

## ПИЛОИДНЫЕ АСТРОЦИТОМЫ И ПРОТЕИНКИНАЗА М $\zeta$ : ЕСТЬ ЛИ СВЯЗЬ С ПРОГНОЗОМ?

Никитин П.В.<sup>1</sup>, Рыжова М.В.<sup>1</sup>, Мурадян М.А.<sup>2</sup>, Галстян С.А.<sup>1</sup>, Зубова И.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГАУ «НМИЦ нейрохирургии имени акад. Н.Н. Бурденко», Москва, e-mail: redseadog@gmail.com;

<sup>2</sup>ФГАУ ВО «Российский университет дружбы народов», Москва, e-mail: marymuradyan2605@mail.ru

Пилоидные астроцитомы представляют собой актуальную проблему в современной нейроонкологии. Многие механизмы прогрессирования опухоли изучены недостаточно, в частности слабо охарактеризованы ключевые эффекторные звенья патогенеза. Подобные факторы могут играть важнейшую роль в процессе клинического прогрессирования опухолей. Поэтому мы изучили влияние активности экспрессии мозгоспецифичной атипичической изоформы протеинкиназы С – протеинкиназы М $\zeta$  (ПК М $\zeta$ ), одного из главных потенциальных эффекторных факторов – на прогноз безрецидивной выживаемости пациентов с установленным диагнозом пилоидной астроцитомы. Чтобы решить данную задачу, были сформированы две равные группы: с отсутствием рецидивов опухолевого процесса по крайней мере в течение пяти лет (БРГ) и с наличием рецидива (РГ). Выяснилось, что процент клеток, экспрессирующих ПК М $\zeta$  (ПКЭ М $\zeta$ ), был статистически достоверно выше в РГ, нежели в БРГ ( $34.36 \pm 1.52\%$  и  $24.14 \pm 1.25\%$  соответственно). Более того, и значения histoscore ПК М $\zeta$  были также статистически достоверно выше в РГ по сравнению с БРГ и составили  $120.46 \pm 3.6\%$  и  $91.7 \pm 3.31\%$ . Кроме того, было выявлено наличие обратной корреляции высокой степени между показателями ПКЭ М $\zeta$  и histoscore ПК М $\zeta$  и временем до возникновения рецидива. Данные результаты показывают наличие выраженной связи между активностью экспрессии ПК М $\zeta$  и прогрессированием опухолевого процесса, а также могут стать основой для формирования новых диагностических подходов и разработки средств таргетной терапии пилоидных астроцитом.

Ключевые слова: пилоидная астроцитомы, протеинкиназа М $\zeta$ , прогностический маркер.

## THE EXPRESSION ACTIVITY OF PROTEIN KINASE M $\zeta$ IN PILOCYTIC ASTROCYTOMAS CORRELATES WITH THE PROGNOSIS OF THE DISEASE

Nikitin P.V.<sup>1</sup>, Ryzhova M.V.<sup>1</sup>, Muradyan M.A.<sup>2</sup>, Galstyan S.A.<sup>1</sup>, Zubova I.V.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>N.N. Burdenko National Medical Research Center of Neurosurgery, Moscow, e-mail: redseadog@gmail.com;

<sup>2</sup>Peoples' Friendship University of Russia, Medical Institute, Moscow, e-mail: marymuradyan2605@mail.ru

Pilocytic astrocytomas are an important issue in modern neuro-oncology. Many mechanisms of tumor progression have not been studied enough, in particular, key effector links of pathogenesis are poorly characterized. Such factors may play a crucial role in the clinical progression of tumors. Therefore, we studied the effect of the expression activity of the brain-specific atypical isoform of protein kinase C - protein kinase M $\zeta$  (PK M $\zeta$ ), one of the main potential effector mechanisms - on the prognosis of patients with an established diagnosis of pilocytic astrocytoma regarding recurrences. To solve this problem, two equal groups were formed - with the absence of the tumor process recurrence for at least five years (RFG) and with the presence of relapse (RG). It was found that the percentage of cells expressing PK M $\zeta$  (PKE M $\zeta$ ) was significantly higher in the RG than in the RFG ( $34.36 \pm 1.52\%$  and  $24.14 \pm 1.25\%$ , respectively). Moreover, the PK M $\zeta$  histoscore values were also significantly higher in the RG compared with RFG and were  $120.46 \pm 3.6\%$  and  $91.7 \pm 3.31\%$ . In addition, inverse correlation of high strength was found between the PKE M $\zeta$  and PK M $\zeta$  histoscore values and the time before the recurrence. Our results show a significant role of PK M $\zeta$  in the development of pilocytic astrocytomas and the progression of the tumor process. These results can be the basis for the formation of new diagnostic approaches and the development of drugs for targeted therapy of pilocytic astrocytomas.

Keywords: pilocytic astrocytoma, protein kinase M $\zeta$ , prognostic marker.

Термин «пилоидная» использовался с 1930 года для описания форм астроцитомы, имеющих в своем строении клетки волосообразные, биполярные отростки [1]. То, что сегодня мы называем пилоидной астроцитомой (ПА), имело множество разных наименований до того, как система классификации ВОЗ стала общепринятой; прежними терминами считались «полярная спонгиобластома» и «ювенильная астроцитомы». ПА

относится к группе опухолей низкой злокачественности (GRADE I по классификации опухолей центральной нервной системы ВОЗ).

Пилоидная астроцитома - наиболее часто встречающаяся опухоль головного мозга у детей и подростков, составляющая 33,2% от общего числа всех глиом, развивающихся в возрасте 0–14 лет, и 17,6% от числа всех первичных опухолей головного мозга в детском периоде [2]. Средний возраст среди старших возрастных групп составляет 22 года, а пациенты старше 50 лет поражаются ПА относительно реже.

ПА возникают в различных отделах центральной нервной системы, поражая зрительный нерв, зрительную хиазму/гипоталамус, таламус и базальные ганглии, полушария головного мозга, а также ствол мозга, однако большинство пилоцитарных астроцитом локализуется субтенториально.

ПА характеризуется бифазным паттерном, включающим в себя плотно расположенные биполярные клетки, содержащие скопления  $\alpha$ -В-кристаллина в виде волокон Розенталя, а также свободно лежащие мультиполярные клетки с микрокистами и эозинофильными зернами, состоящими из  $\alpha_1$ -антихемотрипсина и  $\alpha_1$ -антитрипсина. Эти две составляющие могут наблюдаться в различных пропорциях, создавая значительное гистологическое разнообразие. Необходимо отметить, что возможно выявление признаков, характерных для high-grade новообразований, например клеточная и ядерная анаплазия, пролиферация эндотелия сосудов, фокусы некрозов и т.д. Однако эти признаки чаще являются дегенеративными изменениями вследствие медленного роста опухоли, чем признаками озлокачествления [3].

Пилоидная астроцитома проявляет немалое разнообразие генетических aberrаций. Слияние *BRAF-KIAA1549*, запускающее MAPK каскад, встречается в более 70% опухолей. Обнаруживаются также и другие слияния гена *BRAF*, его делеция и мутация V600E. Все эти генетические отклонения активируют MAPK каскад, что приводит к повышению пролиферативной активности клетки. Другими механизмами запуска этого сигнального пути являются спорадическая инактивирующая мутация гена *NF1* или мутация двух аллелей гена при нейрофиброматозе 1 типа, *KRAS* мутации, точечные мутации N546K и K656E гена *FGFR1*, а также его слияние с геном *TACC1*; мутации гена *RAF1*, включая крайне редкое слияние с геном *SRGAP3*, и мутации в генах NTRK-семейства [2].

Таким образом, многое известно о генетической природе пилоидных астроцитом. Но существенно менее изученными остаются вторичные механизмы прогрессирования этих опухолей, играющие роль в реализации тех пролиферативных потенциалов, которые заложены в опухолевых клетках за счет наличия мутаций и находят свое выражение в опухолевом росте и прогрессии. Понимание этих механизмов является крайне важным как с точки зрения

фундаментальной, поскольку это углубляет наше представление о базовых основах канцерогенеза в целом, так и с практической точки зрения – далеко не всегда ПА в силу своей сложной локализации могут быть доступны для радикального удаления, что нередко приводит к рецидивированию патологического процесса. При этом эффективных средств таргетной терапии для лечения таких пациентов не существует, как и надежных инструментов прогнозирования течения ПА.

При этом факторы, вовлеченные в процесс прогрессирования опухоли, должны обладать достаточно специфическими свойствами – способностью к быстрой активации и длительному поддержанию пластических молекулярных перестроек в опухолевых клетках. На эту роль идеально подходит особый вид атипических изоформ протеинкиназы С – протеинкиназа М ζ (ПК Мζ). ПК Мζ представляет собой альтернативный сплайсинговый вариант ПКС ζ, не содержащий регулирующего аутоингибиторного домена, поэтому после своего синтеза она остается активной до тех пор, пока не подвергнется разрушению [4; 5]. При этом ПК Мζ является абсолютно специфичной для мозговой ткани [6; 7]. В целом роль ПК Мζ при опухолевых заболеваниях практически не изучена. Было выявлено, что при остром лимфобластном лейкозе подобный ПК Мζ белок синтезируется в опухолевых клетках, участвуя в процессах канцерогенеза [8]. Однако при опухолях головного мозга роль данного фактора не изучена. Поэтому целью данного исследования явилось изучение взаимосвязи активности экспрессии ПК Мζ в ПА с показателями безрецидивной выживаемости.

## **Материалы и методы исследования**

### *Группы исследования и их характеристика*

В рамках ретроспективного, слепого, рандомизированного исследования были изучены 50 образцов опухолей пациентов с установленным диагнозом пилоидной астроцитомы (Grade I по ВОЗ) (ПА), проходивших хирургическое лечение в ФГАУ «НМИЦ нейрохирургии им. акад. Н.Н. Бурденко» в 2009–2014 годах. Данные пациенты наблюдались в течение минимум пяти лет, им проводились регулярные (не реже двух раз в год) контрольные магнитно-резонансные томографические исследования головного мозга на предмет наличия рецидивов. При этом были сформированы две равные группы (по 25 пациентов): с наличием рецидива (РГ) и отсутствием рецидива (БРГ) по крайней мере в течение пяти лет. В качестве рецидива расценивались возникновение характерной для локализации опухоли клинической картины и несомненные МР-признаки появления рецидива опухоли в том же месте, что и первичной опухоли. Срок до возникновения рецидива рассчитывался как время в днях от операции по поводу первичной опухоли до выявления признаков рецидива.

В рамках данного исследования средний возраст пациентов на момент операции составил  $11.55 \pm 1.54$  года. Лиц мужского пола было 52%, женского пола - 48%. В РГ средний возраст пациентов составил  $8.95 \pm 1.68$  года, в то время как в БРГ данный показатель был на уровне  $14.15 \pm 2.51$  года. В РГ среднее время до возникновения рецидива составило  $819.92 \pm 126.72$  дня.

#### *Проведение иммуногистохимического исследования*

Для проведения исследования использовали парафиновые блоки с фиксированными образцами опухолей (в случае РГ брались образцы опухолей от первой операции), из которых изготавливали срезы с толщиной слоя 3 микрометра, проводили их депарафинирование, применяя ксилол, и затем выполнялась гидратация с помощью различных растворов этанола. После этого полученные препараты инкубировали с кроличьими моноклональными антителами против антигена ПК М $\zeta$  человека (Abcam, Великобритания) и с антикроличьими мышиными IgG антителом против пероксидазы хрена (Cell Marque, «Sigma-Aldrich», США). Сайты связывания проявляли с помощью тетрагидрохлорида 3,3'-диаминобензидина (Ventana Medical Systems, США).

#### *Обработка и анализ результатов иммуногистохимического исследования*

Проводилось изучение препаратов с помощью светового микроскопа при увеличении  $\times 400$  тремя патологами. Для определения активности экспрессии ПК М $\zeta$  проводился подсчет процента клеток, экспрессирующих данный маркер (ПКЭ М $\zeta$ ), кроме того, оценивалась экспрессия полуколичественным методом histoscore. Результаты подсчета усредняли.

При определении histoscore ПК М $\zeta$  процент клеток, имеющих слабое окрашивание, умножался на один, процент клеток с умеренной интенсивностью окрашивания умножался на два, и, наконец, процент клеток с выраженным положительным окрашиванием умножался на три, после чего результат суммировался. Для оценки активности экспрессии маркера применялся цитокolorиметрический метод с использованием микроскопа Carl Zeiss Scope.A1, камеры AxioCam 105 color (Zeiss AG, Германия) и программ для формирования и анализа изображений ZEN 2 (Zeiss AG, Германия), ImageJ (НИН, США) и Adobe Photoshop (Adobe Systems, США). Данные подсчета активности экспрессии тремя патологами усреднялись.

#### *Статистическая обработка результатов исследования*

Статистическая обработка выполнялась с помощью программного обеспечения Statistica 10 (StatSoft, США). Для выявления достоверности различий показателей активности экспрессии ПК М $\zeta$  в двух группах применялся U-критерий Манна-Уитни. Для вычисления влияния как ПКЭ М $\zeta$ , так и histoscore ПК М $\zeta$  на выживаемость проводился корреляционный анализ между этими двумя показателями по методу Спирмена. Различия считали

достоверными при значении  $p < 0.05$ .

## Результаты исследования и их обсуждение

### Результаты

#### Процент клеток с положительной экспрессией ПК Мζ в обеих группах

В ходе анализа результатов исследования было показано, что ПКЭ Мζ в БРГ составил в среднем  $24.14 \pm 1.25\%$ . При этом средний показатель ПКЭ Мζ в РГ бы выше и составил  $34.36 \pm 1.52\%$  (рисунок 1). Выявленные различия были статистически достоверными ( $p = 0.000034$ ,  $z = 4.14$ ).

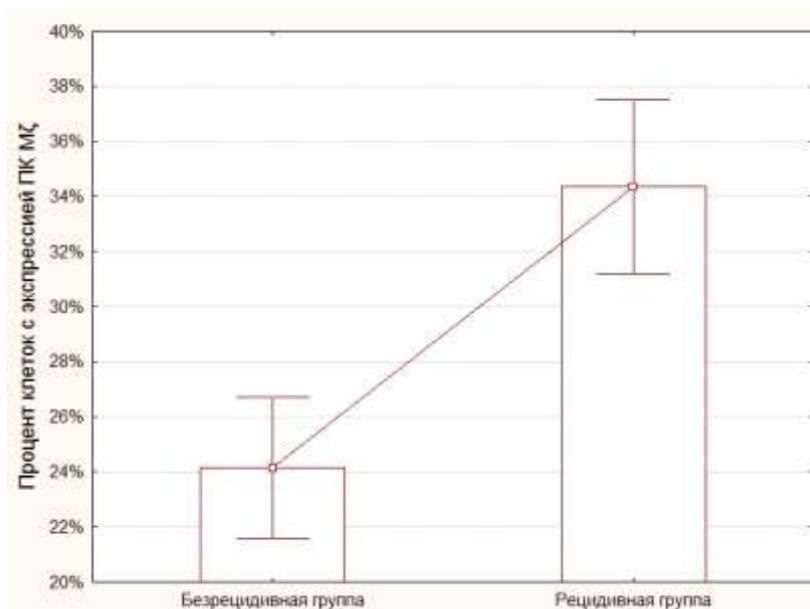


Рис. 1. Значения процента клеток, экспрессирующих ПК Мζ в БРГ и РГ. Уровень экспрессии данного маркера статистически достоверно выше в РГ, чем в БРГ ( $p = 0.000034$ ,  $z = 4.14$ )

#### Показатели histiscore ПК Мζ в БРГ и РГ

Средний показатель histiscore ПК Мζ в БРГ составил  $91.7 \pm 3.31\%$ . При этом среднее значение histiscore ПК Мζ в РГ было выше и составило  $120.46 \pm 3.6\%$  (рисунок 2). Выявленные различия носили статистически достоверный характер ( $p = 0.000006$ ,  $z = 4.51$ ).

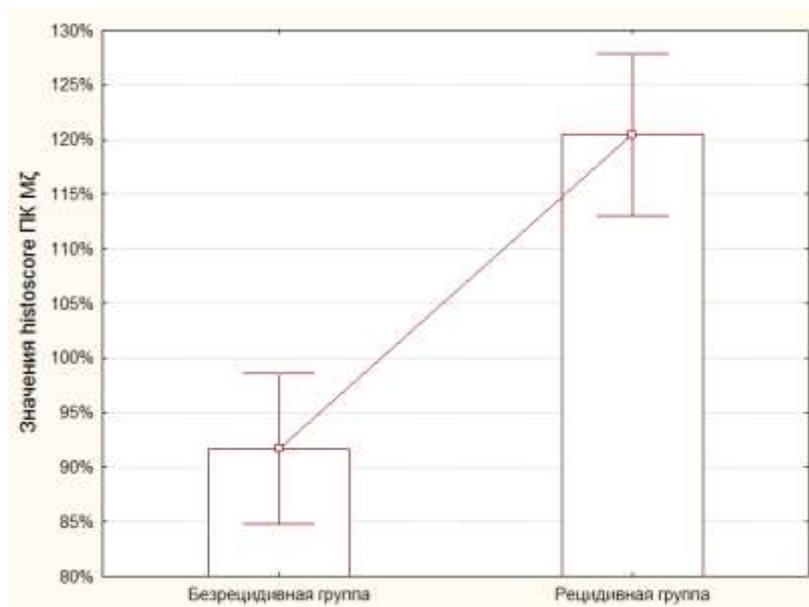


Рис. 2. Значения histoscore ПК Мζ в БРГ и РГ. Данный показатель статистически достоверно выше в РГ, чем в БРГ ( $p=0.000006$ ,  $z=4.51$ )

#### Корреляция значений ПКЭ Мζ и histoscore ПК Мζ с временем до возникновения рецидива

При определении корреляционной зависимости между значениями ПКЭ Мζ и временем до возникновения рецидива было выявлено, что между данными показателями существует обратная корреляционная зависимость высокой степени ( $r=-0.9488$ ) (рисунок 3А). Кроме того, при оценке наличия и выраженности корреляционной зависимости между histoscore ПК Мζ и временем до возникновения рецидива было обнаружено наличие обратной корреляционной зависимости между рассматриваемыми показателями также высокой степени ( $r=-0.9994$ ) (рисунок 3Б).

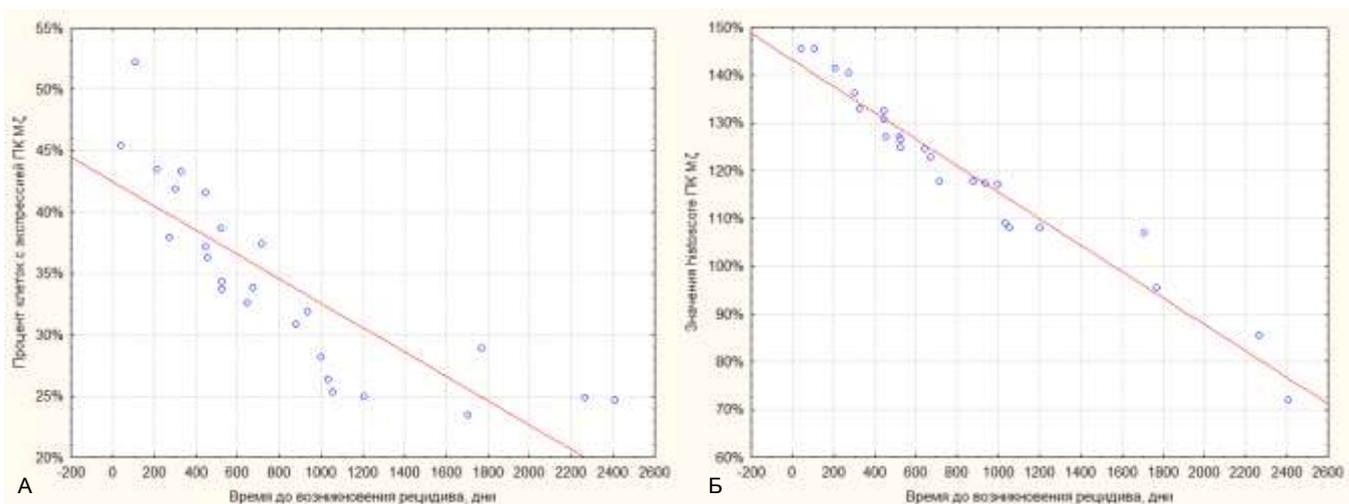


Рис. 3. Корреляция между показателями активности экспрессии ПК Мζ и временем до возникновения рецидива. А - выявляется наличие обратной корреляции между значениями процента клеток, позитивных для маркера ПК Мζ, и временем до возникновения рецидива высокой степени выраженности ( $r=-0.9488$ ). Б - выявляется наличие обратной корреляции

*между значениями histoscore ПК Мζ и временем до возникновения рецидива высокой степени выраженности ( $r=-0.9994$ )*

### *Обсуждение*

Наиболее активно в рамках исследований ПА изучению подвергаются генетические модификации и перестройки. В пилоидных астроцитомах, как уже указывалось выше, наиболее принципиальными являются перестройки с участием гена *BRAF*. Чаще других выявляется слияние генов *KIAA1549-BRAF*, существенно реже наблюдается мутация *BRAF* V600E.

Тем не менее важнейшие патогенетические механизмы, не только непосредственно влияющие на процесс прогрессирования опухоли, но и определяющие функциональную активность отдельных опухолевых клеток, остаются во многом плохо охарактеризованными. В данном вопросе принципиальную роль играют эффекторные механизмы, способствующие реализации основных онкогенных потенциалов, заложенных в драйверных мутациях и перестройках онкогенов.

Как показывает наше исследование, ПК Мζ может играть очень важную роль в прогрессировании опухолевого процесса. Удалось показать наличие различий в активности экспрессии ПК Мζ между группой пациентов с пилоидными астроцитомами с безрецидивным течением послеоперационного периода и группой пациентов с рецидивным вариантом опухоли. Более того, мы выявили наличие корреляционной зависимости высокой степени между активностью экспрессии ПК Мζ и временем до возникновения рецидива.

Результаты данного исследования имеют как несомненную практическую, так и большую теоретическую значимость. С клинической точки зрения удалось выявить потенциальный ценный маркер для определения прогноза безрецидивной выживаемости, что будет способствовать разработке новых подходов к диагностике и наблюдению за такими пациентами. В фундаментальном отношении было показано, что ПК Мζ действительно может играть центральную эффекторную патогенетическую роль в развитии пилоидных астроцитов, так как выраженность её экспрессии коррелирует с активностью прогрессирования опухолевого процесса. Ключевое значение в канцерогенезе делает ПК Мζ перспективной мишенью для разработки средств таргетной терапии.

*Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-29-01034 мк.*

### **Список литературы**

1. Jones D.T., Hutter B., Jäger N., Korshunov A., Kool M., Warnatz H.J., Zichner T.,

Lambert S.R., Ryzhova M., Quang D.A. et al. Recurrent somatic alterations of FGFR1 and NTRK2 in pilocytic astrocytoma. *Nat. Genet.* 2013. Vol. 45 (8). P. 927-932. DOI: 10.1038/ng.2682.

2. Louis D.N., Perry A., Reifenberger G., von Deimling A., Figarella-Branger D., Cavenee W.K., Ohgaki H., Wiestler O.D., Kleihues P., Ellison D.W. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol.* 2016. Vol. 131 (6). P. 803-820. DOI: 10.1007/s00401-016-1545-1.

3. Matyja E., Grajkowska W., Stępień K., Naganska E. Heterogeneity of histopathological presentation of pilocytic astrocytoma - diagnostic pitfalls. A review. *Folia Neuropathol.* 2016. Vol. 54 (3). P. 197-211. DOI: 10.5114/fn.2016.62530.

4. Zeng L., Webster S.V., Newton P.M. The biology of protein kinase C. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2012. Vol. 740. P. 639-661. DOI: 10.1007/978-94-007-2888-2\_28.

5. Hernandez A.I., Blace N., Crary J.F., Serrano P.A., Leitges M., Libien J.M., Weinstein G., Tcherapanov A., Sacktor T.C. Protein kinase M zeta synthesis from a brain mRNA encoding an independent protein kinase C zeta catalytic domain. Implications for the molecular mechanism of memory. *J. Biol. Chem.* 2003. Vol. 278 (41). P. 40305-40316.

6. Sacktor T.C., PK Mzeta, LTP maintenance, and the dynamic molecular biology of memory storage. *Prog Brain Res.* 2008. Vol. 169. P. 27-40. DOI: 10.1016/S0079-6123(07)00002-7.

7. Wang Y.X., Zhang X.R., Zhang Z.J., Li L., Xi G.J., Wu D., Wang Y.J. Protein kinase M $\zeta$  is involved in the modulatory effect of fluoxetine on hippocampal neurogenesis in vitro. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 2014. Vol. 17 (9). P. 1429-41. DOI: 10.1017/S1461145714000364.

8. Hartsink-Segers S.A., Beaudoin J.J., Luijendijk M.W., Exalto C., Pieters R., Den Boer M.L. PKC $\zeta$  and PKM $\zeta$  are overexpressed in TCF3-rearranged paediatric acute lymphoblastic leukaemia and are associated with increased thiopurine sensitivity. *Leukemia.* 2015. Vol. 29 (2). P. 304-311. DOI: 10.1038/leu.2014.210.