

Жидкостные биопсии в детской нейроонкологии: в преддверии возможностей тераностики

Д. Назарян¹, А.Е. Друй^{2, 3}, Л.А. Ясько², Л.И. Папуша², Г.А. Новичкова²

¹ Children's National Health System, Вашингтон

² ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, Москва

³ ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий», Екатеринбург

Детская нейроонкология представляет собой одну из наиболее драматичных страниц педиатрии. Трудности ведения пациентов обусловлены расположением опухоли (зачастую вблизи жизненно важных структур центральной нервной системы), быстрым нарастанием неврологических проявлений и отсутствием адекватных методов мониторинга заболевания для ранней диагностики рецидива опухоли. Для контроля статуса опухоли используются методы лучевой диагностики (в первую очередь магнитно-резонансная томография), имеющие ограниченную разрешающую способность и требующие длительной общей анестезии у детей, что затрудняет их частое применение. Использование жидкостных биопсий – выявление молекулярно-биологических маркеров опухоли (в основном циркулирующей опухолевой ДНК) в жидких средах организма (сыворотке или плазме крови, цереброспинальной жидкости, моче) – становится основой для высокоточного мониторинга опухоли, совмещенного с анализом изменения ее биологических свойств в реальном времени. Сегодня жидкостная биопсия – это универсальный неинвазивный (или малоинвазивный), экономически оправданный метод, обладающий высокими показателями чувствительности и специфичности для оценки динамики опухолевого роста, эффективности лечения и мониторинга рецидива. В настоящем обзоре описано использование метода жидкостной биопсии, а также его терапевтический и диагностический (тераностический) потенциалы в детской нейроонкологии.

Ключевые слова: жидкостная биопсия, циркулирующая опухолевая ДНК, детская нейроонкология.

ПЕРЕВОД СТАТЬИ
(стр. 130–132)

Контактная информация:

Друй Александр Евгеньевич, кандидат медицинских наук, врач клинической лабораторной диагностики, старший научный сотрудник лаборатории цитогенетики и молекулярной генетики НМИЦ детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева Минздрава России.

Адрес: 117997, Москва, ГСП-7, ул. Саморы Машела, 1
Тел.: 8 (495) 287-6570, доб. 5427
E-mail: Dr-Druy@yandex.ru

Молекулярная биология. В последние годы значительно улучшилось наше понимание биологии и патологической физиологии опухолей центральной нервной системы (ЦНС) у детей. Это привело к тому, что заболевания, ранее казавшиеся единой нозологической единицей (медуллобластомы [1], эпендимомы [2] и глиомы [3]), были разделены на группы с различными молекулярно-генетическими свойствами. Оказалось, что данное разделение обладает клинической значимостью. Эти открытия привели к созданию Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) новой классификации опухолей ЦНС [4, 5], которая основывается на молекулярных абберациях, характерных для каждого отдельного типа опухолей. Например, вновь введенными классификационными единицами диффузных глиом стали срединные глиомы с мутацией H3K27M, глиобластомы с геном *IDH* дикого типа, глиобластомы с геном *IDH* мутантного типа [6, 7]. Медуллобластомы

подразделяются на основании транскрипционных и геномных аббераций, включающих активацию сигнальных путей WNT, SHH и наличие мутаций в гене *TP53*.

Выявление аббераций, лежащих в основе данных классификаций, создает основу для персонализированной терапии, где воздействие оказывается на молекулярный механизм, нарушенный в результате мутации или группы мутаций, а принятие клинических решений продиктовано биологическими свойствами опухоли. Данная стратегия приходит на смену традиционному подходу к лечению, основанному на морфологическом строении опухоли. Так, все пациенты с глиомами высокой степени злокачественности получают терапию по единой схеме, но различные клинические исследования, которые более 45 лет проводили по этому «традиционному» принципу, так и не привели к разработке эффективной терапии для этих пациентов.

Однако, несмотря на прогресс в понимании молекулярного патогенеза детских опухолей ЦНС, принятие клинических решений продолжает базироваться на данных морфологии и визуализации опухоли или в лучшем случае молекулярного профиля опухоли, полученного в результате анализа биопсийного материала. При этом как нейровизуализация, так и биопсия, оставаясь стандартами диагностики опухолей головного мозга, имеют определенные ограничения. В частности, предел разрешающей способности магнитно-резонансной томографии (МРТ) не позволяет рано выявлять развитие рецидива, не всегда помогает провести дифференциальную диагностику между истинной и псевдопрогрессией; частота проведения исследований с целью мониторинга ограничена в связи с необходимостью длительного наркоза у детей. Открытая биопсия применяется ограниченно или не применяется вовсе у пациентов с рецидивом опухоли (например, при наличии мелкоочаговой диссеминации или лептоменингеального распространения) или при локализации процесса в анатомически сложнодоступной области мозга (например, в области ствола мозга). Таким образом, современной фундаментальной медицине еще предстоит транслировать знания о биологии опухолевого роста в клиническую практику, где молекулярно-генетические aberrации, выявляемые в клетках опухоли, станут основой для принятия терапевтических решений. В настоящем обзоре обсуждаются потенциальные возможности метода жидкостной биопсии в качестве дополнения, а в ряде случаев замены МРТ и стандартной биопсии для оценки динамики опухолевого процесса на разных этапах терапии опухолей ЦНС.

Циркулирующие опухолевые нуклеиновые кислоты. Циркулирующие опухолевые нуклеиновые кислоты (НК) определяются как небольшие (до 120 пар нуклеотидов для ДНК, 100 нуклеотидов для РНК) полинуклеотидные молекулы, детектируемые в биологических жидкостях вне связи с присутствующими в них клеточными элементами. В качестве примера биологических жидкостей, содержащих опухолевые НК, можно рассматривать как компоненты внутренней среды организма (плазму крови, лимфу, цереброспинальную жидкость, серозную жидкость), так и экскретируемые жидкости (мочу, слюну). Вклад в пул свободных опухолевых НК вносят циркулирующие опухолевые клетки, экзосомы – субклеточные частицы, секретируемые опухолевой клеткой и содержащие различные компоненты цитоплазмы и ядра, включая ДНК и РНК, а также клетки первичного и метастатических очагов опухоли, погибающие вследствие апоптоза или некроза (как спонтанного, так и индуцированного терапевтическими воздей-

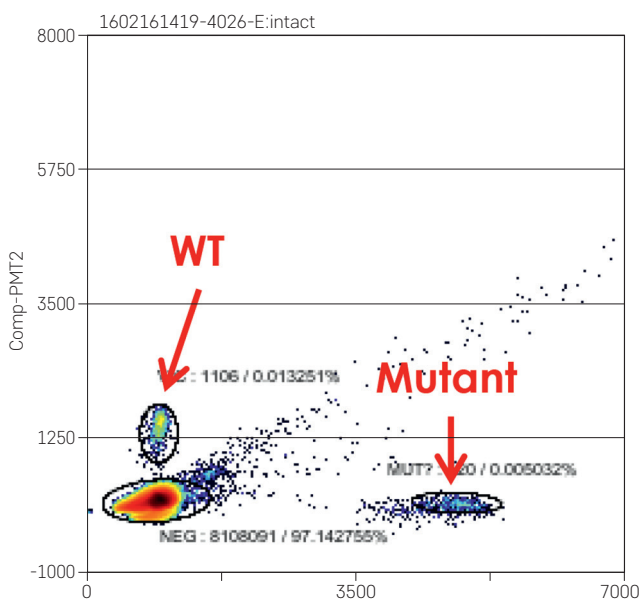
ствиями). При этом, несмотря на относительно высокие, доступные для количественного анализа уровни циркулирующей опухолевой ДНК, выявляемой в наиболее часто анализируемых биологических жидкостях (плазма крови, цереброспинальная жидкость, моча), точный ее источник в каждом конкретном случае до конца не ясен [8]. Более того, доля каждого механизма в образовании свободных НК может быть высокоспецифична для отдельных типов рака. Так, например, высоко васкуляризованные опухоли продуцируют большое количество экзосом, поступающих в кровоток; при опухолях, склонных к раннему метастазированию, присутствует обширный пул циркулирующих опухолевых клеток, а быстрорастущие опухоли высвобождают НК вследствие гибели клеток по причине недостатка кислорода и нутриентов [9]. Необходимы дополнительные исследования, направленные на установление основного источника свободных опухолевых НК и выбор подходящей биологической жидкости для наблюдения за каждым отдельным типом опухоли.

Среди методов детекции свободно циркулирующих НК можно выделить цифровую полимеразную цепную реакцию (ПЦР), отличающуюся высокой чувствительностью и возможностью количественного анализа доли опухолевых НК в общем пуле молекул. Наиболее распространенное технологическое решение цифровой ПЦР – цифровая капельная ПЦР (*ddPCR – digital droplet polymerase chain reaction*), в которой гидрофильная реакционная смесь, содержащая флуоресцентную систему детекции, разбивается на большое количество капель в гидрофобной среде (масле). Таким образом, каждая отдельная капля – это реактор, в котором происходит индивидуальная ПЦР в оптимальном варианте с одной молекулой ДНК-матрицы [10]. Это снижает влияние ингибиторов реакции, а детекция флуоресценции капель после ПЦР с помощью проточной системы позволяет выявлять единичные позитивные события, добиваясь беспрецедентной чувствительности метода. Другие методы выявления свободно циркулирующей опухолевой ДНК (количественная ПЦР в режиме реального времени, секвенирование методом Сэнгера или высокопроизводительное секвенирование) уступают цифровой ПЦР в аналитической чувствительности, кроме того, стандартное секвенирование не позволяет количественно оценивать долю мутантного аллеля в образце [11, 12].

Исследование свободно циркулирующих опухолевых НК в детской нейроонкологии. Несмотря на обилие данных о выявлении и идентификации в качестве биологических маркеров свободно циркулирующих опухолевых ДНК и РНК при различных злокачественных опухолях «взрослых» типов, их

Рисунок

Метод цифровой капельной ПЦР для анализа свободно циркулирующей ДНК, выделенной из плазмы пациентов с диффузной глиомой ствола (мутация K27M)



диагностический потенциал при опухолях ЦНС у детей остается относительно малоизученной областью [13–18]. Недавнее исследование *Saratsis et al.* продемонстрировало возможность выявления мутации в гене *H3F3A* (гистон 3) H3K27M в цереброспинальной жидкости больных диффузными глиомами ствола головного мозга [11]. Развитие метода жидкостных биопсий при опухолях ЦНС обеспечит проведение диагностики с минимальными вмешательствами или совсем без них за счет использования плазмы крови или мочи в качестве жидких сред, а также расширение спектра выявляемых мутаций путем эффективного мультиплексирования и совершенствования технологии ddPCR с целью выявления драйверных мутаций и потенциальных мишеней для таргетного воздействия [19]. Собственные неопубликованные данные доказывают эффективность определения мутантного варианта гена *H3FA3* как в плазме крови, так и в цереброспинальной жидкости пациентов с диффузными глиомами ствола (рис.). При этом концентрация опухолевой ДНК (несущей мутантный аллель гена) в ликворе была многократно выше, чем в плазме, однако ее обнаружение в достаточном количестве в периферической циркуляции доказывает возможность проникновения молекул опухолевой НК через гематоэнцефалический барьер и возможность использования крови для мониторинга опухоли, добываясь меньшей инвазивности процедуры.

Тераностический потенциал жидкостных биопсий. Тераностика – молодая область медицины, которая подразумевает как проведение диагностических исследований, так и осуществление

терапевтических интервенций на единой методологической платформе [20–22]. Жидкостная биопсия в данном ключе может рассматриваться как основа для персонифицированного лечения и одновременно как высокочувствительный инструмент ранней диагностики рецидива, прогрессии опухоли или изменения ее биологических свойств. Таким образом, данная технология открывает перспективы развития тераностики в детской онкологии. Такой подход может быть полезен у пациентов со срединными глиомами или опухолями ствола головного мозга, когда хирургия сопряжена с высоким риском и рутинно не применяется, или у больных с агрессивными эмбриональными опухолями, когда вероятность развития рецидива высока и раннее его обнаружение принципиально важно. Вероятно, в будущем применение жидкостной биопсии с целью диагностики рецидива или прогрессии опухоли позволит преодолеть ограничения метода МРТ и получать быструю и точную информацию о состоянии опухоли с минимальными затратами.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Надежная диагностика, эффективная терапия и мониторинг ответа опухоли на проводимое лечение – ключевые составляющие успеха в борьбе с опухолями ЦНС у детей. Современные общепринятые диагностические методы – открытая биопсия и МРТ – имеют ряд ограничений, которые диктуют необходимость совершенствования подходов к изучению опухоли. Один из возможных путей – жидкостная биопсия – многообещающее направление, которое позволяет достоверно оценить биологию опухоли, ее ответ на проводимые вмешательства, а также вовремя выявить развитие рецидива или прогрессии. Мы предполагаем, что данная технология должна стать рутинной в детской онкологии.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Не указан.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ORCID

А.Е. Друй <http://orcid.org/0000-0003-1308-8622>

Л.А. Ясько <http://orcid.org/0000-0003-3007-3772>

Л.И. Папуша <http://orcid.org/0000-0001-7750-5216>

Г.А. Новичкова <http://orcid.org/0000-0002-2322-5734>