

Друй А.Е.^{1,2,3}, Валамина И.Е.^{1,2}, Заславская Т.В.^{1,2}, Шориков Е.В.¹, Цаур Г.А.^{1,2,3},
Зайчиков А.Н.¹, Тупоногов С.Н.¹, Фечина Л.Г.^{1,3}

Стандарт морфологического и молекулярно-биологического исследования нейробластомы

1 - ГБУЗ СО Областная детская клиническая больница №1, Екатеринбург; 2 - ГБОУ ВПО «Уральский государственный медицинский университет», Екатеринбург; 3 – ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий», г. Екатеринбург.

Druy A.E., Valamina I.E., Zaslavskaya T.V., Shorikov E.V., Tsaur G.A., Zaichikov A.N.,
Tuponogov S.N., Fechina L.G.

Standard of morphological and molecular biological investigations in neuroblastoma

Резюме

В статье приведены результаты морфологического и молекулярно-биологического исследования 87 случаев нейробластомы у детей, верифицированных с учетом принятых стандартов исследования данной опухоли. Приведены морфологические варианты и критерии диагностики нейробластомы в рамках современных классификаций, а также современные подходы к стратификации больных нейробластомой на группы риска для проведения селективной риск-адаптированной терапии. Амплификация гена MYCN и делеция короткого плеча хромосомы 1 в клетках нейробластомы являются неблагоприятными прогностическими факторами и используются в различных схемах стратификации пациентов на группы риска. Проанализирована бессобытийная выживаемость (БСВ) и общая выживаемость (ОВ) в группах пациентов при наличии генетических aberrаций и при неблагоприятной гистологической форме опухоли.

Ключевые слова: нейробластома, морфологическая диагностика, амплификация гена MYCN, делеция короткого плеча хромосомы 1

Summary

87 cases of primary neuroblastoma verified according to current standards of morphological and molecular genetic diagnostics are reviewed in the paper. Morphological variants and diagnostics criteria of tumor as well as risk groups stratification criteria are summarized. MYCN gene amplification and 1p deletion are designated as adverse molecular genetic features. Prognostic impact of genetic aberrations and unfavorable histology were calculated using event-free and overall survival values.

Key words: neuroblastoma, morphologic diagnostics, MYCN gene amplification, 1p deletion

Введение

Нейробластома – наиболее часто встречающаяся у детей эмбриональная злокачественная опухоль экстракраниальной локализации. На ее долю приходится 7-10 % всех детских опухолей. До 90% случаев нейробластом возникает у детей младше 6 лет, при этом наибольшая частота регистрируется у детей раннего возраста. У детей первого года жизни нейробластома занимает первое место среди всех злокачественных опухолей. Опухоль происходит из незрелых клеток-предшественников симпатической нервной системы и может локализоваться в любой области, где располагаются элементы симпатической нервной системы (надпочечники, шейный, грудной, брюшной симпатический отделы, параганглии).

Клиническое течение нейробластомы во многом определяется биологическими свойствами клеток опухоли и представлено в широком диапазоне от относительно

доброкачественных форм с признаками дифференцировки клеточных элементов до агрессивных опухолей с местным распространением и отдаленными метастазами. Морфологически эта группа опухолей варьирует от незрелых эмбриональных опухолей из нейробластических клеток-предшественников, которые возникли пренатально, до зрелых ганглионевром. Незрелые нейробластические опухоли в раннем детском возрасте могут созревать, дифференцироваться. Опухоли имеют уникальные молекулярно-генетические характеристики. Примерно в 20-25% случаев выявляется амплификация гена MYCN и потеря гетерозиготности в локусе 1p36. Они являются важными прогностическими факторами и используются для определения группы риска. В большом количестве моно- и мультицентровых клинических исследованиях [1,2,3,4], а также в собственных исследованиях [5] показано неблагоприятное прогностическое значение ампли-

фикации гена MYCN и делеции короткого плеча хромосомы 1 в опухоли.

Согласно современным схемам, совокупность клинических данных (возраст ребенка, локальная стадия, наличие отдаленных метастазов) и молекулярно-биологическая характеристика опухолевых клеток позволяют стратифицировать больных нейробластомой на группы риска и проводить селективную риск-адаптированную терапию.

Цель работы - выявить морфологические особенности и частоту генетических aberrаций (амплификация гена MYCN и делеция 1p) в нейробластомах у детей разных возрастных групп и оценить прогностическое значение морфологических характеристик опухоли и генетических aberrаций.

Материалы и методы

Исследование проведено на базе Областной детской клинической больницы №1 (г. Екатеринбург). В исследование вошли 87 случаев нейробластомы у детей за период с 2002 по 2015 гг, возрастной диапазон пациентов 0,1 - 168 месяцев, 45,5% (40) пациентов были дети младше 1 года. Соотношение девочек и мальчиков составило 1,2:1 (47 и 40 пациентов соответственно). Стандарт верификации нейробластомы в тканевых образцах включал в себя морфологическое (при необходимости иммуногистохимическое) и молекулярно-биологическое исследование опухоли. Произведено морфологическое исследование 87 образцов опухолей (операционный и биопсийный материал), во всех случаях морфологически верифицирована нейробластома различной степени дифференцировки (от нейробластомы до ганглионевромы).

Кусочки тканей с опухолью фиксировались в 10% нейтральном формалине в течение 24 часов и заливались в парафин по общепринятой методике. Гистологические срезы окрашивались гематоксилином-эозином, пикрофуксином по ван Гизону. Морфологическая диагностика проводилась согласно критериям международной гистологической классификации INPC [6] и системы стадирования Hughes [7]. При недифференцированных и низкодифференцированных вариантах нейробластома была подтверждена иммуногистохимическим методом. (Synaptophysin +, Neuron-specific enolase +, CD 56 +) В 77 случаях опухолевый субстрат был исследован методами молекулярной биологии на наличие делеции короткого плеча хромосомы 1 (1p) и амплификации гена MYCN. Исследовалась нативная опухолевая ткань, полученная в ходе оперативного вмешательства или образцы ткани из парафиновых блоков.

Для выявления делеции 1p применялись анализ варибельного числа tandemных повторов в области теломерного региона 1p методом полимеразной цепной реакции (ПЦР), множественная лигазно-зависимая амплификация зондов (MLPA) и флуоресцентная in situ гибридизация (FISH) по методикам, описанным ранее [5, 8]. Определение количества копий хромосомного региона 2p24, включающего ген MYCN осуществлялось с помощью ПЦР в режиме реального времени, MLPA и FISH.

Прогностическое значение морфологических характеристик опухоли и выявленных генетических aberrаций оценивалось на основании расчета показателей бессобытийной (БСВ) и общей выживаемости пациентов (ОВ). Анализ различий ОВ и БСВ пациентов проводился с помощью Log-Rank теста. Различия считались статистически достоверными при $p < 0,05$. Медиана времени наблюдения за пациентами составила 2,37 года (диапазон 0,10-16,01 лет).

Результаты и обсуждение

В проведенном исследовании морфологически были верифицированы все варианты нейробластических опухолей, согласно критериями международной классификации INPC, рекомендуемой ВОЗ, в разных соотношениях. Из группы нейробластом, бедных шванновской стромой, недифференцированная нейробластома была представлена в 14 случаях (16,1%). В 49 случаях (56,3%) диагностирована низкодифференцированная нейробластома (Рис. 1, 2 эти рисунки к статье см. на специальной цветной вкладке журнала – прим. ред.), в 3 случаях (3,4%) выявлена дифференцирующаяся нейробластома (Рис. 3 этот рисунок к статье см. на специальной цветной вкладке журнала – прим. ред.). Из опухолей, богатых шванновской стромой, ганглионейробластома смешанного типа верифицирована в 14 случаях (16,1%), в 2 случая (2,3%) выявлена ганглионейробластома нодулярного типа и в 4 случаях (4,6%) опухоли были представлены ганглионевромами: 3 случая - вызревающие ганглионевромы (Рис. 4 этот рисунок к статье см. на специальной цветной вкладке журнала – прим. ред.), 1 случай - зрелая ганглионеврома. Морфологическая характеристика гистологических вариантов приведена в таблице 1.

В нашей клинике лечение больных осуществляется в соответствии со схемой программной терапии NB2004 и стратификацией пациентов на группы риска. Концепция терапии больных высокого и среднего рисков различная, также имеется группа больных, подлежащих динамическому наблюдению с возможностью проведения химиотерапии при развитии жизнеугрожающих симптомов заболевания. Стратификация по группам риска проводится с учетом возраста пациента, стадии процесса и молекулярно-генетических характеристик опухоли. При этом морфологический вариант опухоли как критерий стратификации для выбора тактики лечения не учитывается. С этих позиций представляется важным проанализировать частоту встречаемости морфологических вариантов нейробластических опухолей в различных возрастных группах и наличия в опухоли генетических aberrаций (амплификации гена MYCN и делеции 1p). Разбивка на возрастные периоды проведена с учетом критериев стратификации по рискам. Выделено три возрастных периода: от 0 до 1 года, от 1 года (включительно) до 5 лет и старше 5 лет. Нейробластомы у детей до 1 года отличаются благоприятным прогнозом и редко имеют генетические aberrации и при их отсутствии в опухолевом субстрате, вне зависимости от морфологи-

Таблица 1. Краткая морфологическая характеристика нейробластических опухолей, согласно критериями международной классификации INPC

Нейробластома (мелкие нейробласты, шванновская строма в небольшом количестве или отсутствует). Группа опухолей, бедных шванновской стромой	
Подтип	Гистологические особенности
Недифференцированная нейробластома	Мелко-круглоклеточная опухоль. Требуется ИГХ исследование (дифференциальный диагноз с другими эмбриональными опухолями).
Низкодифференцированная нейробластома	Встречаются нейробласты с наличием отростков (нейропилы). Дифференцирующиеся нейробласты составляют менее 5% (клетки характеризуются увеличением количества эозинфильной или амфифильной цитоплазмы, увеличением ядра, появлением ядрышек).
Дифференцирующаяся нейробластома	Нейропил хорошо выражен. Дифференцирующиеся нейробласты составляют более 5%.
Ганглионейробластома (группа опухолей, богатых шванновской стромой)	
Ганглионейробластома смешанного типа	Шванновская строма составляет более 50% объема опухоли. Микроскопические фокусы нейробластических элементов перемежаются с участками шванновской стромы. Нейробластические фокусы состоят из смеси нейробластических клеток, находящихся на разных стадиях дифференцировки. Обычно преобладают дифференцирующиеся нейробласты и созревающие ганглиозные клетки в окружении обильного нейропиля. Недифференцированные и низкодифференцированные нейробласты могут присутствовать.
Ганглионейробластома нодулярного типа	Один или более макроскопически определяемый узел в сочетании с ганглионейробластомой смешанного типа и/или ганглионевромой (сочетание участков, богатых шванновской стромой, с преобладанием шванновской стромы, бедные шванновской стромой участки). Пропорции вариабельны. В компоненте, бедном шванновской стромой, как правило, есть кровоизлияния.
Ганглионевромы (в строме преобладает шванновская строма, среди которой определяются разрозненные нейрональные клетки)	
Ганглионеврома вызревающая	В шванновской строме распределены зрелые ганглиозные клетки, дифференцирующиеся нейробласты и незрелые ганглиозные клетки.
Ганглионеврома зрелая	В шванновской строме распределены зрелые ганглиоциты.

ческого варианта, нейробластома относится к группе низкого риска (при локализованных опухолях и стадии 4S). В возрастной группе старше 5 лет преобладают зрелые опухоли, однако в ряде случаев отмечается развитие недифференцированных опухолей, характеризующихся агрессивным течением и специфическими биологическими характеристиками.

По нашим данным у детей раннего возраста (от 0 до 1 года) преобладали низкодифференцированные и недифференцированные нейробластома (94%), при этом генетические aberrации были выявлены в 10 из 35 случаев нейробластом (в 28,6%). Локализованные опухоли или опухоли 4S стадии у младенцев могут подвергаться регрессии, в этих случаях достаточно наблюдение или проведение умеренно интенсивной химиотерапии при развитии жизнеугрожающих симптомов заболевания. Среди детей старше 1 года низкодифференцированные и недифференцированные нейробластома были верифицированы в 30 из 52 случаев (57%), при этом в 18 опухолевых образцах выявлены генетические aberrации (в 60%). Остальные опухоли морфологически имели в той или иной степени признаки дифференцировки и со-

зрелания нейробластов и относились к другим группам (дифференцирующаяся нейробластома, ганглионейробластома смешанного и нодулярного типов), однако в части этих опухолей также были выявлены генетические aberrации (в 6 из 16 случаев).

В целом, делеция 1p была выявлена у 21 пациента (27,3%) и во всех случаях затрагивала локус 1p36.3 и теломерный регион с вовлечением гена-супрессора опухолевого роста CHD5. БСВ в группе пациентов с наличием делеции 1p была ниже, чем у пациентов без делеции ($0,38 \pm 0,12$ и $0,70 \pm 0,08$ соответственно, $p=0,033$) (рисунок 5, А.). ОВ в группе с делецией 1p также была ниже, по сравнению с большими, не имеющими данной aberrации: $0,48 \pm 0,13$ и $0,77 \pm 0,08$ соответственно ($p=0,037$) (рисунок 5, Б.).

Амплификация гена MYCN является наиболее неблагоприятной молекулярно-генетической аномалией при нейробластоме. Она была обнаружена в 14 случаях (18,2%). БСВ в группе пациентов с амплификацией MYCN была достоверно ниже, чем у пациентов с нормальным количеством копий гена MYCN ($0,23 \pm 0,14$ и $0,69 \pm 0,07$ соответственно, $p=0,010$) (рисунок 6, А.).

ОВ в группе с амплификацией гена MYCN также была ниже, по сравнению с больными, имеющими опухоль с нормальным количеством копий исследуемого гена: $0,40 \pm 0,16$ и $0,73 \pm 0,07$ соответственно ($p=0,008$; рисунок 6,Б.).

Было проанализировано прогностическое значение морфологических характеристик опухоли на БСВ и ОВ пациентов (Рис.7А и Рис.7Б). Показатели выживаемости в группе пациентов с недифференцированными, низкодифференцированными нейробластомами и ганглионейробластомой нодулярного типа (БСВ – $0,29 \pm 0,09$, ОВ – $0,41 \pm 0,10$) была ниже, чем у пациентов с более благоприятной гистологией (БСВ – $0,79 \pm 0,07$, ОВ – $0,89 \pm 0,06$), в обоих случаях $p < 0,001$.

Заслуживает внимания тот факт, что 5 случаев низкодифференцированной нейробластомы возникли у детей старшего возраста: 2 случая в возрасте 8 лет и 3 случая в возрасте 11 лет. Данные опухоли характеризовались агрессивным клиническим течением, при этом в клетках отсутствовали молекулярно-генетические aberrации, определяющие неблагоприятный прогноз (делеция короткого плеча хромосомы 1, амплификация гена MYCN). Данный феномен связан с изменением молекулярных механизмов онкогенеза нейробластомы после достижения пациентами возраста 5 лет. Изменение биологических характеристик опухоли обусловлено сменой спектра драйверных aberrаций: увеличение материала длинного плеча хромосомы 17 и гиперэкспрессия гена

MYCN утрачивают значение, а делеция короткого плеча хромосомы 3, напротив, становится важным патогенетическим и прогностическим фактором [9,10].

Заключение

Таким образом, при морфологическом исследовании 87 случаев нейробластических опухолей у детей в возрасте от 0 до 164 месяцев в 49 случаях (56,3%) была выявлена низкодифференцированная нейробластома и в 14 (16,1%) - недифференцированная нейробластома, в 3 (3,4%) - дифференцирующиеся нейробластома. Ганглионейробластома смешанного типа верифицирована в 14 случаях (16,1%), в 2(2,3%) -ганглионейробластома нодулярного типа и в 4 (4,6%) – ганглионевромы. Делеция 1p была определена в опухолевом субстрате в 21 случае (27,3%) и затрагивала локус 1p36.3 и теломерный регион с вовлечением гена-супрессора опухолевого роста CHD5. Амплификация гена MYCN была обнаружена в 14 случаях (18,2%). При этом генетические aberrации наиболее часто выявлялись в опухолях из группы недифференцированных и низкодифференцированных нейробластом, а также в ганглионейробластоме нодулярного типа.

Бессобытийная и общая выживаемость в группе пациентов при генетических aberrациях (с амплификацией MYCN и /или наличием делеции 1p) была достоверно ниже, по сравнению с больными, имеющими опухоль без указанных генетических aberrаций. Молекулярно-биологические характеристики нейробластомы обладают

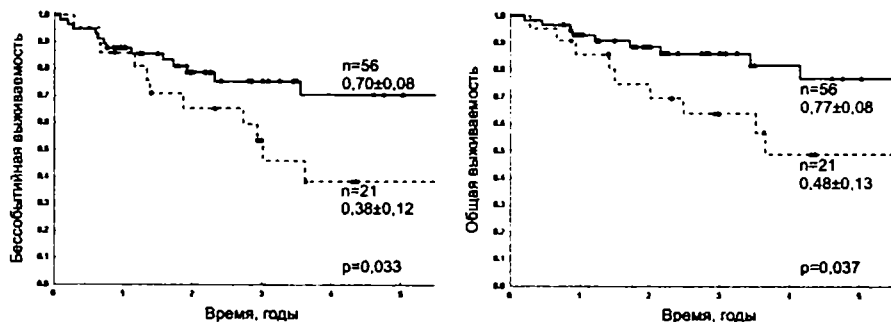


Рисунок 5. Бессобытийная (А.) и общая (Б.) выживаемость пациентов при наличии делеции короткого плеча хромосомы 1 (пунктирная линия) и отсутствии aberrации (сплошная линия).

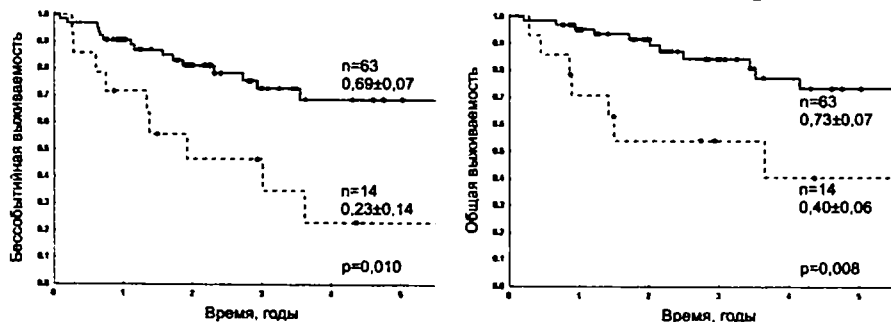


Рисунок 6. Бессобытийная (А.) и общая (Б.) выживаемость пациентов при наличии амплификации гена MYCN (пунктирная линия) и нормальном количестве копий гена MYCN (сплошная линия).

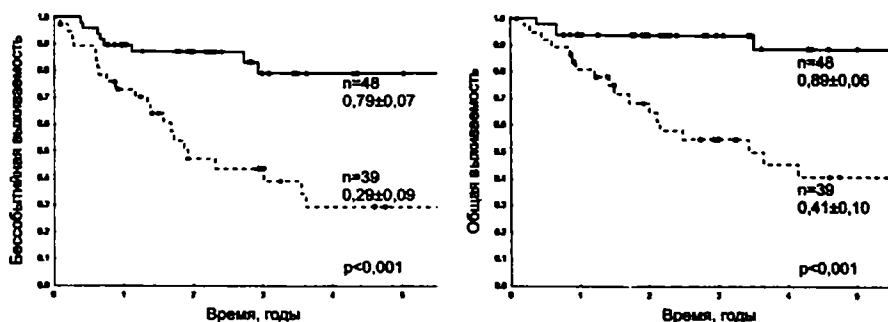


Рисунок 7. Бессобытийная (А.) и общая (В.) выживаемость пациентов при неблагоприятных (пунктирная линия) и благоприятных (сплошная линия) гистологических характеристиках опухоли.

прогностическим значением и используются в качестве критериев для стратификации пациентов на группы риска с целью проведения риск-адаптированной терапии.

Приведенные данные определяют необходимость проведения полноценного морфологического и молекулярно биологического исследования ткани опухоли, которое лежит в основе современного стандартного диагностического алгоритма при опухолях симпатической нервной системы и надпочечников. ■

Друй А.Е., к.м.н., врач клинической лабораторной диагностики лаборатории молекулярной биологии, иммунофенотипирования и патоморфологии ГБУЗ СО «Областная детская клиническая больница №1», Валамина И.Е., к.м.н., доцент кафедры патологической анатомии УГМУ Минздрава России, Заславская Т.В., врач патологоанатом лаборатории молекулярной биологии, иммунофе-

нотипирования и патоморфологии ГБУЗ СО «Областная детская клиническая больница №1», Шориков Е.В., к.м.н., заведующий отделением клинической онкологии ГБУЗ города Москвы «Морозовская детская городская клиническая больница», Цатур Г.А., к.м.н., заведующий лабораторией молекулярной биологии, иммунофенотипирования и патоморфологии ГБУЗ СО «Областная детская клиническая больница №1», Зайчиков А.Н., заведующий отделением детской онкологии №1 ГБУЗ СО «Областная детская клиническая больница №1», Тупоногов С.Н., врач детский онколог отделения детской онкологии №1 ГБУЗ СО «Областная детская клиническая больница №1», Фечина Л.Г., к.м.н. заместитель главного врача по онкологии и гематологии ГБУЗ СО «Областная детская клиническая больница №1», Автор, ответственный за переписку - Валамина И.Е., 620149, г.Екатеринбург, ул. Онуфриева, д.20-а, тел. (343) 2148794, email: ivalamina@mail.ru

Литература:

1. Brodeur, G.M. Neuroblastoma. / G.M. Brodeur, T. Sawada, Y. Tsuchida. – New York: Elsevier Science. – 2000. – 21 p.
2. Cheung N.K.V. Neuroblastoma. / N.K.V. Cheung, S.L. Cohn. – New York: Springer, 2005. – 189 p.
3. Schmidt, M. Is there a benefit of 131 I-MIBG therapy in the treatment of children with stage 4 neuroblastoma? A retrospective evaluation of The German Neuroblastoma Trial NB97 and implications for The German Neuroblastoma Trial NB2004 / M. Schmidt, T. Simon, B. Hero et al // Nuklearmedizin. – 2006. – Vol. 45. – P. 145-151.
4. Yanik, G.A. Semiquantitative mIBG scoring as a prognostic indicator in patients with stage 4 neuroblastoma: a report from the Children's oncology group / G.A. Yanik, M.T. Parisi, B.L. Shulkin et al // J. Nucl. Med. – 2013. – Vol. 54. – P. 541-548.
5. Друй А.Е. Методы выявления и прогностическое значение увеличения генетического материала короткого плеча хромосомы 2 и делеции короткого плеча хромосомы 1 у больных нейробластомой / А.Е. Друй, Г.А. Цатур, Е.В. Шориков [и др.] // Вопросы онкологии. – 2013. – №5. – С. 591-598.
6. Shimada H, Ambros IM, Dehner LP, Hata J, Joshi VV, Roald B (1999) Terminology and morphologic criteria of neuroblastic tumors. Recommendations by the International Neuroblastoma Pathology Committee. Cancer, 86: 349–363
7. Hughes M, Marsden HB, Palmer MK (1974) Histologic patterns of neuroblastoma related to prognosis and clinical staging. Cancer, 34: 1706-1711.
8. Друй А.Е. Амплификация гена MYCN при нейробластоме. Методы выявления и прогностическое значение / А.Е. Друй, Г.А. Цатур, Е.Р. Семенова [и др.] // Медицинская генетика. – 2012. – №9. – С. 25-30.
9. Друй А.Е. Прогностическое значение амплификации гена MYCN, делеции короткого плеча хромосомы 1 и делеции длинного плеча хромосомы 11 у пациентов с нейробластомой / А.Е. Друй, Г.А. Цатур, Е.В. Шориков [и др.] // Педиатр. – 2013. – №1. – С. 41-48.
10. Друй А.Е. Аномалии числа копий генов и хромосомных регионов в клетках нейробластомы: патогенетическое и прогностическое значение, методы выявления / А.Е. Друй, Г.А. Цатур, Е.В. Шориков, Л.И. Савельев, Л.Г. Фечина // Вестник уральской медицинской академической науки. – 2014. – №5 (51). С. 120-127.



Рис. 3. Экспрессия AE1/AE3 при атипичной мелкоацинарной пролиферации предстательной железы. Высокий уровень экспрессии высокомолекулярного панцитокератина AE1/AE3 (3 балла) в цитоплазме железистого эпителия. Цитоплазма клеток стромы метку данного маркера не содержит. Окраска: иммуногистохимический метод – моноклональные антитела к панцитокератину AE1/AE3. $\times 200$

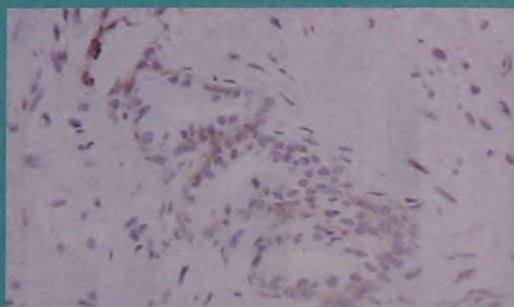


Рис. 4. Экспрессия D2-40 при атипичной мелкоацинарной пролиферации предстательной железы. Экспрессия панцитокератина D2-40 в цитоплазме базального эпителия железы. В цитоплазме базального эпителия видны гранулы коричневого цвета, содержащие метку данного маркера, в отличие от секреторного эпителия, где метка отсутствует. Окраска: иммуногистохимический метод – моноклональные антитела к пан-цитокератину D2-40. $\times 200$

Друй А.Е., Валамина И.Е., Заславская Т.В., Шориков Е.В., Цаур Г.А., Зайчиков А.Н., Тупоногов С.Н., Фечина Л.Г.
Стандарт морфологического и молекулярно-биологического исследования нейробластомы

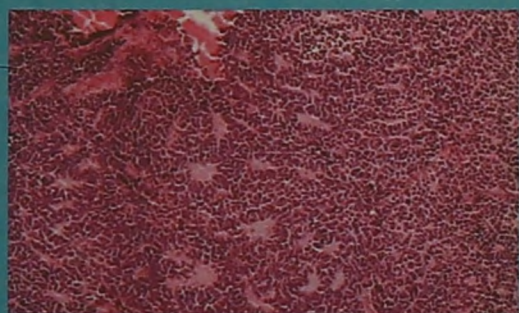


Рисунок 1. Низкодифференцированная нейробластома: умеренно полиморфные недифференцированные клетки, между которыми определяется слабо выраженный нейропил. Имеются множественные розетки Хомера Райта с фибриллярностью в центре. Окраска гематоксилином-эозином. Ув. 100.



Рисунок 2. Низкодифференцированная нейробластома. Среди нейропиля лежат недифференцированные нейробласты, определяются дифференцирующиеся нейробласты (составляют менее 5%). Окраска гематоксилином-эозином. Ув. 200.

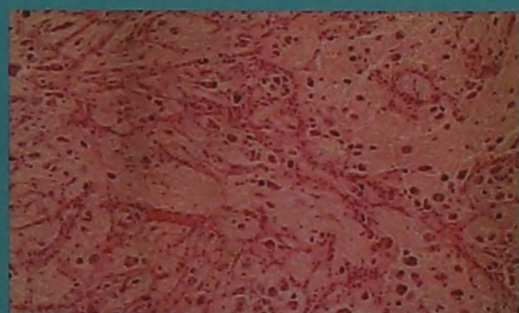


Рисунок 3. Дифференцирующаяся нейробластома. Нейропил хорошо развит. Определяются нейробласты на разных стадиях дифференцировки. Окраска гематоксилином-эозином. Ув. 200.

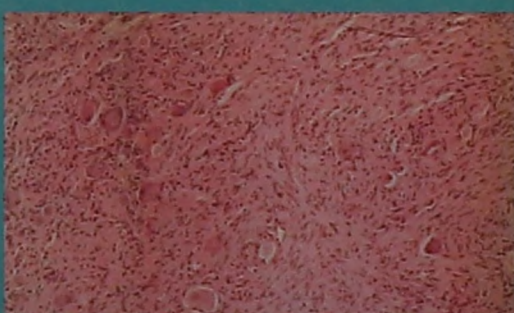


Рисунок 4. Ганглоневрома вызревающая. В хорошо развитой шванновской строме распределены зрелые и вызревающие ганглиозные клетки, дифференцирующиеся нейробласты. Окр. гематоксилином-эозином, $\times 200$.