

На правах рукописи

СТРОГАНОВА АННА МИХАЙЛОВНА

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ В ДИАГНОСТИКЕ
НЕЙРОБЛАСТОМЫ**

14.01.12 онкология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва – 2018

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации (и.о. директора – член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук, профессор Стилиди Иван Сократович).

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор **Карселадзе Аполлон Иродионович**

Официальные оппоненты:

Талалаев Александр Гаврилович, доктор медицинских наук, профессор кафедры патологической анатомии и клинической патологии лечебного факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Шароев Тимур Ахмедович, доктор медицинских наук, профессор, руководитель научного отдела Государственного бюджетного учреждения здравоохранения города Москвы «Научно–практический центр специализированной медицинской помощи детям им. В.Ф. Войно-Ясенецкого Департамента здравоохранения города Москвы».

Ведущая организация:

Федеральное государственное автономное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр нейрохирургии имени академика Н.Н. Бурденко» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита состоится «07» февраля 2019 года в 10-00 часов на заседании диссертационного совета Д 001.017.01 на базе ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России по адресу: 115478, г. Москва, Каширское шоссе, д. 23.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России по адресу: 115478, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24.и на сайте www.ronc.ru.

Автореферат разослан «.....» 2018 года.

Ученый секретарь

диссертационного совета

доктор медицинских наук, профессор

Кадагидзе Заира Григорьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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*.

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. 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.

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

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

1. 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.

2. Определение 3 типов амплификации гена *MYCN*, отражающие хронологию процесса амплификации в динамике.

3. Клетки нейробластомы способны удалять лишний генетический материал из ядра путем экстрезии.

4. Наличие амплификации гена *MYCN*, высокий уровень клоногенности, преобладание I-типа клеток, отсутствие экспрессии белка CRABP1 – составляют прогностически неблагоприятный комплекс.

Личный вклад

Все научные результаты, содержащиеся в диссертации, получены автором лично и представляют собой законченное самостоятельное научное исследование. Текст и выводы диссертации сформулированы и написаны автором.

Соответствие паспорту специальности

Научные положения диссертации соответствуют паспорту специальности 14.01.12 онкология, конкретно пункту 7 «Разработка вопросов диагностики, лечения и профилактики в области детской онкологии».

Степень достоверности результатов и их апробация

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.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 120 страницах машинописного текста. Работа содержит список сокращений, введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты, обсуждение, заключение и выводы. Указатель литературы включает 2 отечественных и 93 зарубежных источника. Работа дополнена 3 таблицами и проиллюстрирована 19 рисунками.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для выполнения поставленных задач был исследован материал от 262 пациентов с диагнозом нейроblastомы в возрасте от рождения до 17 лет, наблюдавшихся или проходивших лечение в НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина 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 нейроblastомой в объеме 0,5-1 см³. 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).

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, локализующимся 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.

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.

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).

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.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

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; б) «промокательными движениями» – клеточных элементов на стекле было много, хорошо происходила их адгезия, ядра не были деформированы, лежали равномерно, не перекрывались.

- способ хранения. После высыхания (3-4 часа) при комнатной температуре мазки-отпечатки необходимо хранить в холодильнике на $+4^{\circ}\text{C}$. При нарушении правил хранения результат FISH-реакции сложно было интерпретировать, т.к. флуоресцентные сигналы были диффузные, раздробленные или размытые.

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

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

Центромерные сигналы 2 хромосомы

Было отмечено, что центромерные сигналы 2 хромосомы всегда яркие, четкие. Количество таких сигналов в опухолевых клетках было разное 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.

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. 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) 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.

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 аберрации – увеличении (gain) короткого плеча хромосомы 2 (рис. 7г).

Преимущество использования мазков-отпечатков

- исключалась возможность перерезки ядер, в этих случаях можно было судить о сегментной хромосомной аберрации, 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.

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.

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.

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 HomerWright, 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.

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*.

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.

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).

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. 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); 2) гетерогенность по клеткам с амплификацией, т.е. среди клеток с амплификацией гена *MYCN* располагаются опухолевые клетки без амплификации этого гена.

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, а также встречались случаи, когда флуоресценция захватывала в основном периферические отделы ядра и прилежащую к нему область.

Явление, когда сигналы гена *MYCN* располагались по периферии ядра опухолевой клетки, наблюдалось в 10 случаях образцов с *dmin*. Из них в трех случаях происходила элиминация (удаление) амплифицированных последовательностей посредством образования микроядер. 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%.

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.

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

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

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)), 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.

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

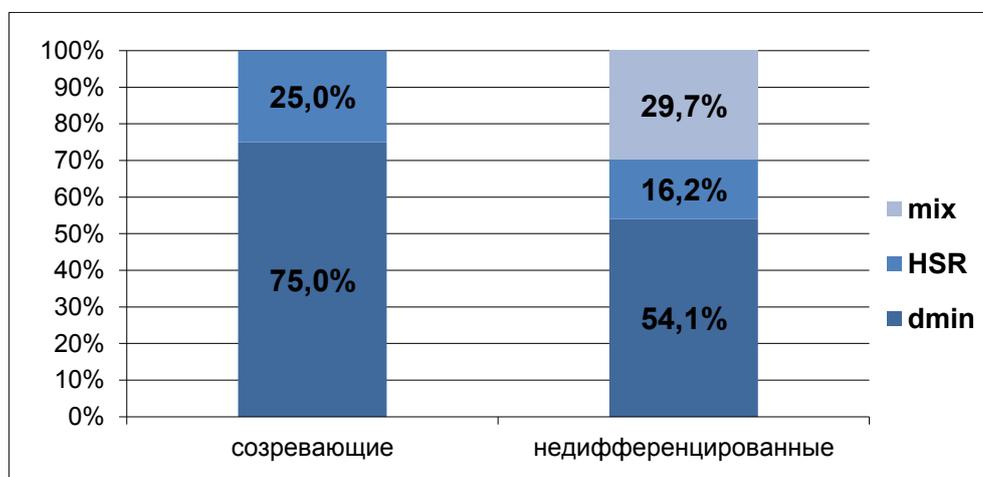


Диаграмма 1. — Соотношение типов амплификации в созревающих и недифференцированных нейробластомах (mix – смешанный тип, HSR – в виде гомогенно окрашенных регионов, dmin – в виде двойных ацентрических хромосом).

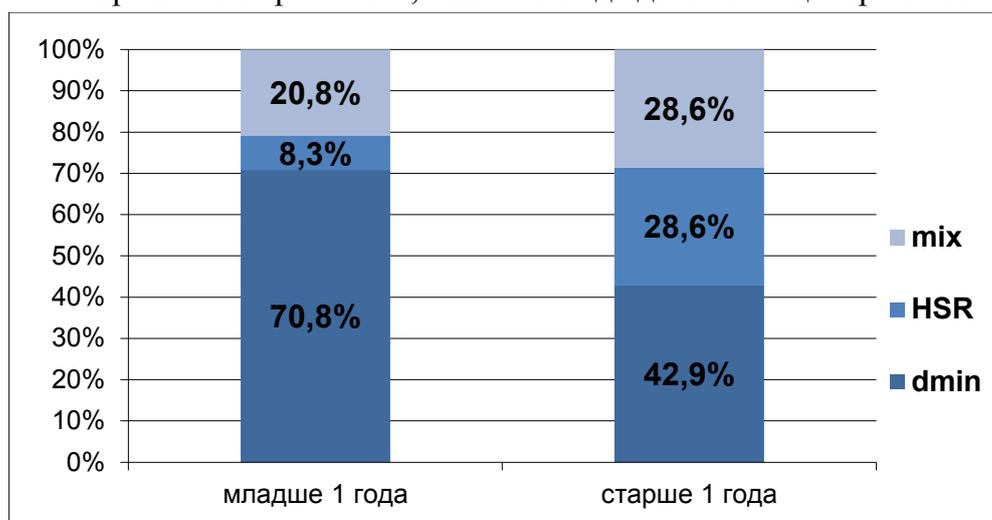


Диаграмма 2. — Соотношение типов амплификации у детей младше и старше 1 года (mix – смешанный тип, HSR – в виде гомогенно окрашенных регионов, dmin – в виде двойных ацентрических хромосом).

Культивирование клеток нейробластомы

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.

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

3. Повышенный уровень клоногенности

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.

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.

При нейробластоме от I-клеток дифференцировались 2 морфологически различных 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.

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.

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

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.

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.

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.

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.

Примечательно, что наиболее злокачественные по культурально-морфологическим характеристикам варианты нейробластомы, представленные недифференцированными клетками I-типа, не имели амплификации гена *MYCN*.

Экспрессия белка CRABP1 в нейробластомах

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

Исследование экспрессии белка CRABP1 проводилось методом иммуногистохимии (ИГХ). Результат реакции – окрашивание цитоплазмы опухолевых клеток.

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.

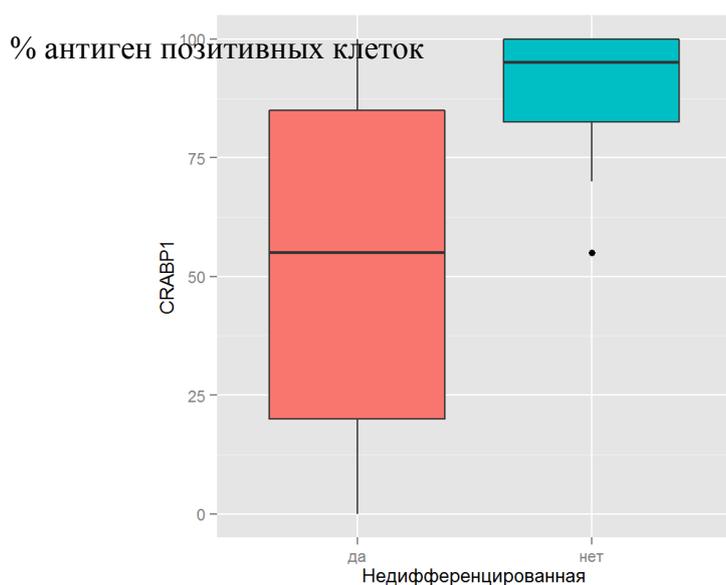


Диаграмма 3 - Зависимость экспрессии белка CRABP1 от уровня клеточной дифференцировки

Т.к. недифференцированные и низкодифференцированные нейробластомы (т.е. незрелые формы) в ряде случаев имеют различные генетические нарушения, такие как амплификация гена *MYCN*, делеция локуса 1р36 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).

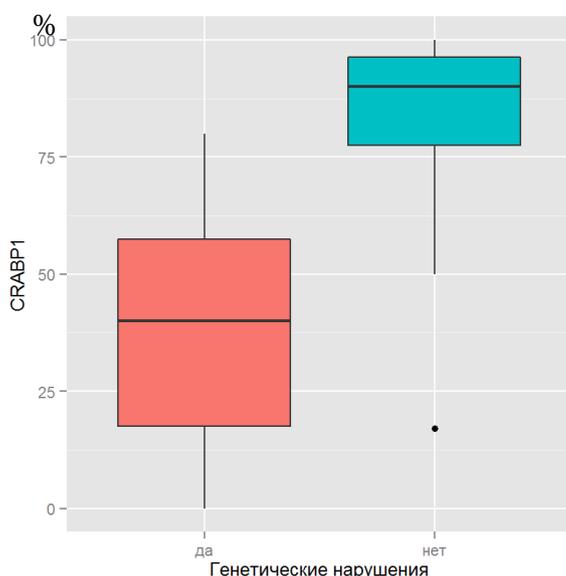


Диаграмма 4 - Зависимость экспрессии белка CRABP1 от наличия генетических нарушений

Помимо вышеизложенного было установлено, что статистически достоверной зависимости между экспрессией белка CRABP1 и возрастом, полом и наличием метастазов у пациентов с нейробластомой не выявлено

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.

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.

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.

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.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

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.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Malakho, S.G. Fast detection of MYCN copy number alterations in brain neuronal tumors by real-time PCR. / S.G. Malakho, A. Korshunov, **A.M. Stroganova**, A.B. Poltarauš // J Clin. Anal. — 2008. — №2. — Vol. 22. — P. 123-30.

2. Табаков, В.Ю. Новые возможности использования метода тканевых культур в диагностической онкоморфологии на примере нейробластомы и рака молочной железы / В.Ю. Табаков, **A.M. Строганова**, В.В. Честков, А.И. Карселадзе // Архив патологии. — 2011. — №3, том 73. — С. 34-40.

3. Строганова, А.М. Нейробластома: морфологическая структура, молекулярно-генетические особенности и прогностические факторы / **A.M. Строганова**, А.И. Карселадзе // Успехи молекулярной онкологии. — 2016. — №1, том 3. — С. 32-43.

4. Строганова, А.М. Белок CRABP 1 и его роль в процессе дифференцировки нейробластомы / **A.M. Строганова**, Г.Ю. Чемерис, Е.М. Чевкина, А.И. Сендерович, А.И. Карселадзе // Вестник ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина». — 2016. — №2, т. 27. — С. 157-163.