

ЭКСПРЕССИОННЫЙ ПРОФИЛЬ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ СИНОВИАЛЬНОЙ САРКОМЫ И САРКОМЫ ЮИНГА/PNET

**В.М. Перельмутер^{1,2}, Н.В. Васильев¹, Л.А. Таширева¹, О.В. Савенкова¹,
Е.В. Кайгородова¹, Г.С. Жамгарян¹**

*ФГБУ «НИИ онкологии» СО РАМН, г. Томск¹
ГОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет», г. Томск²
634050, г. Томск, пер. Кооперативный, 5; e-mail: pvm@ngs.ru¹*

Проведена оценка взаимосвязи гистологических и иммуногистохимических показателей синовиальной саркомы и саркомы Юинга/PNET с количеством клеток, несущих транслокацию t(X;18)(p11.2;q11.2). При гистологическом исследовании изучали цитотипические характеристики, типы структур опухолевого роста, распространенность и характер опухолевого матрикса, вторичные дистрофические изменения опухоли. Оценку митотической активности опухоли осуществляли посредством определения митотического индекса. Методом иммуногистохимии определяли наличие маркеров: vimentine, desmin, SMA, Myf-4, MyoD1, S-100, CD57, bcl-2, CD99, cytokeratine AE1/AE3, cytokeratine 7, EMA, Synaptophysin, chromogranin, Ki67. Детекцию транслокаций, характерных для синовиальной саркомы и саркомы Юинга/PNET, осуществляли с помощью хромогенной гибридизации in situ. Результаты исследования показали определенную связь морфологии и иммунофенотипа синовиальной саркомы с процентом опухолевых клеток, имеющих специфическую транслокацию t(X;18)(p11.2;q11.2).

Ключевые слова: синовиальная саркома, саркома Юинга/PNET, иммуногистохимические маркеры, CISH.

GENE EXPRESSION PROFILE AND MOLECULAR-GENETIC ANALYSIS OF SYNOVIAL SARCOMA AND EWING'S SARCOMA/PNET

*V.M. Perelmuter^{1,2}, N.V. Vasilyev¹, L.A. Tashireva¹, O.V. Savenkova¹, E.V. Kaigarodova¹, G.S. Zhamgaryan¹
Cancer Research Institute, Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences, Tomsk¹
Siberian State Medical University, Tomsk²
5, Kooperativny Street, Tomsk-634050, e-mail: pvm@ngs.ru¹*

The relationship between histological and immunohistochemical parameters of synovial sarcoma and Ewing's sarcoma/PNET and the number of cells carrying the t(X;18)(p11.2;q11.2) translocation. Histological examination was carried out to study the cytotypical characteristics, types of structures of tumor growth, tumor spread and secondary dystrophic changes in the tumor. The tumor mitotic activity was assessed by determining the mitotic index. The presence of markers such as vimentine, desmin, SMA, Myf-4, MyoD1, S-100, CD57, bcl-2, CD99, cytokeratine AE1/AE3, cytokeratine 7, EMA, Synaptophysin, chromogranin and Ki67 was determined by immunohistochemical assay. Detection of translocations characteristic of synovial sarcoma and Ewing's sarcoma/PNET was performed using chromogenic in situ hybridization. The study results showed the relationship between the histological and immunohistochemical parameters of synovial sarcoma and Ewing's sarcoma/PNET and the percentage of tumor cells having specific t(X;18)(p11.2;q11.2) translocation.

Key words: synovial sarcoma, Ewing's sarcoma/PNET, immunohistochemical markers, CISH.

Проблема морфологической диагностики мягкотканых сарком существует уже на протяжении десятилетий, и это обусловлено несколькими обстоятельствами. Группа сарком мягких тканей гетерогенна, что объясняется их широкой гистогенетической вариабельностью. Саркомы различных гистогенетических типов часто структурно сходны между собой, и при микроскопическом изучении лишены специфических черт. Все это требует комплексного подхода патолога в исследовании

опухоли с обязательным привлечением иммуногистохимического анализа [2].

Однако существует ряд сарком, при которых постановка точного нозологического диагноза затруднительна даже при использовании полного общепринятого стандарта. Так, среди мелкокругло-клеточных опухолей у патолога особенные трудности вызывает дифференциальная диагностика саркомы Юинга/PNET и низкодифференцированного субтипа синовиальной саркомы. Для них

характерна схожая морфология – опухоли представлены популяцией мелких однотипных клеток округлой формы с одинаковыми ядерными характеристиками, с возможным присутствием розеток и подобных им структур, с минимальной тканевой дифференцировкой [2, 4, 9]. Для дифференциации указанных опухолевых процессов S.H. Olsen et al. [10] на большой серии наблюдений с использованием широкой панели моноклональных антител разработали метод кластерного анализа иммуногистохимического профиля сарком, заключающийся в совокупной оценке различия экспрессии маркеров и их интенсивности при той или иной саркоме. Между тем данный метод не обладает абсолютными критериями, разграничивающими саркому Юинга/PNET и синовиальную саркому низкодифференцированного субтипа.

При иммуногистохимическом исследовании саркомы Юинга/PNET и низкодифференцированного субтипа синовиальной саркомы иммунофенотип опухолей часто не демонстрирует четких различий – специфичность таких маркеров, как CD99, cytokeratin-AE1/AE3, cytokeratin-7, -19, EMA, Bcl-2, весьма относительна или полностью утрачивается [1, 2, 4, 9, 11]. В этой связи, когда исчерпываются возможности методов морфологической и иммуногистохимической диагностики, решение вопроса лежит в плоскости молекулярно-генетического анализа. Факт наличия специфических транслокаций как при саркоме Юинга/PNET (EWSR1), так и при синовиальной саркоме (SYT) позволяет прибегнуть к проведению FISH (CISH)-метода с целью точной верификации опухоли.

Поскольку иммунофенотип саркомы Юинга/PNET и низкодифференцированной синовиальной саркомы вариабелен, представляют интерес его сопоставления с процентом опухолевых клеток, имеющих специфические для этих процессов транслокации.

Материал и методы

Исследовались 14 случаев сарком мягких тканей, из которых саркома Юинга/PNET составила 5 и синовиальная саркома – 9 случаев. Материал опухоли фиксировали в 10 % растворе нейтрального формалина, заливали в парафин и готовили срезы толщиной 4–5 мкм. Срезы окрашивали в водном растворе гематоксилина и эозина. При гистологическом исследовании изучали цитотипические характеристики, типы структур опухолевого роста,

распространенность и характер опухолевого матрикса, вторичные дистрофические изменения опухоли. Оценку митотической активности опухоли осуществляли посредством определения митотического индекса – подсчета митотических фигур в десяти полях зрения при большом увеличении объектива.

С целью определения иммунофенотипа сарком проводили иммуногистохимическое исследование. Использовались моноклональные антитела к следующим антигенам: vimentine (clone V9, «Novocastra»), desmin (clone DE-R-11, «Novocastra»), SMA (clone 1A4, «Dako»), Myf-4 (clone LO26, «Novocastra»), MyoD1 (clone 5.8A, «Dako»), S-100 (поликлональные, «Dako»), CD57 (clone NK-1, «Novocastra»), bcl-2 (clone bcl-2, «Dako»), CD99 (Ewing's Sarcoma Marker) (clone 12E7, «Dako»), cytokeratine AE1/AE3 (clone AE1/AE3, «Dako»), cytokeratine 7 (clone OV-TL12/30, «Novocastra»), EMA (clone GP1.4, «Novocastra»), Synaptophysin (clone SY38, «Dako»), chromogranin (clone 5H7, «Novocastra»), Ki67 (clone MIB-1, «Dako»). Демаскировка антигенов (в тех случаях, где была необходима) проводилась в программируемой барокамере Pascal («Dako»). Инкубация с антителами составляла 30 мин при 25 °С. Применяли полимерную систему визуализации EnVision Flex High pH («Dako»). Срезы докрасивали гематоксилином.

Материалом для реакции хромогенной гибридизации *in situ* служили парафиновые срезы тканей, фиксированных в 10 % формалине. После стандартной процедуры депарафинизации срезы обрабатывались с помощью Paraffin Pretreatment Reagent Kit II («Abbot Molecular», США) по протоколу фирмы производителя. Для выявления клеток, несущих транслокации, характерные для синовиальной саркомы и саркомы Юинга/PNET, проводилась гибридизация тканей с пробамми SPOT-Light SYT Translocation Probe Pair и SPOT-Light Ewing's Sarcoma Translocation Probe Pair (Invitrogen, США) соответственно. Реакция гибридизации проводилась в приборе TermoBrite Hybridizer («StatSpin», США). Детекция транслокаций осуществлялась с использованием набора SPoT-Light CISH Detection Kit («Invitrogen», США). После окраски срезов ткани гематоксилином («Invitrogen», США) проводилась оценка полученных результатов с использованием световой микроскопии.

Ядро, содержащее два спаренных сигнала, учитывалось как не несущее транслокацию; ядро, содержащее один спаренный и два одиночных

сигнала, учитывалось как имеющее транслокацию. Ядра, наложенные друг на друга, имеющие нечеткие контуры, пузыри и сомнительные сигналы, не учитывались. Подсчет производился на 100 клеток, количество ядер, имеющих транслокацию, выражалось в процентах к общему числу учтенных ядер. Положительными (т.е. соответствующими идентифицируемой саркоме) считались образцы, имеющие $\geq 10\%$ ядер, несущих транслокацию.

Полученные данные обрабатывали методами вариационной статистики. Достоверность различий оценивали с помощью непараметрического критерия Манна – Уитни. Статистически значимыми различия считались при $p < 0,05$. Значения $p < 0,2$ рассматривались как тенденция.

Результаты исследования

По совокупности результатов гистологического, иммуногистохимического и молекулярно-генетического исследований были сформулированы окончательные нозологические диагнозы. В 4 из 5 случаев саркома Юинга/PNET была представлена классическим (мелкокруглоклеточным) и одним веретенноклеточным вариантами. При иммуногистохимическом исследовании в большинстве случаев опухолевые клетки экспрессировали Bcl-2, CD99, слабо экспрессировали CD57, экспрессия AE1/AE3 отсутствовала. За исключением одного случая пролиферативная активность опухолевой ткани была высокой – количество клеток с экспрессией Ki-67 составляло более 30 %. Все случаи саркомы Юинга/PNET были подтверждены молекулярно-генетическим методом. Так, одним из основных признаков принадлежности опухоли к вышеуказанному семейству является генетическая перестройка с участием гена EWS (22q12). Продуктом данного гена является белок длиной 656 аминокислот с неясной функцией [7, 10]. Метод гибридизации *in situ* с использованием специального зонда позволяет выявить точку разрыва в локусе 22q12, т.е. с его помощью можно диагностировать не только основную транслокацию t(11;12)(q24;q12), но и остальные перестройки с участием минорных партнеров гена EWS. В результате проведенного CISH-исследования было показано, что доля клеток, несущих транслокацию t(11;12)(q24;q12), колебалась от 11 до 57 %.

Обсуждение

В настоящее время установлено, что хромосомная транслокация t(X;18)(p11.2;q11.2) в синовиальных саркомах определяется с частотой от 95 до 98 %. В

результате транслокации происходит слияние гена SYT (SS18) с одним из генов – членов семейства SSX-SSX1, SSX2 или SSX4, с образованием нового химерного онкогена SYT/SSX. Белковый продукт SYT/SSX играет важную роль в формировании опухолевого фенотипа синовиальной саркомы [3–5, 8].

Проведенные нами исследования показали, что во всех случаях синовиальной саркомы имел место низкодифференцированный субтип, из них 4 случая представлены мелкокруглоклеточным фенотипом, 3 – веретенноклеточным и 1 случай – плеоморфноклеточным. Пролиферативная активность была высокой – количество клеток с экспрессией Ki-67, за исключением одного случая, составило более 20 %. Доля клеток, несущих транслокацию t(X;18)(p11.2;q11.2), варьировала от 12 до 64 %.

При синовиальной саркоме проведен анализ взаимосвязи показателей гистологических и иммуногистохимических признаков с количеством клеток, несущих транслокацию (таблица). Так, синовиальные саркомы, обладающие большим количеством клеток, несущих транслокацию t(X;18)(p11.2;q11.2), характеризуются тенденцией к слабой экспрессии bcl-2, к большему значению критерия G по системе FNCLCC – G3 и высокой митотической активностью. Данное обстоятельство позволяет думать, что синовиальные саркомы с высоким процентом клеток, несущих специфическую транслокацию, являются биологически более агрессивными опухолями. Кроме того, выраженная митотическая активность, а также отсутствие или слабая экспрессия bcl-2 предполагают большую чувствительность данных опухолей к химиотерапии.

В исследуемый массив (n=14) не вошли 2 случая сарком мягких тканей, в которых при проведении метода хромогенной *in situ* гибридизации наряду с клетками, несущими специфическую транслокацию (SYT), были обнаружены клетки, несущие другие хромосомные aberrации. В одном случае, помимо 5 % клеток с транслокацией t(X;18)(p11.2;q11.2), 12 % клеток имели del(18q11.2). В литературе отсутствуют данные об интерпретации подобных генетических нарушений при синовиальной саркоме, поэтому диагноз был сформулирован как «недифференцированная веретенноклеточная саркома G2». В другом случае опухоль имела бифазное строение (веретенноклеточный и железистый компонент). При анализе веретенноклеточного компонента транслокация обнаружена в

**Взаимосвязь гистологических и иммуногистохимических признаков
с количеством клеток, несущих транслокацию**

Показатель	Значение показателя	Количество клеток, несущих транслокацию t(X;18) (p11.2;q11.2), M ± σ	
Критерий G (система FNCLCC)	2	11,5 ± 0,7	p=0,14
	3	26,43 ± 17,5	
Cytokeratin AE1/AE3	Положительный	18,0 ± 6,55	p=0,33
	Отрицательный/ слабоположительный	21,0 ± 8,54	
Bcl-2	Положительный	16,5 ± 0,7	p=0,19
	Отрицательный/ слабоположительный	32,5 ± 22,2	
CD57	Положительный	20,0 ± 12,7	p>0,5
	Отрицательный/ слабоположительный	16,6 ± 5,0	
Клеточный тип	Веретенклеточный	30,66 ± 28,9	p=0,24
	Плеоморфноклеточный	–	
	Мелкокруглоклеточный	19,7 ± 7,6	
Спонтанные некрозы	Отсутствуют	28,75 ± 23,8	p=0,27
	<15 %	19,0 ± 8,9	
	>15 %	–	
Митотическая активность	<9 митозов	17,6 ± 11,0	p=0,05
	>9 митозов	34,0 ± 16,0	
Атипические митозы	Отсутствуют	23,0 ± 19,1	p>0,5
	Присутствуют	23,5 ± 2,1	

54 % опухолевых клеток, из них в 25 % на фоне амплификации сигнала. В 13 % клеток обнаружены ядра с амплификацией сигнала без транслокации. В железистом компоненте транслокация обнаружена в 37 % опухолевых клеток, из них в 8 % на фоне амплификации сигнала. В 23 % клеток обнаружены ядра с амплификацией сигнала без транслокации. В этом случае процесс квалифицирован как «бифазный субтип синовиальной саркомы».

Настоящее исследование демонстрирует объективные трудности диагностики, с которыми приходится сталкиваться патологу в повседневной практике. В случаях, когда иммуногистохимическое исследование не позволяет дифференцировать мелкоклеточные варианты саркомы Юинга/PNET и синовиальной саркомы, значимость CISH (FISH)-метода достаточно велика. Однако тот факт, что специфические транслокации встречаются в 95 % синовиальной саркомы и в 85 % случаев саркомы Юинга/PNET [6], а также выявление иных генети-

ческих аберраций при этих процессах накладывают определенные ограничения на интерпретацию результатов гибридизации *in situ*. Кроме того, показана определенная связь морфологии и иммунофенотипа синовиальной саркомы с процентом опухолевых клеток, имеющих специфическую транслокацию. Дальнейшие исследования позволят выяснить, имеет ли процент клеток, несущих транслокацию t(X;18)(p11.2;q11.2), предсказательное значение для оптимизации лечения синовиальных сарком.

ЛИТЕРАТУРА

1. Буланов Д.В., Махсон А.Н. Иммуногистохимическая характеристика и критерии прогноза саркомы Юинга/PNET // Российский онкологический журнал. 2010. № 1. С. 17–19.
2. Васильев Н.В. Синовиальная саркома. Оценка прогноза // Сибирский онкологический журнал. 2010. № 1. С. 73–78.
3. Кекеева Т.В., Рязанцева А.А., Завалишина Л.Э., Андреева Ю.Ю., Бабенко О.В., Залетаев Д.В., Франк Г.А. Анализ химерных онкогенов SYT/SSX1 и SYT/SXX2 при синовиальной саркомке // Молекулярная биология. 2011. Т. 45, № 5. С. 840–844.
4. Кекеева Т.В., Рязанцева А.А., Завалишина Л.Э., Андреева Ю.Ю., Бабенко О.В., Залетаев Д.В., Франк Г.А. Комплексная молекулярная

диагностика синовиальной саркомы // Молекулярная медицина. 2010. № 3. С. 43–47.

5. *Amary M., Berisha F., Bernardi F.C., Herbert A., James M., Reis-Filho J.S., Fisher C., Nicholson A.G., Tirabosco R., Diss T.C., Flanagan A.M.* Detection of SS18-SSX fusion transcripts in formalin-Bxed paraffin-embedded neoplasms: analysis of conventional RT-PCR, qRT-PCR and dual color FISH as diagnostic tools for synovial sarcoma // *Mod. Pathol.* 2007. Vol. 20 (4). P. 482–496.

6. *Fletcher C.D.M., Bridge J.A., Hogendoorn P.C.W., Mertens F.* WHO Classification of Tumours of Soft Tissue and Bone. IARC: Lyon, 2013. 468 p.

7. *Hakky T.S., Gonzalvo A.A., Lockhart J.L., Rodriguez A.R.* Primary Ewing sarcoma of the kidney: a symptomatic presentation and review of the literature // *Ther. Adv. Urol.* 2013. Vol. 5 (3). P. 153–159. doi: 10.1177/1756287212471095.

8. *Hosono T., Hironaka M., Kobayashi A., Yamasawa H., Bando M., Ohno S., Sohara Y., Sugiyama Y.* Primary pulmonary synovial sarcoma confirmed by molecular detection of SYT-SSX1 Fusion Gene Transcripts: a case report and review of the literature // *Jpn. J. Clin. Oncol.* 2005. Vol. 35 (5). P. 274–279.

9. *Lopes H., Pereira C.A., Zucca L.E., Serrano S.V., Silva S.R., Camparoto M.L., Cárcano F.M.* Primary monophasic synovial sarcoma of the kidney: a case report and review of literature // *Clin. Med. Insights Oncol.* 2013. Vol. 7 (7). P. 257–262. doi: 10.4137/CMO.S12243.

10. *Olsen S.H., Thomas D.G., Lucas D.R.* Cluster analysis of immunohistochemical profiles in synovial sarcoma, malignant peripheral nerve sheath tumor and Ewing sarcoma // *Mod. Pathol.* 2006. Vol. 19 (5). P. 659–668.

11. *White B.E., Kaplan A., Lopez-Terrada D.H., Ro J.Y., Benjamin R.S., Ayala A.G.* Monophasic synovial sarcoma arising in the vulva // *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2008. Vol. 132. P. 698–702. doi: 10.1043/1543-2165

Поступила 13.01.14

REFERENCES

1. *Bulanov D.V., Mahson A.N.* The immunohistochemical characteristics and prognostic criteria of Ewing's sarcoma/PNET // *Rossijskij onkologicheskij zhurnal.* 2010. № 1. P. 17–19. [in Russian]

2. *Vasil'ev N.V.* Synovial sarcoma. Prognostic assessment // *Sibirskij onkologicheskij zhurnal.* 2010. № 1. P. 73–78. [in Russian]

3. *Kekeeva T.V., Rjazanceva A.A., Zavalishina L.Je., Andreeva Ju.Ju., Babenko O.V., Zaletaev D.V., Frank G.A.* Analysis of SYT/SSX1 and SYT/SSX2 fusion genes in synovial sarcoma // *Molekuljarnaja biologija.* 2011. Vol. 45 (5). P. 840–844. [in Russian]

4. *Kekeeva T.V., Rjazanceva A.A., Zavalishina L.Je., Andreeva Ju.Ju., Babenko O.V., Zaletaev D.V., Frank G.A.* Integrated molecular diagnosis of synovial sarcoma // *Molekuljarnaja medicina.* 2010. № 3. P. 43–47. [in Russian]

5. *Amary M., Berisha F., Bernardi F.C., Herbert A., James M., Reis-Filho J.S., Fisher C., Nicholson A.G., Tirabosco R., Diss T.C., Flanagan A.M.* Detection of SS18-SSX fusion transcripts in formalin-Bxed paraffin-embedded neoplasms: analysis of conventional RT-PCR, qRT-PCR and dual color FISH as diagnostic tools for synovial sarcoma // *Mod. Pathol.* 2007. Vol. 20 (4). P. 482–496.

6. *Fletcher C.D.M., Bridge J.A., Hogendoorn P.C.W., Mertens F.* WHO Classification of Tumours of Soft Tissue and Bone. IARC: Lyon, 2013. 468 p.

7. *Hakky T.S., Gonzalvo A.A., Lockhart J.L., Rodriguez A.R.* Primary Ewing sarcoma of the kidney: a symptomatic presentation and review of the literature // *Ther. Adv. Urol.* 2013. Vol. 5 (3). P. 153–159. doi: 10.1177/1756287212471095.

8. *Hosono T., Hironaka M., Kobayashi A., Yamasawa H., Bando M., Ohno S., Sohara Y., Sugiyama Y.* Primary pulmonary synovial sarcoma confirmed by molecular detection of SYT-SSX1 Fusion Gene Transcripts: a case report and review of the literature // *Jpn. J. Clin. Oncol.* 2005. Vol. 35 (5). P. 274–279.

9. *Lopes H., Pereira C.A., Zucca L.E., Serrano S.V., Silva S.R., Camparoto M.L., Cárcano F.M.* Primary monophasic synovial sarcoma of the kidney: a case report and review of literature // *Clin. Med. Insights Oncol.* 2013. Vol. 7 (7). P. 257–262. doi: 10.4137/CMO.S12243.

10. *Olsen S.H., Thomas D.G., Lucas D.R.* Cluster analysis of immunohistochemical profiles in synovial sarcoma, malignant peripheral nerve sheath tumor, and Ewing sarcoma // *Mod. Pathol.* 2006. Vol. 19 (5). P. 659–668.

11. *White B.E., Kaplan A., Lopez-Terrada D.H., Ro J.Y., Benjamin R.S., Ayala A.G.* Monophasic synovial sarcoma arising in the vulva // *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2008. Vol. 132. P. 698–702. doi: 10.1043/1543-2165