

Національний інститут раку, Київ

ВЕРИФІКАЦІЯ ТА ПРОГНОЗУВАННЯ ПЕРЕБІГУ НЕЙРОБЛАСТОМИ (огляд літератури)



О. М. Грабовий, Н. М. Храновська,
М. Б. Зарецький, Г. І. Климнюк

Адреса:

Грабовий Олександр Миколайович
Національний інститут раку
03022, Київ, вул. Ломоносова, 33/43
Тел.: (044) 258-11-24
E-mail: agrabovoy@yandex.ru

Ключові слова: нейробластома,
верифікація, прогноз.

Нейробластома є однією з найбільш специфічних для дитячого віку солідних злоякісних пухлин. На сьогодні імуногістохімічні та молекулярно-генетичні дослідження при нейробластомі є необхідним компонентом діагностики, методами виявлення мікрометастазів і мінімальної залишкової хвороби в кістковому мозку, а також складовими системи стратифікації хворих за групами ризику, що є необхідними умовами виконання сучасних протоколів лікування. Незважаючи на всі досягнення у верифікації та прогнозуванні перебігу нейробластоми, ця проблема ще не є вирішеною. Завданням сьогоднішніх досліджень нейробластоми є не тільки вдосконалення підходів до визначення гістогенетичного типу пухлини, її окремих імуногістохімічних та молекулярно-генетичних ознак, а й комплексна оцінка цих та інших ознак з їх взаємозв'язками, які можуть виступати у якості високоінформативних критеріїв прогнозу розвитку пухлини.

Нейробластома (НБ) є однією з найбільш специфічних для дитячого віку солідних злоякісних пухлин, яка зустрічається найчастіше і становить приблизно 8% всіх онкологічних захворювань у дітей, займає 6-те місце в структурі дитячої онкозахворюваності. Щорічно реєструється 8–10 НБ на 1 млн живонароджених дітей. У 50% випадків НБ діагностуються у дітей у віці до 1 року, в 2,75% випадків — до 4 років та в 90% — до 10 років. Піки захворюваності припадають на дітей у віці до 1 року та 2–4 років. Серед хворих співвідношення хлопчики/дівчатка становить 1,2:1 [75]. Частота виявлення НБ при аутопсіїх більш ніж у 400 разів перевищує клінічну маніфестацію цих пухлин, що вказує на їх спонтанну інволюцію у більшості дітей [61]. Первинна пухлина частіше локалізується в наднирковій залозі (32%), паравертебрально в заочеревинному просторі (28%), у задньому середостінні (15%), значно рідше в ділянці малого таза (6%) та шиї (2%) [17, 90].

НБ має здатність до раннього гематогенного метастазування, і майже у 50% хворих при надходженні в клініку спостерігаються метастази в кістковий мозок (КМ) та кістки, лімфатичні вузли [18]. Первинно-метастатичну форму виявляють у 25% спостережень у дітей у віці до 1 року і в 68% — у дітей старших 1 року.

Згідно з даними SEER [48] загальна 5-річна виживаність при НБ зросла з 24% у 1960–1963 рр. до 54% — в 1985–1994 рр., 5-річна виживаність у дітей віком до 1 року становить 83%, від 1 до 5 років — 55% та старших 5 років — 40%.

НБ належить до групи ембріональних пухлин, таких як гепатобластома, нефробластома, ембріональна рабдіоміосаркома. Ці пухлини характеризуються

маніфестацією в ранньому віці, мають схожі цитоморфологічні характеристики, притаманні ембріональним пухлинам. Разом з тим НБ відрізняється низкою специфічних унікальних ознак її біологічної поведінки, не притаманних іншим злоякісним пухлинам:

1. Здатність до спонтанної регресії. Однак досі не виявлено жодної ознаки, яка визначає злам у перебігу захворювання від прогресування до регресії [29, 36, 100].

2. Здатність до диференціювання. У культурі клітин, що була отримана з агресивної пухлини, у процесі росту спостерігалися явища диференціювання [8]. Деякі речовини здатні ініціювати цей процес *in vitro*: фактор росту нервової тканини, деякі цитостатики, папаверин, ретиноева кислота. Однак до сьогодні не було повідомлень про успішну індукцію процесу диференціювання *in vivo*. За даними Berthold [15] диференціювання злоякісних НБ у доброякісні пухлини відбувається доволі рідко (1:1150), проте переконливо.

3. Здатність до стрімкого агресивного розвитку та бурливого метастазування [18].

НБ виникає з ембріональних нейробластів, які походять з нервового гребеня і утворюють ганглії периферичного відділу нервової системи та надниркову залозу [53, 66]. Сучасна гістологічна класифікація периферичних нейробластичних пухлин, запропонована Міжнародним комітетом з патології НБ після адаптації раніше існуючих систем Yoshi і Shimada, включає 4 категорії новоутворень [82, 96]:

- НБ (з бідною строюмою зі шваннівських клітин);
- гангліонейробластома зі змішаним клітинним складом (багату шваннівською строюмою);

- гангліонейрому (з переважанням стромального компонента);
- гангліонейробластома нодулярну зі складною будовою (багату на строми, з переважанням строми та бідною стромою).

НБ типова (синоніми: симпатогіома, симпатична НБ, ембріональна симпатоматоза) є низькодиференційованою пухлиною, представленою переважно дрібними круглими клітинами з гіперхромними ядрами, не рідко зі своєрідним розташуванням хроматину в вигляді зерен та вузьким обідком цитоплазми («голі ядра»). Досить часто зустрічаються й клітини дещо більших розмірів, що нагадують симпатобласти (мають світле ядро та цитоплазму, пилоподібний хроматин), а також клітини типу лемобластів. Клітини розміщуються хаотично, залежно від кількості строми. Місцями спостерігаються «розетки» та «псевдорозетки» у вигляді послідовності клітин, між якими знаходиться ніжволокниста субстанція (розетки Homer-Wright). Зустрічаються також окремі багатоядерні клітини, що нагадують гангліозні та інколи, групуючись, утворюють «завитки» [65]. Пухлина часто містить великі ділянки некрозу. Інтерстиційні кровоносники відносно часто зустрічаються в менш диференційованих пухлинах. Дифузна інфільтрація лімфоцитами типова для більш диференційованих пухлин. Наявність кальцифікатів — характерна ознака НБ, а їх кількість може збільшуватися у процесі вірної відповіді пухлини на терапію [52, 89].

Гангліоневрома (синоніми: неврогангліома, гангліонарна неврома) належить за своєю природою до доброякісних пухлин. Являє собою щільний, часточкової будови вузол, добре відокремлений від оточуючих тканин. Мікроскопічно характерна наявність клітин типу гангліозних, що розкидані поодинокі або групами та оточені пухкими прошарками сполучної тканини та нервових волокон, з наявністю серед них шваннівських елементів та фіброцитів. Місцями формуються «завихрення», серед яких власне і скупчуються клітини типу лемоцитів, що мають неправильну форму, велике ядро з крупними грудками хроматину. Часом спостерігаються групи клітин типу симпатобластів з інтенсивно забарвленими ядрами та тонким обідком цитоплазми [65].

Гангліонейробластома (синоніми: злоякісна гангліоневрома, гангліозно-клітинна НБ) відносять до проміжної форми пухлин — між гангліоневромою та типовою НБ. Гангліонейробластома дуже схожа за гістологічною будовою на гангліоневрому, проте менш щільна та здатна до проростання у суміжні тканини, тому часто її також називають злоякісною гангліоневромою. Мікроскопічно її відмінними особливостями є присутність, окрім великих гангліозних клітин та лемоцитів, значної

кількості нейрокитів різного ступеня диференціювання, більш схожих на нейробласти. Поряд із дрібними нейроцитами зустрічаються великі багатоядерні клітини з вакуолізованою цитоплазмою. Клітини розкидані по нижній фібрилярній субстанції. Також часто спостерігаються мітози та вогнища некрозу, утворення дрібних кіст [78, 81, 93].

Причини виникнення НБ невідомі, і жодних конкретних впливів оточуючого середовища або факторів ризику досі не виявлено. За даними епідеміологічних досліджень виникло припущення у якості етіопатогенетичних факторів НБ розглядати вживання матір'ю алкоголю, нейротропних ліків, діуретиків чи впливу на батьків протягом тривалого часу електромагнітного поля [23].

Дуже юний вік більшості пацієнтів з НБ та диференційований стан клітин нашоухують на думку, що рушійні події індукції пухлини відбуваються в пренатальний період чи на дуже ранніх етапах життя. Отже, НБ може розглядатися як прояв злоякісного аберантного розвитку симпатичної нервової системи. Відомо, що НБ доволі часто супроводжується іншими захворюваннями, пов'язаними з аномаліями розвитку похідних нервового гребеня: хворобою Гіршпрунга, синдромом вродженої центральної гіповентиляції, нейрофіброматозом та ін. [7, 16].

Переважає більшість НБ виникає без сімейної історії, однак 1–2% вперше виявлених пухлин мають сімейний анамнез [61]. Донедавна, однак, мало було відомо про генетичні основи цієї хвороби. Нещодавно було встановлено ключову роль мутації ALK у зародковій лінії при розвитку більшості спадкових форм та наявність мутацій в гені *ALK* у 5–15% спорадичних випадків прогресуючої НБ [34, 46, 49, 68]. ALK (anaplastic lymphoma kinase) — рецептор тирозинкінази, уперше виявлений при аналізі специфічної транслокації, пов'язаної з рідкісною формою неходжкінської лімфоми. Прояв цих мутацій характеризується високою кіназою активністю та значним онкогенетичним потенціалом [71].

Діти зі спорадичними або сімейними НБ у поєднанні з синдромом вродженої центральної гіповентиляції, хворобою Гіршпрунга, як правило, також мають мутації з втраченою функцією гена *PHOX2B* [67]. ДНК-асоційований білок, що кодується *PHOX2B*-геном, є членом родини paired homeobox білків і транскрипційним фактором, залученим у регуляцію нейрогенезу, що відіграє ключову роль у ранній диференціації симпатoadреналової гілки з клітин нервового гребеня. Доведено його вирішальне значення у розвитку НБ, у тому числі сімейних форм [92].

Діагностичний комплекс для НБ включає:

1. Аналіз пухлинної тканини за допомогою світлової мікроскопії (з іму-

ногістохімічним (ІГХ) дослідженням, електронної мікроскопії.

2. Аналіз аспірату КМ або трепанобіопсії на вміст клітин НБ.

3. Виявлення підвищеного рівня сироваткових катехоламінів (наприклад дофаміну і норадrenalіну) та їх попередників і метаболітів в сироватці або сечі (ванілінмгдалевої та гомованілінової кислот).

4. Виявлення біомаркерів для оцінки прогнозу перебігу захворювання та стратифікації хворих за групами ризику до початку лікування.

Допоміжними сироватковими маркерами пухлинного росту для діагностики НБ є рівень нейронспецифічної енолази, феритину та гангліозидів [84, 98].

За морфологією типова НБ належить до сімейства дрібнокруглоклітинних пухлин і при звичайній світловій мікроскопії часто важко визначити гістологічний тип пухлини, особливо враховуючи те, що в різних зрізах її будова може значно відрізнятися за клітинністю, ознаками дозрівання та кількістю строми. Виходячи з великої імовірності допущення помилки при оцінці новоутворення за препаратами, забарвленими гематоксиліном та еозинном, необхідне проведення ІГХ дослідження [40]. Найчастіше імунофенотипування пухлини проводиться на матеріалі, ущільненому в парафіні, хоча можливе й на заморожених зрізах. Важливим елементом відтворення повної картини захворювання є також ІГХ виявлення клітин пухлини у КМ, для чого використовуються як мазки з пунктів, так і трепанобіоптати, ущільнені в парафіні.

У діагностиці НБ у панелі антитіл, що можуть бути використані, основну групу становлять нейрональні маркери [2, 40, 51, 64, 73, 99], серед яких найбільш специфічними є антитіла до нейрофіламентів (NF) і антигену NB84. Їх експресія у пухлині, що складається з дрібних круглих клітин, з високою вірогідністю вказує на НБ. Але за цих умов обов'язковим є виключення неспецифічності чи аберантності реакції, що визначається використанням мінімум двох нейрональних маркерів, зовнішнього контролю та включення до панелі маркерів, відсутніх в НБ (віментин (Vim), десмін (Des), CD45). Однак особливо слід відзначити, що експресія NF і NB84 може бути відсутня у значній частині випадків НБ низького диференціювання. У такому разі верифікація проводиться з використанням інших нейрональних маркерів (нейронспецифічної енолази (NSE), синаптофізину (Syn), хромограніну А (CGA), Leu-7 (CD57)). Але вони є значно менш специфічними та можуть виявлятися у дуже схожих морфологічно пухлинах, таких як саркома Юінга/PNET, рабдіоміосаркома, десмопластична дрібнокруглоклітинна пухлина (табл. 1).

Таблиця 1 Панель основних антитіл, які використовуються при діагностиці та диференційній діагностиці нейробластом та інших пухлин з малих округлих клітин

Тип пухлини	Маркери, що використовуються в рутинній діагностиці																			
	Vim	CK	Des	CD45	NF	NB84	NSE	PGP 9,5	Syn	CGA	CD57	CD56	S-100	CD99	Flt-1	Osteocalcin	Myo D1	WT1	CD34	
НБ	+	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-
Рабдоміосаркома	+++	-	+++	-	-	+	++	+	+	+	++	++	+	+	-	-	+++	-	-	
Саркома Юінга/PNET	++	+	-	-	++	++	++	+	++	++	+	+	+	+++	++	-	-	-	-	
Дрібноклітинна синовіальна саркома	+++	+++	-	-	+	-	++	+	-	-	+++	+++	+	+	-	-	-	-	-	
Мезенхімальна хондросаркома	+++	-	-	-	-	+	+	-	-	-	++	++	+++	+	-	-	-	-	-	
Дрібноклітинна остеосаркома	+++	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+++	-	-	-	
Десмопластична дрібнокруглоклітинна пухлина	+++	+++	+++	-	+	-	++	-	++	++	+	+	+	+++	-	-	+++	-	-	
Злоякісна лімфома	++	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	+	+	-	++	+	-	-	-	+	

Примітка: «+++» – зустрічається в більш ніж 75% пухлин; «++» – зустрічається в 50–75% пухлин; «+» – зустрічається в 10–50% пухлин; «-» – зустрічається в менш ніж 10% пухлин; * – виявляється у підтримуючих клітинах пухлини.

Значимим для діагностики НБ є застосування антитіла проти білка S-100, який виявляється у стромальних елементах НБ. Цей маркер, крім того, що вказує на нейральне походження пухлини, дозволяє більш чітко визначити у складі НБ нейральну строму, хоча остання може бути відсутня у варіанті НБ бідної на шваннівську строму [21, 31, 80].

Наш досвід свідчить, що прицільне ІГХ дослідження на НБ виправдовує себе тільки при локалізації дрібнокруглоклітинної пухлини лише у наднирковій залозі. У цьому випадку ми використовуємо панель, що включає Vim, Des, NF, Syn, S-100, CD99. При результатах Vim⁺, Des⁺, NF⁺, Syn⁺, S-100⁺, CD99⁺ практично однозначно пухлина визначається як НБ. У ряді випадків у цій панелі можуть бути негативними NF⁻ і S-100⁻, що потребує обов'язкового застосування додатково інших нейрональних маркерів (за зростанням інформативності — NB84, NSE, CD57, CD56, CGA), оскільки встановлення типу новоутворення за одним маркером є малодостовірним.

При виявленні дрібнокруглоклітинної пухлини інших локалізацій ми вважаємо доцільним проводити поетапне дослідження. На першому етапі ставимо Vim, Des, NSE та у разі Vim⁺, Des⁺, NSE⁺ прицільно ставимо реакції для підтвердження НБ.

Слід однак зазначити, що приблизно кожний 10-й випадок НБ потребує для верифікації визначення понад 10 маркерів, а висновок робиться шляхом виключення інших гістогенетичних типів пухлин. У третині таких випадків встановити точний діагноз НБ допомагають молекулярно-генетичні дослідження.

Одним із найважливіших завдань для сучасної патологічної анатомії є не тільки встановлення гістогенетичного типу пухлини, а й визначення факторів прогнозу для дітей, хворих на НБ, при дослідженні матеріалу первинної біопсії пухлини або операційного матеріалу [6]. Виявлення цих факторів патологом дозволяє визначити групу ризику та призначити адекватну протипухлинну терапію, а у майбутньому оцінити її ефективність за відповіддю пухлини на лікування [1, 3].

На основі гістопатологічної класифікації Шимади (Shimada) розроблена Міжнародна патологічна класифікація НБ (INSP), в якій виділяють 2 гістологічні групи пухлин зі сприятливою та несприятливою гістопатологічною будовою [74, 79, 82]. Для цього враховується:

1. Ступінь диференціації нейробластів.
2. Наявність або відсутність шваннівської строми (багаті стромою, збіднені стромою).
3. Індекс клітинної проліферації (МКІ — мітотично-каріорексичний індекс, індекс Шимади — підраховується кількість мітозів та каріорексисів на 5000 пухлинних клітин).
4. Нодулярність будови.
5. Вік хворого.

Гістологічна група зі сприятливим прогнозом:

- пацієнти будь-якого віку з багатою стромою пухлиною нодулярної будови;
- пацієнти молодші 18 міс з пухлиною зі збідненою стромою, МКІ нижчим за 200/5000, із диференційованими або недиференційованими нейробластами;
- пацієнти молодші 60 міс з пухлиною зі збідненою стромою, МКІ нижчим за 100/5000 та добре диференційованими клітинами пухлини.

Гістологічна група з несприятливим прогнозом:

- пацієнти будь-якого віку з пухлиною зі збідненою стромою та нодулярною будовою;
- пацієнти будь-якого віку з пухлиною зі збідненою стромою та нодулярною будовою, із диференційованими або недиференційованими нейробластами та МКІ вищим ніж 200/5000;
- пацієнти старші 18 міс із пухлиною зі збідненою стромою, недиференційованими НБ та МКІ вищим ніж 100/5000;
- пацієнти старші 18 міс із пухлиною зі збідненою стромою, диференційованими НБ та МКІ вищим за 100–200/5000;
- пацієнти старші 60 міс із пухлиною зі збідненою стромою, диференці-

йованими НБ та МКІ нижчим ніж 100/5000.

Слід зазначити, що гістопатологічна класифікація НБ є дуже корисним інструментом, оскільки допомагає виділити групи хворих, яким потрібні агресивні протоколи лікування або зниження інтенсивності лікування після дослідження біопсійного та післяопераційного матеріалу [65].

Тепер усе більшого значення набувають біологічні прогностичні фактори, що базуються на результатах імунофенотипування та молекулярно-генетичного аналізу, які активно розробляються [40, 65, 95].

Серед ІГХ прогностичних маркерів при НБ одним із найвагоміших є визначення експресії глікопротеїну CD44, з яким пов'язують реалізацію метастатичного потенціалу різноманітних новоутворень [69]. Експресія CD44 на мембранах клітин НБ є показником сприятливого прогнозу [37, 38]. Також дуже важливе значення має рівень експресії маркерів проліферації, таких як Ki-67 та REPP 86, високий рівень асоціюється з несприятливим перебігом захворювання [54, 55, 63]. Є літературні дані [47], які свідчать, що висока експресія ендотеліального фактора росту судин (VEGF) у дітей старших 18 міс має чітку кореляцію з поганим прогнозом. У даний час продовжуються дослідження щодо оцінки ролі експресії мутантних маркерів апоптозу BCL-2 Вах у відповіді НБ на лікування [44]. Отримано дані щодо прогностичної сприятливості значущості експресії c-kit (CD117) в клітинах НБ [56, 97].

Слід зазначити, що для визначення прогнозу захворювання можливе використання деяких спеціальних гістологічних методів дослідження, що не є високоартістичними. Так, згідно з даними літератури [83] при дослідженні ділянок аргірофільних ядерцевих організаторів пухлинних клітин (AgNOR) у дітей з метастатичною НБ була визначена певна залежність між кількістю AgNOR у клітинах первинної пухлини, клітинах регіональних та віддалених метастазів і між прогнозом хвороби. Таким чином було визначено, що в НБ IV стадії кількість AgNOR найбільша в клітинах віддаленого

метастазу, в той час як у НБ IV S стадії їх кількість майже однакова, як у первинній пухлині, так і в регіональних та віддалених метастазах. Отже, цей метод дає можливість відобразити властивості метастатичної НБ, вказуючи на регрес пухлини та/або сприятливий прогноз [41].

На сьогодні молекулярно-генетичні та цитогенетичні дослідження є обов'язковою складовою діагностичного комплексу при НБ і разом із гістологічною класифікацією, стадією та віком хворого служать для встановлення групи ризику та вибору оптимальної тактики лікування [94]. Слід зазначити, що для НБ не відомо ніяких специфічних генетичних перебудов, які могли б служити в якості чітких діагностичних маркерів. Водночас для її клітин притаманний цілий комплекс цитогенетичних та молекулярних аномалій [26, 33, 42, 50]. Вони часто є причиною гетерогенності клінічного перебігу пухлини. Вважається, що коекспресія генів тирозингідроксилази та DOPA-декарбоксілази є вельми характерною для НБ, тому існує припущення, що ці маркери можуть бути використані в диференційній діагностиці НБ від інших дрібноклітинних пухлин дитячого віку [59, 60]. Комплекс основних цитогенетичних та молекулярних аномалій при НБ представлено у табл. 2 [5 з доповненнями].

У 2005 р. на зустрічі голів провідних педіатричних груп на основі досліджень даних 8800 пацієнтів, що лікувалися в Європі, Японії, США, Канаді та Австралії у період з 1990 по 2002 р., була запропонована Система міжнародної класифікації НБ за групами ризику (INRGSS) [9, 35]. Ця нова система включає також й індивідуальні генетичні характеристики пухлини — ампліфікацію гена *N-myc*, делецію 11q, плідність

ДНК та дозволяє розрізнити 4 групи ризику вже на етапі первинної діагностики: групу дуже низького ризику, групу низького ризику, групу проміжного ступеня ризику та групу високого ризику [20, 76]. На основі цієї класифікації пропонується нова система стадіювання INRG (L1, L2, M, MS), яка зараз перебуває на стадії удосконалення та потребує включення нових індивідуальних біологічних ознак пухлинних клітин (табл. 3).

Статус гена *n-myc* є центральним стратифікаційним біологічним маркером для визначення групи ризику незалежно від гістопатологічної будови НБ та ступеня її диференціювання [12, 14]. Ампліфікація гена *n-myc* чітко асоціюється із швидкою прогресією пухлини та поганим прогнозом у пацієнтів будь-якого віку та стадії захворювання [24]. Ампліфікація гена *n-myc* часто сягає 50–400 копій гена на клітину з відповідним високим рівнем його експресії. Це спостерігається у 25% первинних пухлин і корелює з прогресуючою стадією захворювання та резистентністю до лікування. В асоціації із ампліфікацією гена *n-myc* виявлено наявність ампліфікації деяких інших генів, таких як *DDX1*, *NAG* та *ALK*. Не дивлячись на це, важливо наголосити, що у великому відсотку випадків метастатичних НБ ампліфікація гена *n-myc* все-таки не виявляється. Тому пошук нових прогностичних та стратифікаційних генетичних маркерів при НБ або їх комплексу триває, і це є актуальною проблемою дитячої онкології. Пошук нових генетичних маркерів охоплює множинні перебудови геному та епігенетичні порушення в пухлинній клітині, що пов'язані з канцерогенезом при НБ.

Загалом, прогностично сприятливі форми НБ характеризуються здатністю до спонтанної регресії або дозрівання без цитотоксичної терапії. Ці пухлини майже

в усіх випадках поліплоїдні з невеликими сегментними хромосомними абераціями та з відсутністю ампліфікації генів [58]. Вміст у них ДНК становить близькі до триплоїдних значення. Гіперплоїдні пухлини без жодних структурних змін хромосом легше піддаються лікуванню та інколи здатні до спонтанної регресії [45]. Разом з тим плідність ДНК в якості монофактора має обмежене значення, оскільки анеуплоїдні пухлини можуть також мати сегментні хромосомні аберації (набуття або втрати лише частини хромосом) та ампліфікацію гена *n-myc*, що завжди визначає несприятливий перебіг пухлинного процесу [4]. НБ з агресивним перебігом характеризуються множинними сегментними абераціями хромосом та ампліфікаціями окремих генів, зокрема гена *n-myc* в 25% випадків первинних пухлин.

Як найбільш потенційно патогномнічні при НБ розглядаються хромосомні порушення, якими є делеції хромосомних ділянок 1p36.3 або 11q23, незбалансоване набуття довгих плечей хромосоми 17, а також делеції 3p, 4p, 9p та 12p [27, 62, 72, 85, 101]. Деякі з цих хромосомних аномалій асоційовані з ампліфікацією гена *n-myc*. Більш ніж у половині випадків НБ спостерігаються аномалії в довгому плечі 17-ї хромосоми. Незбалансований приріст 17q часто поєднується з незбалансованою транслокацією 1 або 11 хромосом [43]. Контрольні точки приросту 17q є різними, але вони завжди включають в себе район 17q22, що супроводжується посиленням ефекту одного чи більше генів. Ця аномалія асоціюється з більш агресивним перебігом захворювання.

Делеція 11q рідко зустрічається в пухлинах з ампліфікацією *n-myc*, однак асоційована з іншою групою НБ високого ступеня ризику [10, 28]. Висока частота

Таблиця 2 Молекулярні та цитогенетичні аномалії при нейробластомі

Тип аномалії	Хромосоми/гени
Кількісні аномалії хромосом	Гіпердиплоїдія, 3n, 4n, +17, +17q21-pter
Делеції	1p(1p36,3-p36,2), 11q23, 17p, 3p, 4p, 9p, 12p, 14q (14q23), 18q21, 1
Дуплікації та ампліфікації	1q21-q25, 17q, <i>N-myc</i> (2p24)
Втрата гетерозиготності	1p36, 14q32
Зміна експресії генів	<i>H-ras</i> , <i>MRP</i> , <i>CD44+</i> , <i>TrkA</i> , <i>ZF5-3</i> , теломераза, тирозингідроксилаза, DOPA-декарбоксілаза
Транслокації	1-ша, 11-та хромосоми

Таблиця 3 Система міжнародної класифікації нейробластом за групами ризику (INRGSS)

INRG стадія	Вік, міс	Гістологічна категорія/ступінь диференціювання	Статус гена <i>n-myc</i>	11q аберації	Плідність	Група ризику
L1/L2		Гангліоневрома зріла, гангліонейробластома проміжна	Немає ампліфікації			Дуже низький
L1		Будь-які, виключаючи гангліоневрому зрілу або проміжну	Є ампліфікація			Високий
L2	<18	Будь-які, виключаючи гангліоневрому зрілу або проміжну	Немає ампліфікації	Немає	Є	Низький
	≥18	Гангліонейробластома нодулярна, диференційована нейробластома	Немає ампліфікації	Немає	Є	Проміжний
		Гангліонейробластома нодулярна, низькодиференційована нейробластома або недиференційована нейробластома	Немає ампліфікації			Проміжний
			Є ампліфікація			Високий
M	<18		Немає ампліфікації		Гіперплоїдність	Низький
	<12		Немає ампліфікації		Диплоїдність	Проміжний
	12–<18		Немає ампліфікації		Диплоїдність	Проміжний
	<18		Є ампліфікація			Високий
MS	<18		Немає ампліфікації	Немає		Дуже низький
			Є ампліфікація	Є		Високий
						Високий

ламкості в 11q-делетованому районі дозволяє припускати хромосомну нестабільність фенотипу генів, розташованих в 11q. Одним із таких генів є *H2AFX*, що розташований в 11q23.3. *H2AFX* кодує варіант корового гістону H2A, який становить ~2–25% всього клітинного H2A і випадково вбудовується в нуклеосоми. *H2AFX* у фосфорильованому стані фланкує ДНК у місцях дволанцюгових розривів. При втраті однієї з алелей *H2AFX* спостерігається порушення геномної стабільності за відсутності p53. Ось чому зростання ламкості хромосом, що спостерігається у пухлинах з делецією 11q, може бути пояснено частковою втратою копії *H2AFX*. Слід зазначити, що на даний час ще остаточно не ідентифіковані гени (онкогени або гени-супресори), які знаходяться в аномальних ділянках хромосом та задіяні в патогенезі НБ.

Зміни функції білка p53 є одним з найбільш універсальних молекулярних порушень у клітинах при різних злоякісних новоутвореннях. Його інактивація призводить до менш ефективного функціонування внутрішньоклітинних сигнальних систем, що гальмують клітинний цикл при пошкодженнях, пригнічують індукцію апоптозу, зменшують ефективність репарації ДНК, підвищують ефективність адаптації до гіпоксії та стимулюють ангіогенез, інгібують диференціювання; зумовлюють сильну генетичну нестабільність, яка є промотором подальшої пухлинної прогресії. Втрата функціональної активності p53 значно підвищує темп появи клітин, що розмножуються, з різноманітними генетичними аномаліями. Слід зазначити, що залежність прогнозу перебігу злоякісного процесу при НБ від типу мутації в гені *TP53* поки вивчена доволі погано. Для НБ є більш характерним втрата ділянки хромосоми 17p, де розташовується ген *TP53*, мутації самого гена зустрічаються лише в 1–2% випадків [30].

Востанні роки виявлені нові механізми регуляції активності гена *TP53* та встановлена його значимість в прогресії НБ. Велика роль у цьому процесі відводиться епігенетичним факторам — мікроРНК. Нещодавно ідентифіковано мікроРНК 380, задіяну в зворотній регуляції активності гена *TP53* при НБ [88]. Ця мікроРНК не виявлена в нормальних клітинах здорової людини, але вона дуже активна в період розвитку ембріона. Також продемонстрована роль інших мікроРНК в регуляції генів, задіяних в патогенезі НБ. Показано, що miR-34a залучена у процес апоптозу, опосередкований p53, та інгібує експресію білка NMYS. Тому зниження рівня експресії miR-34a при НБ може розглядатися як суттєвий негативний прогностичний фактор, але це потребує ретельного дослідження. Гіперекспресія miR-17-92, виявлена при злоякісних новоутвореннях різних типів, сприяє прогресії пухлини

та блокуванню чутливості до проапоптотичних стимулів [22, 86].

Епігенетична інактивація генів може бути обумовлена іншим механізмом — метилюванням промоторної ділянки гена. У цьому плані найбільший інтерес становлять гени, задіяні в різних сигнальних шляхах у клітині: процесі апоптозу, регуляції клітинного циклу, диференціюванні, інвазії та метастазуванні. Зокрема, гіперметилювання гена ретиноевої кислоти (*RARB2*) може визначати нечутливість клітин НБ до цього стимулу, що індуктує диференціацію пухлинних клітин. Слід зазначити, що дослідження значення епігенетичних механізмів в патогенезі НБ знаходяться на початковому етапі [25, 26].

В якості несприятливих факторів прогнозу можна розглядати низький рівень експресії генів *H-ras*, *CD44^{v6}* та відсутність експресії *TRKA* в пухлинних клітинах [10, 16, 19, 77].

Як вже зазначалося, характерною особливістю НБ є здатність до раннього гематогенного метастазування. Ураження КМ є стійким індикатором IV стадії захворювання, що характеризується агресивним перебігом та стійкістю до хіміотерапії. Дослідження КМ є обов'язковою складовою діагностичного комплексу при НБ. Необхідним є виконання пункції КМ або трепанобіопсії груднини та крил клубової кістки. Одержаний матеріал досліджується цитологічно, імунологічно, молекулярно-генетично (виявлення мікроРНК генів за допомогою real-time RT-PCR).

ІГХ методи дослідження є високоінформативними, але не завжди достатніми при виявленні дисемінованого ураження КМ та мінімальної залишкової хвороби. У таких випадках більш ефективним є використання молекулярно-генетичних методів дослідження, а зокрема RT-PCR, яка дає можливість визначити високоспецифічні молекулярно-генетичні маркери та дозволяє ідентифікувати одну пухлинну клітину серед 105–107 ядеровмісних клітин. Вимірювання транскриптів гена тирозингідроксилази та DOPA-декарбоксілази в КМ є високочутливим методом для виявлення незначної кількості клітин НБ, встановлення наявності метастазів у КМ та визначення рівня мінімальної залишкової хвороби, а також для виявлення пухлинних клітин у лейкоконцентраті перед проведенням трансплантації клітин-попередників гемопоєзу [11, 13, 39, 87]. Наявність експресії тирозингідроксилази під час хіміотерапії, особливо на початковому етапі, свідчить про можливість виникнення резистентності до лікування. Загалом, наявність експресії тирозингідроксилази та DOPA-декарбоксілази асоціюється з прогресуючою стадією НБ, несприятливим прогнозом перебігу захворювання і зниженням рівня виживаності [57, 91].

Таким чином, рутинне гістологічне дослідження у значній частині випадків не є доказовим при верифікації НБ. Враховуючи це, ІГХ стає абсолютною необхідною для типування НБ. І навіть при «очевидності» для патолога діагнозу за результатами вивчення препаратів, забарвлених гематоксиліном і еозинном, є доцільним ІГХ підтвердження гістогенетичного типу пухлини. Слід враховувати, що гістогенетичне типування НБ у невеликому відсотку випадків не може бути здійснене за допомогою ІГХ методів. У такій ситуації реальну допомогу надають дослідження молекулярно-генетичні методи.

ІГХ та молекулярно-генетичні технології забезпечують не тільки можливість гістологічного типування НБ, а й визначення низки прогностичних ознак [40, 70], є базою для методів виявлення мікрOMETASTAZIV та мінімальної залишкової хвороби в КМ, є складовою частиною системи стратифікації хворих за групами ризику та необхідною умовою виконання сучасних протоколів лікування [32].

Незважаючи на визначні досягнення у дослідженні властивостей НБ, далеко не завжди пухлина поводиться так, як очікується. Інколи при діагностуванні гангліоневроми, що мала б мати сприятливий прогноз для пацієнта, після, на перший погляд, типового в цьому випадку лікування спостерігається непередбачене метастазування та перехід у злоякісні форми НБ [18]. Відомі й випадки спонтанного регресу типової НБ до гангліоневроми [29, 36]. Саме наявність таких випадків потребує не лише визначення гістогенетичного типу пухлини та її окремих ІГХ та молекулярно-генетичних ознак, а й комплексної оцінки цих та інших ознак з їх взаємозв'язками, які можуть виступати в якості високоінформативних критеріїв прогнозу розвитку пухлини [2].

Впровадження нових мультиmodalних підходів до лікування та подальший прогрес у терапії НБ вимагають удосконалення системи стратифікації хворих за групами ризику та підходів до індивідуалізації лікування на основі морфологічних та генетичних особливостей пухлини. Комплексна оцінка морфологічних, імунофенотипових, молекулярно-генетичних та інших ознак НБ дає змогу розглянути гетерогенність клітинного складу пухлини за морфофункціональними ознаками та визначити клітинний склад новоутворення, за характером якого можна більш точно прогнозувати подальший перебіг хвороби. Разом із виявленням нових прогностичних молекулярно-генетичних, цитогенетичних та епігенетичних маркерів це надасть можливість удосконалити систему стратифікації хворих за групами ризику та дозволить суттєво підвищити ефективність лікування хворих на НБ.

blastoma: immunohistochemical study with anti-S-100 protein antibody. *Hum. Pathol.*, 16: 471–476.

81. Shimada H., Chatten J., Newton W.A. Jr. et al. (1984) Histopathologic prognostic factors in neuroblastic tumors: definition of subtypes of ganglioneuroblastoma and an agelinked classification of neuroblastomas. *J. Natl. Cancer. Inst.*, 73: 405.

82. Shimada H., Nakagawa A., (2006) Pathology of the Peripheral Neuroblastic Tumors. *Laboratory Medicine*, 37(11): 684–689.

83. Shimotake T., Lwai N., Tokiwa K. et al. (1994) Increased Numbers of Argyrophilic Nucleolar Organizer Regions between Primary and Metastatic Sites Predict Tumor Progression in Stage IV and IV-S Neuroblastoma. *Cancer*, 73: 3103–7.

84. Singal A., Agarwala S. (2005) Tumor markers in pediatric solid tumors. *J. Indian. Assoc. Pediatr. Surg.*, 10(3): 183–190.

85. Spitz R., Hero B., Ernestus K., Berthold F. (2003) Deletions in chromosome arms 3p and 11q are new prognostic markers in localized and 4s neuroblastoma. *Clin. Cancer Res.*, 9: 52–58.

86. Stalling R.L. (2009) MicroRNA involvement in the pathogenesis of neuroblastoma: potential for microRNA mediated therapeutics. *Curr. Pharm. Des.*, 15(4): 456–462.

87. Stutterheim J., Gerritsen A., Zappeij-Kannegie-ter L. et al. (2009) PHOX2B is a novel and specific marker

for minimal residual disease testing in neuroblastoma. *J. Clin. Oncol.*, 26: 1–11.

88. Swarbrick A., Woods S.L., Shaw A. et al. (2010) Mir-380-5p represses p53 to control cellular survival and is associated with poor outcome in MYCN amplified neuroblastoma. *Nature Medicine*, 16: 1134–1140.

89. Tornoczyk T., Kalman E., Kajtar P.G. et al. (2004) Large cell neuroblastoma: A distinct phenotype with aggressive clinical behavior. New entity? *Cancer*, 100: 390–397.

90. Trager C. (2009) Neuroblastoma: incidence, biology and outcome. Stockholm: Karolinska Institutet: 56.

91. Trager C., Vernby A., Kullman A. et al. (2008) mRNAs of tyrosine hydroxylase and dopa decarboxylase but not of GD2 synapse are specific for neuroblastoma minimal residual disease and predicts outcome for children with high risk disease when measured at diagnosis. *Int. J. Cancer.*, 123: 2849–2855.

92. Trochet D., Bourdeau F., Janoueix-Lerosey I. et al. (2004) Germ-line mutations of the paired-like homeobox 2B (PHOX2B) gene in neuroblastoma. *Am. J. Hum. Genet.*, 74: 761–4.

93. Umehara S., Nakagawa A., Matthy K.K. et al. (2000) Histopathology defines prognostic subsets of ganglioneuroblastoma, nodular. *Cancer*, 89: 1150–1161.

94. van Roy N., De Preter K., Hoebeek J. et al. (2009) The emerging molecular pathogenesis of neuroblastoma:

implications for improved risk assessment and targeted therapy. *Genome Medicine*, 1: 74, 1–74, 11.

95. Variend S., Burchill S.A. (2003) Neuroblastoma. *Mol. Biol. Pathol. Paediatr. Cancer*: 161–166.

96. Viprey V.F., Corrias M.V., Kadegal B. et al. (2007) Standardisation of operating procedures for the detection of minimal disease by QRT-PCR in children with neuroblastoma. Quality assurance on behalf of SIOPEN-R-NET. *Europ. J. Cancer*, 43: 341–350.

97. Vitali R., Cesi V., Nicotra M.R. et al. (2003) c-Kit is preferentially expressed in MYCN-amplified neuroblastoma and its effect on cell proliferation is inhibited *in vitro* by STI-571. *Int. J. Cancer*, 106: 147–152.

98. Vogl M., Muller M. (2002) Tumor markers: review and clinical application (IFCC series). Milan.

99. Wick M.R. (2000) Immunohistology of neuroendocrine and neuroectodermal tumors. *Semin Diagn Pathol.*, 17: 194–203.

100. Yamamoto K., Hanada R., Kikuchi A. et al. (1998) Spontaneous regression of localized neuroblastoma detected by mass screening. *J. Clin. Oncol.*, 16: 1265–9.

101. Yong M.H., Hwang W.S., Knight L.A. et al. (2009) Comparing histopathological classification with MYCN, 1p36 and 17q status detected by fluorescence *in situ* hybridization from 14 untreated primary neuroblastomas in Singapore. *Singapore Med. J.*, 50(11): 1090–1094.

Верификация и прогнозирование течения нейробластомы

А.Н. Грабовой, Н.М. Храновская, М.Б. Зарецкий, Г.И. Климчук
Национальный институт рака, Киев

Резюме. Нейробластома является одной из солидных злокачественных опухолей наиболее специфичных для детского возраста. На сегодняшний день иммуногистохимические и молекулярно-генетические исследования при нейробластоме являются необходимым компонентом диагностики, методами выявления микрометастазов и минимальной остаточной болезни в костном мозгу, составляющими системы стратификации больных по группам риска, что являются необходимыми условиями выполнения современных протоколов лечения. Несмотря на все достижения в верификации и прогнозировании течения нейробластомы, эта проблема все еще является неразрешенной. Задачей современных исследований нейробластомы является не только усовершенствование подходов к определению гистогенетического типа опухоли, ее отдельных иммуногистохимических и молекулярно-генетических признаков, но и комплексная оценка этих и других признаков с их взаимосвязями, которые могут выступать в качестве высокоинформативных критериев прогноза развития опухоли.

Ключевые слова: нейробластома, верификация, прогноз.

Verification and prognosis of neuroblastoma

A.N. Grabovyi, N.M. Khranovska, M.B. Zaretsky, G.I. Klimnyuk
The National Cancer Institute, Kiev

Summary. Neuroblastoma is one of solid malignant tumors the most specific for childhood. To date, immunohistochemical and molecular genetic investigations of neuroblastoma are necessary component of the diagnostic, methods of detection of micrometastases and minimal residual disease in bone marrow that makes the stratification of patients into risk groups, which is indispensable for modern treatment protocols. Despite of all the achievement in verification and prognosis of neuroblastoma, this problem is still unresolved. The aim of current research of neuroblastoma is not only improvement of approaches to the definition of histogenetic type of tumor, its individual immunohistochemical and molecular genetic features, but comprehensive assessment of these and other characteristics with their relationships, which can act as a highly informative criteria for prediction of tumor development.

Key words: neuroblastoma, verification, prediction.