

ZEB1 как дополнительный предиктор опухолевой прогрессии при саркоме Юинга. Результаты морфологического исследования на популяции детского и подросткового возраста

О.И. Кит¹, Д.Ю. Юрченко¹, Е.П. Ульянова¹, Д.В. Бурцев², С.А. Кузнецов¹, А.Б. Сагакянц¹, Е.М. Франциянц¹,
Г.А. Мкртчян¹, Е.Е. Пак¹, М.В. Старжецкая¹, А.И. Беспалова¹, О.П. Поповян¹

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Минздрава России;
Россия, 344037, Ростов-на-Дону, ул. 14-я линия, 63;

²ГАУ РО «Областной консультативно-диагностический центр»; Россия, 344000, Ростов-на-Дону, ул. Пушкинская, 127

Контактные данные: Дарья Юрьевна Юрченко dasha_yurchenko_2013@mail.ru

Актуальность. Саркома Юинга (СЮ) — это классический представитель обширного семейства опухолей СЮ, занимающий одну из лидирующих позиций среди злокачественной патологии опорно-двигательного аппарата у детей и подростков. Данная группа характеризуется крайне большим многообразием морфологических, иммуногистохимических (ИГХ) и молекулярно-генетических признаков. Отсутствие специфических патогномоничных маркеров для СЮ, а также наличие широкой вариабельности клинических проявлений осложняет дифференциальную диагностику.

Материалы и методы. В исследование были включены пациенты детского и подросткового возраста с локализованной и генерализованной формами СЮ/примитивными нейроэктодермальными опухолями (ПНЭО) различных локализаций, проходивших лечение в условиях отделения детской онкологии ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России в период с 2009 по 2019 г. В качестве материала была использована ткань первичной опухоли СЮ/ПНЭО из парафиновых блоков, полученная от 67 пациентов при первичной биопсии, а также после хирургического этапа в составе комбинированного или комплексного лечения. Экспрессию ZEB1 определяли иммуногистохимически.

Результаты. Наивысший средний уровень экспрессии белка ZEB1 наблюдался в 4-й группе с генерализованной формой СЮ (операционный материал) и составил $60,8 \pm 2,2\%$, минимальный уровень был выявлен во 2-й группе с локализованной формой СЮ (операционный материал) и составил $29,2 \pm 3,0\%$. Между 2-й (локализованная форма) и 4-й (генерализованная форма) группами отмечались статистически значимые различия ($p = 0,026$).

Заключение. В результате ИГХ-исследования белок ZEB1 показал свою прогностическую значимость при сравнении групп с локализованной и генерализованной формами СЮ ($p = 0,026$). Преобладание уровня экспрессии белка ZEB1 в группе с генерализованной формой статистически значимо увеличивало шансы метастазирования в 3,6 раза (95 % доверительный интервал 1,13–11,8).

Ключевые слова: дети, саркома Юинга, экспрессия ZEB1, иммуногистохимия, прогностический фактор

Для цитирования: Кит О.И., Юрченко Д.Ю., Ульянова Е.П., Бурцев Д.В., Кузнецов С.А., Сагакянц А.Б., Франциянц Е.М., Мкртчян Г.А., Пак Е.Е., Старжецкая М.В., Беспалова А.И., Поповян О.П. ZEB1 как дополнительный предиктор опухолевой прогрессии при саркоме Юинга. Результаты морфологического исследования на популяции детского и подросткового возраста. Российский журнал детской гематологии и онкологии 2020;7(3):39–46.

ZEB1 as an additional predictor of tumor progression in Ewing's sarcoma. Results of a morphological study on a population of children and adolescents

O.I. Kit¹, D. Yu. Yurchenko¹, E.P. Ulyanova¹, D.V. Burtsev², S.A. Kuznetsov¹, A.B. Sagakyants¹, E.M. Frantsiyants¹,
G.A. Mkrtychyan¹, E. Ye. Pak¹, M.V. Starzhetskaya¹, A.I. Bespalova¹, O.P. Popovyan¹

¹National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 63 14th line St., Rostov-on-Don, 344037, Russia;

²Regional Consultative and Diagnostic Center; 127 Pushkinskaya St., Rostov-on-Don, 344000, Russia

Relevance. Ewing's sarcoma (ES) is a classic representative of the extensive family of ES tumors, which occupies one of the leading positions among the malignant pathology of the musculoskeletal system in children and adolescents. This group is characterized by an extremely large variety of morphological, immunohistochemical, and molecular genetic characters among its representatives. The absence of specific pathognomonic markers for ES, as well as the presence of wide variability of clinical manifestations complicates the differential diagnosis.

Materials and methods. The study included patients of childhood and adolescence with a localized and generalized form of ES/PNET of various localizations undergoing treatment in the conditions of the Department of Pediatric Oncology of the Federal State Budgetary Research Center for Oncology from 2009 to 2019. As the material, the tissue of the primary tumor of ES/PNET from paraffin blocks was used, obtained from 67 patients during the primary biopsy, as well as after the surgical stage as part of a combined or complex treatment. The expression of ZEB1 was determined immunohistochemically.

Results. The highest average level of expression of ZEB1 protein was observed in group 4 with a generalized form of ES (surgical material) and amounted to $60.8 \pm 2.2\%$, the minimum level was detected in group 2 with a localized form of ES (surgical material) and amounted to $29.2 \pm 3.0\%$. Between groups 2 (localized form) and 4 (generalized form) statistically significant differences were noted ($p = 0.026$).

Conclusion. As a result of an immunohistochemical study, the ZEB1 protein showed its prognostic significance when comparing groups with a localized and generalized form of ES ($p = 0.026$). The predominance of the expression level of ZEB1 protein in the group with the generalized form statistically significantly increased the chances of metastasis by 3.6 times (95 % CI 1.13–11.8).

Key words: children, Ewing's sarcoma, ZEB1 expression, immunohistochemistry, prognostic factor

For citation: Kit O.I., Yurchenko D.Yu., Ulyanova E.P., Burtsev D.V., Kuznetsov S.A., Sagakyants A.B., Frantsiyants E.M., Mkrtychyan G.A., Pak E.Ye., Starzhetskaya M.V., Bespalova A.I., Popovyan O.P. ZEB1 as an additional predictor of tumor progression in Ewing's sarcoma. Results of a morphological study on a population of children and adolescents. *Russian Journal of Pediatric Hematology and Oncology* 2020;7(3):39–46.

Информация об авторах

О.И. Кит: член-корреспондент РАН, д.м.н., профессор, генеральный директор НМИЦ онкологии, e-mail: onko-sekretar@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0003-3061-6108>, SPIN-код: 1728-0329
 Д.Ю. Юрченко: врач-детский онколог отделения детской онкологии № 2 НМИЦ онкологии, e-mail: dasha_yurchenko_2013@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-1569-6026>, SPIN-код: 8008-0113
 Е.П. Ульянова: научный сотрудник лаборатории иммунофенотипирования опухолей НМИЦ онкологии, e-mail: uljanova_elena@lenta.ru; <https://orcid.org/0000-0001-5226-0152>, SPIN-код: 1243-9475
 Д.В. Бурцев: д.м.н., главный врач Областного консультативно-диагностического центра, e-mail: dr-burtsev@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-4673-7003>, SPIN-код: 4766-0617
 С.А. Кузнецов: к.м.н., врач-детский онколог, заведующий отделением детской онкологии № 2 НМИЦ онкологии, e-mail: kuznecov1978@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-5028-1344>, SPIN-код: 4104-3755
 А.Б. Сагакянц: к.б.н., доцент, заведующий лабораторией иммунофенотипирования опухолей НМИЦ онкологии, e-mail: asagak@rambler.ru; <https://orcid.org/0000-0003-0874-5261>, SPIN-код: 7272-1408
 Е.М. Франциянц: д.б.н., профессор, заместитель генерального директора по науке, руководитель лаборатории патогенеза злокачественных опухолей НМИЦ онкологии, e-mail: rnioi@list.ru; <http://orcid.org/0000-0003-3618-6890>, SPIN-код: 9427-9928
 Г.А. Мкртчян: врач высшей категории, врач-детский хирург, врач-детский онколог отделения детской онкологии № 2 НМИЦ онкологии, e-mail: bonyu.belaya@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-5202-7681>, SPIN-код: 1861-5165
 Е.Е. Пак: к.м.н., врач-детский онколог отделения детской онкологии № 2 НМИЦ онкологии, e-mail: pak.19101982@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0003-2227-5737>, SPIN-код: 8750-9120
 М.В. Старжецкая: к.м.н., врач-детский онколог отделения детской онкологии № 2 НМИЦ онкологии, e-mail: starzheczkaya@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0003-4898-0661>, SPIN-код: 7855-2512
 А.И. Беспалова: врач-детский онколог отделения детской онкологии № 2 НМИЦ онкологии, e-mail: bespalova_a.i@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0003-1599-7600>, SPIN-код: 6779-1744
 О.П. Поповян: врач-детский онколог отделения детской онкологии № 2 НМИЦ онкологии, e-mail: Olyashport@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-9108-4267>, SPIN-код: 5191-3429

Information about the authors

O.I. Kit: Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Dr. of Sci. (Med.), Professor, General Director of the National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia, e-mail: onko-sekretar@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0003-3061-6108>, SPIN-code: 1728-0329
 D.Yu. Yurchenko: Pediatric Oncologist Department of Pediatric Oncology No. 2 at the National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia, e-mail: dasha_yurchenko_2013@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-1569-6026>, SPIN-code: 8008-0113
 E.P. Ulyanova: Researcher Laboratory of Tumor Immunophenotyping at the National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia, e-mail: uljanova_elena@lenta.ru; <https://orcid.org/0000-0001-5226-0152>, SPIN-code: 1243-9475
 D.V. Burtsev: Dr. of Sci. (Med.), Head Doctor of the Regional Consultative and Diagnostic Center, e-mail: dr-burtsev@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-4673-7003>, SPIN-code: 4766-0617
 S.A. Kuznetsov: Cand. of Sci. (Med.), Pediatric Oncologist, Head of the Department of Pediatric Oncology No. 2 at the National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia, e-mail: kuznecov1978@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-5028-1344>, SPIN-code: 4104-3755
 A.B. Sagakyants: Cand. of Sci. (Biol.), docent, Head of the Laboratory of Tumor Immunophenotyping at the National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia, e-mail: asagak@rambler.ru; <https://orcid.org/0000-0003-0874-5261>, SPIN-code: 7272-1408
 E.M. Frantsiyants: Dr. of Sci. (Biol.), Professor, Deputy Director General for Science, Head of the Laboratory of Malignant Tumor Pathogenesis at the National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia, e-mail: rnioi@list.ru; <http://orcid.org/0000-0003-3618-6890>, SPIN-code: 9427-9928
 G.A. Mkrtychyan: Doctor of the Highest Category, Pediatric Surgeon, Pediatric Oncologist Department of Pediatric Oncology No. 2 of the National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia, e-mail: bonyu.belaya@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-5202-7681>, SPIN-code: 1861-5165
 E.Ye. Pak: Cand. of Sci. (Med.), Pediatric Oncologist Department of Pediatric Oncology No. 2 of the National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia, e-mail: pak.19101982@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0003-2227-5737>, SPIN-code: 8750-9120
 M.V. Starzhetskaya: Cand. of Sci. (Med.), Pediatric Oncologist Department of Pediatric Oncology No. 2 at the National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia, e-mail: starzheczkaya@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0003-4898-0661>, SPIN-code: 7855-2512
 A.I. Bespalova: pediatric oncologist of the Department of Pediatric Oncology No. 2 of the National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia, e-mail: bespalova_a.i@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0003-1599-7600>, SPIN-code: 6779-1744
 O.P. Popovyan: Pediatric Oncologist Department of Pediatric Oncology No. 2 of the National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia, e-mail: Olyashport@mail.ru; <https://orsid.org/0000-0002-9108-4267>, SPIN-code: 5191-3429

Вклад авторов

О.И. Кит, Д.В. Бурцев: анализ научной работы, критический пересмотр с внесением ценного интеллектуального содержания
 Д.Ю. Юрченко: сбор материала, разработка дизайна статьи, анализ и интерпретация научного материала, написание текста статьи
 Е.П. Ульянова: разработка концепции научной работы, статистическая обработка полученных данных, участие в написании текста статьи
 С.А. Кузнецов: анализ научной работы и ее критическая оценка с внесением правок и ценного интеллектуального содержания
 Г.А. Мкртчян: обзор публикаций по теме статьи, анализ полученных данных
 А.Б. Сагакянц, Е.М. Франциянц: рецензирование, анализ научной работы, критический пересмотр с внесением ценного интеллектуального содержания
 Е.Е. Пак: рецензирование, анализ научного материала, научное редактирование статьи
 А.И. Беспалова: анализ научного материала, научное редактирование статьи
 М.В. Старжецкая: анализ полученных данных, литературное редактирование статьи
 О.П. Поповян: регистрация, обработка и предоставление данных наблюдения за пациентами

Authors' contributions

O.I. Kit, D.V. Burtsev: analysis of scientific work, critical review with the introduction of valuable intellectual content
 D. Yu. Yurchenko: material collection, article design development, analysis and interpretation of scientific material, writing the text of the article
 E.P. Ulyanova: development of the concept of scientific work, statistical processing of the obtained data, participation in the writing the text of the article
 S.A. Kuznetsov: analysis of scientific work and its critical assessment, with adjustments and valuable intellectual content
 G.A. Mkrtychyan: review of publications on the topic of the article, analysis of the data obtained
 A.B. Sagakyants, E.M. Frantsiants: reviewing, analysis of scientific work, critical review with the introduction of valuable intellectual content
 E. Ye. Pak: reviewing, analysis of scientific material, scientific edition of the article
 A.I. Bepalova: analysis of scientific material, scientific edition of the article
 M.V. Starzhetskaya: analysis of the data obtained, literary edition of the article
 O.P. Popovyan: registration, processing and provision of patient monitoring data

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. / **Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки. / **Funding.** The study was performed without external funding.

Введение

Согласно мировым статистическим данным, саркома Юинга (СЮ) занимает одну из лидирующих позиций среди злокачественной патологии опорно-двигательного аппарата у детей и подростков и 2-е место по частоте встречаемости после остеогенной саркомы [1]. СЮ — это основной представитель гетерогенной группы мелкосинеклеточных злокачественных опухолей — опухолей семейства СЮ [2].

Объединяет данную группу опухолей ряд характерных для них признаков, таких как округлая форма, небольшие размеры клеток, большое ядро, незначительное количество внутриклеточного вещества, способность к окрашиванию в синий цвет и образованию розеткоподобных структур Хомер—Райта и феномена “nucleon crowding” — скученности ядер при микроскопии [3, 4].

Данное семейство характеризуется крайне большим многообразием морфологических, ИГХ и молекулярно-генетических признаков среди ее представителей. Отсутствие специфических патогномоничных маркеров для СЮ, а также наличие широкой вариативности клинических проявлений в значительной мере осложняет дифференциальную диагностику и своевременную высокоточную постановку диагноза [3].

К этиологическим факторам возникновения СЮ относят различного рода хромосомные aberrации с участием ключевого гена *EWS* и различных генов семейства транскрипционных факторов *ETS-FLY*, *ERG*, *ETV1*, *ETV4*, *FEV* и генов других семейств [1, 5, 6]. Результатом подобного рода слияний являются химерные онкопротеины, которые в свою очередь воздействуют на клетки-мишени-предшественники СЮ, вызывая их трансформацию и озлокачествление, тем самым запуская каскад реакций саркомогенеза. Однако, по данным ряда авторов, этот вид генетической катастрофы для СЮ характерен в 85–95 % случаев заболевания, в остальных 5–15 % наблюдений подобного рода транслокаций не выявляется. Вероятно, столь небольшой процент возникновения СЮ ассоциирован с хромосомными aberrациями других, не изученных на сегодняшний день генов [5].

Ведутся активные споры о происхождении СЮ, и все чаще ставится под вопрос классическая теория возникновения СЮ из простой мезенхимальной

клетки, доказательством тому являются факты неоднократного обнаружения в ткани первичной опухоли опухолевых клеток с экспрессией цитокератинов и наличием плотных контактов, т. е. клеток с эпителиоидной дифференцировкой [6]. В качестве основных первоисточников возникновения СЮ современные ученые все чаще рассматривают мезенхимальные стволовые клетки или стволовые клетки из нервного гребня [7].

Особую проблему на сегодняшний день представляет процесс крайне быстрого и зачастую множественного метастазирования СЮ. Так, на момент первичного обращения пациентов с СЮ в 25–30 % случаев имеется метастатическое поражение отдаленных органов и тканей. К наиболее частым локализациям метастатического поражения при СЮ относятся легочная ткань, кости скелета, а также костный мозг. В более редких случаях отмечено поражение регионарных лимфатических узлов, головного и спинного мозга, что коррелирует с неблагоприятным прогнозом [6, 7]. Несмотря на широкий комплекс проводимых мер в терапии, результаты лечения пациентов с данной онкопатологией остаются по-прежнему неудовлетворительными. В связи с этим особенно актуальным представляется изучение процессов диссеминации клеток СЮ с формированием вторичных метастатических фокусов, а также поиск прогностических факторов в оценке агрессивности потенциала данной опухоли.

В новейшей литературе часто упоминается и активно обсуждается концепция клеточной пластичности в регуляции и реализации метастазирования СЮ [8, 9]. В ее основе лежат взаимобратимые процессы эпителиально-мезенхимального (ЭМП) и мезенхимально-эпителиального (МЭП) переходов или транзиции (Epithelial Mesenchymal Transition) [10, 11], в основе регуляции которых лежит активность ряда транскрипционных факторов, таких как *Snail*, *Twist*, *Slug*, *SMAD*, *BMP*, а также представителей семейства белков цинкового пальца — *ZEB1*, *ZEB2* и др. [12, 13]. Данные транскрипционные факторы имеют различную функциональную направленность. Одни индуцируют экспрессию цитокератинов и, как следствие, способствуют приобретению клетками эпителиальных свойств, другие же, напротив, — индуцируют мезен-

химальный или мезенхимоподобный фенотип, ингибируя экспрессию белков плотных контактов.

К последним относится семейство белков цинкового пальца, которое характеризуется наличием цинк-фингерных транскрипционных факторов, распознающих специфические элементы типа E-box, широко известные как белки семейства ZEB. Многочисленные исследования показали, что гиперэкспрессия белков цинкового пальца повышает агрессивность и метастатический потенциал различных злокачественных новообразований [14, 15].

Так, согласно литературным данным, особую роль в патогенезе и прогрессии СЮ играет представитель семейства белков цинкового пальца – ZEB1. Транскрипционный фактор ZEB1 (Zinc finger E-box-binding homeobox) участвует в регуляции процессов клеточной пластичности, а именно в ЭМП и МЭП как в норме, так и при патологии. Наибольший интерес представляет тот факт, что ZEB1 способствует как инициации опухолевого процесса, так и его диссеминации с формированием вторичных метастатических очагов [14, 16]. Доказано, что повышенная экспрессия ZEB1 коррелирует с неблагоприятным клиническим исходом у больных с различными злокачественными опухолями [17, 18]. Основным эффектом, реализуемым ZEB1, является угнетение экспрессии цитокератинов и других маркеров эпителиальной дифференцировки, что запускает процесс ЭМП и способствует приобретению опухолевыми клетками мезенхимоподобного фенотипа, а соответственно подвижности и способности к миграции. ZEB1 способствует протеканию начальных стадий образования опухоли посредством взаимодействия с активными онкогенами и, являясь специфическим центральным индуктором ЭМП, через p53- и Rb-сигнальные пути подавляет апоптотические процессы и содействует приобретению опухолевыми клетками химио- и радиорезистентности. Свои эффекты ZEB1 активно реализует в таких злокачественных опухолях, как карцинома молочной железы, колоректальный рак, рак простаты и др. [15, 18–20]. Однако не только в злокачественных эпителиальных опухолях ZEB1 регулирует процессы инвазии и миграции, также, согласно литературным данным, он участвует в инициации опухолевого процесса при СЮ, опосредованно вызывает супрессию межклеточных контактов опухолевых клеток и стимулирует выработку еще большего числа мезенхимальных маркеров, тем самым способствуя процессам формирования инвазивного фенотипа опухолевых клеток и вторичной метастатической колонизации других органов и тканей [8, 9, 14].

Так, согласно теории о клеточной пластичности, ЭМП действительно необходим для обособления и миграции опухолевых клеток, в то время как МЭП облигатен для формирования вторичных метастатических очагов. Многие авторы полагают, что СЮ – это опухоль, которая по умолчанию проходит пассивный МЭП в силу своей исходной дифференцировки, однако в регуляции данного процесса одну из главенствую-

щих ролей отводят все же ZEB1 [21, 22]. Согласно новейшим литературным данным, повышенная экспрессия ZEB1 в ткани первичной опухоли напрямую коррелирует с распространенностью опухолевого процесса [8, 9, 11]. Однако данные механизмы крайне мало изучены и требуют более детального и углубленного исследования их основ, что может оказать значительное влияние на понимание процессов прогрессии и хоуминга премеастической ниши.

Цель работы – исследование и анализ экспрессии белка ZEB1 в качестве прогностического фактора в ткани первичных опухолей у пациентов детского и подросткового возраста с локализованными и генерализованными формами ретроспективных случаев заболевания СЮ.

Материалы и методы

В исследование были включены пациенты ($n = 67$) детского и подросткового возраста с локализованной и генерализованной формами СЮ/примитивными нейроэктодермальными опухолями (ПНЭО) различных локализаций, проходившие лечение в условиях отделения детской онкологии НМИЦ онкологии в период с 2009 по 2019 г. Возраст пациентов – от 0 до 18 лет включительно. Из них мальчиков было 40, что составило 59,7 % общего числа пациентов, девочек – 27 (40,2 %). С классической костной формой СЮ было 50 (74,6%) больных, с мягкотканной формой СЮ/ПНЭО – 17 (25,3 %). На момент верификации опухолевого процесса с локализованной формой СЮ было 26 пациентов, среди них девочек – 11, мальчиков – 15; с генерализованной формой СЮ – 41, из них девочек – 16, мальчиков – 25. Следует отметить, что в группу с генерализованной формой помимо пациентов, имевших на момент первичного обращения отдаленные метастатические очаги различных локализаций, также были включены все больные, имевшие поражение регионарных лимфатических узлов.

В качестве материала была использована ткань первичной опухоли СЮ/ПНЭО из парафиновых блоков ретроспективных случаев заболевания, всего 87 блоков, полученных от 67 пациентов при первичной биопсии, а также после хирургического этапа в составе комбинированного или комплексного лечения. Все больные, опухолевый материал которых отбирали после проведения хирургического лечения, получали неoadьювантную многокурсовую полихимиотерапию согласно протоколам EURO-EWING 99 и EURO-EWING 2004. Данная терапия включала проведение 6 стандартных альтернирующих курсов неoadьювантной полихимиотерапии по схеме VIDE с применением винкристина, ифосфамида, доксорубина и этопозиды. Учитывая возможное потенциальное влияние химиопрепаратов и различную степень постхимиотерапевтического патоморфоза первичной опухоли, все пациенты были распределены нами на 4 группы: 1-я – пациенты с локализованной формой СЮ (биопсийный материал), $n = 10$;

2-я группа – больные с локализованной формой СЮ (операционный материал), $n = 26$; 3-я группа – пациенты с генерализованной формой СЮ (биопсийный материал), $n = 10$; 4-я группа – больные с генерализованной формой СЮ (операционный материал), $n = 41$. Следует отметить, что в послеоперационных образцах опухолевой ткани пациентов как локализованной, так и генерализованной групп преобладал патоморфоз III–IV степени. Однако в клиническом течении заболевания у некоторых пациентов данных групп, несмотря на проводимую терапию в послеоперационном периоде, отмечалась прогрессия в виде появления ранее не определявшихся метастатических фокусов или увеличения количества и размеров уже имевшихся метастатических очагов, что, по-видимому, свидетельствует в пользу наличия пула резистентных к лечению опухолевых клеток СЮ.

Все образцы опухолевой ткани, полученные после проведения хирургического лечения, в обязательном порядке проходили молекулярно-генетическое исследование на наличие/отсутствие перестройки гена *EWSR1*. Исследование выполнялось с использованием метода флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) на парафиновых срезах ткани опухоли, по результатам которого выявлены 63 положительных в отношении перестройки гена *EWSR1* (94 %) образца и 4 (6 %), в которых соответствующая перестройка отсутствовала. *EWSR1*-негативные образцы опухолевой ткани не были исключены нами из последующего исследования. С учетом большого количества возможных различных типов транслокаций с непосредственным участием других «флагманских» генов полученные нами результаты в целом не отличались от общемировых литературных и клинических данных. Однако в качестве окончательного подтверждения диагноза СЮ все образцы прошли двойной независимый патоморфологический референс, по результатам которого диагноз СЮ был подтвержден во всех случаях.

Далее нами был проведен основной этап исследования, заключавшийся в проведении ИГХ-анализа опухолевого материала с использованием специфических антител к белку ZEB1 в исследуемых группах. Подробная его методика описана в ранее напечатанных работах [12]. В нашем исследовании использовались поликлональные антитела к ZEB1 (Biorbyt Ltd.) в разведении 1:200. Для визуализации применяли систему детекции Reveal Polyvalent HRP-DAB Detection System. Оценивали процентное содержание и интенсивность окрашивания: 0, 1+ – слабое, 2+ – умеренное, 3+ – сильное. Экспрессия белка ZEB1 определялась как положительная, когда окрашивание было выявлено более чем в 10 % (cut-off) опухолевых клеток с интенсивностью 2+ и 3+. Статистический анализ результатов проводился с помощью программы STATISTICA 13.0 (StatSoft Inc., США), применяли критерий χ^2 Пирсона, U-критерий Манна–Уитни, отношение шансов с 95 % доверительным интервалом (ДИ).

Результаты и обсуждение

Проведя исследование на определение экспрессии ZEB1, были получены следующие результаты: в процентном содержании максимальное число пациентов, у которых наблюдалось положительное окрашивание белка ZEB1, отмечено в 3-й (90 %) и 4-й (85 %) группах, минимальное число (62 %) – у пациентов во 2-й группе. Наивысший показатель среднего уровня экспрессии наблюдался в 4-й группе и составил $60,8 \pm 2,2$ %, наименьший показатель был выявлен во 2-й группе – $29,2 \pm 3,0$ %. В 1-й и 3-й группах средний уровень экспрессии ZEB1 составил $46,3 \pm 9,2$ % и $41,7 \pm 11,1$ % соответственно (рис. 1).

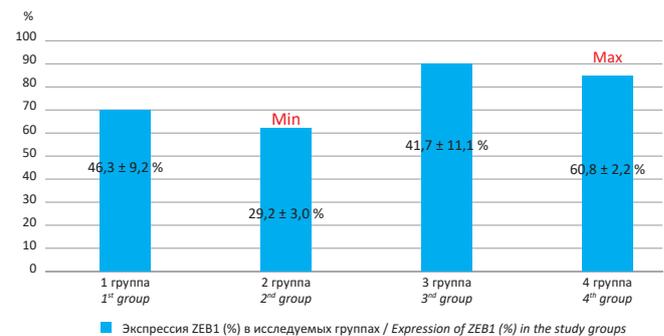


Рис. 1. Средний уровень экспрессии ZEB1 в исследуемых группах

Fig. 1. Average level of expression of ZEB1 in the study groups

Окрашивание опухолевых клеток в исследуемых группах было несколько неоднородным и с различной степенью интенсивности на всем протяжении (рис. 2). Так, в 1-й и 3-й группах преобладала высокая степень интенсивности окрашивания, тогда как во 2-й и 4-й были отмечены все степени интенсивности. Во 2-й группе наиболее часто наблюдалась низкая степень интенсивности окрашивания, в 4-й – наоборот – преобладала высокая степень интенсивности окрашивания.

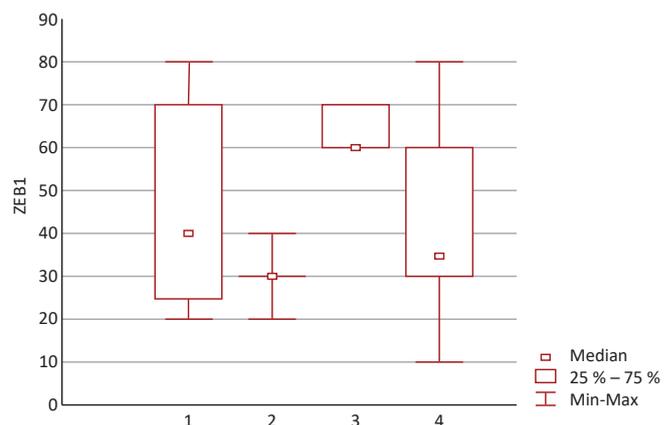


Рис. 2. Диаграмма размаха экспрессии ZEB1 в опухолевых клетках у пациентов исследуемых групп. Цифрами указаны номера исследуемых групп

Fig. 2. Scope of ZEB1 expression in tumor cells in patients in the study groups. The numbers indicate the numbers of the studied groups

Сравнивая полученные данные в исследуемых группах пациентов, у которых первичная опухоль имела различный уровень экспрессии ZEB1, были получены следующие результаты: при распределении по критерию χ^2 Пирсона во всех изучаемых группах статистически значимой связи между факторным и результативным признаками обнаружить не удалось (0,224 при $p = 0,636$ и 0,146 при $p = 0,703$ соответственно). Однако между 2-й и 4-й группами отмечалась статистически значимая связь (4,969 при $p = 0,026$). В результате обработки статистических данных было показано, что преобладание экспрессии ZEB1 в 4-й группе увеличивало шансы метастазирования в 3,6 раза (95 % ДИ 1,13–11,8) по сравнению со 2-й группой. Подробные данные представлены в табл. 1 и 2.

Таблица 1. Распределение экспрессии ZEB1 в исследуемых группах

Table 1. Distribution of ZEB1 expression in the study groups

Группа Group	Фактор риска Risk factor		U-критерий Манна–Уитни Mann–Whitney U-test	Критерий χ^2 Пирсона Pearson χ^2 test
	ZEB1+	ZEB1–		
	% , абс. % , abs.			
1-я, n = 10 1 st , n = 10	70 (7)	30 (3)	p = 0,272	p = 0,636
Средний уровень экспрессии, % The average level of expression, %	46,3 ± 9,2			
2-я, n = 26 2 nd , n = 26	62 (16)	38 (10)	p = 0,138	p = 0,703
Средний уровень экспрессии, % The average level of expression, %	29,2 ± 3,0			
3-я, n = 10 3 rd , n = 10	90 (9)	10 (1)	p = 0,026*	3,6; 1,13–11,8
Средний уровень экспрессии, % The average level of expression, %	41,7 ± 11,1			
4-я, n = 41 4 th , n = 41	85 (35)	15 (6)		
Средний уровень экспрессии, % The average level of expression, %	60,8 ± 2,2			

Таблица 2. Распределение критерия χ^2 Пирсона в исследуемых группах

Table 2. Pearson χ^2 test distribution in the study groups

Группа Group	Фактор риска Risk factor		p	Отношение шансов; 95 % ДИ Odds ratio; 95 % confidence interval
	ZEB1+	ZEB1–		
	% , абс. % , abs.			
2-я, n = 26 2 nd , n = 26	62 (16)	38 (10)	0,026*	3,6; 1,13–11,8
4-я, n = 41 4 th , n = 41	85 (35)	15 (6)		

Примечание. * – различия показателей статистически значимы ($p < 0,05$).

Note. * – differences in the indicators are statistically significant ($p < 0.05$).

Сравнивая средний уровень экспрессии в заданных группах, нами было продемонстрировано преобладание экспрессии ZEB1 в опухолевых клетках у пациентов 1-й группы в 1,6 раза по сравнению с больными 2-й группы. В 3-й и 4-й группах отмечалось преобладание экспрессии ZEB1 в 1,5 раза у пациентов с операционным материалом. При сравнении 2-й и 4-й групп преобладание в 2,1 раза наблюдалось у больных с генерализованной формой опухоли. Однако различия по U-критерию Манна–Уитни оказались статистически незначимы ($p > 0,05$) (см. табл. 1, табл. 3).

Таблица 3. Сравнение уровня экспрессии ZEB1 с помощью U-критерия Манна–Уитни в исследуемых группах

Table 3. Comparison of the level of expression of ZEB1 using the U-test Mann–Whitney in the study groups

Средний уровень экспрессии, % The average level of expression, %	Группа Group				p
	2-я/2 nd (n = 26)		4-я/4 th (n = 41)		
	Me	Q1–Q3	Me	Q1–Q3	
ZEB1	29,2 ± 3,0	20–40	60,8 ± 2,2	10–80	0,745

На рис. 3 продемонстрированы различные варианты экспрессии ZEB1 в опухолевой ткани пациентов исследуемых групп.

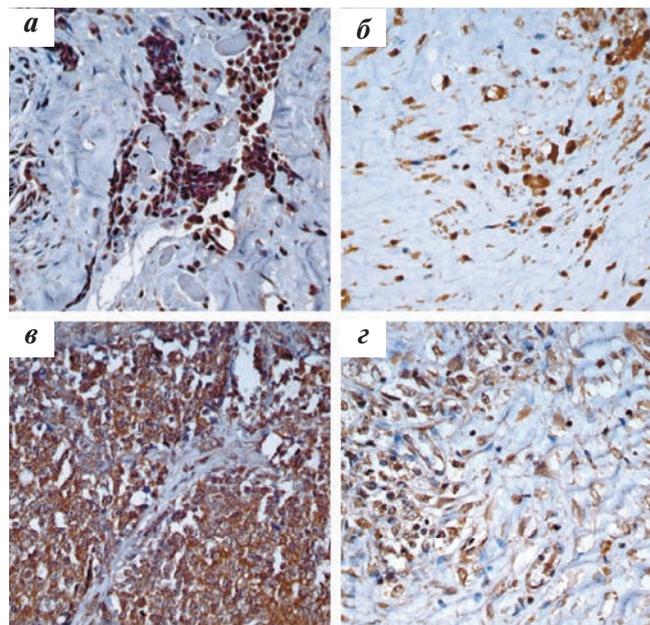


Рис. 3. Варианты экспрессии ZEB1 в опухолевой ткани пациентов: а – высокая степень интенсивности (3+), в биопсийный вариант, генерализованная форма, $\times 400$; б – средняя степень интенсивности (2+), биопсийный вариант, локализованная форма, $\times 400$; в – высокая степень интенсивности (3+), операционный вариант, генерализованная форма, $\times 400$; з – средняя степень интенсивности (2+), операционный вариант, локализованная форма, $\times 400$

Fig. 3. Variants of ZEB1 expression in tumor tissue of patients: а – high degree of intensity (3+), biopsy version, generalized form, $\times 400$; б – medium degree of intensity (2+), biopsy version, localized form, $\times 400$; в – high degree of intensity (3+), operational version, generalized form, $\times 400$; з – medium degree of intensity (2+), operational version, localized form, $\times 400$

Выводы

В результате проведенного ИГХ-исследования нами было установлено, что повышенные уровни экспрессии ZEB1 в ткани первичной опухоли СЮ соответствовали группам пациентов, а именно — 3-й и 4-й, с исходно более агрессивным морфотипом СЮ, и, как следствие, имевшим наиболее неблагоприятное течение заболевания. При статистическом анализе ZEB1 также показал свою значимость при сравнении групп с локализованной и генерализованной формами СЮ ($p = 0,026$). Установлено, что преобладание уровня экспрессии ZEB1 в 4-й группе (генерализованная форма, операционный материал) статистически значимо увеличивало шансы метастазирования в 3,6 раза (95 % ДИ 1,13–11,8) по сравнению со 2-й группой пациентов (локализованная форма СЮ, операционный материал).

Учитывая полученные результаты, мы полагаем, что наиболее целесообразным может считаться исследование уровня ZEB1 в ткани первичной опу-

холи при верификации процесса в качестве непосредственного маркера для оценки метастатического потенциала СЮ. Наряду с этим помимо обязательной оценки патоморфоза первичной опухоли СЮ на этапе хирургического лечения в составе комплексной или комбинированной терапии значимым может считаться исследование уровня экспрессии ZEB1 в качестве предиктора возможного рецидива/прогрессирования метастатического поражения. Материал по данной тематике находится в разработке и будет позже представлен в виде самостоятельной публикации.

Таким образом, нами была подтверждена возможность применения в рутинном ИГХ-исследовании ZEB1 в качестве непосредственного маркера, характеризующего потенциальную метастатическую активность ткани первичной опухоли СЮ как до начала какого-либо лечения, т. е. на этапе верификации опухолевого процесса, так и после уже проведенной комбинированной/комплексной терапии.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Самбурова Н.В., Пименов И.А., Жевак Т.Н., Литвицкий П.Ф. Саркома Юинга: молекулярно-генетические механизмы патогенеза. Вопросы современной педиатрии 2019;18(4):257–63. doi: 10.15690/vsp.v18i4.2042. [Samburova N.V., Pimenov I.A., Zhevack T.N., Litvickiy P.F. Ewing's sarcoma: molecular genetic mechanisms of pathogenesis. Voprosy Sovremennoy Pediatrii = Current Pediatrics 2019;18(4):257–63. (In Russ.).]
- Семенова А.И. Саркома Юинга: характеристика заболевания, особенности диагностики, лечебная тактика. Практическая онкология 2010;11(1):45. [Semenova A.I. Ewing's sarcoma: disease characteristics, diagnostic features, therapeutic tactics. Prakticheskaya Onkologiya = Practical Oncology 2010;11(1):45. (In Russ.).]
- Буланов Д.В. Злокачественные мелкокруглоклеточные опухоли семейства саркомы Юинга: Современные представления о гистогенезе, иммуногистохимических и молекулярно-генетических маркерах. Молекулярная медицина 2013;1:12–4. [Bulanov D.V. Malignant small round cellular tumors of the Ewing sarcoma family: modern ideas on histogenesis, immunohistochemical, and molecular genetic markers. Molekulyarnaya meditsina = Molecular Medicine 2013;1:12–14. (In Russ.).]
- Chaturvedi A., Hoffman L.M., Jensen C.C., Lin Y.C., Grossmann A.H., Randall R.L., Lessnick S.L., Welm A.L., Beckerle M.C. Molecular dissection of the mechanism by which EWS/FLI expression compromises actin cytoskeletal integrity and cell adhesion in Ewing sarcoma. Mol Biol Cell 2014;25(18):2695–709. doi: 10.1091/mbc.E14-01-0007.
- Хмельевская В.Н., Куприянова Е.И., Цепенко В.В. Саркома Юинга костей таза (литературная справка). Клинический случай длительного наблюдения больной после излечения саркомы Юинга костей таза с метастазами в регионарные лимфатические узлы и в правое легкое. Саркомы костей, мягких тканей и опухоли кожи 2019;1:34–5. [Hmelevskaya V.N., Kupriyanova E.I., Cepenkov V.V. Ewing's pelvic bone sarcoma (literature reference). A clinical case of prolonged observation of a patient after curing of Ewing's pelvic bone sarcoma with metastases to regional lymph nodes and to the right lung. Sarkomy kostey, myagkikh tkaney i opukholi kozhi = Sarcomas of Bones, Soft Tissues and Skin Tumors 2019;1:34–5. (In Russ.).]
- Васильев Н.В., Поletaева С.В., Табакаев С.А., Тюкалов Ю.И., Перельмутер В.М. Саркома Юинга: особенности лимфогенного метастазирования и факторы прогноза. Сибирский онкологический журнал 2019; 18(5): 29–37. doi: 10.21294/1814-4861-2019-18-5-29-37. [Vasil'ev N.V., Poletaeva S.V., Tabakaev S.A., Tyukalov Yu.I., Perelmuter V.M. Ewing's sarcoma: features of lymphogenous metastasis and prognosis factors. Sibirskiy Onkologicheskij Zhurnal = Siberian Journal of Oncology 2019;18(5):29–37. (In Russ.).]
- Васильев Н.В. Лимфогенное метастазирование сарком мягких тканей: частота метастазирования, факторы риска, механизмы возникновения. Сибирский онкологический журнал 2015;3:68–75. [Vasil'ev N.V. Lymphogenic metastasis of sarcomas of soft tissues: frequency of metastasis, risk factors, mechanisms of occurrence. Sibirskiy Onkologicheskij Zhurnal = Siberian Journal of Oncology 2015;3:68–75. (In Russ.).]
- Lawlor E.R., Sorensen P.H. Twenty years on: what do we really know about Ewing sarcoma and what is the path forward? Crit Rev Oncol 2015;20(3–4):155–71. doi: 10.1615/critrevoncog.2015013553.
- Фармаковская М.Д., Хромова Н.В., Рыбко В.А., Копнин П.Б. Роль эпителиально-мезенхимального перехода в регуляции свойств раковых стволовых клеток солидных опухолей. Российский биотерапевтический журнал 2015;4:14. [Farmakovskaya M.D., Hromova N.V., Rybko V.A., Kopnin P.B. The role of the epithelial-mesenchymal transition in the regulation of the properties of cancer stem cells of solid tumors. Rossiyskiy Bioterapevticheskij Zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2015;4:14. (In Russ.).]
- Hill B.S., Pelagalli A., Passaro N., Zannetti A. Tumor-educated mesenchymal stem cells promote pro-metastatic phenotype. Oncotarget 2017;8(42):73296–311. doi: 10.18632/oncotarget.20265.
- Jolly M.K., Ware K.E., Gilja S., Somarelli J.A., Levine H. EMT and MET: necessary or permissive for metastasis? Mol Oncol 2017;11(7):755–69. doi:10.1002/1878-0261.12083.
- Chaffer C.L., Thompson E.W., Williams E.D. Mesenchymal to epithelial transition in development and disease. Cells Tissues Organs 2007;185(1–3):7–19. doi: 10.1159/000101298.
- Юрченко Д.Ю., Бурцев Д.В., Кузнецов С.А., Сагакянц А.Б., Мкртчян Г.А., Старжецкая М.В., Беспалова А.И., Поповян О.П., Куштова Л.Б. Некоторые особенности молекулярно-генетического патогенеза саркомы Юинга. Современные проблемы науки и образования 2019;3. [Электронный ресурс]: http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=28924. [Yurchenko D.Yu., Burcev D.V., Kuznecov S.A., Sagakyanc A.B., Mkrtychyan G.A., Starzheckaya M.V., Bepalova A.I., Popovyan O.P., Kusthova L.B. Some features of the molecular genetic pathogenesis of Ewing's sarcoma. Modern Problems of Science and Education 2019;3. [Electronic resource]: http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=28924. (In Russ.).]
- Ming H., Chuang Q., Jiashi W., Bin L., Guangbin W., Xianglu J. Naringin targets Zeb1 to suppress osteosarcoma cell proliferation and metastasis. Aging (Albany NY) 2018;10(12):4141–51. doi: 10.18632/aging.101710.
- Поздняков Д.Ю., Шувалов О.Ю., Барлев Н.А., Миттенберг А.Г. Транскрипционный фактор ZEB1 и его роль в процессах метастазирования и онкогенеза. Цитология 2019;61(11):915–25.

- [Pozdnyakov D.Yu., Shuvalov O.Yu., Barlev N.A., Mittenberg A.G. The transcription factor ZEB1 and its role in the processes of metastasis and oncogenesis. *Cytology* 2019;61(11):915–25. (In Russ.).]
16. Wiles E.T., Bell R., Thomas D., Beckerle M., Lessnick S.L. ZEB2 represses the epithelial phenotype and facilitates metastasis in Ewing sarcoma. *Genes Cancer* 2013;4(11–2):486–500. doi: 10.1177 / 1947601913506115.
 17. Liu Y., Sánchez-Tilló E., Lu X., Huang L., Clem B., Telang S., Jenson A.B., Cuatrecasas M., Chesney J., Postigo A., Dean D.C. Sequential inductions of the ZEB1 transcription factor caused by mutation of Rb and then Ras proteins are required for tumor initiation and progression. *J Biol Chem* 2013;288(16):11572–80. doi:10.1074/jbc.M112.434951.
 18. Manshoury R., Coyaud E., Kundu S.T., Peng D.H., Stratton S.A., Alton K., Bajaj R., Fradette J.J., Minelli R., Peoples M.D., Carugo A., Chen F., Bristow C., Kovacs J.J., Barton M.C., Heffernan T., Creighton C.J., Raught B., Gibbons D.L. ZEB1/NuRD complex suppresses TBC1D2b to stimulate E-cadherin internalization and promote metastasis in lung cancer. *Nat Commun* 2019;10(1):5125. doi:10.1038/s41467-019-12832-z.
 19. Wang H., Huang B., Li B.M., Cao K.Y., Mo C.Q., Jiang S.J., Pan J.C., Wang Z.R., Lin H.Y., Wang D.H., Qiu S.P. ZEB1-mediated vasculogenic mimicry formation associates with epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell phenotypes in prostate cancer. *J Cell Mol Med* 2018;22(8):3768–81. doi:10.1111/jcmm.13637.
 20. Lindner P., Paul S., Eckstein M., Hampel C., Muenzner J.K., Erlenbach-Wuensch K., Ahmed H.P., Mahadevan V., Brabletz T., Hartmann A., Vera J., Schneider-Stock R. EMT transcription factor ZEB1 alters the epigenetic landscape of colorectal cancer cells. *Cell Death Dis* 2020;11(2):147. doi:10.1038/s41419-020-2340-4.
 21. Larsen J.E., Nathan V., Osborne J.K., Farrow R.K., Deb D., Sullivan J.P., Dospoy P.D., Augustyn A., Hight S.K., Sato M., Girard L., Behrens C., Wistuba I.I., Gazdar A.F., Hayward N.K., Minna J.D. ZEB1 drives epithelial to mesenchymal transition in lung cancer. *J Clin Invest* 2016;126(9):3219–35. doi: 10.1172/JCI176725.
 22. Xiao Y.Y., Lin L., Li Y.H., Jiang H.P., Zhu L.T., Deng Y.R., Lin D., Chen W., Zeng C.Y., Wang L.J., Chen S.C., Jiang Q.P., Liu C.H., Fang W.Y., Guo S.Q. ZEB1 promotes invasion and metastasis of endometrial cancer by interacting with HDGF and inducing its transcription. *Am J Cancer Res* 2019;9(11):2314–30. PMID: 31815037.

Статья поступила в редакцию: 10.07.2020. Принята в печать: 06.08.2020.

Article was received by the editorial staff: 10.07.2020. Accepted for publication: 06.08.2020.