

ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ГЛИОБЛАСТОМ

УДК 616–006.484–079.4

Поступила 20.02.2014 г.

© **И.А. Медяник**, к.м.н., старший научный сотрудник¹;
А.С. Гордещов, д.х.н., профессор, зав. кафедрой общей химии²;
О.В. Красникова, к.х.н., ассистент кафедры общей химии²;
И.А. Лобанов, врач-рентгенолог³;
В.В. Радовский, врач-патологоанатом⁴;
А.П. Фраерман, д.м.н., профессор, главный научный сотрудник¹;
И.Г. Терентьев, д.м.н., профессор, зав. кафедрой онкологии ФПКВ²;
Н.Н. Карякин, к.м.н., директор¹

¹Нижегородский НИИ травматологии и ортопедии Минздрава России, Н. Новгород, 603155, Верхне-Волжская набережная, 18/1;

²Нижегородская государственная медицинская академия, Н. Новгород, 603005, пл. Минина и Пожарского, 10/1;

³Лечебно-диагностический центр Международного института биологических систем им. Березина, Н. Новгород, 603167, ул. Нестерова, 34а;

⁴Нижегородская детская областная клиническая больница, Н. Новгород, 603136, ул. Ванеева, 211

Цель исследования — оценить возможность дифференцировки глиобластом с помощью инфракрасной спектроскопии, протонной магнитно-резонансной спектроскопии и иммуногистохимии.

Материалы и методы. Обследовано 22 больных глиобластомами, 21 больной анапластическими астроцитомами. Всем пациентам выполняли ИК-спектроскопию сыворотки крови. 16 больных глиобластомами обследованы в дооперационном и в послеоперационном периодах, из них семи в обоих случаях выполнена протонная магнитно-резонансная спектроскопия опухолей и идентичных участков перитуморальной зоны. Все диагнозы подтверждены морфологическим исследованием, в 10 случаях с глиобластомами и 15 случаях с анапластическими астроцитомами — иммуногистохимическим методом.

Результаты. Выявлена дифференцировка глиобластом (Grade IV) в анапластические астроцитомы (Grade III) в послеоперационном периоде при тотальном удалении глиобластом, что подтверждено результатами инфракрасной спектроскопии сыворотки крови и протонной магнитно-резонансной спектроскопии идентичных участков перитуморальной зоны, выполненных в дооперационном и послеоперационном периодах, и иммуногистохимическим исследованием опухолей и перитуморальной зоны.

Заключение. Совокупность используемых методов (инфракрасная спектроскопия, протонная магнитно-резонансная спектроскопия, иммуногистохимия) позволяет оценить, насколько эффективным и насколько тотальным было оперативное вмешательство, способствовало ли оно дифференцировке глиобластомы в послеоперационном периоде, и определить, по какому пути развития пойдет опухолевая болезнь в послеоперационном периоде: как глиобластома — с ранним продолженным ростом или как анапластическая астроцитома — с более длительным безрецидивным периодом. Полученные результаты согласуются с тканевой теорией онкогенеза, меняют понимание роли и значения хирургического удаления глиобластом в дифференцировке опухолей.

Ключевые слова: глиобластома; дифференцировка глиобластом; анапластическая астроцитома; инфракрасная спектроскопия.

English

The Study of Glioblastoma Differentiation

I.A. Medyanik, PhD, Senior Research Worker¹;
A.S. Gordetsov, D.Chem.Sc., Professor, Head of the Department of General Chemistry²;
O.V. Krasnikova, PhD, Assistant, the Department of General Chemistry²;
I.A. Lobanov, Radiologist³;
V.V. Radovsky, Pathologist⁴;
A.P. Fraerman, D.Med.Sc., Professor, Chief Research Worker¹;
I.G. Terentiev, D.Med.Sc., Professor, Head of the Oncology Department, the Faculty of Doctors' Advanced Training²;
N.N. Karyakin, PhD, Head of Research Institute¹

¹Nizhny Novgorod Research Institute of Traumatology and Orthopedics, Ministry of Health of the Russian Federation, Verkhne-Volzhskaya naberezhnaya St., 18, Nizhny Novgorod, Russian Federation, 603155;

Для контактов: Медяник Игорь Александрович, тел. моб. +7 908-767-62-21; e-mail: med_neuro@inbox.ru

²Nizhny Novgorod State Medical Academy, Minin and Pozharsky Square, 10/1, Nizhny Novgorod, Russian Federation, 603005;

³Diagnostic and Treatment Center of the International Institute of Biological Systems named after Dr. Sergey Berezin, Nesterova St., 34a, Nizhny Novgorod, Russian Federation, 603167;

⁴Nizhny Novgorod Regional Children's Teaching Hospital, Vaneeva St., 211, Nizhny Novgorod, Russian Federation, 603136

The aim of the investigation was to assess the possibility of glioblastoma differentiation using infrared spectroscopy, proton magnetic resonance spectroscopy and immunohistochemistry.

Materials and Methods. 22 patients with glioblastomas and 21 patients with anaplastic astrocytomas were examined. All the patients underwent infrared spectroscopy of blood serum. 16 patients with glioblastomas were examined preoperatively and postoperatively, and in both cases 7 of them underwent proton magnetic resonance spectroscopy of tumors and identical peritumoral areas. All diagnoses were morphologically confirmed, and 10 cases with glioblastomas and 15 cases with anaplastic astrocytomas were confirmed by immunohistochemistry.

Results. Glioblastoma differentiation (Grade IV) into anaplastic astrocytomas (Grade III) was revealed postoperatively, in total glioblastoma resection and confirmed by the findings of infrared spectroscopy in blood serum, proton magnetic resonance spectroscopy of identical peritumoral areas performed preoperatively and postoperatively, as well as by immunohistochemical investigation of peritumoral area.

Conclusion. The complex of the techniques applied (infrared spectroscopy, proton magnetic resonance spectroscopy, immunohistochemistry) enables to assess how effective and total the surgery was, and if it promoted glioblastoma differentiation postoperatively, and determine how the tumor will develop after the surgery: as glioblastoma — with early continued tumor growth, or as anaplastic astrocytoma — with longer recurrence-free period. The findings are in agreement with tissue theory of tumor genesis; and change the understanding of the role and significance of surgical resection of glioblastomas in tumor differentiation.

Key words: glioblastoma; glioblastoma differentiation; anaplastic astrocytoma; infrared spectroscopy.

Наряду с обычным, закономерным течением опухолевого процесса — постепенная трансформация в низко- и недифференцированные опухоли — возможен и переход злокачественных опухолей в опухоли с меньшей степенью анаплазии — обратная трансформация (дифференцировка, реверсия). Экспериментальные исследования показывают возможность индукции дифференцировки глиальных опухолевых клеток в зрелые глиальные клетки и торможения пролиферации [1–4]. Описываются разные факторы, вызывающие дифференцировку, однако механизм этого явления пока не ясен [5].

В литературе встречаются единичные описания дифференцировки злокачественных опухолей головного мозга, подтвержденные морфологически при повторных оперативных вмешательствах [6, 7]. Наиболее часто встречающейся и наиболее злокачественной опухолью головного мозга является глиобластома. Общая выживаемость больных с глиобластомами, по данным разных авторов, составляет 10–12 мес, больных с анапластическими астроцитарными опухолями — 20–24 мес [8, 9].

Важным критерием оценки эффективности лечения этих больных является период без прогрессирования, который может составлять от 1 до 12 мес. Точная причина раннего или позднего продолженного роста опухолей неизвестна. Считается, что увеличению срока жизни больных способствует тотальное удаление глиобластомы [10, 11].

Глиальные опухоли характеризуются инвазивным ростом, распространяясь в окружающее мозговое вещество далеко за пределы основного опухолевого узла, а в 47% случаев опухолевые клетки об-

наруживаются в противоположном полушарии [11, 12]. С высокой точностью определить наличие опухолевых клеток в окружающем опухоль веществе и уточнить морфологический характер опухоли в общей онкологии и в нейроонкологии позволяет инфракрасная (ИК) спектроскопия тканей. В исследованиях [13–17] показано, что ИК-спектры опухолевых и неопухолевых тканей, серого и белого вещества головного мозга, тканей астроцитом и глиобластом отличаются друг от друга.

Опухоль — это патологическое изменение структурно-функционального состояния не только самой новообразованной ткани, ее микроокружения, но и организма в целом. Известно, что в сыворотке крови отражаются абсолютно все процессы, происходящие в организме, в отдельных системах и группах клеток. Известно, что глиальные опухолевые клетки продуцируют ряд веществ, которые вызывают нарушение гематоэнцефалического барьера. В результате недоокисленные продукты и продукты жизнедеятельности опухолевых клеток попадают в сосудистое русло [11, 18].

Проводимые нами ранее исследования сыворотки крови с помощью ИК-спектроскопии больных опухолями головного мозга выявили достоверную зависимость между результатами ИК-спектроскопии, морфологическим характером опухолей и степенью их злокачественности [19–21]. На основе этих данных было проведено обследование больных глиобластомами в дооперационном и послеоперационном периодах, чтобы определить, возможно ли снижение степени анаплазии глиобластом от Grade IV в дооперационном периоде до Grade III (что соот-

ветствует анапластическим астроцитомам) в послеоперационном периоде, т.е. происходит ли дифференцировка глиобластом.

Цель исследования — определить возможность дифференцировки глиобластом с помощью инфракрасной спектроскопии, протонной магнитно-резонансной спектроскопии и иммуногистохимии.

Материалы и методы. Проведено простое слепое проспективное когортное исследование в группе 43 больных злокачественными образованиями головного мозга, находившихся на лечении в Нижегородском межобластном нейрохирургическом центре и в ННИИТО Минздрава России в период с 2009 по 2013 г. Глиобластомы (Grade IV) были диагностированы у 22 больных (51,16%). Из них первичные опухоли (de novo) отмечены у 21 больного, у одного больного была вторичная глиобластома — результат злокачественной трансформации удаленной в анамнезе анапластической астроцитомы. Анапластические астроцитомы (Grade III) диагностированы у 21 больного (48,84%). Группа сравнения — 28 здоровых добровольцев. Всем больным выполняли ИК-спектроскопию сыворотки крови. У 16 больных глиобластомами проведено сравнение результатов ИК-спектроскопии в дооперационном и послеоперационном периодах.

Исследование проведено в соответствии с Хельсинкской декларацией (принятой в июне 1964 г. (Хельсинки, Финляндия) и пересмотренной в октябре 2000 г. (Эдинбург, Шотландия)) и одобрено Этическим комитетом ННИИТО. От каждого пациента получено информированное согласие.

Методика исследования заключалась в следующем. Кровь, забранную из кубитальной вены в количестве 5,0 мл, центрифугировали с частотой 1000 об./мин в течение 15 мин. Отделенную сыворотку в количестве 1,0 мл высушивали в сухожаровом шкафу в чашке Петри при температуре 25°C на протяжении 24 ч. Сухой остаток сыворотки измельчали и суспензировали в вазелиновом масле. Исследование выполняли на спектрофотометре Specord 75 IR (Carl Zeiss, Германия) в области спектра 1200–1000 см⁻¹. Это позволяет выявить весь спектр веществ в сыворотке крови, содержащих связи Р–О и С–О, простые и сложные эфирные связи С–ОО, Р–ОО, к которым относятся все липиды, фосфорилированные белки, углеводы, КФК и другие соединения. Вначале определяли высоту пиков полос поглощения с максимумами 1170, 1165, 1160, 1150, 1140, 1130, 1125, 1100, 1070, 1050 и 1025 см⁻¹. Для исключения ошибок при оценке результатов ИК-спектроскопии изучали не абсолютные значения высот пиков полос поглощения, а вычисляли значения отношений высот пиков полос поглощения (см⁻¹/см⁻¹): 1 — 1165/1160, 2 — 1165/1070, 3 — 1165/1150, 4 — 1165/1140, 5 — 1040/1070, 6 — 1165/1130, 7 — 1070/1025, 8 — 1165/1050, 9 — 1165/1025, 10 — 1100/1050, 11 —

1170/1150, 12 — 1170/1160, 13 — 1125/1165. Забор крови осуществляли утром натощак, до приема медикаментов, накануне операции (1–3 дня), а также в послеоперационном периоде на (3–10-й дни).

У всех больных гистологические диагнозы в послеоперационном периоде были подтверждены морфологическим исследованием, в 25 сложных случаях (39,7%) — иммуногистохимическим методом (в 10 случаях — с глиобластомами, в 15 случаях — с анапластическими астроцитомами). При оценке результатов морфологических исследований мы пользовались международной классификацией ВОЗ [22]. Наличие двух из четырех основных критериев злокачественности опухолей: ядерного полиморфизма, митозов, эндотелиальной пролиферации, некрозов — соответствует III степени злокачественности (Grade III). Наличие не менее трех критериев соответствует IV степени злокачественности (Grade IV) [23].

В семи случаях у больных глиобластомами выполнена протонная магнитно-резонансная спектроскопия (ПМРС) опухолей и идентичных участков перифокальной зоны в дооперационном и послеоперационном периоде. Для этого использовали магнитно-резонансный томограф Magnetom-Symphony 1,5 T (Siemens, Германия) с применением головной катушки. Первоначально выполняли стандартные исследования головного мозга с построением T2-, T1-взвешенных изображений в аксиальной, сагиттальной и корональной проекциях, T2 Flair — в аксиальной проекции. На основе полученных изображений выделяли зону интереса для 2D-мультивоксельной спектроскопии. После предварительной настройки томографа в виде шиммирования и подавления сигнала от протонов молекул воды запускали протокол csi_se 30 с использованием программного обеспечения Spectroscopy Evaluation. Далее в ходе постпроцессинговой обработки получали графические изображения спектров и параметрических карт распределения метаболитов, а также их соотношений.

Полученные данные были обработаны с использованием методов одномерной статистики с помощью пакета прикладных программ Statistica 6.1. Результаты представлены в виде $M \pm \sigma$, где M — среднее арифметическое, σ — стандартное отклонение. Парные внутригрупповые и межгрупповые сравнения проводили с использованием t-критерия Стьюдента, критериев Вилкоксона и Манна–Уитни в зависимости от выполнения условий применимости. Выборки считались принадлежащими к разным генеральным совокупностям при $p \leq 0,05$.

Результаты. Для решения задачи определения возможности диагностики разных морфологических видов опухолей с разной степенью злокачественности с помощью ИК-спектроскопии сначала изучали значения отношений пиков полос поглощения в зависимости от гистологического характера опу-

холи головного мозга в дооперационном периоде (табл. 1).

При проведении исследования были выявлены статистически значимые корреляции между гистологическим диагнозом больных, уточненным по результатам морфологического (n=43) или иммуногистохимического (n=25) исследования, и значениями отношений 13 пиков полос поглощения, полученных при ИК-спектроскопии сыворотки крови этих же больных.

По результатам исследования для получения дифференциально-диагностических профилей строили диаграммы, состоящие из 13 радиальных лучей, исходящих из центра с углом между собой в

30°. Каждый из лучей соответствует определенному отношению полос поглощения. На этих лучах откладывали соответствующие вычисленные значения отношений и, соединяя между собой концы отрезков, получали плоские многоугольники, которые и являлись дифференциально-диагностическими профилями опухолей головного мозга (рис. 1).

В результате обследования с помощью ИК-спектроскопии 22 больных с морфологически верифицированной глиобластомой мы получили определенные повторяющиеся значения отношений, характерные только для опухоли головного мозга — глиобластомы со степенью злокачественности Grade IV (см. табл. 1, рис. 1, а). В результате обследования

Таблица 1

Значения отношений пиков полос поглощения ИК-спектров сыворотки крови больных глиобластомами (Grade IV) и анапластическими астроцитомами (Grade III) в дооперационном периоде

№ луча	Отношения пиков полос поглощения, см ⁻¹ /см ⁻¹	Норма (n=28)	Гистологический вариант опухоли	
			глиобластома (n=22)	астроцитома (n=21)
1	1165/1160	0,71±0,07	0,83±0,04*	0,56±0,07**
2	1165/1070	0,82±0,21	1,16±0,12*	0,54±0,06**
3	1165/1150	0,54±0,06	0,62±0,01*	0,42±0,05**
4	1165/1140	0,50±0,08	0,63±0,04*	0,39±0,02**
5	1040/1070	1,25±0,29	1,26±0,21	1,34±0,16
6	1165/1130	0,84±0,26	1,26±0,13*	0,73±0,17**
7	1070/1025	1,01±0,41	0,73±0,12	0,72±0,12
8	1165/1050	0,64±0,18	0,96±0,13*	0,44±0,01**
9	1165/1025	0,80±0,21	1,13±0,01*	0,38±0,08**
10	1100/1050	0,28±0,17	0,27±0,13	0,27±0,12
11	1170/1150	0,18±0,11	0,34±0,04*	0,15±0,05**
12	1170/1160	0,24±0,14	0,34±0,14	0,20±0,07
13	1125/1165	0,86±0,36	0,57±0,18	0,97±0,17**

* — статистически значимые различия значений с группой здоровых людей (p≤0,05); * — с группой больных глиобластомой (p≤0,05).

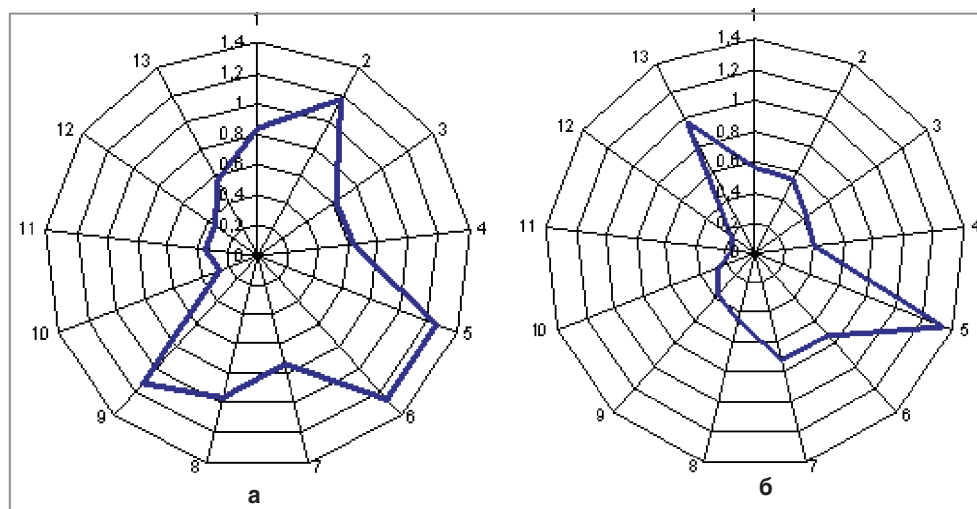


Рис. 1. Диагностический профиль на основе усредненных данных: а — глиобластомы (Grade IV); б — астроцитомы (Grade III)

21 больного с морфологически верифицированной в послеоперационном периоде анапластической астроцитомой мы получили определенные повторяющиеся значения отношений, характерные только для опухоли головного мозга — анапластической астроцитомы, со степенью злокачественности Grade III (см. табл. 1, рис. 1, б).

Затем для выявления возможности дифференцировки глиобластом в послеоперационном периоде с помощью ИК-спектроскопии сыворотки крови выполнили обследование 16 больных с диагнозом «глиобластома» (Grade IV) и сопоставили полученные данные с результатами обследования этих же больных до операции (табл. 2).

Установлено, что в 12 случаях при условии тотально удаленной опухоли в послеоперационном периоде 13 значений отношений пиков полос поглощения и их диаграммы изменялись и по своим характеристикам соответствовали диагнозу «анапластическая астроцитомы» (Grade III). В четырех случаях при субтотальном удалении опухолей результаты ИК-спектроскопии в послеоперационном периоде не менялись по сравнению с дооперационными и по-прежнему соответствовали диагнозу «глиобластома» (Grade IV). Объем удаления оценивали по КТ или МРТ головного мозга с контрастным усилением в послеоперационном периоде. Тотальным удалением считали отсутствие накопления контраста в зоне оперативного вмешательства.

Известно, что уточнить морфологический характер опухолей, оценить степень анаплазии по содержанию и значениям соотношений метаболитов в опухоли и в перитуморальной зоне позволяет ПМРС [24–27]. Нами выполнена ПМРС семи больными глиобластомами. Изучали состояние опухоли и перитуморальной зоны в дооперационном и послеоперационном периодах. Установлено, что в дооперационном периоде у всех пациентов в опухоли определялось значительное увеличение высоты пика холина (Cho), значительное снижение высоты пика N-ацетиласпартата (NAA) и высокий двугорбый пик лактата (Lac). Отношение холин/креатин (Cho/Cr) имело очень высокие значения (до 20,1). Отмечали также существенное увеличение значений отношения Lac/Cr (до 39). Все вышеперечисленные данные свидетельствуют о высокой степени злокачественности опухоли — Grade IV. В перитуморальной зоне на расстоянии до 1,0 см от видимой границы опухоли отмечали умеренное увеличение высоты пика Cho, незначительное снижение высоты пика NAA и небольшое увеличение высоты пика Lac. Определяли выраженное снижение значений соотношения миоинозитол/креатин (Ins/Cr) — $0,15 \pm 0,12$, увеличение значений отношения глутамин–глутамат/креатин (Glx/Cr) — $0,36 \pm 0,04$. Значения отношения Cho/Cr в различных вокселях составляли $1,36 \pm 0,70$. Полученные результаты также соответствовали сте-

Таблица 2

Результаты ИК-спектроскопии сыворотки крови 16 больных глиобластомами (Grade IV) в зависимости от объема удаления опухоли в послеоперационном периоде

Отношения пиков полос поглощения, см ⁻¹ /см ⁻¹	Объем удаления	
	тотально (n=12)	субтотально (n=4)
1165/1160	0,56±0,07	0,83±0,04
1165/1070	0,54±0,06	1,16±0,12
1165/1150	0,42±0,05	0,62±0,01
1165/1140	0,39±0,02	0,63±0,04
1040/1070	1,34±0,16	1,26±0,21
1165/1130	0,73±0,17	1,26±0,13
1070/1025	0,72±0,12	0,73±0,12
1165/1050	0,44±0,01	0,96±0,13
1165/1025	0,38±0,08	1,13±0,01
1100/1050	0,27±0,12	0,27±0,13
1170/1150	0,15±0,05	0,34±0,04
1170/1160	0,20±0,07	0,34±0,14
1125/1165	0,97±0,17	0,57±0,18

пени анаплазии Grade IV. Во всех случаях диагноз «глиобластома» был подтвержден результатами гистологического исследования разных участков опухолей. Гетерогенных опухолей с разной гистологической структурой в одном опухолевом узле в наших наблюдениях не установлено.

После хирургического удаления опухолей этим же семи больным глиобластомами выполнена ПМРС идентичных участков перитуморальной зоны. При проведении сравнительного анализа метаболических изменений до и после удаления опухоли установлено, что в перитуморальной зоне после операции определялось уменьшение высоты пика Cho, незначительное повышение значений отношения Ins/Cr ($0,22 \pm 0,29$), снижение значений отношения Glx/Cr ($0,21 \pm 0,08$) и снижение значений отношения Cho/Cr до $0,69 \pm 0,23$, что указывает на снижение степени анаплазии до Grade III–II.

При исследовании маркера пролиферативной активности Ki-67 в солидной части опухоли и в опухолевых клетках перифокальной зоны у 10 больных глиобластомами после операции выявлено, что в опухоли индекс пролиферации Ki-67 составлял в среднем 15–25%, что соответствует глиобластома со степенью анаплазии Grade IV (рис. 2, а). Во всех случаях проводилось исследование разных участков опухолей. Смешанных гистологических вариантов опухолей не обнаружено. При исследовании перитуморальной зоны опухолей, удаленных тотально, в участках, где выявлялись опухолевые клетки, Ki-67 составлял в среднем 5–10%, что соответствует опухоли со степенью анаплазии Grade III–II (рис. 2, б) [22].

Приводим клинический пример.

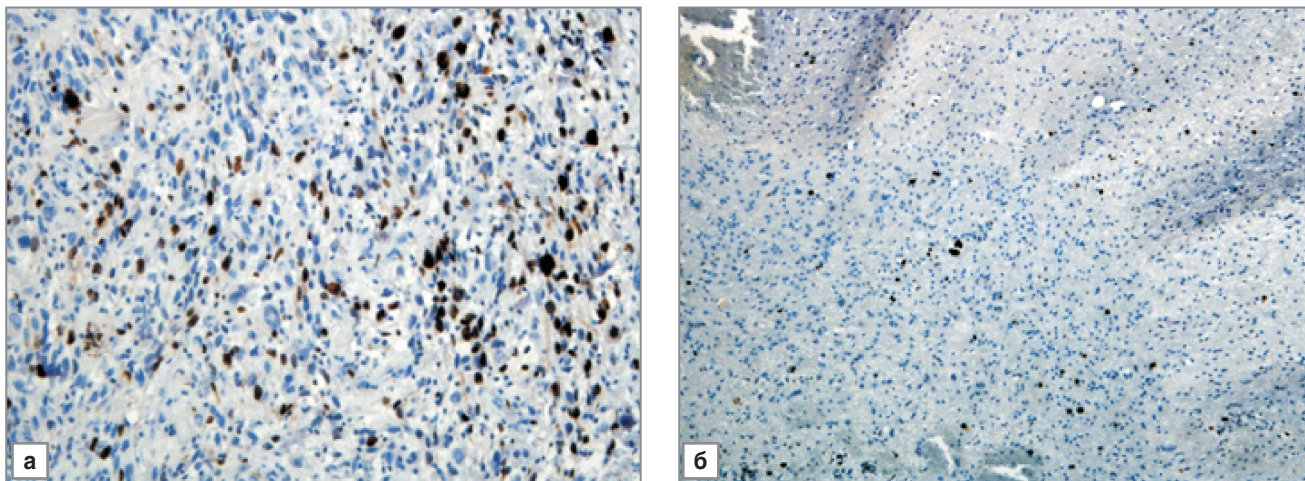


Рис. 2. Экспрессия Ki-67 в ядрах опухолевых клеток: *а* — основного узла глиобластомы, равная 25%; $\times 200$; *б* — перитуморальной зоны, равная 10%; $\times 100$

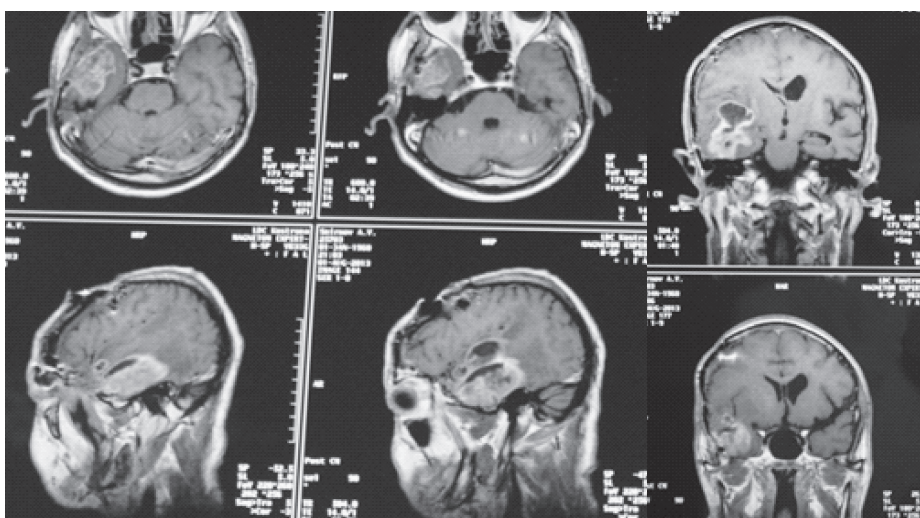


Рис. 3. МРТ больного С. от 1.08.2013 г. с контрастным усилением. Продолженный рост кистозной опухоли правой височной доли

Больной С. оперирован по поводу продолженного роста опухоли правой височной доли 23.09.2013 г. Гистологическое заключение от 01.10 — глиобластома.

В дооперационном периоде больному выполнены МРТ (рис. 3) и ПМРС (рис. 4, а), в послеоперационном периоде — контрольная МРТ (рис. 5) и ПМРС (рис. 4, б).

В послеоперационном периоде в 20 из 21 сравниваемого вокселя (95,2%) отмечается снижение значений отношения Cho/Cr ($p < 0,01$, критерий Манна–Уитни).

В четырех случаях, когда было выполнено субтотальное удаление опухоли, результаты ИК-спектроскопии сыворотки крови в дооперационном и послеоперационном периодах не менялись и соответствовали диагнозу «глиобластома». При сравнении данных ПМРС идентичных участков перитуморальной зоны в дооперационном и послеоперационном периодах выявлено, что в перитуморальной зоне после субтотального удаления опухоли в отдельных участках отмечается незначительное сни-

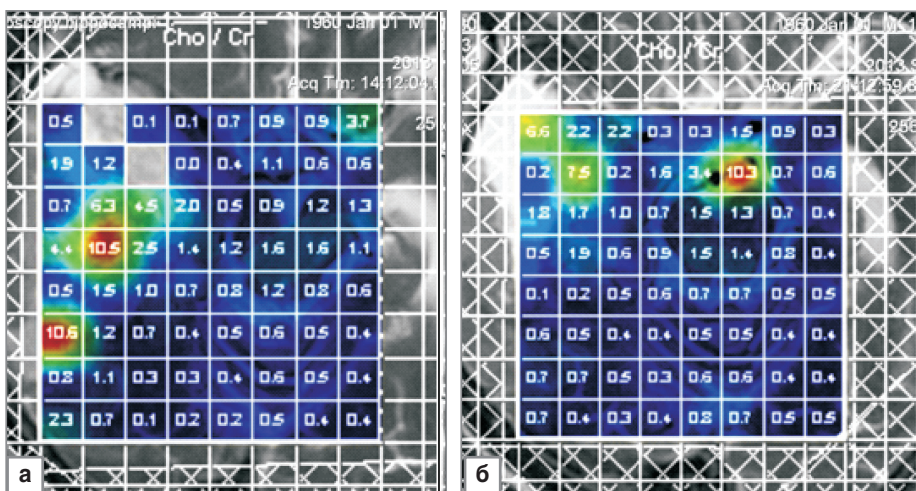
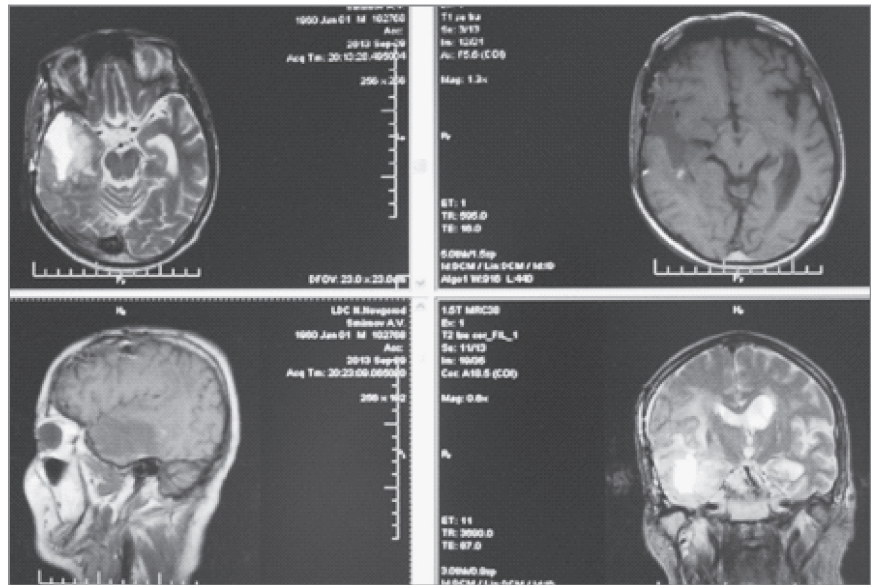


Рис. 4. 2D-мультивоксельная ПМРС больного С. Цветные параметрические карты. Соотношение Cho/Cr: *а* — МРС до операции от 17.09.2013 г.; *б* — МРС после операции от 29.09.2013 г.

Рис. 5. МРТ больного С. от 29.09.2013 г. с контрастным усилением. Состояние после удаления опухоли височной доли справа. Отек вокруг послеоперационной кисты. Накопление контраста не определяется



жение значений отношений Cho/Cr, Cho/NAA, Glx/Cr и незначительное увеличение значений отношений NAA/Cr и Ins/Cr, что свидетельствует о снижении степени анаплазии, однако в меньшем объеме, чем после тотального удаления опухоли. В прилегающих к опухоли участках перитуморальной зоны сохраняются метаболические изменения, соответствующие степени анаплазии Grade IV, чего не наблюдалось при тотальном удалении опухоли.

Во всех четырех случаях субтотального удаления опухоли при морфологическом и иммуногистохимическом исследовании в перитуморальной зоне определялись опухолевые клетки глиобластомы с высоким индексом Ki-67, что соответствует степени анаплазии Grade IV.

Во всех четырех случаях субтотального удаления отмечался ранний (до месяца) продолженный рост опухолей.

Обсуждение. Полученные нами результаты дифференцировки глиобластом (Grade IV) в анапластические астроцитомы (Grade III) в послеоперационном периоде теоретически можно объяснить с позиции тканевой теории онкогенеза, согласно которой саморегулирующаяся система (гомеостаз) контролирует постоянство качественного и количественного состава клеток, обладающих потенциальностью к независимому размножению. Согласно этой теории нарушение тканевого механизма контроля приводит к неконтролируемому делению клоногенных опухолевых стволовых клеток, обладающих активизированными онкогенами [28]. Подтверждением данной теории является эксперимент по трансплантации опухолевых стволовых клеток глиобластом человека в хвостовое ядро мозга генетически модифицированных бестимусных мышей. Гистологический тип опухолей, выявляемых через 10–19 сут в обоих полушариях мозга, и степень анаплазии зависели от их локализации (микроок-

ружения). Так, в хвостовом ядре или в прилежащей паренхиме мозга опухоль напоминала по структуре мультиформную глиобластому человека. В субэпендимарном слое она выглядела как эпендимоастроцитомы, в хориоидном сплетении гистологически опухоль имела признаки карциномы хориоидального сплетения [29]. Влияние микроокружения на морфологическую дифференцировку клеток подтверждено и другими исследователями [30–32]. В процессах направленной онкодифференцировки большая роль отводится клеточно-молекулярному и метаболическому микроокружению опухолевых клеток, включающему взаимодействие между опухолевыми и неопухолевыми клетками, факторами стромального компонента, нейрональными стволовыми клетками, опухолевыми стволовыми клетками; а также напряжению кислорода, кислотности, содержанию лактата, глюкозы, дефициту энергии, потоку интерстициальной жидкости, интерстициальной гипертензии, продуцирующимся клетками микроокружения разным факторам, влияющим на пролиферацию, тип деления и дифференцировку клеток [28, 33–35].

При тотальном удалении опухолевого узла одновременно удаляются основная масса активно пролиферирующих опухолевых клеток, большая часть химио- и радиорезистентных опухолевых клеток, опухолевые стволовые клетки, находящиеся в строме опухоли, очаги некрозов, большая часть новообразованных опухолевых сосудов, продуцируемые опухолевыми клетками факторы роста, цитокины, медиаторы воспаления, антитела, протеазы и другие типы ферментов, различные метаболиты и т.д. В послеоперационном периоде существенно меняются кровоток, сосудистая проницаемость, кислотность, осмотическое, онкотическое давление, парциальное напряжение кислорода и другие показатели в перитуморальной зоне опухоли. Все

вышеперечисленное также существенно меняет гомеостаз окружающих тканей. Оставшиеся в перифокальной зоне неудаленные опухолевые клетки в послеоперационном периоде находятся в измененных условиях микроокружения. Возникающее после удаления основного узла опухоли изменение гомеостаза микроокружения при условии прекращения массивного воздействия на него опухоли теоретически может способствовать дифференцировке глиобластомы (Grade IV) в менее злокачественную опухоль головного мозга — анапластическую астроцитому (Grade III).

Накопленные эмпирические и экспериментальные данные показывают, что не всегда генетические нарушения ведут к злокачественной трансформации и активному росту опухолей. Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что в случае тотального удаления глиобластомы в послеоперационном периоде диагноз «глиобластома» не соответствует реальности с учетом изменений в перифокальной зоне. Это подтверждается результатами трех разных методов исследований: с помощью ИК-спектроскопии, ПМРС, иммуногистохимии. При исследовании сыворотки крови с помощью ИК-спектроскопии значения отношений спектров в дооперационном периоде соответствуют опухоли со степенью анаплазии Grade IV, в послеоперационном — степени анаплазии Grade III. По данным ПМРС, при сравнении идентичных участков перитуморальной зоны в дооперационном и послеоперационном периодах отмечается снижение уровня опухолевых метаболитов и их соотношений, что свидетельствует о снижении степени анаплазии от Grade IV в дооперационном периоде до Grade III в послеоперационном периоде. При иммуногистохимическом обследовании пролиферативной активности опухолевых клеток по экспрессии Ki-67 в опухолевом узле определяется степень анаплазии Grade IV, что соответствует диагнозу «глиобластома». В перитуморальной зоне отмечается снижение индекса по сравнению с основной частью опухоли до степени анаплазии Grade III–II, что соответствует диагнозу «анапластическая астроцитомы».

Заключение. Совокупность используемых методов (ИК-спектроскопия, протонная магнитно-резонансная спектроскопия и иммуногистохимия) позволяет оценить, насколько эффективным и насколько тотальным было оперативное вмешательство, способствовало ли оно дифференцировке глиобластомы в послеоперационном периоде, и определить, по какому пути развития пойдет опухолевая болезнь в раннем послеоперационном периоде: как глиобластома — с ранним продолженным ростом или как анапластическая астроцитомы — с более длительным безрецидивным периодом.

Полностью удалить глиальные опухоли головного мозга из-за инфильтративного характера роста невозможно. Тем не менее основным компонентом

лечения злокачественных опухолей головного мозга по-прежнему остается оперативное вмешательство. Наши исследования показывают, что для предотвращения раннего продолженного роста опухолей необходимо стремиться к их тотальному удалению. Дифференцировка злокачественных опухолей головного мозга (глиобластом) со степенью анаплазии Grade IV в анапластические астроцитомы со степенью анаплазии Grade III сопровождается увеличением периода без прогрессирования.

Выявленная закономерность позволяет сделать шаг в понимании механизмов злокачественной трансформации и дифференцировки опухолей головного мозга и открывает перспективы разработки направленного воздействия на этот процесс.

Финансирование исследования. Работа выполнена за счет внебюджетных средств НижГМА и ННИИТО.

Конфликт интересов. У авторов нет конфликта интересов.

Литература

1. Terés S., Lladó V., Higuera M., et al. 2-Hydroxyoleate, a nontoxic membrane binding anticancer drug, induces glioma cell differentiation and autophagy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109(22): 8489–8494.
2. Xie Y.K., Huo S.F., Zhang G., et al. CDA-2 induces cell differentiation through suppressing Twist/SLUG signaling via miR-124 in glioma. *J Neurooncol* 2012; 110(2): 179–186, <http://dx.doi.org/10.1007/s11060-012-0961-x>.
3. Zhuang W., Long L., Zheng B., et al. Curcumin promotes differentiation of glioma-initiating cells by inducing autophagy. *Cancer Sci* 2012; 103(4): 684–690, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1349-7006.2011.02198.x>.
4. Sukhdeo K., Hambardzumyan D., Rich J.N. Glioma development: where did it all go wrong? *Cell* 2011; 146(2): 187–188, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.06.047>.
5. Анисимов А.Г., Волкова Т.О., Чекмасова А.А., Немова Н.Н. Химически индуцированная дифференцировка клеток опухолевых линий. *Онтогенез* 2002; 33(5): 325–341.
6. Притыко А.Г., Коршунов А.Г., Холодов Б.В. и др. Трансформация медуллобластом у детей на фоне полихимиотерапии с образованием астроцитарной глиомы. В кн.: *Материалы III съезда нейрохирургов России, 4–8 июня 2002 г., Санкт-Петербург. СПб; 2002; с. 585–586.*
7. Yang M.M., Singhal A., Rassekh S.R., et al. Possible differentiation of cerebral glioblastoma into pleomorphic xanthoastrocytoma: an unusual case in an infant. *J Neurosurg Pediatr* 2012; 9(5): 517–523, <http://dx.doi.org/10.3171/2012.1.PEDS11326>.
8. Олюшин В.Е., Филатов М.В., Острейко О.В. и др. Комплексная терапия больных глиомами полушарий большого мозга: итоги последнего десятилетия и перспективы. Комбинированное лечение опухолей головного мозга. В кн.: *Материалы Всерос. конф., 17–19 мая 2004. Екатеринбург; 2004; с. 72–73.*
9. Кобяков Г.Л. Химиотерапия в комплексном лечении больных с первичными злокачественными опухолями головного мозга. Автореф. дис. ... док. мед. наук. М; 2011.

10. Keles G.E., Anderson B., Berger M.S. The effect of extent of resection on time to tumor progression and survival in patients with glioblastoma multiforme of the cerebral hemisphere. *Surg Neurol* 1999; 52(4): 371–379.

11. Зозуля Ю.А. Глиомы головного мозга. Киев: УИПК «ЕксОб»; 2007; 632 с.

12. Burger P.C., Dubois P.J., Schold S.C., et al. Computerized tomographic and pathologic studies of the antreated, quiescent, and recurrent glioblastoma multiforme. *J Neurosurg* 1983; 58(2): 159–169.

13. Толсторожев Г.Б., Скорняков И.В., Бутра И.В. Диагностика онкологических патологий человека методом инфракрасной спектроскопии. *Журнал прикладной спектроскопии* 2009; 76(6): 805–816.

14. Stelling A.L., Toher D., Uckermann O., et al. Infrared spectroscopic studies of cells and tissues: triple helix proteins as a potential biomarker for tumors. *PLoS One* 2013; 8(3): e58332, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0058332>.

15. Steiner G., Shaw A., Choo-Smith L.P., et al. Distinguishing and grading human gliomas by IR spectroscopy. *Biopolymers* 2003; 72(6): 464–471.

16. Krafft C., Sobottka S.B., Schackert G., Salzer R. Analysis of human brain tissue, brain tumors and tumor cells by infrared spectroscopic mapping. *Analyst* 2004; 129(10): 921–925, <http://dx.doi.org/10.1039/B408934K>.

17. Krafft C., Sobottka S.B., Geiger K.D., et al. Classification of malignant gliomas by infrared spectroscopic imaging and linear discriminant analysis. *Anal Bioanal Chem* 2007; 387(5): 1669–1677.

18. Улитин А.Ю., Олюшин В.Е., Сафаров Б.И., Мацко Д.Е. Метастатические опухоли головного мозга. СПб: ФГУ «РНХИ им. проф. А.Л. Поленова Ростехнологий»; 2010; 381 с.

19. Гордецов А.С., Медяник И.А., Лебедев А.В. и др. Способ диагностики новообразований головного мозга. Патент РФ №2350953. 2009.

20. Гордецов А.С. Инфракрасная спектроскопия биологических жидкостей и тканей. *Современные технологии в медицине* 2010; 1: 84–98.

21. Гордецов А.С., Медяник И.А., Лебедев А.В. и др. Способ дифференциальной диагностики новообразований головного мозга. Положительное решение о выдаче патента РФ от 10.01.2014 г. по заявке №2013101333 от 10.01.2013 г.

22. WHO Classification of tumors, of the central nervous system. Lion; 2007.

23. Daumas-Duport C. Histological grading of gliomas. *Curr Opin Neurol Neurosurg* 1992; 5: 924–931.

24. Современные технологии и клинические исследования в нейрохирургии. Том I. Под ред. А.Н. Коновалова. М; 2012; 320 с.

25. Труфанов Г.Е., Тютин Л.А. Магнитно-резонансная спектроскопия. СПб: ЭЛБИ–СПб; 2008; 239 с.

26. Kim J.H., Chang K.H., Na D.G., et al. 3T 1H-MR Spectroscopy in grading of cerebral gliomas: comparison of short and intermediate echo time sequences. *Am J Neuroradiol* 2006; 27(7): 1412–1418.

27. Karatağ O., Karatağ G.Y., Uysal E., et al. Can magnetic resonance spectroscopy adequately differentiate neoplastic from non-neoplastic and low-grade from high-grade lesions in brain masses? *Marmara Med Journal* 2010; 23(3): 326–338.

28. Черезов А.Е. Общая теория рака: тканевый подход. М: Изд-во МГУ; 1997; 252 с.

29. Dong Y., Zhang G., Huang G., et al. Glioma stem cells involved in tumor tissue remodeling in a xenograft model. *J Neurosurg* 2010; 113(2): 249–260, <http://dx.doi.org/10.3171/2010.2.JNS09335>.

30. Борисов К.Е., Макеева Д.Д. Стволовые клетки глиальных опухолей головного мозга. *Архив патологии* 2013; 2: 43–52.

31. Talayev V.Yu., Matveichev A.V., Lomunova M.A., et al. The effect of human placenta cytotrophoblast cells on the maturation and T cell stimulating ability of dendritic cells in vitro. *Clin Experim Immunol* 2010; 162(1): 91–99.

32. Persano L., Rampazzo E., Basso G., Viola G. Glioblastoma cancer stem cells: role of the microenvironment and therapeutic targeting. *Biochem Pharmacol* 2012; 85(5): 612–622.

33. Бережная Н.М. Роль клеток системы иммунитета в микроокружении опухоли. II. Взаимодействие клеток системы иммунитета с другими компонентами микроокружения. *Онкология* 2009; 11(2): 86–93.

34. Осинский С.П., Ваупель П. Микрофизиология. Киев: Наукова думка; 2009; 254 с.

35. Лисяный Н.И. Стволовые клетки злокачественных глиом и их взаимодействие с клеточным микроокружением ткани. *Укр нейрохірургіч журн* 2011; 2: 9–13.

References

1. Terés S., Lladó V., Higuera M., et al. 2-Hydroxyoleate, a nontoxic membrane binding anticancer drug, induces glioma cell differentiation and autophagy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109(22): 8489–8494.

2. Xie Y.K., Huo S.F., Zhang G., et al. CDA-2 induces cell differentiation through suppressing Twist/SLUG signaling via miR-124 in glioma. *J Neurooncol* 2012; 110(2): 179–186, <http://dx.doi.org/10.1007/s11060-012-0961-x>.

3. Zhuang W., Long L., Zheng B., et al. Curcumin promotes differentiation of glioma-initiating cells by inducing autophagy. *Cancer Sci* 2012; 103(4): 684–690, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1349-7006.2011.02198.x>.

4. Sukhdeo K., Hambardzumyan D., Rich J.N. Glioma development: where did it all go wrong? *Cell* 2011; 146(2): 187–188, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.06.047>.

5. Anisimov A.G., Volkova T.O., Chekmasova A.A., Nemova N.N. Chemically induced differentiation of tumor line cells. *Ontogenez* 2002; 33(5): 325–341.

6. Prityko A.G., Korshunov A.G., Kholodov B.V., et al. Transformatsiya medulloblastom u detey na fone polikhimioterapii s obrazovaniem astrotsitarnoy gliomy. V kn.: *Materialy III s'ezda neyrokhirurgov Rossii, 4–8 iyunya 2002 g., Sankt-Peterburg* [Medulloblastoma transformation in children with poly-chemotherapy with the formation of astrocytic glioma. In: Proceedings of III Russian Neurosurgery congress, June 4–8, 2002. Saint-Petersburg]. Sankt Petersburg; 2002; p. 585–586.

7. Yang M.M., Singhal A., Rassekh S.R., et al. Possible differentiation of cerebral glioblastoma into pleomorphic xanthoastrocytoma: an unusual case in an infant. *J Neurosurg Pediatr* 2012; 9(5): 517–523, <http://dx.doi.org/10.3171/2012.1.PEDS11326>.

8. Olyushin V.E., Filatov M.V., Ostreyko O.V., et al. Kompleksnaya terapiya bol'nykh gliomami polushariy bol'shogo mozga: itogi poslednego desyatiletia i perspektivy. *Kombinirovannoe lechenie opukholey golovnoy mozga. V kn.: Materialy Vseros. konf., 17–19 maya 2004* [Complex therapy

of patients with cerebral gliomas: the results of the last decade and prospective. Combined treatment of cerebral tumors. In: Proceedings of All-Russian conference, May 17-19, 2004]. Ekaterinburg; 2004; p. 72–73.

9. Kobyakov G.L. *Khimioterapiya v kompleksnom lechenii bol'nykh s pervichnymi zlokachestvennymi opukholyami golovnogo mozga*. Avtoref. dis. ... dok. med. nauk [Chemotherapy in complex therapy of patients with primary cerebral malignancies. Abstract of a thesis for the degree of Doctor of Medical Science]. Moscow; 2011.

10. Keles G.E., Anderson B., Berger M.S. The effect of extent of resection on time to tumor progression and survival in patients with glioblastoma multiforme of the cerebral hemisphere. *Surg Neurol* 1999; 52(4): 371–379.

11. Zozulya Yu.A. *Gliomy golovnogo mozga* [Cerebral gliomas]. Kiev: UIPK "EksOb"; 2007; 632 p.

12. Burger P.C., Dubois P.J., Schold S.C., et al. Computerized tomographic and pathologic studies of the untreated, quiescent, and recurrent glioblastoma multiforme. *J Neurosurg* 1983; 58(2): 159–169.

13. Tolstorozhev G.B., Skorniyakov I.V., Butra I.V. Diagnosis of oncological human pathologies using infrared spectroscopy. *Zhurnal prikladnoy spektroskopii* 2009; 76(6): 805–816.

14. Stelling A.L., Toher D., Uckermann O., et al. Infrared spectroscopic studies of cells and tissues: triple helix proteins as a potential biomarker for tumors. *PLoS One* 2013; 8(3): e58332, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0058332>.

15. Steiner G., Shaw A., Choo-Smith L.P., et al. Distinguishing and grading human gliomas by IR spectroscopy. *Biopolymers* 2003; 72(6): 464–471.

16. Krafft C., Sobottka S.B., Schackert G., Salzer R. Analysis of human brain tissue, brain tumors and tumor cells by infrared spectroscopic mapping. *Analyst* 2004; 129(10): 921–925, <http://dx.doi.org/10.1039/B408934K>.

17. Krafft C., Sobottka S.B., Geiger K.D., et al. Classification of malignant gliomas by infrared spectroscopic imaging and linear discriminant analysis. *Anal Bioanal Chem* 2007; 387(5): 1669–1677.

18. Ulitin A.Yu., Olyushin V.E., Safarov B.I., Matsko D.E. *Metastaticheskie opukholi golovnogo mozga* [Metastatic cerebral tumors]. Sankt Petersburg: FGU «RNKh im. prof. A.L. Polenova Rostekhnologii»; 2010; 381 p.

19. Gordetsov A.S., Medyanik I.A., Lebedev A.V., et al. *Sposob diagnostiki novoobrazovaniy golovnogo mozga* [Diagnostic technique of cerebral neoplasms]. Patent RF No. 2350953. 2009.

20. Gordetsov A.S. *Infrakrasnaya spektroskopiya biologicheskikh zhidkostey i tkaney* [Infrared spectroscopy of biological fluids and tissues]. *Sovremennye tekhnologii v medicine* 2010; 1: 84–98.

21. Gordetsov A.S., Medyanik I.A., Lebedev A.V., et

al. *Sposob differentsial'noy diagnostiki novoobrazovaniy golovnogo mozga*. Polozhitel'noe reshenie o vydache patenta RF ot 10.01.2014 g. po zayavke №2013101333 ot 10.01.2013 g. [Differential diagnostic technique of cerebral tumors. Russian Federation patent approval dated 10.01.2014, Application for a patent No.2013101333 dated 10.01.2013].

22. *WHO Classification of tumors, of the central nervous system*. Lion; 2007.

23. Daumas-Duport C. Histological grading of gliomas. *Curr Opin Neurol Neurosurg* 1992; 5: 924–931.

24. *Sovremennye tekhnologii i klinicheskie issledovaniya v neyrokhirurgii*. Tom I [Modern technologies and clinical studies in neurosurgery. Volume I]. Pod red. A.N. Konovalova [A.N. Konovalov, editor]. Moscow; 2012; 320 p.

25. Trufanov G.E., Tyutin L.A. *Magnitno-rezonansnaya spektroskopiya* [Magnetic resonance spectroscopy]. Sankt Petersburg: ELBI-SPb; 2008; 239 p.

26. Kim J.H., Chang K.H., Na D.G., et al. 3T 1H-MR Spectroscopy in grading of cerebral gliomas: comparison of short and intermediate echo time sequences. *Am J Neuroradiol* 2006; 27(7): 1412–1418.

27. Karatağ O., Karatağ G.Y., Uysal E., et al. Can magnetic resonance spectroscopy adequately differentiate neoplastic from non-neoplastic and low-grade from high-grade lesions in brain masses? *Marmara Med Journal* 2010; 23(3): 326–338.

28. Cherezov A.E. *Obshchaya teoriya raka: tkanevyy podkhod* [General tumor theory: tissue approach]. Moscow: Izd-vo MGU; 1997; 252 p.

29. Dong Y., Zhang G., Huang G., et al. Glioma stem cells involved in tumor tissue remodeling in a xenograft model. *J Neurosurg* 2010; 113(2): 249–260, <http://dx.doi.org/10.3171/2010.2.JNS09335>.

30. Borisov K.E., Makeeva D.D. Stem cells of cerebral gliomas. *Arkhiv patologii* 2013; 2: 43–52.

31. Talayev V.Yu., Matveichev A.V., Lomunova M.A., et al. The effect of human placenta cytotrophoblast cells on the maturation and T cell stimulating ability of dendritic cells in vitro. *Clin Experim Immunol* 2010; 162(1): 91–99.

32. Persano L., Rampazzo E., Basso G., Viola G. Glioblastoma cancer stem cells: role of the microenvironment and therapeutic targeting. *Biochem Pharmacol* 2012; 85(5): 612–622.

33. Berezhnaya N.M. The role of immune system cells in tumor microenvironment. II. Interaction of immune system cells with other components of microenvironment. *Onkologiya* 2009; 11(2): 86–93.

34. Osinskiy S.P., Vaupel' P. *Mikrofiziologiya* [Microphysiology]. Kiev: Naukova dumka; 2009; 254 p.

35. Lisyanyy N.I. Stem cells of malignant gliomas and their interaction with tissue cell microenvironment. *Ukr neyrokhirurgich zhurn* 2011; 2: 9–13.