

© Коллектив авторов, 2013
УДК 616.988+616.916.1]-053.7-07

СЕМЕЙСТВО МУС ГЕНОВ В СОЛИДНО-ПСЕВДОПАПИЛЛЯРНОЙ ОПУХОЛИ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Е.Н. Гордиенко, О.В. Паклина, И.А. Чекмарева, Д.Л. Ротин, Д.С. Горин

Институт хирургии им А.В. Вишневского, г. Москва

В работе проведено изучение молекулярных нарушений генов с-Мус и N-Мус в солидно-псевдопапиллярной опухоли поджелудочной железы. Исследованы 24 образца опухолей полученных от 21 больного, из них: 19 первичных, 1 рецидивная, 4 метастаза. Флуоресцентная гибридизация *in situ* была проведена с использованием локуспецифических ДНК-проб (молекулярных зондов) к локусам 2p24, 6q23, 8q24 фирмы «Vysis, Abbott Laboratories Inc», США Показано, что амплификация гена N-Мус в солидно-псевдопапиллярной опухоли может быть еще одним подтверждением ее нейрогенного происхождения

Ключевые слова: солидно-псевдопапиллярная опухоль, поджелудочная железа, амплификация гена, морфология, прогноз.

Солидно-псевдопапиллярная опухоль (СППО) редкая злокачественная опухоль, составляющая 0,2 – 2,7% от общего числа злокачественных опухолей и около 6% всех экзокринных образований поджелудочной железы [22, 23, 30]. СППО возникает во второй – третьей декаде жизни преимущественно у лиц женского пола, хотя описаны случаи у мужчин и детей [21, 25, 33, 37].

В классификации ВОЗ СППО относятся к опухолям с неизвестным гистогенезом [3]. В ранних классификациях опухолей поджелудочной железы (ПЖ) они рассматривались в группе нефункционирующих опухолей из островковых клеток. Позднее, была выдвинута гипотеза происхождения данной опухоли из клеток полового гребня. Авторы предполагают, что в процессе эмбриогенеза закладка поджелудочной железы и полового гребня находятся близко друг к другу, поэтому клетки из полового гребня могут мигрировать в поджелудочную железу и, как следствие, под влиянием дисгормональных нарушений может развиваться СППО, что косвенно подтверждается экспрессией прогестерон-

рецепторов опухолевыми клетками. [29, 35]. В подтверждение данной гипотезы Deshpande V с соавт. (2010) описали три случая подобных новообразований в яичниках со сходной с СППО-морфологией и иммунопрофилем [10]. В противовес данной гипотезе – «эмбриональной миграции» Heiser PW с соавт. (2008) на созданной экспериментальной модели на мышах путем активации β -катенина в клетках поджелудочной железы, индуцировали рост опухоли, морфологически сходной с человеческой СППО, поэтому авторы предложили гипотезу развития данных опухолей из клеток-предшественников протокового эпителия [18]. Ряд исследователей, выявив диффузную экспрессию CD117 и DOG1 опухолевыми клетками СППО, предположили, что гистогенез СППО близок к гистогенезу гастроинтестинальных стромальных опухолей, однако отсутствовали мутации с-KIT и PDGFRA. Более того, выявленная сходная экспрессия DOG1 как в центрoацинарных клетках поджелудочной железы, так и в СППО, не исключает происхождение данной опухоли из дериватов ацинарных структур [2, 6].

В последнее время в литературе активно обсуждается гипотеза происхождения СППО из производных не полового гребня, а нервной пластинки. Например, Chen с соавт. (2004) придерживаются данной гипотезы на основании выявленной ими меланоцитарной дифференцировки в СППО [8]. Savard и соавт. (2009) поддерживают эту же гипотезу, исходя из активации генов и регуляторных белков, участвующих в Wnt-и Notch сигнальных путях, а также наличия экспрессии маркеров нейрогенной дифференцировки (SOX10 и TuJ-1) [7]. По данным Li L. И Guo Y. с соавт. (2011), клетки СППО обладают уникальной околядерной точечной экспрессией онкомаркера CD99, первоначально характерного для группы опухолей нейроэктодермального происхождения [16,20]. Также была выявлена очаговая экспрессия еще одного маркера нейроэктодермальных опухолей FLI-1, однако мутация гена EWS/FLI-1 не была подтверждена при молекулярных исследованиях [32]. Более того, иммуногистохимическая (ИГХ) экспрессия опухолевыми клетками белка β -катенина, являющегося рецептором Wnt пути, а также мутация гена β -катенина, расположенного в 3 экзоне (CTNNB1) характерна не только для СППО, но и для медуллобластом, и примитивных нейроэктодермальных опухолей [1,14,17]. Во всех опухолях нервной системы также задействованы гены семейства Мус (с-Мус и N-Мус), при этом в большинстве случаев, отмечалась не только повышенная ИГХ- экспрессия белков генов семейства Мус, но и молекулярные нарушения в самих генах [4,26,27,28]. Известно, что активированные гены семейства Мус в постнатальном периоде обладают способностью вызывать опухолевый рост, особенно в комбинации с другими онкогенами [13].

Целью нашего исследования явилось изучение молекулярных нарушений генов с-Мус и N-Мус в солидно- псевдопапиллярной опухоли поджелудочной железы.

Материалы и методы

В исследовании использованы 24 образца опухолей полученных от 21 больного, из них: 19 первичных, 1 рецидивная,

4 метастаза. Флуоресцентная гибридизация *in situ* была проведена с использованием локуспецифических ДНК-проб (молекулярных зондов) к локусам 2p24, 6q23, 8q24 фирмы «Vysis, Abbott Laboratories Inc», США. Использовали парафиновые блоки фрагментов опухолей с предварительной гистологической окраской срезов для выбора наиболее репрезентативных участков для дальнейшего исследования. Далее срезы обрабатывали по следующей методике: депарафинация срезов в серии ксилолов, дегидратация в спиртах восходящей концентрации, обработка пепсином, денатурация и гибридизация с ДНК-зондами в гибридизационной камере HYBrite в течение 16-18 часов, отмывка, контрастирование и заключение препарата среду в DAPI I. По окончании реакции гибридизации срезы изучали во флуоресцентном микроскопе «Axio Imager A2» («Karl Zeiss», Германия). Изображение фиксировали с помощью цифровой CCD-видеокамеры «AxioCam» («Karl Zeiss»).

Результаты оценивались после подсчета сигналов в 200 отдельно лежащих ядрах. В качестве контроля использовали непораженную ткань поджелудочной железы. Сбалансированным считали профиль при наличии в 90 % ядер двух сигналов от контрольной пробы и двух сигналов от исследуемой пробы. В случае наличия в 90 % ядер двух сигналов от контрольной пробы и более двух сигналов от исследуемой пробы выявлялась амплификация.

Результаты и обсуждение

Клинические данные по больным и макроскопическая характеристика опухолей приведены в таблице 1.

Все больные исключительно женского пола, возраст колебался от 18 до 67 лет, средний возраст составил 34,4 года, при этом до 45 лет 17 больных (81%), после 45 – 4 (19%). Клинически доброкачественное поведение опухоли (без развития рецидивов и метастазов) отмечалось у 17 больных (81%). У четырех пациентов (19%) на момент наблюдения имелись метастазы опухоли, из них: в печень – 2 случая, лимфоузлы – 2, желудок – 2, селезенку – 1, большой сальник – 1, брыжейку тонкой и толстой кишки – 1. Размеры ме-

Таблица 1

**Морфологические и молекулярно-биологические особенности
опухолей поджелудочной железы**

№ п/п	Возраст	Пол	Размер опухоли	Наличие рецидива или метастазов	Экспрессия β-категнина	FISH-анализ	
						Ген C-myc	Ген N-myc
1	18	ж	5,5	да*	да	сбалансированный профиль	амплификация
2	33	ж	2,5	нет	да	нет сигнала	нет сигнала
3	67	ж	3,5	нет	да	сбалансированный профиль	амплификация
4	44	ж	13	да**	да	сбалансированный профиль	амплификация
5	48	ж	6,5	да***	да	нет сигнала	нет сигнала
6	19	ж	4	нет	да	сбалансированный профиль	сбалансированный профиль
7	49	ж	9	да****	да	сбалансированный профиль	сбалансированный профиль
8	31	ж	0,6	нет	да	сбалансированный профиль	сбалансированный профиль
9	36	ж	2,5	нет	да	сбалансированный профиль	сбалансированный профиль
10	59	ж	5	нет	да	сбалансированный профиль	сбалансированный профиль
11	42	ж	2	нет	да	нет сигнала	нет сигнала
12	24	ж	3,5	нет	да	сбалансированный профиль	амплификация
13	25	ж	3,5	нет	да	сбалансированный профиль	сбалансированный профиль
14	21	ж	11	нет	да	сбалансированный профиль	сбалансированный профиль
15	23	ж	3,5	нет	да	сбалансированный профиль	амплификация
16	29	ж	11	нет	да	сбалансированный профиль	сбалансированный профиль
17	24	ж	17	нет	да	нет сигнала	нет сигнала
18	35	ж	3,5	нет	да	сбалансированный профиль	амплификация
19	31	ж	15	нет	да	сбалансированный профиль	сбалансированный профиль
20	39	ж	5,5	нет	да	сбалансированный профиль	сбалансированный профиль
21	25	ж	2,5	нет	да	сбалансированный профиль	амплификация

* метастазы в паранкретические лимфоузлы

** рецидив в культю поджелудочной железы с вовлечением в процесс левой почки, метастазы в печень, большой сальник, брыжейку тонкой и толстой кишки

*** метастазы в желудок, селезенку

**** метастазы в печень



Рис. 1а. Операционный материал. Опухолевая ткань мягкая, розоватые солидные участки чередуются с кистозными полостями заполненными крошащимися массами

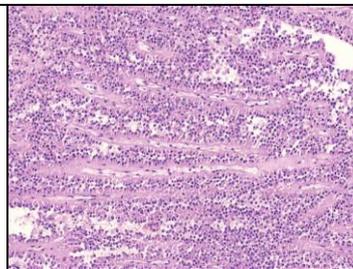


Рис. 1б. Псевдососочковые структуры в СППО. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 200

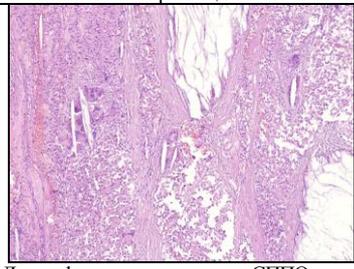


Рис. 1в. Дистрофические изменения в СППО в виде скопления кристаллов холестерина и многоядерных клеток инородных тел. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 100

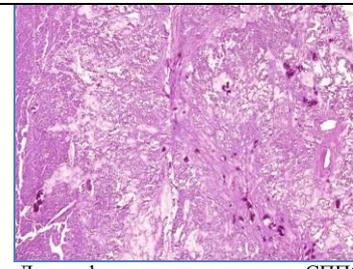


Рис. 1г. Дистрофические изменения в СППО в виде очагов миксоматоза и участков обызвествления. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 50

тастазов от 0,3 (в лимфоузлах) до 25 см (в печени). Длительность периода от первичной опухоли до появления метастазов составила 3, 72, 122 мес. В одном случае наблюдалось одномоментное выявление метастазов (в печень) и первичной опухоли. В одном случае отмечался рецидив опухоли в культе поджелудочной железы через 46 месяцев.

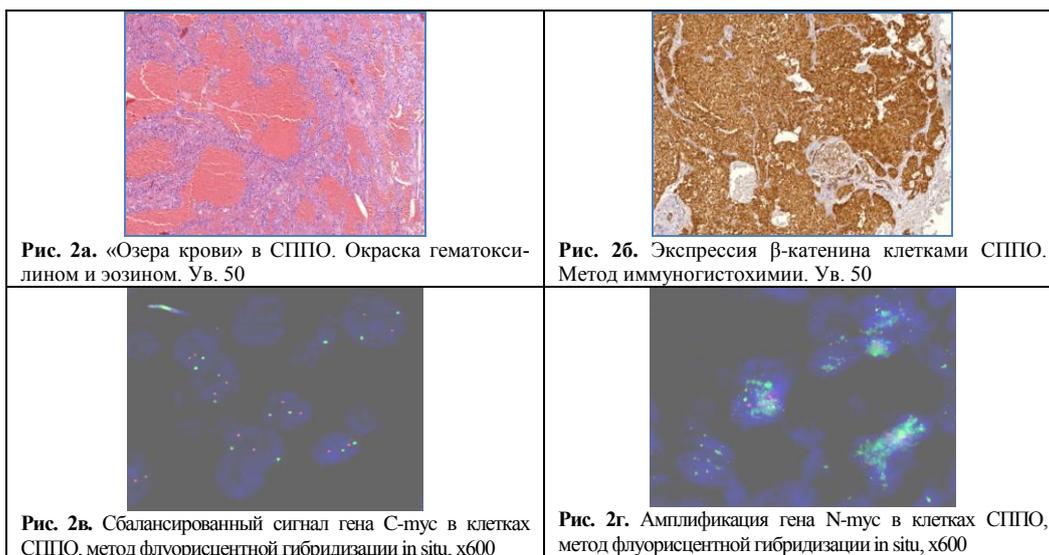
Макроскопически СППО были представлены одиночным или множественными узлами размерами от 0,6 до 17 см (средний размер 6,2 см). Опухолевые узлы были инкапсулированы и хорошо отграничены от окружающей паренхимы железы. На разрезе опухолевая ткань мягкая, светло-коричневые или розоватые солидные участки чередовались с кистозными полостями и участками кровоизлияний. Кисты были заполнены темно бурым густым содержимым с крошащимися массами (рис. 1а). Макроскопически преобладал солидный вариант строения опухоли – 12 случаев (57,1%), также встречался кистозно-солидный – 8 (38,1%) и кистозный – 1 (4,8%). Микроскопически опухоли были представлены сравнительно мноморфными полигональными клетками, окружающими множество тонких капилляроподобных кровеносных сосудов (рис. 1б). Строма была представлена нежными фиброваскулярными прослойками с очагами миксоматоза и гиалиноза. Также в ряде опухолей наблюдались дистрофические изменения в виде скопления шаровидных клеток с пенистой цитоплазмой

(пенистые макрофаги), кристаллов холестерина, многоядерных клеток инородных тел, очагов миксоматоза, участков обызвествления и кровоизлияний (рис. 1в, г).

Характерным гистологическим признаком являлось наличие по периферии опухоли так называемых «озер крови» с включением отдельных опухолевых клеток или их комплексов (рис. 2а). Макро- и микроскопическая характеристика метастазов и рецидивных опухолей была аналогична первичным СППО. Для подтверждения диагноза СППО во всех образцах проводилось ИГХ исследование опухоли на β -катенин. Ядерная и цитоплазматическая экспрессия β -катенина отмечена в 21 случае (100%) (рис. 2б).

Флуоресцентная гибридизация in situ: в 4 случаях (после длительной фиксации в формалине) материал оказался непригоден для анализа результатов флуоресцентной гибридизации *in situ* из-за невозможности визуализировать сигналы от ДНК-зондов. Во остальных случаях (17) получен сбалансированный сигнал гена *c-Myc* (рис. 2в). Амплификация гена *N-Myc* выявлена в 7 из 17 случаев (41%), при этом в двух случаях опухоли проявляли агрессивное клиническое течение с развитием метастазов (табл. 1, рис. 2г).

Известно, что *Wnt* и *Notch* сигнальные пути в период эмбриогенеза отвечают за дифференцировку нормальных тканей, в том числе играют ключевую роль в развитии нервной системы (рис. 3а,б).



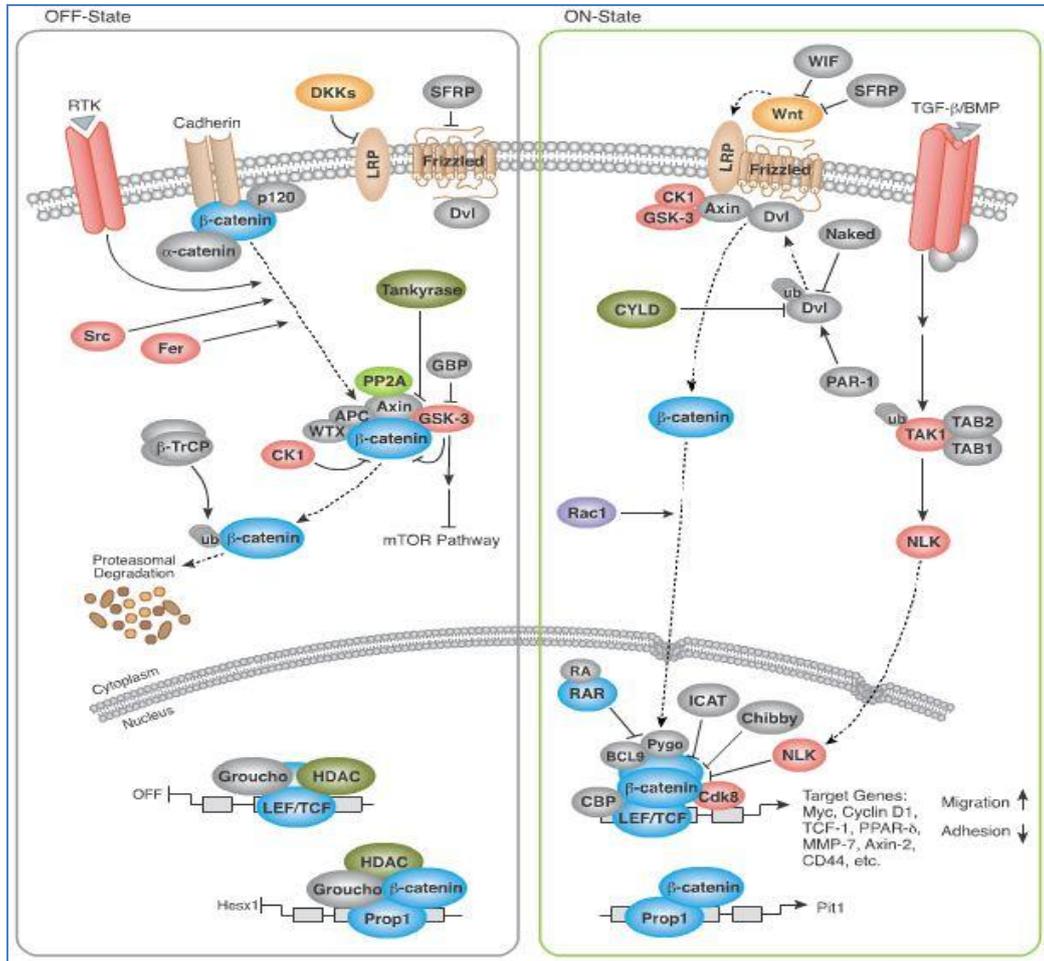


Рис. 3а. WNT-сигнальный путь

В эмбриональном периоде β-катенин выступает в качестве посредника дифференцировки нервного гребня, подавляет эпидермальную дифференцировку и активирует пигментацию и рост нервных волокон [34]. Однако, некоторые исследования указывают на роль Wnt сигнализации в поддержании плюрипотентности и регулировании роста эмбриональных стволовых клеток [5,24]. В постнатальном периоде эти сигнальные пути связаны с патогенезом примитивных «бластных» опухолей нервной системы таких как нейробластома, медуллобластома, ретинобла-

стома, глиобластома и примитивные нейроэктодермальные опухоли [11,15,19]. Кроме того, имеется связь Notch-пути с геном N-Мус, который является белком-мишенью Nuvell убиквитин лигазы в Notch сигнализации [36].

Выводы

Амплификация гена N-Мус в СППО может быть еще одним подтверждением ее нейрогенного происхождения. Однако, данная опухоль обладает низким потенциалом злокачественности и редко метастазирует и рецидивирует в отличие от агрессивного течения бластных опухолей

нервной системы. Возникают опухоли намного позднее и протекают более благоприятно. Возможно, это связано с тем, что свою агрессивность опухоли нервной системы проявляют в результате взаимодействия многих онкогенов. С другой стороны, у больных медуллобластомой и PNET экспрессия β -катенина рассматривается в качестве маркера благоприятного исхода в отличие от других типов опухо-

лей (рак кишки, молочной железы, печени), в которых его ядерная экспрессия связана с прогрессированием заболевания [9,12]. По предположению Tiemann K и соавт., мутации β -катенина могут не влиять на скорость пролиферации в СППО в связи с активацией ингибиторов циклин-зависимой киназы p21 и p27, играющих важную роль в прекращении активированной Wnt сигнализации [31].

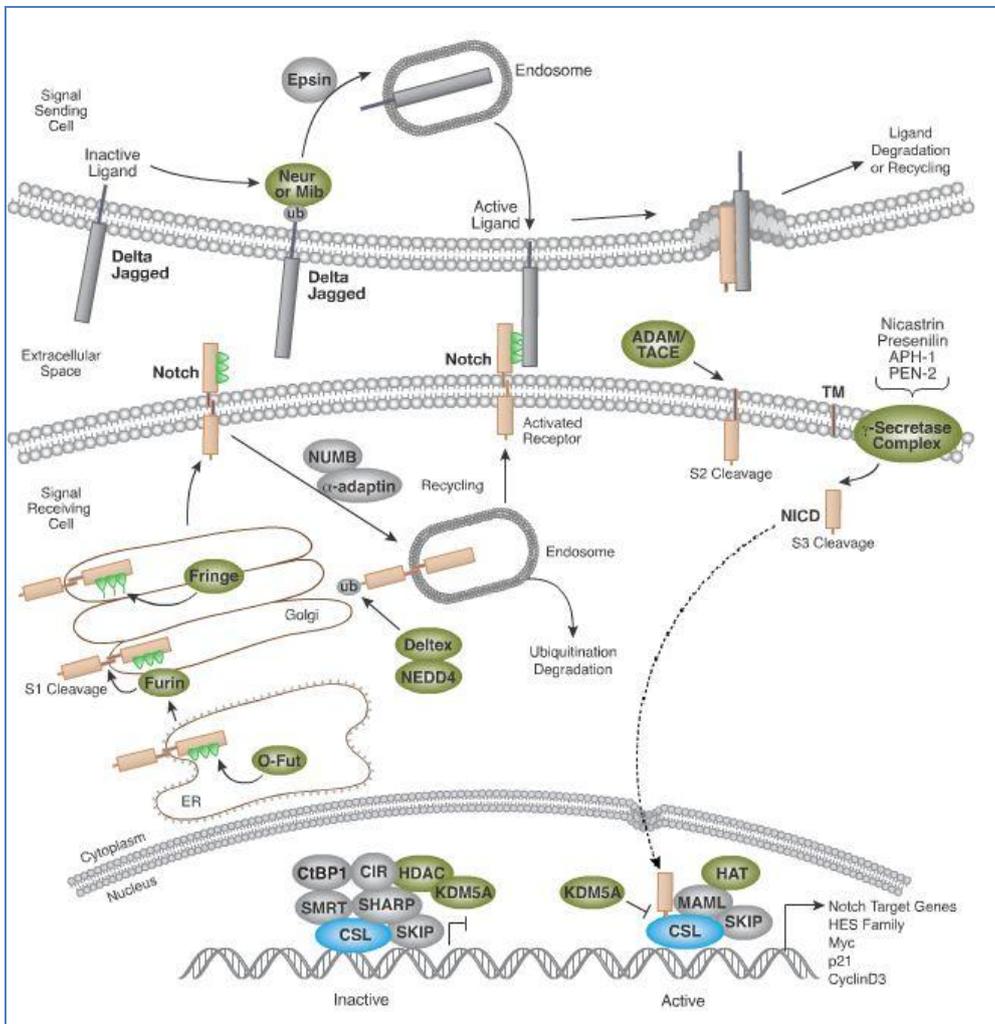


Рис. 36. Notch- сигнальный путь

Литература

1. Solid-pseudopapillary tumors of the pancreas are genetically distinct from pancreatic ductal adenocarcinomas and almost always harbor betacatenin mutations / S.C. Abraham [et al.] // *Am J Pathol.* – 2002. – Vol. 160. – P. 1361-1369.
2. Discovered on gastrointestinal stromal tumor 1 (DOG1) is expressed in pancreatic centroacinar cells and in solid-pseudopapillary neoplasms – novel evidence for a histogenetic relationship / F. Bergmann [et al.] // *Hum Pathol.* – 2011. – Vol. 42. – P. 817-823.
3. World Health Organization international histological classification of tumors of the Digestive System / F.T. Bosman [et al.]. – 4th ed. – Lion, 2010.
4. Glioblastoma subclasses can be defined by activity among signal transduction pathways and associated genomic alterations / C. Brennan [et al.] // *PLoS One.* – 2009. – Vol. 77. – P. 52-54.
5. Promoting human embryonic stem cell renewal or differentiation by modulating Wnt signal and culture conditions / L. Cai [et al.] // *Cell Res.* – 2007. – Vol. 17. – P. 62-72.
6. Positive immunohistochemical staining of KIT in solid-pseudopapillary neoplasms of the pancreas is not associated with KIT/PDGFRA mutations / D. Cao [et al.] // *Mod Pathol.* – 2006. – Vol. 19. – P. 1157-1163.
7. Gene expression profiling provides insights into the pathways involved in solid pseudopapillary neoplasm of the pancreas / C. Cavard [et al.] // *J Pathol.* – 2009. – Vol. 218, №2. – P. 201-209.
8. Melanocytic differentiation in a solid pseudopapillary tumor of the pancreas: case report / C. Chen [et al.] // *J Gastroenterol.* – 2004. – Vol. 39. – P. 579-583.
9. Wnt/Wingless pathway activation and chromosome 6 loss characterize a distinct molecular sub-group of medullo blastomas associated with a favorable prognosis / S.C. Clifford [et al.] // *Cell Cycle.* – 2006. – Vol. 5. – P. 2666-2670.
10. Deshpande V. Solid pseudopapillary neoplasm of the ovary: a report of 3 primary ovarian tumors resembling those of the pancreas / V. Deshpande, E. Oliva, R.H. Young // *Am J Surg Pathol.* – 2010. – Vol. 34. – P. 1514-1520.
11. Histopathological and molecular prognostic markers in medulloblastoma: c-myc, N-myc, TrkC, and anaplasia / C.G. Eberhart [et al.] // *J Neuropathol Exp Neurol.* – 2004. – Vol. 63. – P. 441-449.
12. Medulloblastoma: clinicopathological correlates of SHH, WNT, and non-SHH/WNT molecular subgroups / D.W. Ellison [et al.] // *Acta Neuropathol.* – 2011. – Vol. 121. – P. 381-396.
13. Fredrik J. Swartling Myc proteins in brain tumor development and maintenance / J. Fredrik // *Ups J Med Sci.* – 2012. – Vol. 117, № 2. – P. 122-131.
14. TP53, b-catenin and c-myc/ N-myc status in embryonal tumours with ependymoblastic rosettes / M. Gessi [et al.] // *Neuropathology and Applied Neurobiology.* – 2011. – Vol. 37. – P. 406-413.
15. Targeting Notch pathway induces growth inhibition and differentiation of neuroblastoma cells / Giulia Ferrari-Toninelli [et al.] // *Neuro Oncol.* – 2010. – Vol. 12, № 12. – P. 1231-1243.
16. Paranuclear dot-like immunostaining for CD99: a unique staining pattern for diagnosing solid-pseudopapillary neoplasm of the pancreas / Y. Guo [et al.] // *Am J Surg Pathol.* – 2011. – Vol. 35, № 6. – P. 799-806.
17. An investigation of WNT pathway activation and association with survival in central nervous system primitive neuroectodermal tumours (CNS PNET) / H.A. Rogers [et al.] // *Br J Cancer.* – 2009. – Vol. 100, № 8. – P. 1292-1302.
18. Stabilization of beta-catenin induces pancreas tumor formation / P.W. Heiser [et al.] // *Gastroenterology.* – 2008. – Vol. 135. – P. 1288-1300.
19. Comparative analyses of gene copy number and mRNA expression in glioblastoma multiforme tumors and xenografts / J.G.

- Hodgson [et al.] // *Neuro Oncol.* – 2009. – Vol. 11. – P. 477-487.
20. Immunohistochemical evaluation of solid pseudopapillary tumors of the pancreas: the expression pattern of CD99 is highly unique / L. Li [et al.] // *Cancer Lett.* – 2011. – Vol. 310, № 1. – P. 9-14.
21. Solid pseudo-papillary neoplasm of the pancreas: distinct patterns of onset, diagnosis, and prognosis for male versus female patients / M.C. Machado [et al.] // *Surgery.* – 2008. – Vol. 143. – P. 29-34.
22. Solid-pseudopapillary tumor of the pancreas: a surgical enigma? / R.C. Martin [et al.] // *Ann Surg Oncol.* – 2002. – Vol. 9. – P. 35-40.
23. Mulkeen A.L. Less common neoplasms of the pancreas / A.L. Mulkeen, P.S. Yoo, C. Cha // *World J Gastroenterol.* – 2006. – Vol. 12. – P. 3180-3185.
24. Synergistic action of Wnt and LIF in maintaining pluripotency of mouse ES cells / K. Ogawa [et al.] // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2006. – Vol. 343. – P. 159-166.
25. Papavramidis T. Solid pseudopapillary tumors of the pancreas: review of 718 patients reported in English literature / T. Papavramidis, S. Papavramidis // *J Amer Coll Surg.* – 2005. – Vol. 200. – P. 965-972.
26. gliomas with primitive neuroectodermal tumor-like components: a clinic pathologic and genetic study of 53 cases / A. Perry [et al.] // *Brain Pathol.* – 2009. – Vol. 19. – P. 81-90.
27. Outcome prediction in pediatric medulloblastoma based on DNA copy-number aberrations of chromosomes 6q and 17q and the MYC and MYCN loci / S. Pfister [et al.] // *J Clin Oncol.* – 2009. – Vol. 27. – P. 1627-1636.
28. N-myc amplification and neuronal differentiation in human primitive neuroectodermal tumors of the central nervous system / E. Rouah [et al.] // *Cancer Res.* – 1989. – Vol. 49. – P. 1797-1801.
29. Clinical and biological behavior of pancreatic solid pseudopapillary tumors: report on 31 consecutive patients / R. Salvia [et al.] // *J Surg Oncol.* – 2007. – Vol. 95. – P. 304-310.
30. Santini D. Solid-Papillary Tumors of the Pancreas: Histopathology / D. Santini, F. Poli, S. Lega // *J Pancreas (Online).* – 2006. – Vol. 7. – P. 131-136.
31. Solid pseudopapillary neoplasms of the pancreas show an interruption of the Wnt-signaling pathway and express gene products of 11q / K. Tiemann [et al.] // *Mod Pathol.* – 2007. – Vol. 20. – P. 955-960.
32. Solid pseudopapillary neoplasms of the pancreas are associated with FLI-1 expression, but not with EWS/FLI-1 translocation / K. Tiemann [et al.] // *Mod. Pathol.* – 2006. – Vol. 19. – P. 1409-1413.
33. Solid and cystic tumor of the pancreas in an adult male / T. Tsunoda [et al.] // *Acta Pathol Jpn.* – 1991. – Vol. 41. – P. 763-770.
34. Activation of beta-catenin signaling programs embryonic epidermis to hair follicle fate / Yuhang Zhang [et al.] // *Development.* – 2008. – Vol. 135, № 12. – P. 2161-2172.
35. Mucinous cystic tumors of the pancreas: clinicopathological features, prognosis, and relationship to other mucinous cystic tumors / G. Zamboni [et al.] // *Am J Surg Pathol.* – 1999. – Vol. 23. – P. 410-422.
36. The HECT-domain ubiquitin ligase Huwe1 controls neural differentiation and proliferation by destabilizing the N-Myc oncoprotein / X. Zhao [et al.] // *Nat Cell Biol.* – 2008. – Vol. 10. – P. 643-653.
37. Solid-cystic papillary tumor of the pancreas in children / H. Zhou [et al.] // *Pediatr Surg Int.* – 2001. – Vol. 17. – P. 614-620.

**MYC FAMILY GENES IN SOLID-PSEUDOPAPILLARY TUMORS
OF THE PANCREAS**

E.N. Gordienko, O.V. Pakhlina, I.A. Chekmareva, D.L. Rothin, D.S. Gorin

In the paper the study of molecular disorder genes c-Myc and N-Myc in solid-pseudopapillary tumor of the pancreas. Examined 24 samples of tumors obtained from 21 patients, including 19 primary, recurrent 1, 4 metastasis. Fluorescence in situ hybridization was performed using DNA samples lokusspetsificheskikh to the loci 2p24, 6q23, 8q24 company «Vysis, Abbott Laboratories Inc», demonstrated that amplification of the N-Myc gene in solid-pseudopapillary tumor can be another confirming its neurogenic origin

Key words: the solid-pseudopapillary tumor of the pancreas, gene amplification, morphology, prognosis.

Паклина О.В. – д-р мед. наук, заведующая патологоанатомическим отделением ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России.
123098, г. Москва, ул. Маршала Новикова, д. 23.

Ротин Д.Л. – канд. мед. наук, ст. научный сотрудник патологоанатомической лаборатории НИИ нейрохирургии им. акад. Н.Н. Бурденко РАМН.
125047, г. Москва, ул. 4-я Тверская-Ямская, д. 16.