

**Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный медицинский исследовательский центр онкологии
имени Н.Н.Блохина»
Министерства здравоохранения Российской Федерации**

На правах рукописи

СТРОГАНОВА АННА МИХАЙЛОВНА

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ В ДИАГНОСТИКЕ
НЕЙРОБЛАСТОМЫ**

14.01.12 онкология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук, профессор
Карселадзе Аполлон Иродионович

Москва — 2018 г.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	10
1.1. История изучения нейробластомы	10
1.2. Общая характеристика нейробластомы	11
1.3. Клинические стадии нейробластомы	13
1.4. Гистологическое строение нейробластомы	14
1.5. Факторы, определяющие прогноз заболевания	17
1.6. Характеристика и функции гена <i>MYCN</i>	19
1.7. Амплификация гена <i>MYCN</i>	19
1.7.1. Определение понятия. Особенности при нейробластоме	19
1.7.2. Методы определения статуса гена <i>MYCN</i>	22
1.7.3. Гетерогенность амплификации гена <i>MYCN</i>	23
1.7.4. Механизм формирования амплификации	24
1.7.5. Типы амплификации гена <i>MYCN</i> и их прогностическое значение при нейробластоме. Элиминация амплифицированных последовательностей	26
1.8. Хромосомные aberrации при нейробластоме	28
1.9. Метод первичных тканевых культур	30
1.10. Белок CRABP1 и его роль в процессе дифференцировки	32
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	34
2.1. Метод флуоресцентной <i>in situ</i> гибридизации (FISH) на мазках-отпечатках опухоли	35
2.2. Метод FISH на парафиновых срезах	36
2.2.1. FISH на парафиновом срезе – стандартная методика (обработка 1М изотиоцианатом натрия)	36
2.2.2. FISH на парафиновом срезе – использование высокого давления	38
2.2.3. Оценка результатов FISH-реакции	40
2.3. Метод первичных тканевых культур	41

2.3.1. Получение фиксированного <i>in situ</i> материала опухолевых клеток на слайд-флаконах	41
2.3.2. Методика культивирования клеток нейробластомы <i>in vitro</i>	42
2.3.3. Получение фиксированного материала опухолевых клеток при культивировании Flask-методом для цитогенетического исследования	43
2.3.4. Процедура FISH для культивированных опухолевых клеток	45
2.4. Определение экспрессии белка CRABP1	46
2.4.1. Метод иммуногистохимии	46
2.5. Методы статистического анализа данных	46
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ	47
3. Исследование статуса гена <i>MYCN</i>	47
3.1. Оценка результатов FISH-реакции на мазках-отпечатках нейробластомы	47
3.1.1. Центромерные сигналы 2 хромосомы	49
3.1.2. Варианты распределения сигналов гена <i>MYCN</i> и центромерных сигналов на мазках-отпечатках нейробластомы	50
3.1.3. Преимущество использования мазков-отпечатков	52
3.2. Оценка результатов FISH-реакции на парафиновых срезах нейробластомы	53
3.2.1. Центромерные сигналы 2 хромосомы	55
3.2.2. Варианты распределения сигналов гена <i>MYCN</i> и центромерных сигналов на парафиновых срезах нейробластомы	55
3.3. Амплификация гена <i>MYCN</i> на мазках-отпечатках и парафиновых срезах нейробластомы	56
3.3.1. Амплификация в виде двойных ацентрических хромосом (double minute – dmin). Образование микроядер	56
3.3.2. Амплификация в виде гомогенно окрашенных регионов (homogenously staining regions – HSR)	60
3.3.3. Гетерогенный (смешанный) тип амплификации гена <i>MYCN</i>	61
3.4. Определение статуса гена <i>MYCN</i> у пациентов в динамике	63

3.5. Определение статуса гена <i>MYCN</i> у пациентов с другими опухолями	64
4. Культивирование клеток нейробластомы	65
4.1. Получение первичных тканевых культур на слайд-флаконах	66
4.2. Клеточный состав нейробластом	66
4.3. Культурально-морфологические характеристики полученных тканевых культур	70
4.4. Стадии развития первичных тканевых культур и их клеточный состав	71
4.5. Сопоставление клеточного состава тканевой культуры с микроструктурой нейробластомы, из которой она была получена	74
4.6. Сопоставление клеточного состава тканевой культуры с эффективностью проведенного лечения (2 случая)	76
4.7. Использование метода FISH для определения статуса протоонкогена <i>MYCN</i> в геномах культивированных клеток нейробластомы	77
5. Экспрессия белка CRABP1 в нейробластомах	83
5.1. Изучение экспрессии белка CRABP 1 в образцах нейробластомы разной степени дифференцировки и с различными генетическими нарушениями	83
5.2. Изменение экспрессии белка CRABP 1 в процессе терапии нейробластомы	90
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	96
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	108
ВЫВОДЫ	109
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	110
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	111

ВВЕДЕНИЕ

АКТУАЛЬНОСТЬ ТЕМЫ И СТЕПЕНЬ ЕЕ РАЗРАБОТАННОСТИ

Нейробластома – наиболее распространенная экстракраниальная солидная опухоль детского возраста. Разнообразное клиническое поведение этой опухоли, от спонтанной дифференцировки и регрессии у некоторых пациентов до быстрого прогрессирования, несмотря на интенсивную терапию во многих других случаях, привело к интенсивному изучению биологических и прогностических характеристик нейробластомы. Одной из принципиально важных проблем для клиники нейробластомы является сложность установления прогноза и определение тактики лечения. Наряду со многими параметрами клинического характера (возраст пациента, распространение и локализация опухоли) многообещающими оказались ряд гистологических (гистопатологическая классификация по системе Shimada, количество митотически делящихся клеток и апоптотических телец, молекулярно-биохимических (плоидность) и генетических (хромосомные aberrации, статус гена *MYCN*, делеция локуса 1p36 и 11q, увеличение длинного плеча хромосомы 17 и др.) характеристик опухолевых клеток. Однако наибольшее значение в выборе оптимального объема лечения, установлении прогноза, устойчивости к химиотерапии приобрело изучение состояния гена *MYCN*.

В настоящее время метод FISH является основным для оценки статуса гена *MYCN*. В преимуществах FISH следует отметить скорость и техническую простоту, а также возможность определять гетерогенность амплификации гена *MYCN* между отдельными нейробластами в пределах одной опухоли, как в интерфазных, так и метафазных ядрах. Одновременный анализ метафазных хромосом является важным дополнением к интерфазным исследованиям, т.к. позволяет получить ценную информацию о типе амплификации гена *MYCN*: экстрахромосомная (наличие двойных ацентричных хромосом double minute - dmin); или, реже, как внутрихромосомная (гомогенно окрашенные регионы homogeneous stain region - HSR).

Клеточная гетерогенность – важный признак нейробластомы. В пределах одной опухоли могут присутствовать клетки с различными фенотипическими характеристиками: нейробласты, шванновские, периневральные или сателлитные и даже меланоциты. Показано, что клеточная гетерогенность и степень созревания (богатые стромой, бедные стромой опухоли, или опухоли высокого и низкого риска, основанные на клеточной морфологии) коррелируют с клиническим поведением, и эти свойства используют при классификации и прогнозе заболевания.

В поисках белковых молекул, которые могли бы характеризовать функциональную активность клеток нейробластомы, мы обратили внимание на белок CRABP1, поскольку он связан с обменом ретиноевой кислотой (РК), а последняя играет важную роль в процессах дифференцировки нервной ткани. Белок CRABP1 выполняет основную функцию в связывании РК и, предположительно, снижении ее транскрипционной активности. Исследования, посвященные изучению экспрессии белка CRABP1 при нейробластомах актуальны, если принять во внимание, что изменение экспрессии этого белка является прогностическим маркером в ряде опухолей, и данные об экспрессии этого белка в клетках нейробластомы на сегодняшний день в научной литературе отсутствуют.

Все вышесказанное делает актуальными работы, посвященные разработке методов, направленных на определение генетического статуса нейробластомы, ее клеточного состава и экспрессии белков в целях прогноза, определения рекомендаций и подготовки специфического лечения.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Разработка комплекса методик для уточнения диагноза нейробластомы, установления прогноза, определения тактики лечения и эффекта проведенной терапии.

ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Изучить состояние гена *MYCN* в разных вариантах нейробластомы.
2. Разработать метод получения первичных тканевых культур нейробластомы.
3. Оценить диагностическую ценность метода FISH на метафазных пластинках, полученных в результате культивирования клеток нейробластомы.
4. Изучить особенности экспрессии белка CRABP1 для планирования терапии больных нейробластомой.
5. Сопоставить полученные данные с особенностями морфологической семиотики нейробластомы, прогнозом заболевания и эффектом проведенной терапии.

НАУЧНАЯ НОВИЗНА ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучение свойств клеток нейробластомы *in vitro* и *in vivo* является crucialным для целого ряда клинических проявлений.

Впервые получены данные по культивированию клеток первичной тканевой культуры нейробластомы. Результаты изучения клеточных культур нейробластомы играют важную роль в определении происхождения опухоли и ее ответа на терапию.

Проведенное исследование является первой работой по изучению экспрессии белка CRABP 1 в нейробластомах, ее связи с уровнем дифференцировки опухоли и оценки эффекта проведенной терапии.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ

Данные о статусе гена *MYCN* в разных возрастных группах и их связь с чувствительностью к терапии могут быть использованы в клинике при планировании лечения этих больных.

Показанная нами впервые способность клетки к экстрезии лишнего генетического материала в случаях амплификации гена *MYCN* должна стать предметом дальнейшего углубленного изучения клинических особенностей нейробластомы.

Полученные результаты могут служить обоснованием включения метода культивирования в комплексную диагностику нейробластом.

Определение уровня экспрессии белка CRABP 1 может быть использовано в клинике для более точной оценки дифференцировки опухолевых клеток до и после лечения.

МЕТОДОЛОГИЯ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Основой методологии являются научные труды зарубежных исследователей по изучению клеток нейробластомы. Применение современных молекулярно-генетических и цитогенетических методов привело к увеличению точности диагностики, а также к определению прогностических факторов и более глубокого понимания патогенеза опухоли.

В исследовании использованы методы флуоресцентной *in situ* гибридизации на мазках-отпечатках и парафиновых срезах опухоли, первичных тканевых культур, иммуногистохимии.

ПОЛОЖЕНИЯ, ВЫНОСИМЫЕ НА ЗАЩИТУ

- Комплекс методик для изучения многообразия клинического течения нейробластомы включает в себя: определение статуса гена *MYCN* методом метафазной FISH, изучение основных типов клеток нейробластомы методом первично-тканевых культур, иммуногистохимическое изучение белков, связанных с обменом ретиноевой кислоты.
- Определение 3 типов амплификации гена *MYCN*, отражающие хронологию процесса амплификации в динамике.
- Клетки нейробластомы способны удалять лишний генетический материал из ядра путем экстрезии.
- Наличие амплификации гена *MYCN*, высокий уровень клоногенности, преобладание I-типа клеток, отсутствие экспрессии белка CRABP1 – составляют прогностически неблагоприятный комплекс.

СТЕПЕНЬ ДОСТОВЕРНОСТИ И АПРОБАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Достоверность полученных результатов и выводов основывается на исследовании большой выборки материала, применении комплекса современных методов исследования и статистической обработки данных.

По теме диссертации опубликовано 4 статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных перечнем ВАК при Минобрнауки России. Основные положения раздела диссертации, касающиеся экспрессии белка CRABP1, представлены на международной научной конференции SIOPEN в 2014 году.

Апробация диссертации состоялась 22 декабря 2017 года на совместной научной конференции лабораторий и отделений ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. История изучения нейробластомы

Нейробластома (более точный, но менее используемый термин «периферическая нейробластная опухоль») – наиболее распространенная экстракраниальная солидная опухоль детского возраста, происходит из развивающихся нейрональных клеток симпатической нервной системы (стволовых клеток нервного гребня).

Опухоль была впервые описана немецким ученым Рудольфом Вирховым в 1864 году, который назвал ее «детской глиомой». В 1891 году немецкий патолог Феликс Маршанд (Felix Marchand) отметил, что опухоль развивается из симпатической нервной системы и надпочечников. Стадию IVs нейробластомы, которая характеризуется метастазированием в печень, но не в кости, описал Вильям Пеппер (William Pepper) в 1901 году. Название "нейробластома" было предложено Джеймсом Райтом (James Homer Wright), который в 1910 году показал, что ряд опухолей забрюшинного пространства и заднего средостения имеют четкое морфологическое сходство с незрелой примитивной нервной тканью. Д. Райт также документировал формирование в образцах костного мозга округлых структур из клеток, которые получили название «псевдорозеток Homer-Wright».

В 1914 году К.Герксгеймер (K.Herxheimer) применил серебряные красители, которые позволяли визуализировать нейрональные фибриллы под микроскопом.

В 1927 году Г.Кушинг и С.Вольбах (H.Cushing and S.Wolbach) заметили, что не все нейробластомы были злокачественными, хотя многие из них широко метастазировали в печень кожу, кости, костный мозг, другие растворялись (исчезали) вне зависимости от лечения. Так же они отметили, что в некоторых редких случаях опухоли становятся доброкачественными, ганглионевромами, которые могут исчезать сами по себе [23]. В 1966 году в своей монографии Т.Эверсон и У.Коул (T.Everson and W.Cole) добавили к этому, что трансформация

злокачественной формы опухоли в доброкачественную форму было замечено у детей старше 6 месяцев [26].

1.2. Общая характеристика нейробластомы

Наиболее часто нейробластомы диагностируются у детей и составляют 7-10% всех опухолей детского возраста, включая лейкозы. Средний возраст заболевания - 18 месяцев, при этом нейробластома у 50% пациентов диагностируется в возрасте 2 лет и у 90% - до 6-летнего возраста.

С целью доклинического выявления нейробластомы в ряде стран (в Японии и Канаде более 35 лет назад и позднее в европейских странах) был введен массовый скрининг. Полученные результаты вызвали разногласия, т.к. скрининг в возрасте от нескольких недель до 6 месяцев привел к существенному увеличению количества диагностируемых нейробластом с благоприятным прогнозом, но не привел к уменьшению опухолей с агрессивной 4 стадией и общей смертности. Это показывает, что генетически и биологически благоприятные опухоли особенно в первой половине первого года жизни клинически не обнаруживаются, но способны к спонтанной регрессии [6, 10, 13, 22, 28, 49]. Было рекомендовано прекращение скрининга у детей младше 7 месячного возраста. Скрининг в возрасте от 9 до 12 месяцев (проводимый в Японии и Австрии), возможно, выявляет генетически неблагоприятные и гетерогенные опухоли.

Большинство нейробластом возникают спорадически. Семейные (наследственные) случаи описываются редко. Однако в работе американских и итальянских исследователей было показано, что активирующие мутации в домене тирозинкиназы онкогена *ALK* (anaplastic lymphoma kinase) служат причиной возникновения большинства случаев наследственных нейробластом. Соматически приобретенные мутации, приводящие к активации этого онкогена, наблюдаются в 5-15% нейробластом. Дети со спорадической или наследственной нейробластомой в сочетании с синдромом центральной гиповентиляции («проклятие ундины») и/или болезнью Гиршпрунга обычно имеют мутации в области гена *PNOX2B*. На гены *ALK* и *PNOX2B* приходится большинство семейных случаев нейробластом.

Возможно, увеличена вероятность возникновения нейробластом у пациентов с нейрофиброматозом типа 1. Возникновение опухоли под воздействием условий окружающей среды неизвестно [13, 31, 48, 56].

Анатомическая локализация нейробластом достаточно разнообразна: 50% в надпочечниках, в пара- и превертебральных симпатических ганглиях и параганглиях: 5% в цервикальных, 15% в торакальных, 25% в ретроперитонеальных и 5% в тазовых. Нейробластома с локализацией первичного очага в надпочечнике статистически имеет более низкую безрецидивную выживаемость по сравнению с опухолями других локализаций [18, 89].

Нейробластома принадлежит к группе эмбриональных опухолей, таких как гепатобластома, нефробластома, эмбриональная рабдомиосаркома. Все они характеризуются манифестацией в раннем возрасте, имеют сходные цитоморфологические характеристики, свойственные эмбриональным опухолям. Эмбриональное происхождение нейробластомы было установлено методом иммуногистохимии (ИГХ) с помощью таких белковых маркеров как, Phox2b и C-kit (маркеры стволовых клеток нервного гребня), Sox10 и AP2 α (эмбриональные глиальные маркеры, которые экспрессируются в незрелых глиальных клетках нейробластных опухолей) [3].

Нейробластоме отличают ряд специфических, уникальных черт ее биологического поведения, не свойственных другим злокачественным опухолям.

1. Спонтанная регрессия опухоли (без цитотоксического лечения) у некоторых детей младше 12 месяцев [13, 22, 25, 26, 28, 60].

2. Способность к дифференцировке (созревания в ганглионеврому) у детей после первого года жизни. Это удивительное свойство опухолевых клеток нейробластомы было впервые описано Харви Кушингом в 1926 году у пациента (1 год 8 месяцев) с низкодифференцированной нейробластомой, у которого спустя 9 лет остаточная опухоль дифференцировалась в ганглионеврому [23]. Также в литературе было сообщение о том, что вероятность созревания опухоли зависела от пола и была выше у девочек, чем у мальчиков [42]. Процесс созревания был также замечен при исследовании культуры клеток, взятых из

агрессивно растущей опухоли. В процессе культивирования опухоль приобретала черты дифференцирующейся нервной ткани. Различные агенты способны индуцировать этот процесс *in vitro*: ретиноевая кислота, так называемый, фактор роста нервной ткани, некоторые цитостатики, папаверин [39, 60].

3. Способность к стремительному агрессивному развитию и бурному метастазированию. У 60% пациентов опухоли широко метастазируют в костный мозг, кости, лимфатические узлы, печень и кожу. Уникальный пример распространенных метастазов с благоприятным прогнозом – это стадия нейробластомы IVs [29, 37, 91].

1.3. Клинические стадии нейробластомы

Различают 4 клинические стадии нейробластомы (International neuroblastoma staging system):

I стадия. Локализованная опухоль, находящаяся в области первоначального развития; новообразование полностью удалено с или без микроскопических признаков его остатков; макроскопически подтвержденное отсутствие поражения лимфатических узлов по обе стороны позвоночника.

IIA стадия. Односторонняя опухоль с удалением большей ее части; микроскопически — нет поражения лимфатических узлов с обеих сторон.

IIВ стадия. Односторонняя опухоль, удаленная полностью или большая ее часть; микроскопически — имеется поражение односторонних лимфатических узлов.

III стадия. Опухоль распространяется на противоположную сторону с или без метастатического поражения регионарных лимфатических узлов; односторонняя опухоль с метастазами в противолежащих лимфатических узлах; срединная опухоль с метастазами в лимфатических узлах с обеих сторон.

IV стадия. Диссеминированная опухоль с метастазами в отдаленных лимфатических узлах, костях скелета, печени и поражением костного мозга.

IVs стадия. Локализованная первичная опухоль, определяется в стадии I и II с метастазами в печень, кожу и/или костный мозг.

1.4. Гистологическое строение нейробластомы

Микроструктура нейробластомы сложна и отражает процесс созревания опухоли. Существует несколько гистологических классификаций морфологического строения нейробластомы (INPC, Shimada, Joshi), которые основаны на степени дифференцировки опухоли: от недифференцированной мелко круглоклеточной нейробластомы до высоко дифференцированной ганглионевромы [5].

Клеточный состав нейробластомы:

1. Нейробласты

А) Мелкие клетки имеют круглые ядра, в которых хроматин распределен в виде мелких точек («соль и перец»), тонкий ободок эозинофильной цитоплазмы. Хорошо видны границы между клетками.

Б) Крупные клетки имеют ядра в 1,5-2 раза больше типичных ядер нейробластов; 1-4 видимых ядрышек. Обычно встречаются в недифференцированных и низкодифференцированных нейробластомах (в 8-10% всех нейробластом). Ассоциированы с *MYCN* амплификацией и плохим прогнозом.

2. Ганглиозные клетки

Имеют крупные круглые ядра с видимыми ядрышками, широкую эозинофильную цитоплазму с тельцами Ниссля (базофильные гранулы, располагающиеся на эндоплазматической сети).

Строма, окружающая клетки нейробластомы, также отражает уровень дифференцировки:

1. Шванновская строма - для идентификации методом иммуногистохимии применяется S100 (позитивное) окрашивание.
2. Нейропиль – фибриллярные экстрацеллюлярные волокна.
3. Плотный лимфоидный инфильтрат (присутствует нечасто).

В Международной гистологической классификации нейробластомы (INPC-Shimada system) выделяют 4 категории по степени клеточной дифференцировки [5, 70]:

1. Нейробластома (бедная шванновской стромой)

А) Недифференцированная

Полностью состоит из нейробластов, отсутствуют зрелые ганглиозные клетки (часто требуется иммуногистохимическое исследование для верификации диагноза). Бедная шванновской стромой (менее 50% окружающей стромы или может отсутствовать).

Б) Низкодифференцированная

Преимущественно состоит из нейробластов, но имеется менее 5% созревающих или зрелых ганглиозных клеток; по крайней мере один фокус нейропиля, бедная шванновской стромой (менее 50% окружающей стромы или может отсутствовать) (рис. 1а).

В) Дифференцированная

Преимущественно состоит из нейробластов, но имеется более 5% созревающих или зрелых ганглиозных клеток; по крайней мере один фокус нейропиля, бедная шванновской стромой (менее 50% окружающей стромы или может отсутствовать).

2. Нодулярная ганглионейробластома

Преимущественно состоит из созревающих или зрелых ганглиозных клеток и имеется по крайней мере один ограниченный участок (узел) остаточных нейробластов. Богатая шванновской стромой (50% и более окружающей стромы).

3. Ганглионейробластома

Преимущественно состоит из созревающих или зрелых ганглиозных клеток, но имеется более одного участка остаточных нейробластов смешанных с ганглиозными клетками (изолированные участки нейробластов отсутствуют). Богатая шванновской стромой (50% и более окружающей стромы) (рис. 1б).

4. Ганглионеврома

А) Созревающая

Полностью состоит из созревающих или зрелых ганглиозных клеток, отсутствуют остаточные нейробласты. Богатая шванновской стромой (50% и более окружающей стромы).

Б) Зрелая

Полностью состоит из зрелых ганглиозных клеток, отсутствуют остаточные нейробласты. Богатая шванновской стромой (50% и более окружающей стромы) (рис. 1в).

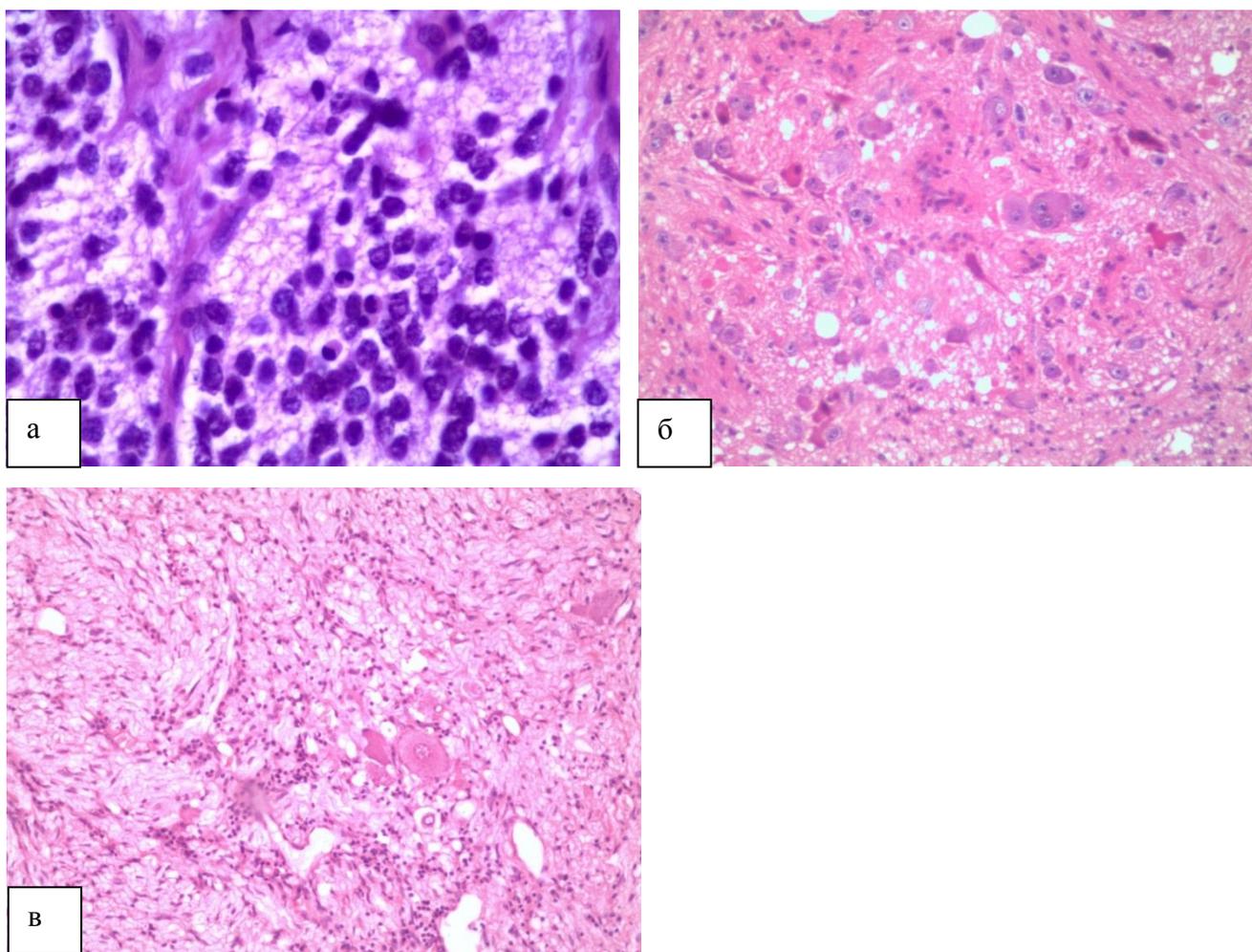


Рисунок 1 - Гистологическое строение нейробластомы (окраска гематоксилин/эозин). а) низкодифференцированная (x400); б) ганглионейробластома (x100); в) зрелая ганглионеврома (x100)

В типичных случаях нейробластома состоит из мелких однородных круглых клеток с гиперхромным ядром, окруженным тонким ободком цитоплазмы. Для этой опухоли характерно образование псевдо-розеток, называемых розетками Homer-Wright — это своеобразная морфологическая структура, образованная по

периферии ядрами нейробластов с расположенными по центру эозинофильными фибриллами. Опухоль часто содержит большие участки некроза. Интерстициальные кровоизлияния относительно часто встречаются в менее дифференцированных опухолях. Диффузная инфильтрация лимфоцитами характерна для более дифференцированных опухолей. Наличие кальцификатов - характерный признак нейробластомы, и их количество может увеличиваться в процессе ответа опухоли на терапию. Сообщается также, что наличие видимых ядрышек в клетках нейробластомы является признаком амплификации гена *MYCN*. Предполагается, что это результат наличия большого количества транскриптов этого гена [80].

Для точной верификации диагноза практически всегда необходимо проведение иммуногистохимического исследования. Клеточные компоненты нейробластомы могут быть идентифицированы с помощью ряда белковых маркеров: S100, S100A6 (Calcyclin) (семейство кальций связывающих белков, для идентификации глиального компонента), NF (нейрофиламенты), хромогранин, синаптофизин, нейрон специфическая энолаза (NSE) [3].

1.5. Факторы, определяющие прогноз заболевания

Одной из принципиально важных проблем для клиники нейробластомы является сложность установления прогноза. Наряду со многими параметрами клинического характера (возраст пациента [46, 89], распространение и локализация опухоли) [24, 48] многообещающими оказались ряд гистологических (гистопатологическая классификация по системе Shimada [70], количество митотически делящихся клеток и апоптотических телец), молекулярно-биохимических (плоидность) [45, 47] и генетических (хромосомные aberrации, статус гена *MYCN*, делеция локуса 1p36 и 11q, увеличение длинного плеча хромосомы 17 и др.) характеристик опухолевых клеток [4, 8, 14, 44, 58, 91].

К факторам благоприятного прогноза относятся: возраст пациента младше года, стадии I, II или IVs, отсутствие амплификации гена *MYCN*, отсутствие

сегментных хромосомных нарушений, полисомия (увеличение количества целой хромосомы) (таблица 1).

Промежуточные прогностические факторы: возраст пациента старше года, локализованная опухоль с поражением лимфатических узлов, у детей младше года метастазы в кости и костный мозг, отсутствие амплификации гена *MYCN* и сегментных хромосомных aberrаций.

Факторы неблагоприятного прогноза: возраст пациента старше года, метастазы в кости и костный мозг, сегментные хромосомные aberrации (такие как делеции субтеломерной области del1p36 [8], длинного плеча хромосомы 11 - del11q, увеличение длинного плеча 17 хромосомы +17q) [43], амплификация гена *MYCN*, морфологически недифференцированная опухоль, высокий митотический индекс (таблица 1).

Таблица 1 - Прогностические факторы нейробластомы

Прогностические факторы	Благоприятные	Неблагоприятные
Возраст	Младше 1 года	Старше 1 года
Клиническая стадия	I, II и IVs	III, IV
Гистологическое строение	Богатые шванновской стромой, дифференцированные	Бедные шванновской стромой, богатые стромой и нодулярные
Хромосомные aberrации	Отсутствует амплификация гена <i>MYCN</i> , делеция локуса 1p36 и другие сегментные хромосомные aberrации	Наличие амплификации гена <i>MYCN</i> , делеции локуса 1p36 и/или других сегментных хромосомных aberrаций

Таким образом, определенный геномный ДНК-профиль опухоли предсказывает клиническую картину течения заболевания. Хромосомные aberrации могут изменять биологическое поведение опухолей в неблагоприятную сторону. Однако наибольшее значение в установлении прогноза, выборе оптимального объема лечения, устойчивости к химиотерапии приобрело изучение состояния гена *MYCN*.

1.6. Характеристика и функции гена *MYCN*

MYCN – клеточный протоонкоген, семейства транскрипционных факторов. Он кодирует один из ядерных белков, который участвует в создании транскрипционных регуляторных комплексов со специфическими ДНК-связывающими свойствами. Располагается ген *MYCN* на коротком плече хромосомы 2 в локусе 2p24. Известно, что белки семейства MYC играют центральную роль в контроле клеточного цикла, клеточной пролиферации, *MYCN* выполняет важную регуляторную функцию в процессе миграции стволовых клеток, нейроэктодермального развития, модуляции апоптоза, плюропотентности и дифференцировки [31, 37, 69, 76, 94]. Онкоген *MYCN* также регулирует гены множественной лекарственной устойчивости *MRP1* и *MDR1* [43]. Важно отметить, что *MYCN* контролирует белки, участвующие в биогенезе рибосом, тем самым влияя на синтез белка. В нормальных клетках уровень белка *MYCN* строго регулируется фосфатидилинозитол-3-киназой (PI3K), которая стабилизирует белок и регулирует его включение в клеточный цикл [31].

1.7. Амплификация гена *MYCN*

1.7.1. Определение понятия. Особенности при нейробластоме

Амплификация ДНК – это механизм, посредством которого клетки злокачественной опухоли приобретают многочисленные копии части своего генома, что приводит к гиперэкспрессии клеточных онкогенов, посредством которой опухолевая клетка получает преимущество в росте и устойчивость к химиотерапии. Ген *MYCN* был первым онкогеном в солидных опухолях, у которого была обнаружена амплификация (более чем четырехкратное увеличение количества этого гена по сравнению с референсным участком, локализующимся на этой же хромосоме, чаще всего это центромерная область). Уровень амплификации этого гена при нейробластоме находится в диапазоне от 4- до 500-кратного увеличения, хотя чаще всего это 50- - 100-кратное увеличение. Туморогенный потенциал процесса амплификации гена *MYCN* – это следствие

увеличения количества копий этого гена, т.к. мутации в пределах гена *MYCN* обнаружены не были [37].

Амплификация гена *MYCN* наблюдается в 20-25% первичных нейробластом [8, 13, 37, 88, 89] и является одним из главных показателей агрессивности заболевания, ранней устойчивости к химиотерапии и неблагоприятного прогноза [14, 16, 94]. Амплификация этого гена – мощнейшая «движущая сила» увеличения митотической активности и предотвращения созревания опухоли. Нейробластомы с амплификацией гена *MYCN* являются, как правило, недифференцированными или низкодифференцированными опухолями с высоким митотическим индексом и классифицируются как неблагоприятная гистологическая группа [4, 58, 94]. Корреляция между амплификацией гена *MYCN* и неблагоприятным исходом была подтверждена в ходе многочисленных исследований на протяжении десятилетий, однако аналогичная ассоциация между экспрессией *MYCN* и исходом остается спорной.

В ряде доклинических исследований было показано, что низкие уровни экспрессии MYC белков увеличивают пролиферацию, а высокие - нужны для индукции апоптоза. Если это верно для нейробластомы, то предполагается, что амплификация гена *MYCN* в первую очередь нарушает регуляцию функции белка *MYCN* во время клеточного цикла, а не просто увеличивает его экспрессию. Эта гипотеза согласуется с утверждением, что амплификация, а не гиперэкспрессия, является показателем агрессивности заболевания [31]. При анализе нейробластом без амплификации гена *MYCN* было показано, что все пациенты с опухолями, в которых уровень экспрессии РНК этого гена был высоким, имели благоприятный исход болезни, без рецидивов и метастазов [49]. Также было показано, что клетки с гиперэкспрессией *MYCN* сохраняют способность к дифференцировке [27]. Механизмы, посредством которых амплификация гена *MYCN* приводит к развитию агрессивной и резистентной опухоли, остаются неясными.

Размер ампликонов гена *MYCN* при нейробластоме может варьировать от 350 kb до 8 Mb, при этом наблюдается большая вариабельность количества коамплифицированных генов. Часто коамплифицируется ген *DDXI* (локус 2p24),

принадлежащий к семейству генов, кодирующих белки DEAD-бокса (Asp-Glu-Ala-Asp), вовлеченные в ряд клеточных процессов, таких как посттранскрипционная и трансляционная регуляция генов. Кроме того, были опубликованы данные, касающиеся экспрессии гена *ID2* (ингибитор ДНК-связывания/дифференцировки), расположенный в локусе 2p25.1. Функции гена *NAG (NBAS)* (neuroblastoma amplified gene), который коамплифицируется в 20-56%, не известна. Наконец, коамплификация гена *ALK* (anaplastic lymphoma kinase) происходит редко и наблюдается только в случаях с плохим исходом [77].

Группой японских ученых [35] была исследована активность фермента теломеразы в 100 образцах нейробластомы. Теломеры – это специальные структуры на концах хромосом, которые вовлечены в процесс репликации и играют важную роль в обеспечении генетической стабильности. Регуляция длины теломер контролируется ферментом теломеразой. В результате деятельности теломеразы длина теломерных участков хромосом клетки увеличивается или сохраняется на постоянном уровне, позволяя клетке делиться неограниченно долго. Следует отметить, что высокая экспрессия теломеразы наблюдается в опухолевых и стволовых клетках. Все нейробластомы с амплификацией гена *MYCN* имели высокую теломеразную активность (это ассоциировано с плохим прогнозом и высокой генетической нестабильностью). Но большинство опухолей со стадией IVs нейробластомы имели низкую теломеразную активность или короткие теломеры [13, 35, 62]. Таким образом, длина теломер является весьма важным прогностическим параметром у больных с диагнозом нейробластома [59].

При отсутствии амплификации гена *MYCN* клетки нейробластомы могут содержать от одной до четырех лишних копий этого гена относительно количества копий хромосомы 2 [14, 94]. Это событие специфично и не связано с увеличением ploидности. Опухолевые клетки могут получить небольшое количество дополнительных копий гена несколькими возможными механизмами. Первый – увеличение количества копий короткого плеча хромосомы 2 или изохромосома 2p [85]. Второй – дупликация гена *MYCN in situ* в локусе 2p24 (было показано на двух клеточных линиях). Третья возможность – это

несбалансированная транслокация дистального конца короткого плеча хромосомы 2 (и, следовательно, *MYCN* и соседних генов) на другие хромосомы (ранее было продемонстрировано на пяти клеточных линиях без амплификации гена *MYCN* и на некоторых первичных опухолях) [88]. Эти данные свидетельствуют о том, что присутствие дополнительных копий гена *MYCN* в неамплифицированной нейробластоме позволяет выявить клетки с комбинированными (сегментными и количественными) генетическими нарушениями, которые впоследствии помогают понять поведение этих опухолей [4, 37, 43].

Следует отметить, что в опухолях, которые имели амплификацию гена *MYCN*, наблюдалась широкая внутриклеточная вариабельность в количестве копий этого гена, между тем в опухолях, которые оценивались как неамплифицированные, полностью отсутствовали клетки с высоким количеством копий этого гена [69].

Надежное и своевременное определение амплификации гена *MYCN* – это ключевая точка в лечении нейробластом. На практике амплификация этого гена устанавливается разными способами.

1.7.2. Методы определения статуса гена *MYCN*

До июля 1993 года количество копий гена *MYCN* определяли Саузерн-блот гибридизацией. Однако с июля 1993 года приобрел широкую популярность и стал широко использоваться метод флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH) для определения наличия амплификации гена *MYCN* [29, 55].

При сравнительном анализе этих двух методов было показано, что при Саузерн-блот анализе, наряду с опухолевыми клетками, нормальные клетки были также включены в исследование, тогда как при FISH-анализе каждое ядро опухолевой клетки идентифицировалось отдельно [29, 37, 69]. Саузерн-блот гибридизация без стандартизации сигнала для одной копии 2 хромосомы, может привести к ложной демонстрации амплификации гена *MYCN* вследствие анеуплоидии 2 хромосомы [69], тогда как для интерфазной FISH-реакции эта проблема была решена путем одновременной гибридизации со специфической α -

сателлитной пробой, что позволяет прямо пересчитывать количество 2 хромосомы по отношению к количеству генов *MYCN*. Важно отметить, что количество копий одной хромосомы в клетках опухоли не обязательно отражает ploидность опухоли [6].

Таким образом, в настоящее время метод FISH является основным для оценки статуса гена *MYCN* («золотым» стандартом для характеристики нейробластомы). В преимуществах FISH следует отметить скорость и техническую простоту, а также возможность определять гетерогенность амплификации гена *MYCN* между отдельными нейробластами в пределах одной опухоли [85], как в интерфазных, так и метафазных ядрах. Одновременный анализ метафазных хромосом является важным дополнением к интерфазным исследованиям, т.к. позволяет получить ценную информацию о типе амплификации гена *MYCN*: экстрахромосомная (наличие двойных ацентричных хромосом double minute - dmin); внутрихромосомная (гомогенно окрашенные регионы homogeneous stain region - HSR) или анеуплоидия 2 хромосомы [29, 37, 69]. В недостатках FISH следует упомянуть о дороговизне, трудоемкости данного метода и о сложностях реализовать мультиплексный анализ [91].

Если речь идет о клинических образцах нейробластом, то метод интерфазной FISH позволяет быстро и надежно определить наличие амплификации гена *MYCN* даже в образцах, содержащих малое количество опухолевых клеток. Для младенцев и маленьких детей с подозрениями на нейробластому, способность оценивать амплификацию гена в небольших образцах ткани, в том числе при тонкоигольной пункции опухоли или костного мозга, может служить альтернативой более инвазивным диагностическим хирургическим процедурам.

1.7.3. Гетерогенность амплификации гена *MYCN*

В некоторых случаях нейробластом описана внутри опухолевая гетерогенность копий *MYCN*. Она наблюдается как в локализованных, так и в диссеминированных опухолях [5]. Различают 3 типа гетерогенности [85]:

гетерогенность по клеткам - кластеры амплифицированных клеток окружены опухолевыми клетками без амплификации гена и/или в опухоли встречаются единичные клетки с амплификацией гена *MYCN*. Такой тип гетерогенности чаще встречается в нейробластомах III и IV стадий и метастатических опухолях;

- гетерогенность по участку опухоли наблюдается в первичном очаге и метастазе (например, амплификация гена *MYCN* в костном мозге и отсутствие в первичной опухоли);

гетерогенность по времени (появление амплификации гена *MYCN* в процессе течения болезни, часто после рецидива).

Клиническое значение гетерогенности амплификации гена *MYCN* недостаточно изучено.

1.7.4. Механизм формирования амплификации

Несмотря на десятилетия интенсивных исследований, молекулярные механизмы амплификации гена остаются не до конца изученными. Тем не менее, последние данные молекулярного анализа и цитогенетических исследований предлагают один часто используемый механизм формирования хромосомной нестабильности, который начинается с продукции ацентрических, циркулярных, экстрахромосомальных молекул ДНК, реплицирующихся автономно. Амплификация гена – результат неравномерной митотической сегрегации и аккумуляции этих элементов в определенных условиях. В большинстве случаев первоначально сформированные циркулярные ДНК очень малы и не могут быть визуализированы в световой микроскоп, но они увеличиваются со временем и формируют гетерогенные по размеру двойные минихромосомы. Последние молекулярные данные демонстрируют хронологию амплификации гена, в которой первоначальные экстрахромосомальные элементы интегрируются и образуют внутривнутрихромосомные регионы амплификации гена. Коротко процесс амплификации можно описать по следующей схеме: вырезание, циркуляция, внутренняя реорганизация, амплификация и при формировании HSR внутривнутрихромосомная интеграция и дальнейшая амплификация [78, 92]. Тип

амплификации в виде гомогенно окрашенных регионов является более стабильным, т.к. при делении дополнительные копии гена могут передаваться дочерним клеткам [55] (рис. 2). В некоторых случаях dmin или HSR могут формироваться без предшественников [78, 92].

Встречающуюся гетерогенность количества копий гена *MYCN* от клетки к клетке можно объяснить неравномерным разделением двойных минихромосом между дочерними клетками в процессе митоза, в результате которого они могут быть объединены в микроядра или потеряны через какое-то время [55, 69].

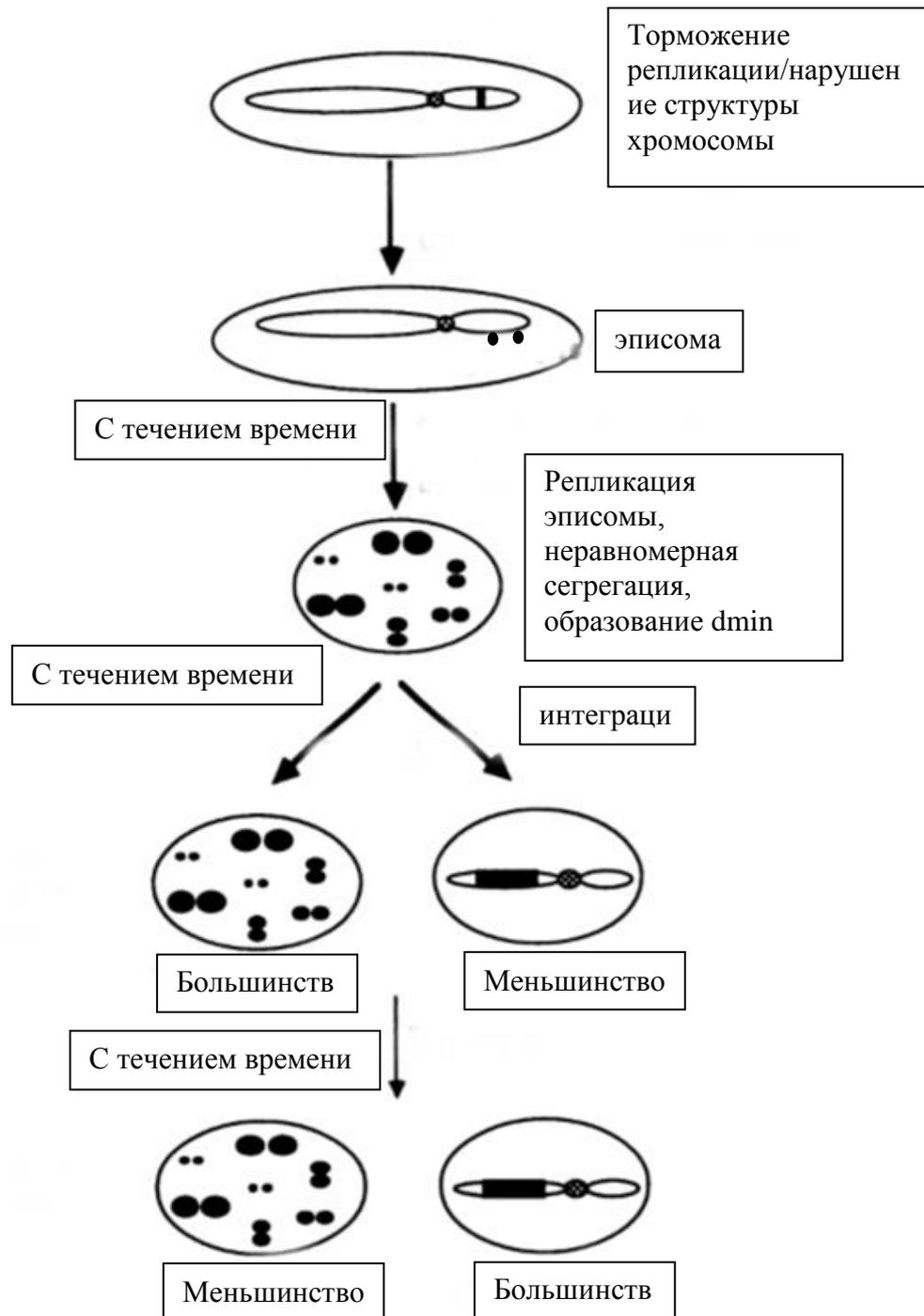


Рисунок 2 - Механизм формирования амплификации в виде двойных ацентрических хромосом и гомогенно окрашенных регионов

1.7.5. Типы амплификации гена *MYCN* и их прогностическое значение при нейробластоме. Элиминация амплифицированных последовательностей

Удобной моделью для изучения разных типов амплификации (dmin и HSR) послужила клеточная линия HL-60, полученная из крови больного острым

промиелоцитарная лейкемия. На ранних стадиях культивирования клеток HL-60 амплификация гена *MYC* наблюдалась в виде двойных ацентричных хромосом (dmin), которые затем заменялись гомогенно окрашенными регионами (HSR) на более поздних стадиях культивирования [92]. При сравнении опухолевых клеток с разными типами амплификации значительной разницы в этих субгруппах по интенсивности роста или устойчивости к химиотерапии выявлено не было. Тем не менее, было показано, что в опухолевых клетках, имеющих амплификацию гена *MYC* в виде гомогенно окрашенных регионов, не наблюдался апоптоз после явления дифференцировки, и после отмены химиопрепарата клетки возвращались в недифференцированное состояние. А в тех клетках, которые содержали dmin, наблюдалось существенное уменьшение уровня *MYC* экспрессии. Это предполагает, что клетки с амплификацией в виде HSR не так восприимчивы к действию дифференцирующих агентов, возможно, из-за развития дополнительных механизмов резистентности [55].

Что касается нейробластомы, то было проведено исследование наличия возможной корреляции между разными типами амплификации гена *MYCN* и основными факторами риска при нейробластоме: возрастом, стадией, ploидностью и гистологическим строением нейробластомы по классификации Shimada. Никакой статистически значимой ассоциации между этими параметрами выявлено не было. Однако отмечено, что опухоли с амплификацией гена *MYCN* в виде dmin по сравнению с HSR преобладали у более старших пациентов с поздними стадиями нейробластомы и наличием метастазов [55]. Не было выявлено также различий между безрецидивной и общей выживаемостью у пациентов с амплификацией гена *MYCN* в виде двойных минихромосом и гомогенно окрашенных регионов [95].

При проведении исследований *in vitro* по изучению двойных ацентричных хромосом (dmin) был отмечен интересный факт, что dmin могут быть элиминированы (удалены) из ядра [7, 55, 72, 78]. Подобное явление называется экстрезией, и его наблюдали также *in vivo* в клетках нейробластомы. Удаленные последовательности ДНК выглядят, как микроядра (мелкие ядерно-подобные

структуры) [90]. Микроядра возникают во время S-фазы путем почкования или после митоза при перестройке ядерной мембраны. Они могут содержать не только амплифицированные онкогены, но также фрагменты ацентричных хромосом или целые поврежденные хромосомы. Размер микроядер может варьировать в пределах одной опухоли. Одно из возможных объяснений этому – разное количество содержащейся в них ДНК. Но возникает вопрос: зачем клетке удалять последовательности, которая она же ранее амплифицировала (накапливала)? Ведь при этом появляется явное противоречие между этими двумя событиями, т.к. амплификация генов придает клетке селективное преимущество, а спонтанная элиминация амплифицированных последовательностей может подавить опухолевый фенотип. Но в этом случае механизм экстрюзии рассматривается как самозащита клетки при избыточном количестве содержащихся в ней последовательностей. Существует строгая «архитектура» ядра, и в нем соблюдается определенное пространственное расположение хромосом. Поэтому не исключено, что если амплификация превышает ядерное пространство, то клетка должна удалить избыток генов путем экстрюзии. Потеря клеткой амплифицированных последовательностей коррелирует с потерей злокачественных свойств и клеточной дифференцировкой [43].

Хотя амплификация гена *MYCN* - признак неблагоприятного исхода болезни, существуют случаи, когда агрессивное течение заболевания наблюдается в отсутствие амплификации данного гена [16]. Это значит, что существуют другие генетические факторы, влияющие на развитие нейробластом с плохим прогнозом [67, 95].

1.8. Хромосомные aberrации при нейробластоме

Амплификация онкогена *MYCN* часто сопровождается делецией 1p36 [6] и увеличением плеча 17q, и реже сопровождается делецией 11q23 [4, 8, 76].

Как было описано выше, делеция в коротком плече хромосомы 1 (1p36) – это наиболее частая структурная хромосомная aberrация при нейробластоме (около 70%) и встречается у пациентов с плохим прогнозом [6, 15, 83]. При изучении группы пациентов с нейробластомой (915 человек) была выявлена

ассоциация между делецией локуса 1p36 (23%) и наличием неблагоприятных прогностических факторов (возраст пациента 1 год и более, IV стадия заболевания, амплификация гена *MYCN* [15], неблагоприятная гистологическая категория по Shimada и диплоидность). Делеция области 1p36 коррелирует с повышенным риском рецидива у пациентов с локализованными опухолями [4, 83]. У пациентов, которые имели делецию 1p36, трехлетняя безрецидивная и общая выживаемость были ниже на 30% и 20% соответственно по сравнению с пациентами, в опухоли которых не определялась потеря локуса 1p36 [8, 95]. Европейские исследователи придерживаются точки зрения, что необходимо проводить анализ статуса 1p в клетках нейробластомы для определения группы риска и своевременной более эффективной терапии этих пациентов.

В спонтанно дифференцирующихся и богатых стромой нейробластомах делеция локуса 1p36 не выявлялась. Эти наблюдения позволяют предположить, что гены, ассоциированные с дифференцировкой, находятся в этом регионе. Целым рядом европейских исследователей было показано, что благоприятные гистологические картины, такие как наличие ганглиозных клеток и обилие шванновской стромы, коррелируют с благоприятными генетическими результатами. С другой стороны, ни одна из опухолей с делецией 1p не показала спонтанного развития шванновской стромы. [6].

Увеличение длинного плеча хромосомы 17 (+17q) – добавление 1-3 лишних копий - было впервые описано около 30 лет назад. Изучению этой аберрации уделялось мало внимания, но с развитием новых молекулярных цитогенетических исследований было показано, что это нарушение встречается в половине всех первичных опухолей. Клиническое значение этой аберрации противоречиво. С одной стороны, немецкими учеными было показано, что увеличение длинного плеча хромосомы 17 не оказывает существенного влияния на прогноз заболевания [73], но другими исследователями было замечено, что увеличение длинного плеча 17 хромосомы ассоциируется с более агрессивным течением болезни и неблагоприятным прогнозом [44, 82, 95]. В первичных нейробластомах амплификация гена *MYCN* часто ассоциирована с увеличением длинного плеча

хромосомы 17, само по себе это является неблагоприятным прогностическим фактором, т.к. плечо 17q является удобным местом для интеграции амплифицированных последовательностей гена *MYCN* [44, 55].

Делеция длинного плеча хромосомы 11 с высокой частотой от 20 до 45% [4, 53] наблюдается у больных нейробластомой с неамплифицированным геном *MYCN* в возрасте от 2,5 до 7 лет и ассоциирована с плохим прогнозом у пациентов с клиническими стадиями II или IVs [16, 18]. Американскими исследователями было выдвинуто предложение считать потерю локуса 11q23 полезным прогностическим маркером в случаях, связанных с низким (стадии I, II или IVs) или средним (благоприятная III стадия или младенцы с IV стадией без амплификации гена *MYCN*) риском течения нейробластомы. [8, 74].

Для более детального анализа особенностей нейробластомы существуют подходы, одним из которых является метод первичных тканевых культур.

1.9. Метод первичных тканевых культур

Клеточная гетерогенность – важный признак нейробластомы. В пределах одной опухоли могут присутствовать клетки с различными фенотипическими характеристиками: нейробласты, шванновские, периневральные или сателлитные и даже меланоциты. Обнаружение шванновских клеток в культуре нейробластомы привело к появлению гипотезы о том, что нейробластомы происходят из плюропотентных клеток нервного гребня [6]. Показано, что клеточная гетерогенность и степень созревания (богатые стромой, бедные стромой опухоли, или опухоли высокого и низкого риска, основанные на клеточной морфологии) коррелируют с клиническим поведением, и эти свойства используют при классификации и прогнозе заболевания.

Эта же самая клеточная гетерогенность выявлена в клеточных линиях, полученных из этих опухолей. Было выделено 3 различных морфологических типа клеток, которые наиболее часто присутствовали в клеточных линиях нейробластом:

1. Симпатоадреналовые нейробласты (N-клетки), имеют нейрональную направленность дифференцировки. Мелкие округлые клетки с тонким ободком

цитоплазмы, с короткими нейритическими отростками, формируют агрегаты (псевдоганглии), не прикрепляющиеся к субстрату. В процессе роста клетки N-типа формируют нейриты и закрепляются на клетках I- и S-типов.

2. S-тип большие, уплощенные клетки, крепко прикрепленные к субстрату и проявляющие признаки контактного торможения, имеют широкую цитоплазму, сравнительно небольшие ядра (предположительно дающие рост глиальным, гладкомышечным элементам, меланоцитам). Клетки S-типа имеют разнообразную морфологию, могут быть отростчатыми, звездчатыми. Подвергаются терминальной дифференцировке (появляется или усиливается отростчатость, вакуолизация, гранулярность цитоплазмы) и не размножаются.

3. Малодифференцированные клеточные элементы, мелкие, иногда с отростками, уплощенные имеют крупные ядра, среднего размера цитоплазму, формируют колонии (слои) в культуре тканей, прикрепляясь как к субстрату, так и друг к другу, являются радиально симметричными по сравнению с S- и N-типами клеток, имеющими клеточную полярность. Они обладают цитоморфологическими признаками промежуточными между клетками N- и S-типов, поэтому называются клетками I-типа (intermediate), имеют отростки, в которых фибриллы не обнаруживаются.

При нейробластоме из I-клеток дифференцируются 2 морфологически различимых типа прекоммитированных клеток: с нейрональной (N-) и глиальной (S-) дифференцировкой в зависимости от индуцирующих агентов (ретиноевая кислота или бромдеоксиуридин, соответственно) [3].

Клетки S-типа не обладают злокачественным потенциалом, что было доказано экспериментами на бестимусных мышах. Клетки N-типа формируют медленно растущие опухоли в 31-100% мышей. Клеткам I-типа присущ высокий злокачественный потенциал, и их называют малигнизированными стволовыми клетками [3], т.к. у них присутствует способность к самовоспроизведению, пролиферации, и дифференцировке.

Таким образом, изобилие в культуре предполагаемых стволовых элементов коррелирует с плохим прогнозом. Изучение свойств клеток нейробластомы *in*

vitro и *in vivo* является crucialным для назначения эффективной терапии [93]. Результаты изучения клеточных культур нейробластомы могут играть важную роль в определении происхождения опухоли и ее ответа на терапию.

1.10. Белок CRABP1 и его роль в процессе дифференцировки

Как сказано выше, ретиноевая кислота играет важную роль в раннем развитии нервной системы, стимулируя нейрональную дифференцировку и индуцируя экспрессию нейрональных белков [3]. В связывании ретиноевой кислоты (РК) и, предположительно, снижении ее транскрипционной активности основную функцию выполняет белок CRABP1, который локализуется в цитоплазме. Отмечено, что в ходе эмбриогенеза CRABP1 экспрессируется на высоком уровне в клетках нервного гребня и в эмбриональной дерме [20]. В исследованиях, проведенных на клеточных моделях, было отмечено, что стимуляция метаболизма ретиноевой кислоты снижает уровень клеточной дифференцировки, что является одним из показателей опухолевой прогрессии, а также служит клиническим признаком агрессивности новообразований и часто коррелирует с неблагоприятным прогнозом. В связи с этим в последнее время значительно возрос интерес к изучению механизмов регуляции РК в процессе возникновения и роста солидных опухолей.

Но существует другая точка зрения на функцию белка CRABP1. С помощью микрочипового анализа было определено, что проонкогенный эффект этого белка связан с CRABP1-опосредованными изменениями в экспрессии около 100 генов, включая гены, кодирующие ключевые регуляторные белки. Такая альтернативная внутриклеточная функция способствует приобретению клеткой злокачественного потенциала [41].

Известно, что изменение экспрессии CRABP1 характерно для ряда новообразований человека, таких как опухоли молочной железы, аденокарцинома эндометрия, немелкоклеточный рак легкого, рак яичников и нейрогенные опухоли, и, по некоторым немногочисленным наблюдениям, может коррелировать с неблагоприятным прогнозом [17, 52].

Данные об экспрессии белка CRABP1 в клетках нейробластомы на сегодняшний день в научной литературе отсутствуют, поэтому представляется чрезвычайно актуальным изучить экспрессию этого белка в нейробластомах разной степени дифференцировки.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для выполнения поставленных задач был исследован материал от 262 пациентов с диагнозом нейробластома в возрасте от рождения до 17 лет, наблюдавшихся или проходивших лечение в РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН с февраля 2005 по декабрь 2009 гг. Из них в возрасте до года 131 пациент (71 пациент - мужского пола, 60 пациентов- женского) и в возрасте старше года 131 пациент (63 мужского и 68 женского пола). Анализируемый материал был представлен в виде мазков-отпечатков опухоли (50 случаев) и/или парафиновых срезов (220 случаев).

Для получения первичных тканевых культур с последующим проведением FISH-реакции использовался операционный материал пациентов с нейробластомой в объеме 0,5-1см³. Всего для культивирования было взято 23 образца: 22 операционных образца опухолевой ткани от 21 пациента в возрасте от 3 месяцев до 17 лет (у одного пациента культивировали как клетки первичного очага, как и взятые из метастаза в лимфатический узел), один образец был представлен некротизированной тканью с инфильтрацией лейкоцитами, по этой причине характеристика этого материала была невозможна.

Для проведения сравнительного анализа методов определения статуса гена *MYCN* были использованы различные модификации флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH): метод FISH для мазков-отпечатков, стандартный FISH-метод для парафиновых срезов с обработкой 1М изотиоцианатом натрия (70 образцов) и FISH-методика с применением высокого давления (150 образцов). Количество клеточного материала для FISH-реакции оценивалось по гистологическим препаратам, окрашенных гематоксилин-эозином. В результате проведения реакции практически весь материал сохранялся и его было достаточно для оценки результатов.

В работе были использованы следующие флуоресцентно меченые зонды для проведения FISH-реакции:

1. LSI N-myc Spectrum Orange DNA Probe гибридизуется с 2p23-24 областью 2 хромосомы (Abbott Molecular, США).
2. LSI N-myc Spectrum Green/ CEP2 Spectrum Orange DNA Probe гибридизуется с 2p24 областью (LSI N-myc) и α -сателлитной областью 2 хромосомы (CEP 2) (Abbott Molecular, США).
3. MYCN (2p24) / AFF3 (2q11) гибридизуется с 2p24 областью и 2q11 референсной областью 2 хромосомы (Kreatech).
4. SRD (1p36) / SE 1 (1qh) гибридизуется с 1p36 областью и 1qh референсной областью 1 хромосомы (Kreatech).
5. KMT2A (11q23) / SE 11 гибридизуется с 11q23 областью и сателлитной областью 11 хромосомы (Kreatech).

2.1. Метод флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH) на мазках-отпечатках опухоли

Стекла с мазками-отпечатками опухоли фиксировали в 4% растворе параформальдегида 10 мин при +4°C, затем инкубировали в однократном растворе фосфатно-солевого буфера (1xPBS) 2 раза по 5 мин при комнатной температуре; ферментную обработку проводили в 0,006 мг/мл растворе протеазы (Kreatech) pH 2,0 при 37 °C 5 мин; 2 смены 1xPBS по 5 мин при комнатной температуре. После этого стекла дегидратировали в охлажденных спиртах 70%, 85% и 96% по 2 мин. в каждом и высушивали на воздухе. Готовили FISH пробу по протоколу фирмы изготовителя (1мкл флуоресцентно меченной пробы, 7 мкл гибридизационного буфера и 2 мкл воды). Денатурировали при 78°C в течение 8 мин. Гибридизацию проводили во влажной камере при 37 °C в течение ночи (14-16 ч).

После инкубации все манипуляции проводили в затемненной комнате. Стекла отмывали 2 мин в 0,4 кратном цитратном буфере 0,4xSSC/0,3% NP-40 предварительно нагретом до 73°C и 2 мин в двухкратном цитратном буфере 2xSSC/0,1% NP-40 при комнатной температуре. Стекла высушивали. Затем наносили на стекло контркраситель DAPI (4,6-диамидино–2-фенилиндол) для визуализации ядер.

Результаты оценивали под флуоресцентным микроскопом (Axioskop2 mot plus, Zeiss) с помощью программы Isis. Для визуализации сигналов использовали фильтры: DAPI, Spectrum Green, Spectrum Orange, соответствующие спектрам испускания флуорофоров, которыми мечены пробы.

Следует отметить, что FISH-метод на мазках-отпечатках давал возможность полностью оценить изучаемый участок или ген, что особенно актуально при оценке делеций локусов 1p36 и 11q23 (для исключения ложноположительных результатов), оценке состояния короткого плеча 2 хромосомы и для точной оценки полисомии в ядрах опухолевых клеток.

2.2. Метод FISH на парафиновых срезах

При проведении FISH-реакции на парафиновых срезах в ряде случаев возникала фоновая окраска из-за поперечных сшивок между белками и ДНК, между цепями ДНК, образующихся в результате фиксации ткани формалином. Отмечено, что качество гибридизации зависело от способа обработки парафиновых срезов. Были сравнены 2 методики: обработка 1М изотиоцианатом натрия и высоким давлением.

2.2.1. FISH на парафиновом срезе – стандартная методика (обработка 1М изотиоцианатом натрия)

Реакция проводилась на предметных стеклах с полилизинным покрытием, и толщина среза была не более 4 мкм.

1. Парафиновые срезы (4 мкм) депарафинировали в ксилоле 2 раза по 10 мин, затем отмывали в 96% этаноле 2 раза по 5 мин при комнатной температуре.

Высушивали при температуре 45-50⁰С, погружали в 0.2 N раствор HCl на 20 мин, отмывали в дистиллированной воде 3 мин, затем 1 мин в двукратном цитратном буфере (2xSSC).

2. Погружали стекла в предварительно нагретый до 80⁰С 1М раствор изотиоцианата Na на 30 мин, отмывали 1 мин в дистиллированной воде при комнатной температуре, затем 2 раза по 5 мин в 2xSSC.

3. Обработка протеазой и фиксация.

Предварительно приготовили 0,15 мг/мл раствор протеазы pH 2,0 в 0,9% растворе NaCl нагретый до 37 °С.

Стекла погружали в раствор протеазы на 40 мин. Отмывали 2 раза по 5 мин в 2xSSC, высушивали срезы при температуре 45-50⁰С.

Фиксировали срезы в 4% нейтральном формалине 10 мин., затем отмывали 2 раза по 5 мин в 2xSSC, снова высушивали срезы при температуре 45-50⁰С.

4. Нанесение FISH пробы и гибридизация.

Стекла погружали в предварительно нагретый до 73⁰С 70% раствор формамида на 5 мин. Дегидратировали по 2 мин в серии охлажденных спиртов 70%, 85%, 96%. Высушивали при температуре 45-50⁰С.

Готовили FISH пробу по протоколу фирмы изготовителя.

Наносили 1,5 мкл пробы на интересующую область среза, накрывали покровным стеклом и денатурировали при 78⁰С в течение 8 мин, заливали резиновым клеем, гибридизацию проводили во влажной камере при 37 °С в течение ночи (14-16 ч).

5. Отмывка после гибридизации

После инкубации все манипуляции проводили в затемненной комнате. Стекла отмывали 2 мин в 0,4 кратном цитратном буфере 0,4xSSC/0,3% NP-40 предварительно нагретом до 73⁰С и 2 мин в двухкратном цитратном буфере 2xSSC/0,1% NP-40 при комнатной температуре. Затем наносили на стекло раствор, содержащий антифейд и контркрашитель DAPI (4,6-диамино-2-фенилиндола) для визуализации ядер.

При обработке парафиновых срезов по выше описанной методике поперечные сшивки разрушались частично и давали сильное фоновое свечение при использовании двухцветного флуоресцентно меченного зонда (рис. 3а). Эта же методика при использовании одноцветного зонда не давала фонового свечения, и сигналы гена *MYCN* были четкими, яркими, что позволяло легко интерпретировать результаты (рис. 3б). Несмотря на то, что использование одноцветного зонда позволяло избежать фоновой окраски, возникал риск

неправильной оценки статуса гена *MYCN* при анеуплоидии 2 хромосомы (ложноположительный результат).

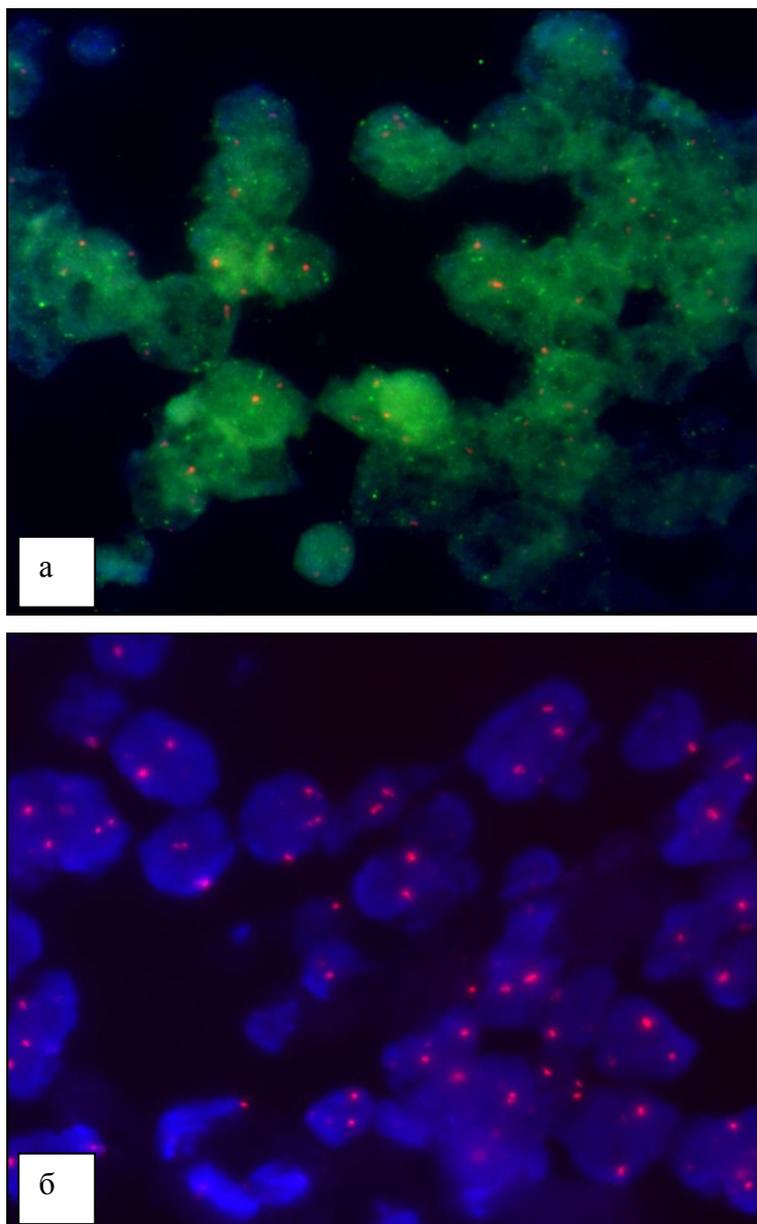


Рисунок 3 - Результаты FISH-реакции при обработке 1М изотиоцианатом натрия (x1000)

а) использование двухцветного флуоресцентного зонда (зеленый сигнал – ген *MYCN*, красный сигнал – центромерная область 2 хромосомы)

б) использование одноцветного флуоресцентного зонда (красный сигнал – ген *MYCN*)

2.2.2. FISH на парафиновом срезе – использование высокого давления

Для оптимизации FISH-методики и уменьшения фоновой окраски был применен метод обработки срезов высоким давлением. Время воздействия давления подбиралось эмпирически и составило 5 минут. При такой обработке нам удалось достичь высокой четкости изображения, уменьшения фонового свечения (рис. 4), что позволило сократить количество неинформативных случаев.

Техника приготовления срезов такая же, как для стандартной методики.

1. Парафиновые срезы (4 мкм) депарафинировали в ксилоле 3 раза по 5 мин, затем отмывали в 96% этаноле 2 мин и дегидратировали в серии спиртов 70%, 85%, 96% по 2 мин. Переносили стекла в дистиллированную воду на 1 мин (можно оставить в воде до закипания скороварки).

2. Предварительно 0.1 мМ раствор EDTA pH 8.0 нагревали в скороварке (Tefal, Франция) до кипения. Погружали стекла в кипящий раствор, герметично закрыв крышку, кипятили 5 мин при максимальном давлении 0,7 бар (время засекали с момента поднятия клапана). Затем переносили стекла в дистиллированную воду на 2 мин.

3. Обработка протеазой

Предварительно приготовили 0,15 мг/мл раствор протеазы pH 2,0 в 0,9% растворе NaCl и нагрели до 37 °С. Стекла погружали в раствор протеазы на 30 мин. После этого отмывали в дистиллированной воде 1 мин. Дегидратировали по 2 мин в серии охлажденных спиртов 70%, 85%, 96%.

4. Нанесение FISH пробы и гибридизация

Готовили FISH пробу по протоколу фирмы изготовителя.

Наносили 1,5 мкл пробы на интересующую область среза, накрывали покровным стеклом и денатурировали при 78 °С в течение 8 мин, заливали резиновым клеем, гибридизацию проводили во влажной камере при 37 °С в течение ночи (14-16 ч).

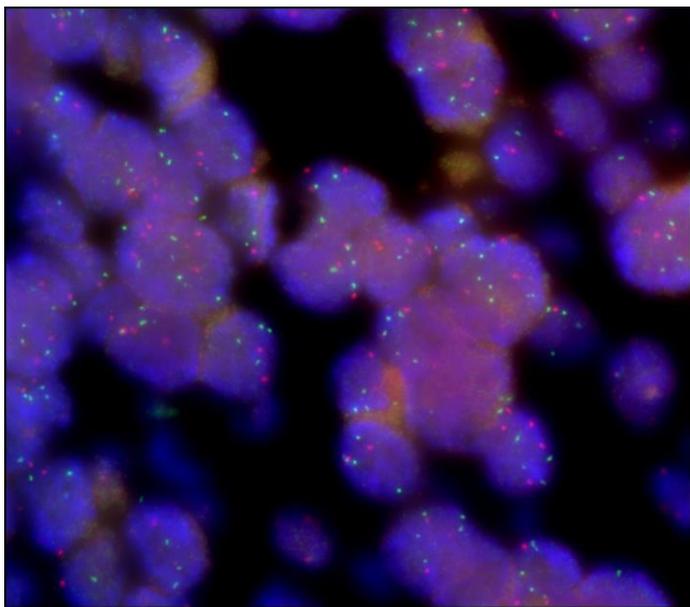


Рисунок 4 - Результат FISH-реакции при использовании высокого давления (x1000) (зеленый сигнал – ген *MYCN*, красный сигнал – центромерная область 2 хромосомы)

5. Отмывка после гибридизации

После инкубации стекла отмывали 2 мин в 0,4 кратном цитратном буфере 0,4xSSC/0,3% NP-40 предварительно нагретым до 73°C и 2 мин в двухкратном цитратном буфере 2xSSC/0,1% NP-40 при комнатной температуре. Затем наносили на стекло раствор, содержащий антифейд и контркраситель DAPI (4,6-диамидино–2-фенилиндол) для визуализации ядер.

2.2.3. Оценка результатов FISH-реакции

Результаты FISH-реакции оценивали с помощью флуоресцентного микроскопа (Axioskop2 mot plus, Zeiss) и программы Isis. Визуализация сигналов осуществлялась с использованием фильтров: DAPI, Spectrum Green, Spectrum Orange, соответствующие спектрам испускания флуорофоров, которыми мечены пробы. FISH-реакция расценивалась как положительная, если определялась амплификация гена *MYCN*, т.е. более чем четырехкратное увеличение количества этого гена по сравнению с референсным участком, локализуемым на этой же хромосоме, чаще всего это центромерная область. Известно, что уровень

амплификации этого гена при нейробластоме находится в диапазоне от 4- до 500-кратного увеличения, хотя чаще всего это 50-100-кратное увеличение [8, 37, 88].

2.3. Метод первичных тканевых культур

Изучение генетических особенностей опухоли не всегда можно было реализовать на материале, подвергшемся традиционной обработке в условиях патологоанатомических лабораторий. Метод культуры тканей привлек к себе внимание с точки зрения его использования в комплексе диагностических процедур, поэтому нами была использована методика первичных тканевых культур с последующим проведением FISH-реакции для изучения типа геномных нарушений в нейробластоме. Известно, что эта опухоль относится к новообразованиям с постоянно меняющейся степенью дифференцировки, и оценка степени зрелости клеточных элементов в тканевой культуре *a priori* может быть произведена с большей, чем в гистологическом препарате, точностью.

2.3.1. Получение фиксированного *in situ* материала опухолевых клеток на слайд-флаконах

Предполагалось использовать метод получения первичных тканевых культур на слайд-флаконах с последующим FISH-анализом полученных колоний для оценки статуса гена *MYCN* во всех типах клеток, представленных в культуре.

1. Вырастили клетки на слайд-флаконах (Nunc, рабочий объем 3мл) до 85-90% плотности монослоя.
2. Удалили культуральную среду и мягко ополоснули 2-3 мл подогретого до 37°C изотонического раствора.
3. Добавляли 2 мл подогретого до 37°C изотонического раствора.
4. Добавляли 1 мл фиксатора Карно, мягко перемешали, инкубировали слайд-флакон при комнатной температуре в течение 2 мин.
5. Удаляли жидкость и добавляли во флакон 2,5 мл свежего фиксатора, инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин.
6. Удаляли фиксатор и добавляли во флакон 2 мл свежего фиксатора, инкубировали при комнатной температуре в течение 1-2 мин.
7. Тщательно удаляли фиксатор и вскрывали слайд-флаконы.

8. Высушивали слайды на нагревательном столике при 37°C.

9. Контролировали качество приготовления препарата микроскопически с использованием фазового контраста.

На слайд-флаконах получить достаточное количество метафаз для оценки статуса гена *MYCN* не удавалось. Метафазные пластинки формировались только по периферии колоний, и хромосомы в них располагались очень плотно, что затрудняло их оценку. Результат FISH-анализа в интерфазных ядрах на слайд-флаконах получался так же неудовлетворительным из-за плотного расположения клеток в колонии и связывающего их межклеточного вещества. Поэтому было решено оценивать статус гена *MYCN* на клетках, обработанных колхицином и снятых с подложки, т.е. на суспензии клеток.

2.3.2. Методика культивирования клеток нейробластомы *in vitro*

1. Свежий (до 2 час) образец операционного материала 0,5–1,0 см³ в 10-15 мл среды RPMI-1640 с гентамицином доставляли в лабораторию и переносили в 10-15 мл изотонического буферного раствора (чашка Петри 90мм) с 4х-кратным содержанием комбинированного раствора антибиотиков. При необходимости отделяли сопутствующую ткань и разделяли на фрагменты объемом 0,1–0,2 см³.

2. Фрагменты переносили в 4-5 мл изотонического буферного раствора (чашка Петри 35-50 мм) и подвергали размельчению до 3-5 мм³.

3. Частицы переносили в 3 мл изотонического буферного раствора (чашка Петри 35мм) и подвергали окончательному размельчению и дезагрегации с помощью острых глазных ножниц (максимальный размер фрагментов 0,5 мм³).

4. Полученные мелкие фрагменты ткани, вместе с жидкостью при помощи пипетки переносили в пластиковые центрифужные пробирки объемом 15 мл и тщательно встряхивали на вортексе в течение 1-2 мин.

5. Супернатант, содержащий мелкодисперсную суспензию тканевого дезагрегата в объеме 0,5-0,8 мл засеивали в пластиковые культуральные флаконы (25см²), содержащие 5 мл среды «Клоноген» для поддержания пролиферации недифференцированных клеток и дифференцирующей среды «Амниокар» (ПанЭко).

6. Флаконы с посевным материалом инкубировали в течение 48-72 часов в CO₂-инкубаторе (5%- CO₂).

7. Прикрепление и начало роста колоний контролировали методом фазового контраста в инвертированном микроскопе по истечении времени инкубации.

8. Полностью удаляли посевную суспензию и вносили во флакон свежую порцию соответствующих сред в объеме 5 мл.

9. Культивирование развивающихся колоний опухолевых клеток проводили в течение 20-30 дней, производя смену ½ объема среды «Клоноген» и «Амниокар» каждые 7 суток.

Контрольное время оценки образцов опухолей замедленным ростом по культурально-морфологическим характеристикам (КМХ) – 1 мес.

2.3.3. Получение фиксированного материала опухолевых клеток при культивировании Flask-методом для цитогенетического исследования

Для этого метода были использованы следующие дополнительные растворы:

- Колхицина водный раствор (100 мкг/мл)
- Гипотонический раствор (хранить стерильно при 37°C): 0.4% KCl + 0.4% Na₃-Цитрат (1:1), готовится путем смешения равных объемов растворов 0.4% KCl и 0.4% Na₃-Цитрата.
- Фиксатор Карно (готовят перед употреблением: ¾ объема холодного метанола + ¼ объема ледяной уксусной кислоты), охладить и хранить не более 1-2 сут. в морозильной камере.

1. Выращивали клетки во флаконах до состояния, соответствующего максимальному накоплению делящихся клеток в популяции (60-85% плотности монослоя).

2. Вносили 40-50 мкл раствора колхицина в культуральный флакон (4-5 мл среды, 25 см²), можно в составе 1 мл буферного раствора PBS или DPBS (желательно предварительно удалить из среды загрязняющие, флотирующие элементы центрифугированием 1000 об/мин, 6-7 мин, заменив среду буферным раствором).

3. Инкубировали 1.5 – 2 часа в стандартных условиях инкубации клеток.
4. Удалили культуральную среду в отдельную пробирку.
5. Мягко ополаскивали монослой 2-3 мл изотонического раствора (PBS, DPBS).
6. Снимали монослой при помощи 1 мл раствора Трипсин-ЭДТА (ПанЭко) - 37°C, 5-7 мин.
7. Инактивировали трипсин собранным ранее объемом среды и суспендировали клетки пипетированием.
8. Осаждали клетки центрифугированием (1000 об/мин, 6-7 мин).
9. Удаляли супернатант, оставив 0,2–0,5 мл среды.
10. Ресуспендировали клетки в оставленном объеме среды.
11. Капельно наслаивали прогретый до 37°C гипотонический раствор (0.4% KCl) до 2 мл.
12. Мягко перемешивали и инкубировали при 37°C, 7 мин.
13. Осаждали клетки центрифугированием (1000 об/мин, 6-7 мин).
14. Удаляли супернатант, оставив 0,2–0,5 мл жидкости.
15. Капельно наслаивали фиксатор Карно, мягко перемешивали, при достижении объема 1 мл.
16. Доводили объем до 2 мл фиксатором и перемешивали.
17. Проводили первую фиксацию при комнатной температуре в течение 30 мин.
18. Центрифугировали, аспирировали жидкость и ресуспендировали клетки в фиксаторе как описано выше.
Довести объем фиксатора до 2 мл.
19. Проводили вторую фиксацию при комнатной температуре в течение 20 мин.
20. Центрифугировали и удаляли фиксатор, как описано выше.
21. Доводили объем конечной суспензии до 0,5-1 мл (фиксированные клетки готовы для приготовления цитогенетического препарата).
22. Наносили приготовленную суспензию клеток на стекло.

23. Высушивали стекла на нагревательном столике (при 37°C).

24. Качество приготовления препарата контролировали микроскопически с использованием фазового контраста.

2.3.4. Процедура FISH для культивированных опухолевых клеток

1. Стекла с нанесенной стандартным способом фиксированной суспензией опухолевых клеток инкубировали в однократном растворе фосфатно-солевого буфера (1xPBS) 2 раза по 5 мин при комнатной температуре;

2. Ферментную обработку проводили в 0,06 мг/мл растворе протеазы (Kreatech) в 0,01N HCl, pH 2,0 при 37°C 1 мин.;

3. 2 смены 1xPBS по 5 мин при комнатной температуре;

4. Дегидратировали в серии охлажденных спиртов 70%, 85% и 96% по 2 мин.;

5. Флуоресцентную пробу готовили по протоколу фирмы изготовителя и наносили на предварительно высушенные препараты, которые затем накрывали покровным стеклом и заливали резиновым клеем.

6. Инкубацию проводили в термостате во влажной камере: 78°C - 8 мин. (если необходима денатурация пробы), 37°C - ночь (14-16 ч);

7. После инкубации все манипуляции проводили в затемненной комнате. Стекла отмывали 2 мин. в 0,4 кратном цитратном буфере 0,4xSSC/0,3% NP-40 предварительно нагретым до 73°C и 2 мин. в двукратном цитратном буфере 2xSSC/0,1% NP-40 при комнатной температуре;

8. Наносили на стекло контракраситель DAPI для визуализации ядер.

9. Результаты оценивали под флуоресцентным микроскопом (Axioskop2 mot plus, Zeiss) с помощью программы Isis. Для визуализации сигналов использовали фильтры: DAPI, Spectrum Green, Spectrum Orange, соответствующие спектрам испускания флуорофоров, которыми мечены зонды.

Следует подчеркнуть, что проведение FISH-реакции на материале культуры тканей давало возможность регистрировать результат как в интерфазных ядрах, так и в метафазных структурах. Число последних в культуральных препаратах нейробластом было всегда достаточным для количественной оценки реакции.

2.4. Определение экспрессии белка CRABP1

Для оценки степени дифференцировки нейробластомы нами была исследована экспрессия белка CRABP1. Известно, что основная функция белка CRABP1 заключается в связывании ретиноевой кислоты, стимуляция метаболизма которой может снижать уровень клеточной дифференцировки, что является одним из показателей опухолевой прогрессии. Поэтому нами были проведены исследования, касающиеся возможной корреляции дифференцировки опухолевых клеток, наличия метастазов и амплификации гена *MYCN* при нейробластоме с экспрессией белка CRABP1. Иммуногистохимическое исследование проводилось на парафиновых срезах по стандартной методике и было выполнено на 54 образцах опухолей с ранее установленным диагнозом – нейробластома (ганглионейробластома, ганглионеврома).

2.4.1. Метод иммуногистохимии

Срезы толщиной 4 мкм депарафинизировали и дегидратировали по стандартной схеме. Для демаскировки антигена проводили обработку на водяной бане при 95°C в течение 40 мин с использованием цитратного буфера pH 6,0 (Dako). Затем срезы инкубировали 1 ч с первичными антителами anti-CRABP1 (Sigma-Aldrich). В качестве вторичных антител использовали систему детекции Super Sensitive™ Polymer-HRP (BioGenex). Для визуализации применялся раствор диаминобензидина DAB+ (Dako). Ядра клеток докрашивались гематоксилином.

2.5. Методы статистического анализа данных

При анализе полученных данных, группы сравнения формировали в соответствии со стандартными клиническими данными о степени дифференцировки опухоли, наличии генетических нарушений, возрасте, поле пациентов и наличии метастазов. Частоты в выделенных группах сравнивали критерием Фишера или χ^2 . Абсолютные значения уровня экспрессии CRABP1 (% положительных клеток) использовали для вычисления коэффициента корреляция критерием Спирмена (r). Средние значения сравнивали с помощью t-критерия. Расчеты проводили в программе Statistica 7.0. Для всех критериев использовали двустороннюю оценку, при $p < 0,05$ различия считали достоверными.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3. Исследование статуса гена *MYCN*

С целью оптимизации условий для определения статуса гена *MYCN* для разного типа исследуемого материала (мазки-отпечатки опухоли, парафиновые срезы) было исследовано методом флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH) 270 образцов операционного материала от 260 пациентов с диагнозом нейробластома. Анализируемый материал был представлен 50 мазками-отпечатками и 220 парафиновыми срезами опухоли.

3.1. Оценка результатов FISH-реакции на мазках-отпечатках нейробластомы

Условия проведения FISH-реакции - время обработки и концентрация протеазы - на мазках-отпечатках нейробластомы подбирались эмпирически. Оптимальной была обработка ферментом в течение 5 минут при концентрации протеазы 0,006 мг/мл при pH 2,0. При увеличении времени инкубации и более высокой концентрации протеазы ядра теряли четкие границы и разрушались.

Кроме этого, было отмечено, что качество результатов FISH-реакции, проведенной на мазках-отпечатках, зависело и от других факторов:

- чистота и качество предметных стекол, используемых для приготовления мазков. При использовании необезжиренных стекол для оценки результата реакции оставались единичные ядра.

- способ приготовления мазков-отпечатков. На практике существует несколько способов: а) «круговыми движениями», при этом клетки получались деформированными, вытянутыми, результат реакции оценивать сложно (рис. 5а); б) «промокательными движениями» – клеточных элементов на стекле было много, хорошо происходила их адгезия, ядра не были деформированы, лежали равномерно, не перекрывались (рис. 5б).

- способ хранения. После высыхания (3-4 часа) при комнатной температуре мазки-отпечатки необходимо хранить в холодильнике на +4°C. При нарушении

правил хранения результат FISH-реакции сложно было интерпретировать, т.к. флуоресцентные сигналы были диффузные, раздробленные или размытые.

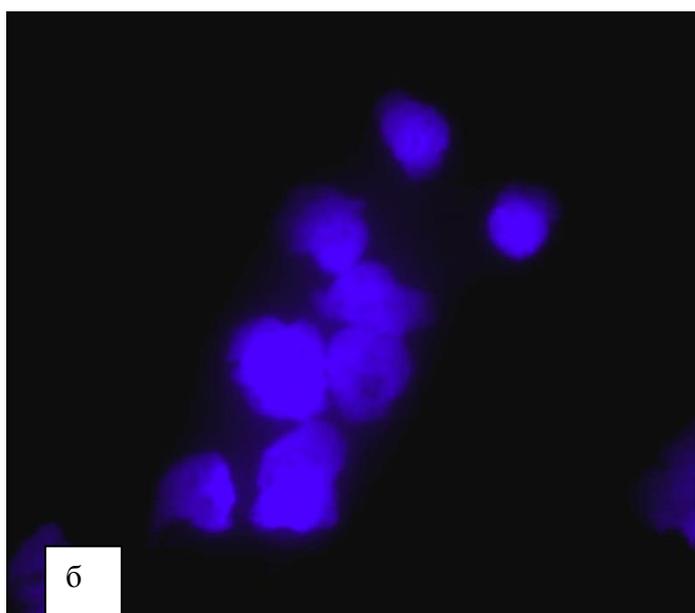
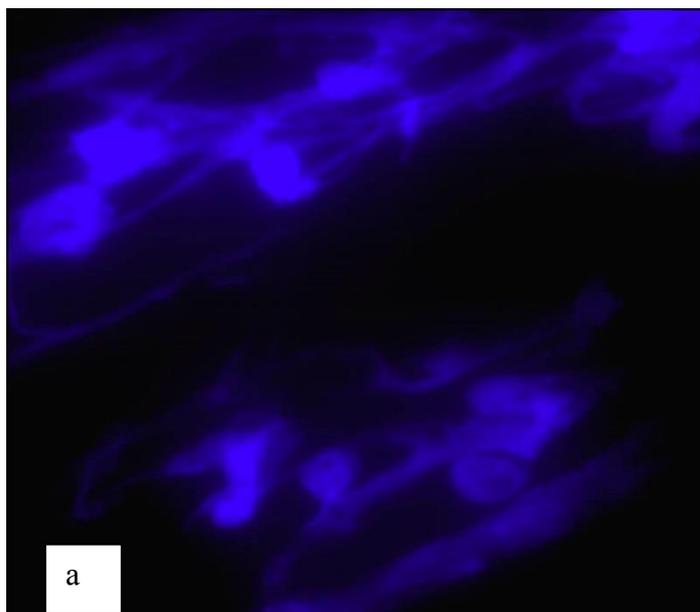


Рисунок 5 - Качество мазков в зависимости от способа приготовления

а) «круговыми движениями»; б) «промокательными движениями»

- своевременно проведенная фиксация клеточного материала на стеклах приводила к тому, что ядра были более сохранны.

На правильно приготовленных мазках-отпечатках нейробластомы практически всегда имелось достаточное количество клеток для анализа. Однако

в 4 случаях из 50 мазки были скудными, т.е. были представлены единичными клетками (около 10), что было недостаточно для оценки статуса гена *MYCN*.

Следует отметить, что на мазках-отпечатках опухолевые клетки всегда были крупнее, чем на парафиновых срезах. Ядра округлой формы лежали отдельно или небольшими группами, чаще всего по 3-6 ядер, без наложения или перекрывания. Среди таких ядер можно было встретить очень мелкие округлые клетки – это лимфоциты, которые лежали поодиночке, не образуя групп.

3.1.1. Центромерные сигналы 2 хромосомы

Было отмечено, что центромерные сигналы 2 хромосомы всегда яркие, четкие. Количество таких сигналов в опухолевых клетках было разным от 2 до 7 на ядро. Полисомия, т.е. избыточное количество 2 хромосом, наблюдалась в 26 случаях в более крупных ядрах и чаще была представлена три- и тетрасомией (рис. 6а). Выраженная полисомия (5-7 центромерных сигналов) была отмечена в 7 мазках-отпечатках нейробластомы, которые имели недифференцированный вариант строения (рис. 6б). В 6 случаях (12,00%) с полисомией наблюдалось расположение центромерных сигналов 2 хромосомы по периферии ядра (рис. 6в).

Сигналы гена *MYCN* также четкие, яркие, но более мелкие по сравнению с центромерными, этот факт объясняется разной длиной флуоресцентно меченых участков на хромосоме.

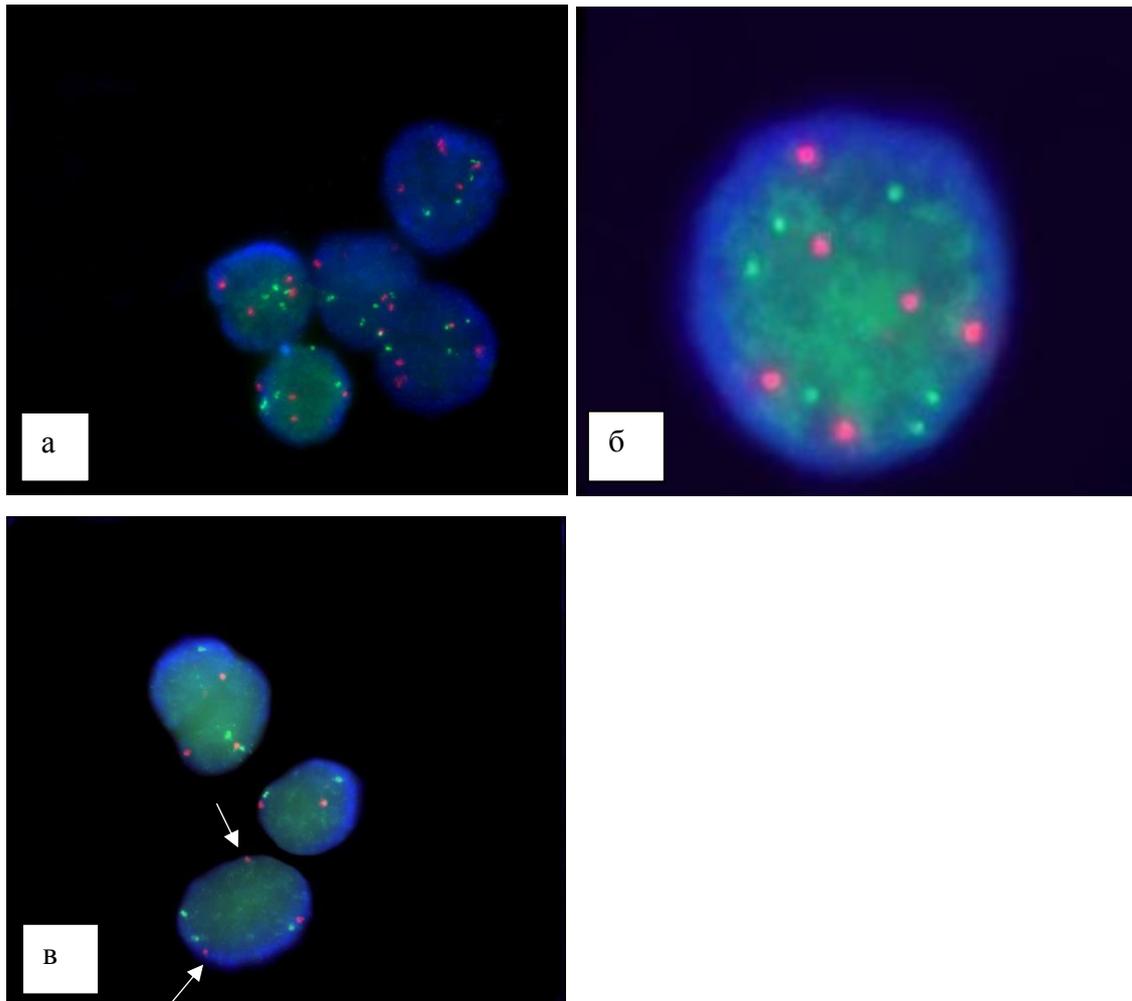


Рисунок 6 - Распределение центромерных сигналов в ядрах нейробластомы (зеленый сигнал – ген *MYCN*, красный сигнал – центромерная область 2 хромосомы) (x1000): а) тетрасомия 2 хромосомы; б) выраженная полисомия 2 хромосомы (6 сигналов/ядро); в) расположение центромерных сигналов 2 хромосомы по периферии ядра.

3.1.2. Варианты распределения сигналов гена *MYCN* и центромерных сигналов на мазках-отпечатках нейробластомы

В 7 случаях мазков-отпечатков конфигурация 2 хромосомы была такой, что наблюдалось слияние центромерного сигнала с сигналом гена *MYCN*, в результате такого перекрывания мы видели вместо двух сигналов (красного и зеленого) один желтый сигнал (рис. 7а). Такое распределение сигналов встречалось: в 3 случаях ганглионейробластом, 2 - низкодифференцированных нейробластом, 1 -

нейробластома с признаками лечебного патоморфоза III степени, 1 – недифференцированная нейробластома.

Нормальное распределение сигналов (2 сигнала гена *MYCN* и 2 центромерных сигнала 2 хромосомы) (рис. 7б) в ядрах опухолевых клеток на мазках-отпечатках наблюдалось в 7 случаях: 2 ганглионевромы, 1 ганглионейробластома, 2 с признаками созревания в виде шванновских клеток и шванновской стромы, 1 с лечебным патоморфозом III степени и 1 недифференцированной нейробластома.

В 4 случаях встречались ядра с одним центромерным сигналом и одним сигналом гена *MYCN*: 2 ганглионевромы и 2 ганглионейробластома. Следует отметить, что в этих четырех случаях исключалась возможность перерезки ядер опухолевых клеток, т.е. истинная моносомия 2 хромосомы наблюдалась только в зрелых формах нейробластома (рис. 7в).

В 5 случаях (10,00%) в ядрах опухолевых клеток наблюдалось увеличение количества сигналов гена *MYCN* (на 1-3) по сравнению с центромерными. Степень дифференцировки этих нейробластом была различна: от недифференцированной формы до ганглионейробластома. В этих случаях речь, вероятнее всего, идет о сегментной хромосомной aberrации – увеличении (gain) короткого плеча хромосомы 2 (рис. 7г).

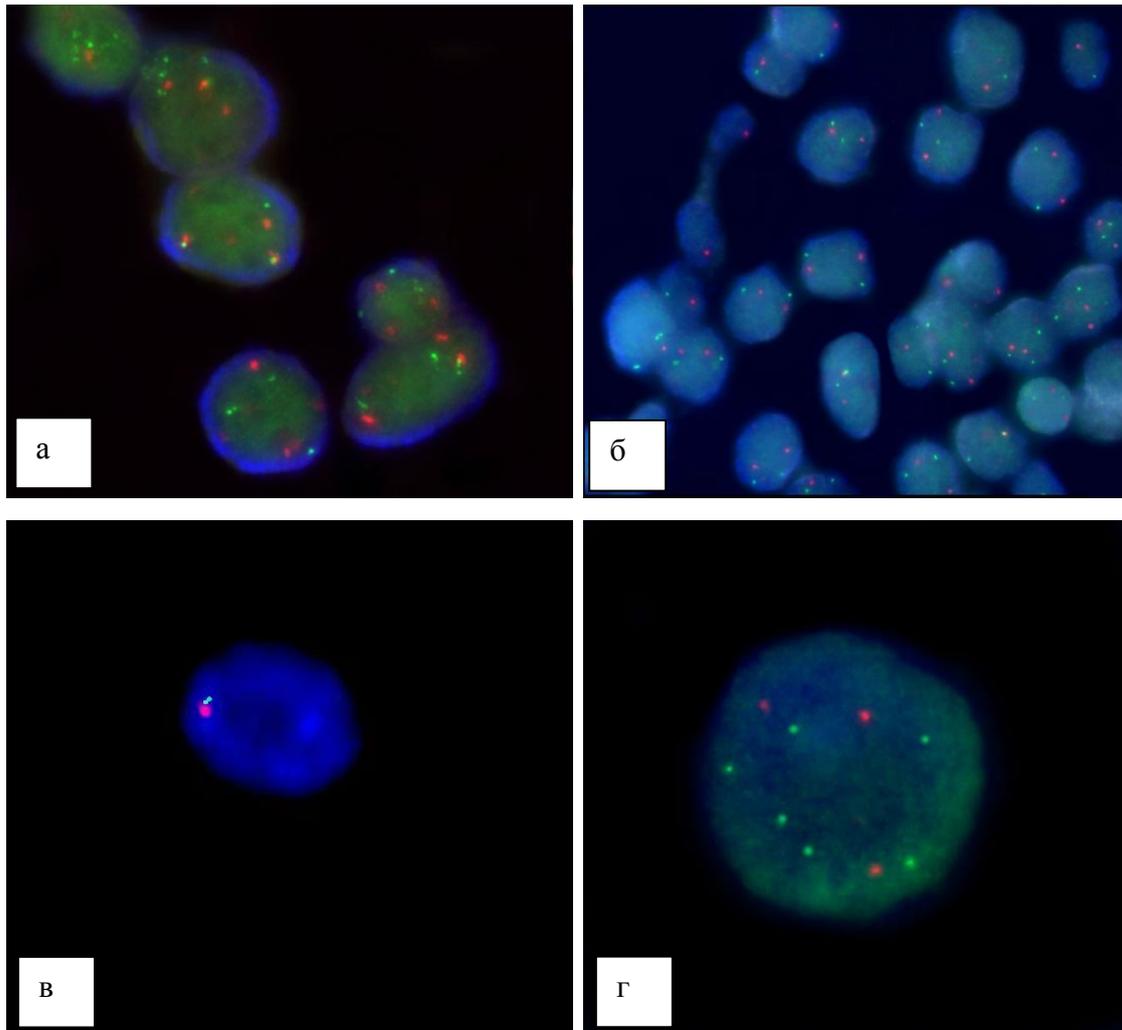


Рисунок 7 - Варианты распределения сигналов гена *MYCN* и центромерных сигналов на мазках-отпечатках нейробластомы (зеленый сигнал – ген *MYCN*, красный сигнал – центромерная область 2 хромосомы) (x1000): а) слияние центромерного сигнала с сигналом гена *MYCN*; б) нормальное распределение сигналов (2 сигнала гена *MYCN* и 2 центромерных сигнала 2 хромосомы); в) ядра с одним центромерным сигналом и одним сигналом гена *MYCN*; г) увеличение количества сигналов гена *MYCN* (на 3) по сравнению с центромерными сигналами.

3.1.3. Преимущество использования мазков-отпечатков

- исключалась возможность перерезки ядер, в этих случаях можно было судить о сегментной хромосомной aberrации, такой как увеличение количества копий короткого плеча (2p gain);

- применялся укороченный, более щадящий протокол FISH-реакции, что позволяло экономить время необходимое для анализа;
- практически во всех случаях реакция была результативна.

3.2. Оценка результатов FISH-реакции на парафиновых срезах нейробластомы

Количество клеточного материала на парафиновых срезах опухоли было всегда достаточно для определения статуса гена *MYCN*. При подготовке материала для FISH-анализа большую роль играла толщина парафиновых срезов опухоли, оптимальной являлась - 3 мкм. В таких срезах ядра практически не перерезались и лежали в один слой.

Для проведения FISH-реакции на парафиновых срезах применялись две методики: 1) обработка 1М изотиоцианатом натрия; 2) обработка высоким давлением. Следует отметить, что эти модификации FISH-реакции позволяют разрушить поперечные сшивки, образующиеся при фиксации тканей в формалине и препятствующие интерпретации результата реакции.

70 парафиновых срезов были обработаны по методике с использованием изотиоцианата натрия. При таком методе обработки часто возникало фоновое окрашивание среза, что чаще всего мешало оценке результатов.

150 срезов были обработаны высоким давлением, время воздействия которого подбиралось опытным путем и составило 5 минут. Соблюдая такой режим реакции, удалось свести к минимуму фоновое свечение и сократить количество неинформативных случаев. При более длительной обработке высоким давлением ядра теряли границы и разрушались, при короткой – избавиться от фона не удавалось.

FISH-реакция была результативна во всех случаях за исключением 10: в 6 случаях наблюдалась сильная фоновая окраска, что затрудняло интерпретацию результатов (применялся стандартный протокол FISH-реакции с изотиоцианатом натрия), в 4 случаях биопсий гибридизация прошла неадекватно из-за сильной деформации клеток при взятии материала. Также следует отметить, что FISH-реакция была неинформативна во всех случаях с использованием материала,

прошедшего декальцинацию, т.к. при такой обработке происходят необратимые изменения в хромосомах, в результате которых не происходит гибридизации флуоресцентного зонда с исследуемым участком хромосомы.

На парафиновых срезах часто возникала проблема идентификации незрелых элементов при нейробластоме. Обычно с этой целью необходимо было сопоставить результаты FISH-реакции с препаратами, окрашенными гематоксилин-эозином. Правда, эта проблема возникала редко, поскольку в большинстве случаев лечащий врач отправлял на исследование большей частью материал больных, у которых опухоль изначально была представлена незрелыми нейробластами. К сожалению, иногда врачи, исходя из формальных требований протоколов, направляли на исследование даже зрелую ганглионеврому. Труднее всего было изучить случай, который являлся переходным к ганглионейробластоме. Тут на помощь приходило сопоставление размеров клеток: на фоне крупных, иногда многоядерных элементов, мелкие округлые ядра безусловно принадлежали нейробластам. Практически сложнейшая задача - дифференцировать нейробласты в FISH-препарате от лимфоцитов. В обоих случаях необходимо было проектировать изучаемый участок на препарат, окрашенный гематоксилин-эозином.

Ядра опухолевых клеток на парафиновых срезах чаще всего имели округлую форму, наряду с ними встречались вытянутые и полиморфные. Размер ядер в опухоли также различался – от мелких до крупных, корреляции с гистологическим строением опухоли выявлено не было.

Ядра на парафиновых срезах редко располагались по одиночке, часто формировали цепочки или «цуги», образовывали скопления по 4-7 ядер или плотные слои.

В 39 случаях можно было наблюдать структуры типа псевдорозеток Homer-Wright, образованные округлыми ядрами. Гистологическое строение этих опухолей было различно: 26 недифференцированных, 10 низкодифференцированных нейробластом и 3 ганглионейробластомы. В

большинстве случаев наличие таких структур, как псевдорозетки, сочеталось с полисомией 2 хромосомы.

3.2.1. Центромерные сигналы 2 хромосомы

Центромерные сигналы 2 хромосомы на парафиновых срезах были окрашены четко, их количество было от 2 до 8. Полисомия наблюдалась в 126 случаях нейробластом, и ядра с полисомией были крупнее, чем ядра с нормальным количеством центромер. Хочется отметить, что полисомия наблюдалась в нейробластомах вне зависимости от гистологического строения.

В 33 (15,00%) случаях нейробластом центромерный сигнал 2 хромосомы располагался по периферии ядра. Такое явление наблюдалось в 8 случаях с амплификацией гена *MYCN* в виде двойных минихромосом (dmin) и в 25 – с полисомией 2 хромосомы и без амплификации гена *MYCN*.

3.2.2. Варианты распределения сигналов гена *MYCN* и центромерных сигналов на парафиновых срезах нейробластомы

На парафиновых срезах в 23 случаях нейробластом можно было видеть слитное расположение сигнала гена *MYCN* и центромеры 2 хромосомы, при этом мы наблюдали один слитный желтый сигнал вместо отдельных красного и зеленого сигналов. Такая картина наблюдалась в 6 низкодифференцированных нейробластомах, 7 ганглионейробластомах, 3 нейробластомах с признаками созревания и 2 нейробластомах с признаками лечебного патоморфоза.

Нормальное распределение сигналов (2 сигнала гена *MYCN* и 2 центромерных сигнала 2 хромосомы) в ядрах опухолевых клеток наблюдалось в 42 случаях: 8 зрелых форм; 13 – с признаками созревания в виде шванновских клеток и шванновской стромы, дифференцированных нейробластов, ганглиозных клеток; 9 – с признаками лечебного патоморфоза и 12 недифференцированных нейробластом. Такое распределение сигналов наблюдалось как в мелких, так и крупных ядрах, однако преобладало в мелкоклеточной популяции.

В 3 случаях встречались ядра с одним центромерным сигналом и одним сигналом гена *MYCN*, гистологическое строение которых соответствовало 1 ганглионейробластоме и 2 недифференцированным нейробластомам.

В 25 случаях (11,36%) в ядрах опухолевых клеток наблюдалось увеличение количества сигналов гена *MYCN* (на 2-4) по сравнению с центромерными. Это событие было специфично и не связано с увеличением ploидности. В 10 случаях это явление сочеталось с полисомией 2 хромосомы. Степень дифференцировки этих нейробластом была различна: от недифференцированной формы до ганглионейробластомы.

У 5 пациентов с ганглионейробластомой наблюдали периферическое расположение сигналов гена *MYCN* в ядрах опухолевых клеток.

У 25 пациентов FISH-реакция для определения статуса гена *MYCN* была проведена с одноцветным зондом (без центромерного). Фоновое свечение при таком окрашивании было выражено немного или отсутствовало. Этот реактив давал более яркую флуоресценцию гена *MYCN*, однако, интерпретировать результаты без информации о числе центромер 2 хромосомы сложно, и такой зонд можно использовать только для окончательного решения о наличии или отсутствии амплификации в сложных случаях.

3.3. Амплификация гена *MYCN* на мазках-отпечатках и парафиновых срезах нейробластомы

Амплификация гена *MYCN* была обнаружена в 45 образцах нейробластомы (16,67%).

В результате проведенного исследования были выявлены разные типы амплификации: двойные ацентрические хромосомы (dmin), гомогенно окрашенные регионы (HSR) и гетерогенный (смешанный) тип (dmin+HSR).

3.3.1. Амплификация в виде двойных ацентрических хромосом (double minute – dmin). Образование микроядер

Амплификация в виде двойных ацентрических хромосом выглядела как огромное количество сигналов гена *MYCN* (до 100), дискретно лежащих в ядре опухолевой клетки (рис. 8a). Такой тип амплификации присутствовал в 26 случаях исследованных нейробластом. Гистологическое строение опухолей в 6 случаях соответствовало нейробластоме с тенденцией к созреванию и в 20

случаях недифференцированным и низкодифференцированным нейробластомам. По возрасту эти пациенты распределялись следующим образом: 17 пациентов младше 1 года и 9 пациентов старше года.

При таком типе амплификации наблюдалась внутри опухолевая гетерогенность копий гена *MYCN*: 1) гетерогенность по степени амплификации (числу сигналов гена *MYCN*) среди клеток одной и той же опухоли. Часть клеток могли содержать небольшое число сигналов копий гена *MYCN* (от 10 до 20), тогда как другие показывали высокий уровень амплификации (более 50 сигналов) (рис. 8б); 2) гетерогенность по клеткам с амплификацией, т.е. среди клеток с амплификацией гена *MYCN* располагаются опухолевые клетки без амплификации этого гена (рис. 8в).

Так же очевидными являлись различия во внутренней организации амплифицированного материала. Некоторые ядра были полностью окрашены, т.е. с равномерным распределением сигналов гена *MYCN* по всему объему, в других можно было различить один или несколько регионов с амплификацией (рис. 8г), а также встречались случаи, когда флуоресценция захватывала в основном периферические отделы ядра и прилежащую к нему область.

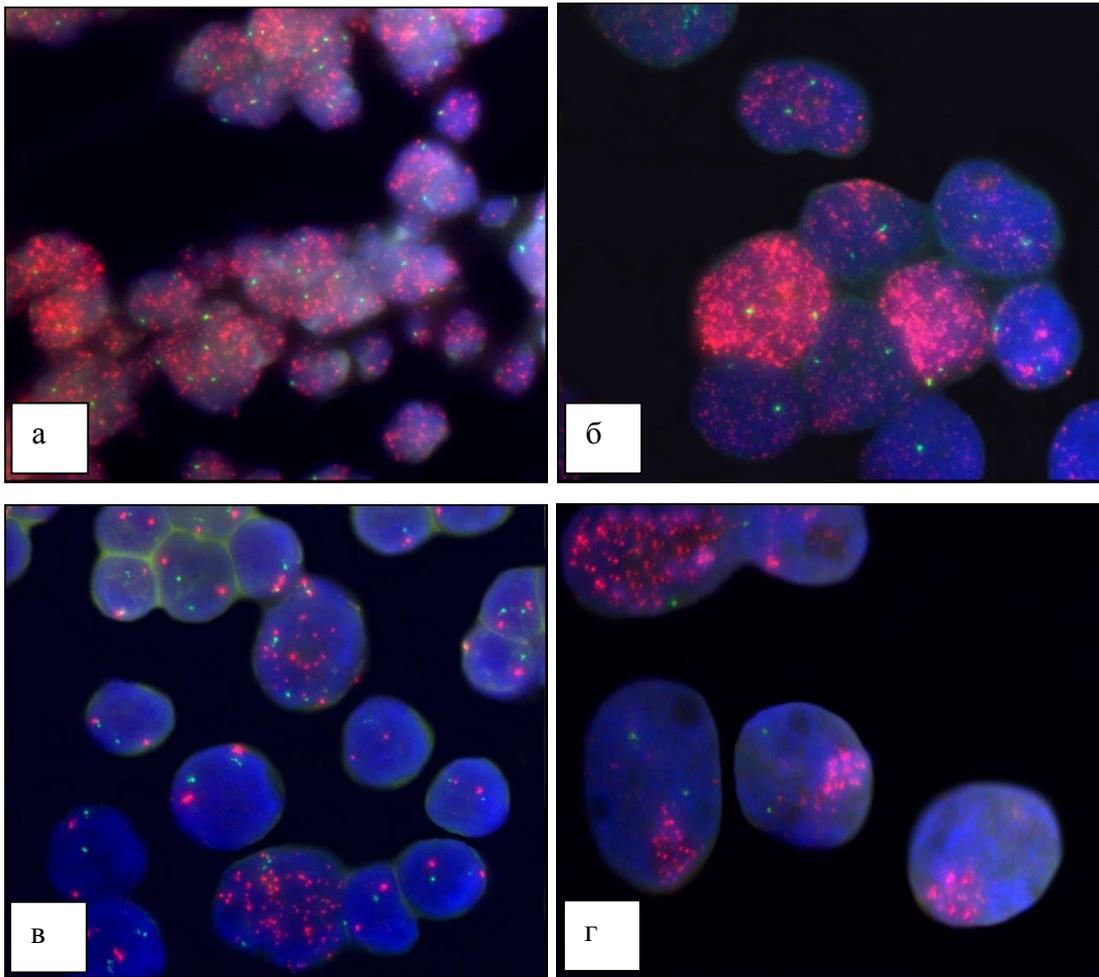


Рисунок 8 - Амплификация в виде двойных ацентрических хромосом (dmin) (красный сигнал – ген *MYCN*, зеленый сигнал – центромерная область 2 хромосомы) (x1000): а) амплификация в виде двойных ацентрических хромосом; б) гетерогенность по степени амплификации (числу сигналов гена *MYCN*) среди клеток одной и той же опухоли; в) гетерогенность по клеткам с амплификацией; г) различия во внутренней организации амплифицированного материала.

Явление, когда сигналы гена *MYCN* располагались по периферии ядра опухолевой клетки, наблюдалось в 10 случаях образцов с dmin (рис. 9а). Из них в трех случаях происходила элиминация (удаление) амплифицированных последовательностей посредством образования микроядер (рис. 9б, в). Распределение этих пациентов по возрасту было следующим: 8 пациентов младше 1 года, 2 – старше 1 года. У пациентов младше года с периферическим распределением амплифицированных последовательностей гена *MYCN*

нейробластома имела недифференцированный вариант строения, тогда как у пациентов старше года была представлена зрелыми ганглионейробластами, ганглиозными, шванновскими клетками и шванновской стромой. В этих случаях выявлялась зависимость возраста и количества ядер с периферическими сигналами гена *MYCN*. У пациентов младше 1 года количество ядер с периферическими сигналами гена *MYCN* было значительно больше (20,00-50,00%), чем ядер с амплификацией гена по всему ядру. У пациентов старше 1 года ядер с периферическими сигналами гена было всего лишь 2-3%.

У трех пациентов младше 1 года с недифференцированными нейробластомами можно было наблюдать необычное распределение сигналов гена *MYCN*: в центре ядра количество сигналов гена было равно количеству центромерных сигналов, а по периферии ядра мы наблюдали большое количества сигналов гена *MYCN* (10-20).

В 5 случаях нейробластом (пациенты также младше 1 года) можно было увидеть тенденцию постепенного нарастания размеров амплифицированных сигналов с локализацией наиболее крупных участков ближе к периферии ядер. Гистологическое строение этих нейробластом: 3 – недифференцированные нейробластомы, 2 – с тенденцией к созреванию.

Амплификация в виде двойных ацентрических хромосом сочеталась с полисомией 2 хромосомы в 15 случаях, которая была представлена в 9 случаях трисомией, в 6 случаях выраженной полисомией 2 хромосомы в пределах 5-7 центромерных сигналов/ядро.

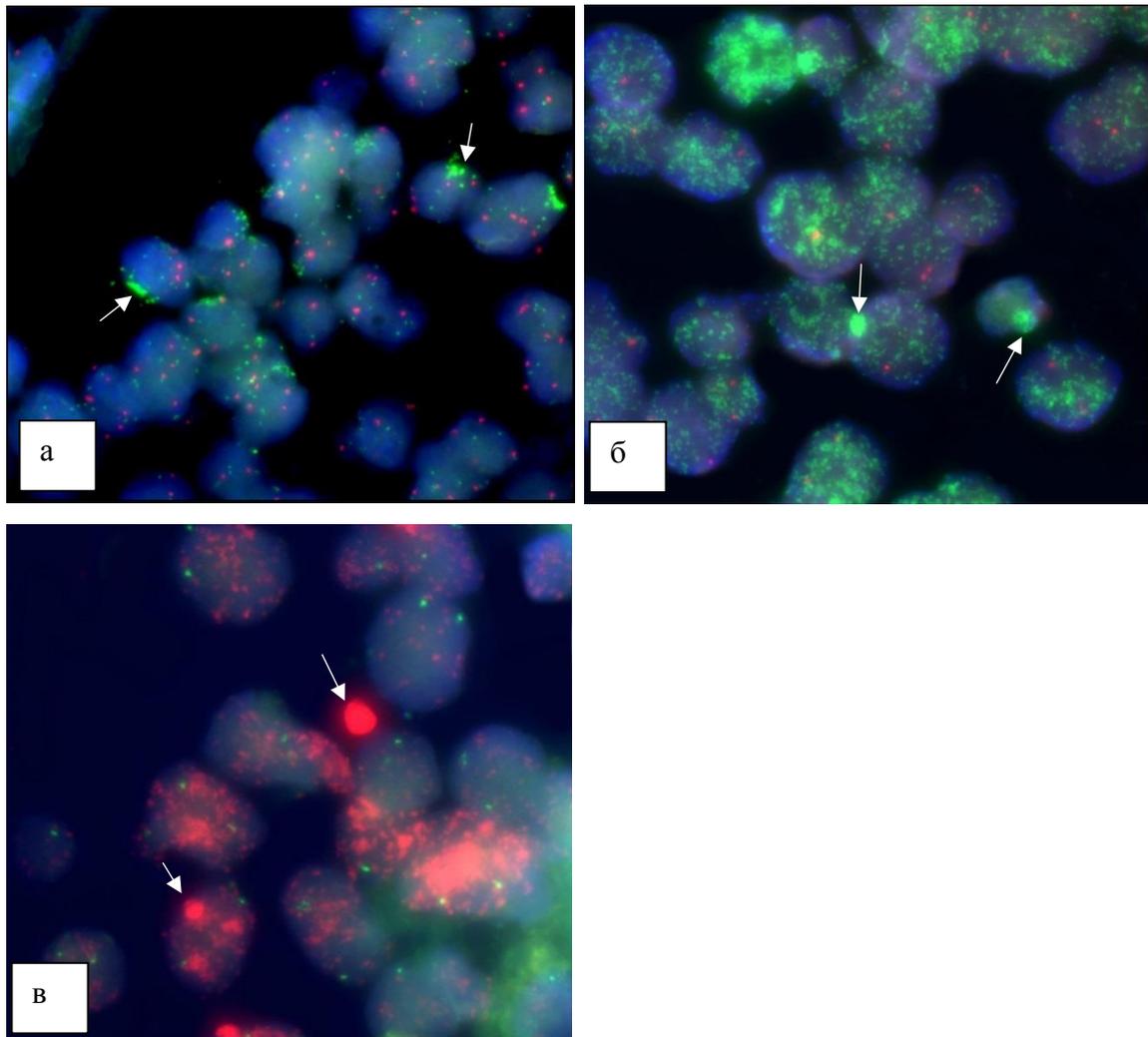


Рисунок 9 (x1000) — а) расположение сигналов гена *MYCN* по периферии ядра опухолевой клетки; б) в) образование микроядер (а, б зеленый сигнал – ген *MYCN*, красный сигнал – центромерная область 2 хромосомы; в. красный сигнал – ген *MYCN*, зеленый сигнал – центромерная область 2 хромосомы).

3.3.2. Амплификация в виде гомогенно окрашенных регионов (homogenously staining regions – HSR)

Амплификация гена *MYCN* в виде гомогенно окрашенных регионов выглядела как «облачность» или крупные «хлопья», заполняющие весь объем ядра или большую его часть (рис. 10а). Количество сигналов гена *MYCN* в этих случаях подсчитать не представлялось возможным.

Такой тип амплификации мы наблюдали в 8 случаях: у 2 пациентов младше 1 года и 6 пациентов – старше 1 года. Гистологическое строение опухолей в 2

случаях соответствовало нейробластому с тенденцией к созреванию, в 3 случаях недифференцированным, 2 -низкодифференцированным нейробластомам и в 1 – опухоли Вильмса.

Интересно отметить, что у пациента с опухолью Вильмса наряду с сигналами в ядре опухолевой клетки наблюдались сигналы гена *MYCN* за его пределами.

Во всех образцах с типом амплификации в виде гомогенно окрашенных регионов полисомия 2 хромосомы не выявлялась.

3.3.3. Гетерогенный (смешанный) тип амплификации гена *MYCN*

Но помимо двух, описанных выше, типов амплификации мы встречались с гетерогенным типом, т.е. наличие в одном образце опухоли двух типов амплификации гена *MYCN* (в виде гомогенно окрашенных регионов (HSR) и в виде двойных ацентрических хромосом (dmin)) (рис. 10б), иногда такую гетерогенность в организации амплифицированного материала можно было наблюдать в ядре одной клетки, где сочетались два типа амплификации. Такой тип амплификации мы наблюдали в 11 случаях недифференцированных и низкодифференцированных опухолях. Возраст пациентов: 5 - младше 1 года и 6 – старше 1 года.

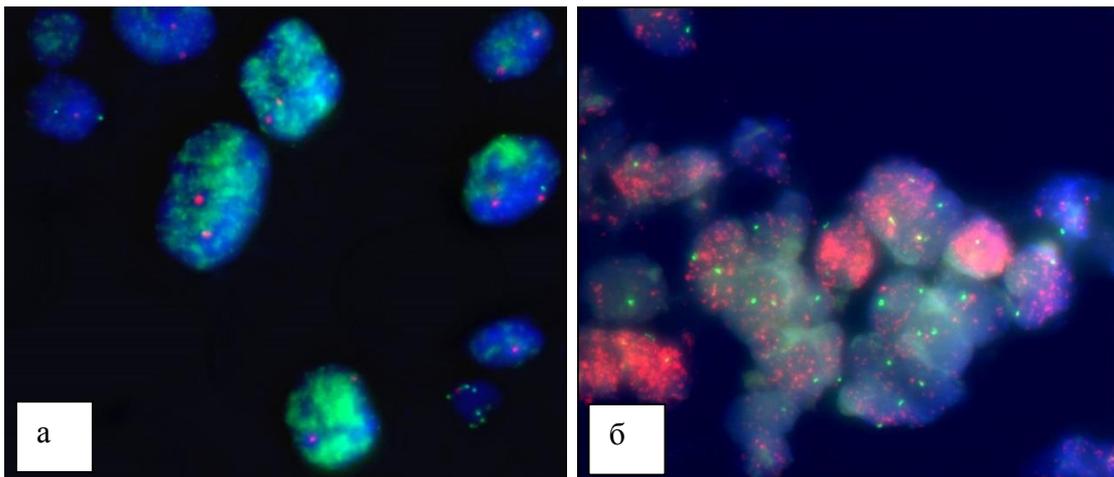


Рисунок 10 - Типы амплификации гена *MYCN*. (x1000) а) амплификация гена *MYCN* в виде гомогенно окрашенных регионов (hsr); б) гетерогенный тип (dmin+hsr) (а. зеленый сигнал – ген *MYCN*, красный сигнал – центромерная

область 2 хромосомы; б. красный сигнал – ген MYCN, зеленый сигнал – центромерная область 2 хромосомы).

Сводные данные по этому разделу представлены в виде диаграмм 1 и 2.

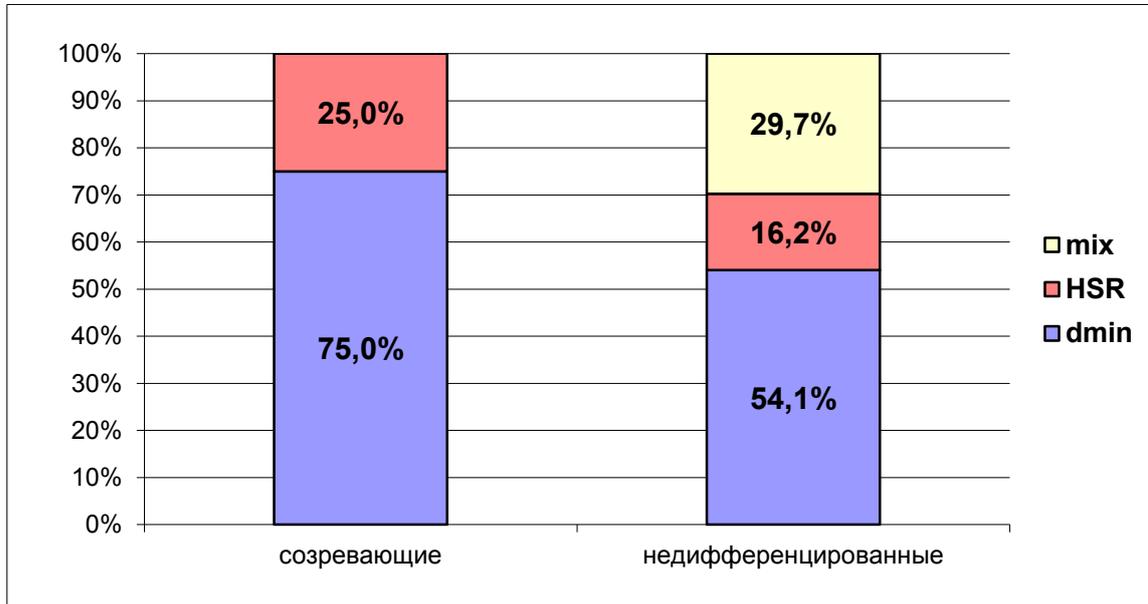


Диаграмма 1. Соотношение типов амплификации в созревающих и недифференцированных нейробластомах (mix – смешанный тип, HSR – в виде гомогенно окрашенных регионов, dmin – в виде двойных ацентрических хромосом).

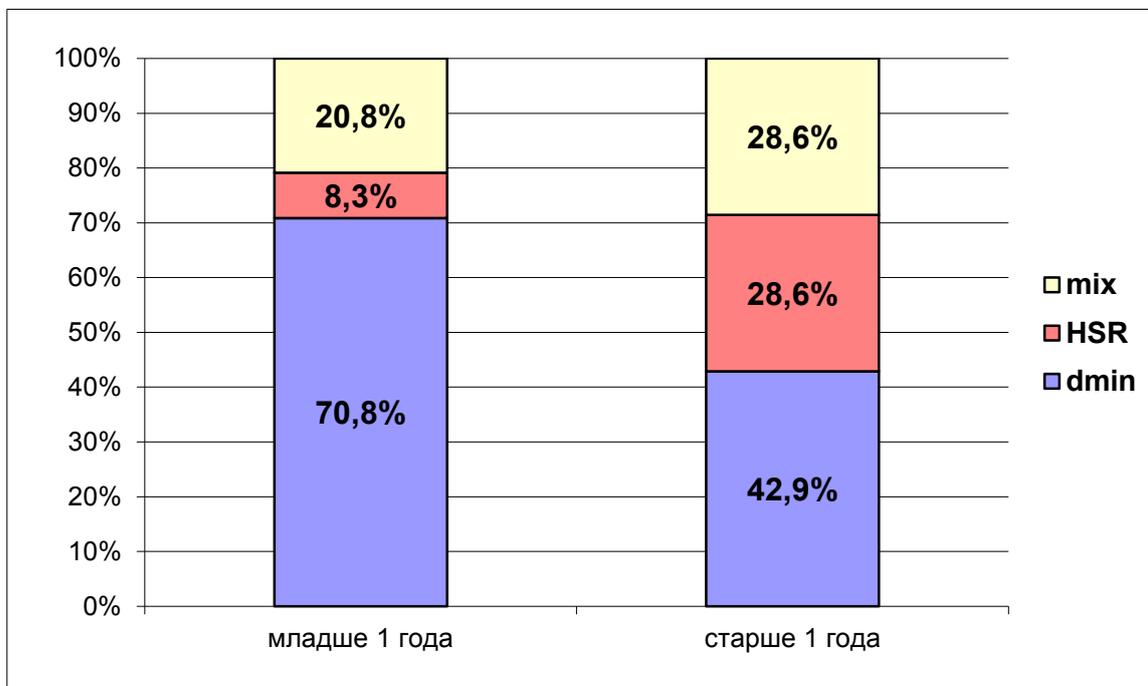


Диаграмма 2. Соотношение типов амплификации у детей младше и старше 1 года (mix – смешанный тип, HSR – в виде гомогенно окрашенных регионов, dmin – в виде двойных ацентрических хромосом).

3.4. Определение статуса гена *MYCN* у пациентов в динамике

Известно, что с течением времени, после лечения опухоль претерпевает изменения: происходит ее созревание, наблюдается лечебный патоморфоз - некроз и дистрофия опухолевых клеток. Нейробластома – это благоприятный объект для изучения этих явлений.

У 4 пациентов оценка статуса гена *MYCN* проводилась дважды: до и после проведенного лечения.

Пациентка З. с нейробластомой надпочечника, первоначально статус гена *MYCN* был определен в 5 месяцев (реакция проводилась на метастазе нейробластомы в лимфатический узел). Была обнаружена амплификация гена *MYCN* в виде двойных ацентричных хромосом (dmin). Так же были обнаружены ядра с периферическим распределением сигналов этого гена, при этом замечено, что в центре ядра было нормальное количество сигналов гена, а по периферии более 10. Встречались ядра со смещением сигналов гена *MYCN* к одному полюсу ядра с формированием микроядер. Клеток с dmin было меньше (5%), чем ядер с периферическим распределением сигналов гена *MYCN* (30%). Реакция была проведена с одноцветным и двухцветным флуоресцентными зондами. Наблюдалась полисомия до 3-4 центромерных сигналов.

Повторный анализ статуса гена *MYCN* был определен в возрасте 1 год 8 месяцев после лечения. Реакция проводилась на метастазе нейробластомы в печень (наблюдались признаки лечебного патоморфоза 3 степени). Много деформированных клеток. В ядрах опухолевых клеток с сохранной морфологией наблюдалось до 5 сигналов гена *MYCN* при единичном центромерном сигнале. Ядер с периферическим распределением сигналов гена *MYCN* не обнаружено.

Пациент Р. с нейробластомой малого таза, первоначально статус гена *MYCN* был определен в возрасте 5 лет после проведенного лечения на операционном материале (опухолевый узел имел строение ганглионейробластомы с лечебным патоморфозом I степени). В крупных ядрах наблюдалась полисомия до 3-4 центромерных сигналов на ядро. Число сигналов гена *MYCN* было в пределах от 2 до 9.

Повторный анализ был проведен через 1 год 5 месяцев на метастазе нейробластомы в лимфатический узел (возраст пациента 6,5 лет). В ядрах опухолевых клеток наблюдалась трисомия 2 хромосомы, количество сигналов гена *MYCN* не превышало 5/ядро.

Пациент Т. с нейробластомой левого надпочечника, первоначально статус гена *MYCN* был определен в возрасте 8 месяцев на операционном материале до лечения (недифференцированный тип нейробластомы). В ядрах опухолевых клеток было обнаружено нормальное соотношения сигнала гена *MYCN* к центромере 2 хромосомы, а также тетрасомия 2 хромосомы с 4 сигналами гена *MYCN*.

Через 8 месяцев (возраст пациента 1 год 4 месяца) был проведен повторный анализ на метастазе нейробластомы в лимфатический узел. В ядрах опухолевых клеток наблюдалась полисомия 2 хромосомы: трисомия и пентасомия – с количеством сигналов гена *MYCN* от 3 до 6.

Пациентка О. с нейробластомой забрюшинного пространства, первоначально статус гена *MYCN* был определен в возрасте 12 месяцев на биопсийном материале (недифференцированный тип нейробластомы). В ядрах опухолевых клеток наблюдалась полисомия 2 хромосомы (три-, тетрасомия), количество сигналов гена *MYCN* соответствовало количеству центромер.

Через 4 месяца (возраст пациента 1 год 4 месяца) был проведен повторный анализ на операционном материале. Была также обнаружена полисомия: трисомия и тетрасомия в 20% ядер опухолевых клеток, при этом количество сигналов гена *MYCN* было от 3 до 6/ядро, т.е. наблюдали превышение количества сигналов гена по сравнению с центромерой.

3.5. Определение статуса гена *MYCN* у пациентов с другими опухолями

В 10 исследованных случаях оценка статуса гена *MYCN* была проведена у пациентов со следующими диагнозами: 5 – примитивные нейроэктодермальные опухоли (ПНЭО), 4 - эмбриональные рабдомиосаркомы, 1 – аденома надпочечника. Во всех случаях (кроме одной эмбриональной рабдомиосаркомы)

наблюдалось нормальное соотношение сигналов – 2 центромерных сигнала второй хромосомы и 2 сигнала гена *MYCN*.

Клинический случай

Пациентка 3 лет с диагнозом эмбриональная рабдомиосаркома параменингеального пространства слева с метастазами в предушные, заднешейные и подчелюстные лимфатические узлы слева. Стадия T2bN1M0. Поступила на обследование и лечение в РОНЦ им. Н.Н. Блохина с предварительным диагнозом – нейробластома. Для определения статуса гена *MYCN* была проведена FISH-реакция, при анализе результатов было отмечено повышенное количество сигналов гена *MYCN* (до 8), которое сочеталось с трисомией 2 хромосомы (рис. 11). При проведении новой биопсии с дальнейшими гистологическим и иммуногистохимическим исследованиями был поставлен диагноз эмбриональная рабдомиосаркома, и проведено лечение по программе среднего риска. После терапии (VAC + ЛТ) данных за рост опухоли выявлено не было. Последнее обследование было проведено через 1 месяц после лечения.

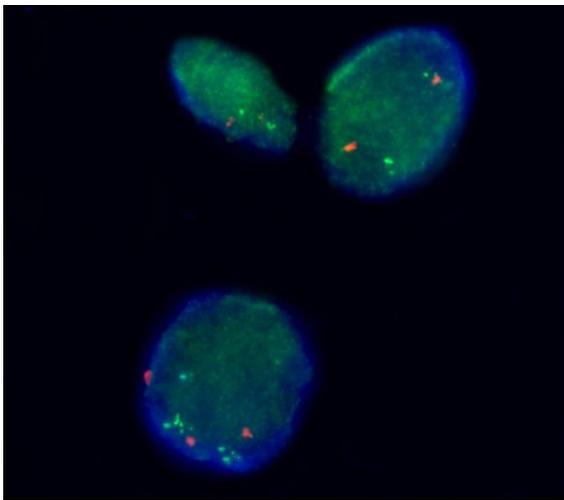


Рисунок 11 - Статус гена *MYCN* у пациентки с эмбриональной рабдомиосаркомой. (x1000) (зеленый сигнал – ген *MYCN*, красный сигнал – центромерная область 2 хромосомы).

4. Культивирование клеток нейробластомы

С целью детализации клеточного состава нейробластомы было проведено исследование по культивированию опухолевой ткани 23 больных с этой нозологией.

4.1. Получение первичных тканевых культур на слайд-флаконах

Первоначально предполагалось использовать метод получения первичных тканевых культур на слайд-флаконах с последующим FISH-анализом полученных колоний для оценки статуса гена *MYCN* во всех типах клеток (I-, N-, S-), представленных в культуре, т.к. конструкция слайд-флаконов предназначена для оценки клеточных колоний *in situ*, т.е. без снятия клеток с подложки. Однако получить достаточное количество метафаз для оценки статуса гена *MYCN* таким методом не удавалось, т.к. метафазные пластинки формировались только по периферии колоний, и хромосомы в них располагались очень плотно, что затрудняло их оценку. Это объяснялось тем, что делящиеся клетки находились по периферии колонии, и ядра, из которых получали метафазные пластинки, только теряли свою оболочку, высвобождая хромосомы, которые располагались в объеме ядра, поэтому мы видели их тесное расположение. Результат FISH-анализа интерфазных ядер на слайд-флаконах также получался неудовлетворительным из-за плотного расположения клеток в колонии и связывающего их межклеточного вещества (рисунки не представлены). Поэтому решено было оценивать статус гена *MYCN* на клетках, обработанных колхицином и снятых с подложки, т.е. в клеточной суспензии.

4.2. Клеточный состав нейробластом

Группа нейробластом, из которых были получены первичные тканевые культуры, была представлена опухолями, содержащими популяции клеток гистологически определяемые, как нейробласты разной степени зрелости и гетерогенности по качественному и количественному составу. Только одна опухоль состояла целиком из незрелых мономорфных клеток без отростков, формирующих солидные поля (таблица 2, образец №4). В остальных случаях определялась примесь того или иного количества более зрелых клеточных элементов, строящих структуры ганглионейробластомы. В пяти случаях опухоль

целиком имела строение ганглионейробластомы (таблица 2, образцы №7, 9, 11, 12, 14) и еще в трех – ганглионевромы (таблица 2, образцы №5, 13, 16). Один образец был представлен некротизированной тканью с инфильтрацией лейкоцитами, по этой причине характеристика этого материала была невозможна.

Таблица 2 - Культурально-морфологические характеристики и результаты FISH исследования образцов нейробластомы

Образец №	Образование колоний	Морфологические типы клеток	Гистологическое строение	Результаты FISH-реакции
1	+	I выраженная пролиферативная активность	Недифференцированная нейробластома. Розеткообразование. Единичные участки ганглионейробластомы. Метастаз в л/у	N-тус – (метафазы и мазок)
2	+	I, S	Рецидив. Недифференцированная нейробластома. Единичные участки ганглионейробластомы. Метастаз в л/у	N-тус – (метафазы)
3	+	I, I(S) слабодифференцированные, пролиферативно активные клетки. Но имеется тенденция к созреванию	Недифференцированная нейробластома. Розеткообразование. Метастаз в л/у	N-тус + на одной хромосоме 2 (метафазы), N-тус–, полисомия, делеция 1p36 нет (мазок)
4	+	I, S, N	Недифференцированная нейробластома, единичные дифференцирующиеся клетки. Метастаз в л/у	N-тус + (на двух хромосомах 2 – метафазы, мазок), делеция 1p36
5	-	Зрелые нейроны не способны к адгезии и пролиферации	Зрелая ганглионеврома	
6	-	S не пролиферирующие, не образующие колоний	Недифференцированная нейробластома, умеренно выраженная способность к образованию фибрилл	

7	-	S	Нодулярная ганглионейробластома Метастаз в л/у, кости скелета и костный мозг	
8	-	S Полное отсутствие пролиферативной активности	Нейробластома с переходами начальной стадии в ганглионейробластома. Метастаз в л/у	N-тус -, полисомия (мазок)
9	+	I(S), S Прогрессирование дифференциации при культивировании	Ганглионейробластома	N-тус -, полисомия, делеции 1p36 нет (мазок), N-тус - (метафазы)
10	+	I, I(N), N поликлональное развитие с дифференциацией в направлении N-клеток.	Стадия IVs. Недифференцированная нейробластома, много розеток, участки ганглионейробластомы Метастаз в печень	N-тус -, трисомия, делеции 1p36 нет (мазок). N-тус + на одной 2 хромосоме (метафазы). N-тус + (срез метастаза в печень)
11	-	S не пролиферирующие, не образующие колоний	После 8 курсов ПХТ Ганглионейробластома – ганглионеврома Метастаз в л/у, распространение в позвоночный канал	
12	-	Единичные клеточные элементы в состоянии G0	Ганглионейробластома	
13	-	Прикрепление единичных клеток в состоянии G0	Ганглионеврома	

22	-	-	Материал в основном представлен некротизированной тканью	
23	+	I, N, S	Недифференцированная нейробластома	N-мус -, три-тетрасомия, делеции 1p36 нет (мазок)

4.3. Культурально-морфологические характеристики полученных тканевых культур

В результате роста в специальной культуральной среде «Клоноген» (для поддержания пролиферации недифференцированных клеток) клетки посевного материала образовывали колонии, варьирующие по скорости роста и числу клеток (от нескольких десятков до нескольких тысяч).

Анализ полученных первичных культур по культурально-морфологическим характеристикам (КМХ) позволил выделить 4 уровня клоногенности опухолевого материала:

1. Низкий уровень клоногенности – полное отсутствие прикрепления/роста, или прикрепление отдельных клеточных элементов с выраженной специализацией при отсутствии пролиферативной активности (рис. 12а).

2. Пониженный уровень клоногенности – прикрепление и образование единичных колоний специализированных клеток, с медленным ростом и с тенденциями к клеточной дегенерации (рис. 12б).

3. Повышенный уровень клоногенности (рис. 12в)

А. Поздняя активация и формирование единичных колоний (1-3/флакон) слабо дифференцированных клеток с активной пролиферацией.

В. Прикрепление и образование множественных колоний специализированных клеток, с выраженной пролиферативной активностью.

4. Высокий уровень клоногенности – умеренное или обильное прикрепление посевного материала, быстрая и активная пролиферация незрелых клеток с образованием большого числа активно растущих колоний (рис. 12г).

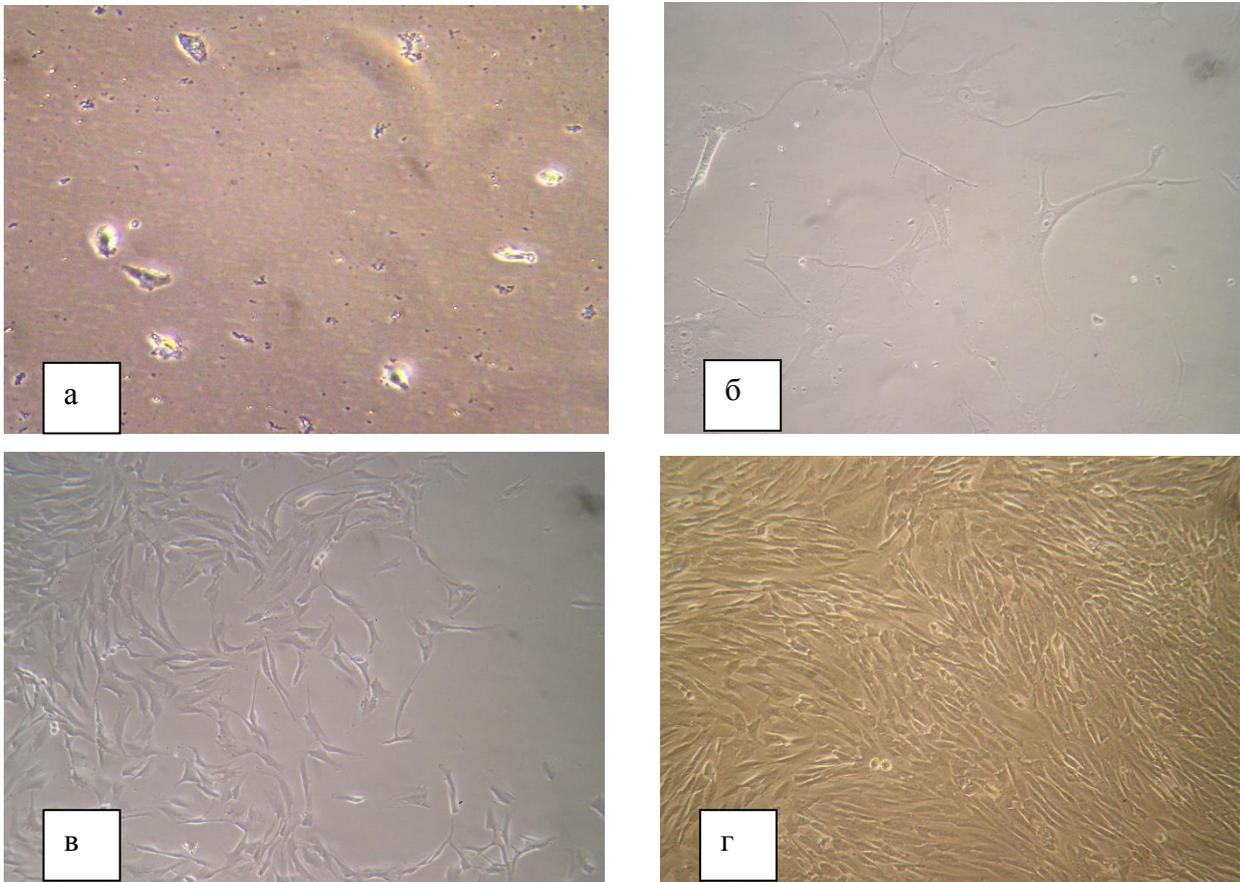


Рисунок 12 - Уровни клоногенности опухолевого материала нейробластомы:

- а) низкий уровень клоногенности;
- б) пониженный;
- в) повышенный;
- г) высокий.

4.4. Стадии развития первичных тканевых культур и их клеточный состав

В эксплантатах нейробластомы развитие культур проходило 3 стадии: адгезия (48 часов), активация (5-10 суток), пролиферация (с образованием колоний) или терминальная специализация клеток (2-3 недели). Общее время культивирования от посева до получения клонов, состоящих из 10^3 - 10^4 клеток

составляло от 21 до 30 суток в зависимости от количества и пролиферативных свойств клеток в составе посевного материала.

Морфология клеток в колониях была разнообразной. В целом она соответствовала описанным ранее клеточным элементам.

1. Малодифференцированные клеточные элементы, мелкие, уплощенные, иногда с отростками имели крупные ядра, среднего размера цитоплазму, формировали колонии в культуре тканей. Они обладали цитоморфологическими признаками промежуточными между клетками N- и S-типов, поэтому их называют клетками I-типа (intermediate). Они имели отростки, в которых фибриллы не обнаруживались (рис. 13а).

При нейробластоме от I-клеток дифференцировались 2 морфологически различимых типа прекоммитированных клеток (S- и N-).

2. S-тип - большие, уплощенные клетки, крепко фиксированные к субстрату и проявляющие признаки контактного торможения. Они имели широкую цитоплазму, сравнительно небольшие ядра (предположительно дающие рост глиальным, гладкомышечным элементам, меланоцитам). Клетки S-типа имели разнообразную морфологию, могли быть отростчатыми или звездчатыми. Подвергались терминальной дифференцировке, т.е. появлялась или усиливалась отростчатость, вакуолизация, гранулярность цитоплазмы (рис. 13б).

3. N-тип – клетки, имеющие нейрональную направленность дифференцировки. Эти мелкие округлые клетки с короткими нейритическими отростками формировали агрегаты, не прикрепляющиеся к субстрату. В процессе роста клетки N-типа формировали отростки - нейриты и закреплялись на клетках I- и S-типов (рис. 13в, г).

Соотношение разных клеточных элементов в каждом конкретном клиническом было случае разное.

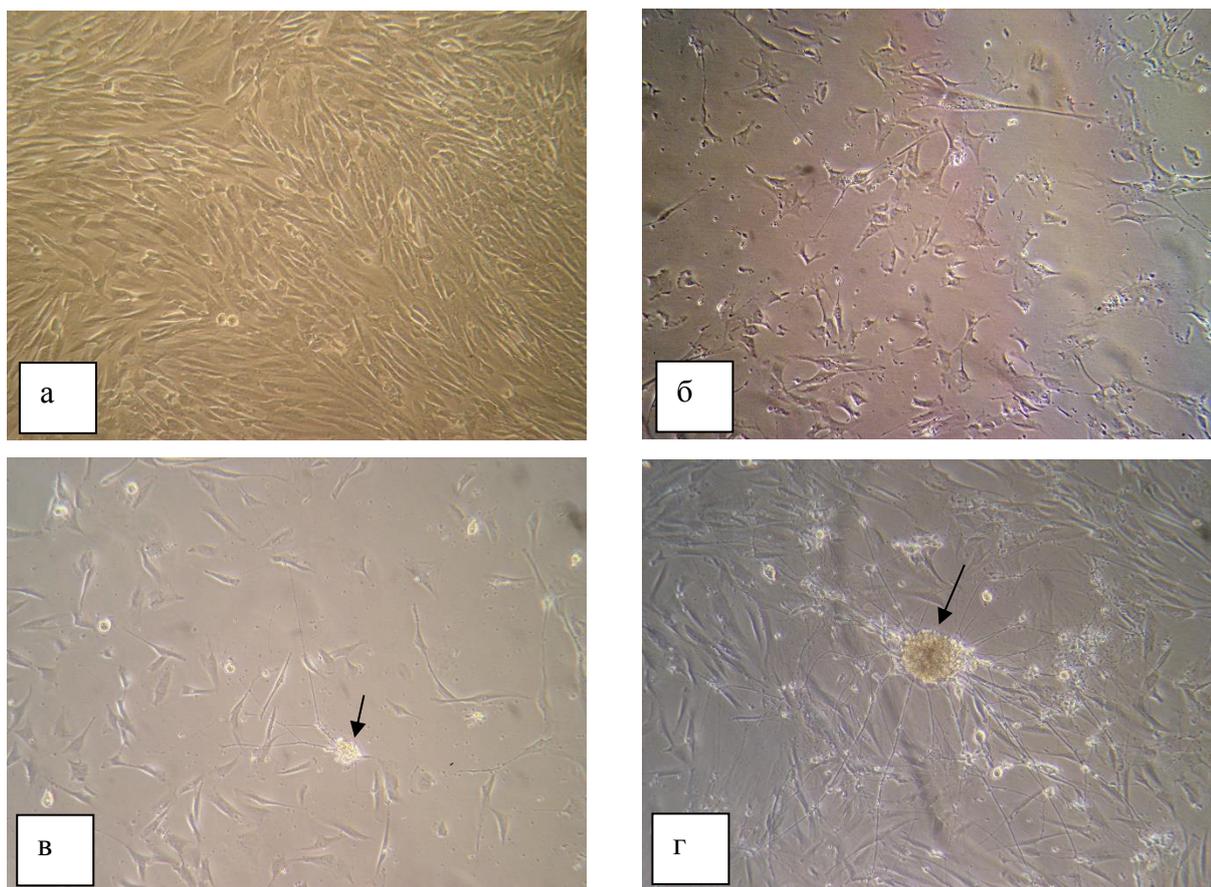


Рисунок 13 - Морфологические типы клеток в колониях:

- а) I-тип клеток;
- б) S-тип;
- в, г) N-тип.

Интересным был тот факт, что усиление тенденций в направлении цитодифференцировки приводило к увеличению сроков культивирования опухолевых клеток и усложняло спектр популяционной картины, развивающейся *in vitro* культуры.

Наиболее быстрое клональное развитие *in vitro* демонстрировали культуры, представленные популяцией активно пролиферирующих I-клеток без явных признаков цитоморфологической дифференцировки. Такие колонии были представлены компактно расположенными бластоподобными элементами с выраженной пролиферативной активностью.

Культуры, содержащие в своем составе клетки нейронального (N-тип) и глиального (S-тип) направлений дифференцировки, характеризовались более

медленными темпами развития колоний (от 25 до 30 дней), а также выраженной тенденцией к специализации, главным образом, в направлении распластанных, непролиферирующих клеток S-типа. N-клетки не обладали выраженными адгезивными свойствами и имели тенденцию к образованию агрегатов и тяжей из сферических клеток. Эти клетки и их агрегаты закреплялись на телах клеток S-типа при помощи отростков – нейритов.

4.5. Сопоставление клеточного состава тканевой культуры с микроструктурой нейробластомы, из которой она была получена

Представляло определенный интерес сопоставление особенностей клеточной популяции в эксплантатах с микроскопической структурой нейробластомы. Во всех вариантах нейробластомы, содержащих то или иное количество незрелых нейробластов, при культивировании обязательно росли клетки I-типа. Дальнейшего параллелизма между числом и типом клеток (N-типа, S-типа) и удельным соотношением микроструктур опухоли уже не наблюдалось, хотя при культивировании этих новообразований на среде «Амниокар», способствующей дифференцировке клеток, может продолжаться процесс дифференцировки с появлением и нарастанием числа клеток N- и S-типов.

Клеточная часть посевного материала операционных образцов ганглионевром (таблица 2, образцы №5, 13, 16) была представлена зрелыми сферическими олигодендритными нейронами, полностью не способными к адгезии, образованию колоний и пролиферации в культуре *in vitro* на пластиковом субстрате (рис. 14а).

При ганглионейробластомах равновесие клеточного состава было значительно сдвинуто в сторону клеток S-типа - непролиферирующих элементов. Но наличие в культуре клеток S-типа не только признак созревающих опухолей. Такого типа клетки преобладали в культуре пациента (таблица 2, образец №2) с рецидивом нейробластомы, у пациента (таблица 2, образец №7) с метастазом нейробластомы в костный мозг, в культуре метастаза в лимфатический узел в образце №14 (таблица 2), в культуре крестцово-копчиковой нейробластомы

(T3N1M0) с распространением в позвоночный канал (таблица 2, образец №11) (рис. 14б).

Рассмотрим случай одновременного культивирования материала первичного и метастатического (лимфатический узел) очагов нейробластомы образец №14 (таблица 2). Был получен следующий результат: в культуре первичного очага образовались две рыхлые медленно растущие колонии дифференцированных клеток S-типа с тенденцией к терминальной дифференцировке и прекращению пролиферации (пониженного уровня клоногенности) (рис. 14в); в метастатическом очаге образовались 5-7 рыхлых колоний с умеренной скоростью роста. Клеточный состав их был представлен распластанными, отростчатыми клетками S-типа и I(S)-клетками с выраженной тенденцией к цитодифференцировке и ассиметричным митозам (повышенного уровня клоногенности) (рис. 14г).

У двух пациентов со стадией IVs нейробластомы (таблица 2, образцы №10, №20) в культуре наблюдалось поликлональное развитие с дифференциацией в направлении N-клеток.

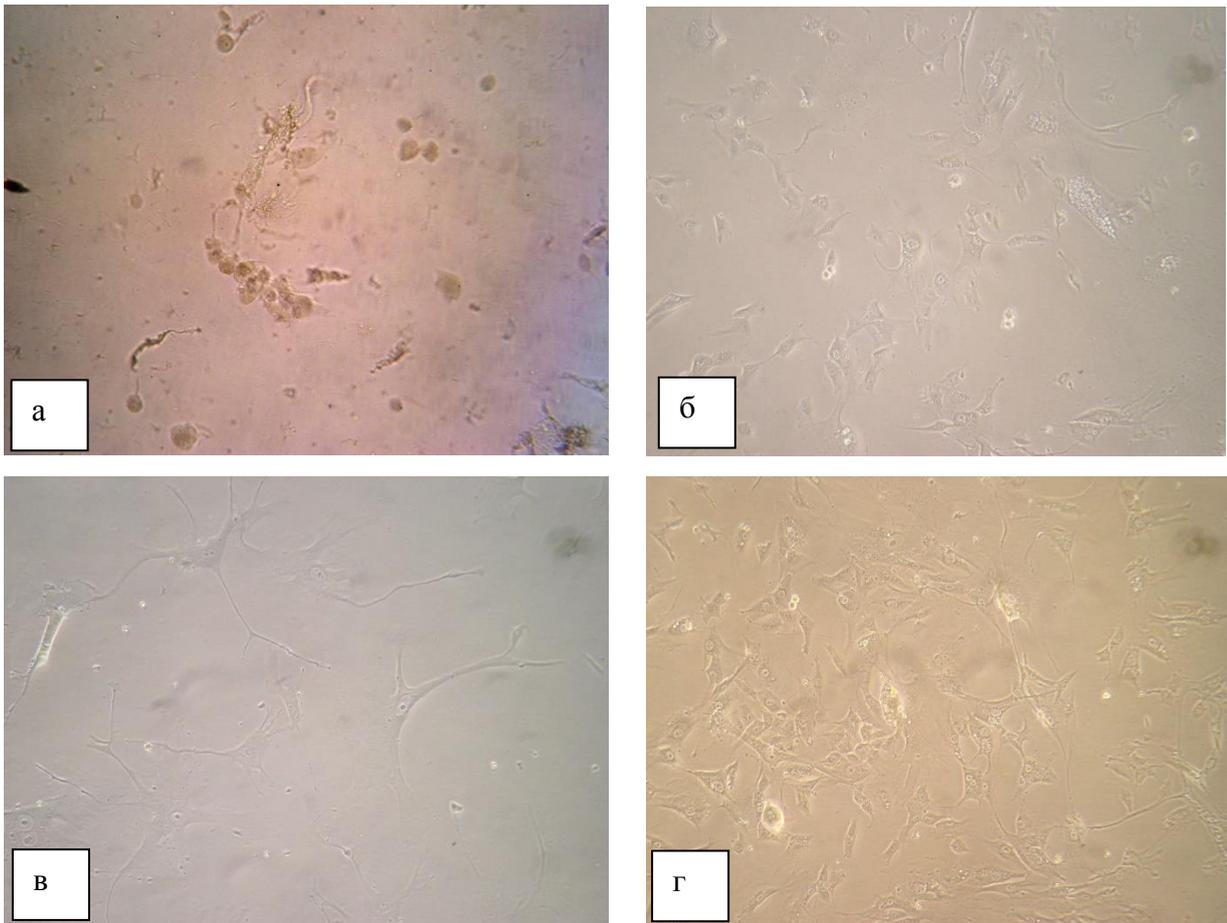


Рисунок 14 - Клеточный состав посевного материала:

- а) ганглионеврома;
- б) ганглионейробластома;
- в) ганглионейробластома первичный очаг;
- г) метастаз ганглионейробластомы в лимфатический узел.

4.6. Сопоставление клеточного состава тканевой культуры с эффективностью проведенного лечения (2 случая)

У пациента 3,5 лет (таблица 2, образец №7) диагностировалась нейробластома с метастазами в кости скелета и костный мозг. Первичная тканевая культура в этом случае была представлена клетками с признаками выраженной цитодифференцировки S-типа, неделящимися и не образующими колоний. При последующей оценке гистологических препаратов после проведенной комбинированной терапии - высокодозной терапии с аутотрансплантацией

гемопозитических стволовых клеток - в пунктате костного мозга сохранялись клетки нейробластомы.

У второго пациента 2 лет (таблица 2, образец №17) с нейробластомой и метастазами в кости скелета, костный мозг и множественными метастазами в плевру, легкие и ткани головного мозга тканевая культура была представлена клетками I-типа и более дифференцированных I(S)-типа. Клетки были охарактеризованы как подвижные, до 10% клеток находилось в состоянии митоза в каждой колонии. При оценке гистологических препаратов этого пациента после проведенной химиотерапии опухоль уменьшилась более чем на 80%, исчезли очаги поражения в легких, тканях головного мозга и печени. Однако метастазы в костном мозге сохранились даже после 3 курсов биотерапии.

4.7. Использование метода FISH для определения статуса протоонкогена *MYCN* в геномах культивированных клеток нейробластомы

Следует подчеркнуть, что проведение FISH-реакции на материале культуры тканей давало возможность оценивать статус гена *MYCN* как в интерфазных ядрах, так и в метафазных структурах.

Амплификация гена *MYCN* была установлена в 4 случаях исследованных нейробластом. Рассмотрим эти случаи.

Пациент №15 (возраст 2 года) (таблица 2) - амплификация гена *MYCN* определялась в мазке-отпечатке опухоли. Провести FISH-исследование статуса гена *MYCN* культуре клеток не удалось, т.к. при культивировании этого образца наблюдались только N-прекомитированные нейробласты, сферические клетки без закрепления и распластывания.

Пациент №4 (возраст 2 года) (таблица 2) - амплификация гена *MYCN* определялась в культуре на обеих вторых хромосомах, и также FISH-реакция была положительной на парафиновых срезах и мазках этой опухоли (рис. 15).

Пациент №3 (возраст 7 месяцев) (таблица 2) - амплификация гена *MYCN* определялась только на одной из пары вторых хромосом. В этом случае хотелось отметить, что на парафиновых срезах и мазках амплификация не определялась (рис. 16).

Пациент №10 (возраст 2 месяца) (таблица 2) - амплификация гена *MYCN* также определялась только на одной из пары вторых хромосом. Однако в этом случае амплификация этого гена сочеталась с отрицательной реакцией на срезах и мазках-отпечатках первичного очага нейробластомы и положительной реакцией - амплифицированным статусом гена *MYCN* - на срезах метастаза этой же опухоли в печени. (Для культивирования был взят материал из первичного очага) (рис. 17).

Клиническое значение последней разновидности амплификации (на одной из пары вторых хромосом) пока неясно.

Особо следует отметить, что на материале тканевых структур очень хорошо были видны различные формы амплификации гена *MYCN*. В одном из амплифицированных случаев можно было видеть не только амплификацию в виде гомогенно окрашенных участков на хромосоме, но и скопления в виде коротких ацентрических хромосом (*double minutes*), лежащих между хромосомами (рис. 17г).

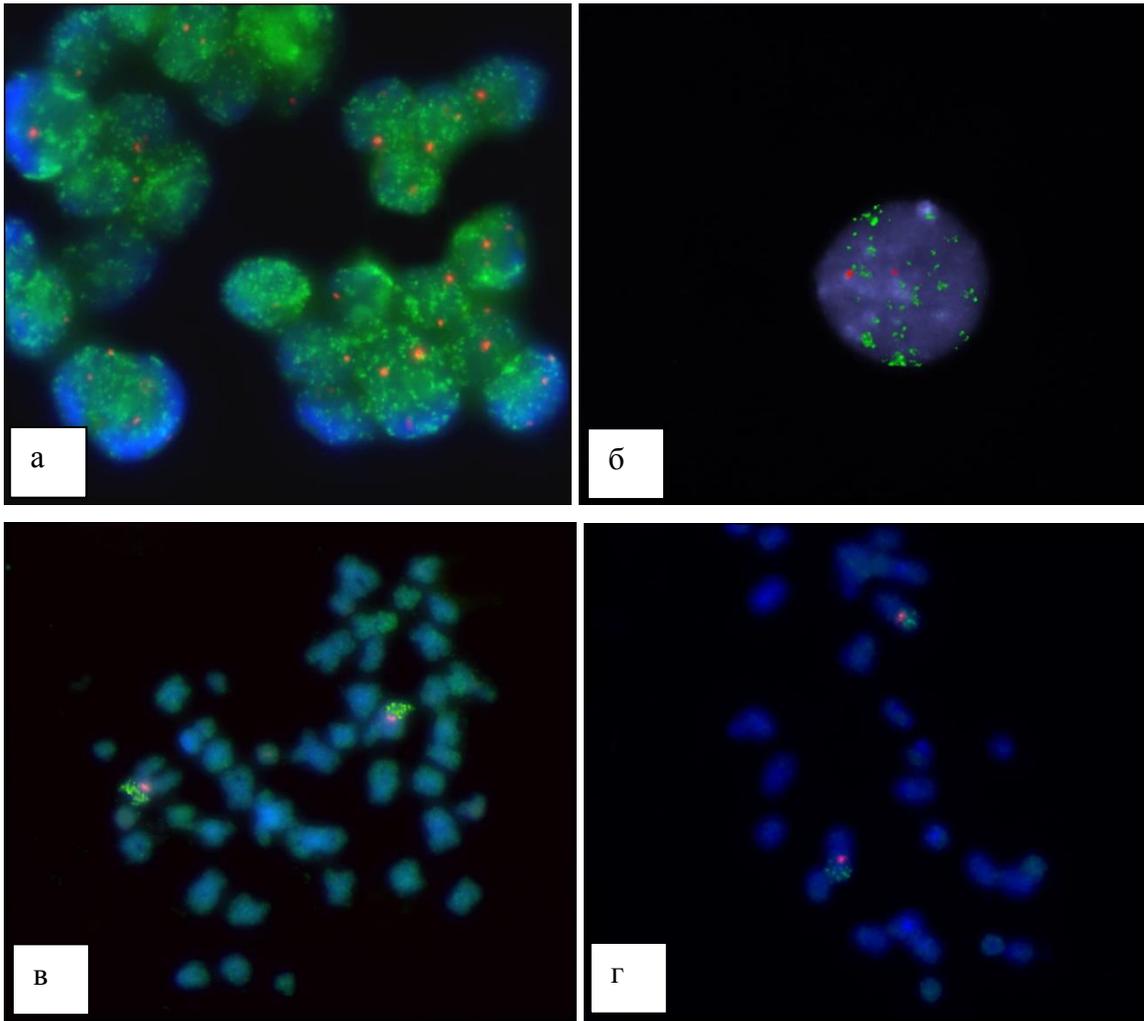


Рисунок 15 - Результаты FISH-реакции пациента №4 (зеленые сигналы – ген *MYCN*, красные сигналы – центромерная область 2 хромосомы) (x1000):

а) амплификация гена *MYCN* на парафиновом срезе нейробластомы;

б) амплификация гена *MYCN* на мазке-отпечатке нейробластомы;

в, г) амплификация гена *MYCN* на обеих вторых хромосомах;

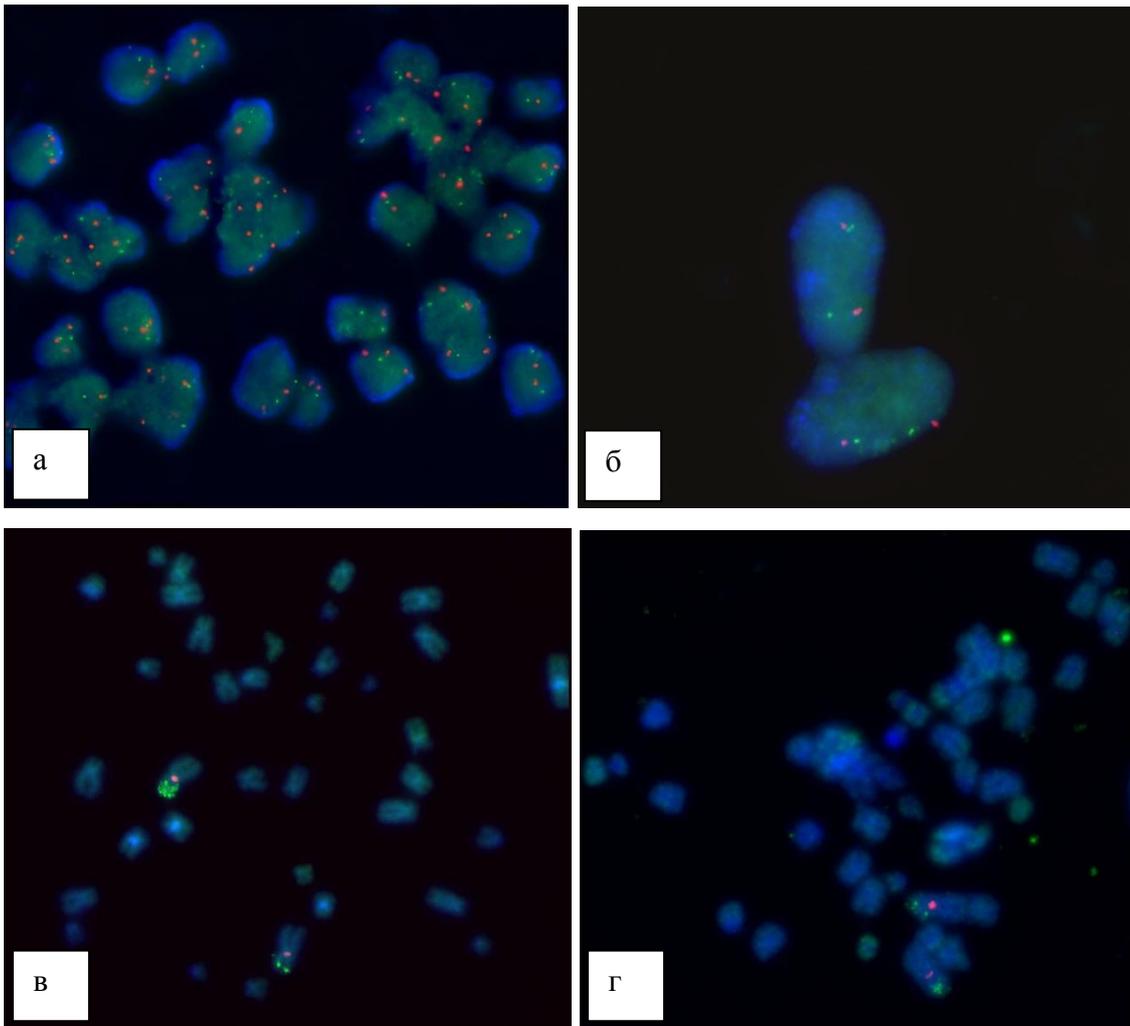


Рисунок 16 - Результаты FISH-реакции пациента №3 (зеленые сигналы – ген *MYCN*, красные сигналы – центромерная область 2 хромосомы) (x1000):

а) статус гена *MYCN* на парафиновом срезе нейробластомы;

б) статус гена *MYCN* на мазке-отпечатке нейробластомы;

в, г) амплификация гена *MYCN* на одной из пары вторых хромосом.

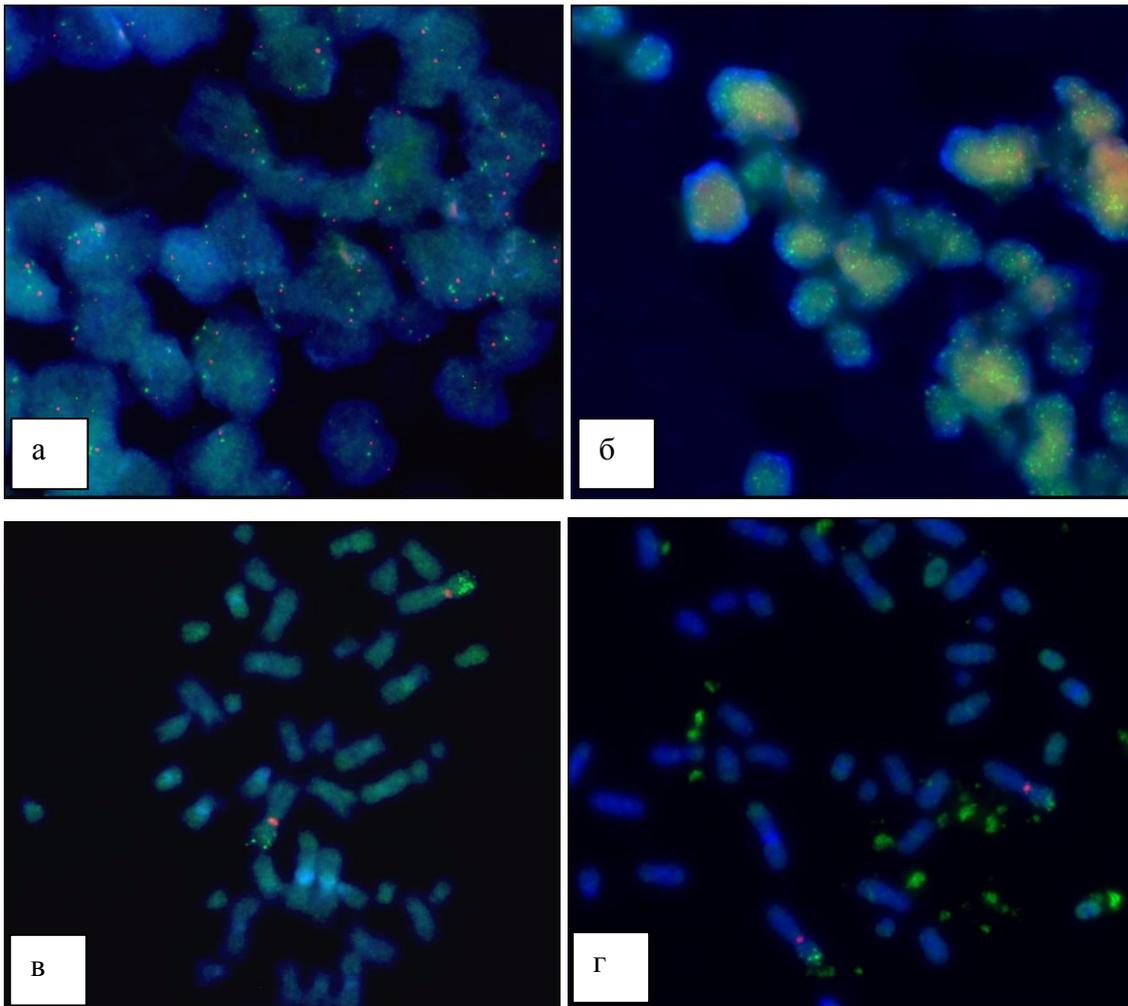


Рисунок 17 - Результаты FISH-реакции на интерфазных ядрах и метафазных хромосомах образца №10 (зеленый сигнал – ген *MYCN*, красный сигнал – центромерная область 2 хромосомы) (x1000):

а) парафиновый срез первичного очага нейробластомы; б) парафиновый срез метастаза нейробластомы в печень; в, г) метафазные хромосомы, полученные из первичного очага.

Примечательно, что наиболее злокачественные по культурально-морфологическим характеристикам варианты нейробластомы, представленные недифференцированными клетками I-типа, не имели амплификации гена *MYCN*. В то же время, активно пролиферирующие клетки из образцов №3, №4 и №10, содержащие прогениторные и созревающие элементы N- и S-типов, имели амплификацию гена *MYCN*.

Следует так же отметить, что образец №15 (таблица 2), представленный в культуре прекомитированными нейробластами (N-типом клеток) и имеющий низкий уровень клоногенности, на мазке-отпечатке показал наличие амплификации гена *MYCN* в 100% опухолевых клеток.

Кроме того, в 6 случаях (таблица 2) проводился анализ наиболее частой сегментной хромосомной aberrации – делеции локуса 1p36. Это исследование проводилось на интерфазных ядрах и только в 3 случаях на метафазных хромосомах. Делеция локуса 1p36 отсутствовала у двух больных (таблица 2, образцы №3, 9) как в мазках из первичного очага, так и в полученной культуре тканей. В одном же наблюдении (таблица 2, образец №4) делеция выявлялась на мазках опухоли и в интерфазных ядрах культивированных клеток, и отсутствовала в метафазных пластинках (рис. 18).

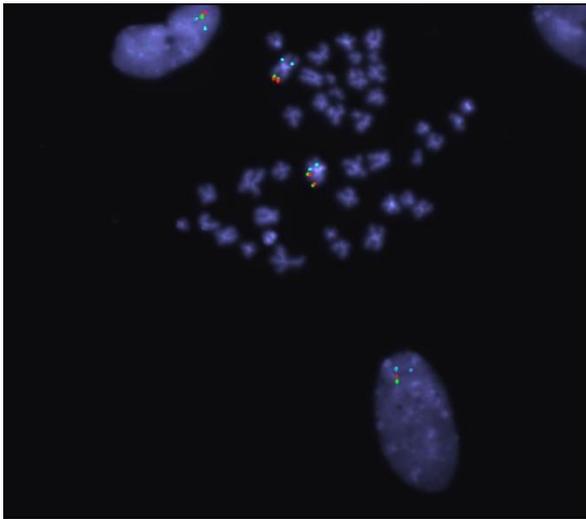


Рисунок 18 - Результат FISH реакции при оценке состояния локуса 1p36 на интерфазных ядрах и метафазных хромосомах культивированных клеток (x630) (зеленый сигнал – теломерная область короткого плеча 1 хромосомы, красный сигнал – локус 1p36, голубой сигнал – референсный участок на длинном плече 1 хромосомы 1q25).

5. Экспрессия белка CRABP1 в нейробластомах

5.1. Изучение экспрессии белка CRABP1 в образцах нейробластомы разной степени дифференцировки и с различными генетическими нарушениями

Изменение экспрессии CRABP1 характерно для ряда новообразований человека, таких как опухоли молочной железы, аденокарцинома эндометрия, немелкоклеточный рак легкого, рак яичников и нейrogenные опухоли, и, по некоторым немногочисленным наблюдениям, может коррелировать с неблагоприятным медицинским прогнозом [17, 52]. Данные об экспрессии белка CRABP1 в опухолях нейробластомы на сегодняшний день в научной литературе отсутствуют, поэтому представлялось чрезвычайно актуальным изучить экспрессию этого белка в образцах нейробластомы разной степени дифференцировки.

Было изучено 40 образцов операционного материала от 39 пациентов с диагнозом нейробластома (операционный материал одного пациента был представлен первичным очагом и метастазом в печень). Возраст пациентов был от 2 месяцев до 20 лет.

Исследование экспрессии белка CRABP1 проводилось методом иммуногистохимии (ИГХ). Результат реакции – окрашивание цитоплазмы опухолевых клеток. В отдельных случаях создавалось впечатление, что продукт реакции выявлялся в ядрах, особенно недифференцированных нейробластов, но более тщательное исследование этого феномена показало, что это простое «закрашивание» ядер излишком продукта.

Интенсивность окрашивания белка CRABP1 колебалась от полного отсутствия продукта реакции до яркой, распространенной окраски цитоплазмы клеток. Отрицательная реакция была характерна для абсолютно незрелых опухолей. Это обычно нейробластомы, строма которых имела ангиоматозный характер с полным отсутствием фибриллярного материала (рис. 19в, е). Реакция оставалась отрицательной и в опухолях с более продвинутой стадией дифференцировки, в которых ангиоматозная строма постепенно замещалась

фибриллярной, либо слегка фиброзированной, однако, в небольшой части более крупноклеточной популяции реакция была положительная, но на уровне мембранной окраски.

С нарастанием процессов созревания число клеток, дающих положительную мембранную реакцию, повышалось (рис. 19б, д). Особенно это относилось к клеткам, строящим трабекулярные структуры. И, наконец, в опухолях, которые по своей морфологии представляли собой, как бы связывающее звено между нейробластомой и ганглионейробластомой (клеточная популяция представлена симпатобластами с намечающимися ядрышками, растущими на фоне большого количества фибриллярного материала), реакция на CRABP1 была положительна почти в 90% клеточной популяции.

В группе ганглионейробластом также выделялись разные фазы созревания. В опухолях, которые по своей структуре были ближе к симпатобластоме, можно проследить динамику нарастания интенсивности окраски от слабой светло-коричневой до темно-коричневой в цитоплазме более крупных клеток. При этом интенсивность окраски была максимальная в зрелых клетках, имеющих нервные отростки. Появление клеток с пузырьковидными ядрами с крупным эозинофильным ядрышком знаменовало окончательное созревание нейробластов и характеризовалось умеренно интенсивной положительной реакцией на CRABP1. Клетки с пикнотическими ядрами давали очень интенсивную реакцию, но, судя по их морфологии, речь шла об артефактах с пассивным накоплением антигена в цитоплазме этих клеток.

В ганглионевромах число зрелых клеточных элементов резко снижалось, сами ганглиозные клетки были крупные, окружены мелкими сателлитными клетками. ИГХ окраска на CRABP1 во всех клетках была положительная, интенсивная (рис. 19а, г). Продукт реакции накапливался и в клетках сателлитов, но, что самое интересное, и в отростках, которые в препаратах, окрашенных гематоксилин-эозином часто не видны. Это обстоятельство представляло интерес и в сугубо диагностическом плане, т.к. при ИГХ окраске на CRABP1 наличие окрашенных отростков давало возможность увидеть и идентифицировать зрелые

нейрогенные элементы среди лимфоидных клеток, которые при обычных окрасках сливались с фоном.

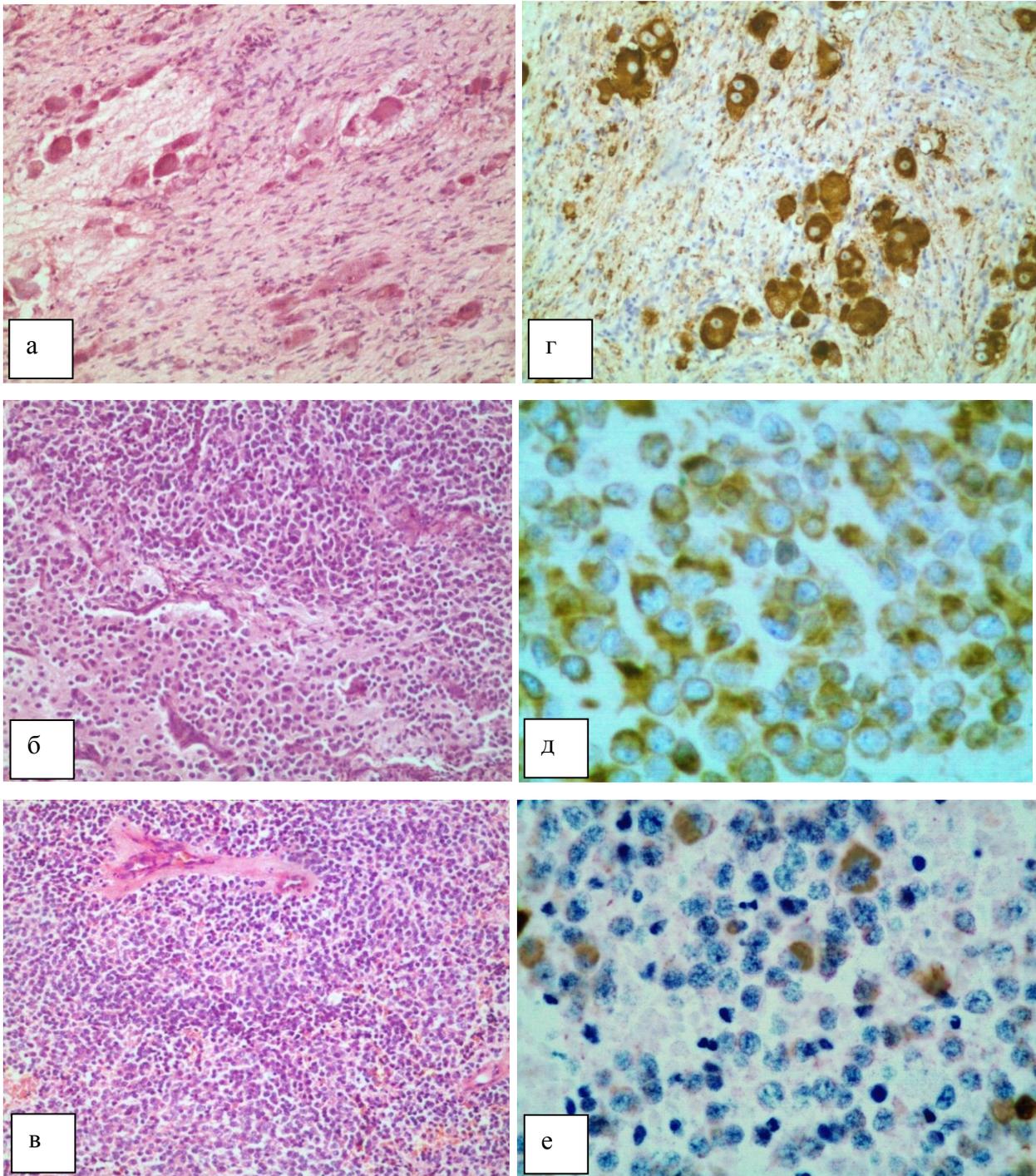


Рисунок 19 - Окраска гематоксилин-эозином нейробластом разной степени дифференцировки (x100) и экспрессия в них белка CRABP1 (x400) а, г) ганглионеврома; б, д) низкодифференцированная нейробластома; в, е) недифференцированная нейробластома

Интересно заметить, что структурная характеристика окрашенного продукта в ганглиозных клетках, своего рода слоистость с чередованием полосок с разной интенсивностью окраски, вызывало сходство с окраской «тигроидного» вещества по Нислю. Являлось ли это формальное сходство отражением метаболизма зрелых нервных клеток, определяющих «тигроидность», сказать трудно, и предметом дальнейшего исследования может быть изучение связи гранулярного эндоплазматического ретикула и синтеза белка CRABP1.

Таким образом, было отмечено, что степень и интенсивность экспрессии белка CRABP1 отличается в нейробластомах разной степени зрелости. Мы получили результат, свидетельствующий о наличии статистически достоверной зависимости между уровнем экспрессии белка CRABP1 и степенью клеточной дифференцировки ($\text{mean}(\text{недифференц.})=53,76$, $\text{mean}(\text{дифференц.})=89,28$; $t=-4,8054$; $p=2,86 \times 10^{-5}$). Более наглядно эти результаты представлены на диаграмме 3.

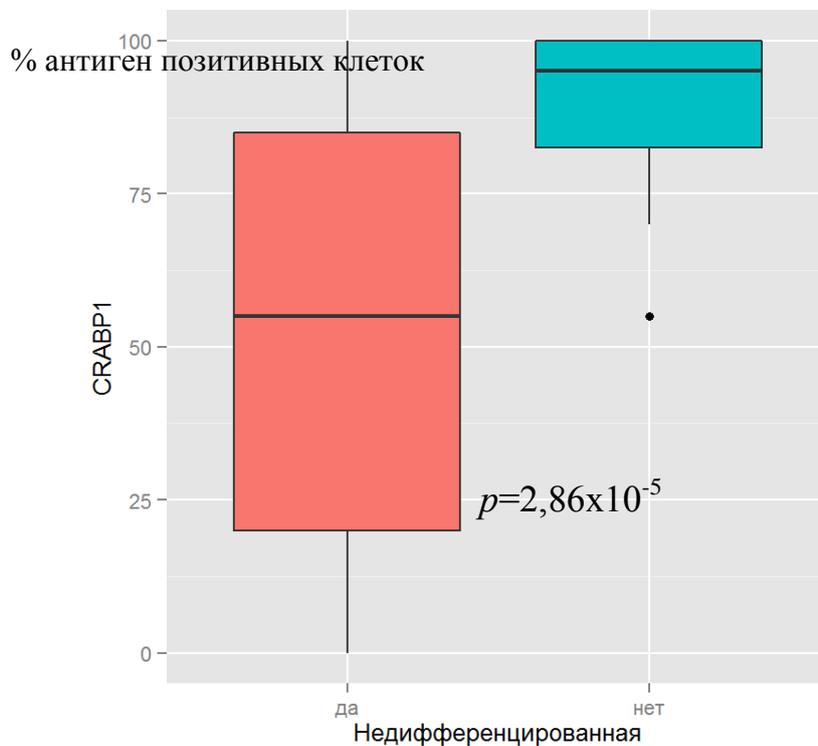


Диаграмма 3 - Зависимость экспрессии белка CRABP1 от уровня клеточной дифференцировки

Т.к. недифференцированные и низкодифференцированные нейробластомы (т.е. незрелые формы) в ряде случаев имеют различные генетические нарушения, такие как амплификация гена *MYCN*, делеция локуса 1p36 на коротком плече хромосомы 1 и делеция длинного плеча хромосомы 11 представлялось чрезвычайно интересным сравнить экспрессию белка CRABP1 в незрелых нейробластомах без генетических нарушений с экспрессией этого же белка в такой же группе нейробластом, но имеющих хромосомные нарушения разного типа.

Из 25 недифференцированных нейробластом в 13 случаях мы обнаружили различные генетические aberrации методом FISH (11 - с амплификацией гена *MYCN*, 2 – с делецией локуса 1p36, 4 – с делецией длинного плеча хромосомы 11), у двух пациентов эти нарушения перекрывались. В связи с небольшой выборкой пациентов было решено не делить пациентов на группы в зависимости от вида хромосомной aberrации, а объединить в одну.

При наличии генетических нарушений среднее значение экспрессии (mean) CRABP1 составило 38,66; при отсутствии 83,92 ($p=8,91 \times 10^{-6}$)

Из представленных данных видно, что уровень экспрессии CRABP1 в недифференцированных нейробластомах имеет статистически достоверную обратную зависимость от наличия генетических нарушений, т.е. при прочих равных условиях в опухолях с генетическими нарушениями в количественном отношении экспрессия ниже, чем в опухолях той же самой степени дифференцировки без генетических нарушений (диаграмма 4).

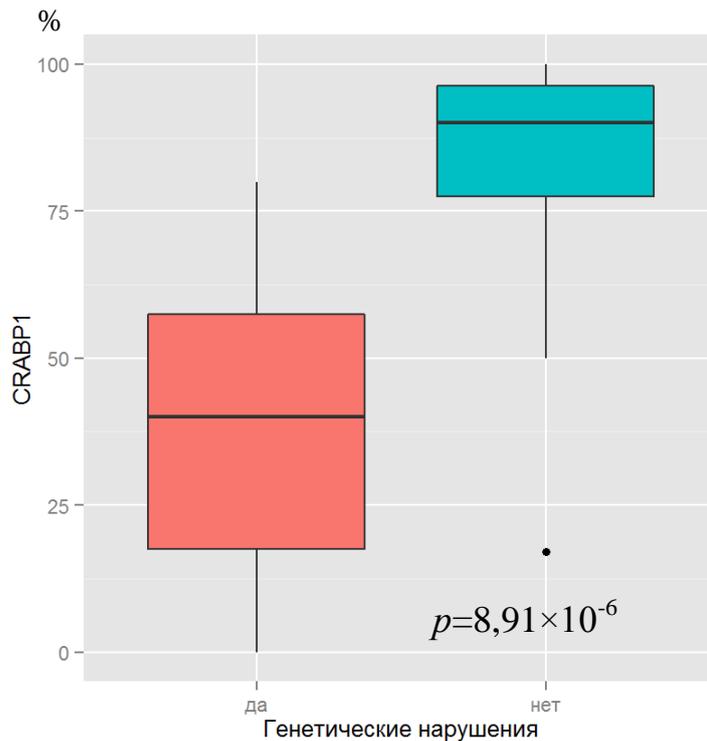


Диаграмма 4 - Зависимость экспрессии белка CRABP1 от наличия генетических нарушений

Значительный интерес представлял собой клинический случай, в котором у пациента в возрасте 2 месяцев (VIa стадия) был отмечен различный уровень экспрессии белка CRABP1 в материале первичного и метастатического очагов: 100% и 70% соответственно. Возможно, этот факт связан с разной степенью дифференцировки опухолевых клеток в первичном очаге и метастазе и отсутствием амплификации гена *MYCN* в первичном очаге (при анализе на парафиновых срезах), и наличием амплификации гена *MYCN* в метастазе нейробластомы в печень.

Помимо вышеизложенного было установлено, что статистически достоверной зависимости между экспрессией белка CRABP1 и возрастом, полом и наличием метастазов у пациентов с нейробластомой не выявлено (график 1, диаграмма 5).

А именно, не обнаружено корреляции между экспрессией белка CRABP1 и возрастом ($r(\text{Спирмена})=0,10$; $p=0,53$).

При наличии метастазов уровень экспрессии CRABP1 не отличался от уровня его экспрессии в группе без метастазов (mean=66,92 и mean=66,30, соответственно; $p=0,95$).

Так же экспрессия CRABP1 не зависела от пола пациента (женский mean=64,95; мужской mean=68,52; $p=0,73$).

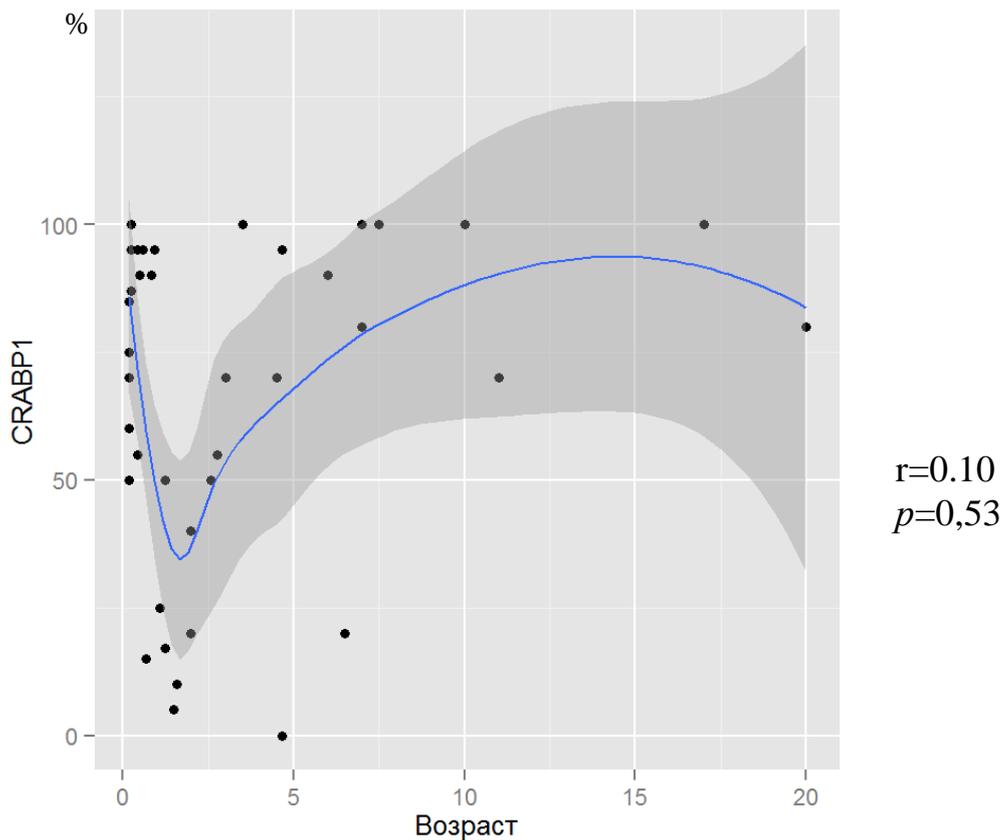


График 1 - Зависимость возраста пациентов с нейробластомой от уровня экспрессии белка CRABP1

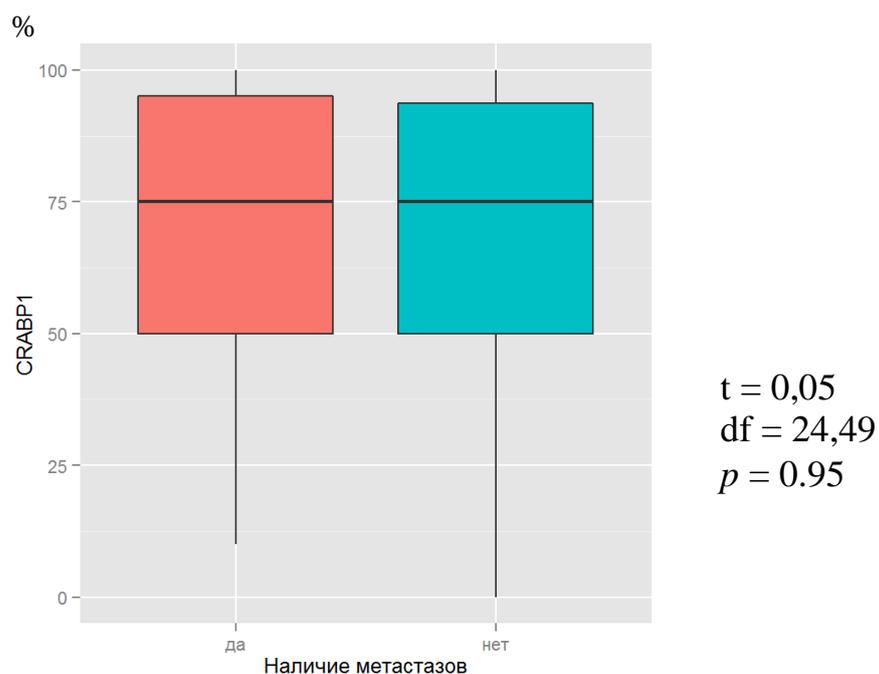
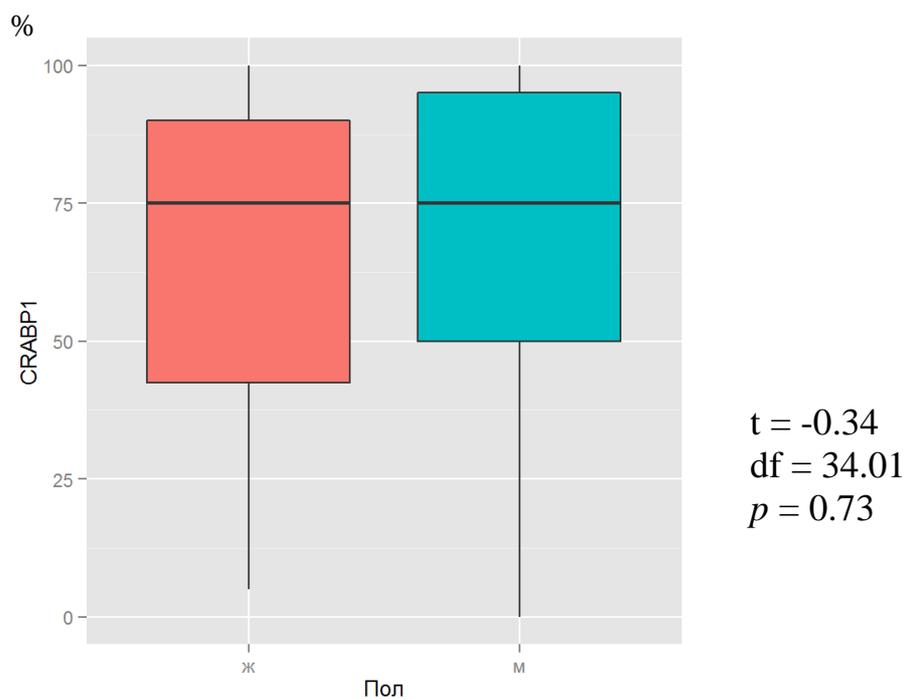


Диаграмма 3 — а) зависимость экспрессии белка CRABP1 от пола пациентов с нейробластомой. б) зависимость экспрессии белка CRABP1 от наличия метастазов у пациентов.

5.2. Изменение экспрессии белка CRABP1 в процессе терапии нейробластомы

Представлял большой интерес вопрос, касающийся экспрессии белка *CRABP1* в процессе терапии нейробластомы. На нашем материале мы располагали случаями параллельных биопсий, проведенных до и после лечения (7 пациентов).

Терапевтические мероприятия включали химиотерапию (ПХТ) по программе низкого, среднего или высокого риска, у одного пациента наряду с ПХТ проводилась лучевая терапия. Естественно, лечению подвергались больные, у которых были недифференцированные формы нейробластомы.

Рассмотрим более подробно эти случаи.

Пациент 1. До лечения имел нейробластому, представленную незрелыми клетками в ангиоматозной строме, с положительной экспрессией продукта гена *CRABP1* в 30-40% клеток.

После лечения в опухолевой ткани обнаруживались выраженные вторичные дистрофические процессы: очаги некроза, отложения солей кальция, гиалиноз стромы, апоптотические тела. Большая часть клеточных элементов претерпела незначительно выраженное созревание. Наблюдались небольшие очаги ганглионейробластомы. Экспрессия *CRABP1* была повышена независимо от вторичных дистрофических изменений, т.е. в этом случае появление и накопление продукта гена *CRABP1* протекало параллельно с выраженными дистрофическими процессами, сопровождающими химиотерапию.

Пациент 2. Первичная опухоль до лечения состояла из продолговатых клеток в ангиоматозной, частично фиброзированной строме. Белок *CRABP1* отсутствовал в цитоплазме опухолевых клеток.

В препаратах после терапии количество незрелых элементов было значительно уменьшено и четко видно созревание опухоли с переходом в ганглионейробластому. Продукт гена *CRABP1* в 100% определялся в зрелых элементах и, кроме того, в значительной части незрелых нейробластов. Причем прослеживалась определенная динамика нарастания интенсивности сигнала и количества продукта по мере увеличения площади цитоплазмы опухолевых клеток.

Пациент 3. До лечения в опухоли экспрессия белка *CRABP1* не определялась.

После лечения опухоль представляла собой низкодифференцированную нейробластому с переходом в ганглионейробластому с большим количеством фибриллярного материала. При ИГХ-реакции наблюдалось легкое мембранное окрашивание, тогда как в крупных клетках ганглионейробластомы реакция была положительной.

Пациент 4. В образце опухоли до лечения трудно было провести грань между недифференцированными нейробластами и лимфоцитами, которые густо инфильтрировали опухолевую ткань из-за чрезвычайной схожести обеих клеточных популяций. Продукт белка *CRABP1* отсутствовал в цитоплазме опухолевых клеток.

После лечения исследование проводилось на метастазе нейробластомы в легкое. Опухоль имела более зрелое строение: опухолевые клетки были крупнее, с более широкой цитоплазмой; наблюдалось большое количество многоядерных гигантов с пузырьковидными ядрами и эозинофильным ядрышком. Фибриллярного межклеточного материала было мало. Выявлялись формирующиеся розетки. На препаратах ИГХ исследования экспрессия белка *CRABP1* наблюдалась в крупных многоядерных клетках, примерно в 10%. В тех клетках, где количество ядер превышало 10-12, цитоплазма не содержала продукта реакции.

Пациент 5. В образцах опухоли до лечения исследуемый белок отсутствовал в участках незрелых нейробластов и определялся только в крупных клетках ганглионейробластомы, особенно в периферических участках цитоплазмы.

После лечения продукт гена *CRABP1* определялся на уровне мембранной окраски в минимальном количестве. Причем интересно отметить, что вторичные, дистрофические процессы опухолевых клеток нигде не были найдены.

Пациент 6. До лечения имел гетерогенное строение опухолевых узлов: опухоль была представлена незрелыми клетками с единичными участками,

содержащими фибриллярный материал со множеством розеток. Продукт белка *CRABP1* в этом случае определялся в цитоплазме опухолевых клеток в 10%.

После лечения степень дифференцировки опухолевых клеток явно повысилась, хотя фибриллярный материал полностью отсутствовал. Появились гигантские многоядерные элементы с дистрофическими изменениями. Продукт ИГХ в целом отсутствовал, за исключением единичных клеток с эксцентрично расположенными ядрами. В этом случае формальные процессы увеличения дифференцировки не сопровождалось накоплением продукта гена *CRABP1*.

Пациент 7. Изначально (до лечения) была совершенно незрелая нейробластома с ангиоматозной стромой с выраженным «плазмацитоидным» характером клеток. При ИГХ исследовании продукт гена *CRABP1* в опухолевых клетках не определялся.

После лечения выявлены участки двух типов (диморфный характер процесса): незрелые без признаков экспрессии белка и зрелые, формирующие участки ганглионейробластомы, в которых идет интенсивное накопление ИГХ продукта.

Полученные данные об экспрессии белка *CRABP1* в нейробластомах до и после проведенной терапии представлены в таблице 6.

Таблица 3 - Экспрессия белка CRABP1 в нейробластомах до и после проведенной терапии и степень клеточной дифференцировки в изученных опухолях

		До лечения, % опухолевых клеток	После лечения, % опухолевых клеток
Пациент 1	Экспрессия CRABP1	30-40	80
	Степень дифференцировки	Низко-дифференцированная	процессы созревания
Пациент 2	Экспрессия CRABP1	0	60
	Степень дифференцировки	недифференцированная	Созревание, формирование структур ганглионейробластомы, ганглионевромы
Пациент 3	Экспрессия CRABP1	10	60-70
	Степень дифференцировки	Симпатобластома с переходом в ганглионейробластому	Появление крупных ганглиозных клеток
Пациент 4	Экспрессия CRABP1	0	30
	Степень дифференцировки	недифференцированная	Небольшое увеличение степени дифференцировки
Пациент 5	Экспрессия CRABP1	0	10
	Степень дифференцировки	Недифференцированная (симпатогониома)	начало созревания
Пациент 6	Экспрессия CRABP1	10-15	0
	Степень дифференцировки	Переход в симпатобластому	Небольшое увеличение степени дифференцировки
Пациент 7	Экспрессия CRABP1	0	5
	Степень дифференцировки	недифференцированная	начало созревания

Обобщая полученные результаты, можно подчеркнуть, что: 1) вторичные посттерапевтические дистрофические изменения в опухолевых клетках не влияют на экспрессию CRABP1; 2) в отдельных случаях происходило увеличение

экспрессии белка CRABP1 в опухолях после лечения по сравнению с первоначальной биопсией. Таким образом, или проведенная химиотерапия помогала отбору клона, способного к дальнейшей дифференцировке, или в результате лечения происходило повышение уровня клеточной дифференцировки, и, как следствие, повышение экспрессии CRABP1.

Из данных, представленных в таблице видно, что при увеличении степени дифференцировки опухоли после лечения происходит увеличение уровня экспрессии белка CRABP1 в опухолевых клетках. Этот феномен можно использовать при составлении общей морфологической характеристики опухоли и для оценки эффективности проведенной терапии.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

На нашей выборке 260 пациентов с нейробластомой установлено, что амплификация гена *MYCN* была выявлена в 16,67% случаев, что сопоставимо с данными International Neuroblastoma Risk Group 2016 года (INRG) (16,30%) [86], но ниже широко цитируемых данных в 20-25% [8, 13, 24, 37, 88, 95].

По нашим данным опухоли с увеличенным количеством гена *MYCN* на 1-4 копии (экстракопии гена) по сравнению с центромерными сигналами составляли 10,00% выборки на мазках-отпечатках и 11,36% на парафиновых срезах, эта расхождение в процентном отношении, возможно, происходит из-за перерезки ядер при приготовлении среза. По литературным данным это соотношение составляло от 6 до 13%. Описанное событие связано с увеличением 2p-области, т.е. короткого плеча хромосомы 2 (2p gain). На коротком плече 2 хромосомы рядом с геном *MYCN* располагаются такие гены как: *ALK*, *DDX1* и *NAG* – т.е. их количество так же увеличивается пропорционально увеличению 2p [37], это нужно принимать во внимание при назначении терапии. Безрецидивная выживаемость у пациентов с нейробластомой с увеличением 2p-области сопоставима с этим параметром у пациентов с амплификацией гена *MYCN* [37], т.е. является неблагоприятным фактором прогноза у пациентов с нейробластомой. Но по данным китайских исследователей [94] у пациентов с нейробластомой, имеющих экстра копии гена *MYCN*, наблюдалась большая общая выживаемость по сравнению с пациентами с нормальным распределением сигналов гена *MYCN*. Поэтому необходимо диагностировать эту сегментную хромосомную aberrацию для понимания поведения этих опухолей и определения дальнейшей тактики лечения.

В результате проведенного определения статуса гена *MYCN* были выявлены разные типы амплификации: в виде двойных ацентрических хромосом (*dmin*) – 26 случаев, гомогенно окрашенных регионов (*HSR*) – 8 случаев и гетерогенный (смешанный) тип (*dmin+HSR*) – 11 случаев. По сути, разные типы амплификации, это хронология процесса амплификации гена. Т.е. первоначально в ядре опухолевой клетки продуцируются ацентричные экстрахромосомные молекулы

ДНК, которые формируют гетерогенные по размеру двойные минихромосомы (dmin) – это начальная стадия амплификации гена *MYCN*. Затем, на более поздней стадии формирования, происходит интеграция этих последовательностей и образуются внутривхромосомные регионы (HSR) амплификации гена. Гетерогенный смешанный тип амплификации, это присутствие в ядре одной клетки или в одной опухоли одновременно двойных циркулирующих минихромосом и интегрированных внутривхромосомных регионов амплификации.

На нашей группе пациентов с амплификацией гена *MYCN* (45 пациентов) можно видеть, что амплификация в виде dmin преобладает у пациентов младше 1 года, в виде HSR – старше года, при смешанном (гетерогенном) типе амплификации (dmin + HSR) не наблюдалось зависимости от возраста пациентов. Наши наблюдения подтверждают хронологию процесса амплификации, и объяснением может быть то, что HSR происходят на более позднем этапе эволюции амплифицированных последовательностей, т.е. чем дольше развивается клон, тем больше вероятность того, что HSR будут преобладающей формой.

Была изучена возможная зависимость между разными типами амплификации гена *MYCN* и гистологическим строением нейробластомы. Так, амплификация в виде dmin и HSR встречалась в 2/3 случаев у пациентов с низкокодифференцированной и недифференцированной нейробластомой и в 1/3 случаев в нейробластомах с тенденцией к созреванию. В случаях с гетерогенным (смешанным) типом амплификации такого распределения не было, такой тип амплификации мы наблюдали только у пациентов с недифференцированными и низкокодифференцированными нейробластомами.

По литературным данным не было выявлено различий между без рецидивной и общей выживаемостью у пациентов с амплификацией гена *MYCN* в виде двойных минихромосом и гомогенно окрашенных регионов, тогда как более низкие показатели выживаемости наблюдались у пациентов с гетерогенным типом амплификации [55, 95]. Этот факт интересен и требует дальнейшего изучения.

В литературе описаны исследования разных типов амплификации (dmin и HSR) *in vitro* на клеточной линии HL-60, полученной из крови больного острым промиелоцитарным лейкозом [55], и было показано, что в опухолевых клетках с разными типами амплификации значительной разницы по интенсивности роста или устойчивости к химиотерапии выявлено не было. Тем не менее, в опухолевых клетках, имеющих амплификацию гена *MYC* в виде гомогенно окрашенных регионов, не наблюдался апоптоз после явления дифференцировки, и после отмены химиопрепарата клетки возвращались в недифференцированное состояние. Это заставляет предположить, что клетки с амплификацией в виде HSR не так восприимчивы к действию дифференцирующих агентов, возможно, из-за развития дополнительных механизмов резистентности [55, 78]. При проведении исследований *in vitro* по изучению двойных ацентричных хромосом (dmin) был отмечен интересный факт, что dmin – нестабильная структура, и она может быть спонтанно или под воздействием лекарств элиминирована (удалена) из ядра. Такое явление мы наблюдали в 3 образцах нейробластомы с амплификацией гена *MYCN* в виде dmin.

В наших исследованиях статуса гена *MYCN* при амплификации в виде dmin, мы отмечали внутриопухолевую гетерогенность копий гена *MYCN*: 1) гетерогенность по степени амплификации (числу сигналов гена *MYCN*) среди клеток одной и той же опухоли; 2) гетерогенность по клеткам с амплификацией.

Теоретически можно утверждать, что даже одна клетка с амплифицированным *MYCN*, остающаяся в организме (в теле), может быть причиной рецидива или прогрессирования. На клиническом опыте показано, что клиническое значение имеет значительно большее число амплифицированных клеток [85]. И кажется маловероятным, что несколько амплифицированных клеток могут оказывать влияние на поведение опухоли, поэтому важно определить пороговое значение амплифицированных клеток. Но существуют работы, показывающие, что амплификация гена, например, *MYC* в единичных очагах при раке предстательной железы может привести в дальнейшем к метастатическому росту опухоли [38]. В случаях с нейробластомой таких данных

нет, и факт определения порогового уровня амплифицированных клеток требует дальнейшего изучения.

Помимо гетерогенности по клеткам с амплификацией наблюдалась гетерогенность по числу амплифицированных сигналов, т.е. разница в количестве копий гена *MYCN* от клетки к клетке. Встречающуюся гетерогенность количества копий гена *MYCN* от клетки к клетке можно объяснить неравномерным разделением двойных минихромосом между дочерними клетками в процессе митоза. По данным литературы у пациентов с 4 стадией нейробластомы клиническая ценность диагностики внутри опухолевой гетерогенности снижается, т.к. все эти пациенты получают интенсивную химиотерапию [55, 69].

В случаях нейробластомы с амплификацией гена *MYCN* в виде двойных ацентрических хромосом (dmin) в 10 случаях мы наблюдали распределение сигналов этого гена по периферии ядра и в 3 случаях элиминацию амплифицированных последовательностей посредством формирования микроядер. Такое явление описано в литературе при проведении исследований *in vitro* по изучению двойных ацентричных хромосом (dmin) [7, 72] и *in vivo* [43, 90]. Размер микроядер в наших наблюдениях был различен в пределах одной опухоли, это сопоставимо с данными других исследователей, т.к. по литературным данным микроядра могут содержать не только амплифицированные последовательности, но также фрагменты ацентричных хромосом или целые поврежденные хромосомы. Помимо этого, в микроядра с dmin может быть включена хромосома 2, это предполагает гипотеза о том, что хромосома 2 локализована в интерфазных ядрах по периферии ядра, и именно ее периферическое положение является предпосылкой для элиминации ДНК из клетки [61]. В наших наблюдениях мы также отметили эту интересную особенность расположения центрального сигнала 2 хромосомы по периферии ядра. Такое явление наблюдалось как в случаях с амплификацией гена *MYCN* в виде двойных минихромосом (dmin) и образованием микроядер, так и с полисомией 2 хромосомы и без амплификации гена *MYCN*. Потеря клеткой амплифицированных последовательностей коррелирует с потерей злокачественных свойств и клеточной дифференцировкой. Таким образом,

стимулируя процесс удаления (элиминации) амплифицированных последовательностей из ядра (например, гидроксимочевиной) путем образования микроядер, можно уменьшить агрессивные свойства опухоли и хеморезистентность, обусловленную наличием амплификации гена *MYCN*.

Полученные нами результаты свидетельствуют о целесообразности пересмотра значения метода тканевых культур в диагностическом процессе современной онкоморфологии, по крайней мере, у больных с нейробластомами. Одним из практически важных преимуществ метода культивирования является возможность селекции и размножения клеток с высоким пролиферативным потенциалом *in vitro*, которые, согласно современным представлениям, являются основными для процесса генеза и прогрессии опухоли [40, 50, 51].

При этом, результативность процесса культивирования, при соблюдении всех методических требований напрямую зависит от содержания пролиферативно активных стволовых/прогениторных элементов в посевном материале и, соответственно, должна находиться в прямой корреляции со степенью злокачественности опухолевого процесса [2, 51].

Описано 3 основных типа клеток, высевающихся из операционных образцов, биоптатов и коллекционных клеточных линий нейробластомы. Это, N-, S- и I- морфологически и биохимически различающиеся типы клеток.

Сильно связанные с поверхностью субстрата, распластанные клетки S-типа по биохимическим характеристикам относят к созревающим предшественникам шванновских глиоцитов. S-клетки – наиболее дифференцированный тип элементов нейробластомы, не способный к пролиферации и имеющий тенденцию к трансформации в зрелые шванновские клетки. В некоторых работах по цитологической характеристике клеток S-типа среди возможных направлений дифференцировки выделяют меланоцитарное направление и гладкомышечные клетки [57, 81]. В нашем исследовании, в процессе развития первичных культур и особенно при дальнейшем субкультивировании пролиферирующих клеток нейробластомы, мы также отмечали развитие популяций морфологических типов клеток, имеющих характерные признаки этих направлений дифференцировки.

Клетки N-типа представляют собой прогениторные элементы нейроцитов адrenaлового отдела вегетативной нервной системы. Как было отмечено, нейробласты часто образуют сфероидные тела, способные закрепляться на тропных субстратах с помощью отростков. N-клетки обладают пролиферативным потенциалом и могут образовывать опухолевые новообразования и формировать отдаленные метастатические очаги [93]. Встречающееся в онкологической практике спонтанное созревание нейробластомы, состоящей из клеток N-типа приводит к образованию доброкачественной опухоли - ганглионевромы, состоящей из зрелых симпатoadrenalовых ганглионейроцитов (см. «Результаты», табл. 2, образцы №5, 13, 16).

В работах зарубежных авторов отмечается, что I-клетки способны к спонтанной или индуцированной дифференцировке в направлении N- и S-типов [66, 93]. В нашей работе мы показали присутствие дифференцированных типов клеток в первичных культурах операционных образцов нейробластомы и различную возможность I-клеток из этих образцов к дифференцировке по направлению и интенсивности. При этом, пул дифференцированных клеток различной степени зрелости мог широко варьировать от долей процента (нейробластомы высокой степени злокачественности) до 100% (созревающие и доброкачественные опухоли). I-тип клеток может быть отнесен к наименее дифференцированным опухолевым клеткам на уровне тканевых стволовых клеток. Клетки N- и S-типов, в свою очередь, могут быть отнесены к прогениторным и созревающим элементам [57].

На примере наших исследований видно, что культура нейробластомы - чрезвычайно информативная модель с позиций применимости к клиническим задачам, т.к. при культивировании были получены клетки, которые позволили нам судить о направленности и возможности дифференцировки опухолевых клеток, но при этом культура тканей полностью не отражала морфологию всей опухоли.

Обнаружено, что наибольший пролиферативный потенциал *in vitro* и туморогенность на тимусэктомированных мышах демонстрируют клетки

промежуточного I (intermediate)-типа. Оказалось, что именно эти клетки, имеющие мезенхимальную морфологию, обладают плюропотентными свойствами, экспрессируют антигены эмбриональных нервных клеток и обеспечивают наибольшую степень злокачественности опухолевого материала [65]. Представленные в литературе данные [93] доказывают наличие четкой взаимосвязи между морфологическими и биохимическими характеристиками клеток нейробластомы, соответствующими I-типу, и способностью вызывать опухолевый рост у тимусэктомированных мышей, что в 7 раз превышает аналогичный показатель для клеток N-типа.

Многочисленные исследования показывают, что присутствие и величина пула клеток I-типа, экспрессирующих маркеры стволовых клеток, обеспечивают высокий уровень злокачественности опухоли, выражающейся в устойчивости к терапии, скоростью опухолевой прогрессии и метастазирования [32, 34, 64, 93]. В нашем исследовании одновременного культивирования материала первичного и метастатического (лимфатический узел) очагов нейробластомы, можно наблюдать, что в культуре первичного очага образовались две рыхлые медленно растущие колонии дифференцированных клеток S-типа (пониженного уровня клоногенности), тогда как в метастатическом очаге образовались 5-7 рыхлых колоний, клеточный состав которого был представлен распластанными, отростчатыми клетками S-типа и I(S)-клетками (повышенного уровня клоногенности). Т.е. клеточный состав первичного и метастатического очагов был различен и отличался в сторону понижения степени дифференцировки, увеличения подвижности опухолевых клеток (способности к метастазированию) и повышения уровня клоногенности.

Таким образом, в нашем исследовании мы показали, что образцы операционного материала, обогащенные субпопуляцией клеток, культурально-морфологически определяемой как клетки I-типа, демонстрировали высокий пролиферативный потенциал *in vitro*, т.е. имели высокий уровень клоногенности.

Поэтому кажется вполне обоснованным предложение [93] использовать количественное распределение I-клеток в качестве прогностического признака у больных нейробластомой.

Особо следует отметить ряд результатов, касающихся использования тканевых культур для проведения FISH-реакции. Принципиально важно то обстоятельство, что результаты FISH-реакции, проведенной на тканевой культуре, не только совпали с результатами, проведенными на парафиновых срезах, но и в отдельных случаях превзошли их по точности, и, самое главное, дали много деталей, невидимых на срезах, таких как присутствие двойных ацентрических хромосом, наличие амплификации на одной хромосоме, при которой в интерфазных ядрах признаки амплификации не выявлялись. Интересен факт отсутствия амплификации гена *MYCN* в первичном очаге у пациента с диссеминированной нейробластомой и наличием амплификации у этого же пациента в метастазе в печень. При этом на культуре клеток мы видели амплификацию гена *MYCN* только на одной из пары вторых хромосом. Не является ли этот феномен отражением ранней стадии увеличения числа копий генов, не улавливаемых на интерфазных ядрах первичного очага? Тогда как на метастазе мы наблюдали клон клеток, обладающий более злокачественным потенциалом. Из наших наблюдений следует, что необходимо (по возможности) определять статус гена *MYCN* не только на образцах первичного очага, но и на метастазах.

Представленные выше данные показывают, что преимущественным способом амплификации, выявленном в геномах клеток первичных культур нейробластом, была локальная внутрихромосомная амплификация в районе исходной локализации протоонкогена. Наблюдаемые изменения, могут приводить к повышенной экспрессии гена *MYCN* с нарушением созревания нейробластов и формированием опухолевых новообразований [21, 75, 76, 79].

При этом следует с осторожностью относиться к трактовке тех случаев, когда отсутствует амплификация на метафазных пластинках. Не все делящиеся клетки являются опухолевыми. Митотически могут делиться и неопухолевые

клетки, поэтому не надо любую митотическую фигуру особенно в тканевой культуре расценивать как неопластический элемент.

Вместе с тем, ряд авторитетных исследователей экспериментально опровергают прямую зависимость степени туморогенности опухолевых линий нейробластомы и уровня повышенной экспрессии *MYCN* в клетках этих линий, поскольку наибольшая концентрация продукта этого гена и, соответственно, показатели амплификации наблюдаются в клетках N-типа (зрелых клетках) [11]. В нашей работе мы также показали отсутствие амплифицированного статуса *MYCN* у наиболее клоногенных образцов нейробластомы, представленных клетками I-типа.

Особо хочется задержаться на феномене отсутствия амплификации в I-клетках при нейробластоме. Теоретически этот феномен хорошо объясним, но для того чтобы его использовать при диагностике надо решить важный вопрос – вызреют ли эти клетки у данного больного, и, возможно, потом возникнет амплификация гена *MYCN*? Есть интересное сообщение о появлении амплификации в клетках промежуточного типа между I- и N-типами. Возможно, амплификация гена *MYCN* происходит на определенном этапе созревания нейробласта [93].

Что же касается, прогностической ценности определения статуса *MYCN*, то последний, по всей видимости, очень важен для оценки вероятности спонтанного разрешения опухолевого процесса, который оказывается практически блокированным гиперэкспрессией транскрипционного фактора *MYCN* при амплифицированном состоянии протоонкогена [19, 68, 76].

Тканевые культуры помогают избежать ложно положительных результатов при оценке делеций локуса 1p36.

Все исследованные образцы нейробластомы относятся либо к низкому, либо к высокому уровню клоногенности. Последнее, очевидно, связано с наличием значительного пула стволовых элементов I-типа в посевном материале опухоли, что характерно для опухолей эмбрионального типа.

Проведенные нами исследования и полученные при этом результаты дают основание для рекомендации метода культивирования опухолевых клеток в комплексной диагностике опухолей. На современном этапе онкоморфологии полученный в процессе культивирования клеточный материал может быть использован для проведения дополнительных цитологических, цитогенетических, молекулярно-биологических и биохимических исследований, а также для определения адекватной, таргетной терапии данного опухолевого процесса.

В настоящее время роль белка CRABP1 в канцерогенезе, прогрессии опухоли, опухолевой дифференцировкой остается неясной. Исследования по этой теме, проведенные разными группами ученых, предоставили противоречивые данные об экспрессии белка CRABP1 и его участии в патогенезе злокачественных новообразований человека.

С одной стороны, ряд эпителиальных опухолей характеризуется пониженной экспрессией CRABP1. Например, при почечно-клеточном раке наблюдается выраженное снижение продукции мРНК белка CRABP1 в опухоли по сравнению с таковым в неизмененных тканях [63]. Активное снижение экспрессии CRABP1 наблюдается при папиллярной карциноме щитовидной железы, при этом белок рассматривают как потенциальный биомаркер опухолей данного гистологического типа [33]. Было показано, что снижение экспрессии белка CRABP1 может использоваться как прогностический маркер для серозной и светлоклеточной карциномы яичника. При этих опухолях общая и без рецидивная выживаемость были значительно меньше в группе с низким уровнем экспрессии CRABP1 по сравнению с такими же опухолями, в которых экспрессия сохранялась, вне зависимости от стадии болезни [52]. При плоскоклеточном раке пищевода отсутствие иммунореактивности к CRABP1 ассоциировано со снижением дифференцировки клеток опухоли и отдаленным лимфогенным метастазированием [84].

С другой стороны, в ряде новообразований человека экспрессия CRABP1 повышается и зачастую четко коррелирует со злокачественным фенотипом опухоли. Так, для эндометриоидного рака яичника характерно более чем 100-

кратное повышение количества мРНК CRABP1 [9]. В аденокарциномах эндометрия экспрессия CRABP1 ассоциирована с высоким уровнем инвазивности, а также с низкой степенью дифференцировки опухолевых клеток. Повышенная экспрессия CRABP1 – неблагоприятный прогностический фактор при новообразованиях головного мозга [17]. Было также показано, что высокий уровень экспрессии CRABP1 ассоциирован с гистологической дифференцировкой и наличием регионарных и отдаленных метастазов при нейроэндокринных опухолях [1, 41].

Исследования, посвященные изучению экспрессии белка CRABP1 при нейробластомах, актуальны, если, во-первых, принять во внимание, что изменение экспрессии этого белка является прогностическим маркером в ряде опухолей; во-вторых - данные об экспрессии белка CRABP1 в нейробластомах на сегодняшний день в научной литературе отсутствуют; и, в третьих - терапия ретиноевой кислотой представляет собой один из первых и, безусловно, ярких примеров успешной генонаправленной дифференцировочной терапии.

В нашей работе мы продемонстрировали, что экспрессия белка CRABP1 зависит от уровня клеточной дифференцировки, т.е. в недифференцированных и низкодифференцированных нейробластомах экспрессия этого белка была ниже, чем в созревающих и зрелых опухолях, ганглионейробластомах и ганглионевромах. Подобная зависимость была отмечена и при карциномах яичника. В нормальной ткани яичников экспрессия CRABP1 была больше, чем в клетках карциномы. Это по-видимому связано с дедифференцировкой клеток карциномы. Исходя из этого, подразумевается, что нормальное функционирование белка CRABP1 поддерживает дифференцировку клеток яичника, а уменьшение его экспрессии может привести к сбою в дифференцировке, т.е. дедифференцировать опухолевые клетки. В результате чего наблюдались ранний рецидив и уменьшение общей выживаемости [52].

Мы показали также, что уровень экспрессии CRABP1 коррелирует с отсутствием генетических нарушений в опухолевых клетках (таких как амплификация гена *MYCN*, делеции локусов 1p36 и 11q23), т.е. в группе незрелых

нейробластом с генетическими aberrациями экспрессия белка CRABP1 была снижена по сравнению с опухолями без хромосомных нарушений. Полученные данные не противоречат друг другу, т.к. нейробластомы с амплификацией гена *MYCN* являются, как правило, недифференцированными или низкодифференцированными опухолями с высоким митотическим индексом и классифицируются как неблагоприятная гистологическая группа [58]. Делеция 1p36 часто выявляется также в недифференцированных и бедных стромой нейробластомах [6].

В последней части нашего исследования были проведены сравнительные анализы экспрессии белка CRABP1 до и после проведенной терапии. Уникальной чертой нейробластомы является способность к дифференцировке. При проведении исследований *in vitro* было доказано, что этот процесс способны индуцировать различные агенты: ретиноевая кислота, так называемый, фактор роста нервной ткани, некоторые цитостатики, папаверин [39, 60]. Таким образом, в процессе химиотерапии зачастую происходит повышение дифференцировки опухолевых клеток, отсюда и усиление экспрессии белка CRABP1 в опухоли после проведенного лечения. В подобных случаях уровень экспрессии этого белка может служить дополнительным маркером для более точной оценки дифференцировки опухолевых клеток до и после лечения.

Проведенное исследование является первой работой по изучению экспрессии белка CRABP1 в нейробластомах, ее связи с уровнем дифференцировки опухоли и оценки эффекта проведенной терапии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенного определения статуса гена *MYCN* были выявлены разные типы амплификации: в виде двойных ацентрических хромосом (*dmin*), гомогенно окрашенных регионов (*HSR*) и гетерогенный (смешанный) тип (*dmin+HSR*), отражающие хронологию процесса амплификации гена.

Была изучена возможная зависимость между разными типами амплификации гена *MYCN* и гистологическим строением нейробластомы.

Полученные нами результаты свидетельствуют о целесообразности пересмотра значения метода тканевых культур в диагностическом процессе современной онкоморфологии, по крайней мере, у больных с нейробластомами.

Особо следует отметить преимущества использования тканевых культур для проведения FISH-реакции. Принципиально важно то обстоятельство, что результаты FISH-реакции, проведенной на тканевой культуре, не только совпали с результатами, проведенными на парафиновых срезах, но и в отдельных случаях превзошли их по точности, и, самое главное, дали много деталей, невидимых на срезах.

Проведенные нами исследования и полученные при этом результаты дают основание для рекомендации метода культивирования опухолевых клеток в комплексной диагностике опухолей.

Проведенное исследование является первой работой по изучению экспрессии белка *CRABP1* в нейробластомах, ее связи с уровнем дифференцировки опухоли и оценки эффекта проведенной терапии.

ВЫВОДЫ

1. Многообразие клинического течения нейробластомы у детей может быть изучено комплексом методик, включающих в себя: определение статуса гена *MYCN* методом метафазной FISH, изучение типов клеток нейробластомы методом первично-тканевых культур, иммуногистохимическое изучение белков, связанных с обменом ретиноевой кислоты.
2. Нейробластома сопряжена в 16,67% с амплификацией гена *MYCN* и в 11,36% случаев с наличием дополнительных копий этого гена.
3. Определено 3 типа амплификации гена *MYCN* в клетках нейробластомы: 57,78% в виде двойных ацентрических хромосом, 17,78% в виде гомогенно окрашенных регионов, 24,44% смешанный тип – отражающие хронологию процесса амплификации в динамике.
4. Амплификация гена *MYCN* в виде двойных ацентрических хромосом преобладала у пациентов младше года, в виде гомогенно окрашенных регионов у пациентов старше года.
5. Опухолевые клетки нейробластомы способны удалять лишний генетический материал из ядра путем образования микроядер – экстрезией.
6. Метод метафазных пластинок является ценным дополнением в определении статуса гена *MYCN* поскольку помогает улавливать ранние признаки амплификации гена в виде амплификации на одной из пары 2-х хромосом.
7. Наличие амплификации гена *MYCN*, высокий уровень клоногенности, преобладание I-типа клеток, отсутствие экспрессии белка CRABP1 – составляют прогностически неблагоприятный комплекс.
8. Экспрессия белка CRABP1 зависит от уровня клеточной дифференцировки, в созревающих и зрелых опухолях экспрессия этого белка была выше. Экспрессия гена CRABP1 сопряжена с созреванием опухоли и косвенно свидетельствует об эффективности проведенной терапии.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

MYCN - клеточный протоонкоген семейства транскрипционных факторов

FISH – флуоресцентная *in situ* гибридизация

HSR – (homogeneous stain region) гомогенно окрашенные регионы

dmin – (double minute) двойные ацентричные хромосомы

CRABP1 – белок, участвующий в связывании ретиноевой кислоты

ИГХ – иммуногистохимия

MYCN – белок, продукт протоонкогена *MYCN*

РК – ретиноевая кислота

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Делекторская, В.В. Экспрессия белка, связывающего ретиноевую кислоту, и пролиферативная активность клеток в нейроэндокринных опухолях поджелудочной железы / В.В Делекторская, Г.Ю. Чемерис, Я.А Каинов и др. // Молекулярная медицина. - 2013. - №1. - С. 38-43.
2. Чиссов, В.И. Стволовые (клоногенные) клетки злокачественных опухолей: возвращаясь к полученным данным. / В.И. Чиссов, Н.С. Сергеева, И.К Свиридова и др. // Российский биотерапевтический журнал. – 2006. - Т. 5. - №2. С. 7-12.
3. Acosta, S. Comprehensive characterization of neuroblastoma cell line subtypes reveals bilineage potential similar to neural crest stem cells. / S. Acosta, C. Lavarino, R. Paris et al // BMC Developmental Biology. – 2009. - Vol 9. - No. 12. P 1-14.
4. Ambros, P.F. International consensus for neuroblastomamolecular diagnostics: report from the International Neuroblastoma Risk Group (INRG) Biology Committee. / P.F. Ambros, I.M. Ambros, G.M. Brodeur, M. Haber et al // British J of Cancer. – 2009. - Vol. 100. P 1471-1482.
5. Ambros, I.M. Morphologic features of neuroblastoma (Schwannian stroma-poor tumors) in clinically favorable and unfavorable groups. / I.M. Ambros, J. Hata, V.V. Joshi et al // Cancer. – 2002. - Vol. 94. - No. 5, P 1574-1583.
6. Ambros, I.M. Tyrrole of ploidy, chromosome 1p, and Schwann cells in the maturation of neuroblastoma. / I.M Ambros, A. Zellner, B. Roald et al // N Engl J Med. – 1996. - Vol 334, - No. 23, - P 1505-1511.
7. Ambros, I.M. Neuroblastoma cells can actively eliminate supernumerary MYCN gene copies by micronucleus formation – sign of tumor cell revertance / I.M. Ambros, S. Rumpler, A. Luegmayr et al // Eur J Cancer. – 1997. - Vol 33, - No. 12, - P 2043-2049.
8. Attiyeh, E.F. Chromosome 1p and 11q deletions and outcome in neuroblastoma. / E.F. Attiyeh, W.B. London, Y.P. Mosse et al // N Engl - J Med. – 2005. - Vol. 353 - No. 24, - P 2243-2253.
9. Banz, C. The molecular signature of endometriosis-associated endometrioid ovarian cancer differs significantly from endometriosis-independent endometrioid

ovarian cancer. / C. Banz, U. Ungethuem, R.J Kuban et al // Fertil Steril. – 2010. - Vol. 94, - No. 4, - P 1212-1217.

10. Beckwith, J.B. In situ neuroblastomas: a contribution to the natural history of neural crest tumors. / J.B Beckwith, E.V Perrin // Am J Pathol. – 1963. - Vol. 43, - No. 6, - P 1089-1104.

11. Bian, X. NF- κ B activation mediates doxorubicin-induced cell death in N-type neuroblastoma cells. / X. Bian, L.M. McAllister-Lucas, F. Shao, et al // J Biol Chemistry. – 2001. - Vol. 276, - No. 52, - P 48921-48929.

12. Bogen, D. The genetic tumor background is an important determinant for heterogeneous MYCN-amplified neuroblastoma / D. Bogen, C. Brunner, D. Walder et al // Int J Cancer. – 2016. - Vol. 139, - P 153-163.

13. Brodeur, G.M. Mechanisms of neuroblastoma regression. / G.M. Brodeur, R. Bagatell // Nat Rev Clin Oncol. – 2014. - Vol. 11, - No. 12, - P 704-713.

14. Campbell, K. Association of *MYCN* copy number with clinical features, tumor biology, and outcomes in neuroblastoma: a report from the children's oncology group. / K. Campbell, J.M. Gastier-Foster, M. Mann, et al // Cancer. – 2017. - Vol. 00 - P. 1-12.

15. Caren, H. High-resolution array copy number analyses for detection of deletion, gain, amplification and copy-neutral LOH in primary neuroblastoma tumors: Four cases of homozygous deletions of the *CDKN2A* gene. / H. Caren, J. Erichsen, L. Olsson et al // BMS Genomics. – 2008. - Vol. 9, - P 353.

16. Cetinkaya, C. Age dependence of tumor genetics in unfavorable neuroblastoma: arrayCGH profiles of 34 consecutive cases, using a Swedish 25-year neuroblastoma cohort for validation. / C. Cetinkaya, T. Martinsson, J. Sandren // BMS Cancer. – 2013. - Vol. 13 - P 231.

17. Chile, T. Expression of CRABP1, GRP, and RERG mRNA in clinically non-functioning and functioning pituitary adenomas. / T. Chile, M.L. Corrêa-Giannella, M.A. Fortes et al // J Endocrinol Invest. – 2011. - Vol. 34 - No. 8 - P 214-218.

18. Cohn, S.L. The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) Classification System: an INRG task force report / S.L. Cohn, A.D.J. Pearson, W.B. London et al // Journal of Clinical Oncology.- 2009.- Vol. 27- No. 2 - P 289-297.

19. Cohn, S.L. *MYCN* amplification remains prognostically strong 20 years after its “clinical debut” / S.L. Cohn, D.A. Tweddle // *Eur J of Cancer*. – 2004. - Vol. 40 - P 2639-2642.
20. Collins, C. Dynamic regulation of retinoic acid-binding proteins in developing, adult and neoplastic skin reveals roles for beta-catenin and Notch signaling. / C. Collins, F. Watt // *Dev. Biol.* - 2008 Vol 324 - No. 1 - P 55-67.
21. Cooper, M.J. Human neuroblastoma tumor cell lines correspond to the arrested differentiation of chromaffin adrenal medullary neuroblasts. / M.J Cooper, G.M. Hutchins, P.S. Cohen et al // *Cell Growth Differ.* – 1990. - Vol. 1, - No. 4 - P 149-159.
22. Cozzi, D.A. Long-term follow-up of the “Wait and See” approach to localized perinatal adrenal neuroblastoma. / D.A. Cozzi, E. Mele, S. Ceccanti et al // *World J Surg.* – 2013. - Vol. 37, - P 459-465.
23. Cushing, H. The transformation of a malignant paravertebral sympathicoblastoma into a benign ganglioneuroma. / H. Cushing, S.B. Wolbach // *Am J Pathol.* – 1927. - Vol. 3, - No. 3, - P 203-217.
24. El-Sayed, M.I. Treatment results and prognostic factors of pediatric neuroblastoma: a retrospective study. / M.I. El-Sayed, A.M. Ali, H.A. Sayed, E.M. Zaky. // *International Archives of Medicine.* - 2010 Vol. 3, - No. 37, - P 1-8.
25. Everson, T.C. Spontaneous regression of cancer: preliminary report. / Cole W.H. // *T.C. Everson, Ann Surg*, Vol. 144, No. 3, 1956, P 366-380.
26. Everson, T.C. Spontaneous regression of neuroblastoma. In: / T.C. Everson, W.H. Cole // *Spontaneous Regression of Cancer*. Philadelphia, Pa: WB Saunders; 1966: P 88.
27. Fredlund, E. High Myc pathway activity and low stage of neuronal differentiation associate with poor outcome in neuroblastoma. / E. Fredlund, M. Ringner, J.M. Maris et al // *PNAS.* – 2008. - Vol. 105, - No. 37, - P 14094-14099.
28. Fritsch, P. “Wait and See” strategy in localized neuroblastoma in infants: an option not only for cases detected by mass screening. / P. Fritsch, R. Kerbl, H. Lackner, C. Urban // *Pediatr Blood Cancer.* – 2004. - Vol. 43, - P 679-682.
29. Georg, R.E. Hyperdiploidy plus nonamplified *MYCN* confers a favorable prognosis in children 12 to 18 months old with disseminated neuroblastoma: a pediatric

oncology group study / R.E. Georg, W.B. London, S.L. Cohn et al // Journal of Clinical Oncology – 2005. -Vol. 23 - No 27 - P 6466-6473.

30. Gilbert, F. Human neuroblastomas and abnormalities of chromosomes 1 and 17. / F. Gilbert, M. Feder , G. Balaban et al // Cancer research. – 1984. - Vol. 44, P 5444-5449.

31. Gustafson, W.C. Myc proteins as therapeutic targets / W.C. Gustafson, W.A. Weiss // Oncogene. – 2010. - Vol. 29, - No 9, - P – 1249-1259.

32. Hansford, L.M. Neuroblastoma cells isolated from bone marrow metastases contain a naturally enriched tumor-initiating cell. / L.M. Hansford, A.E. McKee, L. Zhang et al // Cancer Res. – 2007. - Vol. 67, - No. 23, - P 11234-11243.

33. Hawthorn, L. TIMP1 and SERPIN-A overexpression and TFF3 and CRABP1 underexpression as biomarkers for papillary thyroid carcinoma. / L. Hawthorn, R. Stein // Head Neck. – 2004. - Vol. 26, - No. 12, - P 1069-1083.

34. Hirschmann-Jax, C. A distinct “side population” of cells with high drug efflux capacity in human tumor cells. / C. Hirschmann-Jax, M.K. Brenner, A.E. Foster et al // PNAS. – 2004. - Vol. 101, - No. 39, - P 14228-14233.

35. Hiyama, E. Correlating telomerase activity levels with human neuroblastoma outcomes. / E. Hiyama, K. Hiyama, T. Yokoyama et al // Nat Med. – 1995. - Vol. 1, - No. 3, - P 249-55.

36. Iehara, T. Is the prognosis of stage 4s neuroblastoma in patients 12 months of age and older excellent? / T. Iehara, E. Hiyama, T. Tajiri et al // Eur J Cancer. – 2012. - Vol. 48, - No. 11, - P 1707-1712.

37. Jeison, M. 2p24 gain region harboring *MYCN* gene compared with *MYCN* amplified and nonamplified neuroblastoma. / M. Jeison, S. Ash, G. Halevy-Berko et al // American Journal of Pathology. – 2010. - Vol 176, - No. 6, - P 2616-2625.

38. Jenkins, R.B. Detection of c-myc oncogene amplification and chromosomal anomalies in metastatic prostatic carcinoma by fluorescence *in situ* hybridization. / R.B. Jenkins, J. Qian, M.M. Lieber, et al // Cancer Research. – 1997. - Vol 57, - P 524-531.

39. Jogi, A. Cancer cell differentiation heterogeneity and aggressive behavior in solid tumors. / A. Jogi, M. Vaapil, M. Johansson, et al // *Upsala J Med Sci.* – 2012. - Vol 117, - P 217-224.
40. Jordan, C.T. Cancer stem cells. / C.T. Jordan, M.L. Guzman, M. Noble // *N Engl J Med.* – 2006. - Vol. 355, - No. 12, - P 1253-1261.
41. Kainov, Y. CRABP1 provides high malignancy of transformed mesenchymal cells and contributes to the pathogenesis of mesenchymal and neuroendocrine tumors. / Y. Kainov, I. Favorskaya, V. et al // *Cell Cycle.* – 2014. - Vol 13(10), - P 1530-1539.
42. Kinnier, L.M. Neuroblastoma, its natural history and prognosis: a study of 487 cases. / Kinnier, L.M. Wilson, G.J. Draper // *Br Med J.* – 1974. - Vol. 3, - No. 3, - P 301-307.
43. Kryh, H. Comprehensive SNP array study of frequently used neuroblastoma cell lines; copy neutral loss of heterozygosity is common in the cell lines but uncommon in primary tumors. / H. Kryh, H. Caren, J. Erichsen, et al // *BMS Genomics.* – 2011. - Vol. 12, - P 443.
44. Lastowska, M. Comprehensive genetic and histopathologic study reveals three types of neuroblastoma tumors. / M. Lastowska, C. Cullinane, S. Variend et al // *J Clin Oncol.* – 2001. - Vol. 19, - No. 12, - P 3080-90.
45. Ladenstein, R. Prognostic significance of DNA di-tetraploidy in neuroblastoma. / R. Ladenstein, I.M. Ambros, U. et al // *Med Pediatr Oncol.* – 2001. - Vol. 36, - No. 1, - P 83-92.
46. London, W.B. Evidence for an age cutoff greater than 365 days for neuroblastoma risk group stratification in the children's oncology group. / W.B. London, R.P. Castleberry, K.K. Matthay et al // *J Clin Oncol.* – 2005. - Vol.23, - No. 27, - P 6459-6465.
47. Look, A.T. Clinical relevance of tumor cell ploidy and N-myc gene amplification in childhood neuroblastoma: a Pediatric Oncology group study. / A.T. Look, F.A. Hayes, J.J. Shuster et al // *J Clin Oncol.* – 1991. - Vol. 9, - No. 4, - P 581-591.
48. Maris, J.M. Recent Advances in neuroblastoma. // *N Engl J Med.* – 2010. - Vol. 362, - No. 23, - P 2202-2211.

49. Matsunaga, T. Enhanced expression of N-myc messenger RNA in neuroblastomas found by mass screening. / T. Matsunaga, H. Shirasawa, T. Hishiki et al // Clin Cancer Res. – 2000. - Vol. 6, - P 3199-3204.
50. Mimeault, M. Functions of tumorigenic and migrating cancer progenitor cells in cancer progression and metastasis and their therapeutic implications. / M. Mimeault, S.K. Batra // Cancer Metastasis Rev. – 2007. - Vol. 26, - P 203-214.
51. Mimeault, M. Recent advances in cancer stem/progenitor cell research: therapeutic implications for overcoming resistance to the most aggressive cancers. / M. Mimeault, R. Hauke, P.P. Mehta et al // J. Cell. Mol. Med. – 2007. - Vol. 11, - No. 5, - P 981-1011.
52. Miyake, T. CRABP1-reduced expression is associated with poorer prognosis in serous and clear cell ovarian adenocarcinoma. / T. Miyake, Y. Ueda, S. Matsuzaki et al // J Cancer Res Clin Oncol. – 2011. - Vol 137(4), 2011, P 715-722.
53. Mlakar, V. 11q deletion in neuroblastoma: a review of biological and clinical implications. / V. Mlakar, S.J. Mlakar, G. Lopez et al // Molecular Cancer. – 2017. - Vol. 16, - No. 114, - P. 1-12.
54. Monclair, T. The International neuroblastoma risk group (INRG) staging system: an INRG task force report. / T. Monclair, G.M. Brodeur, P.F. Ambros et al // J Clin Oncol. – 2009. - Vol. 27, - No. 2, -P 298-303.
55. Moreau, L.A. Does MYCN amplification manifested as homogeneously staining regions at diagnosis predict a worse outcome in children with neuroblastoma? A children's oncology group study. / L.A. Moreau, P. McGrady, W.B. London et al // Clin Cancer Res. – 2006. - Vol. 12(19), October 1, - P 5693-5697.
56. Mosse, Y.P. Identification of *ALK* as the major familial neuroblastoma predisposition gene. / Y.P. Mosse, M. Laudenslager, L. Longo et al // Nature. – 2008. - Vol. 455, - No. 7215, - P 930-935.
57. Muller, J.-M. The VIP-receptor system in neuroblastoma cells. / Philippe M., Chevrier L., Heraud C., Alleaume C., Chadeneau C. // J.-M. Muller / Reg Peptides. – 2006. - Vol.137, - P 34-41.

58. Nakazawa, A. Correlation between the International neuroblastoma pathology classification and genomic signature in neuroblastoma. / A. Nakazawa, C. Haga, M. Ohira et al // *Cancer Sci.* – 2015. - Vol. 106, -No. 6, - P 766-771.
59. Ohali, A. Telomere length is a prognostic factor in neuroblastoma. / A. Ohali, S. Avigad, S. Ash et al // *Cancer.* – 2006. - Vol. 107, - No. 6, - P 1391-1399.
60. Papac, R.J. Spontaneous regression of cancer. / R.J. Papac // *Cancer Treatment Reviews.* – 1996. - Vol. 22, - P 395-423.
61. Peace, B.E. A case of elevated spontaneous micronucleus frequency derived from chromosome 2. / B.E. Peace, G. Livingston, E.B. Silberstein et al // *Molecular Mechanisms of Mutagenesis.* – 1999. - Vol. 430, - No. 1, - P 109-119.
62. Pezzolo, A. Intratumoral diversity of telomere length in individual neuroblastoma tumors. / A. Pezzolo, A. Pistorio, C. Gambini et al // *Oncotarget.* – 2015. - Vol. 6, - No. 10, - P 7493-7503.
63. Pfoertner, S. Cellular retinoic acid binding protein I: expression and functional influence in renal cell carcinoma / S. Pfoertner, U. Goelden, W. Hansen et al // *Tumor Biol.* – 2005. - Vol. 26, - No. 6, - P 313-323.
64. Ross, R.A. A role for distinct cell types in determining malignancy in human neuroblastoma cell lines and tumors. / R.A. Ross, J.L. Biedler, B.A. Spengler // *Cancer Lett.* – 2003. - Vol. 197, - No. 1-2, - P 35-39.
65. Ross, R.A. Human neuroblastoma stem cells. / R.A. Ross, B.A. Spengler // *Semin Cancer Biol.* – 2007. - Vol. 17, - No. 3, - P 241-247.
66. Ross, R.A. Human neuroblastoma I-type cells are malignant neural crest stem cells. / R.A. Ross, B.A. Spengler, C. Domenech et al // *Cell Growth Differ.* – 1995. - Vol. 6, - No. 4, - P 449-456.
67. Schleiermacher, G. Segmental chromosomal alterations lead to a high risk of relapse in infants with MYCN-non-amplified localized unresectable/disseminated neuroblastoma (a SIOPEN collaborative study). / G. Schleiermacher, J. Michon, A. Ribeiro et al // *British J of Cancer.* – 2011. - Vol.105, - P 1940-48.
68. Schwab, M. *MYCN* in neuronal tumors. / M. Schwab // *Cancer Lettaers.* – 2004. - Vol. 204, - P 179-187.

69. Shapiro, D.N. Detection of N-myc gene amplification by fluorescence *in situ* hybridization. / D.N. Shapiro, M.B. Valentine, S.T. Rowe et al // American Journal of Pathology. – 1993. - Vol. 142, - No. 5, - P 1339-1346.
70. Shimada, H. The International neuroblastoma pathology classification (the Shimada system). / H. Shimada, I.M. Ambros, L.P. Dehner et al // Cancer. – 1999. - Vol. 86, - No. 2, - P 364-372.
71. Shimizu, N. Selective entrapment of extrachromosomally amplified DNA by nuclear budding and micronucleation during S phase. / N. Shimizu, N. Itoh, H. Utiyama et al // J Cell Biol. – 1998. - Vol. 140, -No. 6, - P 1307-1320.
72. Shimizu, N. Selective elimination of acentric double minutes from cancer cells through the extrusion of micronuclei. / N. Shimizu, T. Shimura, T. Tanaka // Mutat Res. – 2000. - Vol 448, - No. 1, - P 81-90.
73. Spitz, R. Gain of distal chromosome arm 17q is not associated with poor prognosis in neuroblastoma. / R. Spitz, B. Hero, K. Ernestus et al // Clin Cancer Res. – 2003. - Vol. 9, - P 4835-4840.
74. Spitz, R. Loss in chromosome11q identifies tumors with increased risk for metastatic relapses in localized and 4S neuroblastoma. / R. Spitz, B. Hero, T. Simon et al // Clin Cancer Res. – 2006. - Vol. 12, - No. 11, - P 3368-3373.
75. Stanton, B.R. The N-myc proto-oncogene: developmental expression and *in vivo* site-directed mutagenesis. / B.R. Stanton, L.F. Parada // Brain Pathol. – 1992. - Vol. 2, - No. 1, - P 71-83.
76. Stigliani, S. High genomic instability predicts survival in metastatic high-risk neuroblastoma. / S. Stigliani, S. Coco, S. Moetti et al // Neoplasia. – 2012. - Vol. 14, - No. 9, - P 823-832.
77. Stock, C. Genes proximal and distal to *MYCN* are highly expressed in human neuroblastoma as visualized by comparative expressed sequence hybridization. / C. Stock, E. Bozsaky, F. Watzinger et al // American Journal of Pathology. – 2008. - Vol 172, - No. 1, - P 203-214.

78. Storlazzi, C.T. Gene amplification as double minutes or homogeneously staining regions in solid tumors: Origin and structure. / C.T. Storlazzi, A. Lonoce, M.C. Guastadisegni et al // *Genome Research*. – 2010. - Vol. 20, - P 1198-1206.
79. Strieder, V. Regulation of N-myc expression in development and disease. / V. Strieder, W. Lutz // *Cancer Lett*. – 2002. - Vol. 180, - No. 2, - P 107-119.
80. Sukanuma, R. Peripheral neuroblastic tumors with genotype-phenotype discordance: a report from the Children's Oncology Group and the International neuroblastoma pathology committee. / R. Sukanuma, L.L. Wang, H. Sano et al // *Pediatr blood cancer*. – 2013. - Vol. 60, - No. 3, - P 363-370.
81. Sugimoto, T. Alpha-smooth-muscle actin and desmin expressions in human neuroblastoma cell lines / T. Sugimoto, H. Ueyama, H. Hosoi et al // *Int J Cancer*. – 1991. - Vol. 48, - No. 2, - P 277-283.
82. Tajiri, T. Quick quantitative analysis of gene dosages associated with prognosis in neuroblastoma. / T. Tajiri, S. Tanaka, K. Shono et al // *Cancer Letters*. – 2001. - Vol. 166, - P 89-94.
83. Tan, C. Neuroblastoma: experience from National University Health System, Singapore (1987-2008) / C. Tan, S.M. Sabai, A.S. Tin et al // *Singapore Med J* – 2012 - Vol. 53, - No. 1, - P 19-25.
84. Tanaka, K. Frequent methylation-associated silencing of a candidate tumor-suppressor, CRABP1, in esophageal squamous-cell carcinoma / K. Tanaka, I. Imoto, J. Inoue et al // *Oncogene*. – 2007. - Vol. 26, - No. 44, - P 6456-6468.
85. Theissen, J. Heterogeneity of the *MYCN* oncogene in neuroblastoma. / J. Theissen, M. Boensch, R. Spitz et al // *Clin Cancer Res*. – 2009. - Vol. 15, - No. 6, - P 2085-2090.
86. Thompson, D. Identification of patient subgroups with markedly disparate rates of *MYCN* amplification in neuroblastoma: a report from the International Neuroblastoma Risk Group (INRG) project. / D. Thompson, K.T. Vo, W.B. London et al // *Cancer*. – 2016. - Vol. 122, -No. 6, - P. 935-945.
87. Valent, A. *In vivo* elimination of acentric double minutes containing amplified *MYCN* from neuroblastoma tumor cells through the formation of micronuclei. / A.

- Valent, J. Benard, B. Clause et al // *Amer J Pathol.* – 2001. - Vol. 158. - No. 5, - P 1579-1584.
88. Valent, A. *MYCN* gene overrepresentation detected in primary neuroblastoma tumour cells without amplification. / A. Valent, G. Le Roux, M. Barrois et al // *J Pathol.* – 2002. - Vol. 198, P 495-501.
89. Vermeulen, J. Predicting outcomes for children with neuroblastoma. / J. Vermeulen, K. de Preter, P. et al // *Discov Med.* – 2010. - Vol 10, - No. 50, - P 29-36.
90. Villa, O. Blast cells with nuclear extrusions in the form of micronuclei are associated with *MYC* amplification in acute myeloid leukemia. / O. Villa, M. Salido, M.E. Perez-Vila et al // *Cancer Genetics and Cytogenetics.* – 2008. - Vol. 185, - P 32-36.
91. Villamón, E. Comparison of different techniques for the detection of genetic risk-identifying chromosomal gains and losses in neuroblastoma. / E. Villamón, M. Piqueras, C. Mackintosh et al // *Virchows Arch.* – 2008. - Vol. 453, - P 47–55.
92. Wahl, G.M. The Importance of Circular DNA in Mammalian Gene Amplification. / G.M. Wahl // *Cancer Research.* – 1989. - Vol. 49, March 15, - P 1333-1340.
93. Walton, J.D. Characteristics of stem cells from human neuroblastoma cell lines and tumors. / J.D. Walton, D.R. Kattan, S.K. Thomas et al // *Neoplasia.* – 2004. - Vol. 6, - No. 6, - P 838-845.
94. Wang, M. Copy number gain of *MYCN* gene aberration and favorable prognostic factor in Chinese pediatric neuroblastoma patients. / M. Wang, C. Zhou, R. Cai et al // *Diag Path.* – 2013, - Vol. 8, - P 1-6.
95. Yong, M.H. Comparing histopathological classification with *MYCN*, 1p36 and 17q status detected by fluorescence *in situ* hybridization from 14 untreated primary neuroblastomas in Singapore. / M.H. Yong, W.S. Hwang, L.A. Knight et al // *Singapore Med J.* – 2009. - Vol 50(11), - P 1090-1094.