

Мутации изоцитратдегидрогеназ 1 и 2 и метилирование гена *MGMT* в глиомах

Д.В. Табаков¹, А.Н. Катаргин², А.М. Строганова¹, А.И. Сендерович¹, Д.Р. Насхлеташвили¹, Н.П. Киселева²

¹НИИ клинической онкологии ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 23;

²НИИ канцерогенеза ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Наталия Петровна Киселева natalia-kis@yandex.ru

Глиомы – наиболее распространенные опухоли головного мозга, трудно поддающиеся ранней диагностике и лечению. Мутации в генах изоцитратдегидрогеназ 1 и 2 (*IDH1* и *IDH2*) играют существенную роль в глиомогенезе, диагностике и выборе терапии пациентов. Было исследовано распределение мутаций *IDH1/2* в глиомах различных гистологических типов и степеней злокачественности методом анализа кривых плавления ДНК с зондами TaqMap по разработанному нами протоколу, позволяющему определять мутации с чувствительностью 5 %. Специфичность определения мутаций подтверждена секвенированием по Сэнгеру. В глиомах II и III степеней злокачественности по классификации Всемирной организации здравоохранения частота мутаций *IDH1/2* составила 74 %, в глиобластомах (IV степень злокачественности) – 14 %. Глиомы, содержащие клетки с олигодендроцитарным типом дифференцировки, достоверно чаще имели мутации *IDH1/2*, чем другие типы глиом ($p = 0,014$). Преобладающим типом мутаций являются мутации *IDH1* (79 % от общего числа мутаций). Одно из последствий мутаций *IDH1/2* – индукция aberrантного метилирования генов. Анализ метилирования промотора гена *O6*-метилгуанин-ДНК-метилтрансферазы (*MGMT*, *O6-methylguanine-DNA-methyltransferase*), предсказательного маркера чувствительности глиом к терапии алкилирующими агентами у тех же больных, показал частичную ассоциацию с мутациями *IDH1/2*. В 73 % случаев с мутациями *IDH1/2* наблюдалось метилирование *MGMT*. В то же время в 67 % случаев с метилированием *MGMT* отсутствовали мутации *IDH1/2*, что указывает на существование других механизмов метилирования *MGMT* в глиомах. Данные свидетельствуют в пользу необходимости одновременного определения 2 биомаркеров при выборе послеоперационной терапии пациентов.

Ключевые слова: глиома, мутации *IDH1* и *IDH2*, метилирование *MGMT*, плавление ДНК

DOI: 10.17650/2313-805X-2017-4-1-53-59

Isocitrate dehydrogenase 1 and 2 genes mutations and *MGMT* methylation in gliomas

D.V. Tabakov¹, A.N. Katargin², A.M. Stroganova¹, A.I. Senderovich¹, D.R. Naskhletashvili¹, N.P. Kiseljova²

¹Research Institute of Clinical Oncology, N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia; 23 Kashirskoye Shosse, Moscow 115478, Russia;

²Research Institute of Carcinogenesis, N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoye Shosse, Moscow 115478, Russia

Gliomas are the most common brain tumors. It is difficult to detect them at early stages of disease and there is a few available therapies providing significant improvement in survival. Mutations of isocitrate dehydrogenase 1 and 2 genes (*IDH1* and *IDH2*) play significant role in gliomogenesis, diagnostics and selection of patient therapy. We tested the distribution of *IDH1* and *IDH2* mutations in gliomas of different histological types and grades of malignancy by DNA melting analysis using our protocol with a sensitivity of 5 %. The results of this assay were confirmed by conventional Sanger sequencing. *IDH1/2* mutations were detected in 74 % of lower grade gliomas (II and III, World Health Organization) and in 14 % of glioblastomas (IV, World Health Organization). Mutation rate in gliomas with oligodendroglioma component were significantly higher than in other glioma types ($p = 0.014$). The *IDH1* mutations was the most common (79 % of general mutation number). *IDH1/2* mutations can induce aberrant gene methylation. Detection of methylation rate of the gene encoding for *O6*-methylguanine-DNA-methyltransferase (*MGMT*), predictive biomarker for treatment of gliomas with the alkylating agents, has demonstrated a partial association with *IDH1/2* mutations. In 73 % of *IDH1/2*-mutant tumors *MGMT* promoter methylation were observed. At the same time *IDH1/2* mutations were not revealed in 67 % tumors with *MGMT* promoter methylation. These results indicate existence of another mechanism of *MGMT* methylation in gliomas. Our data strong support for necessity of both markers testing when patient therapy is selected.

Key words: glioma, *IDH1* and *IDH2* mutations, *MGMT* methylation, DNA melting

Введение

Глиомы – наиболее распространенные первичные опухоли головного мозга, включающие опухоли различных гистологических типов и степеней

злокачественности, трудно поддающиеся ранней диагностике и лечению.

Классификация глиом Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), основанная на гистологи-

ческом сходстве опухолевых клеток с различными типами нормальных клеток глии и морфологии опухоли, различает 4 степени злокачественности (I–IV) [1]. Разработка и введение в клиническую практику молекулярных маркеров в дополнение к классификации ВОЗ позволяют выделять подтипы глиом, которые существенно различаются по выживаемости и чувствительности к терапии [2, 3].

Мутации в генах изоцитратдегидрогеназ 1 и 2 (*IDH1* и *IDH2*) играют существенную роль в глиомогенезе, а также определяют диагностику и выбор терапии пациентов [4, 5]. Функция изоцитратдегидрогеназ заключается в окислительном декарбоксилировании изоцитрата, который превращается в α -кетоглутарат. Соматические мутации в генах *IDH1* и *IDH2*, обнаруживаемые в глиомах и некоторых других опухолях, представляют собой гетерозиготные миссенс-мутации в каталитическом домене ферментов. Наиболее распространенные (> 90 % случаев) мутации вызывают замену аргинина (R132) на гистидин в *IDH1* и аргинина (R172) на лизин в *IDH2*. В остальных случаях более редкие мутации в этом же кодоне вызывают замену аргинина на другие аминокислоты [5]. Мутации приводят к потере нормальной функциональной активности ферментов (образование α -кетоглутарата) и приобретению новой функции (образование 2-гидроксиглутарата). Таким образом, мутации в генах *IDH1* и *IDH2* имеют по крайней мере 2 последствия для клетки. Во-первых, снижается уровень нормального метаболита α -кетоглутарата, который является ключевым промежуточным продуктом цикла Кребса, необходимым для нормального его прохождения и для многих других процессов в клетке, таких как метаболизм жиров, ацетилирование белков и др. Роль нарушения этих процессов в канцерогенезе пока мало изучена. Во-вторых, в клетках глиом накапливается 2-гидроксиглутарат, который рассматривается как онкометаболит [6]. Показано, что 2-гидроксиглутарат — ингибитор α -кетоглутаратзависимых ферментов диоксигеназ, к которым относятся гистоновые НЗК9/НЗК36-деметилазы семейства KDM4 и ферменты семейства TET, участвующие в деметилировании ДНК [7]. Предположение о том, что мутации *IDH1/2* могут изменять паттерны метилирования ДНК и гистонов в опухолевых клетках в связи с ингибированием соответствующих ферментов, было подтверждено экспериментами в культуре клеток [8–10]. В то же время в клинических исследованиях была охарактеризована группа глиом, обладающих специфическим фенотипом (CIMP, CpG-island methylator phenotype), отличающимся координированным гиперметилированием ДНК в промоторах многих генов-супрессоров. В этих глиомах CIMP статистически достоверно был ассоциирован с соматическими мутациями *IDH1* [11].

Кроме этого, в экспериментах с культурами клеток было продемонстрировано, что клетки, содержащие мутантные *IDH1/2*, обладают повышенными

радиочувствительностью и чувствительностью к химиопрепаратам, что, по-видимому, связано с нарушением ответа на окислительный стресс [12–14]. Увеличение чувствительности глиом с мутантными *IDH1/2* к радио- и химиотерапии также было показано и в клинических исследованиях [15, 16]. Все вышесказанное говорит о необходимости систематического определения мутационного статуса *IDH1/2* в клинической практике.

В связи с тем, что мутации *IDH1/2* нарушают метилирование ДНК в опухолевых клетках, были сделаны попытки определить наличие корреляции метилирования промотора гена O6-метилгуанин-ДНК-метилтрансферазы (*MGMT*, O6-methylguanine-DNA-methyltransferase) с наличием мутаций *IDH1/2*. Метилирование *MGMT* рассматривается в настоящее время как предсказательный маркер, указывающий на чувствительность глиом к химиотерапии алкилирующими агентами [17].

Являясь одним из ферментов системы репарации ДНК, *MGMT* удаляет метильные и хлорэтильные группы из O6-позиции гуанина, нейтрализуя цитотоксический эффект алкилирующих агентов [18]. В нормальных клетках глии ген *MGMT* экспрессируется на высоком уровне. Снижение уровня экспрессии фермента за счет метилирования промотора гена, наблюдающегося только в опухолевых клетках, увеличивает цитотоксичность алкилирующих агентов избирательно по отношению к опухолевым клеткам. Хотя важность определения мутаций *IDH1/2* и метилирования *MGMT* общепризнанна, остается неясным, они предоставляют перекрывающуюся или независимую информацию как биомаркеры [19, 20].

В данной работе мы исследовали распределение мутаций *IDH1/2* в глиомах различных гистологических типов и степеней злокачественности методом анализа кривых плавления ДНК, выделенной из рутинных парафиновых срезов удаленных опухолевых тканей, фиксированных формальдегидом [21].

Разработанный нами протокол обеспечивал чувствительность 5 % и показал 100 % корреляцию с результатами определения мутаций с помощью «золотого стандарта» — секвенирования по Сэнгеру, чувствительность которого составляет 10–20 %. Показана лишь частичная ассоциация мутаций *IDH1/2* и метилирования промотора гена *MGMT* в глиомах, что свидетельствует в пользу определения 2 биомаркеров для каждого пациента при выборе послеоперационной терапии.

Материалы и методы

Клинические материалы. Были использованы фиксированные формальдегидом, заключенные в парафиновые блоки ткани глиом, удаленные у пациентов, проходивших лечение в РОНЦ им. Н.Н. Блохина. Клинический диагноз был подтвержден двойным гистологическим исследованием всех образцов в отделении патологической анатомии опухолей человека. Выборка из 210 глиом включала образцы II–IV

степеней злокачественности согласно классификации ВОЗ (табл. 1).

Выделение ДНК. Для выделения ДНК из тканей опухолей, заключенных в парафиновые блоки, использовали срезы толщиной 25 мкм. После механического выделения опухолевого материала из среза при микроскопическом контроле и депарафинизации его ксилолом (1 мин) ДНК выделяли с использованием набора QIAamp DNA FFPE Tissue (Qiagen, Германия) по протоколу фирмы.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) в реальном времени и определение профиля плавления продукта ПЦР. Использовали зонды типа TaqMan с флуорофором ROX на 5'-конце и гасителем BHQ2 на 3'-конце олигонуклеотида. Олигонуклеотиды были комплементарны к смысловой цепи ДНК, не содержащей мутаций. Весь анализ выполняли в одной пробирке, что снижало вероятность перекрестных загрязнений образцов. Состав праймеров и зондов: *IDH1* F-TCT TCA GAG AAG CCA TTA TC, R-CAC ATT ATT GCC AAC ATG A, зонд 5' (ROX) CATAAGCATGACGACSTATGATGAT (BHQ2) 3' (продукт ПЦР 118 пар нуклеотидов (п. н.)); *IDH2* F-AAA CAT CCC ACG CCT AGT CC, R-AAA GTC TGT GGC CTT GTA CTG C, зонд 5' (ROX) CATGGGCGTGCCCTGCCAATGGTGA (BHQ2) 3' (продукт ПЦР 171 п. н.). Кодоны, соответствующие аргининам 132 в *IDH1* и 172 в *IDH2*, в которых наблюдаются мутации в опухолях, подчеркнуты. Реакционная смесь имела следующий состав: 10-кратный реакционный буфер для ПЦР – 2,5 мкл; ДНК-полимераза Hot Start Taq (Евроген, Россия) – 1,2–2,5 ед. активности на реакцию; MgCl₂ – 2,5 ммоль; дезокси-нуклеотидтрифосфаты – до 200 мкмоль; прямой праймер – 12 пкмоль; обратный праймер – 1,2 пкмоль (для обеспечения преимущественной амплификации смысловой цепи в асимметричной ПЦР); зонд TaqMan (Синтол, Россия) – 5 пкмоль; вода – до общего объема 25 мкл; не менее 40 нг ДНК-матрицы. Реакцию проводили в амплификаторе CFX96 (Bio-Rad, США) для обеих пар праймеров следующим образом: 95 °С – 3 мин, (95 °С – 13 с, 54 °С – 40 с, 72 °С – 20 с) × 40 циклов; затем плавление продукта ПЦР: при температуре 95 °С 1 мин, при 54 °С 8 мин, от 54 до 90 °С повышение температуры на 0,3 °С при каждом шаге с продолжительностью шага 12 с. В качестве матрицы для положительного контроля использовали клонированный в плазмидном векторе pTZ57R/T (Fermentas, Литва) продукт ПЦР *IDH1* и *IDH2* дикого и мутантного типов соответственно.

Определение чувствительности метода выявления мутаций *IDH* плавлением продукта ПЦР. Чувствительность метода определяли анализом кривых плавления продуктов в 3 независимых ПЦР, в которых в качестве матрицы использовали смесь клонированных аллелей дикого и мутантного типов *IDH* в разных соотношениях. За порог чувствительности принимали минимальную

концентрацию мутантного аллеля в смеси с аллелем дикого типа в процентах, при которой еще выявлялся двухфазный характер кривой.

Определение нуклеотидной последовательности продукта ПЦР. После проведения симметричной ПЦР продукт реакции разделяли в 2 % агарозном геле, выделяли из геля замораживанием/оттаиванием и определяли нуклеотидную последовательность ампликона, используя указанные выше праймеры, в Центре коллективного пользования «Геном» НИИ молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта по протоколу Центра.

Метил-специфичная ПЦР для гена *MGMT*. Реакцию проводили как описано ранее [22]. Использовали 2 набора праймеров к верхней цепи ДНК, конвертированной в результате обработки бисульфитом натрия с помощью готового набора EZ DNA Methylation Kit (Zymo Research, США): 1) для метилированной последовательности сенс – 5' TTT CGA CGT TCG TAG GTT TTC GC (1063 п. н.), антисенс №1 – 5' GCA CTC TTC CGA AAA CGA AAC G (1122 п. н.), антисенс №2 – 5' ACC ACT CGA AAC TAC CAC CGT CC (1158 п. н.); 2) для неметилированной последовательности сенс – 5' GTG TTT TGA TGT TTG TAG GTT TTT GT (1059 п. н.), антисенс №1 – 5' AAC TCC ACA CTC TTC CAA AAA CAA AAC A (1127 п. н.), антисенс №2 – 5' ACC ACT CAA AAC TAC CAC CAT CC (1158 п. н.). Позиции праймеров указаны по сиквенсу гена *MGMT* NC_000010.11 (GenBank), начиная от –1000 п. н. от старта транскрипции. ПЦР проводили по следующей программе: 95 °С – 5 мин, (95 °С – 30 с, 60 °С для праймеров к метилированной последовательности и 64 °С для праймеров к неметилированной последовательности – 30 с, 72 °С – 40 с) × 40 циклов, 72 °С – 10 мин. Фрагменты ДНК, полученные в процессе ПЦР, разделяли в 4 % агарозном геле с бромистым этидием (0,5 мкг/мл).

Результаты

Определение мутаций *IDH1/2* флуоресцентным анализом кривых плавления продуктов ПЦР. Первоначально ДНК из 24 образцов глиобластом анализировали одновременно секвенированием по Сэнгеру и ПЦР в реальном времени с флуоресцентно-мечеными зондами с последующим анализом кривых плавления продуктов ПЦР. На рис. 1 представлены примеры кривых плавления продуктов ПЦР и подтверждения мутационного статуса *IDH1/2* секвенированием. Гетеродуплекс, образующийся между мутантным аллелем и зондом, не имеющим мутации, имеет более низкую температуру плавления, чем гомодуплекс зонда с аллелем дикого типа. Однофазная кривая плавления указывает на присутствие аллелей только дикого типа, двухфазная кривая с дополнительным пиком со сниженной температурой плавления – на смесь молекул мутантного и дикого типов.

При разработке протокола учитывали влияние на температуру плавления гетеро- и гомодуплексов, сочетания флуорофора и гасителя, длины зондов,

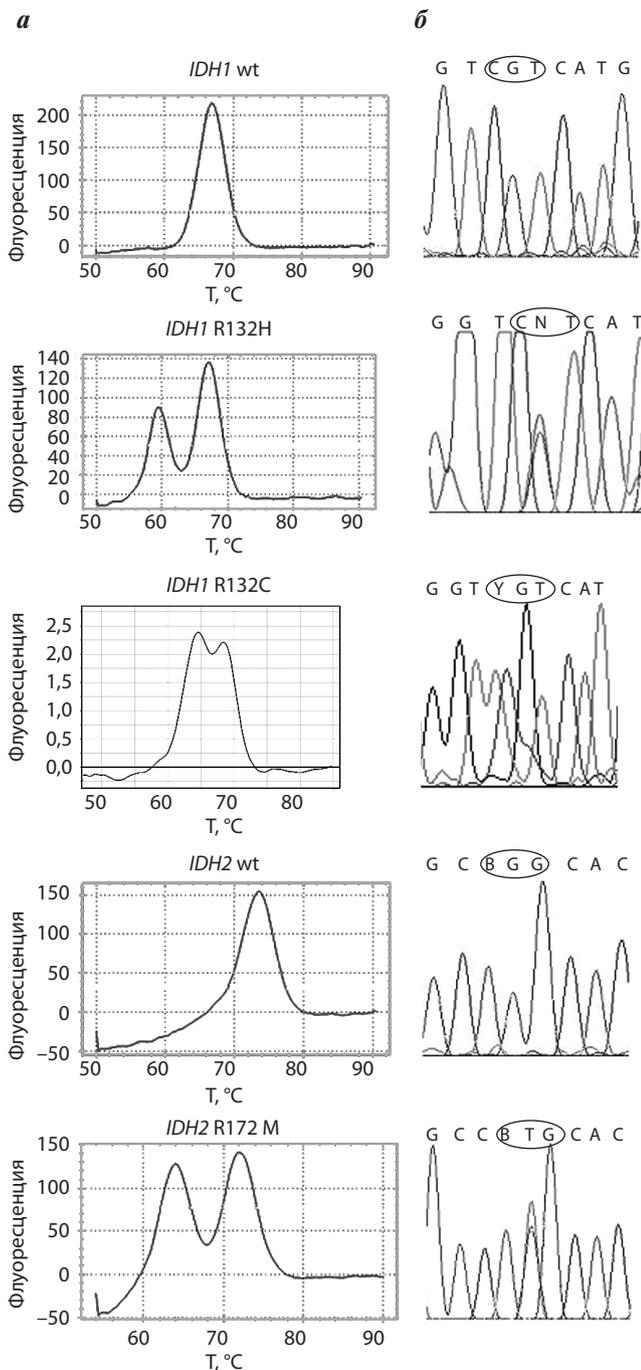


Рис. 1. Определение гетерозиготных мутаций *IDH1* и *IDH2* в образцах глиом 2 методами: а – кривые плавления продуктов полимеразных цепных реакций (ПЦР), проведенных с праймерами к участкам генов *IDH1* и *IDH2*, включающих кодоны для аргинина 132 (R132) и 172 (R172) соответственно; анализ основан на разнице температур плавления дуплексов, образующихся между зондом и аллелями дикого (wt) или мутантного типов; б – определение нуклеотидной последовательности секвенированием по Сэнгеру продукта ПЦР; овалом отмечены кодоны, соответствующие R132 и R172

использования сенс- или антисенс-цепи ДНК в качестве мишени для зонда и некоторых других условий [23].

В нашей выборке во всех случаях на двухфазных кривых сдвиг температур плавления для мутантных аллелей по сравнению с диким типом составлял 4–8 °С, что значительно превышает соответствующий сдвиг

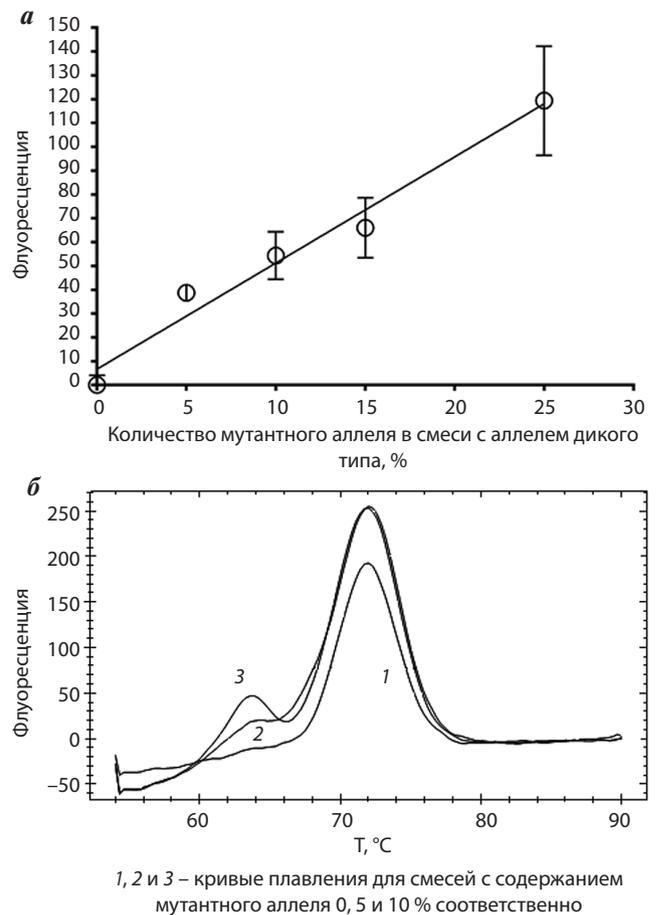


Рис. 2. Чувствительность метода анализа мутаций: а – результаты анализа кривых плавления продуктов 3 независимых полимеразных цепных реакций (вертикальные скобки – стандартное отклонение; в качестве матрицы в реакциях использовали смесь клонированных аллелей дикого и мутантного типов в разных соотношениях); б – результаты типичного опыта для *IDH2*

при использовании интеркалирующих флуоресцентных красителей для анализа кривых плавления (не более 1 °С) [24]. Широкий интервал между температурами плавления мутантного и дикого вариантов позволяет не опасаться получения ложных результатов за счет различий температур плавления продуктов ПЦР с разными вариантами замен оснований в анализируемом кодоне на несколько градусов (см. рис. 1, сравни *IDH1* R132H и R132C). Таким образом, с помощью одних и тех же праймеров и зонда предложенный протокол позволяет выявлять различные варианты точечных мутаций в анализируемом кодоне, описанные в литературе [5].

Результаты определения мутационного статуса 2 методами полностью совпали, что говорит о специфичности разработанного протокола.

Определение чувствительности метода анализа кривых плавления в нашей модификации показало, что минимальная концентрация мутантного аллеля в смеси с аллелем дикого типа, при которой еще выявляется двухфазный характер кривой плавления, составляет 5 % (рис. 2).

Таблица 1. Частота мутаций генов *IDH1* и *IDH2* в глиомах

| Гистотип | Степень злокачественности* | Мутация гена <i>IDH1</i> | Мутация гена <i>IDH2</i> |
|-----------------------------------|----------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Астроцитома | II | 3/6 | 1/6 |
| Олигодендроглиома | II | 4/5 | 0/5 |
| Олигоастроцитома | II | 7/9 | 2/9 |
| Анапластическая астроцитома | III | 9/18 | 1/18 |
| Анапластическая олигодендроглиома | III | 8/12 | 2/12 |
| Анапластическая олигоастроцитома | III | 5/7 | 0/7 |
| <i>Всего</i> | | 36/57 (63) | 6/57 (11) |
| Глиобластома | IV | 14/153 (9) | 8/153 (5) |

Примечание. Здесь и в табл. 2: цифры в скобках – частота события в процентах.

*Степень злокачественности по классификации Всемирной организации здравоохранения [1].

Частота мутаций *IDH1/2* в глиомах. Используя описанный протокол, мы провели анализ мутаций *IDH1/2* в 210 образцах глиом различных степеней злокачественности и гистологических типов (см. табл. 1). В глиомах II и III степеней злокачественности частота мутаций *IDH1/2* составила 74 %. Глиомы, содержащие клетки с олигодендроглиальным типом дифференцировки, достоверно чаще (28 из 33) имели мутации *IDH1/2*, чем астроцитомы разных степеней злокачественности (14 из 24; $p = 0,014$). Таким образом, мутации выявляются уже в глиомах низких степеней злокачественности. В табл. 1 представлена суммарная частота мутаций в первичных и вторичных глиобластомах (IV степень злокачественности), которая составила 14 %. Подавляющее большинство образцов IV степени злокачественности в нашей выборке составляли вновь диагностированные глиобластомы без возможности их разделения по клинической истории на первичные и вторичные глиобластомы (предшественники последних – глиомы II и III степеней злокачественности). Низкая частота мутаций (14 %) в глиобластомах по сравнению с глиомами более низких степеней злокачественности указывает на преобладание в нашей выборке первичных глиобластом, для которых эти

мутации являются редкими [25, 26]. Преобладающим (79 %) типом мутаций во всех глиомах были мутации *IDH1*, при этом большинство из них были мутациями *IDH1R132H*. Только в 3 из 50 глиом, имеющих мутации *IDH1*, были обнаружены другие варианты замен оснований в том же кодоне. Мутации *IDH2* составляли 21 % от всех выявленных мутаций и были представлены наиболее распространенным типом мутаций R172K во всех случаях, кроме одного с мутацией R172M (см. рис. 1). Одновременного присутствия мутаций *IDH1* и *IDH2* не обнаружено ни в одном случае.

Мутации *IDH1/2* и метилирование промотора гена *MGMT* в глиомах. Метилирование *MGMT* было выявлено в 126 (60 %) из 210 глиом (табл. 2). При этом мы не наблюдали преобладания этого маркера в каком-либо из подтипов глиом (данные не представлены). Мутации *IDH1/2* присутствовали лишь в 42 (33 %) из 126 опухолей, в которых наблюдалось метилирование *MGMT*. С другой стороны, мутации *IDH1/2* не всегда сопровождалось метилированием гена *MGMT*. В 17 (27 %) из 64 глиом, имеющих мутации, не выявлено метилирования *MGMT*. Таким образом, наблюдалась лишь частичная ассоциация 2 биомаркеров.

Таблица 2. Соотношение мутаций *IDH1/2* и метилирования *MGMT* в глиомах

| Степень злокачественности* | Частота <i>meMGMT</i> | <i>meMGMT</i> | | <i>mutIDH1/2</i> | |
|----------------------------|-----------------------|------------------|-----------------|------------------|---------------|
| | | <i>mutIDH1/2</i> | <i>wtIDH1/2</i> | <i>meMGMT</i> | <i>unMGMT</i> |
| II + III | 41/57 | 28/41 | 13/41 | 32/42 | 10/42 |
| IV | 85/153 | 14/85 | 71/85 | 15/22 | 7/22 |
| <i>Всего</i> | 126/210 (60) | 42/126 (33) | 84/126 (67) | 47/64 (73) | 17/64 (27) |

Примечание. *meMGMT* – ген *MGMT* метилирован; *unMGMT* – ген *MGMT* не метилирован; *mutIDH1/2* – гены *IDH1/2* мутированы; *wtIDH1/2* – диккий тип генов.

Обсуждение

Обнаружение мутаций анализом кривых плавления ДНК с использованием зондов типа TaqMan является нетрудоемким, быстрым и относительно недорогим методом, снижающим возможность перекрестных контаминаций образцов [21, 23]. Лежащая в основе метода ПЦР позволяет использовать фрагментированную ДНК, выделенную из рутинных парафиновых срезов опухолевых тканей, фиксированных формальдегидом. Сравнение полученных результатов с «золотым стандартом» выявления мутаций прямым определением последовательности нуклеотидов по Сэнгеру показало 100 % корреляцию в выборке из 24 образцов, что говорит о специфичности разработанного протокола. Использование этого протокола позволяет обнаружить мутации, если они присутствуют всего в 5 % молекул ДНК в образце. Таким образом, чувствительность метода в данной модификации составила 5 %, что сравнимо с чувствительностью определения мутаций *IDH* методом пиросеквенирования (5 %), требующего дорогостоящего оборудования, и существенно превышает чувствительность секвенирования по Сэнгеру (10–20 %) [27].

Высокая частота мутаций *IDH1/2* уже при II степени злокачественности (17 (85 %) из 20 глиом) указывает на раннее появление этих мутаций и их вклад в глиомогенез. Глиомы, содержащие клетки с олигодендроцитарным типом дифференцировки, достоверно чаще имели мутации *IDH1/2*, чем астроцитомы разных степеней злокачественности ($p = 0,014$), как это наблюдалось и в других исследованиях. В целом результаты, полученные предложенным методом, хорошо согласуются с данными, опубликованными для других популяций [20, 25, 28]. Это говорит о корректности использованного протокола, с одной стороны, и об отсутствии специфических особенностей частоты мутирования и распределения мутаций *IDH1/2* между типами глиом в российской популяции пациентов, с другой. Насколько нам известно, это 1-е исследование распространенности мутаций *IDH1/2* в глиомах в России.

Метилирование промотора *MGMT* выявлено нами в 60 % глиом, что согласуется с частотой метилирования в других популяциях [17]. При этом присутствие мутаций *IDH1/2* лишь в 33 % глиом, имеющих метилирование *MGMT*, указывает на существование других механизмов метилирования *MGMT* в глиомах помимо снижения активности α -кетоглутаратзависимых ферментов. С другой стороны, мутации *IDH1/2* не сопровождалась метилированием гена *MGMT* в 27 % глиом, имеющих мутации. Это говорит о необходимости каких-то дополнительных условий для метилирования гена, помимо изменения активности *IDH1/2*. Обнаруженная частичная ассоциация между метилированием *MGMT* и мутациями *IDH1/2* указывает на необходимость анализа статуса обоих маркеров для ведения больных после удаления глиом. Определение 2 маркеров тем более важно, поскольку каждый из них имеет независимую ассоциацию с повышенной выживаемостью пациентов, подвергающихся радиотерапии в сочетании с алкилирующими агентами, и, по-видимому, различным образом влияет на клинический ответ на терапию [29, 30].

Заключение

Разработан протокол метода плавления ДНК для анализа мутаций генов *IDH1/2* в глиомах, позволяющий определять мутации с чувствительностью 5 %. Специфичность определения мутаций подтверждена секвенированием по Сэнгеру в 24 образцах. В результате анализа более 200 глиом показаны раннее появление мутаций в процессе прогрессии глиом, преобладание мутаций *IDH1*, более высокая частота мутаций *IDH1/2* в глиомах олигодендроглиального происхождения по сравнению с другими гистотипами глиом. Одновременное определение мутаций *IDH1/2* и метилирования промотора *MGMT*, предсказательного маркера чувствительности глиом к химиотерапии алкилирующими агентами, выявило лишь частичную ассоциацию 2 биомаркеров. Данные свидетельствуют о пользе необходимости определения обоих биомаркеров для каждого пациента при выборе послеоперационной терапии.

Авторы выражают благодарность А. В. Лихтенштейну за консультации в процессе выполнения работы. Работа выполнена при частичной поддержке Российского научного фонда (грант № 15-15-00125).

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Louis D.N., Ohgaki H., Wiestler O.D. et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* 2007;114(2): 97–109.
2. Vignesswaran K., Neill S., Hadjipanayis C.G. Beyond the world health organization grading of infiltrating gliomas: advances in the molecular genetics of glioma classification. *Ann Transl Med* 2015;3(7):95.
3. Борисов К.Е., Сакаева Д.Д. Генные нарушения и молекулярно-генетические подтипы злокачественных глиом. *Архив патологии* 2013;(3):52–61. [Borisov K.E., Sakaeva D.D. Gene disorders and molecular genetic subtypes of malignant gliomas. *Архив патологии* = *Pathology Archive* 2013;(3):52–61. (In Russ.)].
4. Parsons D.W., Jones S., Zhang X. et al. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science* 2008;321(5897):1807–12.
5. Yan H., Ye D., Guan K.L., Xiong Y. IDH1 and IDH2 mutations in tumorigenesis: mechanistic insights and clinical perspectives. *Clin Cancer Res* 2012;18(20):5562–71.
6. Losman J.A., Looper R., Koivunen P. et al. (R)-2-hydroxyglutarate is sufficient to promote leukemogenesis and its effects are reversible. *Science* 2013;339(6127):1621–5.

7. Xu W., Yang H., Liu Y. et al. Oncometabolite 2-hydroxyglutarate is a competitive inhibitor of alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenases. *Cancer Cell* 2011;19(1):17–30.
8. Turcan S., Rohle D., Goenka A. et al. IDH1 mutation is sufficient to establish the glioma hypermethylator phenotype. *Nature* 2012;483(7390):479–83.
9. Lu C., Ward P.S., Kapoor G.S. et al. IDH mutation impairs histone demethylation and results in a block to cell differentiation. *Nature* 2012;483(7390):474–8.
10. Duncan C.G., Barwick B.G., Jin G. et al. A heterozygous IDH1R132H/WT mutation induces genome-wide alterations in DNA methylation. *Genome Res* 2012;22(12):2339–55.
11. Noushmehr H., Weisenberger D.J., Diefes K. et al. Identification of a CpG island methylator phenotype that defines a distinct subgroup of glioma. *Cancer Cell* 2010;17(5):510–22.
12. Shi J., Sun B., Shi W. et al. Decreasing GSH and increasing ROS in chemosensitivity gliomas with IDH1 mutation. *Tumour Biol* 2015;36(2):655–62.
13. Molenaar R.J., Botman D., Smits M.A. et al. Radioprotection of IDH1-mutated cancer cells by the IDH1-mutant inhibitor AGI-5198. *Cancer Res* 2015;75(22):4790–802.
14. Li S., Chou A.P., Chen W. Overexpression of isocitrate dehydrogenase mutant proteins renders glioma cells more sensitive to radiation. *Neuro Oncol* 2013;15(1):57–68.
15. Okita Y., Narita Y., Miyakita Y. et al. IDH1/2 mutation is a prognostic marker for survival and predicts response to chemotherapy for grade II gliomas concomitantly treated with radiation therapy. *Int J Oncol* 2012;41(4):1325–36.
16. Tran A.N., Lai A., Li S. et al. Increased sensitivity to radiochemotherapy in IDH1 mutant glioblastoma as demonstrated by serial quantitative MR volumetry. *Neuro Oncol* 2014;16(3):414–20.
17. Weller M., Stupp R., Reifenberger G. et al. MGMT promoter methylation in malignant gliomas: ready for personalized medicine? *Nat Rev Neurol* 2010;6(1):39–51.
18. Christmann M., Verbeek B., Roos W.P. et al. O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) in normal tissues and tumors: enzyme activity, promoter methylation and immunohistochemistry. *Biochim Biophys Acta* 2011;1816:179–90.
19. Mukasa A., Takayanagi S., Saito K. et al. Significance of IDH mutations varies with tumor histology, grade, and genetics in Japanese glioma patients. *Cancer Sci* 2012;103(3):587–92.
20. Siegal T. Clinical impact of molecular biomarkers in gliomas. *J Clin Neurosci* 2015;22(3):437–44.
21. Lyon E., Wittwer C.T. Light cycler technology in molecular diagnostics. *J Mol Diagn* 2009;11(2):93–101.
22. Табаков Д.В., Строганова А.М., Сендерович А.И. и др. Анализ метилирования гена MGMT в глиомах методом модифицированной метил-специфичной ПЦР. *Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина* 2015;(26):9–33. [Tabakov D.V., Stroganova A.M., Senderovich A.I. et al. Analysis of MGMT gene methylation in gliomas using modified methylation-specific PCR. *Vestnik RONTs im. N.N. Blokhina = Journal of N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center* 2015;(26):9–33. (In Russ.)].
23. Botezatu I.V., Nechaeva I.O., Stroganova A.M. et al. Optimization of melting analysis with TaqMan probes for detection of KRAS, NRAS, and BRAF mutations. *Anal Biochem* 2015;491:75–83.
24. Berenstein R., Blau I.W., Kar A. et al. Comparative examination of various PCR-based methods for DNMT3A and IDH1/2 mutations identification in acute myeloid leukemia. *J Exp Clin Cancer Res* 2015;33:44.
25. Ichimura K., Pearson D.M., Kocialkowski S. et al. IDH1 mutations are present in the majority of common adult gliomas but rare in primary glioblastomas. *Neuro Oncol* 2009;11(4):341–7.
26. Измайлов Т.Р., Снигирева Г.П., Шишкина Л.В. и др. Генетические нарушения при первичных глиобластомах головного мозга. *Вопросы онкологии* 2016;62(4):471–8. [Izmaylov T.R., Snigireva G.P., Shishkina L.V. et al. Genetic disorders in primary brain glioblastomas. *Voprosy onkologii = Problems in Oncology* 2016;62(4):471–8. (In Russ.)].
27. Arita H., Narit Y., Matsushita Y. et al. Development of a robust and sensitive pyrosequencing assay for the detection of IDH1/2 mutations in gliomas. *Brain Tumor Pathol* 2015;32(1):22–30.
28. Hartmann C., Hentschel B., Simon M. et al. Long-term survival in primary glioblastoma with versus without isocitrate dehydrogenase mutations. *Clin Cancer Res* 2013;19(18):5146–57.
29. Molenaar R.J., Verbaan D., Lamba S. et al. The combination of IDH1 mutations and MGMT methylation status predicts survival in glioblastoma better than either IDH1 or MGMT alone. *Neuro Oncol* 2014;16(9):1263–73.
30. Yang P., Zhang W., Wang Y. IDH mutation and MGMT promoter methylation in glioblastoma: results of a prospective registry. *Oncotarget* 2015;6(38):40896–906.