

Роль морфо-молекулярной диагностики для выбора лекарственной терапии опухолей головного мозга

М.В. МАЦКО¹, Д.Е. МАЦКО^{1,2}, Е.Н. ИМЯНИТОВ³,
В.Е. ОЛЮШИН¹, А.Ю. УЛИТИН¹, А.Г. ИЕВЛЕВА³

¹ФГБУ РНХИ им. А. Л. Поленова, Санкт-Петербург

²Санкт-Петербургский Государственный университет, Санкт-Петербург

³ФГБУ «НИИ онкологии им. Н. Н. Петрова» МЗ, Санкт-Петербург

В онкологической практике достаточно прочно устоялось правило – лечение назначается пациентам только после морфологической верификации диагноза. Подразумевается, что речь идет о правильном диагнозе, но, как показывает практика, невзирая на внедрение метода иммуногистохимической диагностики, по-прежнему имеет место большое число диагностических, порой принципиальных, ошибок, что связано, прежде всего, с недостаточной квалификацией специалистов в области нейроонкологии вообще и нейроморфологии – в частности.

Адекватный морфологический диагноз дает возможность рекомендовать лечение в соответствии с установленной нозологической единицей: больным со злокачественными глиальными опухолями в первой линии терапии назначать препараты алкильной группы; больным с примитивными нейроэктодермальными опухолями, нейрональными и нейрональноглиальными опухолями – препараты платины; больным с атипическими и анапластическими менингиомами – как препараты алкильной группы, так и антрациклиновые антибиотики и т.д.

Ключевые слова: индивидуализированная терапия; опухоли головного мозга; экспрессия генов.

Спектр цитостатиков для выбора лечения достаточно широк. Химиопрепараты как правило назначаются исходя из ресурсов медицинского учреждения, общего состояния больного, радикальности оперативного вмешательства, объема поражения головного мозга и статистической вероятности получения положительного эффекта. Но и здесь у пациентов с одним и тем же диагнозом при идентичной терапии эта вероятность оказывается разной. Так, например, мы наблюдаем случай глиобластомы (диагноз был поставлен после стереотаксической биопсии, 14 циклов Темозоломида) с безрецидивным периодом более 37 месяцев при средней продолжительности жизни – 12. И другой случай – рецидив глиобластомы после 2 циклов терапии Темозоломидом. Данную ситуацию можно объяснить исключительно разной биологией опухоли при ее одинаковом морфологическом варианте.

Ранее мы детально описали особенности морфологической диагностики опухолей головного мозга в аспекте их индивидуализированного лечения [1]. Вкратце они сводятся к необходимости

сбора анамнеза морфологом для уточнения тех нюансов течения заболевания, которые могут пройти мимо внимания клинициста, но значительно упрощают гистологическую диагностику. Кроме этого было указано, что данные нейровизуализационного комплекса также существенно помогают в морфологической диагностике еще до микроскопического исследования, равно как и интраоперационные данные о характере опухоли. Детали специфики микроскопического исследования, рассмотренные там же, в контексте настоящей работы, вероятно, излишни. Здесь мы лишь еще раз хотели бы обратить внимание читателя на сложность постановки морфологического диагноза «в условиях очевидности», когда, казалось бы, за несомненной микроскопической картиной той или иной опухоли, скрывается совершенно иная нозологическая единица, требующая принципиально другого терапевтического воздействия.

Нередко встречаются случаи своеобразной аггравации диагноза, когда диагностируется злокачественная опухоль, нуждающаяся в до-

статочны интенсивных врачебных назначениях, а на деле, иногда после проведенных нескольких циклов лечения сильнодействующими препаратами, выясняется, что речь идет об абсолютно доброкачественной неоплазме. Примером может служить случай, в котором опухоль, имеющая тенденцию к периваскулярному расположению клеток с формированием псевдорозеток, была вначале расценена как злокачественная эпендимомы (G III), в другом учреждении – как примитивная нейроэктодермальная опухоль (G IV). Проведенное нами иммуногистохимическое исследование определило эпителиальную природу опухоли, обладающую нейроэндокринной активностью и чрезвычайно низкой пролиферативной активностью. Диагноз – аденома гипофиза (G I).

Чаше возникают противоположные ситуации. Хорошо известны трудноинтерпретируемые случаи долгоживущих глиобластом (более 5-7 лет). Обычно это объясняется успехами лечения, но при углубленном анализе материала от таких больных выясняется, что первоначальный диагноз был ошибочным. Так, например, опухоль с классической микроскопической картиной глиобластомы, диагноз которой был подтвержден в том числе и за рубежом, была подвергнута пересмотру при жизни больной через 9 лет (!) после постановки диагноза. При иммуногистохимическом исследовании была выявлена глиальная природа опухоли, но вместе с тем, в крупных достаточно мономорфных клетках было доказано их нейрональное происхождение. При этом опухоль обладала достаточно низкой пролиферативной активностью (экспрессия Ki-67) – в пределах 8-10 %. Диагноз – анапластическая ганглиоглиома.

В этом наблюдении терапия, направленная против глиобластомы, к счастью, вероятно, была эффективной, поскольку рост анапластической ганглиоглиомы осуществляется за счет ее глиального компонента (по сути – анапластической астроцитомы) и, тем самым лечение по поводу глиобластомы воздействовало на ее более доброкачественный аналог – анапластическую астроцитому.

Подобная благоприятная ситуация складывается не всегда. В одном из наблюдений с диагностированной также за рубежом глиобластомой, мелко-кругло-голубоклеточная бластома с обилием псевдорозеток после углубленного анализа с помощью иммуногистохимии оказалась примитивной нейроэктодермальной опухолью, которая, как известно, требует принципиально иного химиотерапевтического воздействия.

Все сказанное свидетельствует о том, что аксиома, базовый принцип общей онкологии, касающийся необходимости предварительной морфологической диагностики до начала какого-либо лечения, в нейроонкологии если и соблюдается, то нередко – формально. Факт получения гистологического заключения «развязывает руки» нейрохирургу для назначения терапии, при этом последний нередко «не нуждается» в помощи специалиста-онколога и не дает себе труда усомниться в достоверности полученного диагноза.

Очевидно, что хотя эта проблема еще не решена, прогресс в области молекулярной биологии уже выдвигает перед врачом новые задачи. В общей онкологии стало понятным, что для правильного или, более того – индивидуализированного лечения, кроме адекватного морфологического диагноза необходимо знание особенностей опухоли на более глубоком уровне. Что касается нейроонкологии, то здесь понимание этого факта происходит с существенной задержкой.

Для персонификации терапии после морфологической диагностики с использованием иммуногистохимии необходимо осуществлять забор опухолевых клеток для молекулярно-генетического анализа и оценки уровня экспрессии ряда генов – TP; beta-tubulinIII; Ercc-1; TOP2A; MGMT и рецепторов роста – VEGFR и PDGFR. Экспрессия мРНК генов определяется методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Последовательности мРНК гена-мишени и гена-рефери (SDHA) амплифицируются с помощью соответствующих праймеров. Для оценки уровня экспрессии вычисляется соотношение относительных количеств копий кДНК гена-мишени и гена-рефери.

Повышенная экспрессия генов репарации ДНК (beta-tubulinIII; Ercc-1; MGMT) позволяет опухолевой клетке восстанавливаться после воздействия цитостатиков, нейтрализуя таким образом терапевтический эффект.

В настоящее время для терапии нейроонкологических больных известно значение только одного предиктивного маркера – гена MGMT (O⁶-метилгуанин-ДНК метилтрансфераза), фермента репарации ДНК после химиолучевого лечения. Исследования проводились у пациентов с глиобластомой, которым назначался темозоломид [7]. Основным механизмом противоопухолевого действия темозоломида является метилирование ДНК (присоединение метильной группы цитостатика к ДНК опухоли) и алкилирование гуанина в позиции O⁶ и N⁷, что приводит

либо к разрыву нити ДНК, либо к образованию дополнительных сшивок между ними. Такие изменения структуры, в конечном счете, приводят к гибели клетки, если поврежденная ДНК своевременно не репарирована путем синтеза аналогичного нормального фрагмента при участии MGMT. Если ген MGMT блокируется путем метилирования CpG области его промотора, то усиливается воздействие цитотоксических факторов, и запускается апоптоз. Таким образом, высокий уровень экспрессии гена MGMT в клетках опухоли сопряжен с резистентностью к терапии темозоломидом и другими алкилирующими препаратами (циклофосфамидом, дакарбазином, препаратами нитрозомочевины), в то время как низкая активность фермента увеличивает вероятность ответа опухоли на лечение. Подобная взаимосвязь установлена для опухолей мозга, меланомы и лимфомы [13, 16, 17].

Сейчас в нейроонкологии предпринимаются серьезные попытки, направленные на выявление предиктивных маркеров противоопухолевой терапии, но они пока находятся на стадии экспериментальных исследований. Реальные результаты получены пока только у больных с общеонкологической патологией.

В нескольких исследованиях была отмечена ассоциация между гиперэкспрессией бета-тубулина класса III и резистентностью опухолей к препаратам, воздействующим на микротрубочки. Подобные клинические результаты хорошо согласуются с лабораторными данными, полученными *in vitro* [11]. Установлено, что увеличенное содержание бета-тубулина класса III в опухолевой ткани негативно сказывается на результатах лечения паклитакселом новообразований яичника и легкого [20, 14, 5]. Сходная закономерность обнаружена для терапии опухолей молочной железы и желудка доцетакселом [23, 6]. В нейроонкологической практике большой популярностью пользуется *vinca* алкалоид – препарат винкристин. В нашем исследовании у больных с разной гистологической верификацией диагноза из 58 больных в 56 случаях наблюдалась гиперэкспрессия бета-тубулина класса III. Вопрос о чувствительности к винкрестину пока остается открытым.

TOP2A является главной молекулярной мишенью антрациклинов, поэтому предположение о предпочтительном ответе именно тех опухолей, патогенез которых предусматривает активацию TOP2A, представляется вполне логичным. Многочисленные исследования в области общей онкологии подтверждают взаимосвязь между амплификацией TOP2A и эффектом при назначении

антрациклинов [12, 22]. Аналогичные наблюдения опубликованы для другого топоизомеразного ингибитора – этопозиды [2]. Значение данной группы препаратов в нейроонкологии весьма велико, так как они являются препаратами выбора в первой линии терапии атипических и анапластических менингиом.

Еще одним весьма важным геном является ERCC1. Механизм действия производных платины связан с нарушением функции нитей ДНК и образованием внутри- и межспиральных сшивок, в результате чего нарушается структура и подавляется синтез ДНК. Ингибирование синтеза РНК происходит в меньшей степени. Основная роль в восстановлении структуры ДНК после повреждающего воздействия платины отводится нуклеотидной эксцизионной репарации (NER: nucleotide excision repair). Ключевым ферментом репарации ДНК является ERCC1. Клинические исследования в общей онкологии демонстрируют взаимосвязь между низким уровнем экспрессии гена ERCC1 и ответом опухоли на цисплатин, карбоплатин или оксалиплатин при злокачественных новообразованиях яичников, пищевода, желудка, толстой кишки, легкого [19]. Определение экспрессии данного гена принципиально важно для лечения примитивных нейроэктодермальных и нейрональноглиальных опухолей, так как препараты платины являются основными в терапии этих неоплазм. На сегодняшний момент эффективность цисплатина, при низком уровне экспрессии гена ERCC1, уже доказана на клеточных линиях глиобластомы.

Гены VEGF и TP являются факторами ангиогенеза, поэтому повышенная экспрессия ассоциирована с неблагоприятным течением заболевания у больных с любой онкологической патологией. Рост неоплазмы до клинически распознаваемых размеров возможен исключительно в том случае, если сами клетки продуцируют факторы неоангиогенеза. В нашем исследовании при доброкачественных опухолях головного мозга мы наблюдаем невысокие (низкая – средняя) экспрессии VEGF и TP, а при их злокачественном перерождении – становятся высокими.

Помимо определения чувствительности новообразования к цитостатической терапии огромное значение имеет прогнозирование побочных эффектов, возникающих в процессе лечения. Сила токсических реакций зачастую в существенной мере зависит от так называемого генетического портрета пациента, т.е. комбинации генных полиморфизмов, опосредующих метаболизм лекарственных средств. Анализ полиморфных вариантов (генотипирование) по-

зволяет индивидуализировать дозировку противоопухолевых препаратов. В практике общих онкологов оправдано определение мутантных аллелей гена TPMT, при которых плохо метаболизируется меркаптопурин, при котором необходимо уменьшать дозу этого препарата в 10-15 раз [3]. Носительство мутантных аллелей гена DPD сопряжено с риском летальных реакций в ответ на введение 5-фторурацила [21, 15]. Для определения лечебной тактики у больных с рецидивом глиобластомы наиболее важным является определение полиморфизма гена UGT1A1. Некоторые варианты этого гена ассоциированы с повышенной чувствительностью к иринотекану. Лабораторный тест, направленный на выявление повышенной чувствительности к иринотекану, влекущей за собой необходимость снижения стартовой дозировки препарата на 20–25 %, уже рекомендован к применению FDA [9, 10].

В последнее время появились публикации о значимости прогностических и предиктивных маркеров в нейроэктодермальных опухолях. К ним относятся: мутация IDH1/2 (изоцитратдегидрогеназа); метилирование промотора MGMT (O⁶-метилгуанин-ДНКметилтрансфераза); делеция 1p19q; мутация P53; экспрессия INA (альфа интернексин) и др. Данные хромосомные aberrации могут встречаться одновременно в одной опухоли. Например, наличие мутации IDH 1/2 и делеции 1p19q ассоциируются с более длительным выживанием, а делеция 1p19q, метилирование промотора MGMT и мутация IDH 1/2 коррелируют с большей скоростью ответа на химиотерапию темозоломидом ($p=0.01$) [8].

IDH – фермент, катализирующий реакцию превращения изолимонной кислоты в кетоглутаровую (с восстановлением НАД) – третья реакция цикла трикарбоновых кислот. Считается, что именно эта реакция лимитирует скорость всего цикла трикарбоновых кислот. Активность этого фермента зависит от присутствия ионов кальция. IDH – один из наиболее распространенных популяционно-генетических маркеров. Является сложным гетерополимером. Мутация IDH 1/2 яв-

ляется важным прогностическим маркером для диффузных G II и G III глиом, а так же вторичных глиобластом, и ассоциируется с лучшим прогнозом у больных. Не является предиктивным маркером.

Делеция 1p19q коррелирует с лучшим прогнозом у пациентов с олигодендроглиомой и другими нейроэктодермальными опухолями при назначении лучевой и химиотерапии. Для роста опухоли – диффузной глиомы G II (без химиотерапии) весьма важным является наличие делеции 1p19q в опухолевой ткани и сверхэкспрессия P53. При отсутствии делеции 1p19q опухоль растет 5,9 мм в год vs 3,4 мм ($p=0,0016$), отсутствие сверхэкспрессии P53 является благоприятным признаком и опухоль растет 4,2 мм в год vs 6,3 мм, когда сверхэкспрессия имеет место быть. Рано или поздно на фоне химиотерапии темозоломидом опухоль все равно начинает расти, но при наличии делеции 1p19q (16,6 vs 58 %; $p=0,0004$) и отсутствии экспрессии P53 (26 vs 68 %; $p=0,003$) рецидивирование происходит с более низкой скоростью [18]. Так же как мутация IDH 1/2 – делеция 1p19q является прогностическим, но не предиктивным маркером.

INA (нейрональный промежуточный филамент альфа интернексин) экспрессируется у большинства глиальных опухолей с делецией 1p19q: у 43 % больных с мутацией IDH 1/2 против 12 % без мутации ($p < 0,0001$). Экспрессируется в 59 % олигодендроглиом G II, в 45 % олигодендроглиом G III, в 15 % олигоастроцитом G II, в 12 % олигоастроцитом G III и в 23 % глиобластом. В глиомах G III экспрессия INA ассоциируется с более длительным безрецидивным периодом и общей выживаемостью. В глиомах G III экспрессия INA ассоциируется с более длительным безрецидивным периодом и общей выживаемостью [4].

На основании всего вышеизложенного становится очевидным, что успехи лекарственной терапии опухолей центральной нервной системы на сегодняшний день в значительной мере (если не полностью) зависят от достижений молекулярной генетики.