

<https://doi.org/10.21682/2311-1267-2019-6-4-48-54>

Белок CRABP1 как один из возможных факторов прогноза у детей с нейробластомой группы высокого риска

А.М. Строганова¹, М.В. Рубанская¹, Г.Ю. Чемерис¹, С.Л. Дранко¹,
А.И. Карселадзе¹, Г.Б. Сагоян^{1,2}, А.П. Казанцев¹

¹ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478, Москва, Каширское шоссе, 23;
²ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России; Россия, 117997, Москва, ул. Саморы Машела, 1

Контактные данные: Анна Михайловна Строганова stroganova_am@mail.ru

Нейробластома (НБ) — наиболее распространенная экстракраниальная солидная опухоль детского возраста, составляющая 6–10 % всех злокачественных новообразований у детей. Одной из принципиально важных проблем для клинициста является стратификация группы риска и определение тактики лечения пациентов с НБ. В настоящей работе нами были проведены исследования зависимости экспрессии белка CRABP1 в первичном очаге и метастазах опухоли от типа генетических нарушений (амплификация гена MYCN, делеция локуса 11q23) и эффекта проведенной терапии у пациентов с НБ.

Ключевые слова: дети, нейробластома, генетические нарушения, экспрессия, белок CRABP1

Для цитирования: Строганова А.М., Рубанская М.В., Чемерис Г.Ю., Дранко С.Л., Карселадзе А.И., Сагоян Г.Б., Казанцев А.П. Белок CRABP1 как один из возможных факторов прогноза у детей с нейробластомой группы высокого риска. Российский журнал детской гематологии и онкологии 2019;6(4):48–54.

Protein CRABP1 as one of the possible prognosis factors in children with high-risk neuroblastoma

A.M. Stroganova¹, M.V. Rubanskaya¹, G.Yu. Chemeris¹, S.L. Dranko¹,
A.I. Karseladze¹, G.B. Sagoyan^{1,2}, A.P. Kazantsev¹

¹N.N. Blokhin National Medical Research Centre of Oncology, Ministry of Health of Russia; 23 Kashirskoe Shosse, Moscow, 115478, Russia;
²Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Ministry of Health of Russia;
1 Samory Mashela St., Moscow, 117997, Russia

Neuroblastoma (NB) is the most common extracranial solid tumor of childhood, accounting for 6–10 % of all malignant neoplasms in children. One of the fundamentally important problems for the clinician is the stratification of the risk group and the definition of treatment tactics for patients with NB. In this work, we studied the dependence of the expression of CRABP1 protein in the primary focus and tumor metastases on the type of genetic disorders (amplification of the MYCN gene, deletion of the 11q23 locus) and the effect of the therapy in patients with NB.

Key words: children, neuroblastoma, genetic disorders, expression, protein CRABP1

For citation: Stroganova A.M., Rubanskaya M.V., Chemeris G.Yu., Dranko S.L., Karseladze A.I., Sagoyan G.B., Kazantsev A.P. Protein CRABP1 as one of the possible prognosis factors in children with high-risk neuroblastoma. Russian Journal of Pediatric Hematology and Oncology 2019;6(4):48–54.

Информация об авторах

А.М. Строганова: к.м.н., заведующая молекулярно-биологической лабораторией отдела морфологической и молекулярно-генетической диагностики опухолей НИИ клинической онкологии им. акад. РАН и РАМН Н.Н. Трапезникова НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина, e-mail: stroganova_am@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-7297-5240>

М.В. Рубанская: к.м.н., старший научный сотрудник 2-го хирургического отделения НИИ детской онкологии и гематологии НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина, e-mail: marishvecova@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0002-1016-539X>

Г.Ю. Чемерис: к.б.н., старший научный сотрудник патологоанатомического отделения отдела морфологической и молекулярно-генетической диагностики опухолей НИИ клинической онкологии им. акад. РАН и РАМН Н.Н. Трапезникова НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина; <https://orcid.org/0000-0003-0019-3765>

С.Л. Дранко: врач-лабораторный генетик молекулярно-биологической лаборатории отдела морфологической и молекулярно-генетической диагностики опухолей НИИ клинической онкологии им. акад. РАН и РАМН Н.Н. Трапезникова НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина, e-mail: s.maykulova@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0003-3315-0817>

А.И. Карселадзе: д.м.н., ведущий научный сотрудник патологоанатомического отделения отдела морфологической и молекулярно-генетической диагностики опухолей НИИ клинической онкологии им. акад. РАН и РАМН Н.Н. Трапезникова НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина; e-mail: vasutuchuni@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0001-9660-923X>

Г.Б. Сагоян: врач-детский онколог НИИ детской онкологии и гематологии НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина, аспирант НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева, e-mail: g.sagojan@ronc.ru; <http://orcid.org/0000-0002-7846-3473>, SPIN-код: 6304-0159

А.П. Казанцев: д.м.н., заведующий 2-м хирургическим отделением НИИ детской онкологии и гематологии НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина, e-mail: oncoanat@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0001-7309-1650>

Information about the authors

A.M. Stroganova: Cand. of Sci. (Med.), Head of the Molecular Biological Laboratory of the Department of Morphological and Molecular Genetic Diagnosis of Tumors of the N.N. Trapeznikov Research Institute of Clinical Oncology at N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia, e-mail: stroganova_am@mail.ru; https://orcid.org/0000-0002-7297-5240

M.V. Rubanskaya: Cand. of Sci. (Med.), Researcher and Pediatric Oncologist Department of Surgery No. 2 Research Institute of Pediatric Oncology and Hematology of N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia, e-mail: marishvecova@yandex.ru; https://orcid.org/0000-0002-1016-539X

G.Yu. Chemeris: Cand. of Sci. (Biol.), Senior Researcher of the Pathology Department of the N.N. Trapeznikov Research Institute of Clinical Oncology at N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; https://orcid.org/0000-0003-0019-3765

S.L. Dranko: Laboratory Geneticist of Molecular Biological Laboratory of the N.N. Trapeznikov Research Institute of Clinical Oncology at N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia, e-mail: s.maykulova@mail.ru; https://orcid.org/0000-0003-3315-0817

A.I. Karseladze: Dr. of Sci. (Med.), Leading Researcher of the Pathology Department of the N.N. Trapeznikov Research Institute of Clinical Oncology at N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia, e-mail: vacutuchuni@mail.ru; https://orcid.org/0000-0001-9660-923X

G.B. Sagoyan: Pediatric Oncologist Research Institute of Pediatric Oncology and Hematology of N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia, Graduate Student Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology, Immunology Ministry of Health of Russia, e-mail: g.sagojan@ronc.ru; http://orcid.org/0000-0002-7846-3473, SPIN-code: 6304-0159

A.P. Kazantsev: Dr. of Sci. (Med.), Head of the Department of Surgery No. 2 Research Institute of Pediatric Oncology and Hematology of N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia, e-mail: oncoanat@mail.ru; https://orcid.org/0000-0001-7309-1650

Вклад авторов

А.М. Строганова: анализ научного материала, анализ полученных данных, обзор публикаций по теме статьи, подготовка списка литературы, написание текста рукописи, составление резюме

М.В. Рубанская, Г.Ю. Чемерис, С.Л. Дранко, А.И. Карселадзе: выбор тематики публикации и разработка дизайна статьи, анализ научного материала, сбор данных, описание клинического случая, литературное редактирование

Г.Б. Сагоян: анализ научного материала, описание клинического случая

А.П. Казанцев: научная редакция статьи

Authors' contributions

A.M. Stroganova: analysis of scientific material, analysis of the data obtained, review of publications on the topic of the article, preparation of a list of references, writing the text of the article, composing a resume

M.V. Rubanskaya, G.Yu. Chemeris, S.L. Dranko, A.I. Karseladze: selection of topics for publication, design of the article, the analysis of scientific material, data collection, description of the clinical case, literary editing

G.B. Sagoyan: analysis of the data obtained, description of the clinical case

A.P. Kazantsev: scientific edition of the article

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

Нейробластома (НБ) – наиболее распространенная экстракраниальная солидная опухоль детского возраста, которая происходит из развивающихся нейрональных клеток симпатической нервной системы (стволовых клеток нервного гребня) и составляет 6–10 % всех злокачественных новообразований у детей [1, 2]. Разнообразное клиническое поведение и биологическая гетерогенность: от спонтанного созревания у одних пациентов до быстрого прогрессирования – у других, несмотря на современную интенсивную мультимодальную терапию, привело к необходимости изучения биологических и молекулярно-генетических характеристик НБ [3, 4]. Одной из принципиально важных проблем для клинициста является стратификация группы риска и определение тактики лечения пациентов с НБ [4, 5]. Современное лечение основано на дифференцированных подходах терапии в 3 группах риска – наблюдения, промежуточного и высокого риска. Наряду со многими параметрами клинического характера (возраст пациента на момент постановки диагноза, распространение и локализация опухоли, наличие отдаленных метастазов), многообещающим оказался ряд гистологических (гистопатологическая классификация по системе Shimada) и генетических

(хромосомные аберрации, статус гена *MYCN*, делеция локусов 1p36 и 11q, увеличение длинного плеча 17-й хромосомы и др.) характеристик клеток НБ [6–8].

Клеточная гетерогенность – одна из важнейших особенностей НБ. В пределах одной опухоли могут присутствовать клетки с различными фенотипическими характеристиками: нейробласты, шванновские, периневральные или сателлитные и даже меланоциты [3–5]. 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 НБ [6, 7], и эти свойства используют при стратификации на группы риска и определении объема специального лечения пациентов.

В поисках белковых молекул, которые могли бы характеризовать функциональную активность клеток НБ, мы обратили внимание на белок CRABP1. Основная его функция заключается в связывании ретиноевой кислоты, стимуляция метаболизма которой может снижать уровень клеточной дифференцировки, что является одним из показателей опухолевой прогрессии. Ранее нами была обнаружена корреляция между уровнем экспрессии белка CRABP1 и степенью

клеточной дифференцировки. В недифференцированных и низкодифференцированных НБ экспрессия этого белка была ниже, чем в созревающих и зрелых опухолях (ганглионейробластомах и ганглионевромах) [9]. Мы показали также, что уровень экспрессии CRABP1 имеет статистически достоверную обратную зависимость от наличия генетических нарушений [9]. В настоящей работе нами были проведены исследования зависимости экспрессии белка CRABP1 в первичном очаге и метастазах опухоли от типа генетических нарушений (амплификация гена *MYCN*, делеция локуса 11q23) и эффекта проведенной терапии у пациентов с НБ.

Материалы и методы

Исследование было проведено на биопсийном материале опухоли 2 пациентов с диагнозом НБ в возрасте 2 и 4 лет, получавших лечение в НИИ детской онкологии и гематологии НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина в 2018 г. Исследовались образцы опухоли до начала специального лечения и после проведенной полихимиотерапии (первичная опухоль, метастазы в лимфатических узлах (ЛУ) и печени).

Изучение экспрессии белка CRABP1 проводилось методом иммуногистохимии по стандартной методике с использованием первичных антител anti-CRABP1 (Sigma-Aldrich). В качестве вторичных антител использовали систему детекции Super Sensitive™ Polymer-HRP (BioGenex). Результат реакции — окрашивание цитоплазмы опухолевых клеток. Интенсивность окрашивания белка CRABP1 колебалась от полного отсутствия продукта реакции до яркой, распространенной окраски цитоплазмы клеток.

Оценка генетических нарушений в образцах НБ проводилась методом флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH) на парафиновом срезе опухоли с использованием методики обработки срезов высоким давлением для уменьшения фоновой окраски. Использовались следующие флуоресцентные зонды: *MYCN* (2p24)/*AFF3* (2q11) (Kreatech) и *MLL* (11q23)/*SE 11* (Kreatech).

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 зонды.

Результаты

В наше исследование вошли образцы НБ 2 пациентов до (биопсийный материал) и после проведенной специальной терапии (операционный материал). Оба пациента с НБ 4-й стадии, получавшие программное лечение в НИИ детской онкологии и гематологии НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина, включающее 6 курсов индук-

ционной полихимиотерапии, хирургическое лечение, высокодозную химиотерапию с аутологичной трансплантацией костного мозга и лучевую терапию.

Известно, что с течением времени после лечения опухоль претерпевает изменения: происходит ее созревание, наблюдается лечебный патоморфоз [10]. Оценка патоморфоза после терапии проводилась с учетом сочетанных признаков — дистрофических явлений, свидетельствующих о некробиотических процессах в опухолевых клетках, и появления крупных клеток с клеточными отростками.

Клинический случай № 1

Пациент У., 2 года (на момент постановки диагноза), НБ левого надпочечника, 4-я стадия, метастазы в забрюшинных, надключичных и шейных ЛУ справа, в печени, костях, костном мозге.

В целях верификации опухоли была выполнена биопсия шейного ЛУ. Гистологически опухоль состояла из недифференцированных нейробластов (симптогониев). Шванновские клетки, строма и ганглиозные клетки отсутствовали (рис. 1а).

*При молекулярно-генетическом исследовании не было выявлено амплификации гена *MYCN* и делеции локуса 11q23.*

Экспрессия белка CRABP1 в опухолевых клетках отсутствовала (0 %) (рис. 1б).

Пациенту проведены 3 программных курса полихимиотерапии, достигнут очень хороший частичный ответ, далее выполнено хирургическое вмешательство в объеме адреналэктомии слева с забрюшинной лимфодиссекцией и биопсией печени.

*При гистологическом исследовании первичного очага опухоли наблюдались признаки лечебного патоморфоза II степени, недифференцированных нейробластов (симптогониев) стало меньше, появились признаки созревания — розеткоподобные структуры, достаточно крупные ядра. В пределах опухоли можно было наблюдать участки разной степени дифференцировки вплоть до созревающих нейробластов (рис. 1в). При молекулярно-генетическом исследовании не было выявлено амплификации гена *MYCN*. В 20 % опухолевых клеток была обнаружена делеция локуса 11q23 (рис. 1г). Слабая цитоплазматическая экспрессия белка CRABP1 определялась в 30 % опухолевых клеток (рис. 1д).*

*В метастатическом ЛУ опухоль представлена нейробластами с начальными признаками созревания в сочетании с очагами некрозов. При молекулярно-генетическом исследовании не было выявлено амплификации гена *MYCN*. В 65 % опухолевых клеток была обнаружена делеция локуса 11q23. Слабая и умеренная цитоплазматическая экспрессия белка CRABP1 определялась в 70 % опухолевых клеток (рис. 1е).*

*В метастазе в печени определялись признаки лечебного патоморфоза, опухоль состояла из недифференцированных нейробластов без признаков созревания. При молекулярно-генетическом исследовании не было выявлено амплификации гена *MYCN*. В 15 % опухолевых*

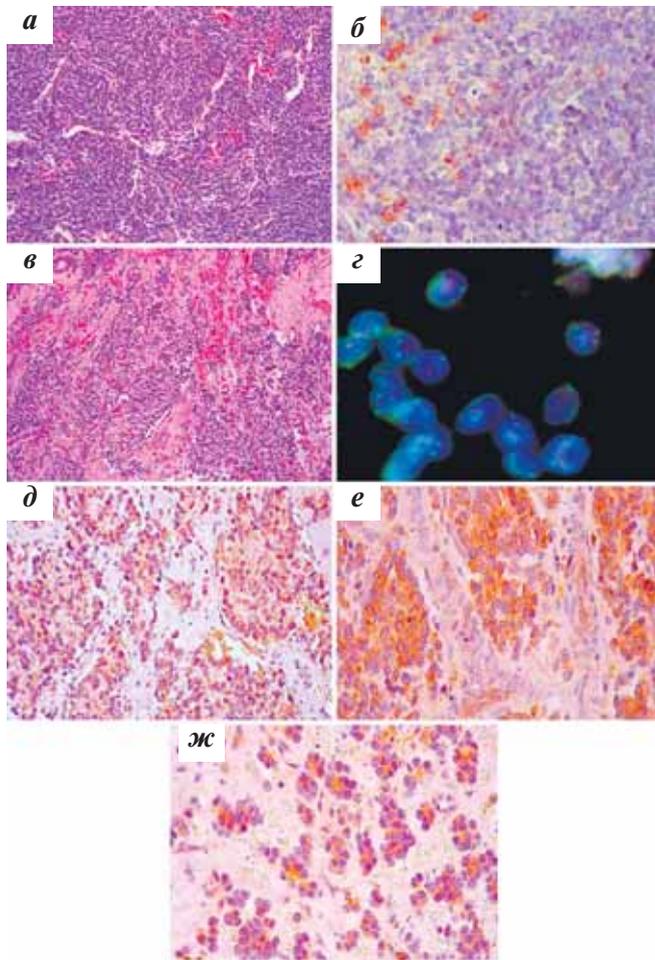


Рис. 1. Гистологическое строение НБ (окраска гематоксилином и эозином), экспрессия белка CRABP1 и результат FISH-реакции у пациента № 1: а – биопсия шейного ЛУ, $\times 100$; б – экспрессия белка CRABP1 в биопсии, $\times 400$; в – гистологическое строение первичного очага опухоли, $\times 100$; г – делеция локуса 11q в первичном очаге (красный сигнал – локус 11q23, зеленый сигнал – центромерная область 11-й хромосомы), $\times 1000$; д – экспрессия белка CRABP1 в первичном очаге, $\times 200$; е – экспрессия белка CRABP1 в метастатическом ЛУ, $\times 400$; ж – экспрессия белка CRABP1 в метастазе в печени, $\times 400$

Fig. 1. The histological structure of neuroblastoma (stained with hematoxylin and eosin), expression of the protein CRABP1 and the result of the FISH reaction in patient No. 1: а – biopsy of the cervical lymph node, $\times 100$; б – expression of protein CRABP1 in a biopsy, $\times 400$; в – the histological structure of the primary tumor focus, $\times 100$; г – deletion of the 11q locus in the primary focus (red signal is the 11q23 locus, green signal is the centromeric region of the 11th chromosome), $\times 1000$; д – expression of protein CRABP1 in the primary focus, $\times 200$; е – expression of protein CRABP1 in the metastatic lymph node, $\times 400$; ж – expression of CRABP1 protein in liver metastasis, $\times 400$

клеток была обнаружена делеция локуса 11q23. Слабая цитоплазматическая экспрессия белка CRABP1 определялась в 10 % опухолевых клеток (рис. 1ж).

По окончании программного лечения у ребенка достигнут полный ответ (ПО) на проводимую терапию.

При контрольном обследовании через 12 мес от окончания специальной терапии (рентгеноконтрастная томограмма органов брюшной полости и забрюшинного пространства с внутривенным контрастированием, сцинтиграфия с ^{123}I -метайодбензилгуанидином, цитологическое исследование костного мозга) данных за рецидив заболевания нет.

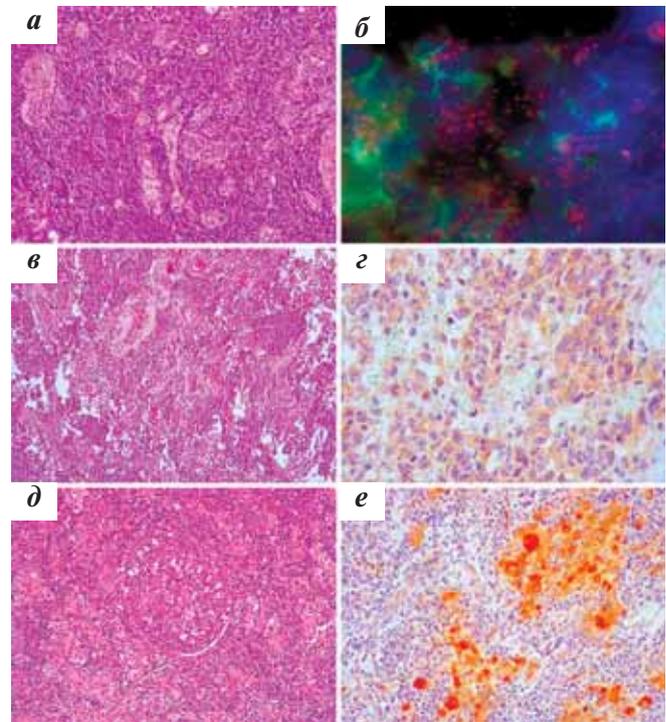


Рис. 2. Гистологическое строение НБ (окраска гематоксилином и эозином), экспрессия белка CRABP1 и результат FISH-реакции у пациента № 2: а – биопсия опухоли, $\times 100$; б – амплификация гена MYCN в биопсии (красный сигнал – ген MYCN, зеленый сигнал – центромерная область 2-й хромосомы), $\times 1000$; в – гистологическое строение первичного очага опухоли, $\times 100$; г – экспрессия белка CRABP1 в первичном очаге, $\times 400$; д – гистологическое строение метастатического ЛУ, $\times 100$; е – экспрессия белка CRABP1 в метастатическом ЛУ, $\times 200$

Fig. 2. The histological structure of neuroblastoma (stained with hematoxylin and eosin), expression of the protein CRABP1 and the result of the FISH reaction in patient No. 2: а – biopsy of the tumor, $\times 100$; б – amplification of the MYCN gene in a biopsy (the red signal is the MYCN gene, the green signal is the centromeric region of the 2nd chromosome), $\times 1000$; в – the histological structure of the primary tumor focus, $\times 100$; г – expression of protein CRABP1 in the primary focus, $\times 400$; д – the histological structure of the metastatic lymph node, $\times 100$; е – expression of protein CRABP1 in the metastatic lymph node, $\times 200$

Клинический случай № 2

Пациент К., 4 года (на момент постановки диагноза). НБ правого надпочечника, 4-я стадия, метастазы в забрюшинных ЛУ, печени, легких.

В целях верификации опухоли была выполнена открытая биопсия новообразования. Гистологически опухоль состояла из недифференцированных нейробластов (симпатогониев) (рис. 2а).

При молекулярно-генетическом исследовании в 80 % опухолевых клеток была выявлена амплификации гена MYCN в виде двойных ацентрических мини-хромосом (dmin). Делеции локуса 11q23 не выявлено. Наблюдалась внутриопухолевая гетерогенность по степени амплификации (числу сигналов гена MYCN) среди клеток одной и той же опухоли (от 15 до 30 сигналов/ядро) (рис. 2б).

Слабая и умеренная цитоплазматическая экспрессия белка CRABP1 определялась в 25 % опухолевых клеток.

Пациенту проведены 4 программных курса полихимиотерапии, достигнут частичный ответ, затем выполнено хирургическое вмешательство в объеме адrenaлэктомии справа с забрюшинной лимфодиссекцией и резекцией S7 печени.

При гистологическом исследовании первичного очага у этого пациента опухоль состояла из менее дифференцированных клеток по сравнению с пациентом № 1. Однако наблюдались признаки созревания (рис. 2в). При молекулярно-генетическом исследовании не было выявлено амплификации гена MYCN и делеции локуса 11q23. Слабая и умеренная цитоплазматическая экспрессия белка CRABP1 определялась в 40 % опухолевых клеток (рис. 2г).

В метастатическом ЛУ опухоль имела строение ганглионейробластомы со зрелыми ганглиозными клетками (рис. 2д). При молекулярно-генетическом исследовании не было выявлено амплификации гена MYCN и делеции локуса 11q23. Выраженная цитоплазматическая экспрессия белка CRABP1 определялась в 90 % опухолевых клеток (рис. 2е).

В метастатическом очаге в печени определялись признаки созревания опухоли. При молекулярно-генетическом исследовании амплификация гена MYCN выявлялась в единичных опухолевых клетках (10–11 сигналов/ядро), не определялась делеция локуса 11q23. Умеренная и выраженная цитоплазматическая экспрессия белка CRABP1 определялась в 90 % опухолевых клеток.

В операционном материале пациента № 2 наблюдалась гетерогенность амплификации по участку опухоли, т. е. отсутствие амплификации в первичном очаге НБ после проведенного лечения и наличие амплифицированных клеток в метастазе опухоли в печени.

По окончании программного лечения у ребенка достигнут ПО на проводимую терапию.

При контрольном обследовании через 9 месяцев от окончания специального лечения (рентгеноконтрастная томограмма органов брюшной полости и забрюшинного пространства с внутривенным контрастированием, сцинтиграфия с ¹²³I-метайодбензилгуанидином, цитологическое исследование костного мозга) данных за рецидив заболевания нет.

Результаты исследования 2 пациентов представлены в таблице.

Отрицательная иммуногистохимическая реакция при оценке экспрессии белка CRABP1 была характерна для абсолютно незрелых опухолей. С нарастанием процессов созревания число клеток, дающих положительную реакцию, повышалось. В опухолях, которые по своей морфологии представляли собой промежуточное звено между НБ 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.

Из данных, представленных в таблице, видно, что происходило увеличение экспрессии белка CRABP1 в опухолях после лечения по сравнению с первоначальной биопсией. Было отмечено, что степень и интенсивность экспрессии белка CRABP1 отличается в образцах НБ разной степени зрелости. Созревание клеток НБ зависело от типа генетических нарушений (амплификация гена MYCN или делеция локуса 11q23): при наличии амплификации созревание опухоли происходило более выражено, чем при наличии делеции. Таким образом, или проведенная химиотерапия помогла отбору клона, способного к дальнейшей дифференцировке, или в результате лечения происходило повышение уровня клеточной дифференцировки, и, как следствие, повышение экспрессии CRABP1.

Обсуждение

Первыми прогностически значимыми факторами при НБ являлись стадия заболевания и возраст пациента на момент постановки диагноза. Вместе с этим, в настоящее время учитываются гистологические и генетические факторы [4, 7, 10–14]. Эти параметры мы постарались рассмотреть в данном исследовании на примере 2 пациентов с диагнозом НБ 4-й стадии

Результаты гистологического, генетического и иммуногистохимического исследований биопсийного и операционного материала (первичный очаг и метастазы опухоли) 2 пациентов с НБ

Results of histological, genetic and immunohistochemical studies of biopsy and surgical material (primary lesion and tumor metastases) in 2 patients with neuroblastoma

Показатель Indicators	Биопсия до лечения Biopsy before treatment	После проведенного лечения After treatment		
		1 очаг 1 tumor focus	метастазы в ЛУ lymph metastases	метастазы в печени liver metastases
Пациент № 1 Patient No. 1				
Гистология Histology	Недифференцированная Undifferentiated	Признаки созревания Signs of maturation	Признаки созревания Signs of maturation	Недифференцированная Undifferentiated
Генетические изменения Genetic changes	MYCN– del11q–	MYCN– del11q+ (20 %)	MYCN– (2p gain) del11q+ (65 %)	MYCN– (2p gain) del11q+ (15 %)
Экспрессия CRABP1, % Expression of CRABP1, %	0	30	70	10
Пациент № 2 Patient No. 2				
Гистология Histology	Недифференцированная Undifferentiated	Признаки созревания Signs of maturation	Ганглионейробластома Ganglioneuroblastoma	Признаки созревания Signs of maturation
Генетические изменения Genetic changes	MYCN+ del11q–	MYCN– del11q–	MYCN– del11q–	MYCN+ del11q–
Экспрессия CRABP1, % Expression of CRABP1, %	25	40	90	90

до и после проведенного лечения. Детальный анализ опухоли позволит дать точную характеристику и определить параметры, влияющие на ее поведение после проведенной терапии.

Ранее нами было показано наличие статистически достоверной зависимости между уровнем экспрессии белка CRABP1 и степенью клеточной дифференцировки [9]. В настоящем исследовании мы также отмечаем, что в более зрелых образцах НБ экспрессия белка CRABP1 была больше по сравнению с недифференцированными. В метастатическом ЛУ пациента № 2 опухоль была представлена ганглионейробластомой, и экспрессия белка CRABP1 наблюдалась практически в 90 % опухолевых клеток. Подобная зависимость была отмечена и при карциномах яичника. В нормальной ткани яичников экспрессия CRABP1 была больше, чем в клетках карциномы. 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 [15].

Помимо этого, в процессе химиотерапии зачастую происходит повышение дифференцировки опухолевых клеток, отсюда и усиление экспрессии белка CRABP1 в опухоли после проведенного лечения. Или это обратный процесс – усиление экспрессии белка и, как результат, повышение дифференцировки? В подобных случаях уровень экспрессии этого белка может служить дополнительным маркером для более точной оценки дифференцировки опухолевых клеток до и после лечения.

У пациента № 1 в операционном материале после проведенного лечения определялась делеция локуса 11q23, которая не наблюдалась в биоптате ЛУ до терапии. Подобное расхождение результатов объясняется малым объемом биопсийного материала и гетерогенностью опухоли. Делеция 11q23 служит прогностическим маркером в группе опухолей без амплификации гена *MYCN* [16, 17] и ассоциирована с низкой степенью дифференцировки опухоли, что мы также отмечали при сравнении гистологических характеристик образцов опухоли у 2 больных до начала лечения. Помимо этого, в результате терапии уровень клеточной дифференцировки у пациента № 1 увеличивался незначительно, что может быть также связано с наличием делеции локуса 11q23. Делеция

генов-супрессоров опухоли, локализующихся в локусе 11q23, вовлечена в прогрессию НБ [18].

У пациента № 2 в результате проведенного лечения в первичном очаге и в метастатическом ЛУ не определялась амплификация гена *MYCN*, тогда как единичные амплифицированные клетки сохранялись в метастазе в печени, однако число сигналов гена *MYCN* было снижено по сравнению с количеством сигналов этого гена в образце биоптата опухоли до лечения. В этом случае можно предположить, что происходит явление элиминации (удаления) амплифицированных последовательностей в виде двойных ацентрических мини-хромосом (*dmin*) из ядра под воздействием лекарств, так как *dmin* это нестабильная структура. Потеря клеткой амплифицированных последовательностей коррелирует с потерей злокачественных свойств и уровнем клеточной дифференцировки [19–22]. У пациента № 2 отмечается созревание опухоли вплоть до ганглионейробластомы и вместе с этим нарастает экспрессия белка CRABP1, что служит дополнительным маркером увеличения уровня клеточной дифференцировки.

В научных публикациях есть сообщения о том, что амплификация гена *MYCN* происходит на определенном этапе созревания нейробласта [23], возможно поэтому первоначальный уровень дифференцировки НБ у этих 2 больных отличается, если оценивать его по экспрессии белка CRABP1 (экспрессия белка выше у пациента № 2 с амплификацией гена *MYCN*). Ранее нами на первичных тканевых культурах НБ было показано, что амплификация гена *MYCN* не выявлялась в наиболее клоногенных образцах НБ, представленных клетками I-типа (незрелыми клеточными элементами), а наблюдалась в клетках N-типа (зрелых клетках) [24], что подтверждается и литературными данными [25]. Что же касается прогностической ценности определения статуса *MYCN*, то последний, по всей видимости, очень важен для оценки вероятности спонтанного разрешения опухолевого процесса [26–28].

Заключение

Полученные нами предварительные результаты на примере 2 пациентов с НБ свидетельствуют о целесообразности проведения детального анализа опухоли для более точного определения параметров, влияющих на ее поведение после лечения, которые могут стать клинически и прогностически значимыми факторами.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Schulte J.H., Schulte S., Heukamp L.C., Astrahantseff K., Stephan H., Fischer M., Schramm A., Eggert A. Targeted therapy for neuroblastoma: ALK inhibitors. *Klin Padiatr* 2013;225(6):303–8. doi: 10.1055/s-0033-1357132.
- Park J.R., Bagatell R., London W.B., Maris J.M., Cohn S.L., Mattay K.K., Hogarty M.; COG Neuroblastoma Committee. Children's Oncology Group's 2013 blueprint for research: neuroblastoma. *Pediatr Blood Cancer* 2013;60(6):985–93. doi: 10.1002/pbc.24433.
- Whittle S.B., Smith V., Doherty E., Zhao S., McCarty S., Zage P.E. Overview and recent advances in the treatment of neuroblastoma. *Expert Rev Anticancer Ther* 2017;17(4):369–86. doi: 10.1080/14737140.2017.1285230.
- Maris J.M. Recent advances in neuroblastoma. *N Engl J Med* 2010;362(23):2202–11. doi:10.1056/NEJMra0804577.
- Park J.R., Eggert A., Caron H. Neuroblastoma: biology, prognosis, and treatment. *Hematol Oncol Clin North Am* 2010;24(1):65–86. doi: 10.1016/j.hoc.2009.11.011.
- Chatten J., Shimada H., Sather H.N., Wong K.Y., Siegel S.E., Hammond G.D. Prognostic value of histopathology in advanced neuroblastoma: a report from the Children's Cancer Study Group. *Hum Pathol* 1988;19(10):1187–98. doi: 10.1016/s0046-8177(88)80151-5.
- Shimada H., Ambros I.M., Dehner L.P., Hata J., Joshi V.V., Roald B., Stram D.O., Gerbing R.B., Lukens J.N., Matthay K.K., Castleberry R.P. The International Neuroblastoma Pathology Classification (the Shimada system). *Cancer* 1999;86(2):364–72. PMID: 10421273.
- Lastowska M., Cotterill S., Pearson A.D., Roberts P., McGuckin A., Lewis I., Bown N. Gain of chromosome arm 17q predicts unfavourable outcome in neuroblastoma patients. U.K. Children's Cancer Study Group and the U.K. Cancer Cytogenetics Group. *Eur J Cancer* 1997;33(10):1627–33. doi: 10.1016/s0959-8049(97)00282-7.
- Строганова А.М., Чемерис Г.Ю., Чевкина Е.М., Сендерович А.И., Карселадзе А.И. Белок CRABP 1 и его роль в процессе дифференцировки нейробластомы. Вестник ФГБУ «РОИЦ им. Н.Н. Блохина» 2016;27(2):157–63. [Stroganova A.M., Chemeris G.Yu., Chevkina E.M., Senderovich A.I., Karseladze A.I. CRABP protein 1 and its role in the process of differentiation neuroblastoma. Bulletin of the Federal State Budgetary Institution "N.N. Blokhin Russian Scientific Center" = Journal of N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center 2016;27(2):157–63. (In Russ.)].
- Jogi A., Vaapil M., Johansson M., Pahlman S. Cancer cell differentiation heterogeneity and aggressive behavior in solid tumors. *Upsala J Med Sci* 2012;117(2):217–24. doi: 10.3109/03009734.2012.659294.
- Campbell K., Gastier-Foster J.M., Mann M., Naranjo A.H., Van Ryn C., Bagatell R., Matthay K.K., London W.B., Irwin M.S., Shimada H., Granger M.M., Hogarty M.D., Park J.R., DuBois S.G. Association of *MYCN* copy number with clinical features, tumor biology, and outcomes in neuroblastoma: a report from the Children's Oncology Group. *Cancer* 2017;123(21):4224–35. doi: 10.1002/cncr.30873.
- Lastowska M., Cullinane C., Variend S., Cotterill S., Bown N., O'Neill S., Mazzocco K., Roberts P., Nicholson J., Ellershaw C., Pearson A.D., Jackson M.S.; United Kingdom Children Cancer Study Group and the United Kingdom Cancer Cytogenetics Group. Comprehensive genetic and histopathologic study reveals three types of neuroblastoma tumors. *J Clin Oncol* 2001;19(12):3080–90. doi: 10.1200/JCO.2001.19.12.3080.
- Nakazawa A., Haga C., Ohira M., Okita H., Kamijo T., Nakagawara A. Correlation between the International neuroblastoma pathology classification and genomic signature in neuroblastoma. *Cancer Sci* 2015;106(6):766–71. doi: 10.1111/cas.12665.
- Villamon E., Piqueras M., Mackintosh C., Alonso J., de Alava E., Navarro S., Noguera R. Comparison of different techniques for the detection of genetic risk identifying chromosomal gains and losses in neuroblastoma. *Virchows Arch* 2008;453(1):47–55. doi: 10.1007/s00428-008-0633-6.
- Miyake T., Ueda Y., Matsuzaki S., Miyatake T., Yoshino K., Fujita M., Nomura T., Enomoto T., Kimura T. CRABP1-reduced expression is associated with poorer prognosis in serous and clear cell ovarian adenocarcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2011;137(4):715–22. doi: 10.1007/s00432-010-0930-8.
- Attiyeh E.F., London W.B., Mosse Y.P., Wang Q., Winter C., Khazi D., McGrady P.W., Seeger R.C., Look A.T., Shimada H., Brodeur G.M., Cohn S.L., Matthay K.K., Maris J.M. Chromosome 1p and 11q deletions and outcome in neuroblastoma. *N Engl J Med* 2005;353(21):2243–53. doi: 10.1056/NEJMoa052399.
- Spitz R., Hero B., Simon T., Berthold F. Loss in chromosome 11q identifies tumors with increased risk for metastatic relapses in localized and 4S neuroblastoma. *Clin Cancer Res* 2006;12(11):3368–73. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-05-2495.
- Ho N., Peng H., Mayoh C., Liu P.Y., Atmadibrata B., Marshall G.M., Li J., Liu T. Delineation of the frequency and boundary of chromosomal copy number variations in paediatric neuroblastoma. *Cell Cycle* 2018;17(6):749–58. doi: 10.1080/15384101.2017.1421875.
- Moreau L.A., McGrady P., London W.B., Shimada H., Cohn S.L., Maris J.M., Diller L., Look A.T., George R.E. Does *MYCN* amplification manifested as homogeneously staining regions at diagnosis predict a worse outcome in children with neuroblastoma? A Children's Oncology Group study. *Clin Cancer Res* 2006;12(19):5693–7. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-06-1500.
- Ambros I.M., Rumpler S., Luegmayr A., Hattinger C.M., Strehl S., Kovar H., Gadner H., Ambros P.F. Neuroblastoma cells can actively eliminate supernumerary *MYCN* gene copies by micronucleus formation – sign of tumor cell reversion. *Eur J Cancer* 1997;33(12):2043–9. doi: 10.1016/s0959-8049(97)00204-9.
- Shimizu N., Shimura T., Tanaka T. Selective elimination of acentric double minutes from cancer cells through the extrusion of micronuclei. *Mutat Res* 2000;448(1):81–90. doi: 10.1016/s0027-5107(00)00003-8.
- Storlazzi C.T., Lonoce A., Guastadisegni M.C., Trombetta D., D'Addabbo P., Daniele G., L'Abbate A., Macchia G., Surace C., Kok K., Ullmann R., Purgato S., Palumbo O., Carella M., Ambros P.F., Rocchi M. Gene amplification as double minutes or homogeneously staining regions in solid tumors: Origin and structure. *Genome Research* 2010;20(9):1198–206. doi: 10.1101/gr.106252.110.
- Walton J.D., Kattan D.R., Thomas S.K., Spengler B.A., Guo H.F., Biedler J.L., Cheung N.K., Ross R.A. Characteristics of stem cells from human neuroblastoma cell lines and tumors. *Neoplasia* 2004;6(6):838–45. doi: 10.1593/neo.04310.
- Табаков В.Ю., Строганова А.М., Честков В.В., Карселадзе А.И. Новые возможности использования метода тканевых культур в диагностической онкоморфологии на примере нейробластомы и рака молочной железы. Архив патологии 2011;73(3):34–40. [Tabakov V.Yu., Stroganova A.M., Chestkov V.V., Karseladze A.I. New feasibility of using a tissue culture technique in diagnostic oncomorphology in case of neuroblastoma and breast cancer. *Arkhiv patologii = Pathology Archive* 2011;73(3):34–40. (In Russ.)].
- Bian X., McAllister-Lucas L.M., Shao F., Schumacher K.R., Feng Z., Porter A.G., Castle V.P., Opari A.W. NF-κB activation mediates doxorubicin-induced cell death in N-type neuroblastoma cells. *J Biol Chemistry* 2001;276(52):48921–9. doi: 10.1074/jbc.M108674200.
- Cohn S.L., Tweddle D.A. *MYCN* amplification remains prognostically strong 20 years after its "clinical debut". *Eur J Cancer* 2004;40(18):2639–42. doi: 10.1016/j.ejca.2004.07.025.
- Schwab M. *MYCN* in neuronal tumors. *Cancer Lett.* 2004;204(2):179–87. doi: 10.1016/S0304-3835(03)00454-3
- Stigliani S., Coco S., Moretti S., Oberthuer A., Fischer M., Theissen J., Gallo F., Garavento A., Berthold F., Bonassi S., Tonini G.P., Scaruffi P. High genomic instability predicts survival in metastatic high-risk neuroblastoma. *Neoplasia* 2012;14(9):823–32. doi: 10.1593/neo.121114.