоли. Предложена оценка плотности расположения микрососудов с использованием негативного контрастирования стенки и просвета сосудов (GFAP, EGFR, IDH1 R132H). Для дифференциальной диагностики ДГ ГМ Grade II и III необходимо использовать Ki-67 с определением индекса пролиферации опухолевых клеток ($p < 0,0001$) и эндотелия ($p < 0,05$), а также GFAP (с целью точной оценки плотности расположения микрососудов, $p = 0,01$), MMP3 ($p < 0,05$), EGFR ($p < 0,05$). Основными маркерами для дифференциальной диагностики глиом Grade III и IV являются IDH1 R132H ($p < 0,001$) и виментин ($p = 0,00001$); дополнительными - цитокератин AE1/AE3 ($p < 0,05$), MMP9 ($p < 0,05$). При сомнительном типе опухоли (астроцитарных или олигодендроглиальных) для повышения степени верификации диагноза нужно использовать уровень экспрессии виментина ($p = 0,001$) и GFAP ($p < 0,05$).

Ключевые слова: диффузная глиома, глиальная опухоль, диффузная астроцитома, анапластическая астроцитома, глиобластома, анапластическая олигодендроглиома, олигодендроглиома, иммуногистохимия, морфологическая характеристика, диагностика.

SUMMARY

Shynkarenko T.V. Pathomorphological characteristics and diagnostic optimization of brain diffuse gliomas (immunohistochemical aspects). - The qualifying scientific work as manuscript.

The thesis for a degree of Candidate of Medicine (PhD) in specialty 14.03.02 "Pathological anatomy" (222 – Medicine). – SI "Dnipropetrovsk Medical Academy of Health Ministry of Ukraine". Zaporozhye State Medical University, Health Ministry of Ukraine. Dnipro, 2017.

The thesis is dedicated to the study of the diagnostic significance of the oncogenesis-dependent markers expression in diffuse gliomas and the establishment of basic and additional immunomorphological criteria for the Grade and type verification.

Analysis of the regulation of cell cycle and DNA repair. The proliferation index (PI) of tumor cells is directly related to the malignancy degree (Grade) of gliomas ($r = +0.756$,

$p < 0.05$), but the statistical significance of the differences was recorded only between low-grade (Grade II) glial tumors vs anaplastic gliomas ($p < 0.0001$) and vs glioblastomas ($p < 0.0001$). The PI (Ki-67) was higher in astrocytic tumors ($p = 0.034$), but when comparing gliomas belonging only to Grade II-III the difference was leveled ($p = 0.576$), which indicated the inapplicability of this parameter for differentiation between tumors of astrocytic and oligodendroglial types.

The expression product of the TP53 gene not only affects the mechanisms of apoptosis, but also blocks the processes of cell division in the G1 phase. Inactivation of this mechanism leads to an increase in the ability of cells to self-dividing predictably. However, we did not find a significant dependence of p53-immunoreactivity level in the distribution of cases for the level of PI ($p = 0.158$) and Grade WHO ($p = 0.231$). TP53 is much more expressed in astrocytic tumors (57.5 %) than oligodendroglial (25.0 %), $p = 0.030$. It is result of higher percentage of p53-positive glioblastomas. There was no significant diagnostic value of MGMT immunoreactivity: all clinical and morphological parameters were statistically independent from the expression level of MGMT gene ($p < 0.05$).

The analysis showed direct links between the EGFR expression with Grade ($p < 0.001$) and the PI of tumor cells ($p = 0.002$) in diffuse gliomas. A significant difference in the overexpression of EGFR was observed between groups of anaplastic and diffuse gliomas Grade II ($p = 0.022$). Overexpression EGFR was more often recorded in astrocytic tumors (65.0 %) than in oligodendroglial tumors (58.3 %). The difference between types of gliomas remained statistically insignificant, excluding glioblastomas from the subgroup of astrocytomas, $p = 0.152$.

Analysis of intermediate filament expression. Glial tumors are characterized by a high level of GFAP expression, but oligodendroglial tumors were markedly less GFAP-immunoreactive compared to astrocytic ($p = 0.004$), moreover, even with the exception of glioblastomas from the group of astrocytic tumors, this difference persisted ($p = 0.024$). Also, diffuse gliomas did not demonstrate a Grade-dependent expression of GFAP ($p = 0.258$).

The high-level expression of vimentin (the threshold value was > 40 % of the area) was characteristic of glioblastomas, in contrast to diffuse gliomas Grade II-III ($p < 0.001$). The prevalence of astrocytic tumors among gliomas with the high levels of vimentin expression ($p = 0.003$) disappeared with the exception of glioblastomas ($p = 0,989$). The lack of vimentin expression, which demonstrated by half of the oligodendroglial tumors, can be used as an additional criterion for verification of the type of tumor ($p < 0.001$).

The Grade-dependence of the cytokeratin-positive status was observed at a threshold value > 10 % of the area ($p = 0.013$) with predominance of cytokeratin-positive glioblastomas over such anaplastic gliomas ($p = 0.042$). A lower proportion of immunoreactive oligodendroglial tumors still did not have a statistical difference from astrocytic tumors (provided glioblastomas were not included among the latter), $p = 0.378$.

Analysis of the microvasculature parameters in diffuse gliomas. The endothelial PI, which characterizes the intensity of angiogenesis processes, was determined on the basis of the Ki-67-immunoreactivity of cells. There were significant differences in this parameter among tumors Grade II and Grade III ($p = 0.023$). Astrocytic and oligodendroglial tumors Grade II-III were characterized by similar values of endothelial PI ($p = 0.274$).

Microvessel density (MVD) was studied on the basis of GFAP-immunonegativity of microvessels with high/moderate-level expression of the corresponding gene by tumor cells. MVD directly strongly correlated with Grade WHO ($r=+0.726$, $p<0.05$). High values of MVD ($>100/\text{mm}^2$) were significantly more frequent in Grade III and Grade IV tumors than diffuse gliomas of Grade II ($p=0.018$ and $p=0.003$, respectively).

Analysis of metabolic changes in diffuse gliomas. Analysis of the accumulation level of MMP3 (stromelysin-1) and MMP9 (gelatinase B / collagenase IV) made it possible to isolate groups of tumors with high and low proteolytic activity. A significant association of the accumulation of MMP and Grade tumors was recorded ($p<0.05$), with differences in low-grade vs anaplastic gliomas in MMP3 ($p=0.018$), and anaplastic tumors vs glioblastomas according to MMP9 ($p=0.017$). Astrocytic and oligodendroglial tumors were characterized by similar parameters of proteolytic activity, $p> 0.05$, and when switched off by glioblastomas the degree of similarity even increased for both enzymes.

In the analysis of IDH1 R132H-immunoreactivity, the reverse correlation of IDH1 R132H-status and Grade tumors was detected ($p<0.001$), although significant differences were recorded only between the group of anaplastic tumors (Grade III) and the group glioblastomas, Grade IV ($p<0.001$), which is explained by the predominance of primary glioblastomas. The parameters of astrocytic and oligodendroglial types were similar when glioblastomas were excluded.

In conclusion, it is recommended to use Ki-67 with the determination of PI of tumor cells ($p<0.0001$) and endothelium ($p<0.05$), as well as GFAP (for accurate estimation of microvessel density, $p=0.01$), MMP3 ($p<0.05$), EGFR ($p<0.05$) for differential diagnosis of diffuse gliomas Grade II and III. The basic markers for differential diagnosis of gliomas Grade III and IV are IDH1 R132H ($p<0.001$) and vimentin ($p=0.00001$); additional ones are cytokeratin AE1/AE3 ($p<0.05$) and MMP9 ($p<0.05$). To increase the degree of diagnosis verification in cases of doubtful type of tumor (astrocytic or oligodendroglial), it is necessary to use the expression level of vimentin ($p=0.001$) and GFAP ($p<0.05$).

Key words: diffuse glioma, glial tumor, diffuse astrocytoma, anaplastic astrocytoma, glioblastoma, anaplastic oligodendroglioma, oligodendroglioma, immunohistochemistry, morphological characteristics, diagnostics.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ГМ	– головний мозок
ДАБ	– діамінобензидин
ДФ	– дифузна гліома
ІГХ (ІНС)	– імуногістохімія/імуногістохімічний (immunohistochemistry)
ІДГ (ІДН)	– ізоцитратдегідрогеназа (isocitrate dehydrogenase)
ПІ (PI)	– індекс проліферації (proliferation index)
ММР	– матриксні металопротеїнази
ЩРМ (MVD)	– щільність розташування мікросудин (microvascular density)
EGFR	– рецептор епідермального фактору росту
GFAP	– кислий фібрилярний гліальний білок
IDH1 R132H	– ген ізоцитратдегідрогенази-1 з мутацією у 132 кодоні (R132) з заміною амінокислоти в поліпептидному ланцюжку на гістидин.
MGMT	– O-6-метилгуанін-DNA метилтрансфераза
TS	– ThermoScientific, підприємство-виробник реактивів

Підписано до друку 27.03.2018 р. Гарнітура Times New Roman.

Папір друкарський. Формат 60×90/16. Умови. друк. арк. 0,83.

Наклад – 100 прим. Зам. № 7675.

Надруковано з оригінал-макету в типографії
Запорізького державного медичного університету
м. Запоріжжя, пр. Маяковського, 26