

Вплив статусу плідності ДНК пухлини на перебіг захворювання у дітей з нейробластомою

Н.М.Храновська, О.В.Скачкова, Н.М.Свергун, Н.В.Іонкіна,
М.В.Іномістова, С.В.Павлик, Е.В.Шайда, Г.І.Климнюк

Національний інститут раку
Київ, Україна

У роботі було досліджено генетичні властивості пухлини у 30 дітей із нейробластомою. Наявність ампліфікації гена MYCN в пухлині встановлено у 30% хворих, яких було віднесено до групи високого ризику. Анеуплоїдний варіант пухлини за вмістом ДНК встановлено у 27% випадків. Більшість анеуплоїдних пухлин були негативними за статусом гена MYCN. Анеуплоїдний статус за вмістом ДНК при відсутності ампліфікації гена MYCN свідчить про чутливість пухлини до лікування та сприятливий перебіг захворювання незалежно від стадії та віку хворого на нейробластому. У 67% хворих із нейробластомою старших 18 місяців та у 25% хворих молодших 18 місяців з диплоїдним варіантом пухлини та відсутністю ампліфікації гена MYCN спостерігалася недостатня відповідь на лікування та несприятливий перебіг захворювання. Статус плідності ДНК пухлини при нейробластомі може слугувати додатковим критерієм при прогнозуванні перебігу захворювання та стратифікації хворих із нейробластомою за групами ризику.

Ключові слова: нейробластома, ампліфікація гена MYCN, плідність ДНК пухлинних клітин, перебіг захворювання.

ВСТУП

Нейробластома (НБ) складає 7-11% від загальної кількості злоякісних новоутворень у дітей, займаючи четверте місце у структурі онкологічної захворюваності дітей після гострих лейкозів, пухлин центральної нервової системи

та злоякісних лімфом. 90% хворих – новонароджені та діти віком до 6 років [1, 2, 7, 9].

НБ характеризується клінічною гетерогенністю – від локалізованих пухлин, що здатні до спонтанної регресії, до поширених форм та раннього гематогенного метастазування. Висока клінічна гетерогенність відображає складність геномних аномалій, що є характерними для цієї пухлини. НБ з агресивним перебігом характеризуються множинними сегментними аберациями хромосом та ампліфікаціями окремих генів, зокрема гена MYCN [4, 5, 8].

У 2005 р. була запропонована система міжнародної класифікації НБ за групами ризику – International Neuroblastoma Risk Group Staging System (INRGSS) [3, 10]. У цю систему, крім віку хворого, деяких клінічних та морфологічних факторів, включена і генетична характеристика – ампліфікація гена MYCN. Ампліфікація гена MYCN є одним з головних маркерів поганого прогнозу і визначає групу високого ризику [1, 2]. Однак важливо підкреслити, що в більшості метастатичних НБ ампліфікація гена MYCN не виявляється. Таким чином, визначення тільки ампліфікації гена MYCN є недостатнім для точного встановлення прогнозу та групи ризику. Разом з тим саме з більш точним визначенням груп ризику пацієнтів на молекулярній основі пов'язують подальший прогрес у лікуванні хворих із цією пухлиною.

Оскільки НБ характеризуються наявністю багатьох генетичних та хромосомних аномалій, пошук нових молекулярно-генетичних та цитогенетичних маркерів або їх комплексу, що здатні охарактеризувати біологічну та прогнозувати клінічну поведінку пухлини, є актуальним.

Метою дослідження було вивчити вплив статусу плідності ДНК пухлини на клінічний перебіг пухлини у дітей з нейробластомою.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

У дослідженні було використано біологічний матеріал 30 хворих з встановленим діагнозом НБ II-IV стадії віком від 6 місяців до 12 років, що знаходилися на стаціонарному лікуванні в дитячому відділенні Національного інституту раку.

Дослідження ампліфікації гена MYCN у біопсійному матеріалі або парафінізованій пухлинній тканині проводили за допомогою методу полімеразно-ланцюгової реакції (PCR) з детекцією результатів у реальному часі з використанням *TaqMan*-зондів або методом флуоресцентної *in situ* гібридизації (FISH), використовуючи двокольорові специфічні зонди LSI N-myc Spectrum Green/Spectrum Orange DNA probe (Abbott Molecular, США). Результат вважали позитивним у випадку наявності не менше 10 копій гена в клітинах.

Вміст ДНК в пухлинних клітинах визначали за допомогою методу проточної цитометрії після фарбування флюорохромом PI [11].

Для оцінки вмісту ДНК гістограми розподілу обробляли за допомогою спеціалізованої математичної програми Mod Fit LT 2.0 (BDIS, США).

Усі проточноцитометричні дослідження виконувалися на приладі FACS Calibur («Becton Dickinson», США) з використанням програми CellQuest-PRO для комп'ютерів Макінтош для придбання та аналізу даних. Для виміру флуо-

ресценції PI використовували вузькополосний фільтр 585/42 нм.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У хворих на НБ ампліфікація гена MYCN в пухлинних клітинах асоціюється зі швидкою прогресією пухлини, резистентністю до лікування та поганим прогнозом незалежно від віку хворого та стадії захворювання. Ампліфікація може досягати 50-400 копій гена на клітину з відповідним високим рівнем його експресії. В асоціації з ампліфікацією гена MYCN часто виявляються ампліфікації деяких інших генів, таких як DDX1, NAG та ALK [1, 7, 9]. У результаті наших досліджень було встановлено, що ампліфікація гена MYCN зустрічається у 30% випадків (9/30) НБ. Ці хворі були віднесені до групи високого ризику й отримували лікування за відповідними протоколами.

Хоча статус гена MYCN є центральним стратифікаційним біологічним маркером для визначення групи ризику, важливо наголосити, що в більшості НБ з несприятливим перебігом ампліфікація цього гена не виявляється. Оскільки найбільш складною для визначення групи ризику є група хворих із НБ з відсутністю ампліфікації гена MYCN в пухлині, подальші наші дослідження були зосереджені на вивченні біологічних особливостей пухлини та клінічного перебігу захворювання у хворих саме цієї групи.

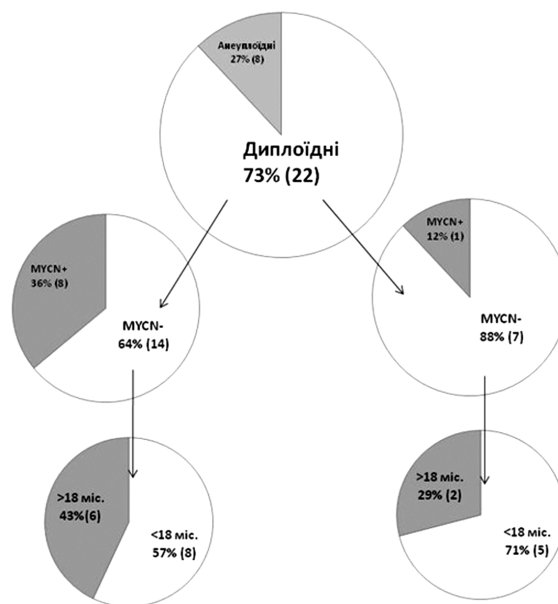


Рис. 1. Розподіл хворих із нейробластомою за генетичними властивостями пухлини.

Примітка: MYCN⁺ — виявлено ампліфікацію гена MYCN в пухлині; MYCN⁻ — не виявлено ампліфікацію гена MYCN в пухлині; <18 міс. — хворі молодше 18 місяців; >18 міс. — хворі старше 18 місяців.

Інформативним для визначення біологічної та клінічної поведінки новоутворення може бути вміст ДНК в ядрах пухлинних клітин, особливо при використанні проточної цитометрії, оскільки вона дає можливість при аналізі дуже великої кількості клітин виявити ступінь анеуплоїдії, що є важливою характеристикою геному [6].

Вважається, що гіперплоїдні НБ без структурних змін хромосом легше піддаються лікуванню та характеризуються більш сприятливим перебігом, ніж диплоїдні. За даними деяких авторів, анеуплоїдний статус пухлини є незалежним фактором прогнозу у дітей віком від 12 до 18 міс. Оцінка даних проточно-цитометричного аналізу гістограм розподілу ядерної ДНК клітин пухлини у хворих на НБ показала, що пухлини з диплоїдним варіантом ДНК складають 73% від усіх досліджених випадків (рис. 1), анеуплоїдні відповідно — 27%. У нашому дослідженні 7 із 8 хворих з анеуплоїдними пухлинами мали негативний статус гена MYCN. Ці пухлини, незалежно від наявності інших прогностичних факторів, таких як стадія та вік хворих, були чутливими до лікування. Хворі знаходяться під спостереженням без ознак хвороби протягом 30 місяців.

Серед пухлин з негативним статусом гена MYCN 64% (14 з 22 хворих) пухлин були диплоїдними за варіантом вмісту ДНК. 6 хворих з такими пухлинами були старші 18 місяців, що є додатковим фактором несприятливого перебігу захворювання. У 3 з 6 хворих старше 18 місяців розвинулися ранні рецидиви, в одного хворого спостерігалася первинна резистентність до хіміотерапевтичного лікування, що обумовило зміну протоколу лікування. З 8 хворих молодше 18 місяців один помер унаслідок прогресії захворювання та в одного хворого розвинувся рецидив захворювання протягом року після початку лікування.

Виходячи із цього, можна зробити висновок, що у 67% хворих із НБ старше 18 місяців та у 25% хворих молодше 18 місяців з диплоїдним варіантом ДНК пухлини та відсутністю ампліфікації гена MYCN спостерігалася недостатня відповідь на лікування та несприятливий перебіг захворювання.

Таким чином, статус плоїдності ДНК пухлини при НБ може слугувати додатковим критерієм при прогнозуванні перебігу захворювання та стратифікації хворих за групами ризику.

ВИСНОВКИ

1. Ампліфікація гена MYCN в пухлині зустрічається у 30% хворих із нейробластомою, яких відносять до групи високого ризику.

2. Анеуплоїдний статус за вмістом ДНК при відсутності ампліфікації гена MYCN свідчить про чутливість пухлини до лікування та сприятливий перебіг захворювання незалежно від стадії захворювання та віку хворого із нейробластомою.

3. Диплоїдний вміст ДНК в пухлинних клітинах може розглядатися як додатковий фактор несприятливого перебігу захворювання у хворих із нейробластомою старше 18 місяців з відсутністю ампліфікації гена MYCN в пухлині.

ЛІТЕРАТУРА

1. Грабовий А.М. Верифікація та прогнозування перебігу нейробластоми (огляд літератури) / А.М.Грабовий, Н.М.Храновська, М.Б.Зарецький, Г.І.Климнюк // Клиническая онкология. — 2012. — №7 (3). — С. 54-58.
2. Павлик С.В. Сучасний погляд на діагностику та лікування хворих на нейробластоми // Онкология. — 2005. — Т. 7, №4. — С. 339-341.
3. Ambros P. International consensus for neuroblastoma molecular diagnostics: report from the International Neuroblastoma Risk Group (INRG) Biology Committee / P.Ambros, I.Ambros, G.Brodeur et al. // British J Cancer. — 2009. — Vol. 100. — P. 1471-1482.
4. Avigad S. Minimal residual disease in peripheral blood stem cell harvests from high-risk neuroblastoma patients / S.Avigad, G.Feinberg-Gorenstein, D.Luria et al. // J. Pediatr. Hematol. Oncol. — 2009. — Vol. 31. — P. 22-26.
5. Capasso M. Genetics and genomics of neuroblastoma / M.Capasso, S.Diskin // Cancer Genetics, Cancer Treatment and Research. ed. Pasche B. — Springer Science LLC. — 2010. — P. 65-84.
6. George R.E. Hyperdiploidy Plus Nonamplified MYCN Confers a Favorable Prognosis in Children 12 to 18 Months Old With Disseminated Neuroblastoma: A Pediatric Oncology Group Study / R.E.George, W.B.London, S.L.Cohn et al. // J Clin Oncol. — 2005. — Vol. 23. — P. 6466-6647.
7. Horner M. SEER cancer statistics review / M.Horner, L.Ries, M.Krapcho // Nat. J. Cancer. — 2009. — Vol. 45, №5. — P. 723-727.
8. Lee S-T. Molecular detection of tyrosine hydroxylase in the peripheral blood of patients with neuroblastoma: useful at diagnosis but not predictable of subsequent relapse during off-therapy follow-up / S-T.Lee, C-S.Ki, K.W.Sung et al. // Pediatr Hematol Oncol. — 2011. — Vol. 28. — P. 16-23.
9. Trager C. Neuroblastoma: incidence, biology and outcome / C.Trager. — Stockholm: Karolinska Institutet, 2009. — 56 p.

10. Monclair T. The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) staging system: an INRG Task Force report / T.Monclair, G.M.Brodeur, P.F.Ambros et al. // J. Clin. Oncol. — 2009. — Vol. 27, №2. — P. 298-303.

Н.Н.Храновская, О.В.Скачкова, Н.Н.Свергун, Н.В.Ионкина, М.В.Иномистова, С.В.Павлик, Е.В.Шайда, Г.И.Климнюк. Влияние статуса пloidности ДНК опухоли на течение заболевания у детей с нейробластомой. Киев, Украина.

Ключевые слова: нейробластома, амплификация гена MYCN, пloidность ДНК опухолевых клеток, течение заболевания.

В работе были исследованы генетические свойства опухоли у 30 детей с нейробластомой. Наличие амплификации гена MYCN в опухоли установлено у 30% больных, которые были отнесены к группе высокого риска. Анеупloidный вариант опухоли по содержанию ДНК установлен в 27% случаев. Большинство анеупloidных опухолей были отрицательными по статусу гена MYCN. Анеупloidный статус по содержанию ДНК при отсутствии амплификации гена MYCN свидетельствует о чувствительности опухоли к лечению и благоприятном течении заболевания независимо от стадии и возраста больного с нейробластомой. У 67% больных с нейробластомой старше 18 месяцев и у 25% больных моложе 18 месяцев с диплоидным вариантом опухоли и отсутствием амплификации гена MYCN наблюдался недостаточный ответ на лечение и не-

благоприятное течение заболевания. Статус пloidности ДНК опухоли при нейробластоме может служить дополнительным критерием при прогнозировании течения заболевания и стратификации больных с нейробластомой по группам риска.

N.M.Khranovska, O.V.Skachkova, N.M.Svergun, N.V.Ionkina, M.V.Inomistova, S.V.Pavlyk, E.V.Shaida, G.I.Klymnyuk. Influence of tumor DNA ploid status on the disease outcome in children with neuroblastoma. Kyiv, Ukraine.

Key words: neuroblastoma, MYCN gene amplification, tumor cells DNA ploid, disease outcome.

The genetic properties of the tumor in 30 children with neuroblastoma were investigated. The presence of MYCN gene amplification in tumors in 30% of patients was found, these patients were attributed to the high-risk group. Aneuploid tumor DNA content was set in 27% cases. Most of the aneuploid tumors were negative on MYCN gene status. Aneuploid DNA content and absence of MYCN gene amplification indicate the sensitivity of the tumor to treatment and a favorable course of the disease, regardless of the patient's age and disease stage. In 67% of patients with neuroblastoma older than 18 months and in 25% of patients younger than 18 months with the diploid tumors and the absence of MYCN gene amplification lack of response to treatment and an unfavorable course of the disease were observed. DNA ploid status in neuroblastoma may serve as an additional criterion for predicting the disease outcome and the stratification of patients with neuroblastoma by risk groups.

Надійшла до редакції 30.06.2013 р.