

DOI: <https://orcid.org/10.17650/2222-1468-2023-13-3-51-62>

Внутриопухолевая молекулярная гетерогенность астроцитом и олигодендроглиом grade 3 и ее значение в прогнозе заболевания

П.В. Никитин¹, А.Ю. Беляев², Г.Р. Мусина³, Г.Л. Кобяков², И.Н. Пронин², Д.Ю. Усачев²

¹Хьюстонский университет; 4849 Калхун-роуд, Хьюстон 77004, Техас, США;

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

³Медицинский колледж Бэйлора; 1 Бэйлор Плаза, Хьюстон 77030, Техас, США

Контакты: Артем Юрьевич Беляев belyaev@nsi.ru

Введение. Злокачественные опухоли головного мозга, такие как астроцитомы и олигодендроглиомы grade 3 (анapластические астроцитомы и анапластические олигодендроглиомы), характеризуются высокой агрессивностью и представляют собой серьезную клиническую проблему. Данная работа посвящена оценке внутриопухолевой гетерогенности этих новообразований и ее влияния на прогноз заболевания.

Цель исследования – изучение свойств внутриопухолевой гетерогенности, в частности морфологических критериев, таких как некрозы, сосудистая пролиферация, митозы, и мутаций в наиболее значимых для прогрессирования глиом генах в группах астроцитом и олигодендроглиом grade 3, а также анализ прогностической значимости этих показателей.

Материалы и методы. В исследование включены 389 пациентов с *IDH*-мутантными анапластическими астроцитомами и 200 пациентов с анапластическими олигодендроглиомами. Средний индекс мечения Ki-67 для астроцитом составил 12,78 %, для олигодендроглиом – 8,54 %.

Результаты. Наличие сосудистой пролиферации, некроза, более 20 % площади препарата, занятой саркомоподобными участками, а также количество митозов существенно влияли на показатели не только безрецидивной, но и общей выживаемости пациентов. В клинических условиях мутации в промоторе гена *TERT*, амплификация и мутация гена *EGFR*, делеция генов *CDKN2A* и *TP53* оказывали значительное негативное влияние на эти показатели.

Заключение. По результатам single-cell секвенирования РНК выявлены дополнительные факторы прогрессирования рассматриваемых опухолей и повышения их злокачественного потенциала, в том числе наличие саркомоподобных участков, а также мутаций в генах *TERT*, *EGFR*, *CDKN2A* и *TP53*.

Ключевые слова: астроцитом grade 3, олигодендроглиом grade 3, внутриопухолевая гетерогенность, общая выживаемость, безрецидивная выживаемость

Для цитирования: Никитин П.В., Беляев А.Ю., Мусина Г.Р. и др. Внутриопухолевая молекулярная гетерогенность астроцитом и олигодендроглиом grade 3 и ее значение в прогнозе заболевания. Опухоли головы и шеи 2023;13(3):51–62. DOI: <https://orcid.org/10.17650/2222-1468-2023-13-3-51-62>

Intra-tumoral molecular heterogeneity of grade 3 astrocytomas and oligodendrogliomas and its significance in disease prognosis

P. V. Nikitin¹, A. Yu. Belyaev², G. R. Musina³, G. L. Kobayakov², I. N. Pronin², D. Yu. Usachev²

¹University of Houston; 4849 Calhoun Road, Houston 77004, Texas, USA;

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

³Baylor Medical College, 3; 1 Baylor Plaza, Houston 77030, Texas, USA

Contacts: Artem Yuryevich Belyaev belyaev@nsi.ru

Introduction. Malignant brain tumors, such as anaplastic astrocytomas and anaplastic oligodendrogliomas grade 3, are characterized by high aggressiveness and pose a serious clinical problem. This study focuses on assessing intratumoral heterogeneity in anaplastic astrocytomas and anaplastic oligodendrogliomas and its impact on disease prognosis.

Aim. To study characteristics of intratumoral heterogeneity, in particular such morphological criteria as necrosis, vascular proliferation, mitoses, and mutations in the most significant for glioma progression genes in the groups of grade III astrocytomas and oligodendrogliomas, as well as analysis of prognostic significance of these parameters.

Materials and methods. The study included 389 patients with *IDH*-mutant astrocytomas and 200 patients with oligodendrogliomas. The mean Ki-67 labeling index of astrocytomas was 12.78 %, while that of oligodendrogliomas was 8.54 %.

Results. The presence of vascular proliferation, necrosis, of more than 20 % of the area of the specimen occupied by sarcomatous-like areas and the number of mitoses significantly affected not only disease-free survival but also overall survival of patients. In the clinical setting, mutations in the *TERT* promoter gene, amplification and mutation of the *EGFR* gene, deletion of the *CDKN2A* gene, and *TP53* gene had a significant negative impact on recurrence-free and overall survival.

Conclusion. The results of single-cell RNA sequencing showed additional factors, including sarcomatous-like areas, as well as *TERT*, *EGFR*, *CDKN2A* and *TP53* mutations, in the progression of the tumors under consideration and in ensuring an increase in their malignant potential.

Keywords: astrocytoma grade 3, oligodendroglioma grade 3, intra-tumoral heterogeneity, overall survival, progression-free survival

For citation: Nikitin P.V., Belyaev A.Yu., Musina G.R. et al. Intra-tumoral molecular heterogeneity of grade 3 astrocytomas and oligodendrogliomas and its significance in disease prognosis. *Opukholi golovy i shei* = Head and Neck Tumors 2023;13(3):51–62. (In Russ.). DOI: <https://orcid.org/10.17650/2222-1468-2023-13-3-51-62>

Введение

Современное представление о диффузных глиомах в диагностическом аспекте постепенно, с каждой последующей классификацией Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), приводится в соответствие с фундаментальными свойствами новообразований в молекулярно-генетической плоскости, в которой определяющими являются механизмы развития заболевания. Рассматривать данные механизмы можно с различных сторон; ключевым в последнее время становится патогенетический подход, поскольку он позволяет изучать опухоли не просто как отдельные, отграниченные нозологические единицы с некими наборами молекулярных признаков, но и как результат закономерной эволюции новообразования, прошедшего определенные этапы прогрессирования, приобретения новых молекулярных характеристик и соответствующих им функциональных свойств. Подобная трассировка патогенетического пути опухоли от ранних предшественников до полноценных опухолевых клеточных клонов, присутствующих в симптомном новообразовании, позволяет более точно и с большей комплаентностью транслировать достижения в диагностике и лечении опухолей в клиническую практику [1].

Цель исследования — изучение свойств внутриопухолевой гетерогенности, в частности морфологических критериев, таких как некрозы, сосудистая пролиферация, митозы, и мутаций в наиболее значимых для прогрессирования глиом генах в группах астроцитом и олигодендроглиом grade 3 — морфологической, молекулярно-генетической, в том числе в аспекте прогностической значимости этих показателей.

Материалы и методы

В исследование вошли 389 пациентов с анапластическими астроцитомами (АА) и 200 пациентов с ана-

пластическими олигодендроглиомами (АО), прооперированные в Национальном медицинском исследовательском центре нейрохирургии им. Н.Н. Бурденко в 2017–2020 гг. Средний возраст больных АА (179 (46 %) женщин и 210 (54 %) мужчин) составил 40,85 года (от 18 до 75 лет), больных АО (115 (57,5 %) женщин и 85 (42,5 %) мужчин) — 44,4 года (от 19 до 75 лет).

Гистологическое исследование. Подготовка гистологических препаратов проводилась по стандартной схеме [2]. Каждый полученный препарат проходил оценку тремя опытными патологами, компетентными в сфере нейропатологии. Патогистологический диагноз устанавливался в строгом соответствии с диагностическими критериями классификации ВОЗ опухолей центральной нервной системы 2016 г. 4-го пересмотра.

Иммуногистохимическое исследование. Материал парафиновых блоков с фиксированными в нем фрагментами новообразования использовали для изготовления срезов толщиной 3 мкм, далее проводилось иммуногистохимическое исследование с моноклональными антителами против антигена Ki-67 человека (CONFIRM anti-Ki67, Roche-Ventana, США) по ранее описанной методике [3]. Для подсчета индекса мечения (ИМ) Ki-67 применяли стандартную методику — выявление процента клеток с положительной экспрессией рассматриваемого маркера.

Иммунофлуоресцентный анализ. Материал парафиновых блоков с фиксированными в нем фрагментами новообразования использовали для изготовления срезов толщиной 3 мкм. Сначала проводили депарафинирование и регидратирование срезов с помощью их последовательного погружения в ксилол, 100, 95, 70 и 50 % этанол, деионизированную воду. После этого срезы высушивали в термостате при 45 °С. Далее проводили их инкубирование с первичными моноклональными антителами к NMDA-рецепторам глутамата

(Sigma-Aldrich, США) с метками зеленого цвета, разведенными в 1 % растворе PBS, при комнатной температуре в течение 1–2 ч. Затем образцы инкубировали в течение ночи при 4 °C во влажной камере. После этого срезы дважды промывали 1 % раствором PBS-T в течение 10 мин. Далее добавляли флуоресцентную метку конъюгированного вторичного антитела, разведенного в 1 % растворе PBS, и инкубировали при комнатной температуре в течение 1–2 ч. Затем срезы дважды промывали 1 % раствором PBS-T в течение 10 мин и наносили краситель DAPI. После инкубации с красителем слайды промывали 1 раз в течение 5 мин PBS. Далее препараты подвергались конфокальной лазерной сканирующей микроскопии с использованием конфокальной микроскопической системы ApeRio VERSA (Leica, Германия).

Полимеразная цепная реакция. Сначала проводилось выделение тотальной РНК из всех фрагментов новообразования с помощью набора RNeasy FFPE Kit (Qiagen, Германия) согласно рекомендациям производителя. Далее выполнялась полимеразная цепная реакция (ПЦР) по описанной ранее методике [3]. Ген β -актина использовали в качестве внутреннего стандарта, и данные выражали как отношение матричной РНК (мРНК) NMDA-рецепторов глутамата к мРНК β -актина.

Секвенирование. Для проведения полноэкзомного секвенирования ДНК из всей когорты были случайным образом выбраны 208 больных с АА и 122 – с АО. ДНК выделялась из опухолевого материала с помощью DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Германия). Целостность ДНК и размер фрагментов были определены на биоанализаторе (Harvard Bioscience, США). Процедура полноэкзомного секвенирования ДНК проводилась по ранее описанной методике с помощью прибора NextSeq 1000 (Illumina, США) [4]. Также был выполнен анализ покрытия с помощью пакета R bioconductor TEQC, который вычисляет соотношение считываний с целевыми и нецелевыми значениями, покрытие на целевую область, а также среднее покрытие на образец. Графики изменения числа копий созданы с помощью пакета R bioconductor seqCNA.

Single-cell секвенирование. Для реализации преданалитических стадий применяли приведенный выше протокол секвенирования. Количественно выраженность экспрессии определяли по формуле:

$$E_{i,j} = \log^2 \left(\frac{\text{TPM}_{i,j}}{10} + 1 \right),$$

где $\text{TPM}_{i,j}$ относится к количеству транскриптов на миллион для гена i в образце j , рассчитанному с помощью RSEM.

Значения TPM делились на 10, поскольку выявлялась сложность библиотек отдельных клеток порядка 100 000 транскриптов. Для каждой клетки рассчитывались 2 меры качества: количество генов, для которых

было картировано хотя бы одно чтение, и средний уровень экспрессии курируемого списка генов домашнего хозяйства. Затем проводилось консервативное исключение всех клеток с менее чем 2500 обнаруженными генами или со средним уровнем экспрессии генов домашнего хозяйства ниже 2,5 единицы в клетке. Для других клеток рассчитывали совокупную экспрессию каждого гена по формуле:

$$Ea_{(i)} = \log^2 (\text{average} (\text{TPM}_{i,1...n}) + 1).$$

Для остальных клеток и генов выявляли относительную экспрессию с центрированием уровней экспрессии в клетке.

Результаты

Морфологическое исследование анапластических астроцитом

Мутацию в гене *IDH1* (АА *IDH*-мут) несли 225 (57,84 %) новообразований астроцитарного ряда, не имели мутаций в генах *IDH1* и *IDH2* (АА *IDH*-дт) 164 (42,16 %) опухоли. Усредненная патогистологическая картина астроцитарных глиом включала в себя диффузно инфильтрирующее новообразование глиальной гистеоархитектоники с повышенной митотической активностью: среднее число митозов в АА *IDH*-мут составило $4,42 \pm 0,80$ на 10 полей зрения при большом увеличении, при этом в АА *IDH*-дт митотическая активность составила $4,48 \pm 0,82$ на 10 полей зрения при большом увеличении. Также наблюдалась отчетливая ядерная атипия, которая выявлена в 82,41 % АА *IDH*-мут и 83,22 % АА *IDH*-дт (рис. 1).

Еще один характерный признак АА – высокая плотность клеточного слоя – выявлен в 76,38 % АА *IDH*-мут и 76,51 % АА *IDH*-дт. Крупные уродливые ядра встречались в 42,21 % АА *IDH*-мут, что было значительно выше по сравнению с АА *IDH*-дт, в которых этот признак наблюдался в 35,57 % случаев ($p = 0,004$). Значительные внутриопухолевые колебания формы ядра – пойкилоцитоз – выявлены в 54,27 % АА *IDH*-мут и 52,34 % АА *IDH*-дт. Маргинация хроматина в ядре определялась в значительном количестве в 36,18 % АА *IDH*-мут, что было ниже чем в АА *IDH*-дт, в которых данная особенность встречалась в 41,16 % случаев ($p = 0,002$). Многоядерные клетки в опухолевой ткани также значительно чаще наблюдались в АА *IDH*-дт по сравнению с АА *IDH*-мут ($p = 0,002$) наравне с патологическими митозами, выявленными в 38,19 % АА *IDH*-мут и 42,95 % АА *IDH*-дт ($p < 0,001$). В то же время в соответствии с патогистологическими критериями диагностики АА ни в АА *IDH*-мут, ни в АА *IDH*-дт не были определены микроваскулярная пролиферация и некротические фрагменты (см. рис. 1).

Дополнительная характеристика ткани образцов с помощью иммуногистохимического анализа

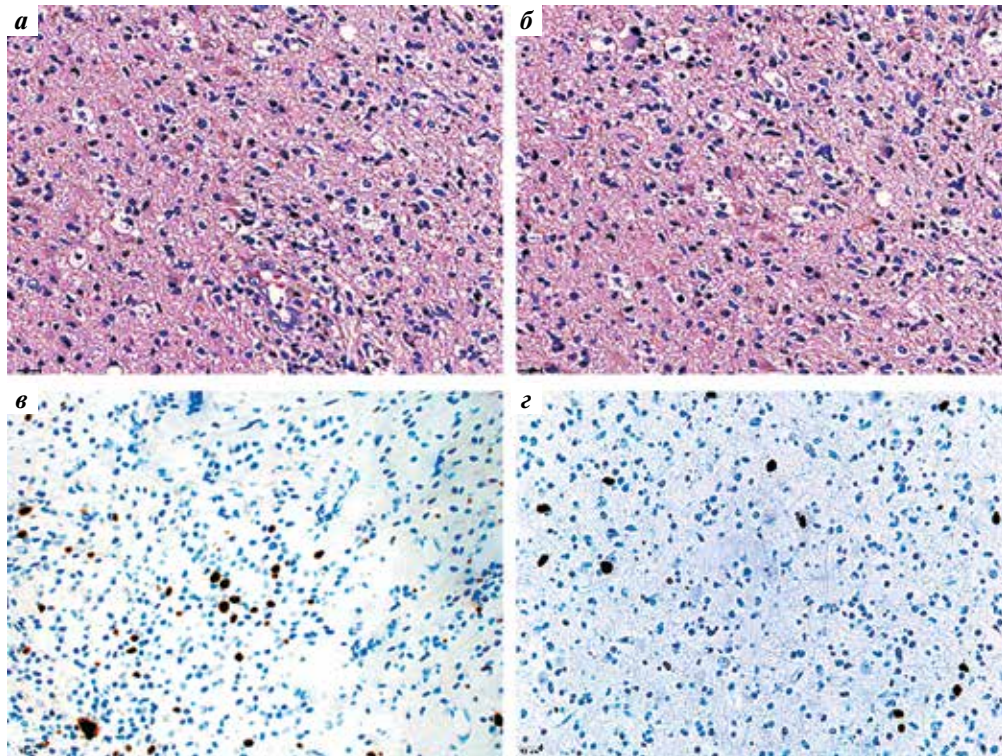


Рис. 1. Классическая гистологическая картина астроцитомы, grade 3: а, б — окраска гематоксилином и эозином, в, з — иммуногистохимическое исследование выраженности экспрессии маркера Ki-67

Fig. 1. Classical histological pathological picture of astrocytoma, grade 3: а, б — hematoxylin and eosin staining; в, з — immunohistochemical study of the expression of the Ki-67 marker

показала, что пролиферативный потенциал АА *IDH*-дт, выраженный в среднем ИМ Ki-67 $12,78 \pm 2,42$ %, был значительно выше пролиферативного потенциала АА *IDH*-мут, в которых ИМ Ki-67 в среднем составил $8,54 \pm 2,48$ % ($p < 0,001$) (см. рис. 1).

С помощью регрессионного анализа было показано, что число митозов и патологических митозов оказывало значимое влияние как на показатели безрецидивной ($p = 0,024$ и $0,028$ соответственно), так и общей выживаемости ($p < 0,001$ для всех типов митозов). Кроме того, ИМ Ki-67 также значительно влиял на эти показатели ($p < 0,001$ для всех типов выживаемости) (рис. 2).

Морфологическое исследование анапластических олигодендроглиом

Мутацию в гене *IDH1* имели 90,48 % АО, в то время как 9,52 % новообразований не несли мутаций в генах *IDH1* и *IDH2*. В большинстве случаев, вошедших в настоящую работу, для АО выявлялась классическая патогистологическая картина, включавшая в себя диффузно инфильтрирующее глиальное новообразование со значительно повышенной плотностью клеточного слоя, которая была характерна для 88,89 % образцов (рис. 3). В массе своей в опухолевых клетках определялись типичные признаки олигодендроглиальной

дифференцировки, в том числе округлые гиперхромные ядра, перинуклеарные светлые ободки цитоплазмы и несколько клеточных отростков. В 84,12 % случаев присутствовали очаговые микрокальцификации.

Наблюдалась заметная пролиферативная митотическая активность: в АО *IDH*-мут она составила $6,48 \pm 1,28$ митоза на 10 полей зрения при большом увеличении, в АО *IDH*-дт данный параметр был достоверно выше и составил $8,48 \pm 1,34$ митоза на 10 полей зрения при большом увеличении ($p < 0,001$). Для некоторой части АО (12,69 % случаев) характерен выраженный клеточный плеоморфизм с наличием многоядерных гигантских клеток. Данная разновидность патогистологической картины получила название полиморфноклеточного варианта Цюльха, при этом рассматриваемый вариант намного чаще наблюдался в АО *IDH*-мут по сравнению с АО *IDH*-дт ($p < 0,001$). Также в 2,12 % случаев встречались саркомоподобные веретеновидные участки, т. е. присутствовали признаки так называемого патогистологического варианта олигосаркомы; все рассматриваемые случаи принадлежали когорте АО *IDH*-дт. Характерный сосудистый рисунок с наличием ветвящихся капилляров довольно отчетливо выявлялся в 64,55 % случаев. Патологическая микровазкулярная пролиферация определена в 56,08 % АО, причем в АО *IDH*-дт рассматриваемый признак

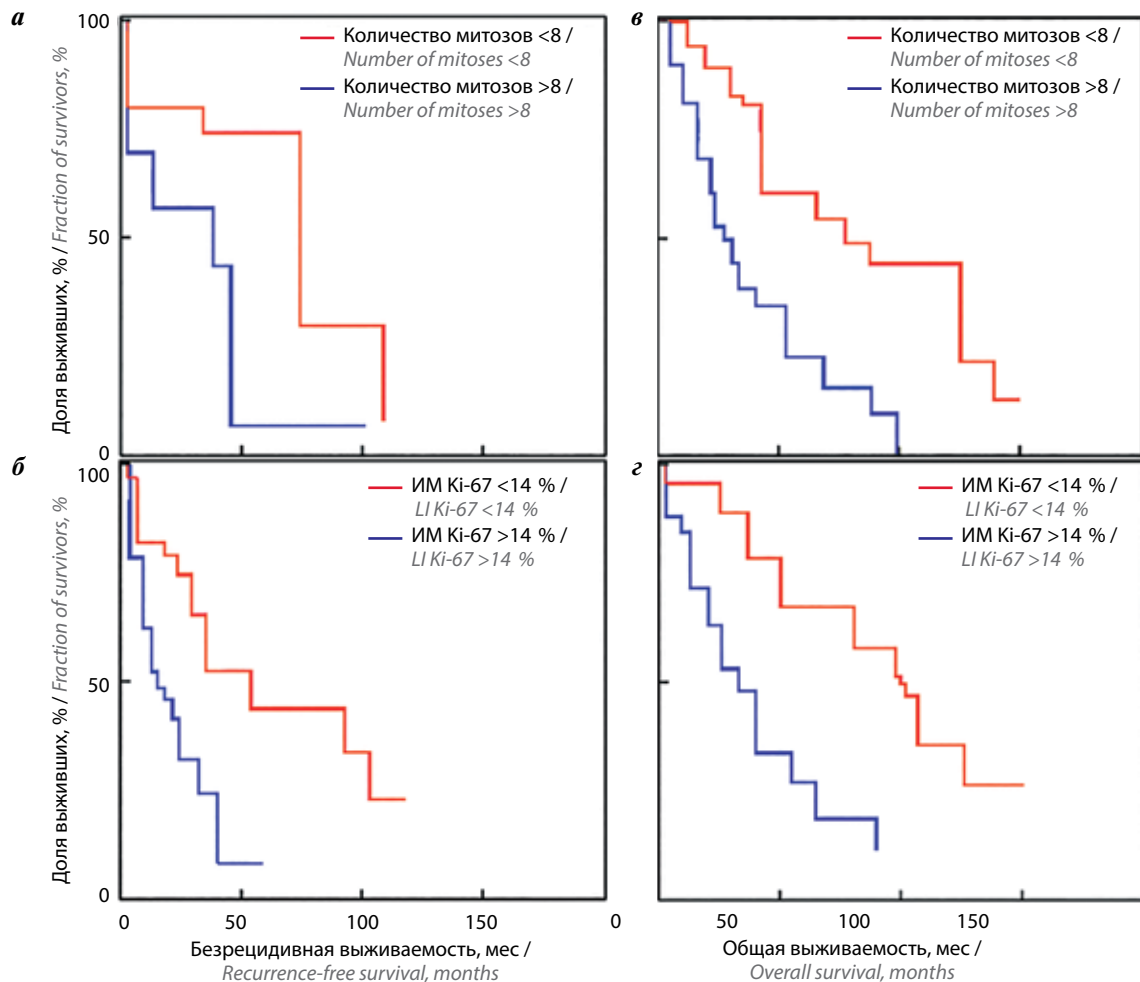


Рис. 2. Безрецидивная выживаемость (а, б) и общая выживаемость (в, г) при диффузных глиомах с различными уровнями митотической активности и выраженности маркера Ki-67. Кривые Каплана–Мейера. ИМ – индекс мечения

Fig. 2. Recurrence-free survival (а, б) and overall survival (в, г) in diffuse gliomas with varying mitotic activity level and Ki-67 proliferation marker. Kaplan–Meier curves; LI – labeling index

встречался намного чаще по сравнению с АО *IDH*-мут ($p < 0,001$). В зонах опухолевой инфильтрации коры в 60,32 % случаев наблюдалось образование вторичных структур в форме перинейронального сателлитоза. Следует заметить, что в 35,09 % АО *IDH*-мут встречались палисадные некрозы, напоминающие таковые при глиобластоме, в то время как в АО *IDH*-дт данный признак встречался намного чаще – в 38,89 % случаев ($p < 0,001$). Наличие заметного астроцитарного патогистологического компонента, включающего не менее 20 % клеточной массы, было характерно для 48,68 % новообразований (рис. 3).

Для более подробного рассмотрения пролиферативного профиля новообразований были проанализированы результаты определения ИМ Ki-67, продемонстрировавшие значимое превосходство АО *IDH*-дт со средним ИМ Ki-67 $14,82 \pm 2,26$ % над АО *IDH*-мут, в которых данный показатель составил $10,44 \pm 2,38$ % ($p < 0,001$).

Согласно результатам регрессионного анализа наличие сосудистой пролиферации, некрозов, более 20 % площади препарата, занятой саркомоподобными участками, и количество митозов значимо влияют на прогноз не только безрецидивной ($p = 0,008$ для саркомоподобных фрагментов, $p < 0,001$ для других показателей), но и общей выживаемости пациентов ($p = 0,006$ для саркомоподобных фрагментов, $p < 0,001$ для других показателей). Также стоит заметить, что ИМ Ki-67 значимо влиял на показатели безрецидивной и общей выживаемости ($p < 0,001$ для всех типов выживаемости) (рис. 4).

Молекулярно-генетическое исследование

Мутационный профиль астроцитом grade 3. В ходе полноэкзомного секвенирования АА выявлены существенные различия мутационного профиля АА *IDH*-мут и АА *IDH*-дт. Самой частой мутацией в АА *IDH*-мут была мутация в гене *ATRX*, которая встречалась в 94,48 % случаев. Далее по частоте выявляемости следовали

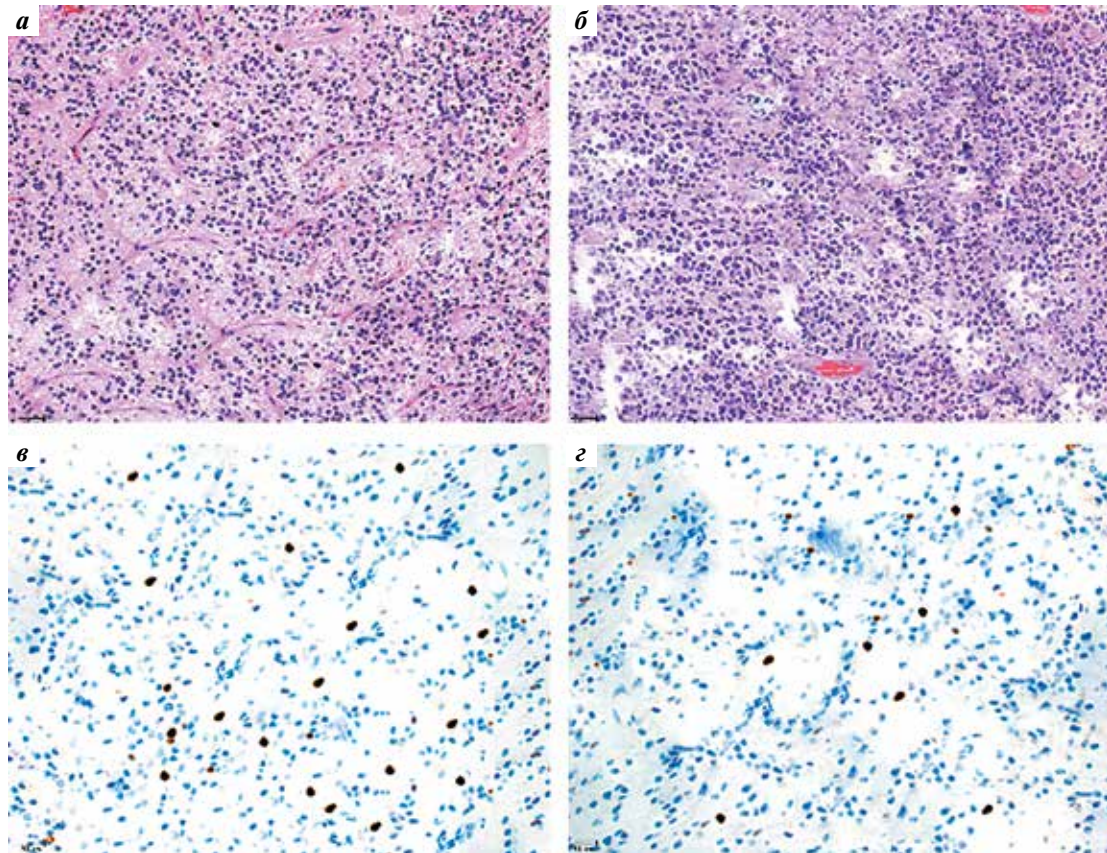


Рис. 3. Классическая гистологическая картина олигодендроглиомы grade 3: а, б — окраска гематоксилином и эозином; в, г — степень выраженности маркера Ki-67

Fig. 3. Classical histological picture of oligodendroglioma grade 3: а, б — stained with hematoxylin and eosin; в, г — the degree of expression of the Ki-67 marker

мутации в гене *TP53*, определяющиеся в 84,72 % случаев. Другие мутационные события были существенно более редкими и включали в себя делеции и мутации гена *CDKN2A* (2,08 % случаев), мутации и амплификации гена *PDGFRA* (2,08 % случаев), мутации промотора генов *TERT* и *PTEN* (1,38 % случаев), а также мутации в генах *EGFR* и *NF1* (0,69 % случаев). Характерно, что в АА *IDH*-дт чаще всего встречались мутация промотора гена *TERT* (80,76 % случаев), амплификации и мутации гена *EGFR* (61,54 % случаев), делеция *CDKN2A* (59,62 % случаев), мутации генов *TP53* (45,19 % случаев) и *PTEN* (32,69 % случаев). Реже наблюдались мутации генов *NF1* (29,81 % случаев), *PDGFRA* (25 % случаев) и *ATRX* (0,96 % случаев). Метилирование промотора гена *MGMT* определялось в 42,31 % АА *IDH*-мут и 55,77 % АА *IDH*-дт.

На показатели безрецидивной выживаемости значимое негативное влияние оказывали мутация промотора гена *TERT* ($p < 0,001$), амплификация и мутация гена *EGFR* ($p < 0,001$), делеция гена *CDKN2A* ($p < 0,001$), а также мутации генов *TP53* ($p = 0,004$) и *NF1* ($p = 0,002$), а на показатели общей выживаемости — мутация промотора гена *TERT* ($p < 0,001$), амплификация и мутация

гена *EGFR* ($p < 0,001$), делеция гена *CDKN2A* ($p = 0,002$) и мутация гена *NF1* ($p = 0,004$) (рис. 5).

Мутационный профиль олигодендроглиом grade 3.

В случае АО мутационный профиль также сильно зависел от наличия *IDH*-мутаций. В группе АО *IDH*-мут коделеция 1p/19q встречалась в 88,89 % случаев, в то время как в группе АО *IDH*-дт — в 11,11 % случаев. В АО *IDH*-мут наиболее часто выявлялась мутация промотора гена *TERT* (94,74 % случаев). Гомозиготная делеция гена *CDKN2A* встречалась в 46,15 % случаев, мутация гена *FUBP1* — в 30,77 %, гена *NOTCH1* — в 26,92 % случаев. Более редко наблюдались мутации генов *PIK3CA* (17,31 % случаев), *PIK3R1* (7,69 % случаев), *TCF12* (5,77 % случаев) и *ARID1A* (3,85 % случаев). При этом метилирование промотора гена *MGMT* выявлялось в 43,68 % АО. Мутационный профиль АО *IDH*-дт характеризовался высокой встречаемостью мутации промотора гена *TERT* (83,33 % случаев), амплификации и мутации гена *EGFR* (77,78 % случаев), делеции гена *CDKN2A* (55,56 % случаев), мутаций генов *TP53* (61,11 % случаев) и *PTEN* (38,89 % случаев). В меньшей части новообразований определялись мутации генов *NF1* (33,33 % случаев), *PDGFRA* (27,78 %

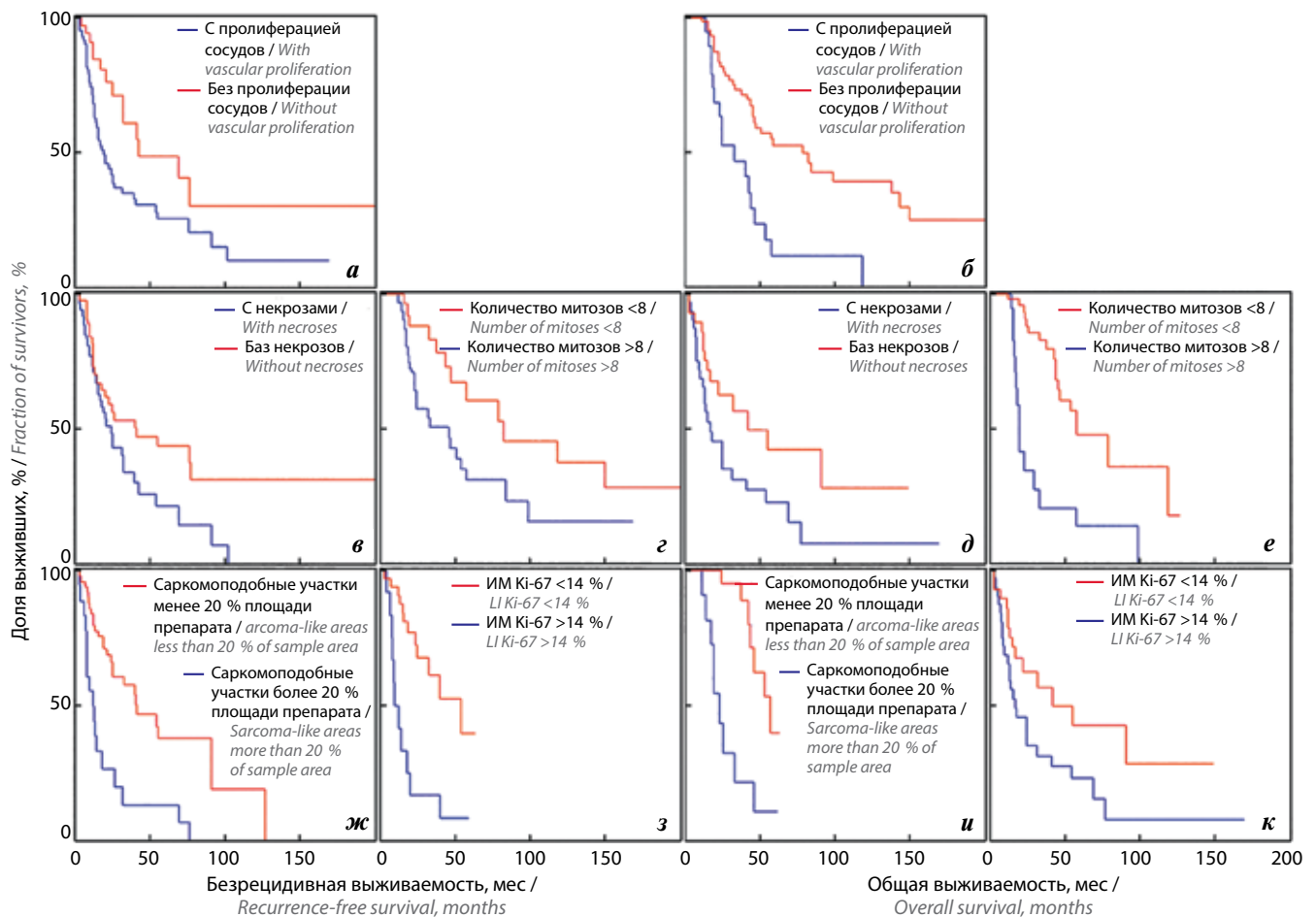


Рис. 4. Безрецидивная (а, в, г, ж, з) и общая (б, д, и, е, к) выживаемость пациентов с анапластическими олигодендроглиомами в зависимости от значимых патогистологических факторов, в том числе пролиферации сосудов (а, б), некрозов (в, г), количества митозов (д, е), наличия саркомоподобных патологических фрагментов (ж, з), пролиферативного маркера Ki-67 (и, к). Кривые Каплана–Мейера

Fig. 4. Recurrence-free (a, в, г, ж, з) and overall (б, д, и, е, к) survival in patients with anaplastic oligodendrogliomas depending on significant pathohistological factors including number of vascular proliferation (a, б), necroses (в, г), number of mitoses (д, е), presence of sarcoma-like pathological fragments (ж, з), Ki-67 proliferative marker (и, к). Kaplan–Meier curves

случаев) и *ATRX* (0,96 % случаев). Метилирование промотора гена *MGMT* наблюдалось в 55,56 % новообразований.

При рассмотрении практических следствий фундаментальных закономерностей выявлено, что на показатели безрецидивной выживаемости значимое негативное влияние оказывали делеция генов *CDKN2A* ($p < 0,001$) и *PIK3CA* ($p = 0,002$), а на показатели общей выживаемости — также *CDKN2A* ($p < 0,001$) и *PIK3CA* ($p = 0,004$) (рис. 6).

Внутриопухолевая гетерогенность

Внутриопухолевая гетерогенность глиом с IDH1- и IDH2-мутациями. Изучен клеточно-популяционный состав AA *IDH*-мут (grade 3) и АО *IDH*-мут (grade 3) с помощью single-cell секвенирования РНК, и проведено сравнение полученных этим методом («Атлас ракового генома», The Cancer Genome Atlas) данных с результатами по диффузным глиомам (*IDH*-мут, grade 2).

Большую часть клеточной массы составили астроцитоподобные (АС-подобные) и олигодендроглиальноподобные (ОРС-подобные) клеточные популяции (в приблизительно равной пропорции), в качестве камбиального пула выступали proneuronal глиомные стволовые клетки (PGSC). При сравнении с диффузными глиомами (*IDH*-мут, grade 2) качественный состав клеточных популяций сохранялся, равно как и количественное соотношение АС-подобных и ОРС-подобных клеточных популяций. Тем не менее количество PGSC значимо возросло в диффузных глиомах *IDH*-мут grade 3 по сравнению с диффузными глиомами *IDH*-мут grade 2 ($p < 0,001$) (рис. 7).

Внутриопухолевая гетерогенность глиом без IDH1- и IDH2-мутаций. При рассмотрении состояния внутриопухолевой гетерогенности AA *IDH*-дт и АО *IDH*-дт выявлено продолжение намеченных ранее тенденций к сохранению паритета АС- и ОРС-подобных клеточных популяций, а также к дальнейшему значимому

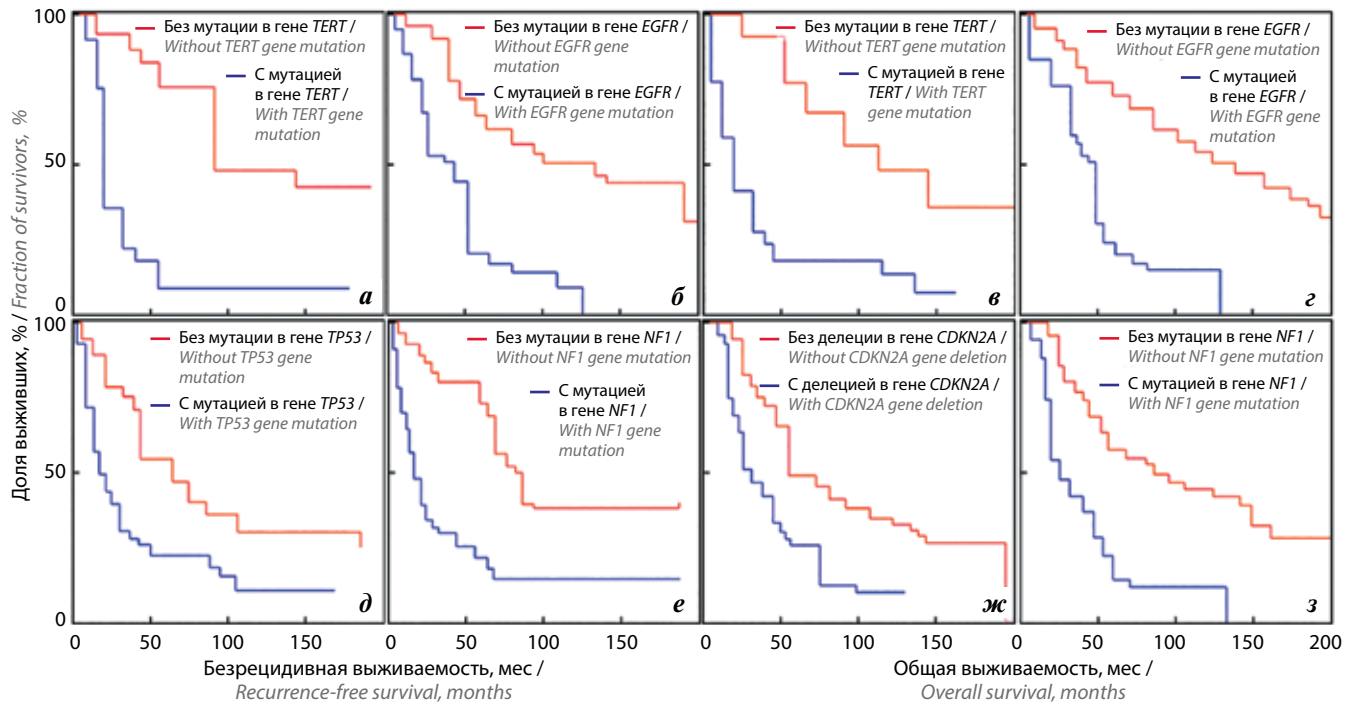


Рис. 5. Безрецидивная (а, б, д, е) и общая (в, г, ж, з) выживаемость пациентов с анапластическими астроцитомами в зависимости от значимых молекулярных факторов, в том числе от мутации гена *TERT* (а, б), амплификации и мутации гена *EGFR* (в, г), мутации генов *TP53* (д), *NF1* (е, ж), делеции гена *CDKN2A* (з). Кривые Каплана–Майера

Fig. 5. Recurrence-free (a, б, д, е) and overall (в, г, ж, з) survival in patients with anaplastic astrocytomas depending on significant molecular factors including *TERT* gene mutations (a, б), *EGFR* gene amplifications and mutations (в, г), *TP53* (д), *NF1* (е, ж) genes' mutations, *CDKN2A* gene deletions (з). Kaplan–Meier curves

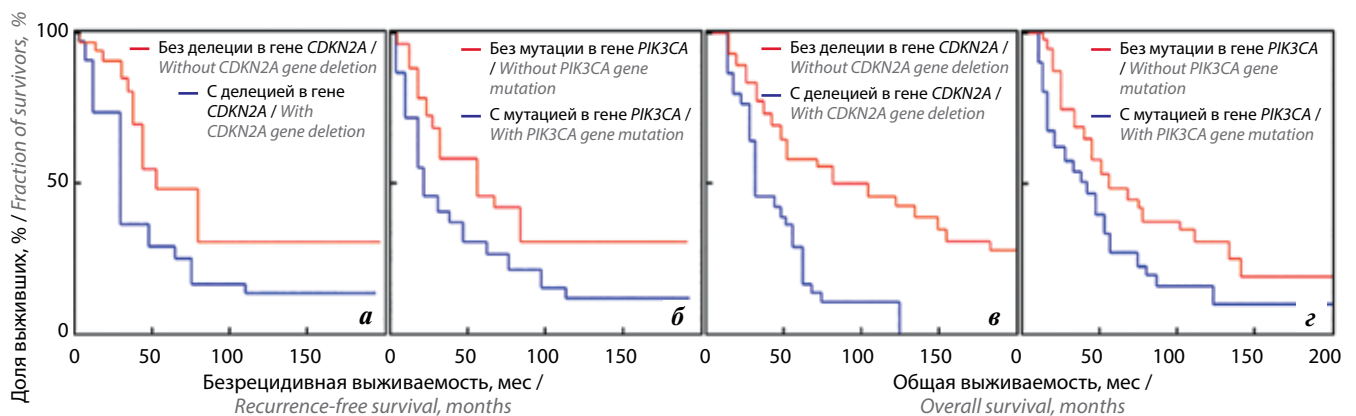


Рис. 6. Безрецидивная (а, б) и общая (в, г) выживаемость пациентов с анапластическими олигодендроглиомами в зависимости от значимых молекулярных факторов, в том числе делеции гена *CDKN2A* (а, б) и мутации гена *PIK3CA* (в, г). Кривые Каплана–Майера

Fig. 6. Recurrence-free (a, б) and overall (в, г) survival in patients with anaplastic oligodendrogliomas depending on significant molecular factors including *CDKN2A* gene deletions (а, б) and *PIK3CA* gene mutations (в, г). Kaplan–Meier curves

увеличению числа PGSC. В то же время в большом количестве стала выявляться принципиально новая клеточная популяция — мезенхимальноподобных (MES-подобных) клеток, ранее в диффузных глиомах *IDH*-мут не наблюдавшаяся. При этом преимущественно определялось наличие клеток подтипа MES2 и лишь небольшое количество клеток подтипа MES1 (рис. 8).

Среднее значение активности экспрессии NMDA-рецепторов в опухолевых образцах составило $53,46 \pm 17,20$ (от 16,24 до 94,24). При сравнении этого показателя в группах *IDH*-положительных и *IDH*-отрицательных АА стало очевидно, что для *IDH*⁺-опухолей значение NMDA достоверно ниже, чем для *IDH*-отрицательных опухолей: $44,49 \pm 15,50$ против $62,42 \pm 13,90$ ($p < 0,001$).

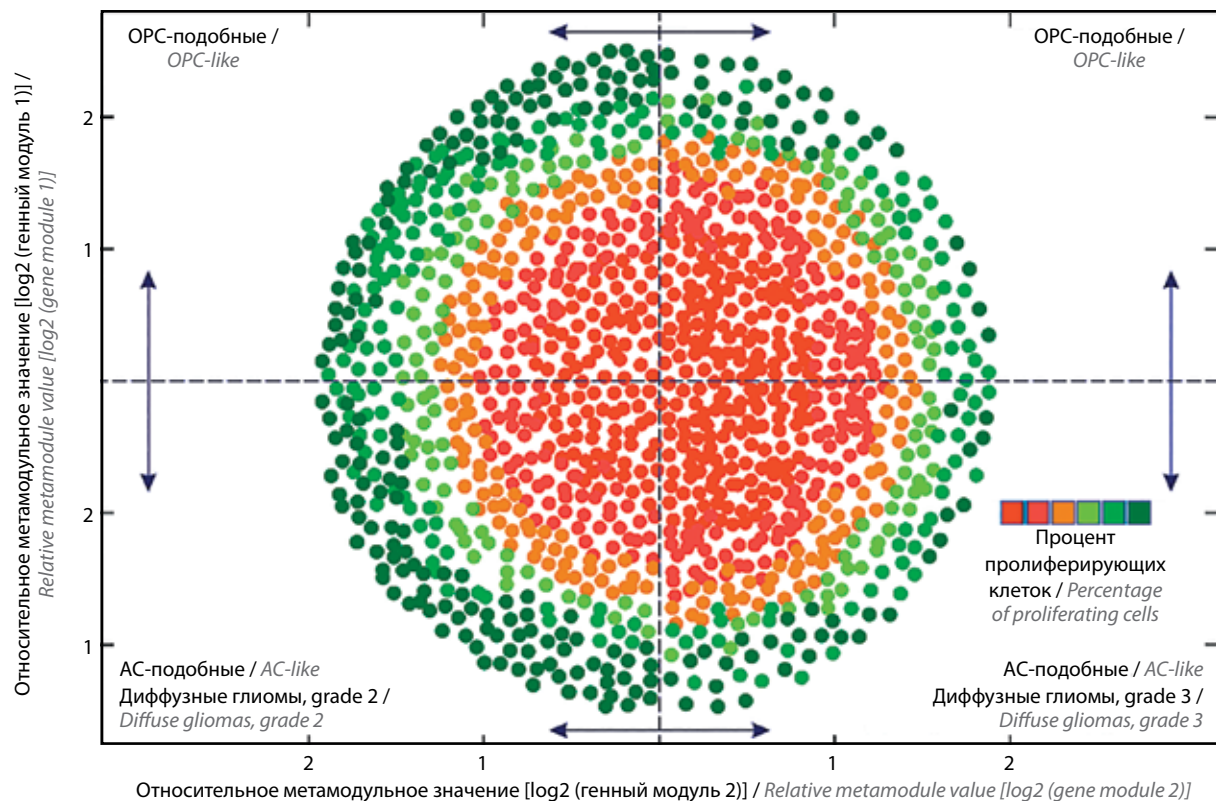


Рис. 7. Результаты single-cell секвенирования РНК астроцитом и олигодендроглиом с мутацией в генах *IDH1* и *IDH2*. На диаграмме каждая точка соответствует одной клетке, цвет точки демонстрирует пролиферативную активность клетки, положение по осям показывает степень дифференцировки клеточных элементов по суммарным молекулярным параметрам в виде относительных метамодульных значений, отражающих выраженность астроцитоподобной (АС-подобной) или олигодендроглиально-подобной (ОПС-подобной) клеточной дифференцировки

Fig. 7. Results of single-cell RNA sequencing of astrocytomas and oligodendrogliomas with mutations in *IDH1* and *IDH2* genes. Each dot on the diagram corresponds to a single cell, the color of the dot demonstrates the proliferative activity of the cell, and the position on the axes indicates the degree of differentiation of the cellular elements based on the overall molecular parameters in the form of relative meta-module values reflecting the expression of astrocyte-like (AC-like) or oligodendroglial-like (OPC-like) cellular differentiation

Распределение мРНК NMDA также было достоверно выше в группе опухолей без мутации *IDH1* (6,81 (6,14–8,46) против 4,54 (3,20–5,43); $p < 0,001$), что вполне ожидаемо.

Анализ зависимости распространенности опухолевого процесса (косвенного показателя объема опухоли) не продемонстрировал взаимосвязи между вовлечением в опухолевый процесс нескольких долей мозга и значением активности экспрессии NMDA в опухолевых клетках: 50,05 (37,79; 62,78) для пациентов с поражением 1 доли против 55,16 (44,62; 68,47) для больных с поражением 2 и более долей ($p = 0,235$).

Корреляционный анализ показал, что взаимосвязь между экспрессией NMDA-рецепторов и значением ИМ Ki-67 была статистически значима ($p = < 0,001$; коэффициент корреляции – 0,8829519). Ожидается, что распределение мРНК NMDA также продемонстрировало статистически достоверную взаимосвязь с ИМ Ki67 ($p < 0,001$; коэффициент корреляции – 0,8133192).

При сравнении показателей общей выживаемости в зависимости от распределения активности экспрессии NMDA-рецепторов, а также интенсивности экспрессии

мРНК этих рецепторов не было выявлено статистически достоверных различий при использовании какого-либо из 3 вышеуказанных тестов ($p = 0,13$). Также не обнаружено взаимосвязи показателей общей выживаемости и наличия *IDH1*-мутации в опухоли ($p = 0,18$). В ходе использования регрессии Кокса выяснилось, что высокий уровень мРНК NMDA-рецепторов является одним из наиболее значимых неблагоприятных предикторов выживаемости (рис. 9).

Любопытно, что экспрессия NMDA-рецепторов (и, соответственно, мРНК NMDA) четко коррелировала с показателями безрецидивной выживаемости, хотя, как сказано выше, не была ассоциирована с показателями общей выживаемости ($p = 0,0333$ по 3 различным тестам). При этом высокий уровень экспрессии NMDA-рецепторов выступал неблагоприятным предиктором, влияющим на риск развития рецидива.

Обсуждение

Полученные результаты представляют определенную фундаментальную и практическую научную ценность. В фундаментальной плоскости впервые подробно

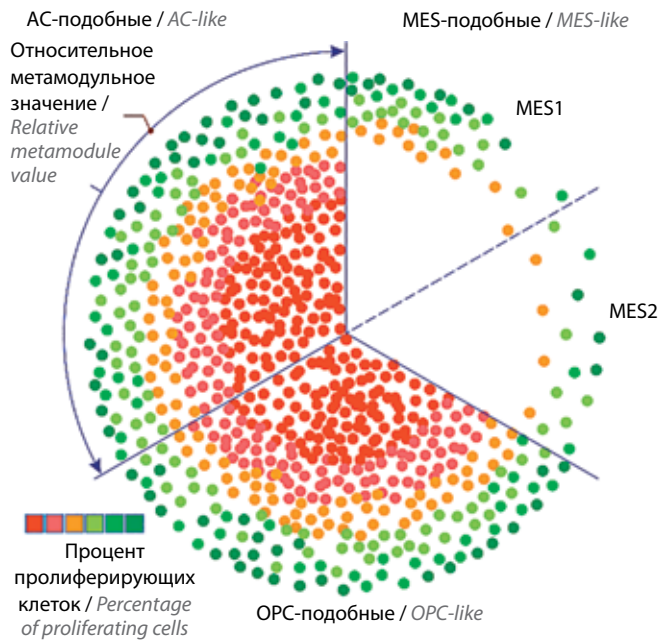


Рис. 8. Результаты single-cell секвенирования РНК астроцитом и олигодендроглиом без мутаций в генах *IDH1* и *IDH2*. На диаграмме каждая точка соответствует одной клетке, цвет точки демонстрирует пролиферативную активность клетки, положение по осям, в том числе дуговым секторальным, показывает степень дифференцировки клеточных элементов по суммарным молекулярным параметрам в виде относительных метамодульных значений, отражающих выраженность астроцитоподобной, олигодендроглиальноподобной или мезенхимальноподобной (MES-подобной) клеточной дифференцировки с подразделением на 2 субтипа клеточных субпопуляций (MES1 и MES2)

Fig. 8. Results of single-cell RNA sequencing of astrocytomas and oligodendrogliomas without mutations in the *IDH1* and *IDH2* genes. Each dot on the diagram represents a single cell, the color of the dot demonstrates the proliferative activity of the cell, and the position on the axes, including the sectorial arc, shows the degree of differentiation of the cellular elements based on the overall molecular parameters in the form of relative meta-module values, reflecting the expression of astrocyte-like, oligodendrocyte-like, or mesenchymal-like (MES-like) cellular differentiation, with division into two subtypes as MES1 and MES2 cellular subpopulations

изучены различия между диффузными глиомами grade 3 астроцитарного и олигодендроглиального гистогенеза. Морфологические данные подтверждают ранее выявленные молекулярные закономерности, в том числе убедительно демонстрируют, что АА *IDH*-мут характеризуются более медленным и менее злокачественным течением по сравнению с АА *IDH*-дт [5]. В частности, наличие большего количества крупных уродливых ядер в АА *IDH*-мут служит признаком дегенеративных изменений, которые являются следствием регионарного регресса новообразования — классической патогенетической проекции относительно медленно растущих опухолей.

В то же время впервые показана значимость такого тонкого морфологического признака, как маргинация хроматина в ядре, зачастую остающегося вне подробного рассмотрения при проведении патогистологического анализа. Было продемонстрировано наличие

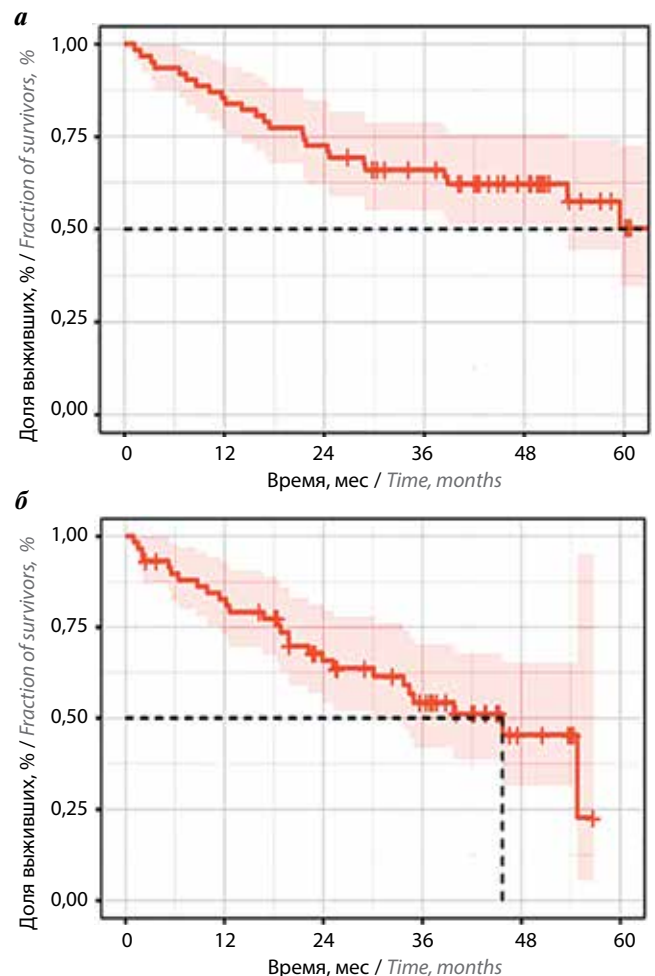


Рис. 9. Кривые Каплана–Мейера, отражающие общую (а) и безрецидивную (б) выживаемость пациентов с анапластическими глиомами в зависимости от активности NMDA-рецепторов глутамата

Fig. 9. Kaplan–Meier curves showing overall (a) and recurrence-free (b) survival of patients with anaplastic gliomas depending on glutamate NMDA receptor activity

фундаментальных различий по данному параметру между двумя принципиальными генетическими типами анапластических глиом, при этом преимущество по степени выраженности оказалось у АА *IDH*-дт, что, вероятнее всего, связано с более высокой активностью продукции РНК и метаболизма опухолевых клеток в данных новообразованиях и служит отражением их злокачественного характера. Более высокий потенциал малигнизации важен и для формирования многоядерных клеток: набирая слишком высокие темпы пролиферации, они успевают разделить лишь ядра, не подвергая демаркации цитоплазму. Морфологически это реализуется в формировании многоядерных клеток, согласно представленным в данной работе результатам, статистически значимо чаще встречающихся в более злокачественных АА *IDH*-дт. Данная закономерность ранее не была изучена и является морфологической новинкой. Та же причина, а именно высокая скорость

клеточного деления, обуславливает и большую частоту встречаемости в АА *IDH*-дт патологических митозов.

Анализ морфологических признаков клеток олигодендроглиом grade 3 также довольно определенно демонстрирует, что между АО *IDH*-мут и нозологически соседствующими им АО *IDH*-дт существует принципиальная разница не только в молекулярной плоскости. Патогистологическое исследование позволяет различить опухоли с мутациями в генах *IDH1* и *IDH2* и без них, но для точной диагностики требуется детальный морфологический анализ. Самым понятным и очевидным различием в данном случае выступает количество митозов, которое выше в АО *IDH*-дт по сравнению с АО *IDH*-мут, что характеризует более злокачественное их течение и более быстрое прогрессирование. В то же время подобно астроцитарным аналогам более доброкачественные АО *IDH*-мут содержат существенно больше полиморфноклеточных фрагментов, что также служит отражением процесса регионарной регрессии. Этого нельзя сказать о фрагментах новообразования с саркомоподобными свойствами, поскольку их присутствие говорит о таком патогенетическом процессе, как метapлазия, служащем проявлением высокой степени внутренней молекулярной пластичности опухоли, позволяющей ей трансформироваться в ткани другого гистогенеза. Это невозможно без глубоких внутренних перестроек генетического аппарата в векторе малигнизации. Хорошо демонстрирует меньший злокачественный потенциал АО *IDH*-мут по сравнению с АО *IDH*-дт, и более низкая выраженность сосудистой пролиферации, которая напрямую связана с важнейшими метаболическими факторами, является краеугольным камнем на путях патогенеза диффузных глиом и выступает принципиальным, а в нозологическом смысле нередко и основным критерием злокачественности процесса [6, 7]. Это можно сказать и о палисадных некрозах, которые характеризуются лишь тем, что находятся на более поздней морфологической стадии того же патогенетического пути.

Полученные в этом исследовании данные по морфологической картине новообразований уникальны и практически не имеют аналогов в мировой литературе. К тому же значимость результатов работы подтверждается тем, что большая часть рассмотренных выше морфологических параметров в определенной степени влияет на показатели выживаемости пациентов. На первый взгляд, этого нельзя сказать о молекулярно-генетических данных, они в целом скорее демонстри-

руют соответствие исследуемой когорты мировому литературному опыту [8, 9]. В данном исследовании на локальной группе пациентов подтверждена современная концепция гисто-молекулярной классификации диффузных глиом. Глиомы без мутаций в генах *IDH1* и *IDH2* близки по свойствам и прогнозу к глиобластомам [9–12]. Однако стройная молекулярная теория начинает претерпевать существенные искажения и в конечном счете обретает новое патогенетическое измерение при изучении данных single-cell секвенирования.

В ходе клеточно-популяционного анализа мы получили данные, соответствующие результатам предшествующих научных работ. При этом была выявлена не описанная ранее особенность опухолей: АА *IDH*-дт и АО *IDH*-дт по своей популяционной структуре не аналогичны глиобластомам. В то же время в соответствии с высказанной ранее концепцией они должны быть как минимум очень близки к глиобластомам по данному параметру. Все дело в том, что, несмотря на схожесть мутационных профилей новообразований, наряду с близостью клинических аспектов в патогенетическом отношении АА *IDH*-дт и АО *IDH*-дт по сравнению с глиобластомами представляют собой отдельные новообразования, для которых характерен свой уникальный патогенетический путь. Дополнительным фактором прогрессирования рассматриваемых новообразований и обеспечения повышения их злокачественного потенциала выступают глутаматэргические рецепторные системы, способствующие распространению глиом в ткани головного мозга. К тому же согласно результатам нашего исследования существенную роль в данном процессе играют NMDA-рецепторы глутамата. В таком случае логично заключить, что для этих новообразований необходим свой собственный не только диагностический, но и лечебный подход, и это непременно должно приниматься в расчет при дальнейшей глубокой персонализации разработок в данной сфере.

Заключение

В ходе исследования были выявлены ключевые различия между диффузными глиомами grade 3 астроцитарного и олигодендроглиального типов. Морфологические данные согласуются с молекулярными данными и подтверждают более медленное и менее агрессивное течение АА с *IDH*-мутацией по сравнению с АА без нее. Эти результаты имеют как фундаментальную, так и практическую значимость.

Л И Т Е Р А Т У Р А / R E F E R E N C E S

1. Louis D.N., Perry A., Reifenberger G., von Deimling A. et al. The 2016 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system: a summary. *Acta Neuropathologica* 2016;131(6):803–20. DOI: 10.1007/s00401-016-1545-1
2. Cardiff R.D., Miller C.H., Munn R.J. Manual hematoxylin and eosin staining of mouse tissue sections. *Cold Spring Harbor Protocols* 2014;2014(6):655–8. DOI: 10.1101/pdb.prot073411
3. Nikitin P.V., Musina G.R., Pekov S.I. et al. Cell-population dynamics in diffuse gliomas during gliomagenesis and its impact on patient survival. *Cancers* 2022;15(1):145–64. DOI: 10.3390/cancers15010145
4. Ravi R.K., Walton K., Khosroheidari M. MiSeq: a next generation sequencing platform for genomic analysis. *Methods Mol Biol* 2018;1706:223–32. DOI: 10.1007/978-1-4939-7471-9_12
5. Ceccarelli M., Barthel F.P., Malta T.M. et al. Molecular profiling reveals biologically discrete subsets and pathways of progression in diffuse glioma. *Cell* 2016;164(3):550–63. DOI: 10.1016/j.cell.2015.12.028
6. Griveau A., Seano G., Shelton S.J. et al. A Glial signature and Wnt7 signaling regulate glioma-vascular interactions and tumor microenvironment. *Cancer Cell* 2018;33(5):874–89.e7. DOI: 10.1016/j.ccell.2018.03.020
7. Venteicher A.S., Tirosh I., Hebert C. et al. Decoupling genetics, lineages, and microenvironment in *IDH*-mutant gliomas by single-cell RNA-seq. *Science* 2017;355(6332):eaai8478. DOI: 10.1126/science.aai8478
8. Inoue S., Li W.Y., Tseng A. et al. Mutant *IDH1* downregulates ATM and alters DNA repair and sensitivity to DNA damage independent of TET2. *Cancer Cell* 2016;30(2):337–48. DOI: 10.1016/j.ccell.2016.05.018
9. Berzero G., Di Stefano A.L., Ronchi S. et al. *IDH*-wildtype lower-grade diffuse gliomas: the importance of histological grade and molecular assessment for prognostic stratification. *Neuro-Oncology* 2021;23(6):955–66. DOI: 10.1093/neuonc/noaa258
10. Shirahata M., Ono T., Stichel Det al. Novel, improved grading system(s) for *IDH*-mutant astrocytic gliomas. *Acta Neuropathologica* 2018;136(1):153–66. DOI: 10.1007/s00401-018-1849-4
11. Galbraith K., Snuderl M. Molecular pathology of gliomas. *Surg Pathol Clin* 2021;14(3):379–86. DOI: 10.1016/j.path.2021.05.003
12. Xu W., Yang X., Hu X., Li S. Fifty-four novel mutations in the *NFI* gene and integrated analyses of the mutations that modulate splicing. *Int J Mol Med* 2014;34(1):53–60. DOI: 10.3892/ijmm.2014.1756

Вклад авторов

П.В. Никитин: разработка дизайна и концепции исследования, получение данных для анализа, анализ полученных данных, написание текста статьи, обзор публикаций по теме статьи;

А.Ю. Беляев: получение данных для анализа, анализ полученных данных, написание текста статьи, обзор публикаций по теме статьи;

Г.Р. Мусина: получение данных для анализа, анализ полученных данных;

Г.Л. Кобяков: разработка дизайна и концепции исследования;

И.Н. Пронин, Д.Ю. Усачев: редактирование.

Authors' contribution

P.V. Nikitin: development of the design and concept of the study, obtaining data for analysis, analysis of the data obtained, article writing, review of publications on the topic of the article;

A.Yu. Belyaev: obtaining data for analysis, analyzing the data obtained, writing the text of the article, reviewing publications on the topic of the article;

G.R. Musina: obtaining data for analysis, analysis of the data obtained;

G.L. Kobaykov: development of design and research concept;

I.N. Pronin, D.Yu. Usachev: editing.

ORCID авторов / ORCID of authors

П.В. Никитин / P.V. Nikitin: <https://orcid.org/0000-0003-3223-4584>

А.Ю. Беляев / A.Yu. Belyaev: <https://orcid.org/0000-0002-2337-6495>

Г.Р. Мусина / G.R. Musina: <https://orcid.org/0000-0002-9962-0909>

Г.Л. Кобяков / G.L. Kobaykov: <https://orcid.org/0000-0002-7651-4214>

И.Н. Пронин / I.N. Pronin: <https://orcid.org/0000-0002-4480-0275>

Д.Ю. Усачев / D.Yu. Usachev: <https://orcid.org/0000-0002-8924-7346>

Конфликт интересов. Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Работа выполнена без спонсорской поддержки.

Funding. The work was performed without external funding.

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики. Протокол исследования одобрен комитетом по биомедицинской этике ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр нейрохирургии им. Н.Н. Бурденко» Минздрава России.

Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Compliance with patient rights and principles of bioethics. The study protocol was approved by the biomedical ethics committee of N.N. Burdenko National Medical Research Center of Neurosurgery, of the Ministry of Health of Russia.

All patients gave written informed consent to participate in the study.

Статья поступила: 10.05.2023. **Принята к публикации:** 17.07.2023.

Article submitted: 10.05.2023. **Accepted for publication:** 17.07.2023.