

© МОРГУН А.В., ТАРАНУШЕНКО Т.Е., САЛМИНА А.Б.,
БОРИСОВА М.В., МАЛЮТИН О.А.

ЗНАЧЕНИЕ МАРКЕРОВ ПРОГРЕССИИ ПРИ ОПУХОЛЯХ ГОЛОВНОГО МОЗГА У ДЕТЕЙ

А.В. Моргун, Т.Е. Таранушенко, А.Б. Салмина,
М.В. Борисова, О.А. Малютин

Красноярская государственная медицинская академия; ректор - д.м.н., проф. И.П. Артюхов; кафедра детских болезней №1 с курсом ПО, зав. - д.м.н., проф. Т.Е. Таранушенко; кафедра биохимии с курсом медицинской химии, зав. - д.м.н., проф. А.Б. Салмина; КГУЗ «Красноярская краевая детская больница», гл. врач - Л.А.Соловьёва

***Резюме.** Исследовали прогностическое значение маркеров апоптоза, пролиферации и химиорезистентности при опухолях ЦНС у детей. Оценивали динамическое изменение этих показателей после химиотерапии. Установлена значимость экспрессии Р-гликопротеина и показателя пролиферации (Ki-67) в прогнозе опухолей ЦНС. Обнаружены гендерные отличия при развитии химиорезистентности опухолей. Обозначена возрастная группа с высокими показателями маркера пролиферации при отсутствии отличий по половому признаку.*

***Ключевые слова:** опухоли ЦНС, дети, апоптоз, Pgp, Ki-67, прогноз, иммуногистохимические методы.*

Эпидемиологические исследования показывают, что за последние десятилетия отмечается отчетливая тенденция роста заболеваемости злокачественными заболеваниями. Заболеваемость злокачественными опухолями в детском возрасте по России составляет 9,5-15 на 100.000 детского населения. Злокачественные опухоли занимают первое место в структуре причин смертности среди детей старше 5 лет в экономически развитых странах [2, 3]. Среднее число ежегодно регистрируемых детей со злокачественными опухолями увеличилось за последнее десятилетие на 20%,

летальность от онкологических заболеваний достигает 18% [1]. Опухоли ЦНС в детском возрасте являются самыми частыми у детей, после гемобластозов, развиваются из различных клеток и тканей, редко метастазируют, растут местно в пределах мозга. Некоторые опухоли содержат одновременно различные типы клеток [9]. Несмотря на возросшую радикальность удаления опухолей головного мозга и достижения в области разработки химиопрепаратов, число рецидивов опухолей у детей остается по-прежнему достаточно высоким (7 - 35%) [10].

В настоящее время информация о прогностической значимости различных молекул, экспрессирующихся при опухолевой прогрессии, весьма противоречива [5]. Предполагается, что одним из значимых прогностических маркеров может являться уровень апоптоза в ткани опухоли. Кроме того, известно, что низкий уровень спонтанного или индуцированного апоптоза опухолевых клеток может быть основой развития устойчивости к противоопухолевой терапии [11]. Другим возможным прогностическим маркером химиорезистентности может быть показатель пролиферации. Есть работы, показывающие связь между уровнем апоптоза, показателями пролиферации и степенью злокачественности опухолей головного мозга [4, 6]. Одним из белков, связанных с пролиферацией, является антиген Ki-67. Данный антиген является ядерным белком, не имеющим структурной гомологии ни с одной из других известных полипептидных последовательностей. Антитела к антигену Ki-67 реагируют с пролиферирующими (G1, S, M и G2 стадии клеточного цикла), но не с покоящимися клетками (стадия G0), что используется для оценки фракции роста в опухолях [7].

Особое место в развитии рецидивов и метастазов отводится лекарственной устойчивости, которую предлагается учитывать как важный прогностический фактор. Одним из важнейших механизмов химиорезистентности опухолевой клетки может быть гиперэкспрессия генов, ответственных за экструзию цитостатиков из клетки (транспортные белки

семейства множественной лекарственной устойчивости (и соответствующие кодирующие нуклеотидные последовательности): multidrug resistance gene-1-MDR-1). Ген MDR-1 расположен на участке хромосомы 7(q21-q23) и кодирует транспортный белок – Р-гликопротеин (Pgp), который является трансмембранным АТФ-зависимым насосом, удаляющим химические вещества из цитоплазмы [8]. Предполагается, что этот важный, но не единственный механизм лекарственной устойчивости, обеспечивает долговременное выживание клеток в присутствии веществ, различных по структуре и биологическому действию.

Таким образом, научные работы по рассматриваемой проблеме не имеют единой интерпретации, носят преимущественно экспериментальный характер, а исследования по изучению состояния апоптоза, пролиферации и химиорезистентности при опухолях центральной нервной системы у детей с их оценкой на фоне химиотерапии практически отсутствуют.

Цель исследования - оценка прогностической значимости некоторых маркеров апоптоза, пролиферации и мультилекарственной устойчивости у детей с опухолями головного мозга.

Материалы и методы

Объектом исследования были 37 (средний возраст $9,9 \pm 0,7$ лет) пациентов онкогематологического отделения Красноярской краевой детской больницы с верифицированным диагнозом «Опухоль головного мозга». Все опухоли были злокачественные (медуллобластомы, астроцитомы, глиобластомы). Диагностические мероприятия включали рентгенологическое исследование, компьютерную томографию, сцинтиграфию, УЗИ. У всех детей имелось морфологическое подтверждение диагноза. Химиотерапия осуществлялась по стандартным протоколам с использованием доксорубицина, винкристина, циклофосфана, цисплатина, карбоплатина.

Течение расценивалось как неблагоприятное при рецидиве опухоли и/или смерти пациента в период ремиссии. Безсобытийная выживаемость рассчитывалась с момента постановки диагноза. Изучались препараты

опухолевой ткани, полученные интраоперационно до и после химиотерапии от 25 (67%) мальчиков и 12 (33%) девочек. Стандартное гистологическое исследование выполнялось патологоанатомической службой Краевого патологоанатомического бюро и городской клинической больницы №20 им. И.С. Берзона.

Для регистрации апоптоза клеток головного мозга использовался метод TUNEL (ApoTag Direct Detection kit, Immunotech, France) согласно протоколу производителя. В депарафинизированных срезах опухолей исследовалась специфичная для апоптоза межнуклеосомная фрагментация ДНК. Количество апоптотических клеток рассчитывалось из 300 клеток в образце. Индекс апоптоза (ИА) обозначался как низкий, умеренный и выраженный в зависимости от показателя (до 0,5, 0,5-1,5 и более 1,5 соответственно).

Определение экспрессии антигенов Ki-67 и Р-гликопротеина проводилось двойным непрямым методом иммуноферментного окрашивания. Для определения Ki-67 использовались первичные моноклональные антитела MIB-1 в рабочем разведении 1:100 (DAKO, Дания). Антителами для Р-гликопротеина были первичные мышинные антитела JSB1 в рабочем разведении 1:50 (Novocastra, Англия). В качестве вторичных антител использовались ФИТЦ-меченые антимышинные моноклональные антитела. Иммуногистохимические исследования осуществлялись по стандартной методике в депарафинизированных срезах. Визуализация регистрировалась с помощью люминесцентной микроскопии, и результаты ранжировались в интервале от 1 до 3 следующим образом: слабое окрашивание менее 10% клеток – 1, слабое окрашивание более 10% – 2, сильно выраженное окрашивание более 10 % расценивалось как 3. На основании результатов окраски повышенным уровнем считались образцы со степенью 2 и 3.

Статистический анализ. Использовался точный критерий Фишера, критерий Уилкоксона, кривая Kaplan–Meier и логранговый критерий.

Расчеты выполнялись с помощью программы StatPlus 2005, Primer of Biostatistics, версия 4.03 и статистического пакета программы Microsoft Office Excel 2003.

Результаты и обсуждение

Большинство детей заболели в возрасте 11 лет и старше – 19 (51,4% от общей численности выборки), из них мальчиков было 15 (78,9%).

I. Характеристика апоптотической активности опухолевой ткани у детей с новообразованиями головного мозга.

Выполненный анализ на выраженность апоптоза показал следующее: из 37 исследованных образцов опухолей головного мозга в 20 ИА был низким (до 0,5). Эти опухоли считались апоптоз – негативными и составили 54% от числа всех исследований. В остальных образцах опухолей, которые составили 46%, индекс апоптоза был высоким (более 1,5). Более высокий показатель ИА (более 1,5) чаще встречался в образцах от мальчиков, чем от девочек (табл. 1), однако, не обнаружено статистически значимых половых различий.

Таблица 1

Гендерные особенности показателей маркеров опухолевой прогрессии

пол	Уровень апоптоза				Степень Ki-67						Степень Pgp					
	Низкий		Высокий		3		2		0-1		3		2		0-1	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
мальчики	12	32,4	13	35,1	4*	10,8	3*	8,1	18	48,6	2**	5,4	8	21,6	15	40,5
девочки	8	21,6	4	10,8	1*	2,7	0*	0	11	29,7	7**	18,9	3	8,1	2	5,4
всего	20	54	17	45,9	5	13,5	3	8,1	29	78,4	9	24,3	11	29,7	17	45,9

Примечание: * - $p < 0,05$; гендерные различия экспрессии Ki-67

** - $p < 0,05$ гендерные различия экспрессии Pgp.

Таблица 2

Возрастные особенности показателей Ki-67 и Pgp у детей с опухолями ЦНС

Возраст (годы)	Степень Ki-67						Степень Pgp					
	3		2		0-1		3		2		0-1	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
0-2	0	0	0	0	1	2,7	0	0	0	0	1	2,7
3-6	1*	2,7	1	2,7	9	24,3	4	10,8	3	8,1	4	10,8
7-10	0	0	1	2,7	5	13,5	3	8,1	3	8,1	0	0
11-17	4*	10,8	1	2,7	14	37,8	2	5,4	5	13,5	12	32,4
всего	5	13,5	3	8,1	29	78,4	9	24,3	11	29,7	17	45,9

Примечание: * $p < 0,05$

Проанализирована связь между исходами и ИА, возрастом и полом детей. При этом не установлено взаимосвязи между ИА и выживаемостью ($p>0,05$), а также возраста и пола с выживаемостью ($p>0,05$). Изучение выраженности показателя апоптоза в зависимости от характера течения опухолевого процесса показало, что минимальные значения ИА наблюдались при частых и ранних рецидивах ($p<0,05$). Установленные результаты не подтверждают известное мнение о прогностической значимости апоптоза в оценке возможного исхода заболевания.

У всех детей после химиотерапии и повторной операции исследовались образцы опухоли повторно, в которых было обнаружено некоторое повышение показателя апоптоза, однако значимых изменений в показателях ИА до и после лечения не выявлено ($p>0,05$). Полученные данные могут косвенно свидетельствовать о недостаточном влиянии используемых в терапии лекарственных средств на индукцию запрограммированной клеточной гибели.

II. Определение пролиферативной активности опухолей ЦНС у детей.

Анализ экспрессии Ki-67 выявил, что из 37 исследованных образцов опухолей головного мозга в 8 (21,6%) окрашивание было выраженным (степень 2 и 3), что свидетельствует о повышенной экспрессии Ki-67. Остальные образцы опухолей, которые составили 78,4%, считались Ki-67-негативными, окраска была слабой и диффузной (степень 0 и 1).

Изучены особенности экспрессии Ki-67 с учетом пола и возраста. Высокие показатели Ki-67 (степень 2, 3) регистрировались чаще в образцах опухолей, полученных от мальчиков, чем от девочек ($p<0,05$) что свидетельствует о значимых гендерных различий при новообразованиях ЦНС у детей (табл. 1).

Наряду с этим, повышенная экспрессия встречалась чаще в возрасте старше 11 лет ($p<0,05$), что свидетельствует о большей пролиферативной активности опухолей у детей, достигших пубертата (табл. 2).

Важно, что среди детей умерших и с частыми рецидивами наблюдалась высокая экспрессия Ki-67. Наряду с этим установлено, что повышенное содержание Ki-67 значимо связано со снижением вероятности ($p < 0,05$) безсобытийной выживаемости. При изучении образцов опухолей после повторной операции, установлено значительное снижение Ki-67-положительных клеток ($p < 0,05$). В отличии от данных по изучению апоптоза, представленные результаты убедительно демонстрируют важность изучаемого маркера, как в прогнозе неблагоприятного течения заболевания, так и в оценке эффективности терапии. Между экспрессией Ki-67 и уровнем апоптоза, не обнаружено значимой корреляционной связи (слабая обратная связь, $r = -0,175$).

III. Определение белка Pgp – маркера химиорезистентности опухолей.

При исследовании экспрессии Р-гликопротеина (Pgp) обнаружено, что в 17 образцах окраска на Р-гликопротеин отсутствовала или была слабая, что соответствовала степени 0 и 1. Эти опухоли считались Р-gr – негативными и составили 46% от числа всех исследований. В остальных образцах опухолей, которые представлены 54%, окрашивание было выраженным и диффузным (степень 2 и 3), что указывает о повышенной экспрессии Р-гликопротеина. Повышенный уровень Р-гликопротеина (3 степень) чаще встречался в образцах от девочек, чем от мальчиков (табл. 1) ($p < 0,05$). Представленные результаты невозможно сопоставить с данными других исследователей из-за отсутствия аналогичных работ по новообразованиям ЦНС в детском возрасте.

Изученные особенности экспрессии Pgp не установили различий в рассматриваемых возрастных группах (табл. 2), что исключает влияние возраста на развитие химиорезистентности при новообразованиях ЦНС.

Рассмотрена взаимосвязь между экспрессией и исходом заболевания. Установлено, что повышенное содержание Р-гликопротеина значимо связано со снижением вероятности ($p < 0,05$) безсобытийной выживаемости. У всех

умерших и детей с рецидивирующим течением обнаружена повышенная экспрессия Pgp (степень 2 и 3). В первые 12 месяцев заболевания рецидивы наблюдались у 8 детей, с гиперэкспрессией Pgp. Во временном интервале от 12 до 30 месяцев рецидивирование отмечено у 14 детей. Исследование на экспрессию Pgp образцов опухоли, после повторной операции, установило незначительное увеличение Pgp-положительных клеток. Это может свидетельствовать о нарастании химиорезистентности к проводимой терапии, и необходимости усиления терапии с использованием модуляторов Pgp.

Результаты выполненного исследования позволили оценить прогностическую значимость маркеров апоптоза, пролиферации и мультитекарственной устойчивости при опухолях центральной нервной системы у детей.

Таким образом, выраженность запрограммированной клеточной гибели в ткани опухоли ЦНС у детей не имеет прогностической значимости в оценке прогрессирования заболевания. Экспрессия Р-гликопротеинов и Ki-67 в клетках опухоли определяет прогноз безсобытийных исходов, что позволяет рекомендовать указанные маркеры для дифференцированного подхода к пациентам с данной патологией и решения вопроса об оптимизации терапии; наиболее высокие уровни маркера пролиферации отмечены в возрастной группе 11-16 лет с преобладанием у детей мужского пола. Высокая экспрессия Р-гликопротеина (степень 2 и 3) установлена в 54% случаях у детей с новообразованиями ЦНС, которая преобладает в образцах опухолевой ткани девочек и не имеет возрастных особенностей, что может свидетельствовать о большей вероятности развития химиорезистентности у пациентов женского пола.

SIGNIFICANCE OF PROGRESSION MARKERS IN CHILDREN WITH BRAIN TUMORS

A.V.Morgun, T.E.Taranushenko, A.B.Salmina,

M. V. Borisova, O.A. Malyutin

Krasnoyarsk State Medical Academy;
Krasnoyarsk Regional Children Hospital

The purpose of this study was to determine the significance of apoptosis, and expression of markers of proliferation and drug resistance in children with brains tumors. Alterations in apoptosis rate and expression of some markers have been detected in brain tumor samples after chemotherapy. Significance of P-glycoprotein expression and proliferative activity rate has been proved as prognostic factor for brain tumor progression. We were able to find the gender difference in development of drug resistance and rate of proliferation in CNS tumors. The age group with high rate of proliferation and absence of gender difference has been registered.

Литература

1. Аксель Е.М., Горбачева И.А. Заболеваемость детей злокачественными новообразованиями и смертность от них в России // Вест. РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН. – 2006. – №3 (прил. 1). – С. 116-132.
2. Дурнов Л.А. Руководство по детской онкологии. – М.: «МИКЛОШ», 2003. – 504 с.
3. Трапезников Н.Н., Абдрахманов Ж.Н., Алиев Д.А. Состояние онкологической помощи населению государств СНГ // Онкология. – 2000. – № 1-2. – С. 6-10
4. Arceci R.J. Clinical Significance of P-Glycoprotein in Multidrug Resistance Malignancies // BLOOD. – 1993. – Vol. 81. – P 2215-2222.
5. Bauman G., Lote K., Larson D. et al. Pretreatment factors predict overall survival for patients with low-grade glioma: A recursive partitioning analysis // Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. – 1999. – Vol. 45. – P 923–931.
6. Fine R., Chambers T., Sachs C. P-glycoprotein, multidrug resistance and protein kinase C // Stem Cells. – 1996. – Vol. 14. – P. 47-55.
7. Haapasalo J., Mennander A., Helen P. et al. Ultrarapid Ki-67 immunostaining in frozen section interpretation of gliomas // J. of Clin. Pathol. – 2005. – Vol. 58. – P. 263-268.

8. Johnstone R.W., Cretney E., Smyth M.J. P-glycoprotein protects leukemia cells against caspase-dependent, but not caspase-independent, cell death // *Blood*. – 1999. – Vol. 93. – P. 1075-1085.
9. Miltenburg D., Louw D.F., Sutherland G.R. Epidemiology of childhood brain tumors // *Can. J. Neurol. Sci.* – 1996. – Vol 23. – P. 118-122.
10. Packer R. Chemotherapy for pediatric brain tumors in *Principles and Practice of Pediatric Neurosurgery* // New-York: Medical Publishers, Inc., 1999. – P. 779-786.
11. Willingham M.C. Cytochemical methods for the detection of apoptosis // *J. Histochem. and Cytochem.* – 1999. – Vol. 47, N 9. – P. 1101-1109.