

*А.Е. Друй^{1,2}, Л.И. Пануша¹, Л.А. Ясько¹,
Д.М. Коновалов¹*

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ КЛАССИФИКАЦИЯ МЕДУЛЛОБЛАСТОМЫ НА ОСНОВАНИИ ИССЛЕДОВАНИЯ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ

¹ ФГБОУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Д. Рогачева», г. Москва, Российская Федерация;

² ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий», г. Екатеринбург, Российская Федерация

В основе клинической гетерогенности медуллобластом лежат различия, выявляемые на молекулярном уровне в виде неодинакового профиля экспрессии генов, метилирования ДНК и мутационного спектра. Выявление данных различий послужило основанием для создания в 2016 г. классификации опухолей ЦНС, где предусмотрено разделение медуллобластом на молекулярно-генетические подгруппы. Принадлежность к определенной молекулярно-генетической подгруппе определяет исход заболевания, ответ на проводимую терапию, вероятность развития рецидива и прогноз. В настоящей работе представлены результаты использования технологии NanoString для определения молекулярно-генетической подгруппы медуллобластом на 65 гистологических образцах.

Ключевые слова: медуллобластома, дети, молекулярно-генетические подгруппы, NanoString, прогноз

Введение

Стратификация пациентов с медуллобластомой на группы риска принципиальна для определения прогноза заболевания, оценки вероятности развития рецидива, а также планирования

терапии. В 2010 г. на консенсусной конференции в Бостоне было достигнуто соглашение о выделении четырех молекулярно-генетических подгрупп медуллобластомы: WNT (Wingless), SHH (Sonic Hedgehog), подгруппа 3 и подгруппа 4 [1, 2]. Данные подгруппы отличаются не только генетическим (экспрессионным, эпигеномным и мутационным) профилем, но и прогнозом, уровнем ответа на терапию и частотой возникновения рецидива. При этом пациенты с медуллобластомой подгруппы WNT характеризуются наиболее благоприятным прогнозом, SHH и подгруппы 4 — промежуточным, представляя собой наиболее гетерогенные популяции, а подгруппы 3 — неблагоприятным. В 2016 году Всемирная Организация Здравоохранения (ВОЗ) представила актуальную классификацию опухолей ЦНС, включающую указанные четыре подгруппы медуллобластомы.

На основании диагностической эффективности для определения подгруппы медуллобластомы, существующие аналитические методы можно разделить на основные и второстепенные. Результаты основных методов исследования позволяют достоверно классифицировать опухоль, в то время как второстепенные лишь указывают на её вероятную принадлежность к той или иной молекулярной подгруппе [1, 3-5].

К первой группе технологий относится исследование профиля экспрессии генов, а также полногеномный профиль метилирования ДНК. Данные методики признаны равнозначными и отражают две стороны процесса транскрипции генов. Гиперметилированные гены имеют низкий уровень экспрессии, гипометилированные — высокий [6, 7]. На момент открытия подгрупп медуллобластомы (2006-2008 гг.) исследовался профиль экспрессии большого количества генов (более 18 000) на экспрессионных чипах высокой плотности, что предъявляло высокие требования к качеству анализируемой РНК и существенно усложняло преаналитический этап [6]. В 2012 году Р.А. Northcott с соавт. показали, что для надежной классификации медуллобластом достаточно знать уровень мРНК 22 генов, экспрессия которых наиболее значимо различается в клетках опухолей различных подгрупп [8]. Для анализа была выбрана технология

NanoString, в основе которой лежит гибридизация небольшого специфического фрагмента мРНК с олигонуклеотидными зондами: репортерным и захватывающим, в результате чего образуется комплекс, состоящий из трех молекул. Репортерный зонд имеет в своем составе цветовой «штрих-код» — уникальную последовательность шести флуорохромов, позволяющих идентифицировать комплекс, а захватывающий зонд несет биотин, обеспечивающий фиксацию комплекса к твердой фазе. В дальнейшем иммобилизованные комплексы подсчитываются флуоресцентным анализатором, а их количество, через этап нормализации по референсным генам, трансформируется в величину экспрессии соответствующих генов. Поскольку участок комплементарного связывания молекулы мРНК и зондов достаточно мал, технология NanoString позволяет осуществлять анализ высокофрагментированной РНК, в том числе, выделенной из ткани, фиксированной в формалине и залитой в парафиновый блок [9].

К группе второстепенных методов классификации медуллобластом относятся стандартные морфологические и генетические методы. Сочетание ядерной аккумуляции β -катенина и однонуклеотидной замены в экзоне 3 гена *CTNNB1*, которые выявляются с использованием иммуногистохимии и секвенирования по Сэнгеру, соответственно, является признаком медуллобластомы подгруппы WNT [5]. Результат может быть дополнен определением моносомии 6 [10, 11]. Нодулярно-десмопластическое гистологическое строение опухоли у детей раннего возраста указывает на принадлежность к подгруппе SHH, однако у более старших пациентов данная зависимость утрачивается. Выявление амплификации гена *MYC* методом флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH) может служить маркеров подгруппы 3, особенно в сочетании с анапластическим гистологическим строением и наличием метастатической диссеминации опухоли. Однако в данном случае чувствительность признаков невысока [5, 10]. Наличие изохромосомы 17q специфично для медуллобластомы подгрупп 3 и 4. При этом необходимо подчеркнуть, что мутации в кодирующей последовательности генов,

равно как и aberrации, связанные с изменением числа копий генов или хромосомных регионов (делеции или амплификации), с одной стороны, не являются строго специфичными для той или иной подгруппы, с другой — даже наиболее специфичные аномалии не выявляются в абсолютном числе образцов соответствующего молекулярно-генетического варианта. Поэтому ни одна из указанных aberrаций не может служить основанием для однозначной классификации опухоли в какую-либо подгруппу, а для точной интерпретации должны быть применены современные высокопроизводительные технологии, в особенности для разделения пациентов с опухолями 3 и 4 подгрупп, экспрессионный и мутационный спектр которых частично перекрывается, а прогноз различается [5, 10, 12].

Таким образом, целью настоящей работы явилось исследование диагностических возможностей технологии NanoString для определения молекулярно-генетических подгрупп медуллобластомы.

Материалы и методы

Проведен ретроспективный анализ клинических и молекулярно-генетических данных 65 пациентов с диагнозом медуллобластома, верифицированным или подтвержденным в патологоанатомическом отделении ФГБУ НМИЦ им. Дмитрия Рогачева в период с 2013 по 2016 г.

Медиана возраста пациентов составила 6,5 лет (диапазон от 1,5 месяцев до 16 лет), 16 пациентов были младше 3 лет. Соотношение мальчиков и девочек 2,25:1. Медиана наблюдения за пациентами составила 25 месяцев (диапазон 2,1–76,6 месяцев). 26 пациентам терапия проводилась в отделениях ФГБУ НМИЦ ДГОИ, остальные дети получали терапию в других клиниках. Всем пациентам проводилась терапия по различным версиям протокола НИТ (в том числе, версии НИТ MED 2014). У 20 пациентов к моменту начала терапии определялось метастатическое распространение опухоли (M+ стадия). У 17 пациентов определялась остаточная опухоль после проведенного оперативного лечения (R+ стадия).

Материалом для молекулярно-генетического исследования явилась ткань, полученная в результате резекции опухоли, фиксированная в формалине и залитая в парафиновый блок. Из фрагмента образца, содержащего не менее 70% ткани опухоли, готовили 5 срезов толщиной 10 мкм. После предварительной депарафинизации растворителем Bio Clear (Bio-Optica, Италия), общая РНК выделялась набором «Recover All Total Nucleic Acid Isolation Kit for FFPE» (Thermo Fisher Scientific, США), согласно инструкции производителя. Выделенная РНК подвергалась количественной и качественной оценке: измерению концентрации методом спектрофотометрии (Nanodrop 2000, Thermo Fisher Scientific, США) и исследованию уровня деградации с помощью электрофореза флуоресцентно меченных фрагментов РНК на микроструйных чипах (Bioanalyzer 2100, Agilent, Германия) [13]. РНК в количестве 300 нг использовалась для исследования экспрессии генов методом NanoString, согласно стандартной методике, включающей гибридизацию РНК и зондов (16 часов), автоматизированную очистку продуктов гибридизации и подготовку картриджа (иммобилизацию комплексов РНК-зонды) и сканирование на флуоресцентном анализаторе nCounter (NanoString, США). Панель исследуемых генов была адаптирована из публикации P.A. Northcott et al., 2012 и включала 23 анализируемых и 3 референсных гена (*ACTB*, *GAPDH*, *LDHA*) [8]. Генами, транскрипты которых специфичны для медуллобластомы подгруппы WNT являются *WIF1*, *TNC*, *GAD1*, *DKK2*, *EMX2*; подгруппы SHH — *PDLIM3*, *EYA1*, *HHIP*, *ATOH1*, *SFRP1*; подгруппы 3 — *IMPG2*, *GABRA5*, *EYS*, *NRL*, *MAB21L2*, *NPR3*, *MYC*; подгруппы 4 — *KHDRBS2*, *KCNA1*, *EOMES*, *RBM24*, *UNC5D*, *OAS1*. Обработка и анализ результатов сканирования осуществлялась с помощью программного обеспечения nSolver 3.0 (NanoString, США).

С целью валидации диагностических возможностей метода NanoString была сформирована тестовая когорта, состоящая из 7 пациентов (WNT — 1, SHH — 4, подгруппа 3 — 2 пациента), у которых принадлежность к молекулярно-генетический подгруппе медуллобластомы была определена на основании иссле-

дования профиля метилирования ДНК, а также ряда второстепенных маркеров: наличия мутации в экзоне 3 гена *CTNNB1* и сочетания десмопластического гистологического строения опухоли с ранним возрастом пациента.

Результаты

Количество РНК, выделенной из фиксированной ткани опухоли, значительно различалось между образцами и находилось в диапазоне от 675,0 нг до 23,3 мкг (медиана 3,7 мкг). Она была представлена в основном короткоцепочечными фрагментами длиной 100 нуклеотидов, рибосомальные пики не визуализировались ни в одном случае, а показатель целостности РНК (RIN) находился в диапазоне от 1,2 до 2,6 (медиана 2,2). Типичная электрофореграмма образца РНК, выделенной из ткани опухоли, фиксированной в формалине и залитой в парафиновый блок, представлена на рис. 1.

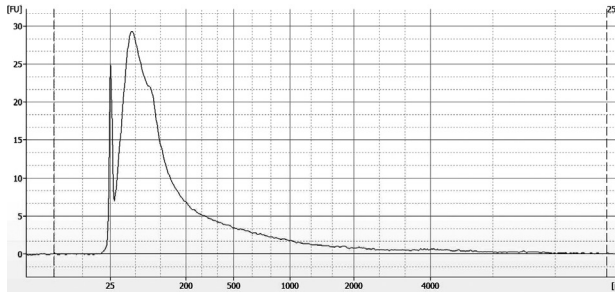


Рисунок 1. Электрофореграмма образца РНК, выделенной из ткани опухоли, фиксированной в формалине и залитой в парафиновый блок. Показатель целостности РНК (RIN) — 2,5

Распределение образцов медуллобластомы на молекулярно-генетические подгруппы в тестовой когорте полностью соответствовало результатам проведенной ранее классификации, что подтвердило диагностические возможности метода NanoString.

Величины нормализованной экспрессии генов были подвергнуты агломеративной иерархической кластеризации, которая позволила выделить четыре неперекрывающиеся группы пациентов, в которых экспрессия генов, специфичных для со-

ответствующей молекулярно-генетической подгруппы медуллобластомы была наивысшей (рис. 2). Таким образом, анализ экспрессии 23 генов с помощью технологии NanoString позволил однозначно классифицировать образцы медуллобластомы на молекулярно-генетические подгруппы WNT, SHH, 3 и 4.

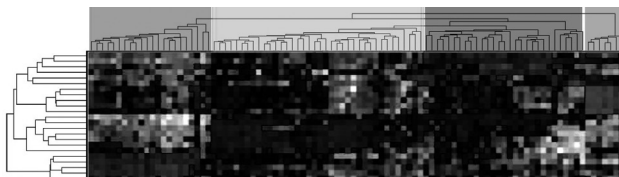


Рисунок 2. Иерархическая агломеративная кластеризация нормализованных величин экспрессии генов позволяет разделить образцы медуллобластомы на молекулярно-генетические подгруппы WNT (синий кластер), SHH (красный кластер), подгруппа 3 (желтый кластер) и подгруппа 4 (зеленый кластер)

В результате проведенного исследования образцы ткани опухоли пациентов с медуллобластомой были классифицированы следующим образом: подгруппа WNT — 8 больных, подгруппа SHH — 15, подгруппа 3 — 16 и подгруппа 4 — 26.

Подгруппа медуллобластомы WNT была определена у 8 пациентов. Средний возраст на момент постановки диагноза составил 10 лет. Только у одного пациента в дебюте заболевания определялось метастатическое поражение ЦНС. Также у одного пациента выявлялась остаточная опухоль после проведенной операции. У большинства пациентов ($n=7$) был определен классический гистологический вариант опухоли, у 1 — десмопластический.

7 пациентов в данной группе живы, 1 ребенок погиб от локального рецидива опухоли.

Опухоль, относящаяся к подгруппе SHH, была обнаружена у 15 пациентов. Средний возраст пациентов на момент постановки диагноза составил 3 года. Основным гистологическим вариантом МБ в данной подгруппе был нодулярно-десмопластический ($n=12$), однако у 2 пациентов была верифицирована классическая медуллобластома, а у одного пациента — анапластическая.

Метастатическое распространение заболевания определялось у трех пациентов. Неблагоприятные события были отмечены у 6 пациентов, при этом в 5 случаях они были связаны с прогрессирующей основной болезнью.

Единственным событием в группе детей до 3 лет была смерть, связанная с токсическими осложнениями терапии. У детей в возрасте старше 3 лет отмечались неблагоприятные события, связанные с заболеванием (прогрессии и рецидивы опухоли).

Опухоли молекулярно-генетической подгруппы 3 были выявлены у 16 пациентов в исследуемой когорте. Средний возраст на момент постановки диагноза составил 4,9 лет. Более чем у половины пациентов (n=9) в дебюте заболевания определялось метастатическое распространение опухоли, а также значительная доля (n=6) неблагоприятных гистологических вариантов (анапластический вариант и классическая медуллобластома с очагами анаплазии). У 2 пациентов была выявлена десмопластическая медуллобластома. Рецидивы и прогрессирование опухоли отмечались у 9 пациентов, при этом у всех детей младшего возраста (менее 4 лет) было зафиксировано рефрактерное течение болезни.

Наиболее многочисленной (n=26) в настоящем исследовании оказалась подгруппа 4. Средний возраст пациентов в данной подгруппе составил 7 лет. Основным гистологическим вариантом был классический тип медуллобластомы (n=20), десмопластический вариант был определен в 6 случаях. Неблагоприятные события, представленные тремя случаями прогрессии заболевания и одним случаем рецидива, были зарегистрированы только у тех пациентов, которые изначально имели метастатическое распространение опухоли (M+ стадию).

Обсуждение

Гетерогенность внутри одного типа опухолей, выявляемая на молекулярном уровне, определяет неодинаковое клиническое течение заболевания, разную вероятность развития рецидива и лежит в основе современных схем стратификации больных на группы риска. Использование данных молекулярной диагно-

стики в клинике предполагает своевременное проведение исследований, отвечающих высоким требованиям достоверности. Это подразумевает получение качественных и репрезентативных образцов на преаналитическом этапе исследования, а также стандартизованной, надёжной и воспроизводимой методики анализа. Немаловажным критерием является скорость и трудоемкость обработки полученных результатов исследования и формирование клинического заключения.

Определение молекулярно-генетических подгрупп медуллобластом осуществляется двумя основными группами методов: исследованием профиля экспрессии генов или метилирования ДНК на уровне генома. Особенности логистики образцов и сложности стандартизации преаналитического этапа в условиях мультицентрового взаимодействия делают использование свежезамороженной ткани опухоли чрезвычайно затруднительным, что практически исключает применение биологических чипов высокой плотности для анализа профиля экспрессии генов, требующих РНК высокого качества. В связи с этим ткань опухоли, фиксированная в формалине и залитая в парафиновый блок, является оптимальным исследуемым материалом, позволяющим одновременно проводить и морфологические, и молекулярно-генетические исследования. В то же время, ДНК, выделенная из фиксированной ткани, пригодна для анализа профиля метилирования ДНК, позволяющего достоверно разделить образцы медуллобластомы на подгруппы. Однако, недостатками метода являются трудоемкость и значительная продолжительность обработки данных, а также высокая стоимость исследования.

Анализ экспрессии генов с помощью технологии NanoString позволяет с относительно небольшими трудозатратами использовать высокофрагментированную РНК, выделенную из фиксированной ткани, для получения достоверных результатов. При этом, программное обеспечение дает возможность быстрого проведения анализа врачу, не имеющему подготовки в сфере биоинформатики. Все вышеперечисленное делает данную платформу оптимальной для использования в клинике, что было подтверждено при создании стандартизованной системы клас-

сификации образцов рака молочной железы с использованием панели PAM50 [14].

В настоящем исследовании диагностические возможности технологии NanoString для классификации образцов медуллобластомы на молекулярно-генетические подгруппы были подтверждены. Метод продемонстрировал возможность получения надежной и клинически значимой диагностической информации.

Выводы

Технология NanoString позволяет надежно дифференцировать образцы медуллобластомы различных молекулярно-генетических подгрупп. Метод применим для анализа фрагментированной РНК, выделенной из фиксированной ткани, и отличается высокой скоростью получения и анализа данных. Разделение медуллобластомы на молекулярно-генетические подгруппы клинически значимо, дает возможность прогнозировать вероятность рецидива или прогрессии заболевания. Прогностическая значимость данных маркеров нуждается в валидации в рамках проспективных клинических исследований, но, несомненно, данная классификация будет являться основой для стратификации пациентов на группы риска в будущих терапевтических протоколах.

Благодарность

Авторы выражают глубокую благодарность благотворительному фонду «Подари жизнь» за финансовую поддержку исследования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Coluccia D., Figueredo C., Isik S., Smith C., Rutka J.T. Medulloblastoma: Tumor Biology and Relevance to Treatment and Prognosis Paradigm. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2016;16(5):43-54.
2. Taylor M.D., Northcott P.A., Korshunov A., Remke M., Cho Y.J., Clifford S.C. et al. Molecular subgroups of medulloblastoma: the current consensus. *Acta Neuropathol.* 2012;123(4):465-472.

3. Louis D.N., Perry A., Reifenberger G., von Deimling A., Figarella-Branger D., Cavenee W.K. et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol.* 2016;131(6):803-820.

4. Northcott P.A., Korshunov A., Pfister S.M., Taylor M.D. The clinical implications of medulloblastoma subgroups. *Nat Rev Neurol.* 2012;8(6):340-351.

5. Pietsch T., Schmidt R., Remke M., Korshunov A., Hovestadt V., Jones D.T. et al. Prognostic significance of clinical, histopathological, and molecular characteristics of medulloblastomas in the prospective HIT2000 multicenter clinical trial cohort. *Acta Neuropathol.* 2014;128(1):137-149.

6. Northcott P.A., Korshunov A., Witt H., Hielscher T., Eberhart C.G., Mack S. et al. Medulloblastoma comprises four distinct molecular variants. *J Clin Oncol.* 2011;29(11):1408-1414.

7. Hovestadt V., Remke M., Kool M., Pietsch T., Northcott P.A., Fischer R. et al. Robust molecular subgrouping and copy-number profiling of medulloblastoma from small amounts of archival tumour material using high-density DNA methylation arrays. *Acta Neuropathol.* 2013;125(6):913-916.

8. Northcott P.A., Shih D.J., Remke M., Cho Y.J., Kool M., Hawkins C. et al. Rapid, reliable, and reproducible molecular subgrouping of clinical medulloblastoma samples. *Acta Neuropathol.* 2012;123(4):615-626.

9. Geiss G.K., Bumgarner R.E., Birditt B., Dahl T., Dowidar N., Dunaway D.L. et al. Direct multiplexed measurement of gene expression with color-coded probe pairs. *Nature Biotechnology.* 2008;26:317-325.

10. Gajjar A., Bowers D.C., Karajannis M.A., Leary S., Witt H., Gottardo N.G. Pediatric Brain Tumors: Innovative Genomic Information Is Transforming the Diagnostic and Clinical Landscape. *J Clin Oncol.* 2015;33(27):2986-2998.

11. Shih D.J., Northcott P.A., Remke M., Korshunov A., Ramaswamy V., Kool M. et al. Cytogenetic prognostication within medulloblastoma subgroups. *J Clin Oncol.* 2014;32(9):886-896.

12. Pfister S., Remke M., Benner A., Mendrzyk F., Toedt G.,

Felsberg J. et al. Outcome prediction in pediatric medulloblastoma based on DNA copy-number aberrations of chromosomes 6q and 17q and the MYC and MYCN loci. *J Clin Oncol.* 2009;27(10):1627-1636.

13. Цаур Г.А., Друй А.Е., Попов А.М., Семенихина Е.Р., Ригер Т.О., Иванова А.С. и соавт. Возможность использования микроструйных биочипов для оценки качества и количества РНК у пациентов с онкологическими и онкогематологическими заболеваниями. *Вестник Уральской медицинской академической науки.* 2011;4:107-111.

14. Liu M.C., Pitcher B.N., Mardis E.R., Davies S.R., Friedman P.N., Snider J.E. et al. PAM50 gene signatures and breast cancer prognosis with adjuvant anthracycline- and taxane-based chemotherapy: correlative analysis of C9741 (Alliance). *NPJ Breast Cancer.* 2016;2:15023.