

© Шпонька И.С., Шинкаренко Т.В., 2017

УДК 616.831-006-036:612.017

DOI:10.23888/PAVLOVJ20173350-361

ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ СТРОЕНИЯ МИКРОСОСУДОВ ГЛИАЛЬНЫХ ОПУХОЛЕЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА

И.С. Шпонька, Т.В. Шинкаренко

ГУ «Днепропетровская медицинская академия МЗ Украины»,
ул. Владимира Вернадского, 9, 49044, г. Днепр, Украина

Диффузные глиомы – наиболее распространенные первичные опухоли головного мозга с непропорционально высоким уровнем смертности. Характеристики микрососудов имеют важное диагностическое и прогностическое значение, однако результаты предыдущих исследований противоречивы. Цель работы: оценить особенности ангиогенеза в диффузных глиомах на основе определения качественных и количественных характеристик микрососудов и определить их взаимосвязь с гистологическим типом опухоли. В диффузных глиомах головного мозга (n=76), используя GFAP-негативный статус эндотелия при наличии исключительно GFAP-позитивных опухолевых клеток, была измерена и подсчитана плотность расположения сосудов (мкм^{-1}), удельная площадь (%), удельная площадь просвета (%), а также средний диаметр микрососудов (мкм). Микроваскулярная пролиферация была оценена с помощью индекса пролиферации эндотелия сосудов (Ki-67). Установлена возможность рутинной оценки ангиогенеза в диффузных глиомах с помощью маркеров GFAP и Ki-67. В диффузных глиомах головного мозга выявлена выраженная взаимосвязь между особенностями строения микроциркуляторного русла неопластической ткани и Grade глиомы по классификации ВОЗ.

Ключевые слова: опухоль головного мозга, иммуногистохимия, диагностика, сосудистая пролиферация, сосудистая плотность.

Диффузные глиомы – наиболее распространенные первичные опухоли головного мозга с чрезвычайно высоким уровнем летальности, построенные из клеток, имеющих черты астроцитарной и/или олигодендроглиальной дифференцировки. Согласно пересмотренной классификации опухолей ЦНС ВОЗ (4-е пересм. изд., 2016 г.) был введен «интегрированный» диагноз, который формируется на основе определения патогистологических и молекулярных особенностей новообразования [1]. На первом этапе определяют именно гистологический вариант глиомы, основываясь на характерных для отдельных диагностических категорий фенотипических признаках с исполь-

зованием как рутинной окраски, так и иммуногистохимических технологий [2].

Традиционно, важнейшее значение при установлении патогистологического диагноза и определении степени злокачественности новообразования принадлежит таким критериям, как пролиферативная активность неопластических клеток, клеточный и ядерный плеоморфизм, выраженность и распространенность вторичных изменений опухоли [3].

Учитывая особенности строения и форму кровеносных сосудов, в диффузных глиомах выделяют 4 основных морфологических типа, а именно: 1) гломерулоидный тип – группа сосудов, окруженных со-

единительнотканной стромой; 2) сосудистые гирлянды – сосуды с или без соединительнотканной стромы, которые вместе формируют гирляндоподобные структуры и чаще локализуются вокруг некротически измененной ткани; 3) сосудистые кластеры – отдельные ячейки микрососудов (≥ 3) причудливой формы без соединительнотканной стромы; 4) капилляроподобные сосуды – равномерно распределенные тонкие микрососуды, напоминающие нормальные капилляры головного мозга [4, 5].

Неоднократно указывалось на диагностическое и независимое от патогистологического диагноза прогностическое значение таких показателей ангиогенеза как микрососудистая плотность (micro-vascular density) [6-8], общая сосудистая площадь (total microvascular area) [9], морфологический тип представленных сосудов [4, 5]. Существует взаимосвязь особенностей строения микрососудистого русла и других морфологических и клинических признаков опухолей [10].

Использование иммуногистохимических (ИГХ) методик позволяет упростить

и объективизировать исследования сосудов. Наиболее часто применяются следующие маркеры микрососудистой стенки: CD34, CD31, фактор фон Виллебранда.

Целью исследования было оценить особенности ангиогенеза в диффузных глиомах на основе определения характеристик микрососудов и выявить их взаимосвязь с гистологическим типом опухоли.

Материалы и методы

Было проанализировано 76 образцов глиальных опухолей головного мозга (табл. 1), полученные путем биопсии или оперативного вмешательства, преимущественно в нейрохирургическом отделении Днепропетровской областной клинической больницы им. И.И. Мечникова и подлежащих иммуногистохимическому исследованию в морфологическом отделе лечебно-диагностического центра ООО «Аптеки медицинской академии» (г. Днепр) в течение 2006-2016 гг. Гистологический диагноз был установлен, опираясь на современные гистологические и иммуногистохимические критерии [3].

Таблица 1

Характеристика исследуемой группы пациентов (n, %)

Критерий	Количество случаев, (n)	%
Пол		
мужской	36	47,4
женский	40	52,6
Возраст		
≤ 50	48	63,2
> 50	28	36,8
Гистологический диагноз		
диффузная астроцитома (ДА) – Grade II	10	13,2
анапластическая астроцитома (АА) – Grade III	14	18,4
глиобластома – Grade IV	36	47,4
олигодендроглиома (О) – Grade II	8	10,5
анапластическая олигодендроглиома (АО) – Grade III	8	10,5
Всего	76	100%

Кроме рутинного гистологического исследования (окраска гематоксилин-эозином), образцы опухоли подвергались иммуногистохимическому анализу, который проводился согласно протоколам компании Thermo Scientific (TS), (США) для определения экспрессии GFAP (RTU (Dako Cytomation, Дания)) и Ki-67 (клон sp6, p. 1: 400 (TS, США)). В срезах толщи-

ной 4 мкм использовали систему визуализации Lab Vision Quanto (TS, США) с выявлением белковой цепи с помощью DAB Quanto Chromogen (TS, США).

Определение морфотипа сосудов, подсчет их количества, измерение площади сосуда, площади его просвета и диаметра были основаны на отсутствии GFAP-иммунореактивности в эндотелии

при выраженной (+++), умеренной (++) или слабой (+) GFAP-иммунореактивности окружающих неопластических клеток.

Для морфометрического исследования были получены цифровые фотографии участков исследуемых опухолей при помощи камеры ZEISS Axioscam 105 color на микроскопе Axio Scope. А1 при увеличении объектива $\times 40$. Каждый образец был иллюстрирован 3 фотографиями с наибольшей плотностью расположения микрососудов. Измерение площади и линейных размеров производилась с использованием инструментов пакета Image J 1.49v [11].

Средние измеренные параметры были использованы для расчёта плотности микрососудов на 1 мм^2 площади опухоли, удельной площади микрососудов (% от общей площади среза), удельной площади просветов микрососудов (% от общей площади среза), среднего диаметра микрососудов (в мкм) [12, 13]. Пролиферативная активность микрососудов была оценена по индексу пролиферации эндотелиоцитов – соотношению количества Ki-67-иммунореактивных ядер эндотелиоцитов и их общего количества, выраженному в процентах [12].

Статистический анализ был проведен с использованием лицензионной программы «Statistica» (версия 6.1; серийный номер AGAR 909 E415822FA). Нормальность распределения значений исследуемых параметров была проверена с использованием критерия Шапиро-Уилка. Статистическую значимость различий характеристик изучаемых групп ($n=5$) опухолей определяли методом Краскела-Уоллиса, с последующим определением критерия Манна-Уитни для двух независимых выборок. С целью определения силы связи между показателями использовался коэффициент корреляции Спирмена. Значение $p < 0,05$ было принято статистически значимым [14].

Результаты и их обсуждение

Отсутствие экспрессии GFAP эндотелием сосудистой стенки, окруженной исключительно GFAP-положительной цитоплазмой неопластических клеток, позволило выявлять скрытые капилляры, а также провести более точные морфометрические исследования (рис. 1А-Б). Следует

отметить, что представленная в образцах зона инфильтрации мозговой ткани опухолью, статистически значимо не отличалась от нормальной мозговой ткани по исследуемым параметрам ($p > 0,05$).

В опухолях Grade II (ДА и О) регистрировались преимущественно капилляры, которые фенотипически не отличались от нормальных (94%). В АА и АО (Grade III) более часто отмечалось почкование, что отражалось на количестве сосудов, по форме похожих на нормальные (78%). Глиобластомы (Grade IV) отличались интенсивным ангиогенезом, что в 76% образцов приводило к формированию гирляндоподобных структур и лишь в 18% образцов были зафиксированы гломерулоидные сосуды; количество сосудов, которые были похожи на обычные капилляры головного мозга, составляло 37%.

Средние значения морфометрических показателей микрососудистого русла диффузных глиом представлены на рисунке 2. Достоверность отличий плотности микрососудов, удельной площади микрососудов, удельной площади просветов микрососудов и индекса пролиферации эндотелия в различных формах диффузных глиом установили с помощью теста Краскела-Уоллиса ($p < 0,01$). Критерий Манна-Уитни установил, что значения плотности и удельной плотности микрососудов зафиксированные в ДА и О (Grade II), были статистически значимо меньше, чем в опухолях Grade III-IV (соответствующие уровни значимости отличий $p < 0,01$). При этом достоверные отличия отсутствовали между опухолями астроцитарного и олигодендроглиального ряда идентичной степени злокачественности и между опухолями Grade III-IV ($p > 0,05$). Подобные зависимости были выявлены при анализе удельной площади просветов микрососудов, однако показатели АО оказались самыми низкими ($p < 0,01$). Наибольшие значения данного показателя были зафиксированы в Г, в остальных гистологических формах диффузных глиом удельная площадь просветов микрососудов была промежуточной и статистически подобной. Значения индекса пролиферации эндотелия

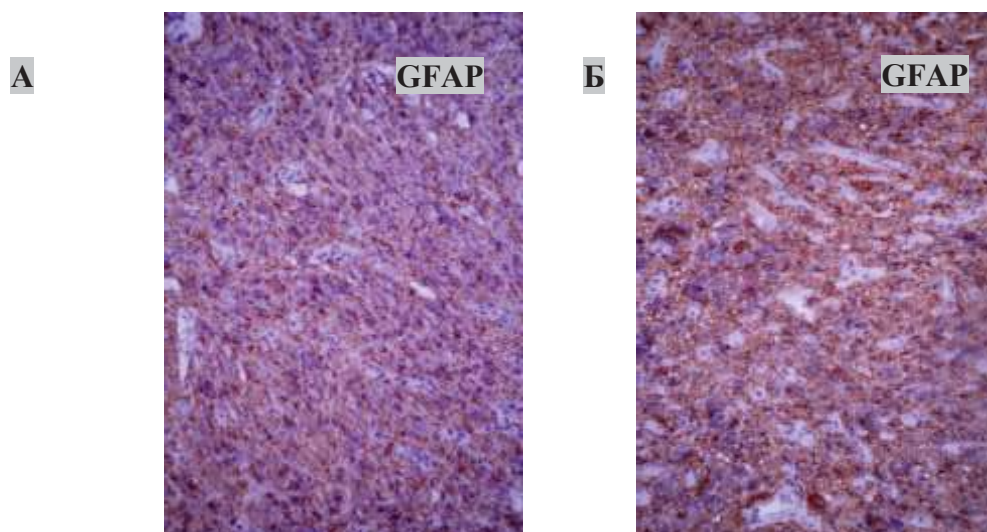


Рис. 1. Диффузная (А) и анапластическая (Б) астроцитомы головного мозга. GFAP-негативный эндотелий резко выделяется на фоне GFAP-реактивных опухолевых клеток. ИГХ, дополнительное окрашивание гематоксилином Майера, $\times 400$

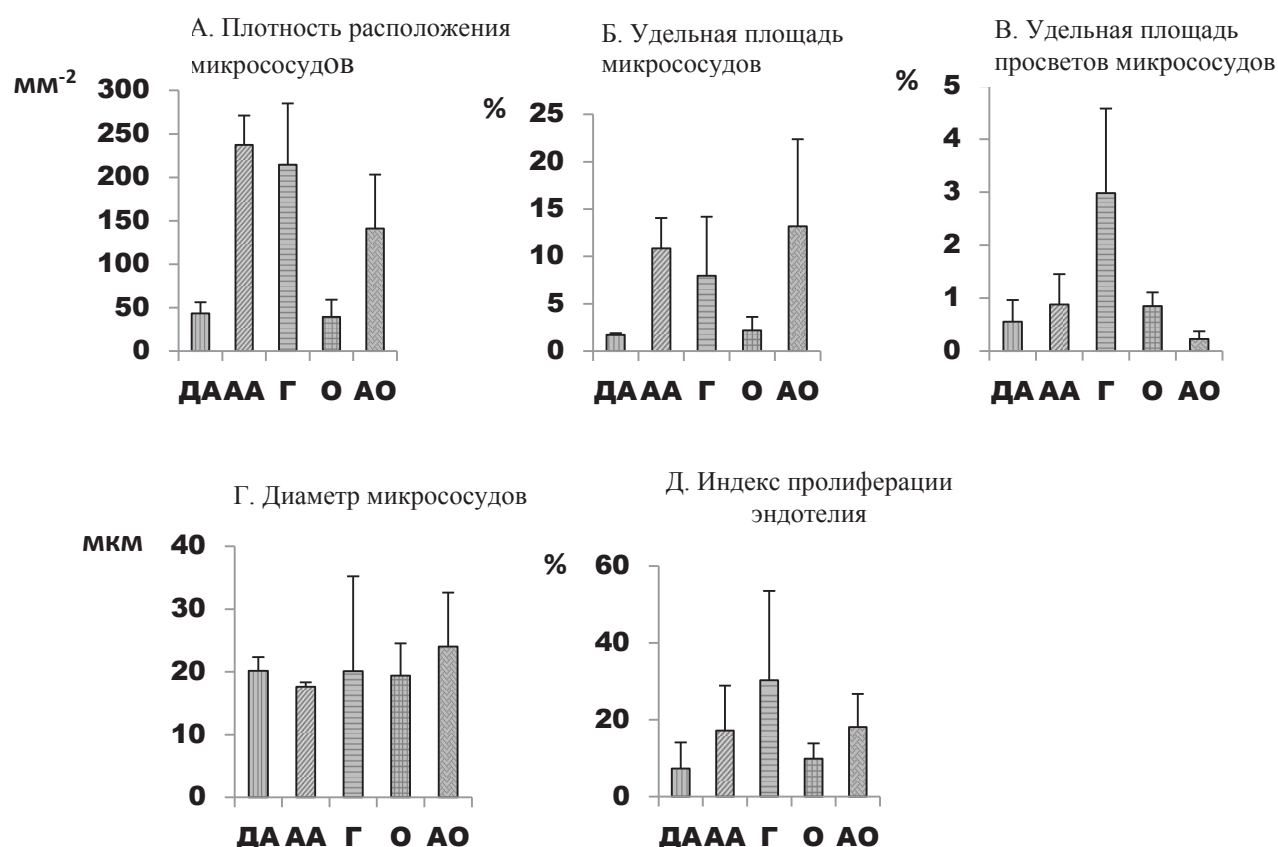


Рис. 1. Количественные характеристики микрососудистого русла диффузных глиом головного мозга. А. Плотность расположения микрососудов (мм⁻¹). Б. Удельная площадь микрососудов (%). В. Удельная площадь просветов микрососудов (%). Г. Диаметр микрососудов (мкм). Д. Индекс пролиферации эндотелия (%)

значимо отличались в опухолях различной степени дифференцировки. Так, опухоли, отнесенные к Grade II, демонстрировали достоверно наименьшие значения, в глиобластомах эндотелиальный индекс пролиферации был максимальным, а в диффузных глиомах Grade III по ВОЗ значения указанного показателя были промежуточными. Диаметр микрососудов колебался в опухолях различного гистологического строения в пределах статистической погрешности (тест Краскела-Уоллиса, $p=0,069$).

Со степенью злокачественности по ВОЗ прямо достоверно коррелировали: плотность расположения сосудов ($r=0,596$), удельная площадь микрососудов ($r=0,275$), удельная площадь просветов микрососудов ($r=0,813$) и индекс пролиферации эндотелия ($r=0,746$).

Анализ корреляционных связей исследуемых параметров показал умеренную прямую достоверную связь между плотностью расположения микрососудов и индексом пролиферации эндотелия, а также их удельной площадью. Диаметр микрососудов не коррелировал ни с одним из исследуемых показателей (коэффициент корреляции Спирмена не имел статистической значимости).

В предыдущих исследованиях особенностей микрососудистого русла диффузных глиом, как и других солидных опухолей, широко применяли иммуногистохимические маркеры сосудистой стенки (CD34, CD31) [4, 5, 7-9, 12]. Однако, указанные маркеры достаточно редко используются в рутинной патологоанатомической диагностике интрапаренхиматозных опухолей головного мозга, поэтому мы использовали для морфометрических измерений негативное контрастирование сосудистой стенки. При этом маркер астроцитарной дифференцировки GFAP рекомендовал себя наилучшим образом: во всех диффузных глиомах наблюдается выраженная или умеренная его экспрессия опухолевыми клетками при абсолютном отсутствии соответствующего белка в эндотелии сосудов [3].

Результаты морфометрических исследований показали зависимость показателей интенсивности образования новых сосудов от степени злокачественности глиом. При этом увеличение количественных параметров (плотность расположения микрососудов, индекс пролиферации эндотелия и др.) переходит в изменения качественных характеристик васкуляризации опухолевой ткани: образование каскада микрососудов (гирлянд) и гломерулоидных структур в высокозлокачественных новообразованиях [5, 9].

Инициаторами роста сосудов считают нарастающие в опухолевой ткани гипоксию и «псевдогипоксию». «Псевдогипоксия» обусловлена изменениями метаболизма, вызванными мутацией гена изоцитратдегидрогеназы, что характерно преимущественно для низкоккачественных глиом. Впрочем, гипоксия, которая вероятно является сильнейшим стимулом, более выражена в густоклеточных плеоморфных неоплазиях (Grade III-IV).

Выводы

1. Отсутствие экспрессии GFAP эндотелиоцитами и перицитами позволяет на основании их негативного контрастирования оценить и измерить морфометрические показатели микрососудов диффузных глиом головного мозга без применения дополнительных сосудоспецифических маркеров.

2. Определена статистически значимая связь индекса пролиферации (Ki-67) эндотелия и Grade по ВОЗ ($r=0,746$, $p<0,05$).

3. Для опухолей Grade II характерны капилляроподобные микрососуды, в опухолях Grade III и IV могут наблюдаться микрососудистые гирлянды, а в глиобластомах встречаются гломерулоидные сосуды. Плотность расположения, удельная площадь и удельная площадь просвета микрососудов прямо коррелируют с Grade по ВОЗ. Плотность расположения микрососудов и удельная площадь микрососудов в глиомах Grade III-IV значительно выше, чем в опухолях Grade II ($p<0,01$).

Конфликт интересов отсутствует.

Литература

1. Louis D.N., Perry A., Reifenberger G., von Deimling A., Figarella-Branger D., Cavenee W.K. et al. The 2016 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system: a summary // *Acta neuropathologica*. 2016. Vol. 131, №6. P. 803-820.

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 // *Morphologia*. 2016. Т. 10, №3. С. 46-52.

3. Cavenee W.K., Leung S.Y., Hawkins C., Van Meir E.G., Burger P.C., Tabori U., eds. WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. Revised 4th ed. Lyon: IARC, 2016. 408 p.

4. Birner P., Piribauer M., Fischer I., Gatterbauer B., Marosi C., Ambros P.F. et al. Vascular patterns in glioblastoma influence clinical outcome and associate with variable expression of angiogenic proteins: evidence for distinct angiogenic subtypes // *Brain pathology*. 2003. Vol. 13, №2. P. 133-143.

5. Chen L., Lin Z.X., Lin G.S., Zhou C.F., Chen Y.P., Wang X.F. et al. Classification of microvascular patterns via cluster analysis reveals their prognostic significance in glioblastoma // *Human pathology*. 2015. Vol. 46, №1. P. 120-128.

6. Cai H., Xue Y., Liu W., Li Z., Hu Y., Li Z. et al. Overexpression of Roundabout4 predicts poor prognosis of primary glioma patients via correlating with microvessel density // *Journal of neuro-oncology*. 2015. Vol. 123, №1. P. 161-169.

7. Clara C.A., Marie S.K., Almeida J.R.W., Wakamatsu A., Oba-Shinjo S.M., Uno M. et al. Angiogenesis and expression of PDGF-C, VEGF, CD105 and HIF-1 α in human glioblastoma // *Neuropathology*. 2014. Vol. 34, №4. P. 343-352.

8. Yao Y., Kubota T., Takeuchi H., Sato K. Prognostic significance of microvessel density determined by an anti-CD105/endoglin monoclonal antibody in astrocytic tumors: Comparison with an an-

ti-CD31 monoclonal antibody // *Neuropathology*. 2005. Vol. 25, №3. P. 201-206.

9. Korkolopoulou P., Patsouris E., Kavantzias N., Konstantinidou A.E., Christodoulou P., Thomas-Tsagli E. et al. Prognostic implications of microvessel morphometry in diffuse astrocytic neoplasms // *Neuropathology and applied neurobiology*. 2002. Vol. 28, №1. P. 57-66.

10. Shi J., Zhao Y., Yuan Y., Wang C., Xie Z., Gao X. et al. The expression of IDH1 (R132H) is positively correlated with cell proliferation and angiogenesis in glioma samples // *Xi bao yu fen zi mian yi xue za zhi*. Chinese journal of cellular and molecular immunology. 2016. Vol. 32, №3. P. 360-363.

11. Пославська О.В. Методологія використання програмного забезпечення для аналізу цифрових мікрофотографій на базі курсу патоморфології з метою підвищення професійного рівня студентів і науковців // *Morphologia*. 2015. Т.9, №3. P. 122-126.

12. Mittelbronn M., Baumgarten P., Harter P.N., Plate K.H. Analysis of cerebral angiogenesis in human glioblastomas. In: Milner R., ed. Cerebral Angiogenesis: Methods and Protocols. New York: Humana Press, 2014. P. 187-203.

13. Potts S.J., Eberhard D.A., Salama M.E. Practical approaches to microvessel analysis: hotspots, microvessel density, and vessel proximity. In: Potts S.J., Eberhard D.A., Wharton K.A., eds. Molecular Histopathology and Tissue Biomarkers in Drug and Diagnostic Development. New York: Springer, 2015. P. 87-100.

14. Антомонов М.Ю. Математическая обработка и анализ медико-биологических данных. К.: Фірма малого друку, 2006. 558 с.

References

1. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK et al. The 2016 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system: a summary. *Acta Neuropathol*. 2016; 131 (6): 803-20.

2. Shynkarenko TV, Shpon'ka IS, Kornilov BY. Alghorytmy diaghnostryky astro-

cytarnykh pukhlyn gholovnogho mozku u doroslykh z urakhuvannjam perehljadu klasyfikaciji pukhlyn centralnoji nervovoji systemy [Diagnostic algorithms for astrocytic brain tumors in adults according to revised classification of nervous system tumors]. *Morphologia*. 2016; 10 (3): 46-52. (in Ukrainian).

3. Louis DN, Ohgaki H, Wiestle OD, Cavenee WK, eds. *WHO classification of tumours of the central nervous system*. Revised 4th ed. Lyon: IARC; 2016. 408 p.

4. Birner P, Piribauer M, Fischer I, Gatterbauer B, Marosi C, Ambros PF et al. Vascular patterns in glioblastoma influence clinical outcome and associate with variable expression of angiogenic proteins: evidence for distinct angiogenic subtypes. *Brain Pathol*. 2003; 13 (2): 133-43.

5. Chen L, Lin ZX, Lin GS, Zhou CF, Chen YP, Wang XF et al. Classification of microvascular patterns via cluster analysis reveals their prognostic significance in glioblastoma. *Hum pathol*. 2015; 46 (1): 120-8.

6. Cai H, Xue Y, Liu W, Li Z, Hu Y, Li Z et al. Overexpression of Roundabout4 predicts poor prognosis of primary glioma patients via correlating with microvessel density. *J Neurooncol*. 2015; 123 (1): 161-9.

7. Clara CA, Marie SK, Almeida JR, Wakamatsu A, Oba Shinjo SM, Uno M et al. Angiogenesis and expression of PDGF C, VEGF, CD105 and HIF 1 α in human glioblastoma. *Neuropathology*. 2014; 34 (4): 343-52.

8. Yao Y, Kubota T, Takeuchi H, Sato K. Prognostic significance of microvessel density determined by an anti- CD105/endoglin monoclonal antibody in astrocytic tumors: Comparison with an anti- CD31 monoclonal antibody. *Neuropathology*. 2005; 25 (3): 201-6.

9. Korkolopoulou P, Patsouris E, Kavantzias N, Konstantinidou AE, Christodoulou P, Thomas & Tsagli E et al. Prognostic implications of microvessel morphometry in diffuse astrocytic neoplasms. *Neuropathol appl neurobiol*. 2002; 28 (1): 57-66.

10. Shi J, Zhao Y, Yuan Y, Wang C, Xie Z, Gao X et al. The expression of IDH1 (R132H) is positively correlated with cell proliferation and angiogenesis in glioma samples. *Chinese journal of cellular and molecular immunology*. 2016; 32 (3): 360-3.

11. Poslavska OV. Metodologhija vykorystannja proghramnogho zabezpechennja dlja analizu cyfrovykh mikrofotohrafij na bazi kursu patomorfologhiji z metoju pidvyshhennja profesijnogho rivnja studentiv i naukovciv [Methodology for the use of software for the analysis of digital micrographs on the base of pathomorphology course in order to increase the professional level of students and scientists]. *Morphologia*. 2015; 9 (3): 122-6. (in Ukrainian).

12. Mittelbronn M, Baumgarten P, Harter PN, Plate KH. Analysis of cerebral angiogenesis in human glioblastomas. In: *Cerebral Angiogenesis: Methods and Protocols*. New York; 2014. p. 187-203.

13. Potts SJ, Eberhard DA, Salama ME. Practical approaches to microvessel analysis: hotspots, microvessel density, and vessel proximity. In: *Molecular Histopathology and Tissue Biomarkers in Drug and Diagnostic Development*. New York; 2015. p. 87-100.

14. Antomonov M. *Matematicheskaja obrabotka i analiz mediko-biologicheskikh dannyh* [Mathematical processing and analysis of biomedical data]. K.:Firma Maliy Druk; 2006. p. 381-91. (in Russian)

Шпонька И.С. – д.м.н., профессор кафедры патологической анатомии и судебной медицины, ГУ «Днепропетровская медицинская академия МЗ Украины», г. Днепр, Украина.

Шинкаренко Т.В. – аспирант кафедры патологической анатомии и судебной медицины, ГУ «Днепропетровская медицинская академия Минздрава Украины», г. Днепр, Украина.
E-mail: Timash3061990@gmail.com.