

Анализ генетических aberrаций в глиомах высокой степени злокачественности у детей

М.А. Зайцева¹, А.П. Шехтман¹, Л.И. Папуша¹, Э.Ф. Валиахметова^{1,2}, Л.А. Ясько¹, А.Е. Друй^{1,3}

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России; Россия, 117997 Москва, ГСП-7, ул. Саморы Машела, 1;

²ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр нейрохирургии им. акад. Н.Н. Бурденко» Минздрава России; Россия, 125047 Москва, ул. 4-я Тверская-Ямская, 16;

³ГАЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий»; Россия, 620026 Екатеринбург, ул. Карла Маркса, 22а

Контакты: Маргарита Алексеевна Зайцева astice@list.ru

Введение. Высокозлокачественные глиомы характеризуются широким спектром генетических аномалий. Различия в молекулярно-генетическом профиле позволяют выделить несколько основных подгрупп глиом высокой степени злокачественности у детей и подростков, которые различаются как по клиническому течению заболевания, его прогнозу, так и по ответу на стандартные схемы терапии.

Цель исследования — оценить профиль молекулярно-генетических маркеров глиом высокой степени злокачественности у детей.

Материалы и методы. В исследование были включены 53 образца глиом высокой степени злокачественности у детей. Были проанализированы мутации в генах H3F3A, Hist1H3B, BRAF, IDH1/2, а также аномалии числа копий генов CDKN2A/2B и экспрессия химерного гена ETV6-NTRK3.

Результаты. В 24 (45 %) из 53 проанализированных случаев выявлена драйверная мутация в ткани опухоли, в 15 (28 %) — потеря копии CDKN2A/2B, которая может выступить как второе мутационное событие. В общей сложности обнаружена 41 генетическая aberrация, из них 24 (58,5 %) составляют соматические миссенс-мутации, 1 (2,4 %) — вариант с неясным клиническим значением, 1 (2,4 %) — химерный онкоген и 15 (36,6 %) — делеции генов-онкосупрессоров.

Заключение. Полученные данные свидетельствуют о важности углубленного изучения генетического профиля опухоли для определения тактики ведения пациентов, а также подбора персонализированной терапии для больных злокачественными глиомами.

Ключевые слова: глиобластома, анапластическая астроцитомы, анапластическая плеоморфная ксантоастроцитомы, диффузная срединная глиома, H3 K28M, BRAF V600E, CDKN2A/2B, ETV6-NTRK3

Для цитирования: Зайцева М.А., Шехтман А.П., Папуша Л.И. и др. Анализ генетических aberrаций в глиомах высокой степени злокачественности у детей. Успехи молекулярной онкологии 2020;7(3):37–47.

DOI: 10.17650/2313-805X-2020-7-3-37-47



Analysis of genetic aberrations in pediatric high-grade gliomas

M.A. Zaytseva¹, A.P. Shekhtman¹, L.I. Papusha¹, E.F. Valiakhmetova^{1,2}, L.A. Yasko¹, A.E. Druy^{1,3}

¹Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Ministry of Health of Russia; 1 Samory Mashela St., GSP-7, Moscow 117997, Russia;

²N.N. Burdenko National Medical Research Center for Neurosurgery, Ministry of Health of Russia; 16, 4th Tverskaya-Yamskaya St., Moscow 125047, Russia;

³Research Institute of Medical Cell Technologies; 22a Karla Marksa St., Yekaterinburg 620026, Russia

Background. High-grade gliomas are characterized by a wide range of genetic abnormalities. The heterogeneous genomic landscape of pediatric high-grade gliomas allows identifying distinct subgroups of the disease in children and young adults. Most importantly, these subgroups differ by clinical course and prognosis, as well as treatment response to standard therapy.

Objective: to assess the profile of molecular genetic markers of high-grade gliomas in children.

Materials and methods. In the current study, we examine the frequency of H3F3A, Hist1H3B, BRAF, IDH1/2 mutations, the copy number alterations of CDKN2A/2B genes and the expression of ETV6-NTRK3 fusion gene in a cohort of 53 pediatric high-grade gliomas.

Results. Driver mutations and CDKN2A/2B deletions were observed in 24 (45 %) and 15 (28 %) of 53 tumors, respectively. Overall, the studied high-grade gliomas harbored 41 genetic aberrations including 24 (58.5 %) somatic missense mutations, 1 (2.4 %) genetic variant of unknown clinical significance, 1 (2.4 %) oncogenic fusion gene and 15 (36.6 %) deletions of the tumor suppressor genes.

Conclusion. These findings point to the importance of molecular profiling of tumors for the optimal clinical care and development of new approaches to treatment aimed at molecular targets for personalized anticancer therapies.

Key words: glioblastoma, anaplastic astrocytoma, anaplastic pleomorphic xanthoastrocytoma, diffuse midline glioma, H3 K28M, BRAF V600E, CDKN2A/2B, ETV6-NTRK3

For citation: Zaytseva M.A., Shekhtman A.P., Papusha L.I. et al. Analysis of genetic aberrations in pediatric high-grade gliomas. Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology 2020;7(3):37–47. (In Russ.).

Введение

Глиомы – самые распространенные новообразования центральной нервной системы (ЦНС). Традиционно, основываясь на данных гистологического исследования с применением рутинной окраски гематоксилином и эозином и методов иммуногистохимии, глиомы подразделяют на 4 степени злокачественности (grade). В основе определения степени злокачественности лежат следующие гистологические критерии: клеточный и ядерный полиморфизм, фигуры митозов, эндотелиальная пролиферация и области некрозов опухолевой ткани. При наличии 2 и более критериев глиальные опухоли оцениваются как высокозлокачественные (ВЗГ). К ним относятся анапластическая астроцитома (АА), анапластическая плеоморфная ксантоастроцитома (АПКА), анапластическая олигодендроглиома, анапластическая ганглиоглиома – степень злокачественности III по классификации Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) grade III. Некроз и/или пролиферация микрососудов (ангиогенез) являются характерными особенностями глиобластом (ГБ) – опухолей IV степени злокачественности (WHO grade IV) [1].

За последние 5 лет в диагностике опухолей ЦНС произошли кардинальные изменения благодаря совершенствованию методов молекулярной биологии. В обновленной классификации опухолей ЦНС ВОЗ 2016 г. (издание 4-е, пересмотренное) впервые был реализован междисциплинарный подход в диагностике, основанный на определении не только гистологических, но и в обязательном порядке молекулярно-генетических особенностей опухоли. Определение мутационного статуса генов *IDH1*, *IDH2*, а также делеции 1p/19q стало необходимым для окончательной верификации гистологических вариантов глиом у взрослых пациентов, а определение мутации K28M в гене *H3F3A* стало обязательным для исключения диффузной срединной глиомы у детей, характеризующейся крайне агрессивным клиническим течением и неблагоприятным прогнозом [1]. Более того, после публикации классификации опухолей ЦНС ВОЗ 2016 г. была продемонстрирована диагностическая и прогностическая ценность многих других молекулярно-генетических аномалий, выявление которых в настоящее время активно применяется в рутинной практике и является неотъемлемым этапом окончательной постановки диагноза, а также определения тактики лечения пациентов с учетом генетического профиля опухоли [2–5].

Принимая во внимание, что глиальные опухоли характеризуются высокой гетерогенностью по своему клеточному составу, не вызывает сомнений, что выявление молекулярно-генетических маркеров позволит существенно улучшить качество дифференциальной диагностики фенотипически схожих гистологических вариантов глиом, а также позволит использовать идентифицированные генетические варианты в качестве прогностических биомаркеров и терапевтических мишеней.

Цель исследования – оценить профиль молекулярно-генетических маркеров ВЗГ у детей.

Материалы и методы

В ретроспективно-проспективное исследование были включены 53 пациента в возрасте от 4 мес до 21 года (медиана возраста 10 лет) с глиальными опухолями grade III–IV. Клинический диагноз у всех пациентов был подтвержден результатами гистологического исследования в патологоанатомическом отделении Национального медицинского исследовательского центра детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева в период с 2013 по 2020 г. Законные представители пациентов предоставили информированное согласие на использование результатов исследований в научных целях.

В общей структуре исследованного материала ВЗГ большую часть наблюдений составили гистологически верифицированные ГБ ($n = 35$; 66 %), среди них 8 (15 %) случаев – гигантоклеточные ГБ. Меньшее количество наблюдений составили АА ($n = 9$; 17 %) и АПКА ($n = 7$; 13 %). В 2 (4 %) случаях ввиду малого количества диагностически значимого материала гистологический вариант злокачественной глиомы не был дифференцирован.

В серии наших наблюдений ВЗГ имели преимущественно полушарное расположение ($n = 27$; 51 %), 1 из них с вовлечением подкорковых структур. Опухоли срединной локализации составили 22 (42 %) наблюдения, среди них 12 (23 %) – опухоли таламуса, 4 (7 %) – опухоли ствола головного мозга, 3 (6 %) – опухоли мозжечка и 3 (6 %) – опухоли спинного мозга. У 4 (7 %) пациентов данные о локализации опухоли неизвестны. Соотношение девочек и мальчиков составило 1:1,5 (21 и 32 пациента соответственно).

Молекулярно-генетическое исследование ткани опухоли включало определение наиболее характерных генетических aberrаций для ВЗГ у детей: мутаций в генах *H3F3A* (COSM327928, COSM327929), *Hist1H3B* (COSM829202), *BRAF* (COSM476), *IDH1* (COSM28746, COSM28747), *IDH2* (COSM33733) аномалий числа копий (делетий) генов *CDKN2A/2B* и экспрессии химерного гена *ETV6-NTRK3* (COSF571) [6].

Материалом для молекулярно-генетического исследования послужили образцы опухолевой ткани, фиксированные в формалине и залитые в парафиновые блоки. Для выделения РНК и ДНК использовали коммерческий набор FFPE RNA/DNA Purification Plus (Norgen Biotek, Канада) в соответствии с инструкцией фирмы-производителя. Концентрацию выделенных РНК и ДНК оценивали с помощью спектрофотометра Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, США).

Анализ мутаций в генах *H3F3A* и *Hist1H3B* проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующим двусторонним секвенированием продуктов амплификации на генетическом анализаторе ABI 3500xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США).

Полученные данные интерпретировали с использованием программного обеспечения Variant Reporter v2.0 (Applied Biosystems, США) и Sequencing Analysis v6.0 (Applied Biosystems, США). Для количественной оценки частоты мутантного аллеля *H3 K28M* проводили цифровую капельную ПЦР с применением системы QX200 Droplet Digital PCR (Bio-Rad, США). Анализ и интерпретацию результатов осуществляли с помощью программного обеспечения QuantaSoft Version 1.6.6.0320 (Bio-Rad, США).

Определение соматических мутаций в экзоне 4 *IDH1* (R132C и R132H), экзоне 4 *IDH2* (R172M и R172K), экзоне 15 *BRAF* (V600E), а также анализ числа копий генов *CDKN2A/2B* выполняли методом множественной лигазно-зависимой амплификации зондов (MLPA). Для пробоподготовки использовали набор реагентов SALSA MLPA probemix P370-A1 BRAF-IDH1-IDH2 (MRC-Holland, Нидерланды). Количественный анализ результатов проводили с применением программного обеспечения Coffalyser.Net (MRC-Holland, Нидерланды). Все выявленные нуклеотидные замены были подтверждены референтным методом – секвенированием по Сэнгеру.

Определение экспрессии химерного гена *ETV6* (экзон 5) – *NTRK3* (экзон 15) выполняли методом ПЦР с обратной транскрипцией с последующей верификацией ПЦР-продуктов секвенированием по Сэн-

геру. Для исключения ложноотрицательных результатов одновременно с выявлением химерного транскрипта проводилось определение экспрессии референсного гена *ABL*, что служило контролем сохранности выделенной РНК.

Статистическую обработку результатов исследований осуществляли с использованием программы XLStat. Различия качественных параметров между исследуемыми группами пациентов были проанализированы с помощью непараметрического критерия χ^2 , количественных параметров – Манна–Уитни.

Результаты

Определение мутационного статуса гена *H3F3A* было выполнено всем 53 пациентам. При секвенировании по Сэнгеру экзона 2 гена *H3F3A* выявлены 2 патогенных генетических варианта: с.83A>T, р.(K28M) – у 15 (28 %) пациентов и с.103G>A, р.(G35R) – у 4 (8 %), а также вариант с.95C>A, р.(S32Y) с неясным клиническим значением – у 1 (2 %) пациента. В качестве референса использовали транскрипт ENST00000366815.9, версия генома GRCh38.p13. Количественную оценку частоты мутантного аллеля *H3 K28M* выполняли 14 пациентам, результаты представлены на рис. 1 и в таблице.

Пациентам с «диким» типом гена *H3F3A* и срединной локализацией опухоли (таламус, ствол головного

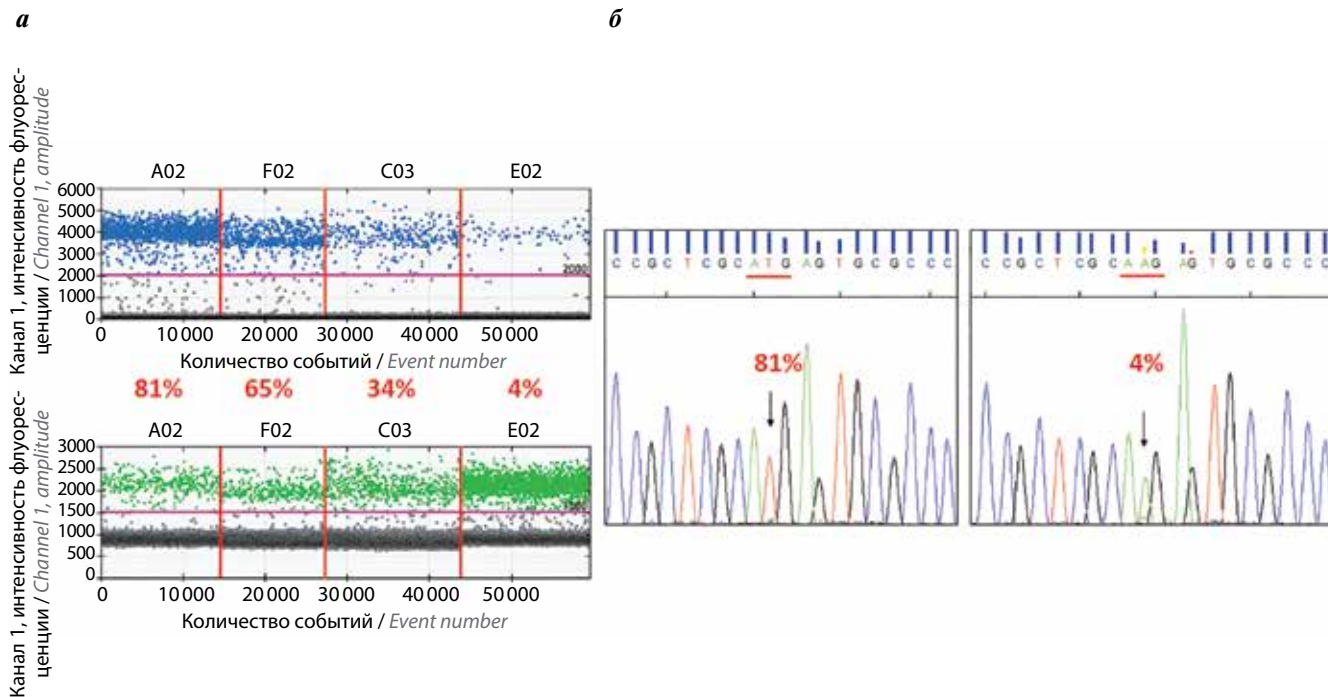


Рис. 1. Результаты оценки частоты мутантного аллеля *H3 K28M*: а – определение частоты мутантного аллеля *H3 K28M* методом цифровой капельной полимеразной цепной реакции. Канал 1 (FAM) – детекция мутантного аллеля, канал 2 (HEX) – детекция аллеля «дикого» типа. Розовой линией обозначен пороговый уровень интенсивности флуоресценции, выше которого капли расценивались как позитивные (HEX: 1500, FAM: 2000); б – секвенирование по Сэнгеру образцов с высокой (81 %) и низкой (4 %) частотой мутантного аллеля *H3 K28M*, стрелкой обозначена исследуемая нуклеотидная замена *H3F3A:c.83A>T*

Fig. 1. The results of assessing allele frequency of *H3 K28M*: a – the variant allele frequency of *H3 K28M* detection using digital droplet polymerase chain reaction assays. Channel 1 (FAM) – *H3F3A K28M*, channel 2 (HEX) – wild-type *H3F3A*. The pink line shows the threshold (HEX: 1500, FAM: 2000); б – Sanger sequencing in the cases with high (81 %) and low (4 %) *H3 K28M* variant allele frequency, the arrow indicates the location of the nucleotide substitution *H3F3A:c.83A>T*

Клинико-морфологические особенности злокачественных глиом с мутацией *H3 K28M*Clinicopathologic features of high-grade gliomas with histone *H3 K28M* mutation

Номер Case number	Возраст пациента, лет Age at onset, years	Пол Sex	Локализация опухоли Tumor location	Частота мутант- ного аллеля <i>H3</i> <i>K28M</i> , % Variant allele frequency (VAF) of <i>H3 K28M</i> , %	Проллиферативная активность по Ki-67, % Ki-67 proliferation index, %
1	10	Мужской Male	Ствол головного мозга и IV желудочек Brainstem and IV ventricle	Нет данных No data	Нет данных No data
2	15	Мужской Male	Левый таламус Left thalamus	53,2	60
3	17	Мужской Male	Теменно-затылочная область левого полушария Parieto-occipital region of the left cerebral hemisphere	4,0	15–20
4	13	Женский Female	Правый боковой желудочек с распростра- нением на область правого таламуса, правую ножку мозга и четверохолмие Right lateral ventricle with the extension to the right thalamus, right cerebral peduncle and corpora quadrigemina	56,2	20
5	2	Женский Female	Левое полушарие мозжечка Left cerebellar hemisphere	55,6	20–30
6	16	Мужской Male	Левый таламус и ножки мозга слева Left thalamus and left cerebral peduncles	33,9	10–15, фокально до 20 10–15, focally up to 20
7	9	Мужской Male	Правый таламус с распространением в ствол головного мозга Right thalamus with the extension to the brainstem	80,9	15–20, фокально до 25–30 15–20, focally up to 25–30
8	7	Мужской Male	Правое полушарие с распространением в боковой и III желудочки, правый таламус и средний мозг Right hemisphere with the extension to the lateral and III ventricles, right thalamus and midbrain	64,4	30
9	18	Женский Female	Правый зрительный бугор и средний мозг Right thalamus and midbrain	50,3	30
10	4	Мужской Male	Спинальный мозг на уровне C4–C7 Spinal cord at C4–C7 level	64,6	15
11	14	Мужской Male	Спинальный мозг на уровне C4–Th3 Spinal cord at C4–Th3 level	35,3	20
12	5	Мужской Male	Ствол головного мозга Brainstem	45,0	30
13	11	Женский Female	Левый таламус и ножки мозга слева Left thalamus and left cerebral peduncles	56,1	20
14	16	Мужской Male	Правый таламус и ножки мозга справа Right thalamus and right cerebral peduncles	44,2	40
15	11	Женский Female	Левый таламус и средний мозг Left thalamus and midbrain	44,8	15

мозга, спинной мозг) был проведен анализ мутаций в гене *Hist1H3B* ($n = 9$). Мутация *Hist1H3B* K28M не обнаружена ни в одном из исследуемых образцов ВЗГ.

Далее образцы были проанализированы на предмет более редких генетических aberrаций. При исследовании методом MLPA у 1 пациента обнаружена

замена с.394C>T, p.(R132C) в гене *IDH1*, у 4 – мутация *BRAF* с.1799T>A, p.(V600E). Мутаций в гене *IDH2* (R172M и R172K) в исследуемой когорте пациентов не выявлено. Делеция локуса 9p21.3, затрагивающая *CDKN2A/2B*, обнаружена в 15 (43 %) из 35 образцов: в 4 случаях – гомозиготная и в 11 случаях –

гетерозиготная. В 6 (40 %) из 15 образцов ген *MIR31*, расположенный в регионе 9p13, также был вовлечен в делецию.

Определение химерного транскрипта *ETV6-NTRK3* было выполнено пациентам в возрасте 0–7 лет ($n = 14$). Экспрессия химерного гена в ткани опухоли обнаружена только у 1 пациентки. На рис. 2 представлена электрофореграмма продуктов амплификации детектируемого химерного транскрипта *ETV6-NTRK3* и фрагмента гена *ABL*, а также результат верификации выявленного транскрипта путем секвенирования по Сэнгеру.

На рис. 3 показаны обнаруженные генетические aberrации в когорте пациентов с ВЗГ.

Обсуждение

При интерпретации результатов секвенирования гена *H3F3A* могут возникать трудности, поскольку в зависимости от используемой номенклатуры можно встретить разные обозначения мутаций: *H3 K27M* и *H3 G34R/V* или *H3 K28M* и *H3 G35R/V*. Данные

разногласия связаны с устоявшейся номенклатурой сайтов модификации гистонов в контексте эпигенетической регуляции экспрессии генов. Однако при уточнении первичной структуры гистонов было обнаружено, что после трансляции полипептидная цепь H3, как и многие другие полипептиды, подвергается пост-трансляционной модификации (процессингу) для приобретения функциональной активности – отщеплению N-концевого остатка метионина. Поскольку в составляющих нуклеосомную глобулу молекулах гистонов отсутствует метионин, то в общеизвестной номенклатуре гистонов при нумерации аминокислот не учитывается удаленный аминокислотный остаток метионина. Несмотря на то что в научной литературе чаще встречаются обозначения генетических вариантов *H3F3A* по общепринятой номенклатуре гистонов, в данном исследовании все варианты нуклеотидной последовательности *H3F3A* названы в соответствии с номенклатурой, принятой HGVS (Human Genome Variation Society; <http://www.hgvs.org>), во избежание ошибочной интерпретации сообщаемых данных

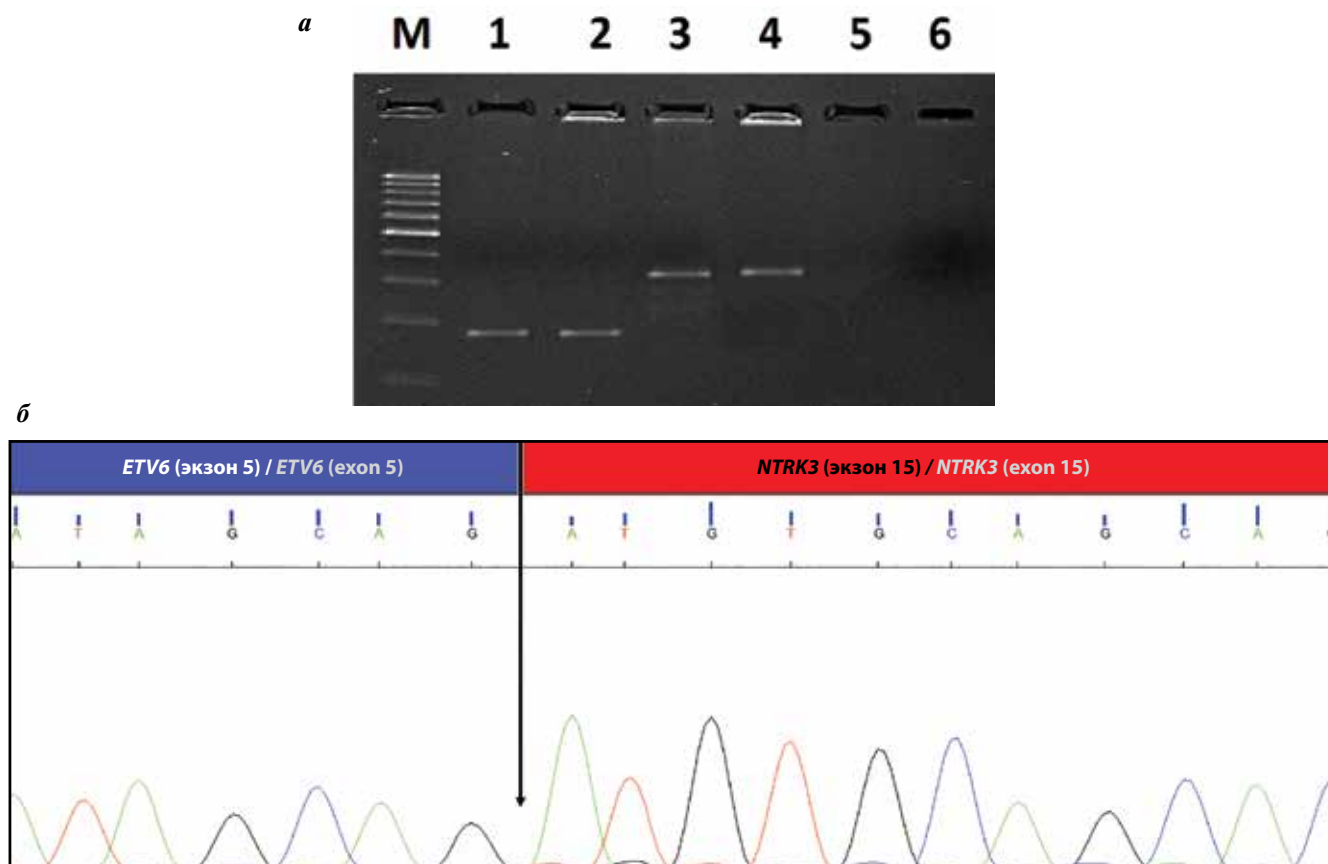


Рис. 2. Результат определения химерного транскрипта *ETV6-NTRK3*: а – электрофореграмма продуктов амплификации (M – маркер молекулярной массы; 1, 2 – фрагмент химерного транскрипта *ETV6-NTRK3* (188 пар оснований); 3, 4 – фрагмент референсного гена *ABL*; 5, 6 – отрицательный контроль реакции); б – фрагмент хроматограммы *ETV6* (экзон 5) – *NTRK3* (экзон 15) с указанием точки разрыва. В качестве референсных транскриптов для генов *ETV6* и *NTRK3* использованы ENST00000396373.9 и ENST00000360948.6 соответственно, версия генома GRCh38.p13
Fig. 2. Results of the fusion transcript *ETV6-NTRK3* detection: а – gel electropherogram of RT-PCR products (M – DNA Ladder; 1, 2 – fragment of *ETV6-NTRK3* fusion transcript (188 base pairs); 3, 4 – fragment of *ABL* housekeeping gene transcript; 5, 6 – negative amplification control); б – sequence chromatogram of *ETV6* (exon 5) – *NTRK3* (exon 15) fusion transcript, with the arrow indicating the fusion breakpoint. ENST00000396373.9 and ENST00000360948.6 transcripts were used as reference sequences for *ETV6* and *NTRK3* genes respectively, genome build GRCh38.p13

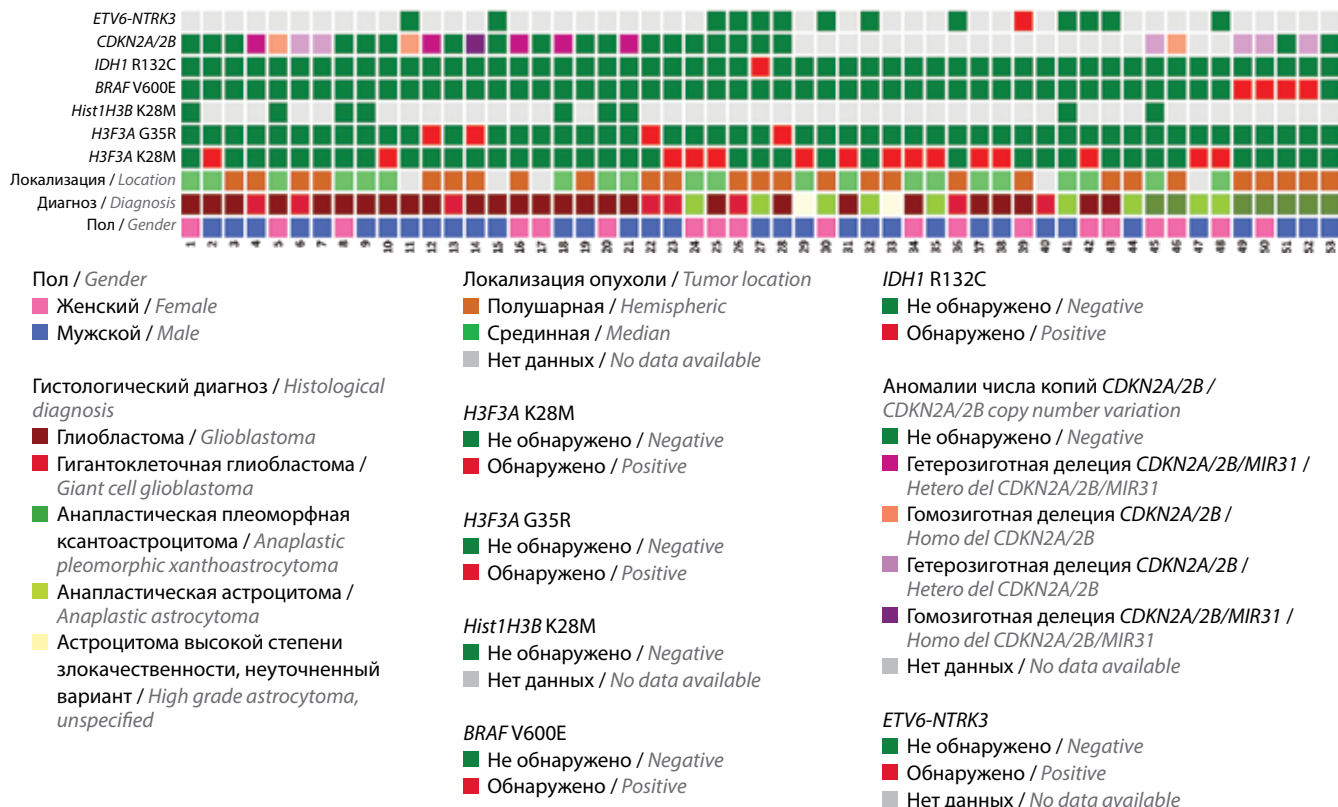


Рис. 3. Графическое представление клинических данных и генетических aberrаций в исследуемой когорте пациентов с высокозлокачественными глиомами

Fig. 3. Graphical representation of the clinical data and of the genetic alterations observed in the cohort of pediatric high-grade gliomas

и диагностических неточностей. Тем не менее стоит иметь в виду, что обозначения *H3F3A*: с.83A>Т, р.(K28M) и *H3F3A*: с.103G>А, р.(G35R) эквивалентны общеизвестным *H3* K27M и *H3* G34R [7].

В данном исследовании было проанализировано 53 образца ВЗГ у детей. В 24 (45 %) из них выявлена драйверная мутация в ткани опухоли. Все выявленные мутации были взаимоисключающими – сочетаний мутаций в генах *H3F3A*, *IDH1/2*, *BRAF* не обнаружено. В соответствии с наличием или отсутствием драйверных мутаций в выбранных генах-кандидатах и экспрессии химерного гена *ETV6-NTRK3* все глиомы у детей и подростков можно разделить на 6 основных подгрупп: *H3* K28-мутантный тип, *H3* G35-мутантный тип, *IDH1/2*-мутантный тип, *BRAF*-мутантный тип, с наличием перестроек *NTRK* и *H3/BRAF/IDH*-«дикий» тип. Наиболее распространенными соматическими мутациями в ВЗГ у детей оказались мутации в гене *H3F3A*.

В серии наших наблюдений мутации *H3F3A* были обнаружены в 19 (36 %) из 53 образцов: вариант K28M выявлен в 15 (28 %) случаях, вариант G35R – в 4 (8 %), вариант G35V не обнаружен. Из 15 глиом с *H3* K28M в 8 (53 %) случаях был выставлен гистологический диагноз ГБ, в 1 (7 %) – гигантоклеточная ГБ, в 4 (27 %) – АА, в 2 (13 %) случаях гистологический вариант ВЗГ не был дифференциально диагностирован. Мутация *H3* K28M обнаружена в глиомах средней линии

в 13 (59 %) из 22 образцов: 8 (67 %) из 12 глиом таламуса, 2 (50 %) из 4 глиом ствола головного мозга, 2 (67 %) из 3 глиом спинного мозга, а также 1 (33 %) из 3 глиом мозжечка. В 1 случае опухоль имела диффузное распространение из правого полушария головного мозга в боковой и III желудочек, правый таламус, средний мозг. В классификации опухолей ЦНС ВОЗ 2016 г. для обозначения подобных опухолей введена новая нозологическая единица «диффузная срединная глиома с мутацией *H3* K28M, WHO grade IV» [1].

Однако у 1 пациента с полушарной гигантоклеточной ГБ также выявлена мутация *H3F3A* K28M. Стоит отметить, что в данном случае частота мутантного аллеля составила 4 %, т. е. соответствовала субклональной. Данный факт указывает на внутриопухольную гетерогенность и ставит под сомнение драйверный характер замены *H3* K28M и ее прогностическое значение. На момент сбора катamnестических данных пациент закончил локальную лучевую терапию с параллельной химиотерапией темозоломидом и вальпроевой кислотой по протоколу НПТ НГГ 2007 и жив без признаков прогрессирования заболевания спустя 20 мес от постановки диагноза.

У пациента 4 лет с АА спинного мозга в гене *H3F3A* были обнаружены 2 генетических варианта: 1) патогенный вариант с.83A>Т, р.(K28M) с частотой мутантного аллеля 64,6 %; 2) гетерозиготная однонуклеотидная замена с.95C>А в экзоне 2 с частотой альтернативного

аллеля ~65 %, приводящая к замене аминокислоты p.(S32Y). Вариант *H3 S32Y* не зарегистрирован в базе данных аллельных вариантов человека The Genome Aggregation Database (gnomAD) и базе данных Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (COSMIC). Для оценки возможного влияния замены аминокислоты на структуру и функцию белка были применены компьютерные (*in silico*) программы предсказаний патогенности. По данным предсказательных ресурсов MutationTaster, Mutation assessor, SIFT и PROVEAN, замена считается патогенной. Более того, найденный генетический вариант располагается в высококонсервативном участке ДНК, а аминокислота в позиции 32 является уникальным сайтом фосфорилирования гистона H3.3, отличающим его от других вариантов гистона H3, что также свидетельствует в пользу его патогенности. В исследовании F.N. Grigore и соавт. показано, что замены K28M, S32E, G35R/V инициируют онкогенез через хромосомную нестабильность, обусловленную нарушением регуляции клеточного цикла и приводящую к анеупloidии. На клеточной линии диффузной срединной глиомы авторы продемонстрировали, что аномальная сегрегация хромосом обусловлена снижением метилирования лизина H3K28 и влечет за собой нарушение фосфорилирования серина H3S32. В то же время клеточные линии с сочетанными мутациями (K28M/S32E или G35R/S32E) проходят контрольные точки клеточного цикла и завершают цикл деления без каких-либо нарушений. Таким образом, нуклеотидная замена в сайте фосфорилирования может нивелировать потерю метилирования H3K28 и восстанавливать эпигенетическую регуляцию активности генов, ответственных за прохождение клетки по тому или иному периоду клеточного цикла [8]. Спустя год от постановки диагноза описываемый пациент жив и продолжает терапию.

По последним данным, срединные глиомы с аллельной нагрузкой *H3 K28M*, превышающей 50 %, характеризуются наиболее агрессивным фенотипом [9]. Наличие соматического генетического варианта с частотой мутантного аллеля >50 % обусловлено аллельным дисбалансом области расположения гена *H3F3A* (локус 1q42.12). В исследовании S. Maeda и соавт. в 27 % диффузных срединных глиом аллельная нагрузка *H3 K28M* превышала 50 %, что было связано с увеличением числа копий мутантного аллеля, потерей интактного аллеля и потерей гетерозиготности 1q. Наличие аллельного дисбаланса локуса 1q42.12 было ассоциировано с высоким индексом пролиферации Ki-67, а также с низкими показателями выживаемости пациентов ($p < 0,05$) [9]. Таким образом, принципиально важно определять не только наличие мутации *H3 K28M*, но и оценивать частоту альтернативного аллеля.

Мы провели количественную оценку частоты мутантного аллеля *H3 K28M* в опухолевой ДНК, в 8 (57 %) из 14 случаев она превышала 50 % (см. таблицу). При сравнении пролиферативной активности опухолевых

клеток в группах пациентов с частотой мутантного аллеля *H3 K28M* >50 и ≤50 % статистически значимых различий не получено ($p > 0,05$).

Мутация G35R в гене *H3F3A* выявлена в 4 (15 %) из 26 полушарных ВЗГ, а именно в ГБ лобной доли, ГБ височной доли и в 2 ГБ с сочетанным поражением долей (лобно-теменной и теменно-височно-затылочной).

Полученные нами данные о преобладании мутаций *H3F3A* в ВЗГ у детей соответствуют результатам ранее опубликованных исследований. D.A. Solomon и соавт., проведя иммуногистохимическое исследование, выявили наличие *H3 K28M* в 17 (94 %) из 18 диффузных глиом ствола, в 15 (65 %) из 23 глиом зрительного бугра и в 9 (53 %) из 17 глиом спинного мозга [10]. По данным A. Johnson и соавт., в серии из 90 ГБ абerrации *H3F3A* наблюдались в 43 (48 %) случаях, из них *H3 K28M* – в 35 (81 %), *H3 G35R* – в 8 (19 %) [2]. Кроме того, в исследованиях, посвященных изучению молекулярно-генетического профиля ВЗГ, подчеркивается, что для замен K28M и G35R/V характерна корреляция с локализацией опухоли [2, 3]. В глиомах срединных структур выявляется мутация *H3 K28M*, в глиомах полушарной локализации – *H3 G35R/V*. Данная особенность подтверждена и в серии наших наблюдений.

Абerrантная активация сигнального пути MAPK/ERK является наиболее частым событием в патогенезе глиом низкой степени злокачественности. Тем не менее в 5–10 % ВЗГ, преимущественно АПКА и эпителиоидных ГБ, также встречается активирующая мутация *BRAF V600E* [2]. Среди исследуемых нами пациентов с ВЗГ данная мутация обнаружена только у пациентов с АПКА, а именно в 4 (57 %) из 7 проанализированных случаев.

Отличительная особенность генетического профиля АПКА – абerrантная активация генов семейства *RAF (BRAF, RAF1)* в сочетании с биаллельной инактивацией гена-супрессора опухолевого роста *CDKN2A*. По данным J.J. Phillips и соавт., с частотой до 90 % в АПКА наблюдаются мутации в гене *BRAF*, безусловно, наиболее распространенная из них *BRAF V600E* [11]. Описан случай АПКА с редким генетическим вариантом – *BRAF p.(485_490del)*, также приводящим к конститутивной активации сигнального пути MAPK/ERK. Помимо точечных мутаций *BRAF* в геноме АПКА могут присутствовать структурные перестройки, приводящие к образованию химерных генов *NRF1-BRAF* и *ATG7-RAF1* [11, 12]. Данные генетические абerrации являются идеальной мишенью для таргетной терапии пациентов с ВЗГ [5, 13].

По данным R.A. Vaubel и соавт., гомозиготная делеция *CDKN2A/2B* наблюдается в 93 % случаев АПКА. Согласно приведенным данным потеря *CDKN2A/2B* выявлялась в сочетании с другими абerrациями хромосомы 9 – с утратой всей хромосомы, делециями короткого плеча, а также с потерей гетерозиготности 9p, не сопровождающейся изменениями числа

копий [12]. Значительно реже в АПКА наблюдается гетерозиготная делеция *CDKN2A*, однако при проведении иммуногистохимического окрашивания с антителом к белковому продукту *CDKN2A* (p16^{INK4a}) выявляется полная утрата экспрессии маркера, что указывает на биаллельную инактивацию гена альтернативным механизмом (например, за счет гиперметилирования промоторной области) [11]. В исследуемой нами когорте в 4 (57 %) из 7 АПКА наблюдалась гетерозиготная делеция *CDKN2A*, в 1 (14 %) из 7 – гомозиготная, в 3 образцах она сочеталась с мутацией *BRAF* V600E.

С высокой частотой делеция *CDKN2A* встречается и при других гистологических вариантах ВЗГ у детей. L. Frazão и соавт. выявили делецию *CDKN2A/2B* в 6 (35,3 %) из 17 ВЗГ разных гистологических вариантов (ГБ, АА и других более редких нозологических форм): в 4 случаях – гомозиготную и в 2 – гетерозиготную. Наличие делеции было ассоциировано с худшей общей и бессобытийной выживаемостью пациентов [14]. A. Johnson и соавт. выявили делеции *CDKN2A* и *CDKN2B* соответственно в 18 (20 %) и 14 (16 %) из 90 ГБ у детей [2]. В исследуемой нами группе пациентов делеция *CDKN2A/2B* обнаружена в 15 из 35 (43 %) образцов: в 4 случаях – гомозиготная и в 11 – гетерозиготная. При этом в 2 образцах ГБ она сочеталась с мутацией *H3F3A* G35R. В 6 (40 %) из 15 наблюдений ген *MIR31*, расположенный в регионе 9p13, также был вовлечен в делецию. По данным R. Rajbhandari и соавт., экспрессия miR-31 снижена в >70 % ГБ и ассоциирована с худшими показателями общей выживаемости независимо от количества копий *CDKN2A/2B* [15].

Наиболее изученными прогностическими маркерами глиом у взрослых являются мутации в генах *IDH1* и *IDH2*. С частотой до 80 % в астроцитомах, олигодендроглиомах и вторичных ГБ обнаруживается мутация в кодоне 132 гена *IDH1*. Однако в ВЗГ у детей мутации *IDH1* и *IDH2* наблюдаются в редких случаях. В исследовании Детской онкологической группы США (Children's Oncology Group, COG) частота встречаемости мутаций *IDH1* в ВЗГ у детей составила 16 %, при этом чаще наблюдалась замена R132H, реже – R132S и R132C. Согласно приведенным данным мутации *IDH1* чаще встречались у детей с АА, чем с ГБ (26 и 8 % соответственно). Все мутации *IDH1* были обнаружены у детей старше 14 лет, в то время как в младшей возрастной группе данных мутаций не выявлено. Наличие мутации *IDH1* имело благоприятное влияние на 1-годовалую безрецидивную выживаемость и общую годовую выживаемость [16]. A. M. Buccoliero и соавт., исследовав серию из 42 глиом различных гистологических типов и степеней злокачественности у детей, не обнаружили мутаций *IDH1* [17]. В исследовании M. Antonelli и соавт. в когорте из 27 ВЗГ мутаций гена *IDH1* также не выявлено [18]. Вероятно, полученные данные связаны с малым возрастом детей в исследуемых группах (медиана возраста 6 и 9 лет соответственно).

В исследуемой нами когорте пациентов замена с.394C>T, р.(R132C) в гене *IDH1* обнаружена только у 1 пациента 17 лет с гистологически верифицированной АА лобной доли. Полученный результат подтверждает низкую частоту встречаемости мутаций *IDH1* в глиомах у детей, а также данные о старшем подростковом возрасте пациентов с ВЗГ, имеющих мутацию *IDH1* [16–18].

A.S. Guerreiro Stucklin и соавт. представили данные о парадоксальном клиническом поведении глиом у младенцев до 1 года в сравнении с детьми старшего возраста: наибольшая выживаемость была отмечена в группе пациентов с ВЗГ, в то время как пациенты с глиомами низкой степени злокачественности имели более высокий уровень смертности. Причины таких отличий в течении заболевания свидетельствуют об уникальной биологии глиом у младенцев. В 83 % полушарных ВЗГ были обнаружены транслокации *ALK*, *ROS1*, *NTRK1/2/3*, *MET*. В 2 из 7 *NTRK*-положительных ВЗГ наблюдалось посттерапевтическое созревание опухоли в более дифференцированный вариант [19].

Среди больных, включенных в исследуемую нами группу, была пациентка с полушарной ВЗГ в возрасте 4 мес на момент постановки диагноза. Ткань опухоли имела гистологическое строение ВЗГ и в большей степени соответствовала ГБ. Ввиду отсутствия специфической гистологической картины дифференциальная диагностика проводилась с АПКА и анапластическим вариантом пилоцитарной астроцитомы. После проведения 4 блоков химиотерапии в составе комбинации винкристина с циклофосфаном (блоки 1, 3) и этопозида с карбоплатином (блоки 2, 4) была выполнена повторная резекция опухоли. При гистологическом исследовании материала от повторной операции и его сопоставлении с инициальным материалом было подтверждено идентичное морфологическое строение опухоли (рис. 4).

При проведении молекулярно-генетического исследования был выявлен химерный транскрипт *ETV6* (экзон 5) – *NTRK3* (экзон 15). Данный вариант транскрипта обнаруживают у подавляющего большинства пациентов с инфантильной фибросаркомой и мезобластной нефромой клеточного типа, у пациентов с ВЗГ он встречается значительно реже. Стоит отметить, что в зависимости от локализации точки разрыва могут возникать различные типы химерного гена *ETV6-NTRK3*. Вариант химерного транскрипта *ETV6* (экзон 4) – *NTRK3* (экзон 14) у детей с ВЗГ встречается заметно чаще [3, 4, 19].

С учетом того, что опухоли в детском возрасте отличаются малым совокупным количеством мутаций, в том числе являющихся мишенями для таргетной терапии, обнаружение подгруппы ВЗГ с перестройками генов, кодирующих протеинкиназы, открывает перспективы для использования соответствующих ингибиторов. Управление по санитарному надзору за качеством

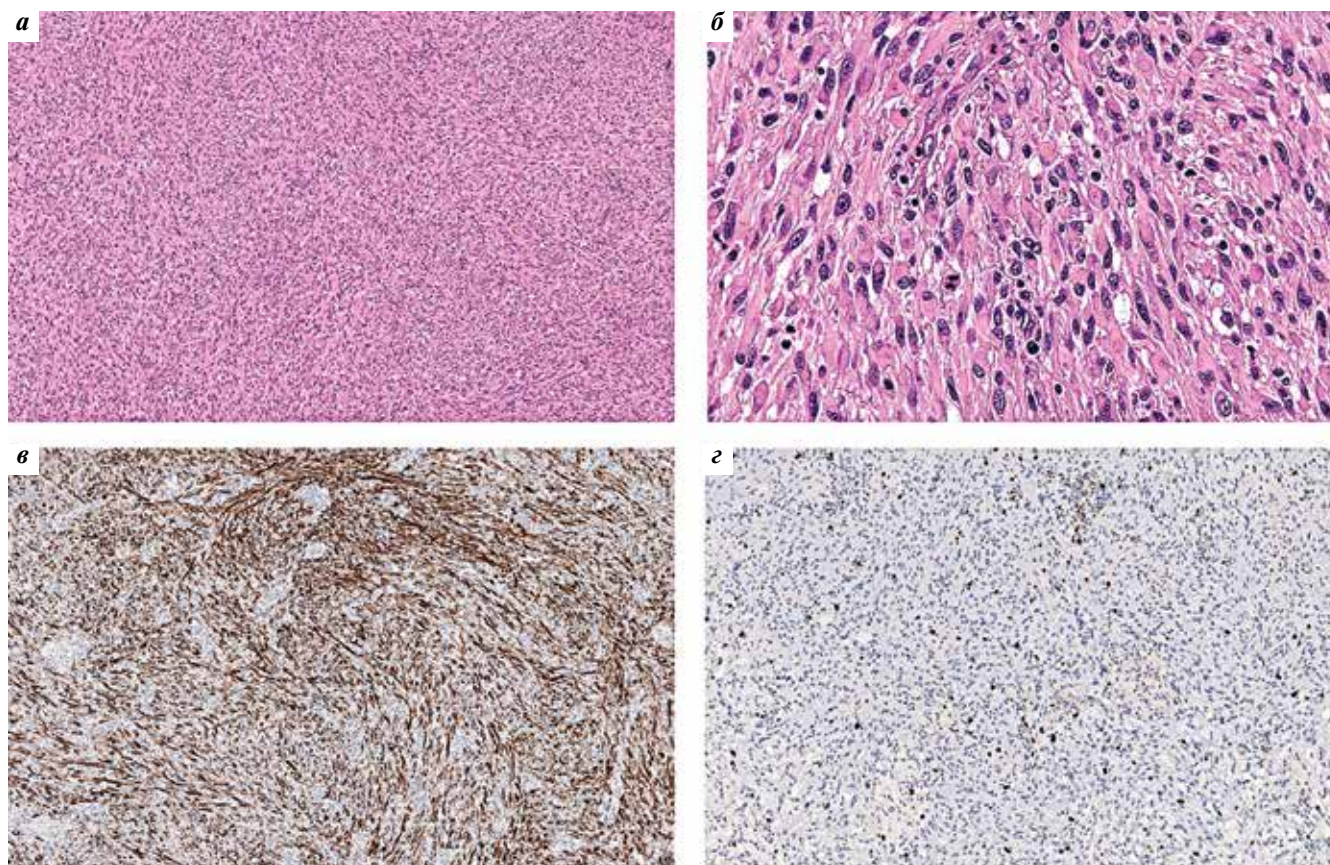


Рис. 4. Гистологическая картина инфантильной глиобластомы с наличием химерного гена *ETV6-NTRK3*: а – ткань опухоли с компактным расположением клеточных элементов. Клетки опухоли с умеренно выраженным клеточным полиморфизмом, местами формируют потоковые структуры (окраска гематоксилином и эозином, $\times 100$); б – клетки опухоли с умеренно выраженным ядерным полиморфизмом. Определяются фигуры митоза и пролиферация эндотелия сосудов (окраска гематоксилином и эозином, $\times 400$); в – клетки опухоли экспрессируют GFAP (GFAP, $\times 100$); з – пролиферативная активность по уровню экспрессии Ki-67 – 10 % (Ki-67, $\times 200$)

Fig. 4. Histopathologic analysis of infant glioblastoma harboring *ETV6-NTRK3* fusion gene: а – tumor tissue with compact arrangement of cellular elements. Slightly polymorphic cells form stream-like structures (H&E, $\times 100$); б – tumor cells demonstrate moderate nuclear pleomorphism. Mitotic figures and vascular endothelial proliferation are present (H&E, $\times 400$); в – immunohistochemical stains showing tumor cell immunoreactivity for glial fibrillary acidic protein (GFAP, $\times 100$); з – approximate cell proliferative index 10 % (Ki-67, $\times 200$)

пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) одобрило применение энтректиниба (entrectinib) – селективного ингибитора рецепторных тирозинкиназ Trk A/B/C, ROS1, ALK – для лечения взрослых и детей с неоперабельными или метастатическими солидными опухолями с перестройкой генов *NTRK1/2/3*, *ROS1* и *ALK* вне зависимости от гистологического диагноза и локализации опухоли. Эффективность применения энтректиниба у детей была продемонстрирована в I/II фазе исследования STARTRK-NG (NCT02650401). Одним из преимуществ данного таргетного препарата является его способность проникать через гематоэнцефалический барьер, благодаря чему были показаны исключительно высокие результаты противоопухолевой активности у пациентов с ВЗГ ($n = 8$) с транслокацией генов *NTRK1/2/3* и *ROS1*: 4 полных ответа (*ETV6-NTRK3*, *EML1-NTRK2*, *GOPC-ROS1*, *TPR-NTRK1*) и 2 частичных ответа (*KANK1-NTRK2*, *EEFIG-ROS1*). У 2 пациентов наблюдался продолженный рост опухоли (*EML4-ALK* и *PARP6-NTRK3*) [20]. Обнаружение экспрессии химерного гена *ETV6-NTRK3* в ткани

опухоли описываемой больной позволяет рассматривать ингибиторы NTRK как потенциально эффективную терапевтическую опцию.

Заключение

Представленные данные подчеркивают важность углубленного изучения молекулярной биологии ВЗГ. Идентификация патогенетически значимых молекулярных маркеров имеет важное практическое значение для определения тактики ведения пациентов и поиска новых терапевтических возможностей, в том числе молекулярно-направленной (таргетной) терапии, в случаях опухолей, устойчивых к стандартным схемам лечения.

На основании полученных нами данных можно выработать диагностический алгоритм поиска генетических aberrаций в ВЗГ у детей. На первом этапе целесообразно проводить поиск драйверных мутаций в «горячих точках» *H3F3A*: K28M – для опухолей срединной локализации и G35R/V – полушарной локализации. Далее, при отрицательном результате, необходим поиск более редких генетических aberrаций.

Для пациентов с «диким» типом гена *H3F3A* и срединной локализацией опухоли рекомендовано исследование ткани опухоли на наличие мутации K28M в гене *Hist1H3B*, в случае полушарной локализации — *BRAF*

V600E. Пациентам с ВЗГ старше 14 лет целесообразно проводить поиск мутаций в генах *IDH1/2*, детям младше 1 года — химерных онкогенов с вовлечением *NTRK1/2/3*, *MET*, *ROS1* и *ALK*.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Louis D.N., Perry A., Reifenberger G. et al. The 2016 World Health Organization classification of tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol* 2016;131:803–20. DOI: 10.2176/nmc.ra.2017-0010.
- Johnson A., Severson E., Gay L. et al. Comprehensive genomic profiling of 282 pediatric low- and high-grade gliomas reveals genomic drivers, tumor mutational burden, and hypermutation signatures. *Oncologist* 2017;22(12):1478–90. DOI: 10.1634/theoncologist.2017-0242.
- Зайцева М.А., Ясько Л.А., Папуша Л.И., Друй А.Е. Молекулярно-генетические характеристики глиом у детей. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2019;18(4):109–17. [Zaytseva M.A., Yasko L.A., Papusha L.I., Druy A.E. Molecular genetic features of pediatric gliomas. *Voprosy gematologii/onkologii i immunopatologii v pediatrii* = *Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology* 2019;18(4):109–17. (In Russ.)]. DOI: 10.24287/1726-1708-2019-18-4-109-117.
- Gambella A., Senetta R., Collemi G. et al. NTRK fusions in central nervous system tumors: a rare, but worthy target. *Int J Mol Sci* 2020;21(3):753. DOI: 10.3390/ijms21030753.
- Toll S.A., Tran H.N., Cotter J. et al. Sustained response of three pediatric BRAFV600E mutated high-grade gliomas to combined *BRAF* and *MEK* inhibitor therapy. *Oncotarget* 2019;10(4):551–7. DOI: 10.18632/oncotarget.26560.
- Catalogue of somatic mutations in cancer. Available at: <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>.
- Leske H., Rushing E., Budka H. et al. K27/G34 versus K28/G35 in histone H3-mutant gliomas: a note of caution. *Acta Neuropathologica* 2018;136(1):175–6. DOI: 10.1007/s00401-018-1867-2.
- Grigore F.N., Day C., Yang H. et al. Histone H3.3 mutations drive tumorigenesis through chromosomal instability. *Neurooncology* 2019;21(Suppl_2):ii84. DOI: 10.1093/neuonc/noz036.086.
- Maeda S., Ohka F., Okuno Y. et al. H3F3A mutant allele specific imbalance in an aggressive subtype of diffuse midline glioma, H3 K27M-mutant. *Acta Neuropathol Commun* 2020;8(1):8. DOI:10.1186/s40478-020-0882-4.
- Solomon D.A., Wood M.D., Tihan T. et al. Diffuse midline gliomas with histone H3 K27M mutation: a series of 47 cases assessing the spectrum of morphologic variation and associated genetic alterations. *Brain Pathol* 2016;26(5):569–80. DOI: 10.1111/bpa.12336.
- Phillips J.J., Gong H., Chen K. et al. The genetic landscape of anaplastic pleomorphic xanthoastrocytoma. *Brain Pathol* 2019;29(1):85–96. DOI: 10.1111/bpa.12639.
- Vaubel R.A., Caron A.A., Yamada S. et al. Recurrent copy number alterations in low-grade and anaplastic pleomorphic xanthoastrocytoma with and without *BRAF* V600E mutation. *Brain Pathol* 2018;28(2):172–82. DOI: 10.1111/bpa.12495.
- Touat M., Younan N., Euskirchen P. et al. Successful targeting of an *ATG7-RAF1* gene fusion in anaplastic pleomorphic xanthoastrocytoma with leptomeningeal dissemination. *JCO Precis Oncol* 2019;3:1–7. DOI: 10.1200/PO.18.00298.
- Frazão L., do Carmo Martins M., Nunes V.M. et al. *BRAF* V600E mutation and 9p21: CDKN2A/B and MTAP co-deletions — markers in the clinical stratification of pediatric gliomas. *BMC Cancer* 2018;18(1):1259. DOI: 10.1186/s12885-018-5120-0.
- Rajbhandari R., McFarland B.C., Patel A. et al. Loss of tumor suppressive microRNA-31 enhances TRADD/NF-κB signaling in glioblastoma. *Oncotarget* 2015;6(19):17805–16. DOI: 10.18632/oncotarget.4596.
- Pollack I.F., Hamilton R.L., Sobol R.W. et al. IDH1 mutations are common in malignant gliomas arising in adolescents: a report from the Children's Oncology Group. *Child's Nervous System* 2011;27(1):87–94. DOI: 10.1007/s00381-010-1264-1.
- Buccoliero A.M., Castiglione F., Degl'Innocenti D.R. et al. *IDH1* mutation in pediatric gliomas: has it a diagnostic and prognostic value? *Fetal Pediatr Pathol* 2012;31:278–82. DOI: 10.3109/15513815.2012.659383.
- Antonelli M., Buttarelli F.R., Arcella A. et al. Prognostic significance of histological grading, p53 status, YKL-40 expression, and IDH1 mutations in pediatric high-grade gliomas. *J Neurooncol* 2010;99:209–15. DOI: 10.1007/s11060-010-0129-5.
- Guerreiro Stucklin A.S., Ryall S., Fukuoka K. et al. Alterations in *ALK/ROS1/NTRK/MET* drive a group of infantile hemispheric gliomas. *Nat Commun* 2019;10(1):4343. DOI: 10.1038/s41467-019-12187-5.
- Desai A.V., Robinson G.W., Basu E.M. et al. Updated entrectinib data in children and adolescents with recurrent or refractory solid tumors, including primary CNS tumors. *J Clin Oncol* 2020;38(15_suppl):107. DOI: 10.1200/JCO.2020.38.15_suppl.107.

Вклад авторов

М.А. Зайцева: разработка дизайна исследования, проведение генетических исследований и анализ полученных данных, обзор публикаций по теме статьи, написание текста рукописи;

А.П. Шехтман: проведение гистологических исследований, редактирование текста рукописи;

Л.И. Папуша, Э.Ф. Валиахметова: обзор публикаций по теме статьи, сбор клинических данных;

Л.А. Ясько, А.Е. Друй: разработка дизайна исследования, обзор публикаций по теме статьи, научное редактирование текста рукописи.

Authors' contributions

M.A. Zaytseva: developing the research design, genetic testing and analysis of the obtained data, analysis of the literature, writing of the manuscript;

A.P. Shekhtman: histopathologic analysis, editing of the manuscript;

L.I. Papusha, E.F. Valiakhmetova: analysis of the literature, clinical data collection;

L.A. Yasko, A.E. Druy: developing the research design, analysis of the literature, scientific editing of the manuscript.

ORCID авторов / ORCID of authors

М.А. Зайцева / M.A. Zaytseva: <https://orcid.org/0000-0003-2015-5790>

А.П. Шехтман / A.P. Shekhtman: <https://orcid.org/0000-0001-5461-7442>

Л.И. Папуша / L.I. Papusha: <https://orcid.org/0000-0001-7750-5216>

Э.Ф. Валиахметова / E.F. Valiakhmetova: <https://orcid.org/0000-0002-2977-665X>

Л.А. Ясько / L.A. Yasko: <https://orcid.org/0000-0003-3007-3772>

А.Е. Друй / A.E. Druy: <https://orcid.org/0000-0003-1308-8622>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование было поддержано благотворительным фондом «Наука-детям».

Financing. The study was supported by charity foundation "Science for children"

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики

Протокол исследования одобрен комитетом по биомедицинской этике ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России.

Все пациенты или законные представители пациентов подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Compliance with patient rights and principles of bioethics

The study protocol was approved by the biomedical ethics committee of Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Ministry of Health of Russia.

All patients or legal representatives of patients gave written informed consent to participate in the study.