

Молекулярно-генетическая дифференциальная диагностика опухолей головного мозга*

Алексеева Е.А.^{1,2}, Горбачева Ю.В.², Бабенко О.В.^{1,2},
Землякова В.В.^{1,2}, Кузнецова Е.Б.^{1,2}, Смолин А.В.³,
Прозоренко Е.В.⁴, Залетаев Д.В.^{1,2}, Стрельников В.В.^{1,2}

¹ — Федеральное государственное бюджетное учреждение «Медико-генетический научный центр» РАМН, Москва, 115478, ул. Москворечье, д.1, факс (495) 324-07-02, e-mail: vstrel@list.ru

² — ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздравсоцразвития России, Москва, 119992, ул. Трубецкая, д.8, факс (495) 622-96-35, e-mail: zalnem@mail.ru

³ — ФГУ Главный военный клинический госпиталь им. академика Н.Н. Бурденко Министерства обороны Российской Федерации, Москва, 105229, Госпитальная пл., д.3, факс: (495) 622-96-35, e-mail: sirano68@list.ru

⁴ — Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва, 115478, Каширское ш., д.24, факс (495) 622-96-35, e-mail: prozorenko1984@mail.ru

Обзор посвящён вопросам молекулярно-генетической диагностики глиом. Глиомы — первичные опухоли, которые происходят из клеток глиального роста и составляют 50–60% опухолей головного мозга. Приведены сведения по этиопатогенезу глиом на молекулярно-генетическом уровне. Рассмотрена диагностика аллельного состояния хромосомных районов 1p и 19q как метод выявления пациентов с анапластической олигодендроглиомой, а также прогнозирования ответа на химиотерапию и выживаемости этих пациентов. Описан способ определения статуса метилирования промоторной области гена *MGMT* в ткани опухоли для оценки прогноза эффективности лечения пациентов с глиомами темозоломидом.

Ключевые слова: опухоли головного мозга, олигодендроглиома, глиобластома

Введение

Опухоли головного мозга — исключительно гетерогенная по своим биологическим основам, гистологическим характеристикам и особенностям лечения группа новообразований. Среди взрослого населения наиболее часто встречаются глиомы и лимфомы головного мозга. Глиомы — первичные опухоли головного мозга, происходящие из клеток глиального роста; они составляют 50–60% опухолей головного мозга. Под термином *глиомы*, как правило, подразумевают опухоли, имеющие астроцитарное или олигодендроглиальное происхождение. К первым относятся астроцитомы, анапластическая астроцитомы, глиобластома; ко вторым — олигодендроглиомы и анапластическая олигодендроглиомы; к смешанным глиомам относятся олигоастроцитомы и анапластическая олигоастроцитомы [5, 6].

Глиомы различаются также по степени злокачественности (в классификации ВОЗ — grade I–IV). Астроцитомы, олигодендроглиомы и олигоастроцитомы — опухоли II степени злокачественности; анапластическая астроцитомы, анапластическая олигодендроглиомы и анапластическая олигоастроцитомы — III степени; глиобластома — IV степени [5].

До недавнего времени происхождение глиом связывали с трансформацией нормальных клеток глии.

Считалось, что это — единственный тип клеток взрослого мозга, способный к делению, хотя этот факт строго не доказан. В последнее время всё большая роль в качестве предшественников злокачественных клеток отводится относительно недавно обнаруженным мультипотентным предшественникам нейронов и глии — стволовым клеткам. Ранее считалось, что стволовые клетки присутствуют только в головном мозге эмбриона, однако появляется всё больше информации об их наличии и в постнатальный период жизни. Стволовые клетки более многочисленны и активны в детстве, когда ещё продолжается развитие головного мозга, но обнаруживаются и в зрелом возрасте. Они способны к пролиферации и широкой дифференцировке, а экспрессионный профиль генов в этих клетках аналогичен таковому, характерному для глиогенеза и нейрогенеза. Согласно современным представлениям, аномальная активация генетических программ развития приводит к трансформации стволовых клеток мозга с повышением их пролиферативной и миграционной активности [12].

Этиопатогенез астроцитомы и глиобластомы на молекулярно-генетическом уровне представляется каскадом событий, вовлекающих ряд онкогенов и генов-супрессоров опухолевого роста, и развивающихся в течение

* Работа проводилась при поддержке Федерального агентства по науке и инновациям в рамках ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» (ГК №02.740.11.0089).

ние нескольких лет. Центральным генетическим событием злокачественной трансформации считается мутация гена *p53* (хромосома 17p). Трансформация астроцитом низкой степени злокачественности в анапластические астроцитомы и глиобластомы сопровождается делециями участка 10-й хромосомы, содержащего ген *PTEN*, и ряда других хромосомных локусов. Что же касается первичных глиобластом, для них характерна гиперэкспрессия рецептора эпителиального фактора роста *EGFR*, что обеспечивает возможность таргетной терапии [5, 9, 13, 15]. Чувствительность к химиопрепарату темозоломид, часто используемому при лечении глиобластом, в значительной степени определяется уровнем экспрессии O⁶-метилгуанин-ДНК-метилтрансферазы, кодируемой геном *MGMT*: снижение экспрессии этого гена в опухоли ассоциировано с повышенной чувствительностью к темозоломиду [8].

Для олигодендроглиом знаковым геномным событием является сочетанная делеция хромосомных участков 1p и 19q (рис. 1) [11].

Диагностика аллельного состояния хромосомных районов 1p и 19q

у пациентов с олигодендроглиальными опухолями

За последнее время доля олигодендроглиом в составе всех глиальных опухолей постепенно возросла от традиционных 5% до 25—30% (соответственно, снижается доля астроцитом). Такая динамика говорит о том, что некоторые опухоли, которые ранее классифицировались как астроцитомы, сейчас рассматриваются как олигодендроглиомы или смешанные олигоастроцитомы. Современная морфологическая классификация глиом не всегда однозначна. Кроме того, опухоли, обладая общими морфологическими чертами, могут различаться на генетическом уровне и иметь различное течение, несмотря на сходство традиционных диагностических критериев. Растёт понимание того, что проведение молекулярно-генетического анализа вскоре станет так же важно, как и определение морфологических критериев, что улучшит классификацию глиом [5]. В связи с этим важным достижением стала генетическая классифика-

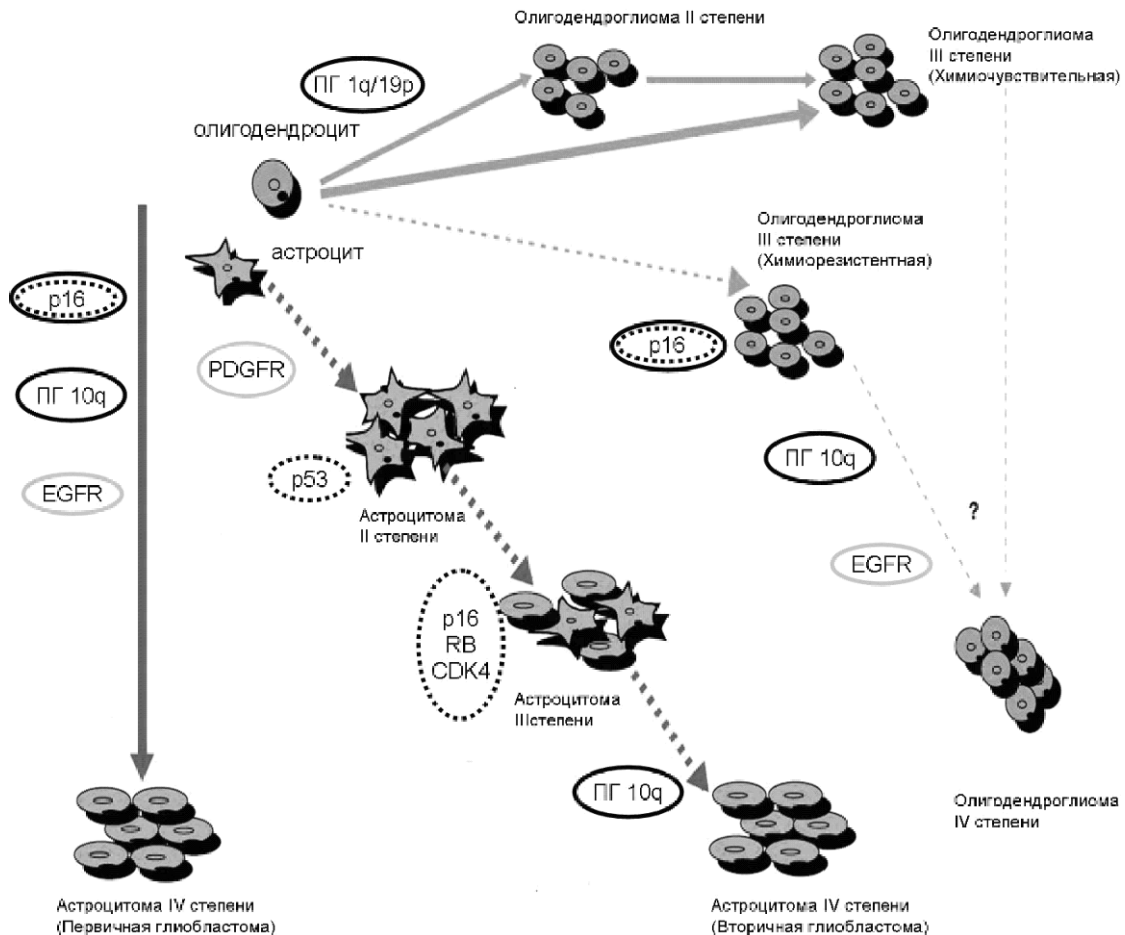


Рис. 1. Пути генетической прогрессии глиом [4]:

ПГ — потеря гетерозиготности. Названия генов, в которых наиболее часто обнаруживаются мутации в соответствующих опухолях, обведены пунктирной линией. Названия рецепторов, обнаруживающих повышенную экспрессию в опухолях, обведены серым. Названия локусов, подвергающихся делециям, обведены чёрным

ция анапластических олигодендроглиом, которые могут быть поделены на несколько подгрупп, различающихся частотой возникновения, длительностью ответа на химиотерапию, продолжительностью жизни больных, при этом имея общую морфологию. В самой благополучной группе (50%) с утратой аллелей 1p и 19q ответ на химиотерапию прокарбазином, ломустинном и винкристином приближается к 100%, а продолжительность жизни от постановки диагноза может превышать 10 лет. Такие положительные результаты ставят вопрос об отсроченном проведении лучевой терапии, что позволило бы избежать или задержать появление побочных эффектов. В группе с наихудшим прогнозом (25%) генетический профиль схож с первичной глиобластомой (амплификация *EGFR*, делеции 10q и 9p21 (*p16*), мутации в гене *PTEN* без утраты хромосомы 1p или с мутацией гена *TP53*) (рис. 1), хотя опухоли соответствуют гистологическим критериям анапластических олигодендроглиом. Такой генетический статус ассоциируется с плохим прогнозом, ответом на химиотерапию менее чем в 20% случаев и средней продолжительностью жизни 16 мес. [10]. Эта группа, возможно, принадлежит к той же категории, что и глиобластомы с олигодендроглиальным компонентом, и требует немедленного проведения лучевой терапии. Таким образом, олигодендроглиомы — это неоднородная группа опухолей и их диагностика и лечение должны проводиться с учётом генетического профиля.

Конкордантная делеция хромосомных участков 1p и 19q представляет собой наиболее изученное изменение генома, характерное для олигодендроглиом [4, 5]. Эта характеристика служит хорошим прогностическим признаком с точки зрения выживаемости пациентов независимо от стадии заболевания. Панель маркёров для диагностики делеций 1p/19q методом анализа аллельного состояния (потери гетерозиготности, ПГ) микросателлитных маркёров включает в себя полиморфные локусы D1S1635, D1S3669, D1S407, D1S562, D1S400, и D1S559 [2]. Все маркёры представляют собой тетра-нук-

леотидные повторы, что обеспечивает высокое разрешение и отсутствие артефактов анализа, часто сопровождающих использование динуклеотидных полиморфизмов.

На рис. 2 представлены результаты исследования образцов ДНК из опухолевой ткани и лимфоцитов периферической крови пациента с олигодендроглиомой. Анализ ДНК из периферической крови во всех случаях демонстрирует наличие двух фрагментов, что свидетельствует о гетерозиготном состоянии маркёров (присутствуют 2 аллеля). В опухолевом образце наблюдается снижение интенсивности, вплоть до практически полного отсутствия, сигнала одного из аллелей каждого маркёра, что свидетельствует о делеции 1p/19q.

По результатам исследования формулируют заключение, в котором указываются названия исследованных микросателлитных маркёров и их аллельное состояние и делается вывод о наличии или отсутствии сочетанной делеции локусов 1p/19q в исследованном образце опухолевой ткани. Выявление сочетанной делеции локусов 1p36 и 19q13 подтверждает диагноз *анапластическая олигодендроглиома*, говорит о целесообразности химиотерапии прокарбазином, ломустинном и винкристином и даёт оптимистичный прогноз выживаемости от постановки диагноза [10]. Использование системы прогностических маркёров ПГ как дополнительного метода к гистологическому исследованию способствует эффективной диагностике и прогнозу опухолей головного мозга. Решение об отсроченном применении лучевой терапии, принимаемое на основании выявления сочетанных делеций 1p/19q с учётом комплекса результатов клинико-морфологических исследований и ответа на химиотерапию, позволит избежать или задержать появление побочных эффектов у конкретных пациентов.

Диагностика генетического статуса **O⁶-метилгуанин-ДНК-метилтрансферазы (MGMT)** у пациентов со злокачественными опухолями головного мозга для оптимизации терапии темозоломидом

Темозоломид — алкилирующий препарат второго поколения, имеющий несколько отличительных особенностей, чрезвычайно важных для пациентов с опухолями мозга:

- 1) он хорошо проникает через гематоэнцефалический барьер, создавая высокую концентрацию препарата непосредственно в тканях головного мозга;
- 2) угнетает фермент MGMT, тем самым преодолевает как первичную, так и вторичную лекарственную резистентность;
- 3) малотоксичен по сравнению с другими химиотерапевтическими препаратами (не обладает кумулятивной токсичностью, характерной для препаратов нитрозомочевины);
- 4) имеет пероральную форму, позволяя проводить лечение в амбулаторном режиме и даже в домашних условиях. Химиотерапия темозоломидом не требует госпитализации и работы среднего медперсонала, что экономически выгодно [7].

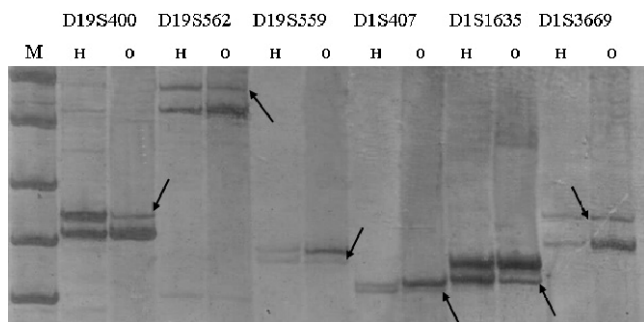


Рис. 2. Анализ аллельного состояния микросателлитных маркёров, расположенных на хромосомах 1p и 19q: н — ДНК нормальной ткани (из лимфоцитов периферической крови); о — ДНК опухоли; М — маркёр молекулярной массы PUC19/MspI. Стрелками указаны ПЦР-продукты, сниженная концентрация которых свидетельствует о потере гетерозиготности. Объяснения в тексте

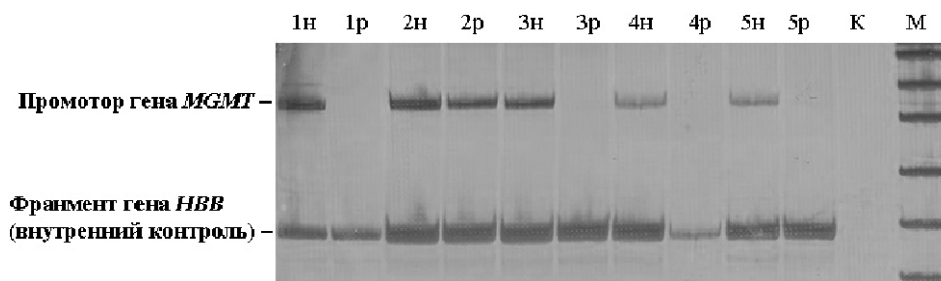


Рис. 3. Определение состояния метилирования *MGMT* в опухолевом материале:

p — ДНК после гидролиза HpaII; n — ДНК, негидролизованная HpaII; M — маркер молекулярной массы PUC19/MspI; K — отрицательный контроль. Показано метилирование промотора *MGMT* в образце №2 и отсутствие метилирования в остальных образцах

Эффективность лечения алкилирующими агентами в значительной степени определяется активностью *MGMT* в клетках злокачественных новообразований: высокая активность *MGMT* формирует резистентный фенотип опухоли. Ген *MGMT*, расположенный на хромосоме 10q26.3, кодирует белок репарации ДНК, удаляющий алкильные (метильные) группы из позиции O⁶ гуанина [3]. Метилирование гуанина в позиции O⁶ вызывает мутации типа транзиций, формирование одно- и двунитевых разрывов ДНК и, в конечном счёте, выход клетки в апоптоз [8]. Репарационная активность каждой молекулы белка *MGMT* приводит к её полной инактивации; после акта переноса метильной группы инактивированная молекула *MGMT* подлежит утилизации в клетке [14].

Одним из важнейших и наиболее ранних механизмов инактивации генов-супрессоров опухолевого роста, к которым относится и ген *MGMT*, является метилирование их промоторных областей. Метилирование промотора *MGMT* приводит к инактивации этого гена и повышению чувствительности опухоли к алкилирующим препаратам. Метилирование гена *MGMT* определяют методом метилчувствительной ПЦР (МЧ-ПЦР). Матрицей для МЧ-ПЦР служат продукты гидролиза исследуемого биологического материала метилчувствительной рестриктазой HpaII. В качестве внутреннего контроля МЧ-ПЦР амплифицируют участок гена бета-глобина (*HBB*), который не содержит сайтов узнавания HpaII [1].

В случае, если в опухолевой ДНК имеет место аномальное метилирование промотора гена *MGMT*, остатки цитозина в составе CpG-динуклеотидов заменены на 5-метилцитозин, в том числе в сайтах узнавания HpaII. В этом случае рестриктаза HpaII не в состоянии гидролизировать геномную ДНК в сайтах узнавания и матрица для МЧ-ПЦР остаётся интактной. В результате в окрашенном геле видны фрагменты, соответствующие промоторному району *MGMT* (рис. 3). В тех образцах, где метилирование генов отсутствует, происходит гидролиз геномной ДНК в сайтах узнавания HpaII, матрица для ПЦР разрушается и ПЦР-продукт, соответствующий промотору гена, не нарабатывается. Внутренний контроль МЧ-ПЦР, не содержащий сайтов узнавания HpaII, должен присутствовать во всех анализируемых образцах.

Отрицательный контроль не должен содержать ПЦР-продукты; в положительном контроле должны присутствовать ПЦР-продукты внутреннего контроля и промотора исследуемого гена.

Заключение

Растёт роль молекулярно-генетических методов в диагностике опухолей головного мозга. Значимость молекулярно-генетического анализа заключается в возможности использования его данных для ряда практических приложений. Так, исследование локусов 1p36 и 19q13 позволяет верифицировать гистологический диагноз, определить прогноз выживаемости, а также оптимизировать тактику и эффективность лечения пациентов с олигодендроглиальными опухолями. Определение статуса метилирования промотора гена *MGMT* даёт возможность определить чувствительные к темозоломиду опухоли головного мозга и, соответственно, оптимизировать тактику и эффективность лечения больных с такими опухолями. Поэтому разработка и внедрение новых маркеров и методов их диагностики при глиомах представляет огромный интерес.

Список литературы

1. Землякова В.В., Стрельников В.В., Пальцева Е.М., Кузнецова Е.Б., Смолин А.В., Залетаев Д.В. Молекулярно-генетическая методика определения генетического статуса O⁶-метилгуанин-ДНК-метилтрансферазы у пациентов со злокачественными опухолями головного мозга для оптимизации терапии темозоломидом // Медицинская ДНК-технология. Разрешение ФС №2009/316 от 4.09.2009 г.
2. Стрельников В.В., Пальцева Е.М., Кузнецова Е.Б., Смолин А.В., Залетаев Д.В. Молекулярно-генетическая методика определения потери гетерозиготности хромосомных районов 1p и 19q у пациентов с анапластической олигодендроглиомой // Медицинская ДНК-технология. Разрешение ФС №2009/332 от 5.10.2009 г.
3. Стрельников В.В., Малышева А.С., Землякова В.В., Кузнецова Е.Б., Алексеева Е.А., Смолин А.В., Прозоренко Е.В., Залетаев Д.В. Делеции области расположения гена *MGMT* на хромосоме 10q26.3 в глиомах // Молекул. медицина. — 2011. — №2. — С. 28—31.
4. Aldape K., Burger P.C., Perry A. Clinicopathologic Aspects of 1p/19q Loss and the Diagnosis of Oligodendroglioma // Arch. Pathol. Lab. Med. — 2007. — Vol. 131. — P. 242—251.

5. Behin A., Hoang-Xuan K., Carpentier A.F., Delattre J.Y. Primary brain tumours in adults // *The Lancet*. — 2003. — Vol. 361. — P. 323–331.
6. DeAngelis L.M. Brain Tumors // *The N. Engl. J. Med.* — 2001. — Vol. 344. — P. 114–123.
7. DeAngelis L.M., Loeffler J.S., Mamelak A.N. Primary and metastatic brain tumors // *Cancer Management: A Multidisciplinary Approach*, 11th Edition. — 2008. — Chapter 26.
8. Hegi M.E., Diserens A., Gorlia T. et al. MGMT Gene Silencing and Benefit from Temozolomide in Glioblastoma // *The N. Engl. J. Med.* — 2005. — Vol. 352. — P. 997–1003.
9. Ichimura K., Schmidt E.E., Goike H.M., Collins V.P. Human glioblastomas with no alterations of the CDKN2A (p16INK4A, MTS1) and CDK4 genes have frequent of the retinoblastoma gene // *Oncogene*. — 1996. — Vol. 13. — P. 1065–1072.
10. Ino Y., Betensky R.A., Zlatescu M.C. et al. Molecular subtypes of anaplastic oligodendroglioma: implications for patient management at diagnosis // *Clin. Cancer Res.* — 2001. — Vol. 7. — P. 839–845.
11. Reifenberger J., Reifenberger G., Liu L., James C.D., Wechsler W., Collins V.P. Molecular genetic analysis of oligodendroglial tumors shows preferential allelic deletions on 19q and 1p // *Am. J. Pathol.* — 1994. — Vol. 145. — P. 1175–1190.
12. Sanai N., Alvarez-Buylla A., Berger M.S. Neural Stem Cells and the Origin of Gliomas // *The N. Engl. J. Med.* — 2005. — Vol. 353. — P. 811–822.
13. Sarkar C., Jain A., Sury V. Current concepts in the pathology and genetics in gliomas // *Indian Journal of Cancer*. — 2009. — Vol. 46. — P. 108–119.
14. Srivenugopal K.S., Yuan X.H., Friedman H.S., Ali-Osman F. Ubiquitination-dependent proteolysis of O6-methylguanine-DNA methyltransferase in human and murine tumor cells following inactivation with O6-benzylguanine or 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea // *Biochemistry*. — 1996. — Vol. 35. — P. 1328–1334.
15. Zhou X.P., Li Y.J., Hoang-Xuan K. et al. Mutation analysis of the PTEN gene in gliomas: molecular and pathological correlations // *Int. J. Cancer*. — 1999. — Vol. 84. — P. 150–154.

Molecular differential diagnostics of brain tumors

Alekseeva E.A.^{1,2}, Gorbacheva Y.V.², Babenko O.V.^{1,2}, Zemlyakova V.V.^{1,2}, Kuznetsova E.B.^{1,2}, Smolin A.V.³, Prozorenko E.V.⁴, Zaletayev D.V.^{1,2}, Strelnikov V.V.^{1,2}

¹ — Research Centre for Medical Genetics, Russian Academy of Medical Sciences, Russian Federation, Moscow, 115478, Moskvorechye street, 1, fax: (495) 324-07-02, e-mail: vstrel@list.ru

² — I.V. Sechenov First Moscow State Medical University, State Education Institution of Higher Professional Training of the Ministry of Health Care and Social development, Russian Federation, Moscow, 119992, Trubetskaya street, 8, fax: (495) 622-96-35, e-mail: zalmen@mail.ru

³ — Academician N.N. Burdenko Main Military Clinical Hospital, The Ministry of Defence of the Russian Federation, Russian Federation, Moscow, 105229, Gospitalnaya square, 3, fax: (495) 622-96-35, e-mail: sirano68@list.ru

⁴ — N.N. Blockin Russian Research Center for Oncology, Russian Academy of Medical Sciences, Russian Federation, Moscow, 115478, Kashirskoe highway, 24, fax: (495) 622-96-35, e-mail: prozorenko1984@mail.ru

This review addresses the questions of molecular diagnostics of gliomas. Gliomas are primary brain tumors that arise from glial cells and comprise 50–60% of all brain tumors. An overview of etiopathogenesis of gliomas at a molecular and genetic levels is provided. The diagnostics is considered for allelic status of chromosome regions 1p and 19q as a method for identifying patients with anaplastic oligodendrogliomas, as well as predicting response to chemotherapy and survival in these patients. Determinations of the methylation status of the *MGMT* gene promoter region in the tumor tissue are discussed in relation to the prognosis of temozolomide treatment effectiveness.

Key words: brain tumors, oligodendroglioma, glioblastoma