

DOI: 10.24287/1726-1708-2021-20-4-69-77

Прогностическое значение суррогатного молекулярного профиля диффузных астроцитом у детей

Т.М. Михалевская¹, Д.Р. Капуза¹, Н.Е. Конопля², О.И. Быданов¹, О.В. Алейникова¹¹ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии», Республика Беларусь, Минский район, д. Боровляны²ГУ «Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова», Республика Беларусь, Минский район, аг. Лесной

Диффузные астроцитомы являются основной причиной смертности в детской нейроонкологии. Педиатрические диффузные астроцитомы клинически и биологически неоднородны, они состоят из отдельных подтипов, обусловленных различными молекулярными нарушениями. Нашей целью было выяснить, могут ли суррогатные молекулярные подписи, отражающие молекулярные изменения в диффузных астроцитомах, иметь прогностическую ценность. Для определения суррогатной молекулярной подписи мы использовали иммуногистохимическое исследование с антителами к IDH1R132H, p53, BRAFV600E, H3K27 trimethylated, ATRX и цитогенетическое исследование с выявлением делеции *CDKN2A* и транслокации *FGFR2*. В результате мы получили 6 групп диффузных астроцитом с различными суррогатными молекулярными подписями, которые обозначили как H3K27mut, ALT, IDH1mut, BRAFmut-PXA, BRAFmut/FGFR2 и MYB. Всего были проанализированы 62 пациента (29 мальчиков и 33 девочки, возраст больных от 0 до 17 лет, средний возраст – 10,6 года). Данное исследование одобрено независимым этическим комитетом и утверждено решением ученого совета ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии» (Республика Беларусь). Выживаемость в группах диффузных астроцитом с разными суррогатными молекулярными подписями значительно отличалась: группы BRAFmut/FGFR2 и MYB имели благоприятный прогноз с общей выживаемостью 100% и безрецидивной выживаемостью 89 ± 11% и 100% соответственно. Группы H3K27mut, ALT, IDH1mut и BRAFmut-PXA характеризовались неблагоприятным течением с бессобытийной выживаемостью 0%, 20 ± 17%, 44 ± 17% и 18 ± 12% соответственно и общей выживаемостью 23 ± 19%, 37 ± 20%, 40 ± 17% и 53 ± 19% соответственно. Определение подтипов педиатрических диффузных астроцитом на основе суррогатной молекулярной подписи тесно коррелирует с биологическими параметрами и клиническими исходами и, следовательно, может быть предиктором ответа на стандартные протоколы лечения.

Ключевые слова: головной мозг, нейроонкология, дети, диффузные глиомы, прогноз

Михалевская Т.М. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. 2021; 20 (4): 69–77. DOI: 10.24287/1726-1708-2021-20-4-69-77

Long-term outcome and surrogate molecular signatures of pediatric patients with diffuse astrocytomas

Т.М. Mikhaleuskaya¹, D.R. Kapuza¹, N.E. Konoplya², O.I. Bydanov¹, O.V. Aleinikova¹¹Belarusian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology, Borovlyany, Minsk region, Republic of Belarus
²N.N. Alexandrov National Cancer Centre, Lesnoy, Minsk region, Republic of Belarus

Diffuse astrocytomas is the major cause of mortality in pediatric neurooncology. Pediatric diffuse astrocytomas are clinically and biologically heterogeneous, they consist of distinct subtypes driven by various molecular events. Our aim was to reveal if the surrogate molecular signatures reflecting molecular alterations underlying diffuse astrocytomas could be of prognostic value. The surrogate molecular signature was determined by IHC with antibodies to IDH1R132H, p53, BRAF V600E, H3K27trimethylated, ATRX and by cytogenetics with identification of deletion *CDKN2A* and *FGFR2* fusion. As a result, we obtained 6 groups of diffuse astrocytomas with different surrogate molecular signatures, which we designated as H3K27mut, ALT, IDH1mut, BRAFmut-PXA, BRAF mut/FGFR2, MYB. A total of 62 patients (29 male, 33 female, mean age 10.6 years, range 0–18 years) were analyzed. The study was approved by the Independent Ethics Committee and the Scientific Council of the Belarusian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology (Republic of Belarus). These surrogate molecular signatures were associated with significantly different outcomes, i.e. BRAFmut/FGFR2, MYB groups show a significantly good prognosis with 100% overall survival and relapse-free survival of 89 ± 11% and 100%. Groups H3K27mut, ALT, IDH1mut, BRAFmut-PXA display extremely poor outcomes with EFS equal to 0%, 20 ± 17%, 44 ± 17%, 18 ± 12% respectively, and OS equal to 23 ± 19%, 37 ± 20%, 40 ± 17%, 53 ± 19% respectively. The recognition of subtypes of pediatric diffuse astrocytomas based on surrogate molecular signature revealed close correlations with biological parameters and clinical outcomes and may therefore, be predictive of response to standard treatment protocols.

Key words: brain, neurooncology, children, diffuse gliomas, prognosis

Mikhaleuskaya T.M., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology. 2021; 20 (4): 69–77. DOI: 10.24287/1726-1708-2021-20-4-69-77

© 2021 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России
Поступила 26.04.2021
Принята к печати 15.05.2021

Контактная информация:

Михалевская Таисия Михайловна, заведующая лабораторией молекулярно-генетических исследований ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии», Республика Беларусь
Адрес: Республика Беларусь, 223053, Минский район, д. Боровляны, ул. Фрунзенская, 43
E-mail: aisiat@tut.by

© 2021 by «D. Rogachev NMRCPHO»

Received 26.04.2021

Accepted 15.05.2021

Correspondence:

Taisiya M. Mikhaleuskaya, Head of the Laboratory of molecular studies, Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology, Republic of Belarus
Address: 43 Frunzenskaya St., Borovlyany 223053, Minsk region, Republic of Belarus
E-mail: aisiat@tut.by

Педиатрические диффузные глиомы встречаются редко и составляют менее 8–12% всех опухолей головного мозга у детей. Однако в структуре онкологической смертности диффузные астроцитомы занимают 1-е место среди детских солидных опухолей с 2-летней общей выживаемостью (ОВ), не превышающей 10–30% [1, 2].

Патогенез и биологическое поведение диффузных глиом у детей и у взрослых существенно различаются. Принципиальным отличием педиатрических диффузных глиом является перестройка эпигеномной регуляции, приводящей к онкогенной стимуляции чувствительных к ней групп клеток-прогениторов, возникающих во время эмбриогенеза, что отражается в специфической клинической картине диффузных глиом у детей [3, 4]. Так, последние исследования показали, что вариант генных мутаций гистонов связан с местоположением опухоли и возрастом пациентов [4].

Опухоли с мутацией H3K27M преимущественно замечены в аксиальной локализации, включая таламус, мост и спинной мозг. Напротив, опухоли с мутацией H3G34V/R ограничены локализацией в пределах полушарий головного мозга [4, 5] и не обнаруживаются при срединном поражении.

По данным литературы, молекулярные подписи гена H3K27 мутантных опухолей соответствуют подписям средних и поздних стадий эмбрионального развития полосатого тела и таламуса, тогда как подписи H3G34V/R-мутантных опухолей более типичны для ранних и средних стадий эмбрионального развития коры головного мозга и полосатого тела [6].

Согласно теоретическим данным, каждой молекулярной подписи соответствует определенный опухолевый фенотип. Определение данного фенотипа возможно на основе использования иммуногистохимических суррогатов. Мутация в гене H3K27 приводит к глобальному деметилированию генома [5, 6], что может быть выявлено с помощью антитела, связывающегося исключительно с триметилированной формой данного белка. ALT-фенотип характерен для опухолей с мутациями H3G34V/R, так как они при супратенториальных высокозлокачественных глиомах почти всегда сопряжены с ATRX или мутацией DAXX и дополнительно возникающей мутацией TP53 [7, 8].

Следующим по частоте встречаемости является фенотип плеоморфной ксантоастроцитомы, для которого характерны соответствующая гистологическая картина, экспрессия астроцитарных антигенов, мутация BRAFV600E в сочетании с делецией CDKN2A/B, которые могут быть определены с помощью суррогатного антитела VE1 и цитогенетического исследования [9–11].

Мутация BRAFV600E не является специфичной исключительно для астроцитом с фенотипом плеоморфной ксантоастроцитомы. Она определяется также в группе дизонтогенетических опухолей с фенотипом так называемой полиморфной низкоклеточной нейроэпителиальной опухоли молодых людей (polymorphous low-grade neuroepithelial tumor of the young). Формирование данного фенотипа могут вызывать также перестройки гена FGFR2. Наиболее яркими признаками данного фенотипа являются морфологическая картина на светооптическом уровне, экспрессия BRAFV600E или реаранжировка FGFR2 [12].

Распространенный у взрослых гиперметилаторный фенотип G-CIMP в педиатрической популяции встречается редко, обычно у детей старшей возрастной группы. Данный фенотип коррелирует с мутациями IDH1/2 [13, 14].

Диффузный тип роста определяется и в группе астроцитом с перестройками генов MYB/MYBL, для них характерен фенотип, имеющий черты астроцитарной и эпендимарной дифференцировки. Как и в случае эпендимарных опухолей, при иммуногистохимическом исследовании в них сохраняется экспрессия GFAP и полностью отсутствует аберрантная экспрессия OLIG2 [15, 16].

Цель данного исследования – оценить влияние на прогноз суррогатной молекулярной подписи педиатрических диффузных астроцитом, созданной на основе определения иммуногистохимических и цитогенетических маркеров.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Данное исследование одобрено независимым этическим комитетом и утверждено решением ученого совета ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии» (Республика Беларусь).

Пациенты

В основу работы положены данные 62 пациентов с диффузными астроцитомами, зарегистрированных в детском канцер-регистре. Все больные получали лечение в ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии» с 2015 по 2021 г. Диагноз у всех пациентов установлен на основании рентгенологического, клинического обследования и подтвержден морфологически. Средний возраст пациентов составил 10,6 года. Распределение по полу было практически одинаковым. Опухоли поражали ствол мозга в 7 случаях, лобную долю – в 7, височную – в 21, теменную – в 10, затылочную – в 4, несколько долей – в 10, спинной мозг – в 1 и мозжечок – в 2 случаях.

Иммуногистохимическое исследование

Изучение экспрессии антигенов в опухолевой ткани осуществлялось иммуногистохимическим методом с использованием моноклональных мышинных антител ATRX (Elabioscience, разведение 1:400), IDH1 R132H (Sygma, разведение 1:100), H3K27tryme (Elabioscience, разведение 1:400), VE1 (Ventana Roche, ready-to-use), p53 (Ventana Roche, клон Bp-53-11, ready-to-use), OLIG2 (Elabioscience, разведение 1:500) с постановкой положительного и отрицательного контроля. Кроме того, проводилось окрашивание опухолей с использованием стандартных антител различных производителей для определения клеточной линии – GFAP, Synapt, NF, EMA, CD34, Chromogranin.

Срезы ткани опухоли толщиной 3 мкм помещались на стекла Superfrost Plus и высушивались в сухожаровом шкафу при температуре 100°C в течение 60 мин. Депарафинизация и последующая тепловая демаскировка эпитопа в буфере CC1 проводились в автоматическом стейнере Ventana Benchmark GX согласно стандартному протоколу. После экспозиции с первичными антителами в течение 32 мин при температуре 37°C на препараты наносилась визуализирующая система Ultra View universal dab detection kit (Ventana). Затем предметные стекла докрашивали гематоксилином в течение 4 мин и Bluing Reagent в течение 4 мин, промывали в теплой мыльной воде, обезжовивали с помощью спиртов с восходящей концентрацией, ксилола, покрывали с использованием монтирующего реагента. Оценка результатов проводилась с использованием светового микроскопа. Позитивным считалось окрашивание на p53 при ядерном окрашивании более 10% опухолевых клеток при подсчете не менее 1000 клеток, на ATRX, H3K27me, OLIG2 – при наличии ядерного окрашивания более 10% опухолевых клеток, на VE1 и IDH1 R132H – при наличии цитоплазматического окрашивания.

Флуоресцентная *in situ* гибридизация

Флуоресцентная *in situ* гибридизация проводилась с использованием двухцветного ДНК-зонда LSI CDKN2A SpectrumOrange/CEP9 SpectrumGreen (Abbott Molecular, США), ZytoLight SPEC FGFR2 Dual Color Break Apart Probe и ZytoLight SPEC FGFR3 Dual Color Break Apart Probe (ZytoVision, Германия). В случае IDH1R132H-позитивной опухоли дополнительно исследовалась коделеция 1p/19q на гистологических образцах опухолей с использованием набора ДНК-зондов Vysis LSI 1p36/1q25 и LSI 19q13/19p13 Dual Color Probe (Abbott Molecular, США). Исследование проводилось на 2 типах материала: мазках-отпечатках и срезах формалин-фиксированных опухолей, заключенных в парафиновые

блоки (FFPE). Мазки-отпечатки, фиксированные раствором Карнуа (ледяная уксусная кислота и этанол в соотношении 3:1), и FFPE проходили ферментную обработку (3 и 25 мин в рабочем растворе пепсина для отпечатков и FFPE соответственно). Гибридизация зонда и постгибридизационная отмывка осуществлялись в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя. При исследовании анализировался весь материал на стекле, подсчитывалось минимум 200 клеток в нескольких точках. При определении дисбаланса/делеции пороговым значением считался процент аберрантного клона: более 15% клеток для мазков-отпечатков, более 30–35% – для FFPE. При оценке статуса гена *FGFR2* в нормальных клетках детектировались желтые совмещенные сигналы (Fusion). В аберрантных клетках, имеющих стандартную перестройку исследуемых генов, выявлялись 1 изолированный красный, 1 зеленый и 1 желтый совмещенный сигналы (1R1G1F).

Статистический анализ

Статистический анализ полученных результатов выполнялся с использованием компьютерных пакетов статистических программ R-statistics v.3.5.3 (R Foundation Conference Committee, США), Excel 2010 (Microsoft Office). ОВ и бессобытийная выживаемость (БСВ) рассчитывались от времени диагностики до даты смерти или последнего наблюдения и сравнивались среди вышеуказанных групп с использованием метода Каплана–Майера.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Во всех случаях была проведена оценка экспрессии суррогатных маркеров (H3K27tryme, IDH1R132H, ATRX, p53, BRAFV600E и OLIG2), в 60 случаях – оценка статуса гена *CDKN2A* и в 6 случаях – оценка статуса гена *FGFR2*. Как и ожидалось, в большинстве исследованных астроцитом прослеживалась определенная закономерность в экспрессии суррогатных гистохимических маркеров и в наличии перестроек генов *CDKN2A* и *FGFR2* (рисунки 1). В 55 из 62 случаев диффузных астроцитом была выявлена суррогатная молекулярная подпись – комбинация изменений экспрессии суррогатных иммуногистохимических маркеров и/или наличие перестройки генов *CDKN2A* и *FGFR2*.

Перед проведением статистической обработки результатов все случаи диффузных астроцитом в зависимости от суррогатной молекулярной подписи были разделены на 7 групп – H3K27mut, IDH1mut, ALT, BRAFmut-PXA, BRAFmut/FGFR2, MYB и other. В группу other вошли случаи, где не удалось определить суррогатную молекулярную подпись. Каждая из

Рисунок 1

Молекулярная подгруппа детских диффузных астроцитом и соответствующая каждой из них суррогатная молекулярная подпись

Figure 1

Molecular subgroup of pediatric diffuse astrocytomas and the corresponding surrogate molecular signature

Group	H3K27tryme	ATRXloss	p53	IDHR132H	Olig2loss	BRAF V600E	FGFR2	delCDKN2A
H3K27mut	Dark Blue	Light Blue	Dark Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue
ALT	Light Blue	Dark Blue	Dark Blue	Light Blue	Dark Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue
IDH1mut	Light Blue	Dark Blue	Dark Blue	Dark Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue
BRAFmut-PXA	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Dark Blue	Light Blue	Dark Blue
BRAFmut/PGFR2	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Dark Blue	Dark Blue	Light Blue
MYB	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Dark Blue	Light Blue	Light Blue	Light Blue

выделенных групп отличалась уникальными клиническими и гистологическими чертами.

При использовании распределения опухолей в зависимости от суррогатной молекулярной подписи 8 случаев было отнесено в группу глиом – H3K27mut. Во всех случаях глиомы располагались по средней линии. Возраст пациентов колебался от 2 до 13 лет, в среднем – 8,1 года. В данную группу вошли опухоли с разной степенью злокачественности: диффузные ($n = 3$) и анапластические ($n = 1$) астроцитомы, глиобластомы ($n = 4$). Гистологическое строение опухолей варьировало. В большинстве случаев новообразование было представлено мелкими астроци-

тарными клетками с вытянутым или палочковидным гиперхромным ядром, формирующими сетчатые солидные участки и периваскулярные скопления. Встречались гигантские многоядерные и гемистоцитарные клетки (рисунок 2А). В нескольких случаях опухоль состояла из низкокодифференцированных глиальных клеток. Лептоменингеальное распространение имело место у 6 больных. Несмотря на проводимое лечение, у 7 (8,75%) пациентов произошло прогрессирование заболевания, приведшее к смерти.

К группе опухолей с ALT-фенотипом были отнесены 9 случаев. Опухоль локализовалась супратенториально в теменной ($n = 2$) и височной ($n = 1$) долях, с поражением нескольких долей ($n = 5$) и инфратенториально ($n = 1$). Возраст пациентов был сравнительно выше, чем в предыдущей группе, в среднем составил 15,5 года. В 4 случаях опухоль была классифицирована как глиобластома, в 5 случаях – как анапластическая астроцитома. На светооптическом уровне опухолевые клетки были без четкой дифференцировки – округлые клетки с гиперхромными округлыми ядрами и скудной цитоплазмой, окруженные очагово нейропил-подобным веществом (рисунок 2Б). Причудливые гигантские клетки определялись в 3 случаях. Прогрессия основного заболевания произошла у 6 (67%) пациентов и у 4 из них привела к смерти.

Группа астроцитом с фенотипом IDH1mut, соответствующим астроцитомам взрослого типа, включала 9 случаев. В группе преобладали мальчики ($n = 8$). Все пациенты были старше 13 лет. Опухоли

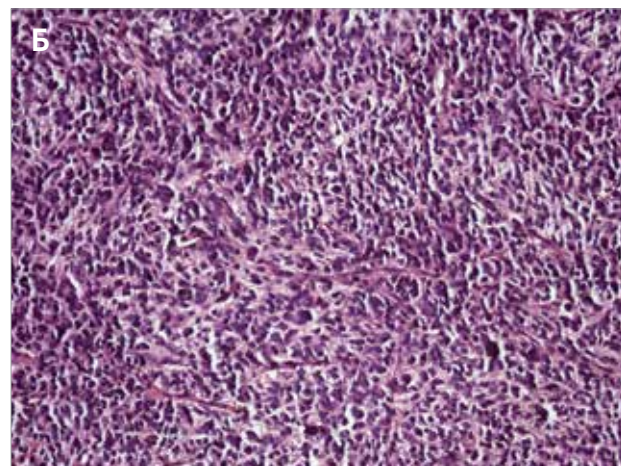
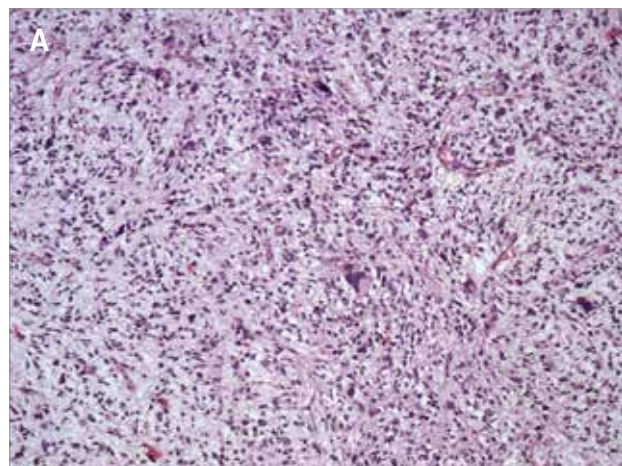
Рисунок 2

Гистологические признаки диффузных астроцитом подгрупп H3K27mut и ALT. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 200$

А – диффузная астроцитома подгруппы H3K27mut: показательный участок опухоли, состоящий из плотно расположенных фибриллярных астроцитов с примесью гигантских многоядерных клеток, по периферии – расширенные синусоидные сосуды; Б – диффузная астроцитома подгруппы ALT: гиперклеточная опухоль, состоящая из незрелых низкокодифференцированных клеток с высокой митотической активностью

Figure 2

Histological features of diffuse astrocytomas of H3K27mut subgroup and ALT subgroup. Hematoxylin–eosin, $\times 200$
 А – pediatric diffuse glioma H3K27mut subgroup: A representative area showing predominately dense fibrillary components with frequent giant cells. Dilated vessels are conspicuous in the background; Б – pediatric diffuse glioma ALT subgroup: abundant tumor cells with immature undifferentiated morphology and common mitotic figures



локализовались в лобной, височной и теменной долях головного мозга. По гистологическому строению новообразования были классифицированы как диффузная астроцитома ($n = 3$), олигодендроглиома ($n = 1$), анапластическая астроцитома ($n = 2$), глиобластома ($n = 2$), анапластическая олигодендроглиома ($n = 1$). Коделеция 1p/19q была выявлена у 2 пациентов с олигодендроглиомами. На светоптическом уровне IDH1mut-астроцитомы были представлены диффузным инфильтратом из олигодендроглиоподобных клеток или мелких отростчатых астроцитов с разной степенью выраженности цитологической атипии, частыми участками рарификации, редко с участками гемистоцитарной дифференцировки (рисунки 3А). В состоянии ремиссии находятся 3 из 9 пациентов.

В группу MYB были включены 4 человека с опухолями височной и затылочной долей. При гистологическом исследовании новообразование было представлено диффузным инфильтратом из мнорморфных олигодендроглиоподобных или биполярных клеток с мелкими овальными или удлинёнными ядрами с глыбчатым хроматином и скудной цитоплазмой. В 2 случаях имелись периваскулярные розетки из удлинённых, тонких клеток, ориентированных перпендикулярно сосудам (рисунки 3Б), в 1 случае – шваннома-подобные структуры. Опухолевые клетки также имели тенденцию к накоплению под мягкой мозговой оболочкой. Новообразования были классифицированы как ангиоцентрическая глиома либо как диффузная астроцитома. Рецидивов у пациентов данной группы не было.

Опухоль с молекулярной подписью, соответствующей BRAFmut-PXA-группе, имели 10 пациентов в возрасте от 3 до 17 лет. Новообразования располагались в височной и теменной долях. Гистологически они состояли из крупных эозинофильных веретеновидных глиальных клеток, эпителиоидных клеток и причудливых многоядерных глиальных клеток в различных соотношениях. Определялся выраженный ретикулиновый матрикс, концентрическое расположение опухолевых клеток вокруг сосудов (рисунки 4А). У 9 больных опухоль прогрессировала и 4 пациента умерли.

Наиболее многочисленной была группа BRAFmut/FGFR2-астроцитом ($n = 14$). Средний возраст пациентов составил 11 лет. Опухоли были расположены супратенториально в теменной ($n = 1$), височной ($n = 10$) и затылочной ($n = 2$) долях и инфратенториально ($n = 1$). Новообразования представляли собой диффузный инфильтрат из олигодендроглиоподобных клеток. Очагово некоторые клетки приобретали нейрональные черты – крупное ядро с центральным ядрышком или крупную эозинофильную цитоплазму (рисунки 4Б). Митотическая активность была низкой или полностью отсутствовала. Сосудистый рисунок был выражен, определялись многочисленные тонкостенные ветвящиеся сосуды, часто вокруг них наблюдались кровоизлияния, кальцинаты. У 1 (1,7%) пациента произошел рецидив.

Статистическое исследование подтвердило ценность стандартного прогностического фактора – степени злокачественности ($p = 0,002$). Выживае-

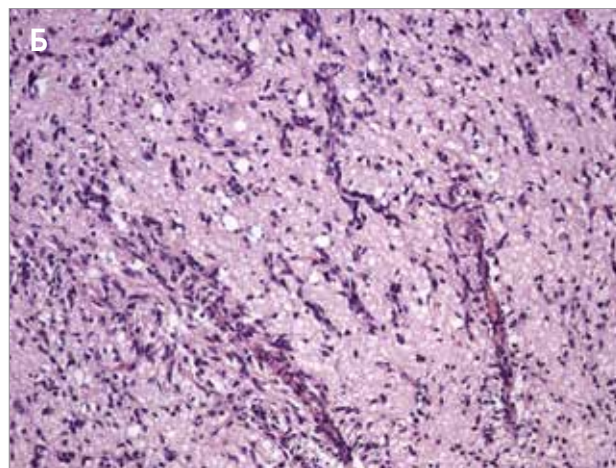
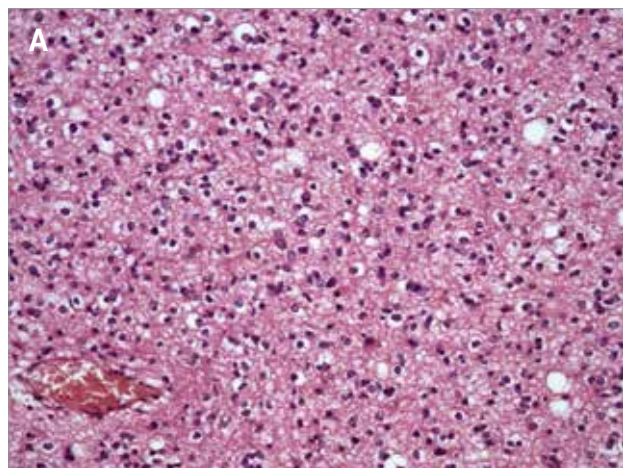
Рисунок 3

Гистологические признаки диффузных астроцитом подгрупп IDH1mut и MYB. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 200$

А – диффузная астроцитома подгруппы IDH1mut: участок коры головного мозга с умеренной инфильтрацией олигодендроглиоподобными клетками и примесью микрогемистоцитов; Б – диффузная астроцитома подгруппы MYB: диффузная глиома, состоящая из вытянутых и олигодендроглиоподобных клеток с овальными ядрами с минимальным полиморфизмом, глыбчатым хроматином, очагово опухолевые клетки концентрируются вокруг сосудов

Figure 3

Histological features of diffuse astrocytomas of IDH1mut subgroup and MYB subgroup. Hematoxylin–eosin, $\times 200$
 А – pediatric glioma IDH1mut subgroup: cerebral cortex with moderate infiltration with oligodendroglial-like cells, mixed with microgemistocytes; Б – pediatric glioma MYB subgroup: diffuse glioma consisting of spindle and oligodendroglia-like cells with oval, only minimally pleomorphic nuclei, with speckled chromatin, focal tumor cells arranged around vessels



мость пациентов с анапластическими астроцитомами и глиобластомами была ниже, чем больных с низкоккачественными опухолями. ОВ пациентов с глиомами II степени злокачественности составила $61 \pm 12\%$, с III степенью – 0% и с IV степенью – $32 \pm 17\%$.

Выживаемость пациентов с диффузными астроцитомами существенно различалась в группах, выделенных в зависимости от суррогатной молекулярной подписи ($p < 0,0001$). При этом степень злокачественности не коррелировала с выделенными группами астроцитом на основании суррогатной молекулярной подписи. В группе опухолей с суррогатной подписью H3K27mut прогноз был наихудшим – ОВ составила $23 \pm 19\%$, БСВ – 0%. Выживаемость была также низкой в группах ALT, IDH1mut, BRAFmut-PXA. В группе ALT ОВ составила $37 \pm 20\%$, БСВ – $20 \pm 17\%$. ОВ пациентов группы BRAFmut-PXA была $53 \pm 19\%$, БСВ – $18 \pm 12\%$.

У пациентов группы IDH1mut сравнительно реже случались рецидивы, БСВ в ней составила $44 \pm 17\%$, однако ОВ – $40 \pm 17\%$, что близко по уровню больных из групп ALT, H3K27mut, BRAFmut-PXA.

Напротив, пациенты из групп MYB и BRAFmut/FGFR2 имели благоприятный прогноз, риск возврата болезни был низким, БСВ в группе BRAFmut/FGFR2 составила $92 \pm 7\%$, в группе MYB – 100%. ОВ в обеих группах была 100%. ОВ в группе other была равна $71 \pm 17\%$, БСВ – $29 \pm 17\%$. График, отражающий ОВ, отражен на *рисунке 5А*, БСВ – на *рисунке 5Б*.

Рисунок 4

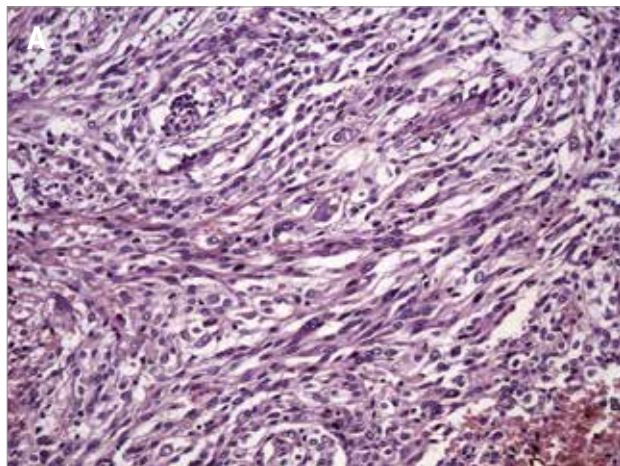
Гистологические признаки диффузных астроцитом подгрупп BRAFmut-PXA и BRAFmut/FGFR2. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 200$

А – диффузная астроцитома подгруппы BRAFmut-PXA: опухоль имеет морфологические черты плеоморфной ксантоастроцитомы – толстые пучки гемистоцитарных астроцитов и клеток с эозинофильной гранулярной цитоплазмой, окруженных волокнами ретикулина; Б – диффузная астроцитома подгруппы BRAFmut/FGFR2: гистоархитектоника опухоли напоминает строение сот, как при олигодендроглиоме, некоторые клетки с центральными ядрышками немного напоминают нейроны. Многочисленные ветвящиеся капиллярные кровеносные сосуды

Figure 4

Histological features of diffuse astrocytomas of BRAFmut-PXA subgroup and BRAFmut/FGFR2 subgroup. Hematoxylin–eosin, $\times 200$

A – pediatric glioma BRAFmut-PXA subgroup: typical pleomorphic xanthoastrocytoma morphology – thick bundles of gemistocytic cell with eosinophilic granular cytoplasm in reticulin rich background; Б – pediatric glioma BRAFmut/FGFR2 subgroup: Tumor cells have oligodendroglioma-like honeycomb architecture, some cells with centrally nucleoli slightly resemble neurons. Capillary blood vessels arrange in an arborizing pattern



ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Педиатрические диффузные астроцитомы – сложное и гетерогенное заболевание с широким спектром гистологических и молекулярных изменений и потенциально смертельным биологическим потенциалом. Согласно полученным результатам, стандартные клиничко-морфологические параметры для оценки прогноза педиатрических диффузных астроцитом имеют ограниченную ценность в отличие от определения прогноза на основании суррогатной молекулярной подписи, который является статистически значимым.

По данным литературы, мутации гистоновых белков представляют собой наиболее частое генетическое нарушение в детских диффузных глиомах. Точечные мутации в терминальном участке гистона H3 в позициях 27 и 34 регистрируются примерно у 36% детей с супратенториальными глиомами, 14% из них составляют мутации G34R/V и 22% – мутации K27M [8, 17]. Мутация H3.3 K27M также обнаруживается в 70–80% случаев диффузных педиатрических глиом моста [5, 17]. Мутации преимущественно происходят в гене *H3F3A*, кодирующем гистоновый белок H3.3, но аналогичные мутации также обнаруживаются с меньшей частотой в гене гистона 3.1 – *HIST1H3B* [17–19]. В нашем исследовании распространенность глиом с соответствующими молекулярными подписями составляет 12,9% для глиом с

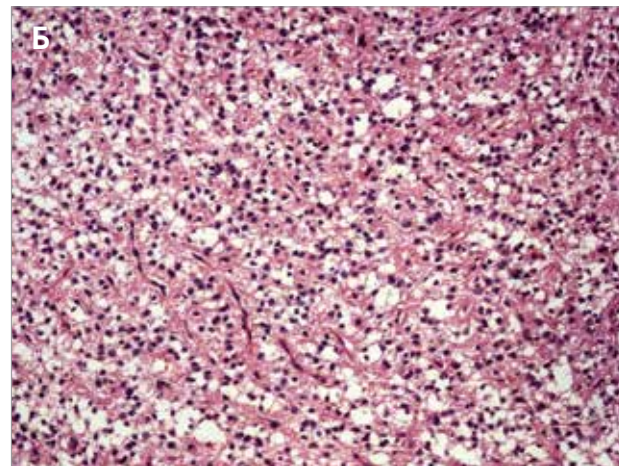
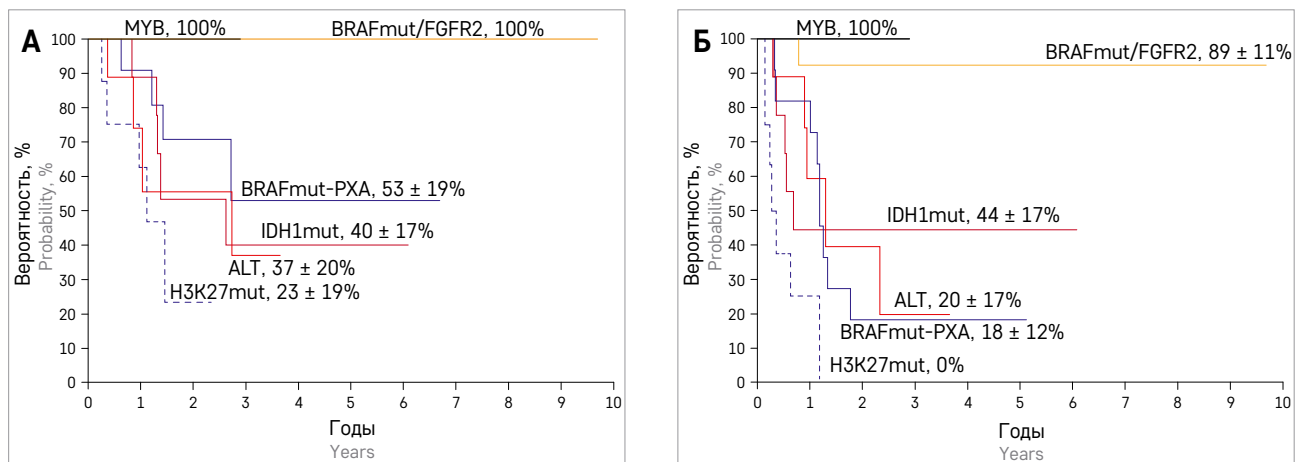


Рисунок 5

ОВ (А) и БСВ (Б) пациентов с диффузными астроцитомами в зависимости от молекулярной подгруппы, выделенной на основании суррогатной молекулярной подписи

Figure 5

Overall (A) and event-free (B) survival of patients with diffuse astrocytomas, depending on the molecular subgroup identified on the basis of a surrogate molecular signature



Н3К27М и 14,5% для глиом Н3G34М, это несколько меньше в сравнении с мировыми данными в связи с тем, что биопсии глиом ствола проводятся редко.

При анализе выживаемости группа глиом с фенотипом Н3К27mut имела наихудший прогноз среди всех исследованных групп. Мутации Н3К27М представляют собой один из главных предикторов биологического поведения. Так, в исследовании, включавшем 85 диффузных глиом, в том числе 56 Н3.3 К27М-мутантных опухолей (66%), 6 Н3.1 К27М-мутантных опухолей (7%), Н3 К27М-мутантные глиомы имели наиболее агрессивное клиническое течение независимо от их анатомического расположения [20, 21]. Кроме того, на выживаемость Н3К27М-мутантных опухолей не влияет ни степень их злокачественности, ни степень резекции [5, 21–23].

В нашем исследовании выявление глиом с мутацией Н3G34V/R основывается на определении ALT-фенотипа. Мутация Н3G34V/R в супратенториальных глиомах всегда сочетается с мутацией *ATRX* или *DAXX* и мутацией *TP53* [24, 25]. Так как гистоновые шапероны *ATRX* и *DAXX* участвуют в загрузке гистона Н3.3 в гетерохроматических областях теломер, мутации *ATRX/DAXX* приводят к независимому от теломеразы удлинению теломер, т. е. к формированию ALT-фенотипа [26]. В опухолях ствола мозга, связанных с мутацией Н3К27М, также могут присутствовать мутации *ATRX/DAXX*, но они чаще встречаются у детей старшего возраста и подростков [26, 27]. С другой стороны, наличие ALT-фенотипа не является специфической чертой педиатрических глиом. Данное нарушение может встречаться в 86% астроцитом взрослого типа. Однако для них характерно раннее событие в виде *IDH*-мутации [28]. Поэтому использование комбинации антител *IDH1R132H*, *ATRX* и *p53* позволяет дифференцировать

группу глиом взрослого типа и глиомы детского типа, связанные с мутацией Н3G34V/R.

В нашей работе выживаемость пациентов с суррогатной подписью BRAFmut-PXA была низкой, сопоставимой с выживаемостью в группах с суррогатными молекулярными подписями Н3К27mut и ALT, связанными с мутациями гистонов. Данные, касающиеся выживаемости этих опухолей, разнятся. В 1 исследовании приводятся данные о наличии отдельной группы детских опухолей, имеющих кортикальное расположение, гистологическую картину и профиль метилирования плеоморфной ксантоастроцитомы, характеризующихся наличием мутации BRAFV600E и делеции *CDKN2A/B* и лучшей 3-летней ОВ в сравнении с другими диффузными астроцитомами, равной примерно 70% [6]. В то же время многие исследователи сообщают о том, что мутация BRAFV600E и делеция *CDKN2A/B* также часто встречаются в эпителиоидной глиобластоме, которая имеет аналогичные гистологические, а иногда и эпигеномные признаки, что и анапластическая плеоморфная ксантоастроцитомы, но прогноз у данных опухолей хуже, медиана ОВ составляет 11 мес [10, 29, 30].

Результаты нашего исследования показали, что группа глиом с подписью *IDH1mut* отличается более низким риском развития рецидивов, чем опухоли, связанные с мутациями гистоновых белков, и опухоли с наличием мутации BRAFV600E в сочетании с *delCDKN2A*. Другие опубликованные исследования подтверждают эти данные. По данным исследования Children's Oncology Group (ACNS0423 study), мутация *IDH1R132H* была выявлена в 16,3% глиобластом и прогноз у этих опухолей был лучше, чем в остальных группах детских глиобластом. Однолетняя БСВ в группе опухолей с *IDH*-мутациями составила

86 ± 15% против 64 ± 8% в случае опухолей IDH-wild type [31].

Наиболее дискуссионной является тема биологического потенциала педиатрических диффузных астроцитом II степени злокачественности. Патогенез, гистологические и молекулярные особенности этих глиом остаются неясными. При оценке выживаемости низкоквалифицированных астроцитом, вошедших в наше исследование, ни одна из опухолей не рецидивировала в течение периода наблюдения. Однако, по данным некоторых исследований, в большинстве астроцитом IDH-wild type с гистопатологическими и рентгенологическими признаками диффузной астроцитомы низкой степени злокачественности обнаруживаются молекулярные и клинические признаки глиомы высокой степени злокачественности, что свидетельствует о том, что они могут представлять раннюю стадию первичной глиобластомы. В связи с этим представляет интерес работа M. Hasselblatt и соавт., в которой при изучении профиля ДНК метилирования 25 опухолей с гистологическими признаками низкоквалифицированной диффузной астроцитомы IDH-wild type в 17 были обнаружены генетические маркеры или специфический профиль метилирования глиобластомы. В последующем у 10 из этих пациентов произошла ранняя злокачественная трансформация. В итоге не было обнаружено ни одной убедительной низкоквалифицированной диффузной астроцитомы [32].

В то же время диффузные астроцитомы с альтерациями генов *MYB/MYBL*, *FGFR2*, *BRAF*, недавно описанные при изучении больших серий педиатрических диффузных астроцитом [33, 34], в настоящее время считаются имеющими доброкачественное клиническое течение без терапии [35]. В случае данных диффузных астроцитом переоценка значения

II степени злокачественности может привести к чрезмерному лечению, что способствует потенциально опасным последствиям.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диффузные глиомы у детей полностью различаются по биологическим свойствам и клиническому поведению и требуют индивидуальных протоколов лечения, несмотря на сходные гистологические признаки. Мы ретроспективно рассмотрели опухоли, занесенные в детский канцер-регистр с диагнозом «диффузные глиомы», и, проанализировав наш собственный опыт, предложили диагностический алгоритм их верификации у детей на основе использования суррогатной молекулярной подписи, включающей комбинацию иммуногистохимических и цитогенетических маркеров. Результаты настоящего исследования подтверждают возможность использования суррогатной молекулярной подписи для оценки прогноза педиатрических диффузных глиом.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование проведено в рамках государственной научно-технической программы «Разработать и внедрить комплексный метод прогнозирования биологического поведения нейроэпителиальных опухолей у детей, основанный на выявлении молекулярно-генетических маркеров».

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

ORCID

Mikhaleuskaya T.M. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7134-8923>

Konoplya N.E. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0592-7182>

Bydanov O.I. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3232-2322>

Kapuzha D.R. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2604-324X>

Aleinikova O.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0143-1921>

Литература

1. Faury D., Nantel A., Dunn S.E., Guiot M.-C., Haque T., Hauser P., et al. Molecular profiling identifies prognostic subgroups of pediatric glioblastoma and shows increased YB-1 expression in tumors. *J Clin Oncol* 2007; 25 (10): 1196–208. DOI: 10.1200/JCO.2006.07.8626
2. Broniscer A., Gajjar A. Supratentorial high-grade astrocytoma and diffuse brainstem glioma: two challenges for the pediatric oncologist. *Oncologist* 2004; 9 (2): 197–206. DOI: 10.1634/theoncologist.9-2-197
3. Sturm D., Bender S., Jones D.T., Lichter P., Grill J., Becher O., et al. Paediatric and adult glioblastoma: multiform (epi)genomic culprits emerge. *Nat Rev Cancer* 2014; 14 (2): 92–107. DOI: 10.1038/nrc3655
4. Sean P., Ferris S.P., Hofmann J., Solomon D.A., Perry A. Characterization of gliomas: from morphology to molecules. *Virchows Arch* 2017; 471 (2): 257–69. DOI: 10.1007/s00428-017-2181-4
5. Sturm D., Witt H., Hovestadt V., Khuong-Quang D.-A., Jones D.T.W., Konermann C., et al. Hotspot mutations in H3F3A and IDH1 define distinct epigenetic and biological subgroups of glioblastoma. *Cancer Cell* 2012; 22 (4): 425–37. DOI: 10.1016/j.ccr.2012.08.024
6. Korshunov A., Ryzhova M., Hovestadt V., Bender S., Sturm D., Capper D., et al. Integrated analysis of pediatric glioblastoma reveals a subset of biologically favorable tumors with associated molecular prognostic markers. *Acta Neuropathol* 2015; 129 (5): 669–78. DOI: 10.1007/s00401-015-1405-4
7. Korshunov A., Capper D., Reuss D., Schrimpf D., Ryzhova M., Hovestadt V., et al. Histologically distinct neuroepithelial tumors with histone 3 G34 mutation are molecularly similar and comprise a single nosologic entity. *Acta Neuropathol* 2016; 131 (1): 137–46. DOI: 10.1007/s00401-015-1493-1
8. Lee J., Solomon D.A., Tihan T. The Role of Histone Modifications and

- Telomere Alterations in the Pathogenesis of Diffuse Gliomas in Adults and Children. *J Neurooncol* 2017; 132 (1): 1–11. DOI: 10.1007/s11060-016-2349-9
9. Alexandrescu S., Korshunov A., Lai S.H., Dabiri S., Patil S., Li R., et al. Epithelioid glioblastomas and anaplastic epithelioid pleomorphic xanthoastrocytomas – same entity or first cousins? *Brain Pathol* 2016; 26: 215–23. DOI: 10.1111/bpa.12295
 10. Kleinschmidt-DeMasters B.K., Aisner D.L., Birks D.K., Foreman N.K. Epithelioid GBMs show a high percentage of BRAFV600E mutation. *Am J Surg Pathol* 2013; 37: 685–98. DOI: 10.1097/PAS.0b013e31827f9c5e
 11. Huillard E., Hashizume R., Phillips J.J., Griveau A., Ibric R.A., Yasuyuki A., et al. Cooperative interactions of BRAFV600E kinase and CDKN2A locus deficiency in pediatric malignant astrocytoma as a basis for rational therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109 (22): 8710–5. DOI: 10.1073/pnas.1117255109
 12. Huse J.T., Snuderl M., Jones D.T.W., Brathwaite C.D. Polymorphous low-grade neuroepithelial tumor of the young (PLNTY): an epileptogenic neoplasm with oligodendroglioma-like components, aberrant CD34 expression, and genetic alterations involving the MAP kinase pathway. *Acta Neuropathol* 2017; 133 (3): 417–29. DOI: 10.1007/s00401-016-1639-9
 13. Noushmehr H., Weisenberger D.J., Diefes K., Phillips H.S., Pujara K., Berman B.P., et al. Identification of a CpG island methylator phenotype that defines a distinct subgroup of glioma. *Cancer Cell* 2010; 17 (5): 510–22. DOI: 10.1016/j.ccr.2010.03.017
 14. Killela P.J., Reitman Z.J., Jiao Y., Betegowda C., Agrawal N., Diaz L.A. Jr, et al. TERT promoter mutations occur frequently in gliomas and a subset of tumors derived from cells with low rates of self-renewal. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; 110: 6021–6. DOI: 10.1073/pnas.1303607110
 15. Wefers A.K., Stichel D., Schrimpf D., Coras R., Pages M., Tauziède-Espariat A., et al. Isomorphic diffuse glioma is a morphologically and molecularly distinct tumour entity with recurrent gene fusions of MYBL1 or MYB and a benign disease course. *Acta Neuropathol* 2020; 139 (1): 193–209. DOI: 10.1007/s00401-019-02078-w
 16. Miyata H., Ryufuku M., Kubota Y., Ochiai T., Niimura K., Hori T. Adult-onset angiocentric glioma of epithelioid cell-predominant type of the mesial temporal lobe suggestive of a rare but distinct clinicopathological subset within a spectrum of angiocentric cortical ependymal tumors. *Neuropathology* 2012; 32 (5): 479–91. DOI: 10.1111/j.1440-1789.2011.01278.x
 17. Wu G., Broniscer A., McEachron T.A., Lu C., Paugh B.S., Becksfors J., et al. Somatic histone H3 alterations in pediatric diffuse intrinsic pontine gliomas and non-brainstem glioblastomas. *Nat Genet* 2012; 44: 251–3. DOI: 10.1038/ng.1102
 18. Behjati S., Tarpey P.S., Presneau N., Scheipl S., Pillay N., Van Loo P., et al. Distinct H3F3A and H3F3B driver mutations define chondroblastoma and giant cell tumor of bone. *Nat Genet* 2013; 45: 1479–82. DOI: 10.1038/ng.2814
 19. Bender S., Tang Y., Lindroth A.M., Hovestadt V., Jones D.T., Kool M., et al. Reduced H3K27me3 and DNA hypomethylation are major drivers of gene expression in K27M mutant pediatric high-grade gliomas. *Cancer Cell* 2013; 24: 660–72. DOI: 10.1016/j.ccr.2013.10.006
 20. Karremann M., Gielen G.H., Hoffmann M., Wiese M., Colditz N., Warmuth-Metz M., et al. Diffuse high-grade gliomas with H3 K27M mutations carry a dismal prognosis independent of tumor location. *Neuro Oncol* 2018; 20 (1): 123–31. DOI: 10.1093/neuonc/nox149
 21. Khuong-Quang D.-A., Buczkowicz P., Rakopoulos P. K27M mutation in histone H3.3 defines clinically and biologically distinct subgroups of pediatric diffuse intrinsic pontine gliomas. *Acta Neuropathol* 2012; 124: 439–47. DOI: 10.1007/s00401-012-0998-0
 22. Fontebasso A.M., Papillon-Cavanagh S., Schwartzentruber J. Recurrent somatic mutations in ACVR1 in pediatric midline high-grade astrocytoma. *Nat Genet* 2014; 46: 462–6. DOI: 10.1038/ng.2950
 23. Wu G., Diaz A.K., Paugh B.S. St. Jude Children's Research Hospital-Washington University Pediatric Cancer Genome Project, The genomic landscape of diffuse intrinsic pontine glioma and pediatric non-brainstem high-grade glioma. *Nat Genet* 2014; 46: 444–50. DOI: 10.1038/ng.2938
 24. Schwartzentruber J., Korshunov A., Liu X.-Y., Jones D.T.W., Pfaff E., Jacob K., et al. Driver mutations in histone H3.3 and chromatin remodelling genes in paediatric glioblastoma. *Nature* 2012; 482: 226–231. DOI: 10.1038/nature10833
 25. Znenker E., Ray-Gallet D., Almouzni G. The double face of the histone variant H3.3. *Cell Res* 2011; 21: 421–34. DOI: 10.1038/cr.2011.14
 26. Pathak P., Jha P., Purkait S., Sharma V., Suri V., Sharma M.C., et al. Altered global histone-trimethylation code and H3F3A-ATRX mutation in pediatric GBM. *J Neurooncol* 2015; 121 (3): 489–97. DOI: 10.1007/s11060-014-1675-z
 27. Gerdes N., Fontebasso A.M., Albrecht S., Faury D., Jabado N. Pediatric high-grade astrocytomas: a distinct neuro-oncological paradigm. *Genome Med* 2013; 5 (7): 66. DOI: 10.1186/gm470
 28. Brat D.J., Verhaak R.G., Aldape K.D., Yung W.K., Salama S.R., Cooper L.A., et al. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive, Integrative Genomic Analysis of Diffuse Lower-Grade Gliomas. *N Engl J Med* 2015; 372 (26): 2481–98. DOI: 10.1056/NEJMoa1402121
 29. Broniscer A., Tatevosian R.G., Sabin N.D., Klimo P. Jr, Dalton J., Lee R., et al. Clinical, radiological, histological and molecular characteristics of paediatric epithelioid glioblastoma. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2014; 40 (3): 327–36. DOI: 10.1111/nan.12093
 30. Korshunov A., Chavez L., Sharma T., Ryzhova M., Schrim D. Epithelioid glioblastomas stratify into established diagnostic subsets upon integrated molecular analysis. *Brain Pathol* 2018; 28 (5): 656–62. DOI: 10.1111/bpa.12566
 31. Pollack I.F., Hamilton R., Sobol R.W., Nikiforova M.N., Lyons-Weiler M.A., LaFramboise W.A., et al. IDH1 mutations are common in malignant gliomas arising in adolescents: a report from the Children's Oncology Group. *Childs Nerv Syst* 2011; 27 (1): 87–94. DOI: 10.1007/s00381-010-1264-1
 32. Hasselblatt M., Jaber M., Reuss D., Grauer O., Bibo A., Terwey S., et al. Diffuse Astrocytoma, IDH-Wildtype: A Dissolving Diagnosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 2018; 77 (6): 422–5. DOI: 10.1093/jnen/nly012
 33. Ramkissoon L.A., Horowitz P.M., Craig J.M., Ramkissoon S.H., Rich B.E., Schumacher S.E., et al. Genomic analysis of diffuse pediatric low-grade gliomas identifies recurrent oncogenic truncating rearrangements in the transcription factor MYBL1. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 110 (20): 8188–93.
 34. Ramkissoon S.H., Bandopadhyay P., Hwang J., Ramkissoon L.A., Greenwald N.F., Schumacher S.E., et al. Clinical targeted exome-based sequencing in combination with genome-wide copy number profiling: precision medicine analysis of 203 pediatric brain tumors. *Neuro Oncol* 2017; 19 (7): 986–96. DOI: 10.1093/neuonc/now294
 35. Chiang J., Harreld J.H., Tinkle C.L., Moreira D.C., Li X., Acharya S., et al. A single-center study of the clinicopathologic correlates of gliomas with a MYB or MYBL1 alteration. *Acta Neuropathol* 2019; 138 (6): 1091–2. DOI: 10.1007/s00401-019-02081-1