

**Федеральное государственное бюджетное учреждение  
«РОССИЙСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР РЕНТГЕНРАДИОЛОГИИ»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации**

**Регентова Ольга Сергеевна**

**ПОВТОРНАЯ ЛУЧЕВАЯ ТЕРАПИЯ ПРИ ВОЗОБНОВЛЕНИИ РОСТА  
ОПУХОЛЕЙ СТВОЛА ГОЛОВНОГО МОЗГА У ДЕТЕЙ И ПОДРОСТКОВ**

**14.01.13 – лучевая диагностика, лучевая терапия**

**14.01.12 - онкология**

**Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук**

**Научные руководители:**

**Д.м.н., профессор      О.И.Щербенко**

**Д.м.н.                      Т.Р.Измайлов**

**Москва – 2019**

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ПРОБЛЕМЫ ДИАГНОСТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ ОПУХОЛЕЙ СТВОЛА ГОЛОВНОГО МОЗГА У ДЕТЕЙ И ПОДРОСТКОВ. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	10
1.1. Анатомия ствола мозга.....	10
1.2. Клинические проявления опухоли ствола мозга.....	11
1.3. Рентгенологическая и морфологическая диагностика опухолей ствола мозга.	
1.4 . Молекулярно-генетическая диагностика опухолей мозга.....	15
1.5. Современное состояние проблемы лечения опухолей ствола мозга.....	28
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	36
2.1. Дизайн исследования.....	36
2.2. Общая характеристика анализируемой группы больных ОСГМ.....	37
2.3. Методы исследования.....	41
2.4. Предлучевая подготовка больных при опухолях ствола головного мозга и методики лучевой терапии.....	42
2.5. Молекулярно-генетические методы исследования.....	46
2.6. Методы статистической обработки данных.....	50
ГЛАВА 3. ПЕРВИЧНОЕ И ПОВТОРНОЕ ЛЕЧЕНИЕ, МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ПРИ ОСГМ У ДЕТЕЙ (РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ).....	51
3.1. Результаты первичного лучевого и химиолучевого лечения.....	51
3.2. Повторное лечение при возобновлении роста опухоли ствола мозга и его результаты.....	65

3.3. Обсуждение результатов повторного лучевого и химиолучевого лечения больных ОСГМ.....	79
3.4. Результаты молекулярно-генетических исследований ДНК опухоли в плазме периферической крови методом цифрового ПЦР .....	82
3.5. Исследование динамики концентрации мутантной ДНК в периферической крови в процессе ЛТ.....	89
3.6. Обсуждение результатов молекулярно-генетических исследований .....	94
3.7. Алгоритм выработки тактики при возобновлении роста ОСГМ.....	98
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	99
ВЫВОДЫ .....	109
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	110
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	111
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ .....	111

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность работы

Опухоли ствола головного мозга (ОСГМ) относятся к числу наиболее тяжелых онкологических заболеваний у детей. Удельный вес этой патологии среди всех новообразований ЦНС в детском и подростковом возрасте составляет от 10 до 15%, но, в то же время, она является причиной смерти около 40% всех детей, заболевших опухолями головного мозга [79]. Пик заболевания приходится на 7-8 лет, частота заболеваний примерно одинакова для лиц обоего пола. В 80% случаев ОСГМ локализуются в области моста и растут инфильтративно. Значительно реже, в 15-20% случаев, ОСГМ растут преимущественно экзофитно, обозначаясь как задние экзофитные цервико-медуллярные глиомы и очаговые тектальные глиомы [105]. Инфильтративно растущие ОСГМ являются наиболее тяжелой формой заболевания. Из-за близости расположения опухоли к ядрам черепно-мозговых нервов и проводящим путям радикальное хирургическое лечение сопряжено с риском тяжелой инвалидизации и даже смерти больного, поэтому основным методом лечения ОСГМ в настоящее время являются лучевая и химиолучевая терапия, с помощью которых можно временно улучшить качество жизни многим больным [43]. Однако, у большинства пациентов в различные сроки после лечения опухоль возобновляет рост. Медиана стабилизации роста опухоли после такой терапии составляет 6 мес. [87], а медиана продолжительности жизни (МПЖ) не превышает 12 месяцев [108]. В ситуации, когда после короткого периода относительного благополучия, достигнутого в результате консервативной терапии, наступает ухудшение состояния ребенка, перед врачом встает сложная проблема оказания реальной помощи больному. Выбор невелик: или отправить больного в паллиативное отделение, или попытаться облегчить его состояние и продлить жизнь, о чем, как правило, и просят родители ребенка. Поиск наиболее рациональных и эффективных вариантов оказания помощи таким детям определяет актуальность

исследования. Возможности такого поиска в последнее время расширяются с получением новых данных о молекулярно-генетических характеристиках опухолей мозга, использование которых может быть ключевым моментом в разработке методов таргетной терапии. Однако при ОСГМ препятствием на этом пути встает проблема трудностей морфологической верификации структуры ОСГМ. Хотя уже доказана относительная безопасность и целесообразность выполнения в специализированных центрах, в рамках научного поиска, стереотаксической биопсии ОСГМ, но широкого применения этот метод пока не получил [87]. Всего 10-15% пациентам удается выполнить хирургическое вмешательство в объеме СТБ. Альтернативой этому методу является использование жидкостной биопсии, которая заключается в исследовании содержания маркеров опухоли в биологических жидкостях. По данным литературы имеется зависимость между наличием в крови мутаций в генах IDH 1-2, H3, ATRX, BRAF, TERT, метилированием промотера гена MGMT и эффективностью лечения глиальных опухолей полушарных локализаций [61, 71]. Но, на сегодняшний день, при несомненной перспективности поисков молекулярных мишеней для таргетной терапии, задача оказания помощи детям при возобновлении роста ОСГМ остается актуальной. Наиболее реальным вариантом этой помощи представляется повторная лучевая терапия, тактика которой до сих пор не разработана. До сих пор не сформулированы показания и противопоказания к повторному облучению, не определены допустимые границы предельных доз и оптимальные варианты фракционирования, не уточнена роль выявленных при других глиомах молекулярных характеристик опухоли в эффекте лучевой терапии ОСГМ. Все изложенное определяет актуальность данного исследования.

## **Цель исследования**

Повышение эффективности лечения опухолей ствола головного мозга у детей и подростков путем разработки алгоритма повторной лучевой терапии на основе клинико-рентгенологических и молекулярно-генетических факторов.

## **Задачи исследования:**

1. Оценить прогностическое значение ряда клинических и рентгенологических характеристик заболевания при первичном и повторном лечении детей и подростков больных ОСГМ для определения показаний к повторному лечению при возобновлении роста опухоли.

2. Изучить переносимость и результаты повторной радиотерапии у детей и подростков с продолженным ростом ОСГМ.

3. Изучить возможность использования метода цифровой капельной ПЦР по плазме периферической крови для диагностики и прогнозирования течения ОСГМ.

4. Разработать алгоритм повторного комплексного лечения детей с продолженным ростом ОСГМ с учетом состояния клинических и молекулярно-генетических параметров.

## **Научная новизна исследования**

1. Впервые изучено значение ряда клинико-рентгенологических параметров для прогноза опухолей ствола головного мозга.

2. Оценена возможность и эффективность проведения повторной лучевой и химиолучевой терапии при возобновлении роста ОСГМ у детей и подростков.

3. Впервые с помощью метода «жидкостной биопсии» исследовано наличие и динамика в крови в процессе лечения у детей с ОСГМ мутаций в молекулярно-генетических маркерах BRAF, H3F3A, IDH1.

4. Впервые предпринята попытка оценить прогностическую значимость данных маркеров в течении и исходе заболевания у детей с ОСГМ.

5. Впервые разработан алгоритм принятия решения о тактике лечения детей и подростков при возобновлении роста опухолей ствола головного мозга.

### **Практическая значимость работы**

- разработан алгоритм определения показаний и противопоказаний к повторному лучевому лечению детей и подростков при возобновлении роста ОСГМ;

- продемонстрирована возможность и информативность получения данных о молекулярно-генетических особенностях ОСГМ по плазме крови с помощью метода «жидкостной биопсии» и их использования в диагностике и раннем выявлении возобновления процесса;

### **Положения, выносимые на защиту:**

1. При возобновлении роста ОСГМ повторная лучевая терапия в режиме традиционного фракционирования в суммарных дозах до 45 Гр позволяет в большинстве случаев улучшить качество жизни больного и увеличить ее продолжительность без клинически значимого риска развития радиационных повреждений.

2. Молекулярно-генетические исследования методом цифровой капельной ПЦР позволяют с высокой достоверностью определять наличие мутантной ДНК опухоли в плазме периферической крови и могут быть использованы для диагностики, прогнозирования течения заболевания и оптимизации лечебной тактики при ОСГМ.

### **Апробация работы:**

Основные положения работы доложены в устных докладах и материалах следующих конференций и конгрессов:

Научно-практическая конференция РНЦРР с международным участием «Инновационные методы адьювантной и неоадьювантной радиотерапии в лечении злокачественных новообразований у взрослых и детей» (Москва, ноябрь 2018г.);

Научно-практическая конференция РНЦРР «Возможности лучевой терапии при возобновлении роста опухоли ствола головного мозга у детей» ФГБУ «Российский научный центр рентгенорадиологии» МЗ РФ (Москва, февраль 2019г.).

Международный съезд Siop Asia 2019 (Абу-Даби, апрель 2019г.);

XXVI Российский национальный конгресс «Человек и лекарство». Симпозиум «Молекулярно-биологические маркеры опухолей в онкологической клинике» (Москва, апрель 2019г.);

Апробация диссертации состоялась 15 апреля 2019 г. на совместном заседании научно-практической конференции ФГБУ «Российский научный центр рентгенорадиологии» МЗ РФ, протокол № 49. Работа рекомендована к защите по двум специальностям: 14.01.13 – лучевая диагностика, лучевая терапия и 14.01.12 - онкология.

### **Внедрение результатов исследования**

Результаты исследования внедрены в практику работы отделения комплексных методов лечения онкологических заболеваний у детей ФГБУ «РНЦРР» МЗ РФ.

### **Публикации:**

По теме диссертации опубликовано 6 печатных работ, из них 5 - в рецензируемых научно-практических журналах, рекомендуемых ВАК РФ для публикации результатов диссертационных исследований.

### **Объем и структура диссертации**

Диссертация изложена на 125 стр. машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, 3-х глав (обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты и их обсуждение), заключения, выводов, практических рекомендаций и библиографического указателя (117 источников: 4 отечественных и 113 зарубежных). Работа иллюстрирована 34 таблицами и 33 рисунками.

# ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ПРОБЛЕМЫ ДИАГНОСТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ ОПУХОЛЕЙ СТВОЛА ГОЛОВНОГО МОЗГА У ДЕТЕЙ И ПОДРОСТКОВ. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

## 1.1. Анатомия ствола мозга

Этот самый древний отдел мозга расположен в каудальной (хвостовой части) головного мозга, ближе всего к спинному мозгу, в который он непосредственно и переходит. Ствол головного мозга (рис. 1) (*truncus encephali*) подразделяется на три отдела: продолговатый мозг (*medulla oblongata*), мост (*pons*) и средний мозг (*mesencephalon*) [2].

Ниже продолговатого мозга, его продолжением, вплоть до 2 поясничного позвонка является спинной мозг. Выше среднего мозга находится промежуточный мозг, и они разделены между собой мостом.

Из ствола выходят (и входят, соответственно), 10 пар черепно-мозговых нервов (ЧМН) с каждой стороны. Всего у человека 12 пар этих нервов, но первые две пары – обонятельные и зрительные нервы, являются непосредственно выростами мозга. Функцией структур ствола головного мозга является координация и управление этими разнообразными нервами. В небольшом объеме ствола «запрессовано» и сконцентрировано большое количество проводящих путей. Все, что связывает голову с телом, проходит через структуры ствола по чувствительным, двигательным и вегетативным пучкам. Некоторые из этих путей на своем пути образуют переход на противоположную сторону ствола, некоторые переключаются на другие нейроны. Эти анатомические особенности ствола обуславливают тяжесть клинических проявлений его заболеваний и ограниченность возможностей их радикального лечения

## 1.2. Клинические проявления опухоли ствола мозга

Растущая внутри ствола опухоль давит на жизненно важные центры и на окружающие ствол структуры, что и обуславливает клиническую картину заболевания. Классическими симптомами ОСГМ является триада, состоящая из парезов черепно-мозговых нервов (преимущественно VI и VII пары), признаков повреждения длинного тракта (гиперрефлексии, клонуса, гипертонуса, рефлекса Бабинского) и атаксии [87].

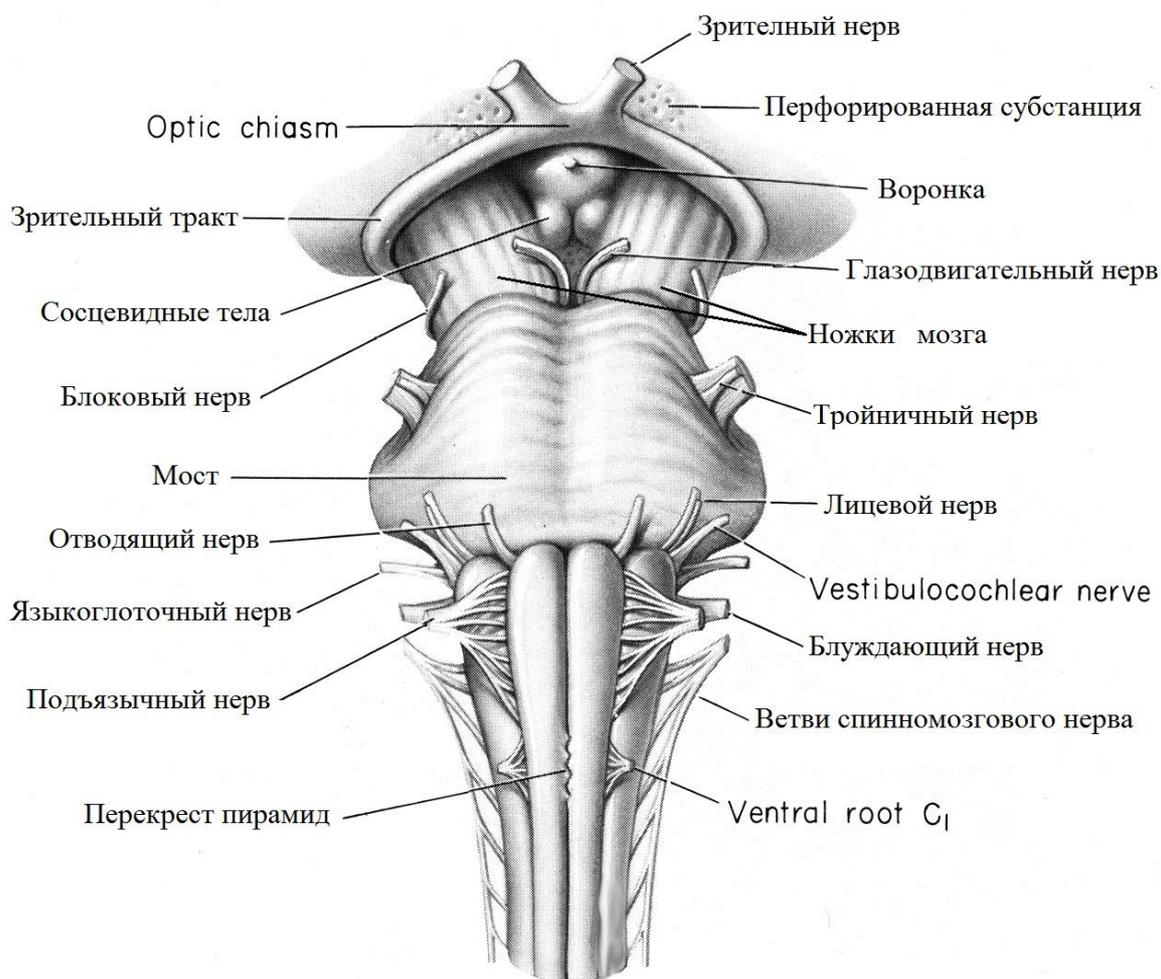


Рисунок 1 – Схема ствола головного мозга.

Наиболее частым первым симптомом является парез VI ЧМН нерва, проявляющийся косоглазием и диплопией с последующим появлением признаков вовлечения в процесс других ЧМН: асимметрии рта при улыбке, шаткости

походки, слабости, нарушения баланса [111]. Примерно у трети детей в момент первичной диагностики имеются симптомы повышения внутричерепного давления за счет сдавления Сильвиева водопровода растущей опухолью. В некоторых случаях локальным симптомам предшествуют общемозговые симптомы в виде периодической головной боли, сонливости или бессонницы, изменений поведения. Обычно симптомы развиваются быстро и длительность анамнеза не превышает 3-х месяцев. Более длительный анамнез свидетельствует о необходимости исключения иной патологии [44, 47].

### **1.3. Рентгенологическая и морфологическая диагностика опухолей ствола мозга**

Наличие описанных неврологических симптомов является показанием к выполнению КТ и головного мозга с контрастным усилением. Типичная картина ОСГМ выглядит как наличие образования плотной или неравномерной структуры, расположенного внутри моста. Инфильтрация может распространяться на средний мозг, зрительные бугры, ножки мозжечка. Продолговатый мозг редко вовлекается в процесс, за исключением цервикомедуллярных глиом. На КТ головного мозга ОСГМ выглядит как изоденсивное или гиподенсивное образование без кальцинатов. На МРТ опухоль обычно представляется как гипоинтенсивное образование в режиме T1 и гиперинтенсивное в режимах T2 и Flair. Степень накопления контрастного вещества может быть различной и этот критерий мало помогает в установлении природы образования [105]. Часто наблюдается сдавление и смещение опухолью базилярной артерии [87]. При магнитно-резонансной спектроскопии выявляется умеренное усиление уровня холина и снижение уровня N-ацетиласпартата. В работе Steffen-Smith E.A. et al. [100] установлено, что изменение соотношения между холином и N-ацетиласпартатом в пользу первого является прогностически неблагоприятным признаком. Петехиальные кровоизлияния в опухоль

наблюдаются часто, но они редко проявляются клинически и обнаруживаются только при помощи высокочувствительных магнитно-резонансных методик [65]. В некоторых случаях появление первых симптомов обусловлено кровоизлиянием в опухоль, которое хорошо диагностируется при нативной МРТ. Могут быть признаки некроза опухоли с образованием кист. По характеру рентгенологического изображения выделяется два основных типа ОСГМ: солидный и солидно-кистозный.

Важное место в диагностике ОСГМ в настоящее время занимает позитронно-эмиссионная томография с метионином, меченым С-11. По данным Kwon J.W. et al. [57] имеется зависимость степени накопления контрастного вещества от степени злокачественности: чем более интенсивно накапливается контраст, тем больше данных за наличие глиобластомы или анапластической астроцитомы. Однако, имеются и другие данные: в работе Tinkle C.L. et al. [104] на материале результатов обследования 22 детей на выявлено зависимости между характером изображения опухоли на ПЭТ и показателями выживаемости.

Растущая преимущественно кзади ОСГМ сдавливает Сильвиев водопровод и затрудняет ток ликвора, приводя к повышению внутричерепного давления, проявляющегося общемозговыми симптомами. Наличие и степень выраженности по данным КТ и МРТ обструктивной гидроцефалии является показанием к выполнению ликвороотводящих операций (постановка вентрикулоперитонеального шунта или перфорация дна 3-го желудочка). По данным Roujeau T. et al. из 51 ребенка с ОСГМ гидроцефальный синдром, потребовавший выполнения ликвороотводящих операций, наблюдался у 11 (22%). Медиана срока развития этого осложнения от начала первых симптомов заболевания составили 3,2 мес. У 9 детей был наложен вентрикулопериотенальный шунт и у 2-х перфорация дна 3-го желудочка [88].

Морфологическая верификация структуры ОСГМ связана с риском повреждения структур ствола и поэтому ранее применялась редко. В последние годы, с совершенствованием методик стереотаксической биопсии (СТБ), она

используется достаточно широко при проведении научных исследований, поскольку получение гистологического материала позволяет глубже понять особенности опухоли, ее молекулярную структуру и разрабатывать методы таргетной терапии [85]. В ряде исследований показана высокая эффективность и относительная безопасность данной процедуры [81, 89]. Лучшей мишенью для забора материала при СТБ является гипоинтенсивная зона, накапливающая контрастное вещество на МРТ в режиме T2, поскольку эти признаки свидетельствуют о наличии очаговой анаплазии [64].

По гистологической структуре ОСГМ в большинстве случаев принадлежат к глиомам Gr III-IV [15]. Buczkowicz P. et al. изучили 72 гистологических препарата ОСГМ, в том числе 53 полученных в результате аутопсии и 19 в результате прижизненной стереотаксической биопсии (СТБ). В 62 пробах имелась глиома высокой степени злокачественности (в 18 астроцитомы Gr III и в 44 глиобластомы). В 8 случаях обнаружена астроцитома Gr II и в 2-х примитивная нейроэктодермальная опухоль [15]. Метастазы по кранио-спинальной оси при первичной диагностике обнаруживаются относительно редко, и плановое обследование всего объема ЦНС считается оправданным только при наличии клинических симптомов диссеминации [95]. По мере прогрессии опухоли вероятность появления метастазов возрастает и при аутопсии они выявляются у трети умерших [42]. Дифференциальный диагноз ОСГМ по клинико-рентгенологическим данным проводится с другими вариантами глиом этой локализации: очаговыми глиомами среднего мозга, дорзальными экзофитными глиомами, цервикомедуллярными глиомами. Характер роста перечисленных нозологий зависит от локализации образования и анатомических барьеров. Очаговые опухоли среднего мозга обычно отграничены тектальной пластинкой, дорзальные экзофитные растут в полость 4-го желудочка, цервико-медуллярные опухоли исходят из верхнего отдела спинного мозга и распространяются вверх и вниз [13]. Другими заболеваниями, с которыми необходимо дифференцировать диффузные глиомы ствола головного мозга (ДИГСГМ), являются

демиелинизирующие, сосудистые и инфекционные заболевания, сопровождающиеся похожей клинической картиной при их локализации в области моста [4, 40].

#### **1.4. Молекулярно-генетическая диагностика опухолей мозга**

Наряду с использованием в диагностике внутричерепных опухолей клиничко-рентгенологических методов и морфологических методов, в настоящее время интенсивно разрабатываются методики изучения особенностей структуры новообразований на молекулярном уровне. Существенные усовершенствования в методах молекулярной биологии привели к прогрессу в понимании молекулярной биологии новообразований ЦНС. Нигде это не демонстрируется так ясно, как в нейроонкологии, где молекулярная диагностика и появившиеся молекулярные маркеры теперь способны предоставить клинически полезную информацию и прогностические значения, выходящие за рамки возможностей гистологической классификации [112]. Перспективой этих исследований может быть создание программ уточненной дифференциальной диагностики, прогнозирования и персонализированной, в том числе и таргетной, терапии [113]. Проведенные в последние годы молекулярно-генетические исследования опухолей мозга позволили выявить ряд полезных для диагностики и планирования лечения маркеров при различных морфологических вариантах. Роль одного из важных молекулярных маркеров в нейроонкологии отводится гену BRAF [77].

##### **Мутации в гене BRAF**

Протоонкоген BRAF - часть семейства сериновых/треониновых протеинкиназ, которые участвуют в MAPK/ERK сигнальном пути, регулируют клеточную дифференцировку, пролиферацию и миграцию [82] и играют важнейшую роль в патогенезе различных видов рака [1]. В нейроонкологии, наиболее диагностически ценными являются следующие мутации в гене BRAF:

соматическая точечная мутация BRAF-V600E и соматическая fusion-мутация — генов KIAA1549-BRAF (рис. 2, 3) [36, 91].

### **Точечная соматическая мутация V600E в гене BRAF**

Мутации BRAF-V600E чаще всего встречаются в плеоморфной ксантоастроцитоме, ганглиоглиоме, эпителиоидных глиобластомах и глиомах, диагностированных в более молодом возрасте. Мутация V600E присутствует у 15% диффузно инфильтративных педиатрических астроцитом II-IV степени злокачественности [80], в тоже время эта мутация встречается меньше чем у 2% из соответствующих взрослых глиом [16, 59, 110]. Частота обнаружения мутации возрастает до 25% в педиатрических и взрослых ганглиоглиомах и достигает рекордного максимума - около 80%- в плеоморфных ксантоастроцитомах [29, 99, 110]. У пациентов с пилоцитарной астроцитомой (ПА), не зависимо от возраста, частота выявления мутации составляет около 10% [52, 92].

Мутация BRAF- V600E, распространена в подмножестве глиом и может представлять собой потенциальный прогностический маркер. По данным мета-исследования [109], основанного на анализе 11 статей и 1308 пациентов с глиомой, было показано, что мутация V600E в гене BRAF связана с улучшением общей выживаемости (OS) у пациентов (HR = 0,60; 95% CI = 0,44–0,80). Результаты выживаемости без прогрессирования (PFS), однако, не были статистически значимыми (HR = 1.39; 95% CI = 0.82–2.34). При разделении пациентов по группам, основанным на возрасте, наличие мутации V600E в гене BRAF ассоциировалось с улучшение выживаемости у детей и в группе молодых взрослых (до 35 лет), но не имело прогностического значения у пожилых пациентов. Кроме того, мутация V600E BRAF была связана только с благоприятным прогнозом при глиомах более низкой степени злокачественности. Проведенный мета-анализ свидетельствует о том, что мутация V600E в гене BRAF оказывает благоприятное прогностическое влияние на глиомы и ее прогностическая ценность может зависеть от возраста пациента и степени злокачественности опухоли. Мутация V600E может быть использована в качестве

прогностического фактора при глиоме, но необходимы дополнительные исследования для уточнения ее прогностической ценности с учетом других факторов [115].

### **Соматическая fusion-мутация генов KIAA1549-BRAF**

Нарушение активности BRAF так же происходит за счет соматической fusion-мутация — генов KIAA1549-BRAF (рис. 2). Эта мутация обычно происходит путем 2 Mb тандемной дупликации на хромосоме 7q34 [14, 54, 97], вызывающей слияние генов BRAF:KIAA1549 и приводит к усилению нисходящего сигналинга (MEK/ERK) [36]. В результате такой тандемной дупликации N-терминальный регуляторный регион BRAF заменяется на N-терминальный конец гена KIAA1549, и оставшийся киназный домен BRAF становится активным. Слияние генов KIAA1549-BRAF является наиболее распространенным изменением BRAF в пилоцитарной астроцитоме (ПА) и обнаруживается в ~ 70% ПА. Идентификация fusion-мутации KIAA1549-BRAF используется как диагностический маркер ПА, с помощью метода FISH. Мутация KIAA1549-BRAF широко представлена при опухоли в мозжечке (>90%) и менее распространена при супратенториальных новообразованиях [26].

### **Использование ингибиторов BRAF первого поколения в нейроонкологии**

Ингибиторы BRAF первого поколения (BRAFi) показали эффективность в лечении больных меланомой с метастазами в мозг и в настоящее время проходят клинические испытания для лечения детских первичных опухолей мозга с мутацией BRAF-V600E. Первичные опухоли головного мозга с мутацией KIAA1549-BRAF не должны лечиться с использованием BRAFi первого поколения из-за парадоксальной активации Ras-Raf-MEK-ERK пути [16].

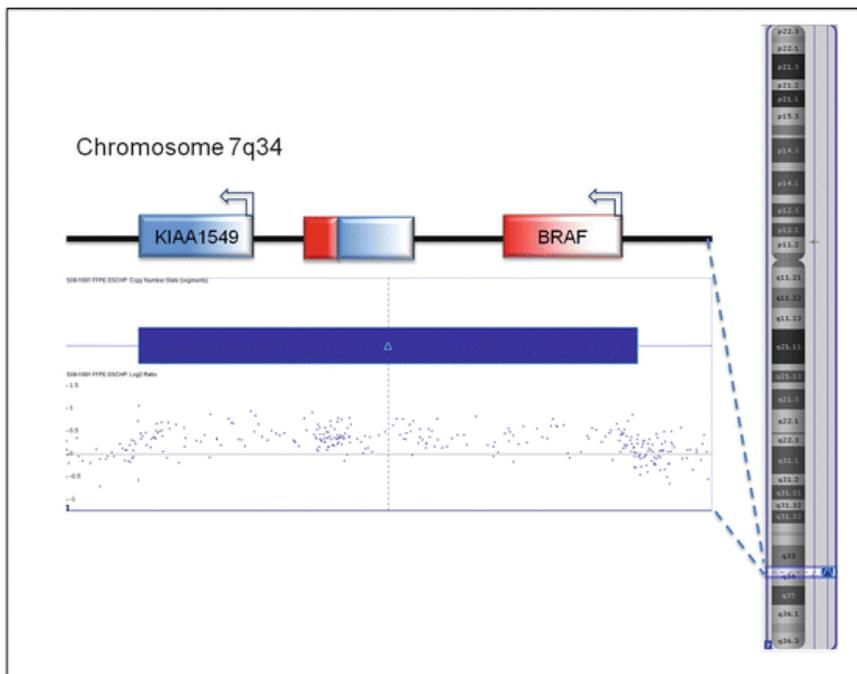
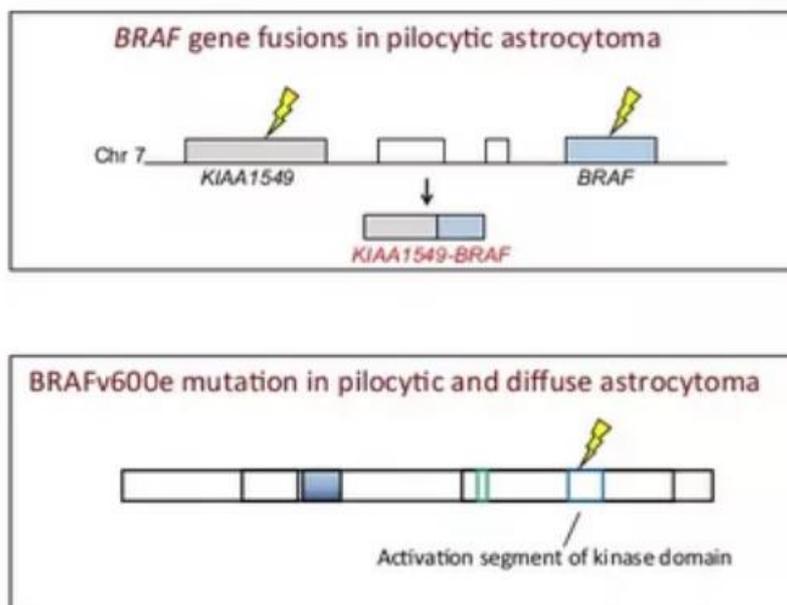


Рисунок 2 – KIAA1549 - BRAF Fusion. Слияние происходит в результате тандемного дублирования сегмента 2 МБ хромосомы 7q34. Он объединяет N-концевую половину KIAA1549 и киназный домен в С-концевой половине BRAF.



Forsheew et al, J. Pathol 2009

Рисунок 3 – Мутации в гене BRAF.

## Мутации в гене IDH1.

При глиомах, составляющих 64% всех злокачественных опухолей ЦНС, установлено значение для прогноза состояния гена IDH1 и степень метилирования промотера гена 06 метилгуанин-ДНК-метилтрансферазы (MGMT). Mu L. et al. изучили методом иммуногистохимии наличие мутации гена IDH1 R132H в 55 парах гистологических препаратов первичных и рецидивовавших астроцитарных опухолей. В 5 парах имела место пилоцитарная астроцитома, в 35 астроцитома II-III степени злокачественности и в 15 случаях глиобластома. Во всех случаях из парных проб извлекалась ДНК и с помощью полимеразно-цепной реакции (ПЦР) изучалось состояние гена IDH1. Установлено, что процент мутаций гена IDH1 R132H в группе больных астроцитомой II-III степени злокачественности составил 68,6% (24/35), причем наличие мутации коррелировало с более длинным безрецидивным периодом, хотя не влияло на показатели выживаемости. В препаратах больных пилоцитарной астроцитомой и глиобластомой мутаций этого гена не выявлено. Изменений мутационного статуса гена IDH1 при рецидиве опухоли, в том числе и при повышении степени злокачественности, также не выявлено [73].

Установлен также факт влияния на прогноз для больных злокачественными глиомами степени метилирования промотера гена фермента метилгуанинметилтрасферазы (MGMT). Этот фермент принимает участие в репарации поврежденных молекул ДНК, что защищает клетки опухоли от цитотоксического действия химиопрепаратов и облучения. Если промотер гена метилирован, процессы репарации повреждений ДНК тормозятся и цитотоксический эффект лучевой и химиотерапии усиливается. Lee et al. провели анализ результатов лечения 12 725 больных глиобластомой, из которых у 626 (4,9%) ген MGMT был метилирован и у 1.037 (8,1%) не метилирован. Медиана продолжительности жизни и 2-х летняя выживаемость составили соответственно 20 мес. и 40,2% в первой группе и 14,6 мес. и 27,5% во второй группе [60].

Использование аутопсийного материала для целей молекулярно-генетической диагностики не может быть оптимальным вариантом не только в силу непригодности получаемых результатов для лечения конкретного пациента, но и накоплением к моменту смерти в опухоли генетических изменений, вызванных проводившейся терапией и естественной трансформацией опухоли в процессе ее прогрессирования. Так, по данным аутопсий, до 22% всех ОСГМ имеют структуру, соответствующую примитивной нейроэктодермальной опухоли, что не совпадает с результатами прижизненных исследований [114]. Прогресс в проведении молекулярно-генетического анализа опухолей мозга в настоящее время облегчен разработанными методиками получения материалов при помощи стереотаксической биопсии (СТБ). Потенциальной проблемой при использовании для анализа материалов, полученных с помощью СТБ, являются ограниченные возможности оценки и учета гетерогенности опухоли по микроскопическому участку ткани, получаемому при СТБ. Тем не менее, с разработкой методик секвенирования генома примерно в 80% проб ОСГМ удалось выявить высокорекуррентные мутации в генах, кодирующих варианты гистона H3.3 (H3F3A) и H3.1 (HIST1H3B). В результате этих мутаций происходит замена в белке K27M лизина на метионин [94, 114]. Эта замена приводит к потере метилирования в лизине 27 гистона H3 [19, 17]. Отмечено, что при локализации опухоли в срединных структурах имеет место преимущественно мутация в гистоне H3.3 K27M, в то время как при опухоли моста – мутация в H3.1 K27M. Предполагается, что эти мутации являются пусковым моментом в цепочке онкогенеза, но для формирования опухоли необходимы также мутации других генов (T53, PPM1D, фактора, ремоделирующего хроматин (ATRX), факторов роста (ACVR1, PDGFRA) [42]. Исследователи 4-х независимых групп идентифицировали примерно в 20% проб ОСГМ частые соматические мутации в рецепторах гена активина A (ACVR1), участвующего в клеточной пролиферации, дифференцировке, апоптозе, метаболизме, иммунном ответе [103]. Предполагается, что мутировавший ген ACVR1 является драйвером онкогенеза

при ОСГМ [18, 115]. Дети с выявленной ОСГМ, носители мутировавшего гена ACVR1, имеют более юный возраст, преимущественно это девочки и их продолжительность жизни больше, чем при «диком» типе данного гена [35]. Некоторые генетические мутации гена ACVR1, обозначенные как ACVR2, выявленные в ОСГМ, идентичны наблюдаемым при врожденном заболевании детей прогрессирующей оссифицирующей дисплазии, характеризующейся развитием гетеротопических оссификаций в мягких тканях, приводящих к деформации скелета [36]. В ОСГМ детей выявлены также патологические изменения в глиомогенезе, идентичные наблюдаемым у взрослых. Так же примерно в 2/3 опухолей детей выявляется мутация гена p53 и мутация в рецепторе тирозин-киназы-RAS-фосфоинозитид 3-киназы (RTK-RAS-PI3K) [13, 56].

Lu V.M. et al. обобщили результаты 6 молекулярно-генетических исследований 474 детей с ОСГМ. Наличие мутации в гене H3K27M оказалось достоверным признаком неблагоприятного прогноза [67].

Кроме исследований мутаций клеток опухоли в материале, полученном в результате биопсии, получение которого не всегда возможно, разрабатываются также методики определения генотипических особенностей опухоли по ее компонентам, выделяемым из крови и ликвора. Определение молекулярно-генетического профиля опухолей по жидким средам получило название «жидкостной биопсии» (ЖБ). Применение ЖБ при ряде внечерепных форм злокачественных опухолей показало возможности ее применения не только для диагностики, но и для оценки эффективности лечения. Это открывает перспективы для создания новых, неинвазивных, методик диагностики и мониторинга опухолей [62].

Поступление компонентов опухоли в биологические жидкости возможно в виде отдельных клеток новообразования, отделяющихся от основного массива и поступающих в кровотоки или ликворное пространство, а также за счет

фрагментов клеток, целостных цепочек и фрагментов ДНК, в том числе и в составе экзосом [98].

Выявление в ликворе и крови больных опухолями мозга циркулирующих клеток (ЦКО) стало доступным с созданием специализированной лабораторной аппаратуры [5]. Большая часть опубликованных работ относится к исследованиям наличия ЦКО при глиобластомах. Выделение ЦКО из общего количества клеток, присутствующих в ликворе или крови, технологически весьма сложно. Чаще всего используется метод «положительной селекции», основанный на определении белков на поверхности клетки при помощи антител [31]. Применение этого метода основано на определении наличия на клетке белков, специфичных для данного вида опухоли. Другим вариантом выделения из жидкой среды (крови или ликвора) является метод «отрицательной селекции», заключающийся в удалении из биологической жидкости клеток, не относящихся к данной опухоли [84]. Gao F. et al. использовали интегрированный клеточно-молекулярный способ обнаружения клеток глиобластомы в крови и выявили эти клетки у 24 из 31 пациента (77%). Авторы пришли к выводу, что частота наличия клеток глиобластомы в кровотоке значительно выше, чем выявление сформировавшихся метастазов при помощи МРТ [39]. Так в исследовании Muller S. et al. клетки глиобластомы в крови выявлены у 29 из 141 больного глиобластомой и диффузной глиомой [74]. Macarthur K.M. et al. с помощью определения промотера теломеразы на поверхности клеток обнаружили клетки опухоли у 8 из 11 (72%) злокачественной глиомой до лечения и у 1 из 8 (12%) после лучевой терапии [68]. Sullivan J.P. et al. получили ЦКО у 39% из 33 больных глиобластомой [101].

По ЦКО возможно определение природы источника метастатического поражения мозга. Lohr et al. установили, что при скрытом течении рака предстательной железы и выявлении метастазов в мозге, по ЦКО, обнаруживаемых в пробах крови, в 90% случаев возможно точно определить их принадлежность именно к этой опухоли [66].

Ограничения в использовании метода обнаружения ЦКО заключаются в необходимости использования для исследования только свежей пробы крови или ликвора и неотложного проведения исследования. Следовательно, это исследование, требующее сложной аппаратуры и обученного персонала, может проводиться только в отдельных крупных центрах, что ограничивает возможности его использования в широкой практике.

Вторым объектом для получения информации о генотипе опухоли могут быть нуклеиновые кислоты (ДНК и РНК) опухоли (ОНК) и их фрагменты, высвобождающиеся в результате спонтанной или индуцированной гибели клеток опухоли и поступающие в биологические жидкости в свободном виде или в составе «везикул», выделяемых всеми клетками организма, в том числе и клетками опухоли [33,10].

Определение ОНК в ряде случаев существенно опережает изменения на КТ. Так Dawson et al. диагностировали по данным ОНК рецидив рака молочной железы за 5 месяцев до того, как он был выявлен при КТ [28]. Аналогичные результаты получены и при раке легкого [80, 99]. Это дает возможность оценивать данные тесты как имеющие перспективы в диагностике и мониторинге злокачественных опухолей различных локализаций. С помощью данного метода возможно определить минимальное остаточное заболевание, что уже доказано при опухолях системы гемопоза [93]. Изменения в содержании ОНК в течение лучевой терапии или после ее окончания возможно использовать для оценки эффекта и прогнозирования течения заболевания [23]. Поскольку полупериод жизни ОНК в крови составляет от 0,5 до 2 часов [30], степень изменений в концентрации ОНК после первых сеансов ЛТ позволяет оценить радиочувствительность опухоли, что показано на примере рака носоглотки [63]. Динамика уровня ОНК в процессе лечения может быть основанием для изменения программы лечения или подключения других методов.

Положительные результаты исследований, направленных на определение в биологических жидкостях маркеров при раке молочной железы, легкого,

предстательной железы и других опухолей создали платформу для проведения аналогичных исследований при опухолях мозга [10].

Свободно циркулирующие ОНК также являются объектом разработки методов жидкостной биопсии при опухолях мозга. Wang Y. et al. показали, что у всех больных с интракраниальными опухолями, прилегающими к цистернальным пространствам, а также у всех больных со злокачественными глиомами, возможно определение ОНК в ликворе. Авторы обнаруживали ОНК в ликворе всех больных медуллобластомой, эпендимомой и злокачественной глиомой. При опухолях, не прилегающих к желудочковой системе, ОНК не выявлялись. По мнению авторов, люмбальный ликвор может быть наиболее реальным объектом для определения генотипа опухоли мозга по содержащейся в нем ОНК [110]. Обычно концентрация ОНК в биологических жидкостях значительно меньше, чем в клетках или ткани опухоли. Этот показатель может составлять менее чем 100 нг/мл, т.е. в одной пробе может быть только несколько молекул. Кроме того ОНК представлена в крови не в виде целых молекул, а в виде их фрагментов. В связи с этим для их определения требуются очень точные методики, позволяющие анализировать мало количество мутантных вариантов на фоне молекул дикого типа. Тем не менее, проводятся исследования, показывающие возможность обнаружения принадлежащих опухоли нуклеиновых кислот в различных биожидкостях. Huang T.Y. et al. показали, что из cerebro-спинальной жидкости внеклеточные ОНК могут быть выделены и по ним возможно определить специфические мутации в вариантах гена гистона H3. Чувствительность теста (87,5%) и специфичность (100%) были подтверждены иммуногистохимическим методом и секвенированием Сенгера в 8 образцах опухолевой ткани [49]. Chen et al. показали, что ОНК из опухоли у больных глиомой имеют более низкий, по сравнению с контролем, уровень метилирования элемента Alu и суррогатным маркером для оценки уровня метилирования геномной ДНК организма [21].

При опухолях мозга процесс поступления в плазму крови опухолевой ДНК затруднен наличием гемато-энцефалического барьера, через который большие

частицы проходят с трудом. Однако в крови и других жидкостях обнаружены другие биомаркеры, в том числе и специфичные для опухолей. В частности, последние исследования показали, что нормальные клетки и клетки опухолей мозга выделяют частицы, называемые «экзосомы» (ЭС), размером от 30 до 2000 нм, проходящие через все биологические барьеры и содержащие фрагменты ДНК, специфичные для каждого вида клеток. В обзоре Santiago-Dieppa D.R. et al. говорится, что биологические функции ЭС разнообразны: ремоделирование клеток, внутриклеточные коммуникации, изменение микроокружения опухоли, регулирование иммунных функций. ЭС рассматриваются как возможный источник макромолекул для проведения ЖБ при опухолях мозга [90]. Skog et al. сообщили, что ЭС могут быть изолированы из сыворотки крови больного опухолью мозга и в них могут быть обнаружены специфические альтерации в гене EGFR [98]. Akers J.C. et al. обнаружили экзосомы, содержащие фрагменты РНК глиобластомы, в ликворе больных этой опухолью [7]. Chen W.W. et al. с помощью специально разработанной методики BEAM нашли эти элементы не только в ликворе, но и в крови и выделили из них фрагменты мутантного гена IDH1. По их данным, чувствительность этого метода по результатам исследования ликвора составляет 63% и специфичность 100% [22]. По мнению авторов, предложенный метод представляется новым направлением в диагностике рака. Figueroa J.M. et al. сообщили, что им удалось обнаружить онкоген EGFRvII во внеклеточных ЭС с показателем чувствительности 60% и специфичности 98% [32]. Manda et al. провели аналогичное исследование с ЭС, полученными из плазмы и установили, что возможность дифференцировки опухолевой РНК от нормальной составляет 80% по критерию чувствительности и 78% по критерию специфичности [70]. Аналогичные результаты получили также Akers et al. при исследовании ЭС, полученных из спинно-мозговой жидкости [6].

Проблемой для «жидкостной биопсии» на основе выделения ЭС является сложный состав ЭС, получаемых из крови. Так установлено, что общая популяция везикул у ракового больного разнообразна и потенциально может включать

несколько субпопуляций одновременно: (1) ЭС, высвобождающиеся из делящихся опухолевых клеток. Эти везикулы имеют молекулярный профиль, аналогичный профилю опухолевых клеток, и могут информировать об опухолевом росте, эволюции или патогенезе рака; (2) ЭС, полученные из иммунных клеток. Понимание и профилирование молекулярных характеристик между иммунными везикулами и производными от опухоли, которые, как было показано, являются иммуносупрессивными, может также информировать врачей о состоянии опухоли и/или ответе на терапию; и (3) везикулы, полученные из нормальной стромы вокруг опухоли, а также всех других органов, которые прямо или косвенно затронуты присутствием опухоли [38]. Для того, чтобы точно разделить, изолировать и профилировать эти различные субпопуляции ЭС, необходимы дополнительные исследования, чтобы понять поверхностные маркеры или другие молекулярные различия, чтобы лучше дифференцировать источники и диагностическое значение обнаруженных везикул.

В исследовании Shao H. et al. [96], продемонстрирована новая технология для выявления опухоль-ассоциированных белков на поверхности ЭС. Она основана на использовании магнитных нано-частиц с прикрепленными к ним маркерами белков глиобластомы. Полученная от больного глиобластомой кровь обрабатывается этим реактивом и исследуется при помощи миниатюрной магнитно-резонансной системы. Метод обладает высокой чувствительностью и позволяет не только выделить ЭС происходящие из глиобластомы, но и определить наличие мутаций вызванных терапевтическим воздействием. С его помощью можно оперативно оценить эффективность химиотерапии и внести коррекции в ее схемы при необходимости.

### **Стандартизация и воспроизводимость методики жидкостной биопсии**

Существует насущная потребность в стандартизации процесса получения материала для ЖБ. Например, на результаты получения макромолекул при различных методах получения биологической жидкости могут влиять протоколы замораживания/оттаивания, способ сбора, время обработки, уровень гемолиза,

экспозиция консерванта и условия хранения [9]. В случае ЭС метод подсчета везикул также может давать различные результаты [8], и эту переменную следует учитывать при анализе. Еще одной причиной ограниченной воспроизводимости биомаркерных исследований является отсутствие рекомендаций и стандартизированных протоколов, и в каждом исследовании по-разному рассматриваются вопросы, касающиеся размеров когорт, влияния факторов лечения, а также выбора контрольных групп. Микрочипы, количественная полимеразная цепная реакция в режиме реального времени (qRT-ПЦР), цифровая капельная ПЦР (ddPCR) являются одними из наиболее часто используемых методов исследования биомаркеров, каждый из которых имеет свои преимущества, ограничения и недостатки, и усилия должны быть направлены на обеспечение непрерывности технологии, используемой от открытия до полной проверки эффективности анализа.

Разработка и использование методики ЖБ при опухолях мозга находится в начале пути, но имеет несомненные перспективы. Это особенно актуально при ситуациях, в которых выполнение традиционной биопсии связано с высокой опасностью осложнений. К таким ситуациям можно отнести диффузно растущие опухоли мозга и состояние после проведенного комплексного лечения. Выявление в крови и ликворе опухолевых клеток экзосом и фрагментов ДНК и РНК опухоли могут быть существенным дополнением к традиционным методам диагностики и мониторинга течения опухолей мозга. Однако сфокусированный и рентабельный анализ биомаркеров из жидких биоматериалов станет возможным по мере того, как будущие исследования продолжат выяснять, какие геномные изменения предоставляют важную клиническую информацию для выработки стратегии лечения.

## 1.5. Современное состояние проблемы лечения опухолей ствола мозга

Невозможность выполнения радикальной операции обуславливают возможность только консервативного – лучевого или химиолучевого лечения больных ОСГМ, причем лучевая терапия остается основным и наиболее эффективным компонентом, хотя в большинстве опубликованных работ используется комбинация лучевой и химиотерапии.

Лучевая терапия проводится с использованием разных режимов фракционирования дозы: традиционным по 1,8 Гр 5 дней в неделю, всего 30 фракций до суммарной дозы (СОД) 54 Гр [51, 71], средним фракционированием по 3 Гр 13- 15 раз, до СОД 39-45 Гр, 2,8 Гр x 16 до 44,8 Гр [71, 72, 116] и мультифракционирования по 1,17 Гр x 2 раза в день с 4-6 часовым интервалом до СОД 70,2 Гр [48]. Получаемые результаты, оцениваемые по показателям безрецидивного течения и выживаемости, при всех вариантах фракционирования были примерно одинаковы. Медиана продолжительности жизни после окончания лечения при всех вариантах фракционирования колебалась в пределах 7,8- 9,5 месяцев, ремиссия в течение года сохранялась примерно у 20% больных, годичный срок переживали от 12% до 36%, двухгодичный около 13% детей. В среднем длительность ремиссии составила 6,4 месяца и медиана продолжительности жизни 9,3 месяца. Осложнения при использовании фракций по 3 Гр до СОД 45 Гр в виде отека опухоли, отмечены только в работе Negretti L. et al. [76].

Неудовлетворительные результаты одной лучевой терапии заставляют большинство авторов использовать комбинацию лучевой терапии с различными химиопрепаратами, которые применяются как перед лучевой терапией, так и в процессе ее и после ее окончания [48]. Результаты этих исследований представлены в таблице 1. Как видно из данных из этой таблицы, в среднем результаты химиолучевого лечения с использованием различных препаратов и их комбинаций незначительно отличаются от результатов лучевой терапии, за

Таблица 1 – Сводные данные результатов химиолучевого лечения ОСГМ.

Автор	Год	N	ЛТ Гр	ХТ	Осложнени я	Медиа на OS мес.	Медиа на PFS мес.	Ремис сия12 мес. %	OS более (%)	
									12 мес.	24 мес.
Kim C.Y. et al. [55]	2010	17		TMZ+талидомид	миелодепрессия	12,7	7,2		58,3	25
Michalski A et al. [72]	2010	31	54	тамоксифен	нет	6,3		3,2	16,1	
Cohen K. et al. [25]	2011	63		TMZ	миелодепрессия		9,6	14	40	
Haas-Kogan A. et al. [46]	2011	40		типифарниб	лимфопения	8,3	6,8	12,9	34,3	
Chassot A. et al. [20]	2012	21	54	TMZ	миелодепрессия	11,7	7,5	33	50	
Bailey S. et al. [12]	2013	43	54	TMZ	миелодепрессия	9,5			35	5
Zaky W. et al. [45,117]	2013	6		карбоплатин+ TMZ после ЛТ иринотекан+ TMZ +BVZ	миелодепрессия	14,6	10,6			
Müller K. et al. [75]	2014	6 с mts	54/3 5	TMZ	миелодепрессия перерыв 4 случая	7,6+/-3,5	4			
Porkholm M. et al. [83]	2014	41		топотекан+талид омид+этопозид+ целестроксиб	не указано	12			61	17
Rizzo D et al. [86]	2015	15		TMZ	миелодепрессия		7,5			
Hummel T.R. et al. [50]	2016	15	+	TMZ	миелодепрессия ,гепатотоксично сть,	10,4				
Gokce-Samar Z et al. [41]	2016	16		НАПХТ BCNU+ цисплатин+мето трексат	миелодепрессия	16,1	8,6			
Veldhuijzen van Zanten SEM et al. [107]	2017	9		гемцитабин	не указано	8,7	4,8			
Gokce-Samar Z et al. [41]	2016	9		эрлотиниб, циленгитид или нимотузумаб и винбластин	не указано	8,8	3			
Масу М.Е.1 et al. [69]	2017	45	59,4	иринотекан+ цетуксимаб	не указано			29,6		
<b>Среднее</b>		<b>436</b>				<b>9,5</b>	<b>6,9</b>	<b>18,5</b>	<b>34,7</b>	<b>18</b>

исключением большей токсичности и значительных финансовых затрат. Некоторое, статистически недостоверное, улучшение отмечено только при использовании перед лучевой терапией неoadьюватной полихимиотерапии [82]. Наиболее часто применяемым препаратом в последние годы был темозоламид, который также не улучшил результаты, что позволило Rizzo D et al. [86] в заголовок их статьи поставить окончание «broken promise» - «невыполненное обещание». Применение некоторых таргетных препаратов: эрлотиниба, нимотузумаба, целекоксиба, бевацезумаба также не привело к статистически значимому положительному результату. Однако, бевацезумаб в комплексе с темозоламидом продолжает использоваться достаточно широко, поскольку он проявил способность уменьшать перифокальный отек и улучшать состояние больных.

В таблице 2 приведены средние результаты лучевой и химиолучевой терапии. Как видно из этой таблицы, они примерно одинаковы [24, 46, 55].

Таблица 2 – Средние результаты лучевой и химиолучевой терапии ОСГМ [24].

Вариант лечения	Средняя продолжительность жизни	Средняя длительность ремиссии	Ремиссия 12 мес.	Пережили срок	
				12 мес.	24 мес.
Лучевая терапия	9,4 месяца	6,4 месяца	20,2%	22,2%	12,8%
Химиолучевая терапия	9,5 месяца	6,9 месяца	18,5%	34,7%	18%

Анализ опубликованных результатов лучевого и химиолучевого лечения показывает, что в настоящее время для большинства больных ОСГМ прогноз остается плохим. Лучевая и химиолучевая терапия, в равной степени, для большинства больных позволяют временно уменьшить выраженность симптомов, а сроки жизни зависят в основном от степени агрессивности опухоли. Длительная

стабилизация и, соответственно, длительные сроки жизни возможны только для 10- 20% больных , имеющих опухоли низкой степени злокачественности.

Имеются указания, что прогноз несколько лучше у детей моложе 3-х лет [71, 102] что, очевидно обусловлено более доброкачественной морфологической структурой врожденной опухоли у этих больных. В работе Lindsey M. et al. собрана информация о 1008 детях, получавших лечение в различных странах. Из них только 101 (10%) пережили 2-х летний срок. Медиана продолжительности жизни составила 11 месяцев. Пережили сроки 1, 2, 3, 4 и 5 лет соответственно 42,3%, 9,6%, 4,3%, 3,2% и 2,2%. Биопсия и гистологическое исследование после аутопсии было выполнено в 376 случаях. Из них в 181 случаев выполнено молекулярно-генетическое исследование и в качестве благоприятного прогностического признака определена мутация в гистоне HIST1H3B [62].

Возобновление роста ОСГМ, наблюдаемое у большинства детей после полученного хорошего эффекта первичного лечения ставит перед врачом сложную задачу оказания им реальной помощи для улучшения качества и продолжительности жизни. Наиболее популярной группой медикаментов, применяемых с этой целью, являются кортикостероидные гормоны (чаще всего дексаметазон). Кортикостероидные гормоны эффективно уменьшают выраженность перифокального отека, в том числе и индуцируемого парезом сосудов в процессе лучевой терапии, и улучшают качество жизни. Однако они обладают значительными побочными эффектами, особенно при длительном применении: нарушением сна, изменениями поведения, повышением аппетита, развитием синдрома Кушинга с образованием стрий и «лунообразного» лица, остеопорозом, нарушением функции печени, снижением иммунитета. Все эти явления существенно нарушают качество жизни детей, что заставляет тщательно оценивать пользу и риск их применения в каждом случае. К сожалению, до сих пор стратегия и алгоритм использования стероидов у данной категории больных не разработаны и большинство авторов при их назначении руководствуются собственным опытом и клиническими обстоятельствами. В работе Veldhuijzen van

Zanten S.E. et al. [106], основанной на анализе публикаций и многонационального опыта 150 специалистов и показано, что только 7% из них руководствуются клиническими рекомендациями. В 85% случаев респонденты сообщили о констатации выраженных побочных эффектов. Границы между риском и пользой их применения не определены.

Второй возможностью улучшения качества жизни детей, больных ОСГМ является проведение повторного курса лучевой терапии [11]. Это лечение требует определенного мужества у врача и родителей ребенка, поскольку теоретически велик риск развития радиационных повреждений структур ствола мозга после уже проведенного облучения в дозе 54-70 Гр. По данным Cooney T. et al., собравшим данные о 235 детях, получавших лечение по поводу ОСГМ, медиана продолжительности жизни от момента установления диагноза и до появления рентгенологических признаков прогрессии опухоли составила 7 месяцев, а после появления признаков прогрессии опухоли медиана продолжительности их жизни всего 4,8 месяца [27]. Таким образом, для большинства детей заболевших ОСГМ хронология болезни в среднем выглядит так: длительность анамнеза до начала лечения 1-2 месяца, длительность лучевого лечения 2 месяца, длительность ремиссии 7 месяцев и длительность всей жизни от момента постановки диагноза 11- 12 месяцев. В ситуации, когда родители ребенка и врач через 7 месяцев после сообщения о страшном диагнозе, через 4-6 месяцев после полученного хорошего эффекта первого курса лучевой терапии получают информацию о неизбежном конце менее через полгода, и стоят перед выбором: отправить ребенка в отделение паллиативной помощи или попытаться, улучшить качество жизни и продлить ее срок некоторые специалисты решаются на повторный курс лучевой терапии. В таблице 3 приведены сведения о повторной лучевой терапии, имеющиеся в доступной литературе. Как видно, количество публикаций, посвященных повторной лучевой терапии и число пролеченных больных ОСГМ очень мало, а алгоритм показаний и вопросы дозирования лучевой терапии совершенно не разработаны. В значительной мере это обусловлено бедностью

Таблица 3 – Сводные данные о применении повторной лучевой терапии при рецидиве опухолей ствола мозга у детей.

Автор	Год	N	Мин. интервал от 1-го курса мес.	РОД (Гр)	СОД (Гр)	Улучшение число (%)	Ухудшение (%)	Осложнения	Медиана повт. ремиссии мес.	Медиана OS получавших повт. ЛТ мес.	Медиана OS в контр. группе мес.
Wolff J.E. et al. [115]	2012	7				4/7 57%					
Fontanilla H.P. et al. [34]	2012	6	8-28	2	18-20	5/6 83	17%	тошнота, алопеция	5		
Щербенко О.И. и соавт. [3,4]	2014	23	4- 48	1,8-2	15-50	18/23 78,3	13%	1		14	8
Janssens G.O et al. [52, 53]	2016	31			19,8-30	24/31 77		нет		13,7	10,3
La Madrid A. M. et al. [58]	2017	2				2/2 100		нет			
Freese C et al. [37]	2017	3			20						
Lassaletta A., et al. [59]	2018	14	4-37		21,6-36	11/14 78		нет		7	3
Amsbaugh M.J. et al. [11]	2019	12		2- 2,2	24-30,8	11/12 92	18			19,5	4,5

информации о радиочувствительности нервной ткани и возможных пределах суммарных доз облучения без ее повреждения. Имеются только единичные сообщения, посвященные данной проблеме. Так в работе Nieder C. et al. [78] на основании опубликованных в литературе данных о развитии радиационных повреждений спинного мозга, с помощью использования линейно-квадратичной модели и соотношения альфа/бета, выведена формула, согласно которой облучение шейного и грудного отдела спинного мозга фракциями по 2 Гр до суммарных доз 50 Гр эквивалентно биологически эффективной дозе (БЭД) 100 Гр, а пределом толерантности этих отделов спинного мозга при повторном облучении является кумулятивная БЭД 120 Гр при перерыве между курсами не менее 6 месяцев. Экстраполируя эти данные на варианты фракционирования, используемые в нашей практике (по 1,8 Гр) до СОД 54 Гр, можно сделать вывод, что предельно допустимая доза при повторном облучении ствола мозга через 6 и более месяцев является 45 Гр.

### **Обсуждение**

Таким образом, проблема лечения детей и подростков больных диффузно растущей опухолью ствола мозга далека от окончательного разрешения. Радикальное хирургическое лечение не имеет перспектив в силу анатомической особенностей структуры этой зоны, наличия в ней жизненно важных центров, контролирующих все процессы жизнедеятельности организма. Эффективных цитотоксических препаратов пока создать не удалось. Единственным реальным методом помощи этим больным остается лучевая терапия, с помощью которой удастся затормозить рост опухоли и улучшить качество жизни. Однако, излечить опухоль с помощью этого метода практически невозможно при использовании любой, самой современной, радиотерапевтической аппаратуры и источников излучения. Достижимый эффект практически для всех больных имеет временный характер и длительность ремиссии, главным образом, зависит от степени

агрессивности опухоли. Перспективу создания методов радикального лечения этого заболевания можно видеть только в разработке направленного воздействия на опухоль с помощью таргетной терапии. Первые шаги в этом направлении сделаны: разработаны и применяются в научных исследованиях методы прижизненного получения тканевого материала и выделения фрагментов опухоли для проведения молекулярно-генетических исследований опухоли. Следующими этапами, видимо, должны быть выявление возможных молекулярных мишеней в опухоли и создание средств направленного воздействия на них. Но сегодня основная задача врача-онколога заключается в возможно более эффективной работе по улучшению качества жизни и увеличения ее продолжительности заболевших детей. Поскольку основной причиной неудач является возобновление роста опухоли и, реже, ее метастазирование, повторная лучевая терапия остается единственно реальным средством помощи, а создание отсутствующей на сегодня концепции такого лечения представляется актуальным. В эту концепцию необходимо включить: 1. Разработку прогностической модели для ОСГМ на основе клинических, рентгенологических и молекулярно-генетических характеристик заболевания; 2. Определение показаний к повторной лучевой терапии и выбор клинически и экономически рационального варианта повторного облучения.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1. Дизайн исследования

Представляемая работа состоит из трех основных фрагментов.

1. Ретроспективный анализ эффективности первичной и повторной лучевой и химиолучевой терапии детей больных ОСГМ и изучение роли клинко-рентгенологических параметров опухолей ствола головного мозга у детей в прогнозе заболевания.
2. С помощью метода ПЦР и «жидкостной биопсии» изучение молекулярно-генетических параметров глиальных опухолей головного мозга у детей и выяснение их значения для прогноза заболевания.
3. На основании полученных данных разработка алгоритма повторного лечения при возобновлении роста ОСГМ.

Первый фрагмент работы посвящен ретроспективному анализу непосредственных и отдаленных результатов первичного и повторного лучевого и химиолучевого лечения при возобновлении роста диффузно растущих опухолей ствола мозга (ОСГМ). На основании полученных данных определена прогностическая значимость некоторых клинических и рентгенологических характеристик заболевания. На основании полученных результатов предложен алгоритм повторного лечения при возобновлении роста ОСГМ.

Во втором фрагменте работы представлены данные о результатах определения молекулярно-генетических характеристик глиальных опухолей головного мозга, в том числе и опухолей ствола головного мозга, их динамике в процессе лечения и возможных корреляциях этих признаков с течением и прогнозом заболевания.

## 2.2. Общая характеристика анализируемой группы больных ОСГМ

За период с 1990 по 2018 годы в отделении комплексных методов лечения онкологических заболеваний у детей ФГБУ «РНЦРР» лучевое и химиолучевое лечение получили 377 детей и подростков больных ОСГМ из различных регионов России и зарубежных стран. Данное исследование основано на ретроспективном анализе клинико-рентгенологических проявлений, лечебной тактики, ближайших и отдаленных результатов лечения 102 детей и подростков, катамнез которых был прослежен вплоть до конца 2018 г. Вся популяция прослеженных пациентов разделена на две группы: группа 1 из 52 больных, которым лучевая или химиолучевая терапия проводилась только в виде одного курса, и группа 2 из 50 детей, которым лечение проводилось дважды: первично и повторно, через различные интервалы времени, при возобновлении роста опухоли.

В таблице 4 представлены данные о гендерной принадлежности анализируемой популяции пациентов и их возрасте. В группе 1 преобладали девочки, в группе 2 число детей обоего пола было почти одинаковым. В группе 2 несколько преобладали дети старше 5 лет, хотя медиана возраста была практически одинаковой: 5,5 и 6 лет (табл. 4).

Данные о распределении больных в зависимости от длительности анамнеза представлены в таблице 5. Поскольку длительность симптомов до момента установления диагноза не превышала 4-х месяцев, нам представилось целесообразным выделить две группы: с длительностью анамнеза до 2-х месяцев и более 2-х месяцев. В группе 2 было несколько больше пациентов с более длительным анамнезом.

Клиническая картина заболевания при первичном обращении в основном выражалась локальными симптомами поражения стволовых структур, которые схематично можно разделить на две основных группы: симптомы поражения структур моста (нарушение функции черепно-мозговых нервов) и поражения длинного тракта (парезы и параличи конечностей). У части больных

присутствовало сочетание обеих групп симптомов и общемозговые нарушения: головная боль, тошнота, изменения поведения за счет повышения внутричерепного давления вследствие компрессии ликворопроводящих путей (табл. 6).

Таблица 4 – Распределение больных ОСГМ по группам в зависимости от пола и возраста.

Пол пациентов	Группа 1		Группа 2	
	Число	%	Число	%
Мальчики	18	34	27	54
Девочки	34	65	23	46
2 - 5 лет	26	50	20	40
6 - 10 лет	18	34	19	38
11 - 17 лет	8	15	11	22
Медиана возраста	5,5 лет		6 лет	

Таблица 5 – Распределение больных ОСГМ по группам в зависимости от длительности анамнеза.

Длительность анамнеза	Группа 1		Группа 2	
	Число	%	Число	%
До 2-х месяцев	26	50	18	36
Более 2-х месяцев	26	50	32	64
Всего	52	100	50	100

Диагноз устанавливался на основании анамнеза, клинических проявлений и результатов МРТ головного мозга с контрастным усилением. По результатам МРТ нам удалось выделить две основные формы роста опухолей: солидные

Таблица 6 – Клинические проявления опухолей ствола мозга у детей при первичном обращении.

Симптомы	Группа 1		Группа 2	
	Число	%	Число	%
Нарушение функции ЧМН	38	73	36	72
Периферические парезы	32	61	34	68
Сочетание обоих нарушений	34	65	32	64
Общемозговые симптомы (головная боль, тошнота, изменения поведения)	29	55	30	60

Таблица 7 – Распределение больных ОСГМ по группам в зависимости от характера изображения опухоли при первичном обращении по данным МРТ и гистологической характеристики верифицированных опухолей.

Характер опухоли по данным МРТ	Группа 1		Группа 2	
	Число	%	Число	%
Солидная	39	75	36	72
Кистозно-солидная	13	25	14	28
Всего	52	100	50	100
Гистологическая структура	Группа 1		Группа 2	
	Число	%	Число	%
Астроцитома Gr I-II	3	33	2	50
Астроцитома Gr III-IV	6	66	2	50
Всего	9	100	4	100

(без признаков кровоизлияний, деструкции и кистообразования) и кистозно-солидные (с наличием зон кровоизлияния, распада и/или кист). ( Рис. 4, 5, табл. 7). Морфологическое подтверждение структуры опухоли удалось получить всего у

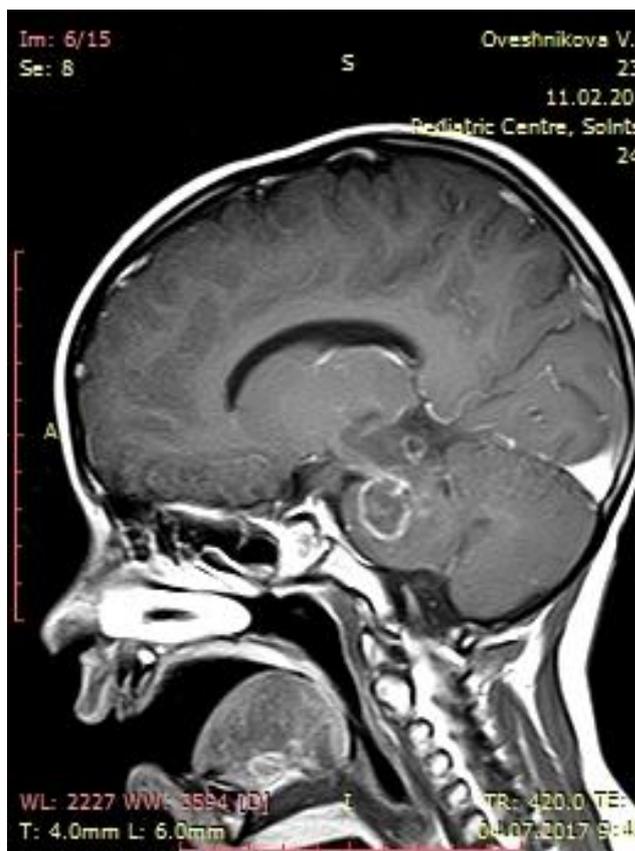


Рисунок 4 – Диффузно-инfiltrативная кистозно-солидная опухоль Варолиева моста.

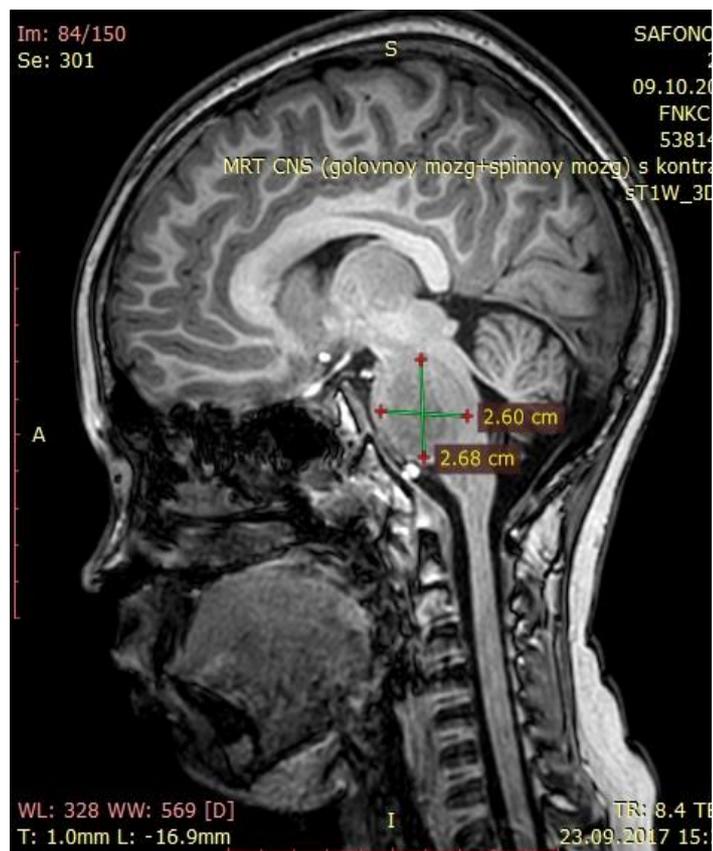


Рисунок 5 – Диффузно-инfiltrативная солидная опухоль Варолиева моста.

13 больных (12,7%): у 9 в группе 1 и у 4 в группе 2. Результаты представлены в таблице 7.

Всем пациентам перед началом курса лучевой терапии до поступления в клинику были выполнены следующие исследования:

- 1) МРТ/КТ головного мозга как с контрастным усилением, так и без него (по показаниям);
- 2) оценка соматического и неврологического статуса, нейроофтальмологическое обследование;
- 3) консультация детского онколога для определения показаний к адъювантной химиотерапии, нейрохирурга при наличии гидроцефалии (для определения показаний к выполнению ликвороотводящих операций);

После обследования и получения результатов МРТ больным проводилось лучевое или химиолучевое лечение. В таблице 8 представлена информация о распределении больных в зависимости от использованного варианта первичного лечения.

Таблица 8 – Варианты первичного лечения больных опухолью ствола мозга.

Вариант лечения	Группа 1		Группа 2	
	Число	%	Число	%
Лучевая терапия	29	55	25	50
Химиолучевая терапия	23	44	25	50
Всего	52	100	50	100

### 2.3. Методы исследования

1. Ретроспективный анализ переносимости, непосредственной эффективности и отдаленных результатов первичного (102 больных) и повторного (50 больных) лучевого и химиолучевого лечения при ОСГМ с обработкой результатов методами медицинской статистики.
2. Изучение содержания и динамики в процессе лечения опухолевых маркеров BRAF, IDH 1, H3 в плазме периферической крови с помощью метода капельной ПЦР.

Использованная аппаратура: магнитно-резонансные томографы: Toshiba Vantage Atlas 1,5t, General Electric Signa 1,5t, Siemens Magnetom Aera 1,5t, компьютерные томографы: Toshiba Asteion 4, Philips Brilliance 16 и Siemens Somatom Definition AS; радиотерапевтические аппараты: телекобальтовые установки типа «Рокус» и линейные ускорители Varian Clinac 2100, True Beam, системы дозиметрических расчетов, «Тонкий Луч», «Поле», «Varian Eclipse», «Oncentra Master Plan»,

система для проведения цифровой капельной ПЦР третьего поколения «BIO-RAD QX 100TM Droplet Reader».

#### **2.4. Предлучевая подготовка больных при опухолях ствола головного мозга и методики лучевой терапии**

За анализируемый 20-летний период лучевая терапия проводилась с использованием различных генераторов излучения: телекобальтовых установок типа «РОКУС» и фотонного излучения линейных ускорителей с энергией тормозного пучка 6 -18 МЭВ. На рисунках 4 и 5 представлены схемы распределения дозы при чаще всего применявшихся методиках облучения. Здесь следует отметить, что совершенствование технических средств лучевой терапии, переход на фотонное излучение линейных ускорителей, внедрение в практику современных методик предлучевой подготовки и фиксирующих приспособлений создали возможности уменьшения доз облучения здоровых внутричерепных структур, но, к сожалению, не внесли существенных изменений в непосредственные и отдаленные результаты лечения ОСГМ.

Предлучевая подготовка в эпоху использования гаммаустановок заключалась в выполнении компьютерной томографии области задней черепной ямки на уровне опухоли в одной плоскости. На полученной томограмме оконтуривался ствол мозга с включением зоны перифокального отека в область СТ<sub>V</sub>. До 2008 г. по изготовленному срезу с помощью компьютерных программ «Тонкий луч» или «Поле» врач-радиолог совместно с физиком выбирал методику облучения, затем физик рассчитывал время облучения и изображал на срезе распределение дозы на уровне очага (рис. 6).

С внедрением в практику линейных ускорителей процесс предлучевой подготовки был модернизирован. В объем предлучевой подготовки были включены: изготовление индивидуального фиксирующего устройства, представляющего собой термопластическую маску, имеющую приспособления и



Рисунок 6 – Схема распределения дозы при использовании двухплоскостного планирования и облучении на гаммаустановке с двух боковых полей и в режиме ротации.

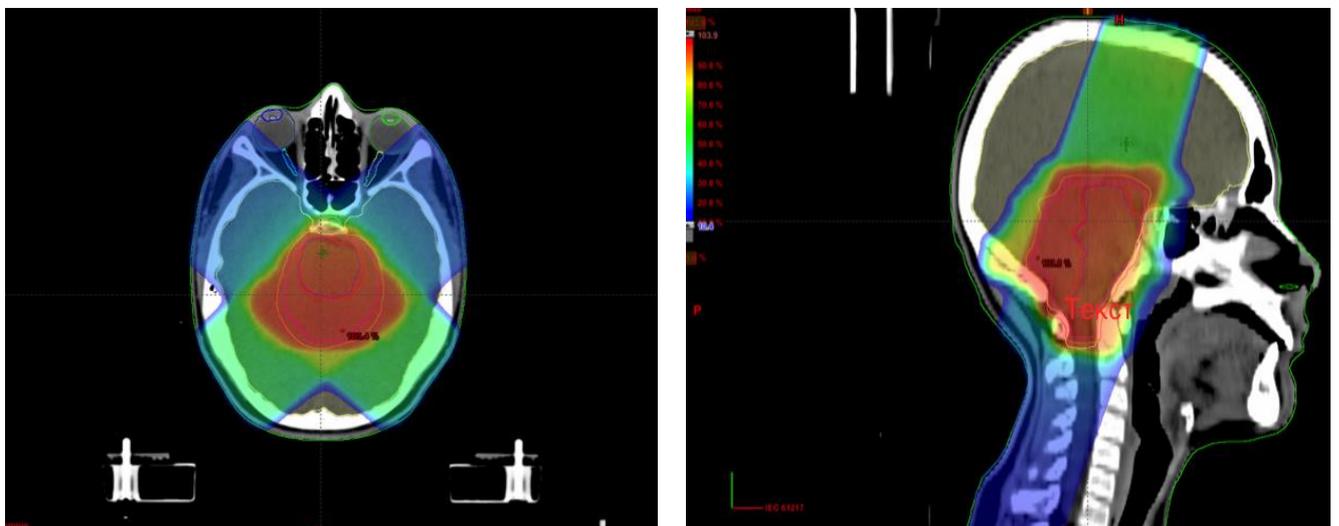


Рисунок 7 – Схема распределения дозы при трехплоскостном планировании и конформном облучении с трех полей тормозным излучением ускорителя с энергией 6МэВ.

механизмы крепления к столу компьютерного томографа и радиотерапевтической установки. Вместо КТ в одной плоскости на уровне середины очага стала выполняться спиральная КТ-топометрия в условиях аналогичных процессу облучения, с маской, фиксируемой к деке стола томографа (рис. 9). Полученное спиральное КТ- изображение, записанное на диска или по внутрибольничной сети передается физикам и совмещается с МРТ-изображением. На полученном сочетанном изображении на каждом скане (всего от 5 до 30 срезов) врачом-радиотерапевтом выполняется оконтуривание зоны видимой опухоли (GTV), зоны предполагаемого субклинического распространения процесса (CTV) и планируемого объема облучения (PTV). Полученная картина передается физикам для составления плана лучевой терапии и анализа лучевой нагрузки на критические органы и ткани по гистограммам (рис. 8). Все дозиметрические расчеты проводятся с использованием трехплоскостной объемной планирующей системы «Oncentra Master Plan» (рис. 7). В процессе проведения КТ- топометрии пациенту присваивается индивидуальный ID (идентификационный номер), который является уникальным номером в планирующей системе и в плане расписания лечения пациентов на медицинском ускорителе электронов или гамматерапевтической установке.

Лучевая терапия при первичном лечении в большинстве случаев проводилась с использованием традиционного варианта фракционирования дозы по 1,8Гр с подведением суммарной дозы до 54- 55 Гр. В некоторых случаях, при наличии выраженного перифокального отека и симптомах внутричерепной гипертензии, лечение начиналось в режиме мультифракционирования разовыми дозами 1,0- 1,1 Гр 2 раза в день с интервалом между фракциями 4- 6 часов, с постепенным переходом на обычный режим по мере стабилизации состояния, но с коррекцией суммарной дозы за период мультифракционирования в сторону ее повышения до 70 Гр.

В качестве химиопрепаратов параллельно с лучевой терапией использовались темозоломид, ломустин, фторафур, винкристин, онкофер.

Поскольку результаты первичного лечения не свидетельствовали о существенном вкладе всех использованных химиопрепаратов в непосредственный

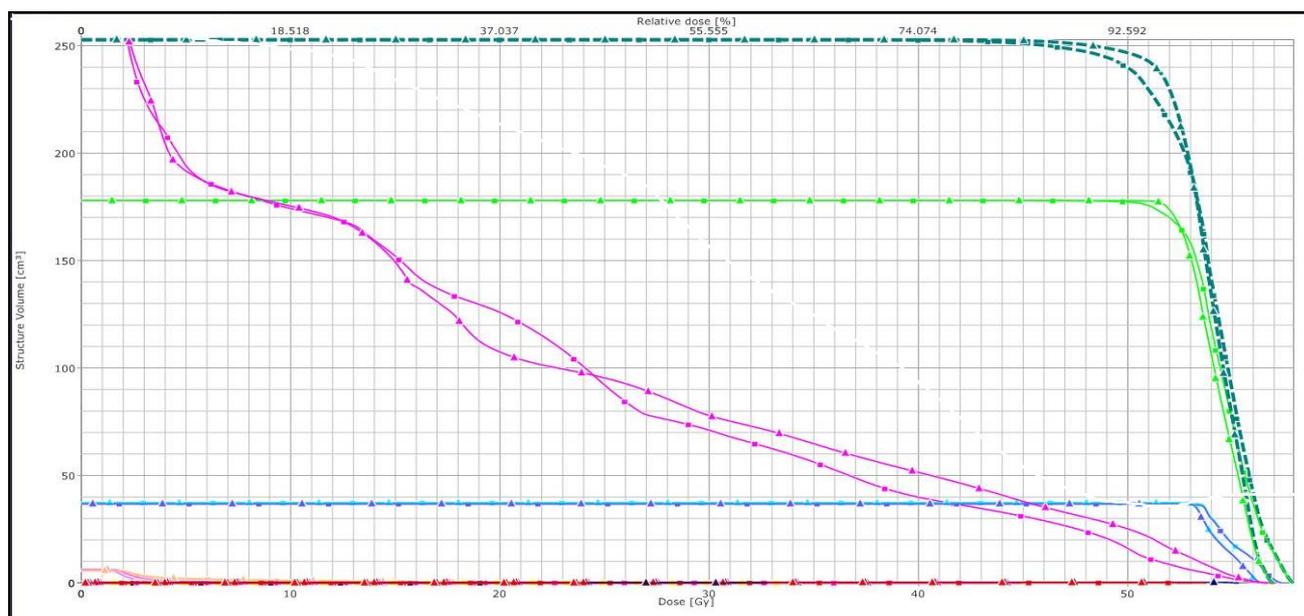


Рисунок 8 – Гистограмма доза - объем для критических структур при проведении 3D конформной ЛТ ОСГМ.



Рисунок 9 – Изготовление ИФУ – маски.

эффект, выбор препарата онкологом осуществлялся без рандомизации. Чаще всего использовался темозоломид.

Программа сопроводительной терапии формировалась индивидуально, в зависимости от состояния больного и степени выраженности неврологических нарушений. Чаще всего эта терапия включала в себя назначение дексаметазона в минимально необходимых (определяемых по тяжести симптомов) дозировках, диуретиков (обычно диакарба, в тяжелых случаях фуросемида). Способы введения кортикостероидов и диуретиков зависели от состояния пациента: при затруднениях с приемом препаратов внутрь (у маленьких детей, при выраженной тошноте) использовался парентеральный путь, в остальных случаях энтеральный. При резком ухудшении состояния назначались длительные внутривенные введения кортикостероидных гормонов и 15% раствора маннитола. В целях предупреждения инфекционных и грибковых осложнений у больных, получавших кортикостероидные гормоны, превентивно назначались противогрибковые препараты, проводилась обработка слизистых. После окончания лучевого или химиолучевого лечения по клиническим данным оценивался непосредственный эффект и больные выписывались под наблюдение региональных онкологов и педиатров. Контрольные МРТ- исследования назначались через 1- 1,5 месяца. Части больных онкологом было рекомендовано проведение консолидирующей химиотерапии темозоломидом в виде 5-дневных циклов в дозе 150-200 мг на м<sup>2</sup>. с перерывом между циклами 28 дней.

## **2.5. Молекулярно-генетические методы исследования**

**Получение материала для исследования.** Материал (парафиновые блоки и срезы, полученные с них), после экспертной морфологической оценки, включавшей в себя определение типа ткани, наличия в препарате опухолевых клеток, признавался пригодным для дальнейшего исследования.

## **Выделение циркулирующей ДНК из плазмы крови**

**Подготовка плазмы.** Плазма отделялась сразу после получения образца крови. Процедура включала в себя следующие этапы:

1. Центрифугирование образца крови при комнатной температуре при 600 x g , 20 минут. Мягкое центрифугирование необходимо для предотвращения повреждения клеток крови.
2. Осторожно отбирали плазму в другую пробирку. При отборе плазмы избегали захватывания клеток, собравшихся на разделе фаз.
3. Центрифугировали собранную плазму при комнатной температуре при 6000 x g, 20 минут. Повторное центрифугирование позволяет удалить оставшиеся в плазме клетки и тромбоциты.
4. Отбирали плазму в другую пробирку. Хранили плазму при температуре не выше +4°C.
5. Выделение цНК из 2 мл плазмы. Для выделения циркулирующей ДНК из плазмы крови использовали наборы фирмы Sileks на основе частиц SileksMagNA-Direct (избирательное связывание нуклеиновых кислот). Процедуру выделения проводили по протоколу фирмы производителя.

### **Определение мутации V600E в гене BRAF, мутации R132H в гене IDH1 и мутации K27M в гене H3F3A методом цифровой капельной ПЦР (ddPCR)**

Для постановки ddPCR применяли реактивы фирмы «BioRad» согласно протоколу исследования. ДНК- зонды, использовавшиеся для детекции продуктов амплификации исследуемых и нормировочных генов, были помечены FAM и HEX. ПЦР смесь помещали в генератор капель, где из 20 мкл образца, в котором требуется определить количество исследуемой ДНК, создают водно-масляную эмульсию, в каждой пробирке образуется до 20000 капель объемом 1 нл. При этом генетический материал распределяется по каплям случайным образом: в них попадают как ДНК-мишени, так и фоновая ДНК (рис. 10). Процесс распределения целевой ДНК по каплям чисто случайный и подчиняется закону распределения малых чисел Пуассона. Перед разделением образца на капли не обязательно

разводить его до концентрации, чтобы в каждой капле было либо 0, либо 1 копия ДНК-мишени: при анализе результатов учитываются ситуации, когда в одной капле находится более одной копии мишени. По распределению Пуассона в каплю либо попадает одна матричная цепь, либо не попадает ни одной.

Из генератора капель образцы переносили в амплификатор. Амплификацию осуществляли в режиме “реального времени” в объеме 35 мкл по следующей программе:

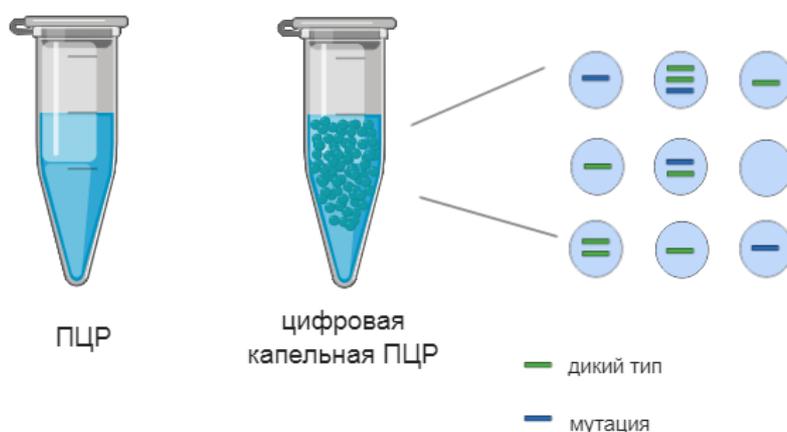


Рисунок 10 – Цифровая капельная ПЦР, процесс распределения целевой ДНК по каплям.

<b>95°C</b>	10min			
<b>94°C</b>	30с	Ramp 94°C 2°C/c		40 с
<b>55°C</b>	1min	Ramp 94°C 2°C/c		
<b>98°C</b>	10min			

После амплификации планшет помещали в прибор «BIO-RAD QX 100™ DROPLET READER», где происходило считывание сигнала от флуоресцентных меток. В капле с матрицей амплификация идет во много раз эффективнее, чем при других видах ПЦР, что связано с нахождением всех компонентов смеси для ПЦР в нанобъеме. Во время амплификации происходит энзиматическое расщепление

ТaqMan- зондов, в результате чего многократно увеличивается эффективность флюоресценции капли. Накопленный в ходе амплификации продукт детектируется в каждой капле отдельно, со скоростью 1500 капель/с. По соотношению общего количества микрокапель и количества микрокапель, в которых уровень флюоресценции превышает фоновый, ридер рассчитывает абсолютное количество ДНК в одном микролитре образца. Вид конечного результата представлен на рисунке 11.

Учет результатов производился в программе «Quanta Self 16», поставляемой с прибором. Средние значения данных переносились из таблицы программы «Quanta Self 16» в таблицу Excel для дальнейшей статистической обработки.

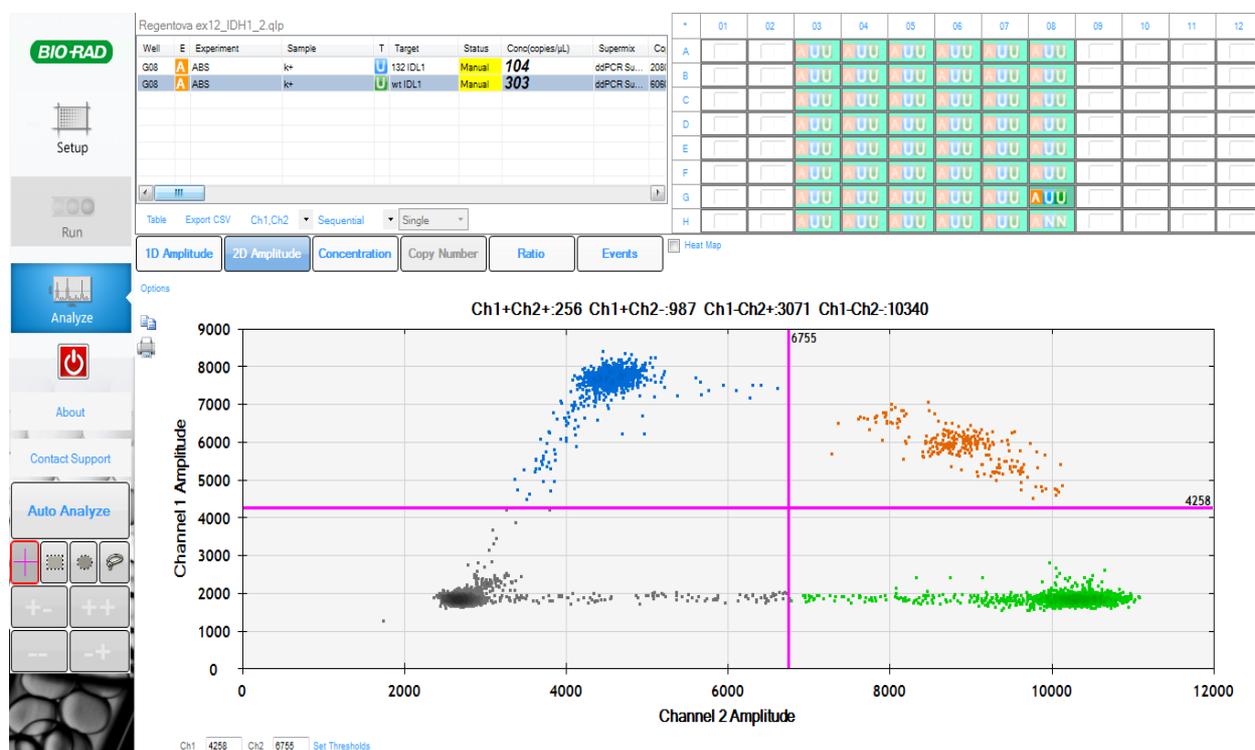


Рисунок 11 – Иллюстрация результата ddPCR исследования мутаций гена IDH1 R132H. Точки, окрашенные синим цветом- капли, содержащие мутантные молекулы, точки зеленого цвета- капли с молекулами ДНК дикого типа.

## 2.6. Методы статистической обработки данных

Для написания данной работы использовался ретроспективный анализ медицинской документации 102 больных, включенных в исследование, а также результаты динамического наблюдения за ними. Были изучены методики и режимы лучевой терапии, сочетание курса лучевой терапии с параллельной химиотерапией, зависимость результатов от объема проводимой химиотерапии после первичного лечения, от длительности анамнеза до начала первичного лечения, длительности первой ремиссии, влияние характера рецидива и степени распространённости процесса. Были проанализированы переносимость лечения, непосредственные реакции и осложнения, выяснялись возможные причины и локализация рецидивов.

Общая кумулятивная выживаемость была подсчитана от даты установления диагноза до смерти от прогрессирования основного заболевания или до даты сбора последних катамнестических данных. Кумулятивная выживаемость после повторного лечения подсчитана от даты его окончания. Длительность ремиссии была определена как промежуток времени от даты начала первичного лечения до даты констатации прогрессии заболевания или в случае отсутствия прогрессии заболевания до даты сбора последних катамнестических данных.

В информационной аналитико-статистической базе РНЦРР интегрировано более 100 различных параметрических и непараметрических прогностических факторов на каждого пролеченного больного с верифицированной опухолью ЦНС. Для оценки общей выживаемости и выживаемости без прогрессирования использовался корреляционный анализ, расчеты кумулятивной выживаемости методом Каплан-Майера, многофакторный анализ регрессии Кокса и логистическая регрессия. Изучение непосредственных и отдаленных результатов с применением вышеуказанных методов статистической обработки выполнялось с помощью пакета программ “Microsoft Excel”, “IBM SPSS Statistics” (20 версия), «StatSoft STATISTICA 8.0» и «STATA 20.0».

### **ГЛАВА 3. ПЕРВИЧНОЕ И ПОВТОРНОЕ ЛЕЧЕНИЕ, МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ПРИ ОСГМ У ДЕТЕЙ (РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ)**

#### **3.1. Результаты первичного лучевого и химиолучевого лечения**

Переносимость первичного лечения для больных обеих групп в большинстве случаев была удовлетворительной. После первых сеансов у некоторых детей, получавших лучевую терапию на гаммаустановках с использованием двух боковых полей, наблюдались явления острого отека околоушных слюнных желез с болевым синдромом, что успешно купировалось противоотёчными средствами. У части из этой же группы детей к концу курса лечения наблюдался эпидермит в заушных областях, что требовало назначения местной мазевой терапии. Среди больных, получавших конформную лучевую терапию на ускорителях, таких реакций не наблюдалось. Миэлодепрессия (лейкопения) 1-2 степени выраженности наблюдалась у 45% детей, у которых первый курс лучевой терапии сочетался с адъювантной химиотерапией темозоломидом. Примерно у 20% детей, получавших винкристин, наблюдались явления винкристиновой нейропатии, проявлявшейся спастическими запорами и мышечно-суставными болями, купируемыми диетой, назначением витаминных препаратов (мильгамма), спазмолитиков и прозерина.

У большинства детей уже после подведения суммарных доз лучевой терапии 10-15 Гр общее состояние улучшалось, снижалась выраженность неврологических нарушений, повышалась активность. Положительный эффект первых сеансов лучевой терапии можно объяснить не только этим фактором, но и адекватно подобранной дегидратационной терапией, снимающей перифокальный отек. Здесь следует заметить, что больные с выраженным неврологическим дефицитом, длительно получавшие необоснованно большие дозы кортикостероидов по месту жительства, поступали с тяжелыми симптомами

гиперкортицизма (прибавка в весе до 10-15 кг, грибковое обсеменение полости рта) и требовалось немало усилий, чтобы снизить дозу гормонов до необходимого уровня и купировать осложнения.

К концу курса лечения у 77 (76%) из 102 прослеженных и включенных в данный анализ пациентов достигнуто уменьшение выраженности или полная регрессия неврологических нарушений. В таблице 9 отражена динамика состояния больных, ретроспективно оцененная по шкале Лански.

Таблица 9 – Динамика состояния больных ОСГМ к концу первого курса лечения, ретроспективно оцененная по шкале Лански.

Оценка по шкале Лански (баллы)	До лечения		После лечения	
	Число больных	%	Число	%
30-40	72	70,7	4	3,9
50-60	28	27,4	60	58,8
70-90	2	1,9	38	37,3
Всего	102	100	102	100

Согласно представленным данным табл. 9, из 70% пациентов с неврологическим статусом по ш. Лански до 40 баллов до начала первичного лечения, состояние без динамики после проведенного лечения сохранялось лишь у 4% пациентов. В первую очередь регрессировали бульбарные симптомы и признаки поражения длинного тракта: восстанавливалась подвижность мягкого неба, улучшалось глотание, регрессировали вплоть до полного исчезновения двигательные нарушения в конечностях. Глазодвигательные нарушения регрессировали заметно медленнее и у части больных сохранялись до конца жизни.

По информации, получаемой от родителей, в ближайшие 2-6 недель после лечения примерно у четверти больных наблюдалось ухудшение состояния в виде

слабости, усиления выраженности неврологических нарушений, иногда повышения температуры как следствия поздней лучевой реакции: локального постлучевого пареза сосудов с выпотеванием в ткани жидкости. Во всех случаях эти явления удавалось купировать возвратом к приему дексаметазона или увеличением его дозы (если больной был выписан с данным препаратом) и диакарбом или фуросемидом. Частота и закономерность проявления признаков позднего постлучевого отека не зависели от объема лечения, комбинации радиотерапии с химиотерапией, возраста или других факторов.

Следует отметить, что при контрольных обследованиях мы ни в одном случае не констатировали на МРТ полной регрессии опухоли: остаточная опухоль определялась у всех 102 детей, даже находящихся под наблюдением длительные сроки.

После окончания первичного лечения по рекомендации онколога 38 детей из 102 (37%) получали консолидирующую цикловую химиотерапию темозоломидом 5-дневными циклами из расчета 150-200 мг/м<sup>2</sup>. в день с 28-дневными перерывами.

Всем пациентам в период от 4 до 6 недель после завершения лечения выполняли контрольную МРТ без и с КУ. В структуре и размерах опухоли были выявлены изменения: у 21 ребенка (20%) по сравнению с исходными данными объем опухоли уменьшился, у остальных он существенно не изменялся. Накопление контраста в опухоли уменьшалось, в части случаев формировался кистозный компонент как проявление деструкции опухоли. При этом достигнутый положительный клинический эффект у большинства больных к моменту первого контрольного обследования сохранялся, независимо от картины, получаемой при контрольной МРТ.

После периода ремиссии, длящейся от 3 до 48 месяцев, у 78 (76%) детей отмечалось нарастание неврологического дефицита. Это наблюдалось как у детей, не получавших консолидирующей противоопухолевой терапии, так и на фоне химиотерапии темозоломидом. Возобновление роста опухоли или появление

метастазов в ЦНС по клиническим данным и результатам МРТ констатировано у 38 больных (73%) гр. 1 и у всех прослеженных больных гр. 2. На данный момент наблюдаются 24 ребенка: в гр. 1 - 16 больных, и в гр. 2 - 8 пациентов. Сведения о состоянии всей популяции больных представлены в табл. 10.

Таблица 10 – Сведения о состоянии всех исследованных больных ОСГМ.

Состояние больных	Число больных	%	Медиана продолжительности жизни
Находятся под наблюдением	24	23,5	29,6 месяцев
Умерли	78	76,5	15,9 месяцев

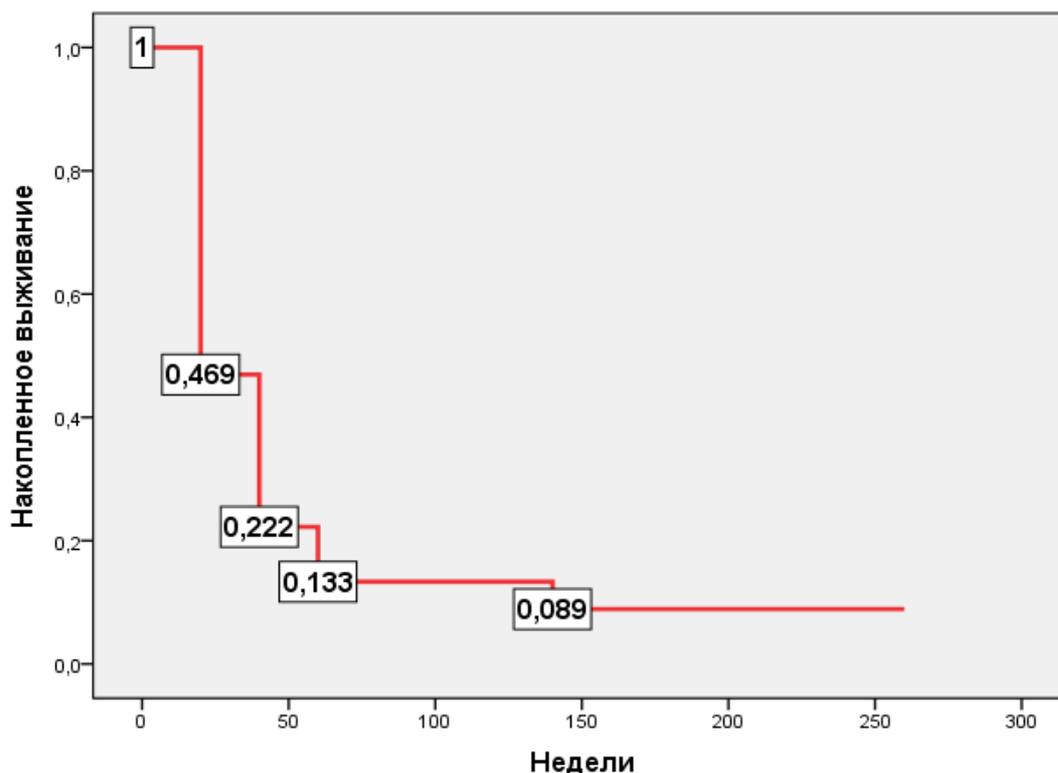


Рисунок 12 – График накопленной выживаемости 102 больных ОСГМ.

Для 102 пациентов показатель общей кумулятивной 6-и и 12-месячной выживаемости (рис. 12) составил 47% и 22%. (95% ДИ 9,5-37,5мес.). Медиана

продолжительности жизни для всей группы- 18,8 мес. Период более 2-х лет пережили 36 пациентов (35,3%). Медиана ОВ у 52 пациентов, пролеченных однократно, 13,1 мес., у 50 пациентов, которым удалось провести повторный курс лечения, 20,3 мес.

### **Роль некоторых клиничко-рентгенологических факторов в результатах первичного лучевого и химиолучевого лечения ОСГМ**

Для всей популяции в 102 больных нами были проанализировано влияние ряда клинических и рентгенологических признаков на показатели выживаемости.

#### **Выживаемость в зависимости от пола ребенка**

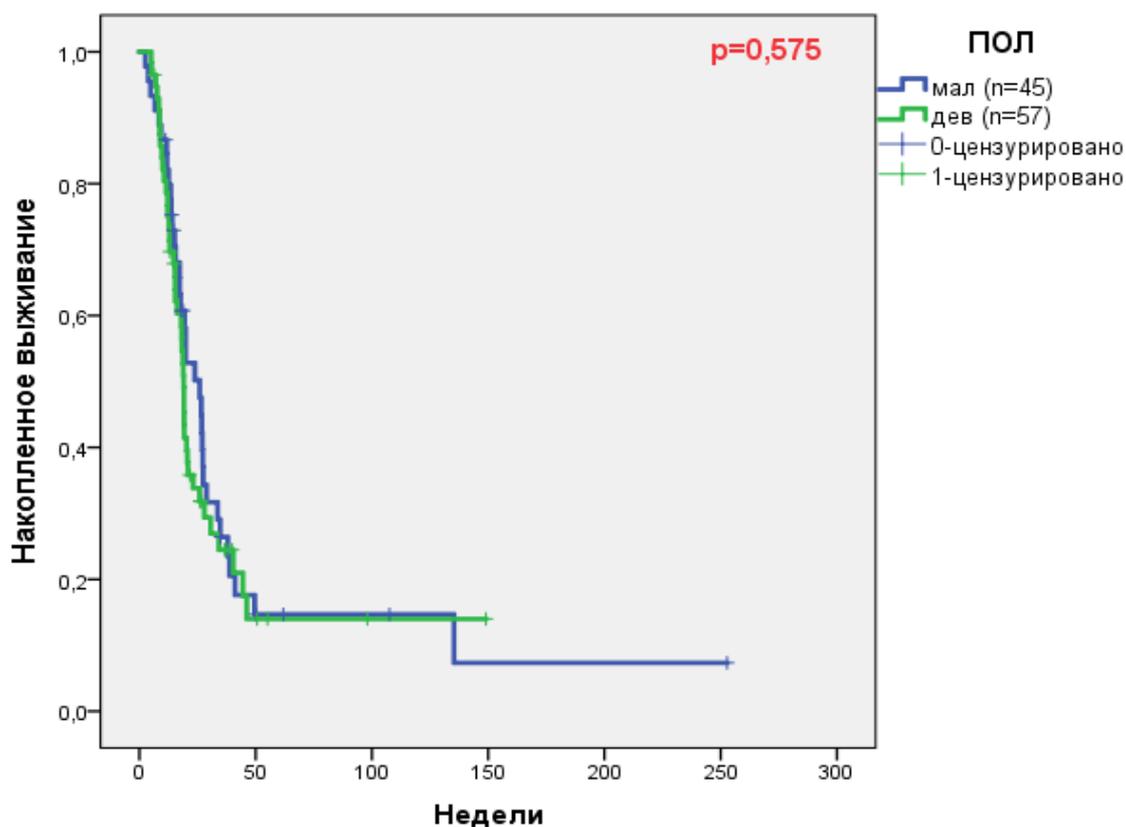


Рисунок 13 – Динамика выживаемости 102 пациентов с ОСГМ в зависимости от пола.

Из 102 пациентов в анализируемой группе было 45 (44%) мальчиков и 57 (56%) девочек. За анализируемый период в группе мальчиков умерло 35 пациентов (78%), а в группе девочек 43 (76%). При медиане срока наблюдения (МСН) мальчиков 6,5 месяцев, 6 и 12 месяцев прожили 60% и 16% соответственно (рис. 13). В группе девочек при МСН 4,8 месяцев, 6 и 12 месяцев прожили 56% и 17% соответственно. Разница статистически недостоверна ( $p=0,575$ ). (95% ДИ 4,4- 5,2 мес.). Медиана продолжительности жизни (МПЖ) у девочек - 18,7 мес., у мальчиков - 18,8 мес. Таким образом, эффект лечения не зависел от пола ребенка.

### Выживаемость в зависимости от возраста

Учитывая возрастной состав анализируемой группы детей, нами было проанализирована зависимость общей выживаемости от возраста пациентов в момент начала первичного лечения: мы выделили 2 группы: дети в возрасте до 3-х лет и старше 3-х лет.

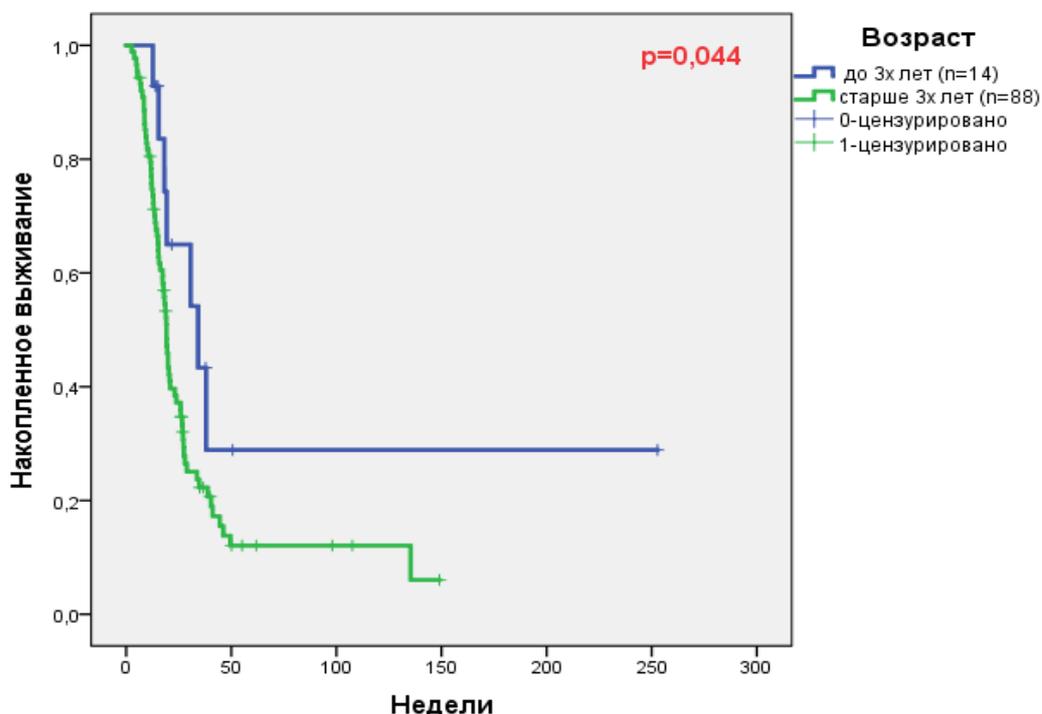


Рисунок 14 – Динамика выживаемости 102 пациентов с ОСГМ в зависимости от возраста.

Из 102 пациентов в анализируемой группе было 14 (13%) детей до 3-х лет, и 88 (87%) пациентов старшего возраста. Среди детей до 3-х лет при МСН 8 мес. умерло 7 человек (50%), 6-ти и 12-ти месячная выживаемость у детей младшего возраста составила 66% и 28%, а из пациентов старше 3-х лет при МСН 4,7 мес., умер 71 больной (69%), 6-ти месячная и 12-ти месячная общей выживаемость у детей старше 3-х лет составила 40% и 12% соответственно (рис. 14). МПЖ у пациентов до 3-х лет 34,2 мес. Разница статистически достоверна ( $p=0,044$ ). (95% ДИ 4,4- 5,2). Таким образом, результаты лечения детей в возрасте до 3-х лет были лучше, чем для детей старшего возраста.

### **Влияние хирургических вмешательств на выживаемость у больных ОСГМ**

У 13 больных перед началом лечения были выполнены хирургические вмешательства в виде биопсии опухоли или частичного удаления ее экзофитного компонента. На рис. 15 представлены кривые выживаемости для оперированных и не оперированных детей. Из 89 пациентов, не подвергавшихся операциям, живы 17 (19%). При МСН 4,8 месяца 6 и 12 месяцев пережили 40% и 10% из этих больных соответственно, а среди 13-ти оперированных, из которых 7 живы, при МСН 11,1 месяцев, 6-ти и 12-ти месячная выживаемость составила 58% и 44%. МПЖ у пациентов без хирургических вмешательств составила 19,1 мес., а у пациентов с различными объемами инвазивных вмешательств 44,4 мес. Разница статистически достоверна ( $p=0,028$ ). (95% ДИ 4,4- 5,2 мес.). Такая закономерность может быть объяснена тем, что хирургическим манипуляциям на опухоли подвергались больные, у которых инфильтративный компонент опухоли сочетался с экзофитным, который и был объектом биопсии или частичного удаления. Такой рост опухоли чаще бывает при более доброкачественной ее структуре.

Хотя эти вмешательства при диффузно растущей опухоли ствола имели больше диагностический, чем лечебный, характер, но более доброкачественный

характер опухоли обусловил и лучший эффект лечения. В частности, среди оперированных больных было двое с морфологически подтвержденными

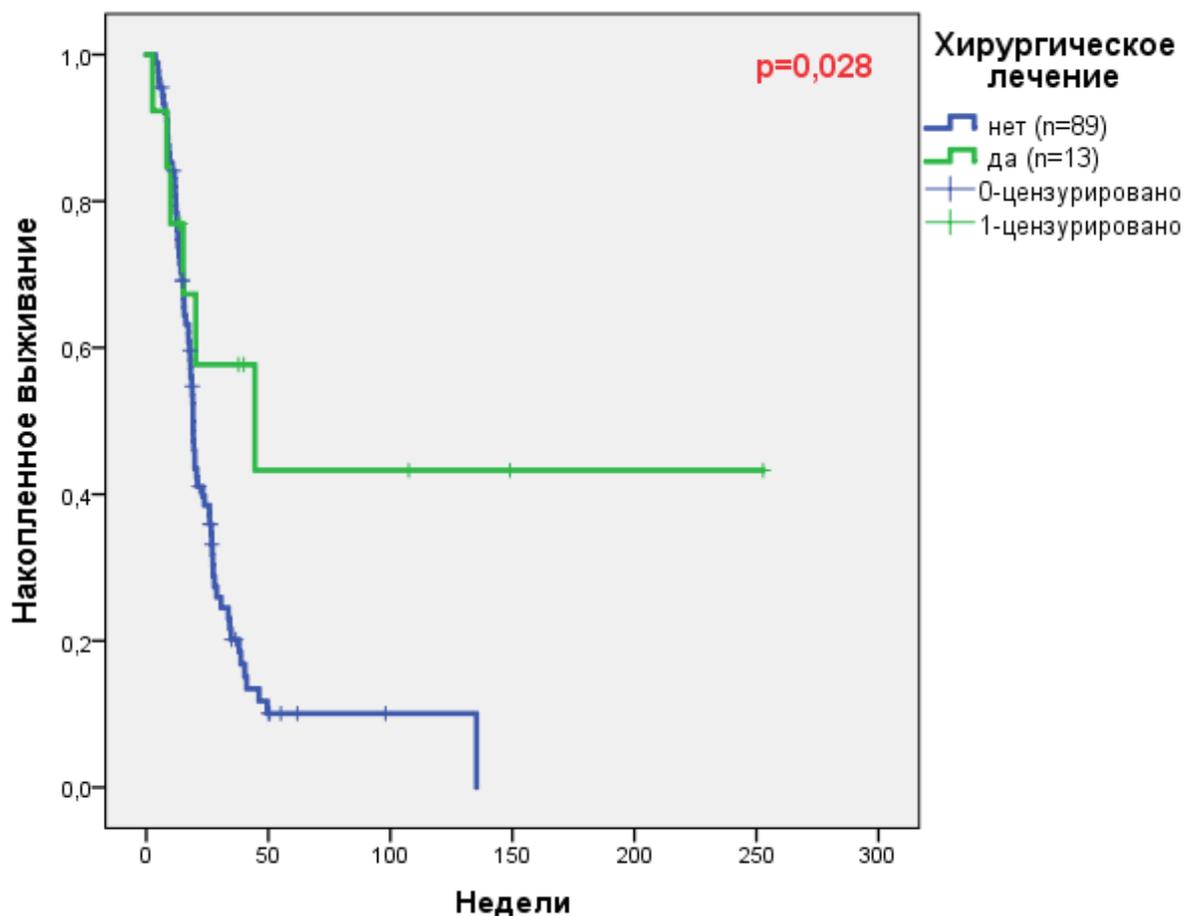


Рисунок 15 – Динамика выживаемости 102 пациентов с ОСГМ в зависимости от хирургического вмешательства на опухоли в анамнезе.

пилоидными астроцитомами, которые продолжают наблюдаться в срок более 5 лет. В качестве примера приведем выписку из и/б ребенка Х. а/к № 4943/99.

*В возрасте 2,5 года у мальчика появились симптомы поражения ствола мозга. При МРТ выявлена диффузно растущая опухоль Варолиева моста. Больному в 1995 г. был проведен курс химиолучевой терапии: лучевая терапия на установке «Рокус» в СОД 55 Гр + химиотерапия ломустином + винкристином с достижением полной регрессии симптомов, хотя при контрольных МРТ опухоль в области моста уменьшилась незначительно. Через 4 года неврологические нарушения возобновились и при контрольном исследовании выявлен рецидив опухоли с преимущественным ростом экзофитно кпереди. В НИИ нейрохирургии им. Н.Н. Бурденко было выполнено удаление экзофитного компонента опухоли. При гистологическом исследовании выявлена пилоидная астроцитома. В*

послеоперационном периоде ребенку был проведен повторный курс лучевой терапии в СОД 45 Гр. Лечение прошло без осложнений. В настоящее время пациент жив, полностью сохранен в интеллектуальном плане, в неврологическом статусе сохраняется легкий парез нижних конечностей, появившийся после операции.

### **Влияние длительности анамнеза до начала противоопухолевого лечения на выживаемость пациентов с ОСГМ**

Теоретически важным прогностическим признаком при ОСГМ должна быть длительность анамнеза до момента начала специального лечения: чем больше длительность анамнеза, тем менее злокачественной должна быть опухоль. На рис. 16 представлены кривые выживаемости для пациентов, у которых между первыми симптомами и началом лечения прошло менее 2- месяцев и более двух месяцев.

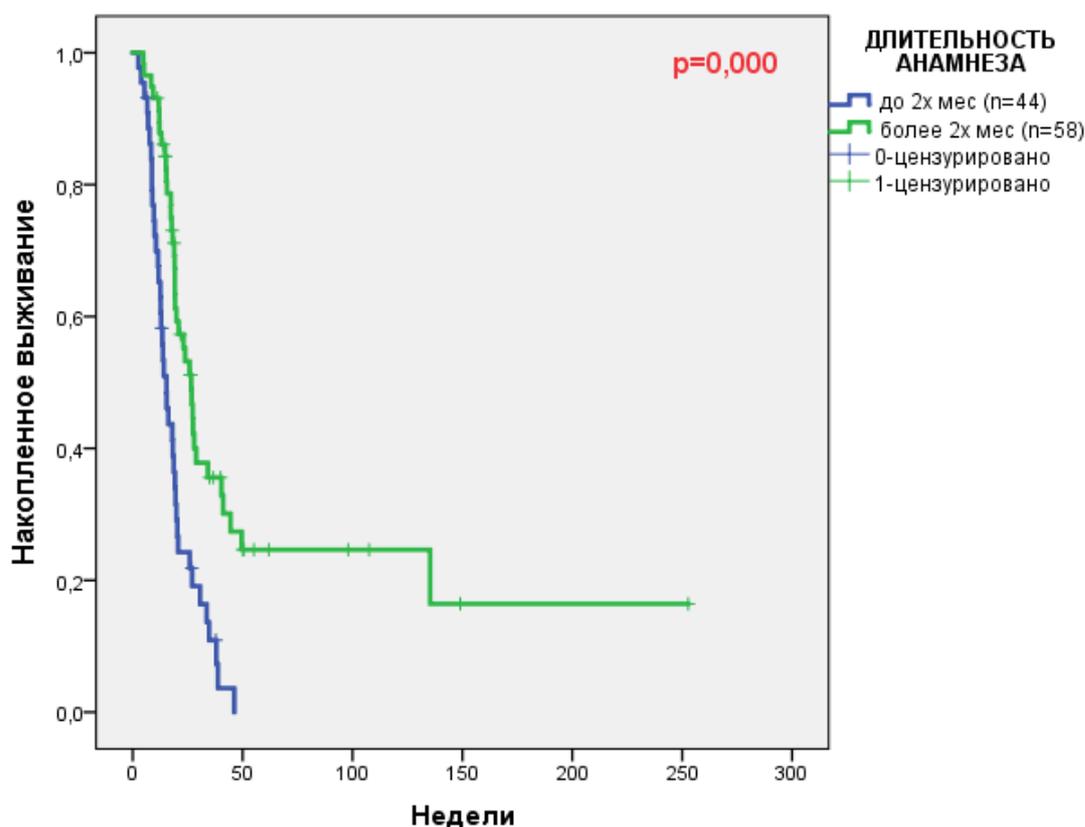


Рисунок 16 – Влияние длительности анамнеза до начала первичного лечения на кумулятивную выживаемость 102 больных ОСГМ.

Как видно из графика на рис. 16, у 44-х пациентов с длительностью анамнеза до 2-х месяцев, МСН которых составила 3,8 мес., 6-месячный срок пережили 24%, до 1 года эти пациенты не дожили. МСН 58 больных с длительностью анамнеза более 2-х месяцев составила 6,7 мес. и МПЖ 26,6 мес., 6-ти и 12-ти месячный срок пережили 60% и 26%. Разница в показателях выживаемости достоверна ( $p=0,000$ ).

### Роль адъювантной химиотерапии во время первичного лечения пациентов с ОСГМ

Как упоминалось выше, у 48 детей первичная лучевая терапия сопровождалась адъювантной химиотерапией с использованием различных препаратов: темозоломида, винкристина, ломустина, фторафура, бевацезумаба, онкофера. На рис. 17 отражены кривые кумулятивной выживаемости для пациентов, получавших и не получавших адъювантную химиотерапию.

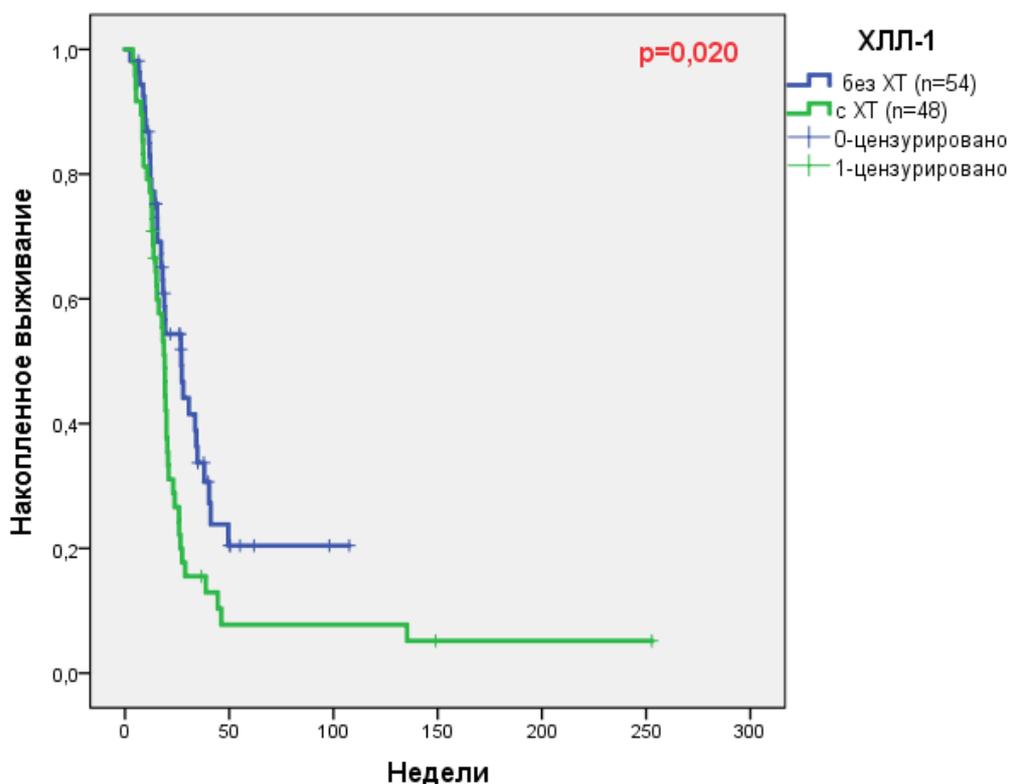


Рисунок 17 – Влияние адъювантной химиотерапии при первичном лечении на кумулятивную выживаемость больных ОСГМ.

Как видно из представленных графиков показатели выживаемости в срок до 2-х лет для детей, не получавших адьювантной химиотерапии, были достоверно лучше ( $p=0,020$ ). МСН у пациентов, находившихся под динамическим наблюдением составила 6,8 мес., 6 и 12 месяцев от момента установки диагноза пережили соответственно 56% и 20%. Для больных, получавших ХТ МСН составила 4,8 мес., 6-и и 12-месячный срок пережили соответственно 30% и 8%, МПЖ для не получавших адьювантной химиотерапии составила 27 мес., с параллельной ХТ - 19,0 мес. (95%ДИ 4,2-9,3 мес.).

### **Влияние консолидирующей химиотерапии после первого курса лечения на выживаемость больных ОСГМ**

Как упоминалось, из всей группы 102 больных по рекомендации онколога 38 детям (37%) после окончания лучевой терапии проводилась консолидирующая химиотерапия темозоломидом. На рис. 18 представлены кривые кумулятивной выживаемости для всей анализируемой популяции больных в зависимости от проведения такой терапии.

Из 38 больных, которым после окончания первичного лечения до момента прогрессирования болезни проводилась химиотерапия, умерли 35 (92%), из 64, не получавших химиотерапии, умерло 43 пациента (67%). Показатель общей 6-ти и 12-ти месячной кумулятивной выживаемости больных в группе пациентов с ХТ после первичного лечения составил 52% и 6% при МСН 4,6 мес. (95% ДИ 2,5-5,4мес.), а в группе пациентов без ХТ- 52% и 24% при МСН 5,1 мес. (95% ДИ 2,8-7,3мес.). МПЖ у пациентов без консолидирующей ХТ 20,3 мес., а у пациентов с ХТ 18,2 мес.

### **Влияние исходного характера МРТ-изображения опухоли на выживаемость больных ОСГМ**

Из всей группы 102 пациентов, при установлении диагноза по данным МРТ головного мозга без и с КУ у 81 пациента (79%) был выявлен солидный рост опухоли, без признаков деструкции (рис. 19). Среди них за анализируемый период

умер 61 ребенок (75%). Из 21 больного с кистозным типом опухоли умерло 17 пациентов (80%). МСН пациентов с солидным ростом опухоли составила 5 месяцев, а пациентов с кистозными изменения в структуре опухоли – 3,6 мес. (ДИ 95% 4,4- 5,2 мес.) 6-ти и 12-ти месячная выживаемость у пациентов, с диффузным ростом опухоли составила 44% и 16%, а у пациентов, с кистозными

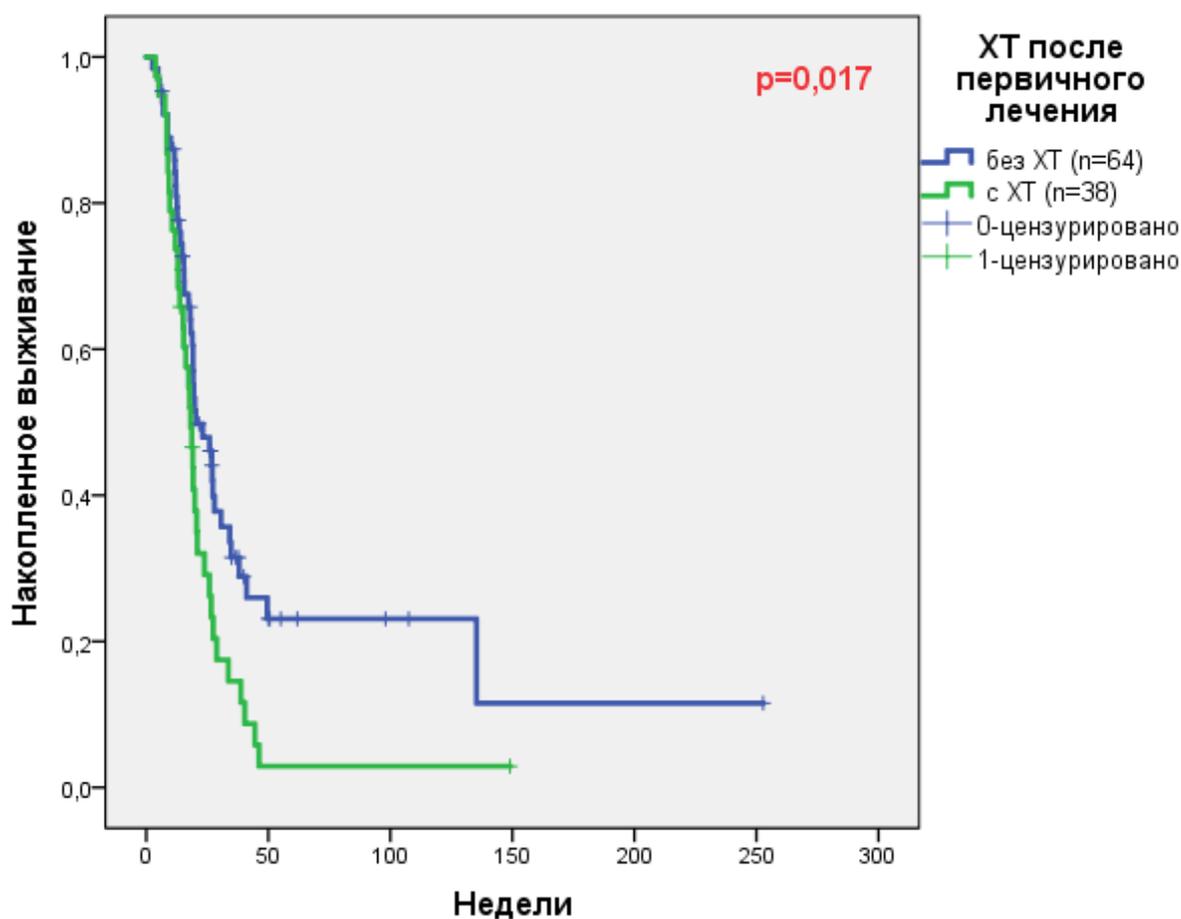


Рисунок 18 – Влияние консолидирующей химиотерапии темозоломидом на показатели кумулятивной выживаемости пациентов с ОСГМ.

изменениями в структуре опухоли составила 24% и 20% соответственно. Статистические различия в исследуемых группах в срок до года не достоверны  $p=0,083$ . Однако, в более поздние сроки выживаемость пациентов с плотными опухолями существенно улучшается и через 2,5года в живых остались только больные без деструкции опухоли. МПЖ для пациентов с солидным ростом опухоли 19,2 мес., для пациентов с кистозным компонентом в опухоли – 14,8 мес.

## Результаты многофакторного анализа выживаемости для 102 больных ОСГМ

При проведении многофакторного анализа для всей группы детей (табл. 11) было выявлено статистически достоверное положительное влияние на показатели кумулятивной выживаемости больных ОСГМ таких факторов как возраст в

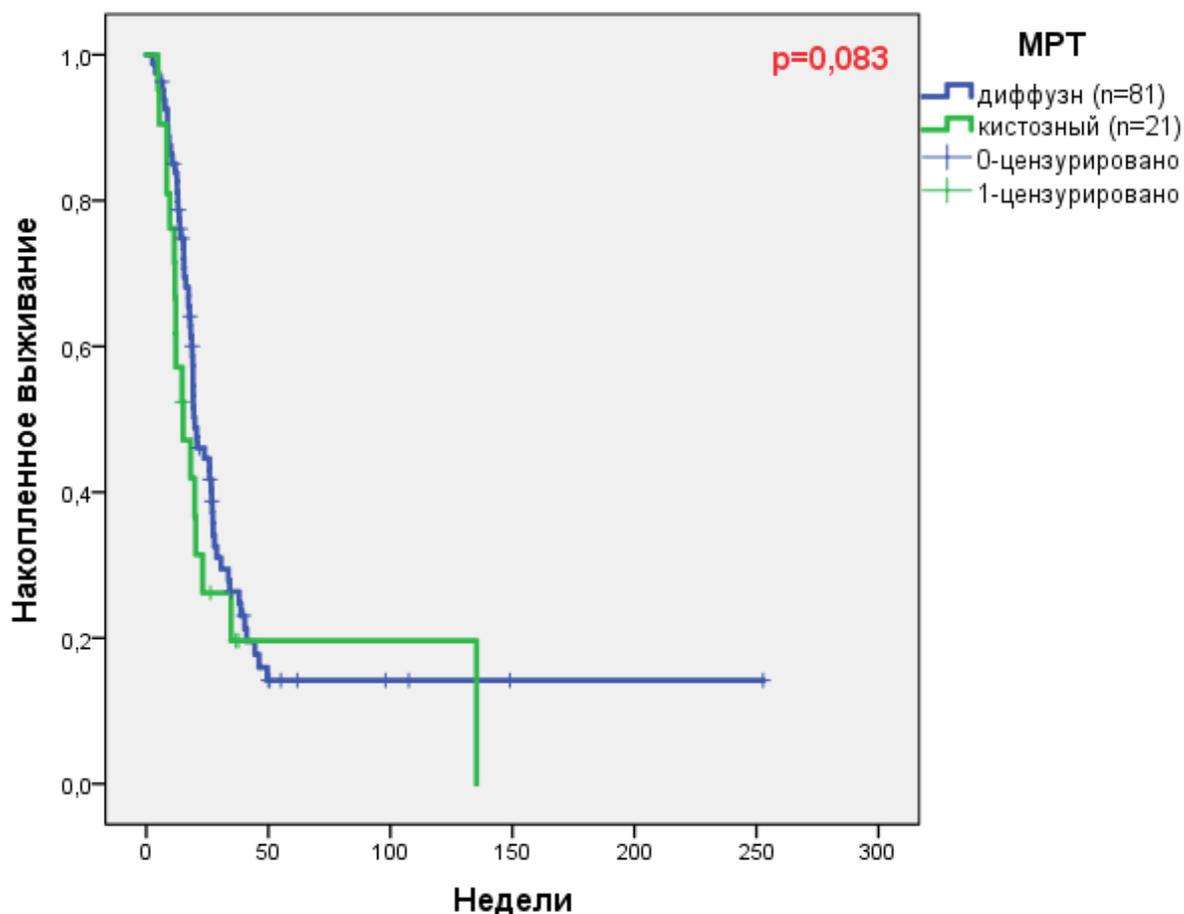


Рисунок 19 – Показатели выживаемости пациентов с ОСГМ в зависимости от характера исходного МРТ- изображения опухоли.

момент начала первого курса менее 3-х лет, длительность анамнеза более 2-х месяцев, выполнение перед консервативным лечением хирургических манипуляций на опухоли, проведение повторного лечения. В то же время не выявлено положительного влияния на показатели выживаемости как адъювантной, так и консолидирующей химиотерапии. Все выявленные положительные факторы прогноза можно отнести к характеристикам степени

Таблица 11 – Сводные данные зависимости медианы продолжительности жизни 102 больных ОСГМ, получивших один и два курса лечения, в зависимости от некоторых клинико-рентгенологических параметров.

Клинико-рентгенологические параметры	Медиана продолжительности жизни от выявления заболевания	Доверительный интервал	Степень достоверности (p)
Младше 3-х лет	34,2	12,9-55,5	0,044
Старше 3-х лет	19,1	17,5-20,8	
Мальчики	25,9	17,7-34,2	0,6
Девочки	19,0	18,0-20,1	
Операция выполнялась	44,4	17,7-20,5	0,028
Не выполнялась	19,1	0,0-99,1	
Длительность анамнеза < 2 мес.	15,4	12,0-18,7	0,001
Длительность анамнеза > 2 мес.	26,6	21,4-31,9	
АХТ проводилась	19,0	17,1-21,0	0,02
АХТ не проводилась	27,0	16,9-37,0	
КХТ при первой ремиссии проводилась	18,2	14,9-21,5	0,017
КХТ при первой ремиссии не проводилась	20,3	11,5-29,0	
Исходно опухоль солидная	19,2		0,083
Исходно опухоль солидно-кистозная	14,8	4,4-5,2	

злокачественности опухоли, поскольку у детей раннего возраста чаще наблюдаются доброкачественные глиомы, для таких же форм характерна большая длительность анамнеза, чаще наблюдается экзофитный компонент, при котором имеется возможность выполнения биопсии или частичного удаления и реже распад опухоли с образованием кист.

## **1.2. Повторное лечение при возобновлении роста опухоли ствола мозга и его результаты**

Тактика при возобновлении процесса роста опухоли зависела от решения региональных детских онкологов, наблюдавших детей, и от состояния больного.

Часть больных направлялась на повторную консультацию в РНЦРР, а в части случаев предпринимались попытки «спасающей» химиотерапии, ряд больных отправлялись под наблюдение региональных детских онкологов и неврологов для оказания симптоматической помощи. В итоге из 102 первично пролеченных и прослеженных пациентов, произвольно сформировались две группы детей: в группе 1 из 52 больных при возобновлении роста опухоли или выявлении метастазов проводилось или только симптоматическое лечение или продолжалась попытка химиотерапии. В группе 2, состоявшей из 50 больных, направленных для консультации в РНЦРР, имевших общее состояние, ретроспективно оцениваемое по шкале Лански не менее чем в 40 баллов или по шкале ECOG- ВОЗ (табл. 12) не менее чем в 3 балла, проводилась повторная лучевая или химиолучевая терапия.

### **Общая характеристика больных группы 2, прошедших повторное лечение**

Из 50 пациентов с продолженным ростом ОСГМ, направленных для повторного лечения больных 21 (42%) после первого курса лучевой терапии получали консолидирующую химиотерапию темозоломидом, на фоне которой продолжалось прогрессирование опухоли и у 29 возобновление роста опухоли

Таблица 12 – Шкала ECOG-ВОЗ для оценки состояния онкологических больных.

Баллы	Характеристика состояния больного
0	Нормальная активность больного
1	Есть симптомы заболевания, но больной ведет активный образ жизни
2	Ведет активный образ жизни более 50% времени, но иногда нуждается в отдыхе в постели
3	Нуждается в отдыхе более 50% дневного времени, способен обслуживать себя сам
4	Нуждается в постоянном уходе, прикован к постели

констатировано на фоне динамического наблюдения. Заключение о возобновлении роста опухоли делалось на основании клинических данных (нарастание неврологических нарушений после стабилизации состояния в течение не менее 2-х месяцев) и результатов контрольной МРТ с контрастным усилением, при которой выявляли признаки увеличения объема опухоли и/или появление метастазов. В анализируемой группе преобладали больные с возобновлением роста первичной опухоли (табл. 13). Длительность первой ремиссии у больных гр. 2 колебалась от 4 месяцев до 4-х лет. У 6 (12%) этот показатель был менее 6 месяцев и у 44 (88%) превышал этот срок (рис. 20).

Наше исследование базировалось на ретроспективном анализе клинических наблюдений, оно не было рандомизированным и вопрос о сочетании лучевой терапии с адьювантной химиотерапией решался индивидуально в зависимости от состояния больного, МРТ-изображения и длительности первой ремиссии. На рис. 21 изображено распределение больных группы 2 в зависимости от типа адьювантного лечения.

Таблица 13 – Распределение больных по характеру возврата заболевания, МРТ-картине роста опухоли.

Характер возврата опухолевого процесса и роста опухоли в группе 2	Число	%
Возобновление роста первичной опухоли	46	92
Метастазы в пределах ЦНС	4	8
Солидный	36	72
Солидно-кистозный	14	28
Всего	50	100

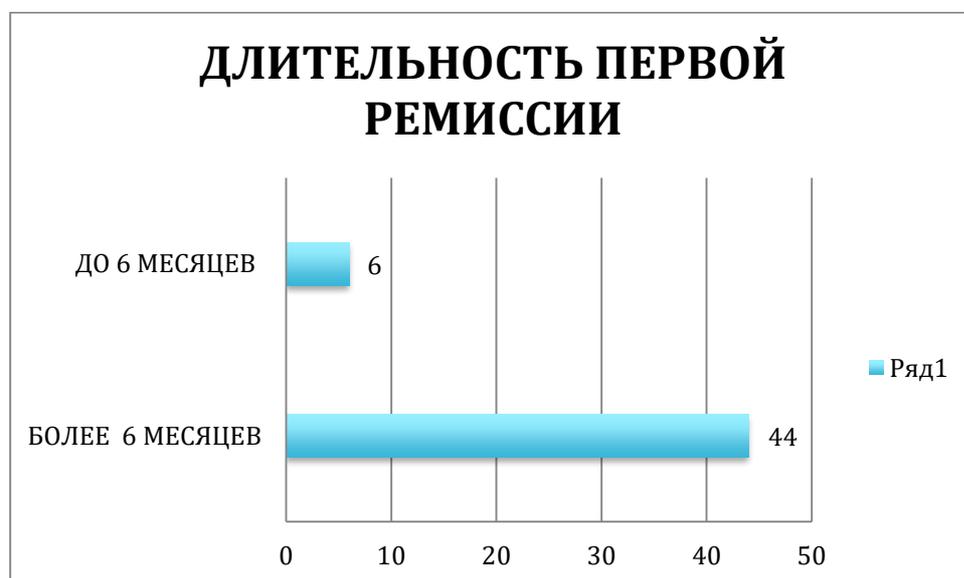


Рисунок 20 – Длительность первой ремиссии у больных ОСГМ, поступавших для повторного лечения.

У 22 детей при повторном лечении использовалась только лучевая терапия и у 28 она сочеталась с адъювантной химиотерапией, в том числе у 23 темозоломидом с добавлением в 10 случаях бевацезумаба и у 5 винкристином. Методика предлучевой подготовки и фракционирования дозы при повторном лечении были идентичны использованным при первичном лечении.

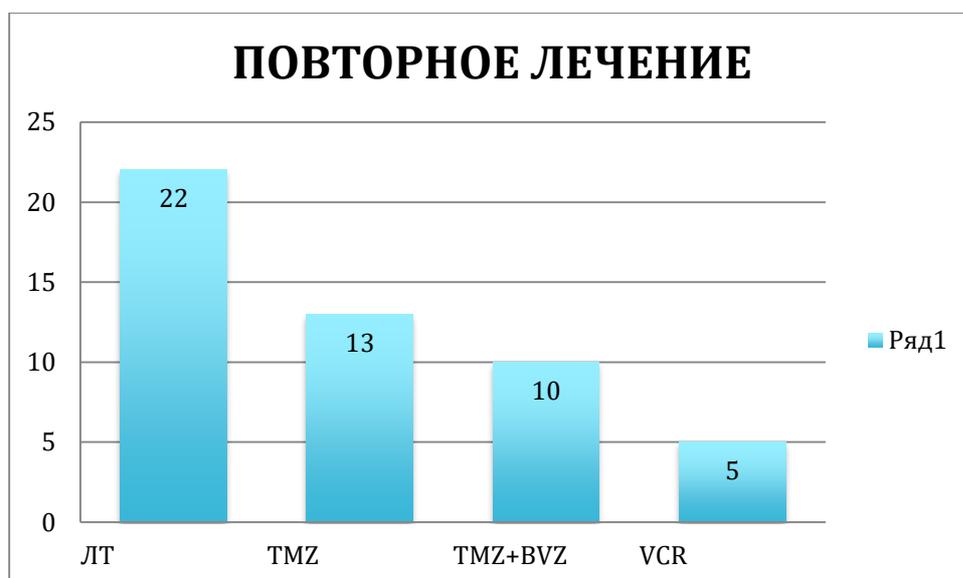


Рисунок 21 – Распределение больных группы 2 по характеру повторного лечения и варианты адъювантной химиотерапии при повторном лечении (ЛТ- только лучевая терапия, TMZ – 75 мг на м<sup>2</sup>. ежедневно, TMZ+BVZ - темозоломид 75 мг на м<sup>2</sup> ежедневно+ бевацезумаб 1 раз в 2 недели. VCR - винкристин 1,5 мг на м<sup>2</sup> раз в неделю).

Нестандартность ситуации и отсутствие рекомендаций по оптимальным суммарным дозам при повторном облучении, опасения развития радиационных повреждений структур ствола заставили нас выбирать величины суммарных доз в зависимости от переносимости и характера роста опухоли. При хорошей переносимости и солидном характере роста опухоли суммарная доза доводилась до 46-50 Гр. У 43 (86%) больных СОД составила от 40 до 46 Гр (рис. 22). У трех больных, имевших большие опухоли с зонами распада и выраженным перифокальным отеком, лечение было прервано на дозе до 15 Гр в связи с ухудшением состояния, которое не удалось купировать интенсивной дегидратационной терапией. Эти больные умерли в течение 2-х месяцев после прекращения лечения. У 4 больных суммарная доза составила от 15 до 30 Гр.

Сопроводительная терапия при повторном лечении была идентичной применявшейся при первичном лечении: глюкокортикоидная терапия с



Рисунок 22 – Распределение больных гр. 2 в зависимости от суммарной дозы повторной лучевой терапии.

индивидуальным подбором дозы и способа введения дексаметазона, диуретики по показаниям, профилактика грибковой и микробной инфекции.

После окончания повторной терапии 14 больных по назначению онколога получали консолидирующую химиотерапию: у 11 использован темозоломид, в том числе у 2 в сочетании с бевацезумабом, одного только бевацезумаб и у двоих другие препараты.

#### **Непосредственные результаты повторного лечения**

Переносимость повторного лечения была удовлетворительной. Случаев местной или общей лучевой реакции не наблюдалось. Не отмечено также осложнений при сочетании лучевой терапии с адъювантной химиотерапией, за исключением миелодепрессии легкой степени у части больных, получавших темозоломид, не потребовавшей дополнительного лечения.

Непосредственные результаты повторного лечения отражены в таблице 14. Согласно данным, полученным в нашей работе, к концу повторного лечения из 35 детей, статус которых исходно оценивался в 40- 50 баллов, у 30 (85%) он улучшился, в группу с исходным статусом 70-90 баллов, исходно представленную

одним ребенком, включились дополнительно включилось еще 10 детей и только у 5 больных состояние ухудшилось или не изменилось.

Таблица 14 – Динамика неврологического статуса больных ОСГМ по шкале Лански к концу повторного лечения.

Оценка в баллах по шкале Лански	До лечения		После лечения	
	Число больных	%	Число больных	%
40-50	35	70	5	10
50-60	14	28	34	68
70-90	1	2	11	22

### **Отдаленные результаты и роль некоторых клинических факторов в эффективности повторного лечения при возобновлении роста ОСГМ**

Результаты статистического анализа кумулятивной выживаемости больных гр. 2 в сравнении с больными, получившими только один курс лечения, представлены на рис. 23.

По данным графиков при МСН больных гр. 2 после повторного лечения 4,8 месяцев (95% ДИ 4,4-5,2 мес.) в срок до года показатели выживаемости больных, получивших один или два курса лечения, были одинаковы, в более поздние сроки явные и статистически достоверные преимущества ( $p=0,001$ ) имелись в группе получивших повторное лечение. По показателю общей кумулятивной выживаемости в исследуемых группах выявлены достоверные статистические различия. Медиана продолжительности жизни в группе больных, получивших один курс лечения, составила 14,7 месяцев, в группе лечившихся повторно 23,8 месяцев.

Нами был проведен анализ прогностической значимости некоторых клинических и рентгенологических факторов в группе больных, получавших повторное лечение.

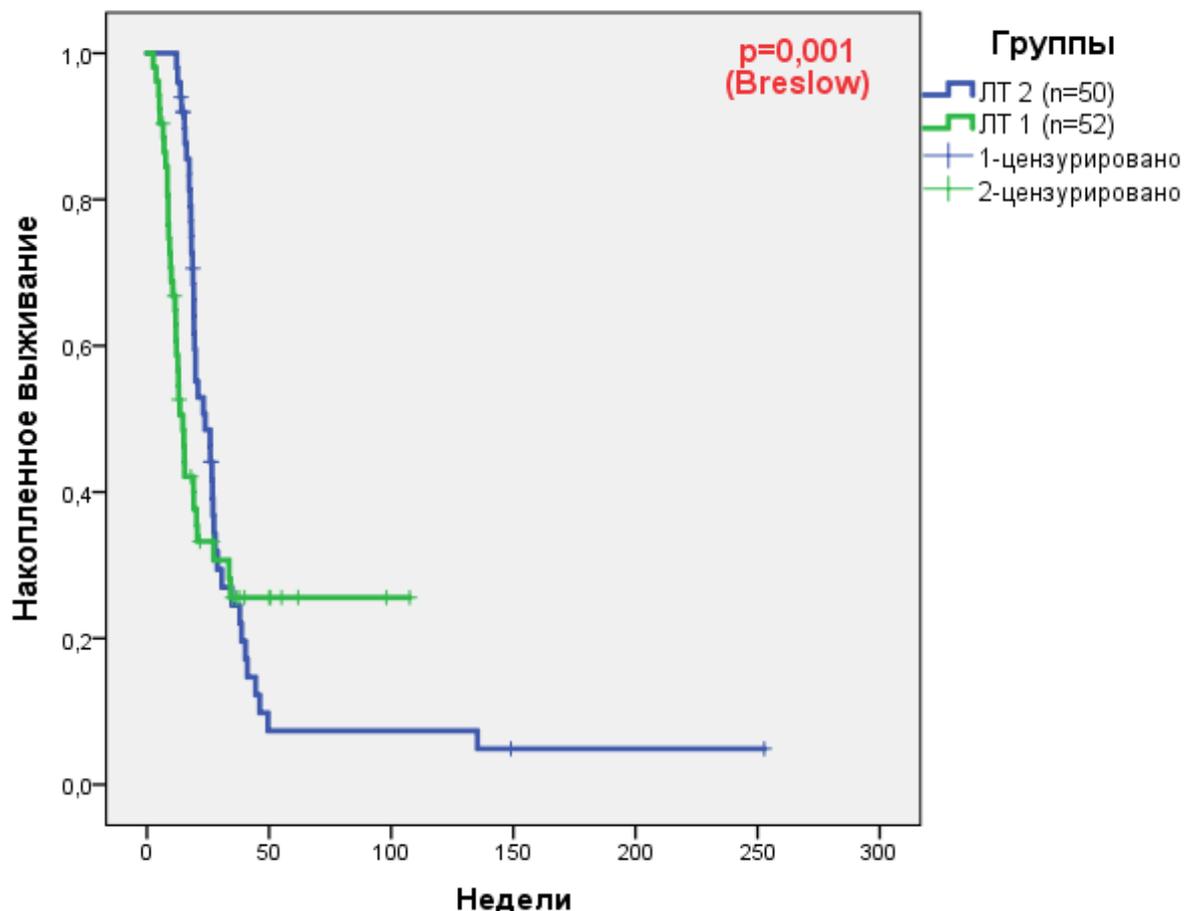


Рисунок 23 – Сравнение кумулятивной выживаемости больных ОСГМ в гр. 1 и 2.

### **Влияние шунтирующих операций на выживаемость после повторного лечения**

Из 50 больных, которым проведено повторное лечение, в 6 случаях (12%) в связи с декомпенсированной гидроцефалией были выполнены шунтирующие операции. Как видно из рис. 24, все эти 6 пациентов умерли в течение первого года после повторного лечения, в то время как из 44 больных, которые не подвергались ВПШ, умерли 36 (82%). При МСН 5,7 мес. МПЖ у пациентов с ВПШ составила 18,2 мес., без ВПШ при МСН 4,5 мес., ОВ- 23,8 мес. Объяснить такую

закономерность можно тем, что шунтирование выполнялось в наиболее тяжелых случаях, при выраженном гидроцефальном синдроме и больших размерах опухоли. Постановка ВПШ продлевала этим жизнь, а проводимое повторное лечение временно улучшало качество жизни за счет нивелирования выраженности неврологических нарушений, но не оказывало существенного вклада в продление жизни более года.

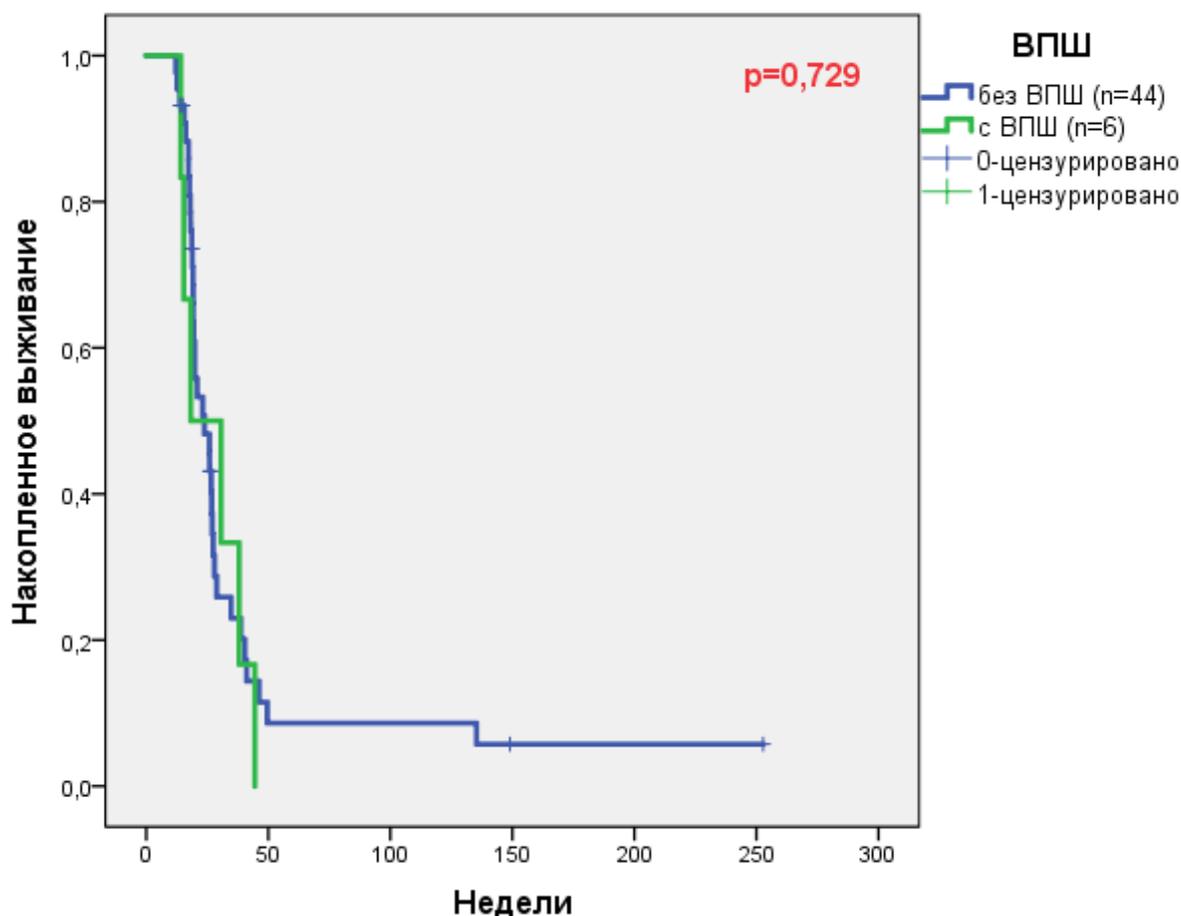


Рисунок 24 – Влияние шунтирующих операций на показатели выживаемости пациентов с ОГСМ при повторном лечении.

### Роль длительности первой ремиссии

Из 50 больных, которым проведено повторное лечение, у 6 пациентов (12%) длительность первой ремиссии была менее 6 месяцев. Как видно из рис. 25, все

они умерли в течение полугода после повторного лечения, в то время как из 44 пациентов, имевших ремиссию более 6 месяцев, умерло 36 человек

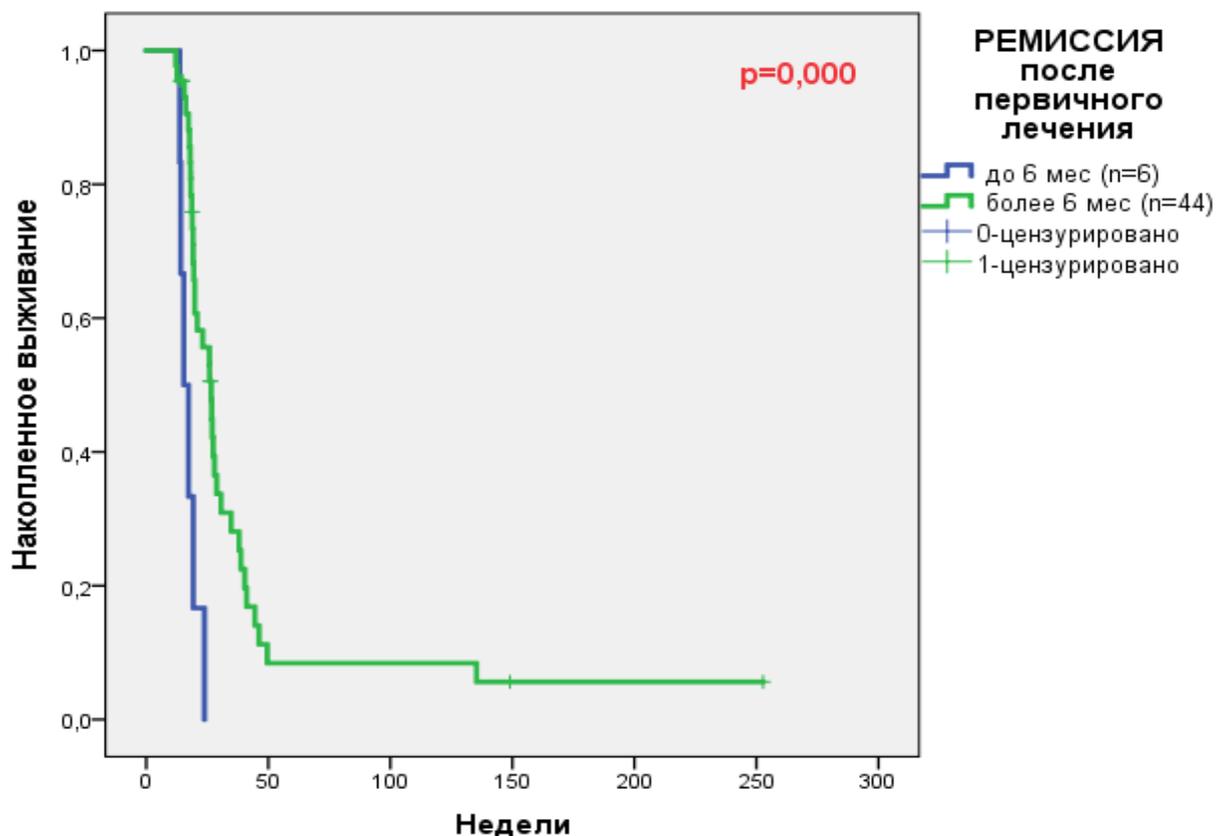


Рисунок 25 – Влияние длительности первой ремиссии на показатели кумулятивной выживаемости больных ОСГМ.

(82%). Ни один из больных с длительностью ремиссии менее 6 месяцев не пережил полугодовой срок после окончания повторного лечения, в то время как при длительности ремиссии более 6 месяцев показатели 6-месячной и 12-месячной выживаемости составили 56% и 10% соответственно. (95% ДИ 5,3-7,9 мес.). Статистические различия по показателю общей выживаемости в исследуемых группах достоверны  $p=0,000$ . МПЖ от момента окончания повторного лечения для больных, имевших первую ремиссию короче 6 месяцев составила 3,9 мес., у пациентов с ремиссией более 6 месяцев 6,7 мес. Таким образом, длительность первой ремиссии является существенным фактором

прогноза при повторном лечении данной категории больных. МПЖ при первой ремиссии менее шести месяцев составила 15,4 мес., у пациентов с ремиссией более длительной 26,6 мес. Это также можно объяснить ролью степени агрессивности опухоли в эффекте лечения и продолжительности жизни больного. Следовательно, при определении показаний и тактики повторного лечения фактор длительности первой ремиссии должен быть обязательно учтен.

### Роль характера изображения структуры опухоли по данным МРТ

Результаты анализа прогностической значимости структуры рецидивной опухоли по данным МРТ представлены на рис. 25.

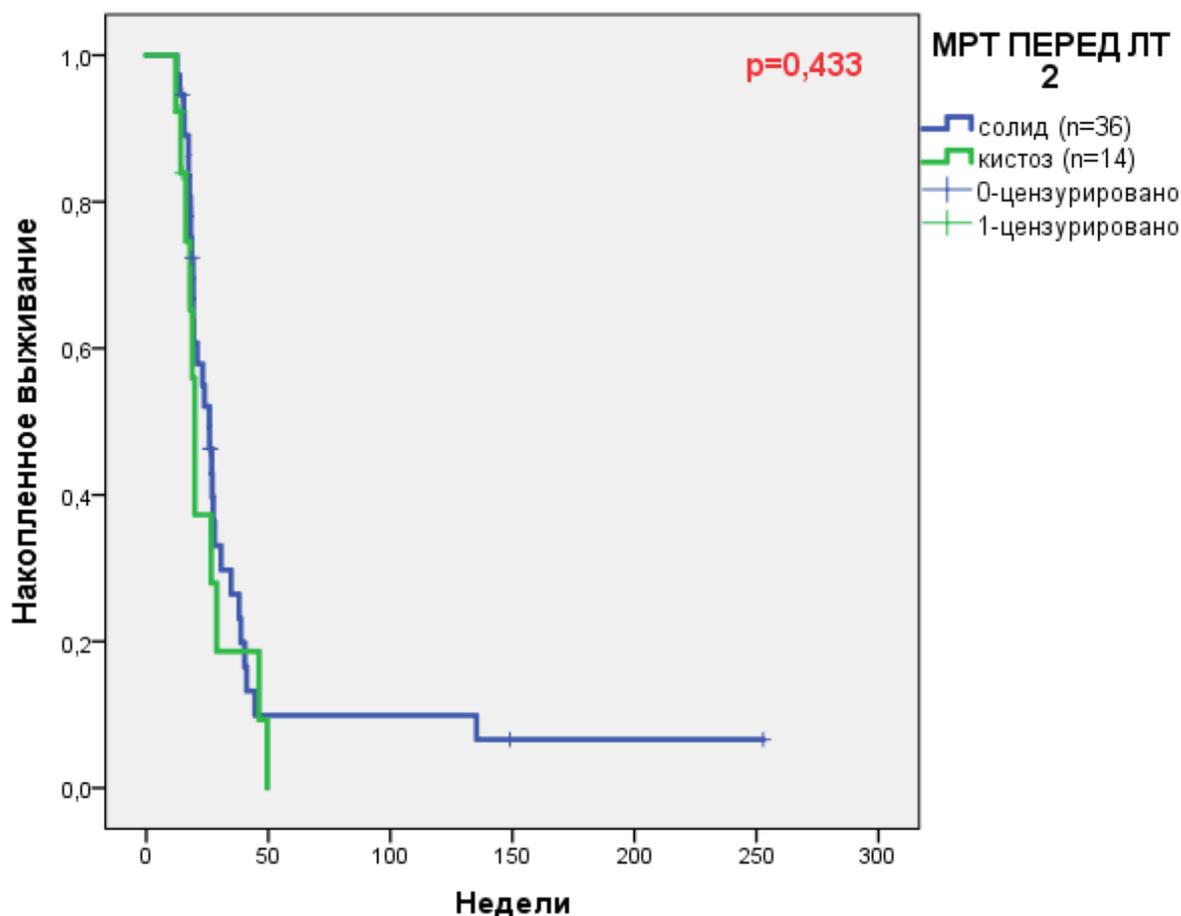


Рисунок 26 – Влияние характера МРТ-изображения рецидивной опухоли на показатели кумулятивной выживаемости больных ОСГМ.

В течение первого года наблюдения показатели выживаемости существенно не зависели от структуры опухоли по данным МРТ. Однако годичный срок был пределом продолжительности жизни для всех больных, имевших на МРТ зоны распада в опухоли: при кистозно-солидной структуре опухоли в течение первого года после повторного лечения все больные умерли, в то время как в сроки более года продолжают жить только больные с плотной опухолью. МПЖ у пациентов с солидным компонентом МР изменений после повторного лечения 25,9 мес., при наличии по данным МРТ признаков распада 18,9 мес.

### Роль адъювантной химиотерапии при повторном лечении

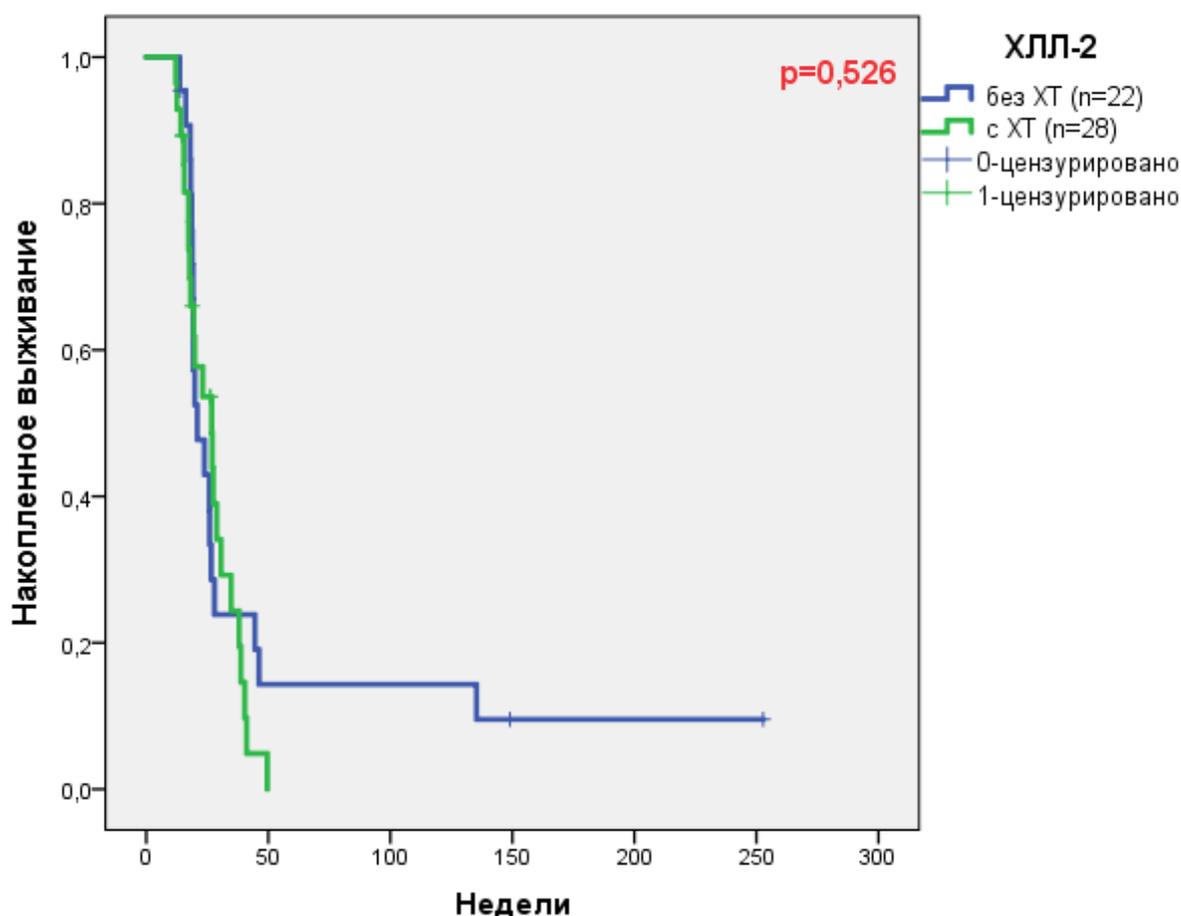


Рисунок 27 – Влияние адъювантной химиотерапии на показатели выживаемости после повторного лечения больных ОСГМ.

Из 50 пациентов 22 получили при повторном лечении только ЛТ. Из них умерло 19 пациентов (86%), МСН для них равнялась 4,2 месяца. У 28 детей лучевая терапия сочеталась с химиотерапией. Из них умерло 23 ребенка (82%), при МСН 5,4 месяца. (ДИ 95% 3,3-6,8 мес.). Сроки в 6 и 12 мес. после повторного лучевого лечения, без ХТ, пережили соответственно 42% и 16%, а у пациентов, которым было проведена адьювантная ХТ в период повторного лечения, составила 56% и 6% соответственно. МПЖ у пациентов без ХТ 20,9 мес., а в группе с адьювантной ХТ 26,8 мес. (рис. 27). Статистические различия в исследуемых группах недостоверны ( $p=0,526$ ). Таким образом, проведение химиотерапии при повторном курсе лучевой терапии продолженного роста ОСГМ не влияет на показатель общей выживаемости.

**Влияние консолидирующей химиотерапии темозоломидом,  
проведенной после первого курса лечения, на выживаемость после  
повторного курса**

Нами было оценено влияние проводившейся в период первой ремиссии консолидирующей химиотерапии на показатели выживаемости после повторного лечения.

Как видно из рис. 28, проводившаяся в период первой ремиссии консолидирующая химиотерапия не оказала влияния на результаты повторного лечения: и 12 месяцев после повторного лечения пережили соответственно 54% и 6% из больных получавших такую химиотерапию и 54% и 10% не получавших ( $p= 0,944$ ). МПЖ в обеих группах пациентов составила 23,1 и 23,8 мес. Это еще раз подтверждает факт, что результаты химиолучевого лечения диффузно растущей опухоли ствола мозга с использованием доступных в настоящее время препаратов и их комбинаций незначительно отличаются от результатов лучевой терапии, при этом важно учитывать явления токсичности и существенных финансовых затрат. Однако, необходимо учесть, что наше исследование не было рандомизированным и ХТ назначалась в основном больным, имеющим признаки злокачественной опухоли.

## Влияние консолидирующей химиотерапии после повторного лечения на показатели выживаемости

На рис. 29 отражены показатели кумулятивной выживаемости больных,

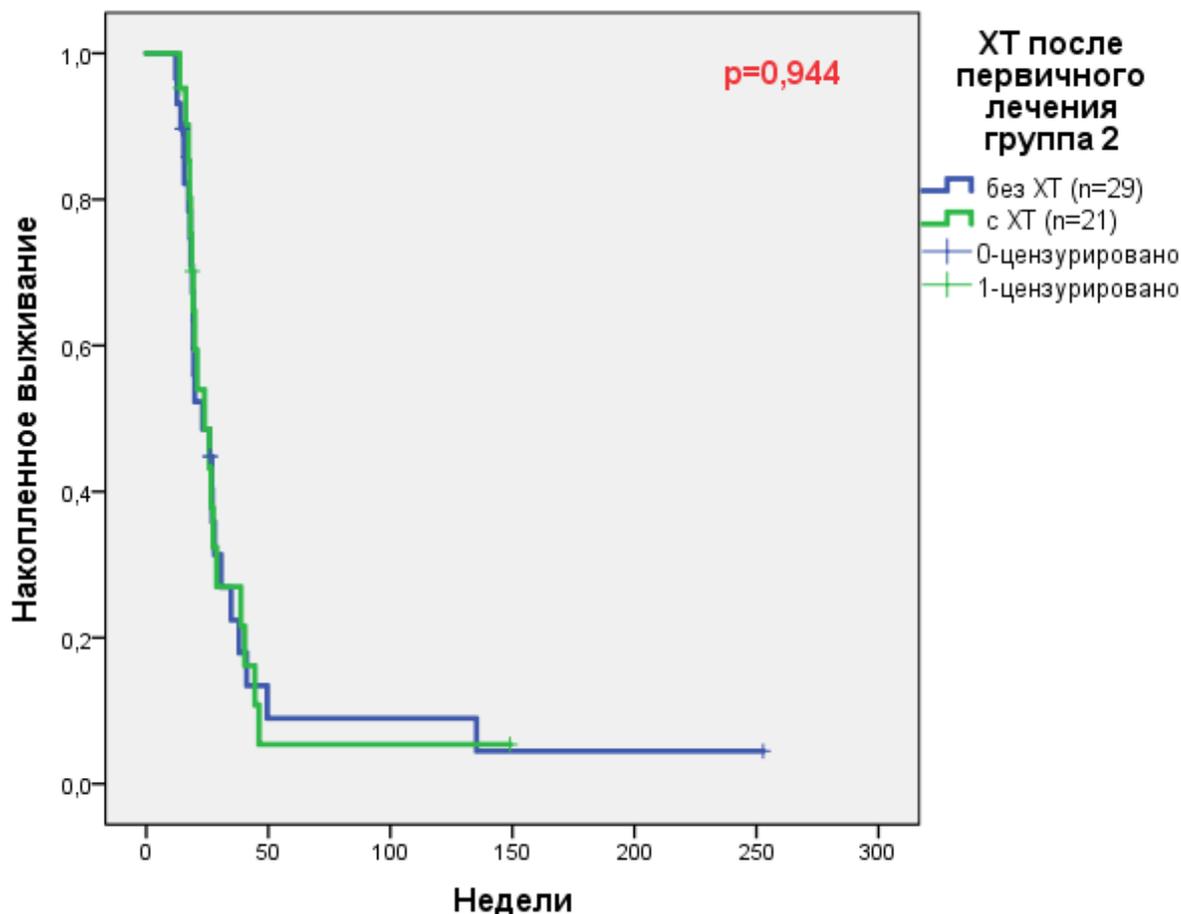


Рисунок 28 – Влияние ранее проведенной после первого курса консолидирующей химиотерапии темозоломидом на показатели кумулятивной выживаемости при повторном лечении больных ОСГМ.

получавших или не получавших после повторного лечения консолидирующую химиотерапию. Ни один из использованных вариантов консолидирующей химиотерапии после повторного лечения не улучшил показатели выживаемости. МСН для всех пациентов составила 5,9 месяцев (95% ДИ 1,1-3,9 мес.). МСН в группе пациентов без ХТ после окончания повторного лечения составила 6,5 мес., а МСН в группе пациентов с различными видами лекарственного лечения составила 5,9 месяцев. МПЖ у пациентов, получавших консолидирующую ХТ

после повторного лечения составила 19, 2 мес., а у пациентов, не получавших ХТ- 25,9 мес. Такое отрицательное прогностическое значение консолидирующей ХТ можно объяснить тем, что ХТ назначалась наиболее тяжелым больным, имеющим факторы неблагоприятного прогноза.

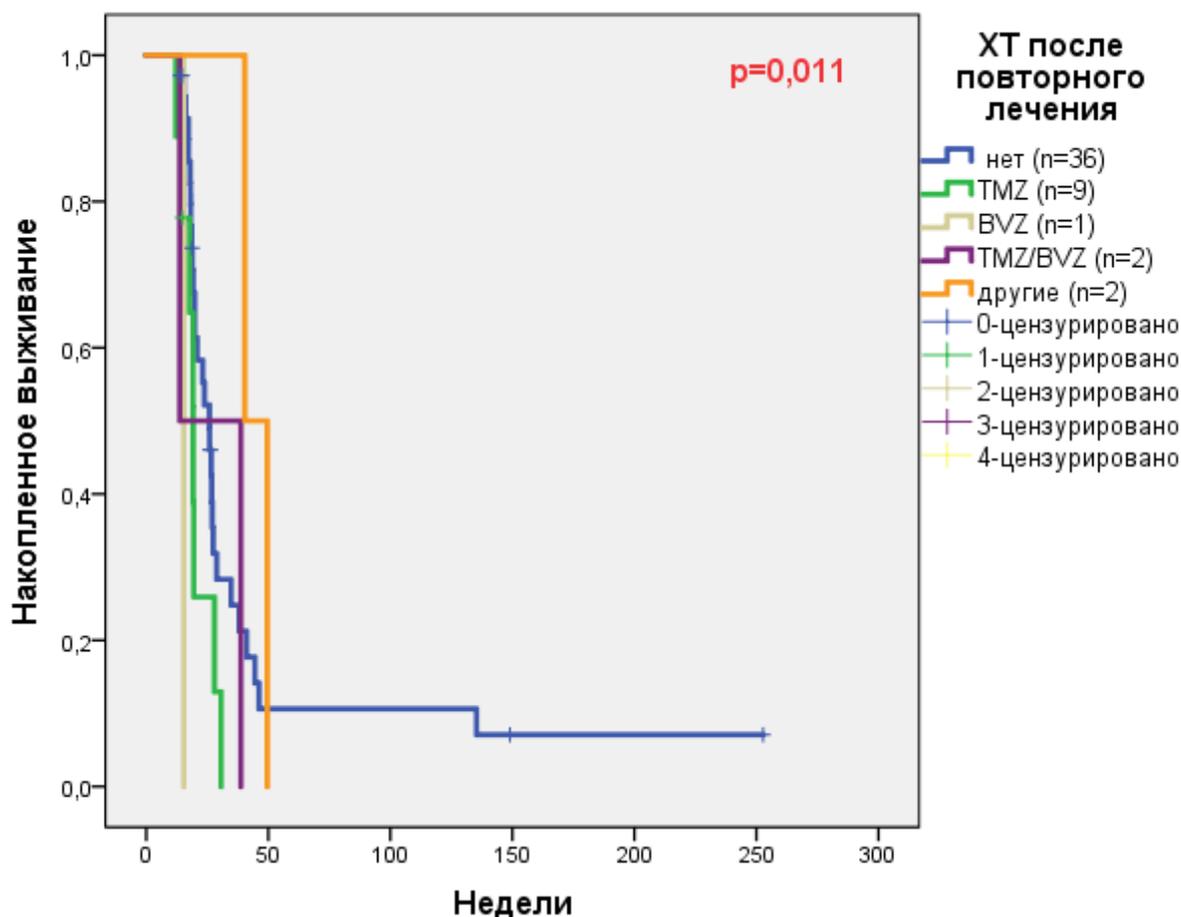


Рисунок 29 – Влияние консолидирующей химиотерапии после повторного лечения на показатели кумулятивной выживаемости больных опухолью ствола головного мозга во второй группе.

### **Влияние величины суммарной дозы облучения на выживаемость после повторного лечения**

На рис. 30 представлены кривые кумулятивной выживаемости в зависимости от суммарной дозы облучения. Все больные, получившие дозу менее 30 Гр, умерли в течение первого года. Хотя в первый год разница в показателях выживаемости не зависела от СОД, но в сроки более года оставались под

наблюдением только 46 (92%) больных, у которых СОД была более 31 Гр. МПЖ у пациентов с СОД до 30Гр- 19,8 мес., при СОД 31-50 Гр- 23,8 мес. Следовательно, с увеличением суммарной дозы возрастает стойкость достигнутого эффекта стабилизации роста опухоли и увеличивается продолжительность жизни.

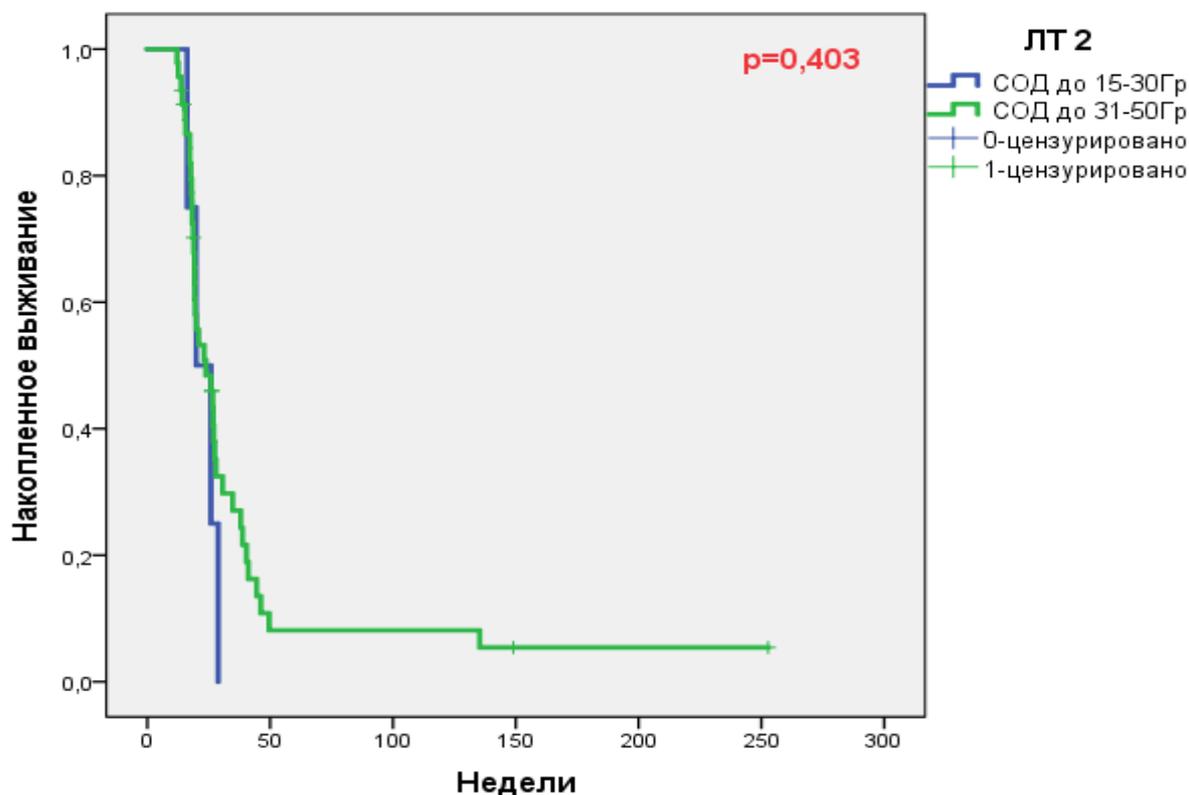


Рисунок 30 – Зависимость выживаемости пациентов с ОСГМ от величины суммарной дозы облучения.

### 1.3. Обсуждение результатов повторного лучевого и химиолучевого лечения больных ОСГМ

Проведенное исследование показало, что при помощи существующих в настоящее время методов консервативного лечения полное излечение ОСГМ невозможно. Современная лучевая и химиолучевая терапия позволяют уменьшить

или полностью устранить неврологические расстройства, вызванные растущей опухолью, но не приводят к полной регрессии новообразования. Поэтому практически у всех больных в различные сроки наблюдается возобновление роста опухоли. Длительность достигаемой в результате ремиссии зависит от степени агрессивности опухоли. При глиомах высокой степени злокачественности (глиобластомах), которые клинически проявляются коротким анамнезом, быстрым нарастанием выраженности неврологических нарушений, частым наличием на МРТ-изображении признаков деструкции опухоли, возобновление роста после лучевой или химиолучевой терапии наблюдается уже в течение 2-3-х месяцев после окончания лечения. При менее злокачественных анапластических астроцитомах, которые проявляются более медленным нарастанием симптоматики и более редким выявлением на МРТ зон распада, период ремиссии может достигать 6-8 месяцев. Наиболее стойкий эффект лечения при глиомах низкой степени злокачественности (пилоцитарных астроцитомах), которые, как правило, проявляются постепенным и интермитирующим нарастанием неврологических нарушений, отсутствием признаков деструкции опухоли на МРТ-изображении и, как правило, отсутствием или низким уровнем фиксации гадолиния при позитронно-эмиссионной томографии. При таких опухолях при помощи лучевой терапии возможно достичь длительной стабилизации роста опухоли, хотя риск возобновления ее роста сохраняется, видимо, на протяжении всей жизни больного.

Многофакторный анализ роли ряда клинических и рентгенологических признаков в прогнозе заболевания показал возможность их использования в индивидуализации программы лечения (табл. 16.). Большая часть значимых для прогноза параметров прямо или косвенно связана с признаками, характеризующими степень злокачественности опухоли. К числу таких признаков относятся возраст моложе 3-х лет, когда у детей чаще бывают врожденные опухоли низкой злокачественности, длительность анамнеза более 2-х месяцев, длительность ремиссии более 4-6 месяцев, отсутствие зон деструкции опухоли на

Таблица 16 – Сводные данные зависимости медианы продолжительности жизни больных ОСГМ, получавших повторный курс лечения, в зависимости от некоторых клинико-рентгенологических параметров.

Клинико-рентгенологические параметры	Медиана продолжительности жизни от выявления заболевания	ДИ 95,0%	Степень достоверности (p)
Один курс лечения	14,7	11,8 - 17,6	0,01
Два курса лечения	23,8	15,9 - 31,8	
Выполнено ВПШ	18,2	0,000 - 36,6	0,7
Без ВПШ	23,8	16,4 - 31,2	
Первая ремиссия менее 6 месяцев	15,4	11,6 - 19,2	0,01
Первая ремиссия более 6 месяцев	26,6	21,2 - 32,1	
МРТ-картина диф. опухоль, без распада	25,9	19,3 - 32,5	0,4
Имеются зоны распада	18,9	18,3 - 31,8	
АХТ проводилась	26,8	16,6 - 37,0	0,5
АХТ не проводилась	20,9	14,1 - 27,7	
КХТ при первой ремиссии проводилась	23,8	15,5 - 32,1	0,9
КХТ при первой ремиссии не проводилась	23,1	12,2 - 34,0	
КХТ при второй ремиссии проводилась	19,2	1,0 - 17,3	0,011
КХТ при второй ремиссии не проводилась	25,9	2,4 - 21,2	
СОД ЛТ до 30 Гр	19,9	10,4 - 29,3	0,4
СОД ЛТ более 31 Гр	23,8	15,6 - 32,0	
Сокращения: ВПШ-вентрикуло-перитонеальное шунтирование МРТ- магнитно-резонансная томография КХТ- консолидирующая химиотерапия АХТ – адьювантная химиотерапия			

МРТ- изображения. Повторная лучевая терапия также позволяет не только улучшить качество жизни, но и части больных увеличить ее продолжительность.

При использовании классического фракционирования и суммарных дозах от 30 до 46 Гр повторное облучение не сопровождается клинически значимым риском фатальных осложнений.

### **3.4. Результаты молекулярно-генетических исследований ДНК опухоли в плазме периферической крови методом цифрового ПЦР**

Всего методом цифрового ПЦР проанализировано 146 образца плазмы периферической крови, полученных от 60 пациентов- группа 3, из них у 31 был установлен диагноз ОСГМ– группа 3А и у 29 другие ОГМ- группа 3Б. Возрастной состав, в зависимости от локализации представлен в таблицах 17, 18 и 19.

Таблица 17 – Распределение пациентов общей группы 3 с опухолями головного мозга по локализации.

Локализация	N	%
Другие участки головного мозга	29	48,3
Ствол мозга	31	51,7
Всего	60	100

Таблица 18 – Возрастной диапазон пациентов в группе 3Б с диагнозом ОГМ.

Возраст	Частота	Кумул. частота	Процент	Кумул. процент
До 3-х лет	4	4	14	14
3- 7 лет	10	14	34	48
7- 11 лет	8	22	28	76
11- 15 лет	4	26	14	90
15- 19 лет	3	29	10	100
Всего		29		100

Таблица 19 – Возрастной диапазон пациентов в группе 3А с диагнозом ОСГМ.

Возраст	Частота	Кумул. частота	Процент	Кумул. процент
3- 6 лет	12	12	39	39
6- 9 лет	12	24	39	77
9- 12 лет	3	27	10	87
12- 15 лет	4	31	13	100
15- 18 лет	0	31	0	100
Всего		31		100

На первом этапе была оценено совпадение результатов цифровой ПЦР с данными, полученными методикой секвенирования нового поколения (NGS). Для этого были исследованы 11 образцов тканей опухолей, полученных в результате оперативных вмешательств, в которых ранее был проведен молекулярно-генетический анализ спектра соматических мутаций с применением NGS. Было показано, методы цифрового ПЦР и NGS дают полное совпадение результатов как в негативных, так и в позитивных по соматическим мутациям образцах. Наличие тканей опухоли, позитивных по исследованным мутациям позволило нам ставить в серии экспериментов с применением цифрового ПЦР как негативный, так и позитивные контроли.

Далее мы исследовали кровь (плазму) у пациентов с наличием образцов ткани опухоли и показали, что результаты исследования наличия или отсутствия мутаций в ткани опухоли полностью совпадают с результатами исследования плазмы. Т.е. при обнаружении мутации в ткани опухоли, она обнаруживается и в плазме периферической крови.

На следующем этапе мы исследовали образцы плазмы, полученной от пациентов на наличие или отсутствие мутаций генов BRAF (V600E), H3F3A (K27M) и IDH1 (R132H) и проанализировали частоту встречаемости мутаций в исследованных группах. Для общей 3-й группы пациентов мы обнаружили, что мутация BRAF V600E выявляется в 49% случаев, H3F3A K27M в 46%, а IDH1

R132H в 44%. Однако, частота встречаемости мутаций отличалась при сравнении групп 3А с ОСГМ и 3Б с ОГМ. В таблице 20 показана частота встречаемости исследованных мутаций в группе 3А у пациентов с ОСГМ.

Таблица 20 – Частота мутации IDH1, H3F3, BRAF в группе 3А у пациентов с ОСГМ.

Наличие или отсутствие мутации	N	%
IDH1 нет	13	42
IDH1 да	18	58
Всего IDH1	31	100
H3F3 нет	15	48
H3F3 да	16	52
Всего H3F3	31	100
BRAF нет	12	39
BRAF да	19	61
Всего BRAF	31	100

Результаты встречаемости исследованных мутаций в группе 3Б пациентов при локализации отличной от ствола мозга показаны ниже (табл. 21). Таким образом, в группе опухолей ствола мозга достоверно выше количество мутантных опухолей всех исследованных вариантов по сравнению с опухолями, локализуемыми в других частях мозга: IDH1 58,1 и 20%, H3F3A 51,6 и 33,3%, BRAF 61,3 и 33,3% соответственно. Мы также проанализировали сочетанную (одновременную) частоту встречаемости мутаций. Для ОСГМ одновременная частота мутаций BRAF и H3F3A составила - 36% (табл. 22). Частота одновременной встречаемости мутаций BRAF и IDH1 при опухолях ОСГМ составила 41,4% (табл. 23). Частота одновременной встречаемости мутаций H3F3 и IDH1 составила 41,4 % (табл. 24).

Таблица 21 – Частота мутации IDH1, H3F3, BRAF в группе 3Б у пациентов с ОГМ.

Наличие или отсутствие мутации	N	%
IDH1 нет	16	80
IDH1 да	4	20
Всего IDH1	20	100
H3F3A нет	6	67
H3F3A да	3	33
Всего H3F3A	9	100
BRAF нет	16	67
BRAF да	8	33
Всего BRAF	24	100

Таблица 22 – Частота одновременной встречаемости мутаций BRAF и H3F3a в группе 3А с ОСГМ.

N=25 Наличие мутации BRAF	Наличие мутации H3F3A		Сумма
	да	нет	
Да	9	7	16
Нет	4	5	9
Всего	13	10	25

Таблице 23 – Частота одновременной встречаемости мутаций BRAF и IDH1 в группе 3А с ОСГМ.

N=27 Наличие мутации BRAF	Наличие мутации IDH1		Сумма
	да	нет	
Нет	11	6	17
Да	5	5	10
Всего	16	11	27

Таблица 24 – Частота одновременной встречаемости мутаций H3F3A и IDH1 в группе 3А с ОСГМ.

N=29 Наличие мутации H3F3A	Наличие мутации IDH1		Сумма
	да	нет	
Нет	5	8	13
Да	12	4	16
Всего	17	12	29

Сравнение встречаемости одновременно двух мутаций при ОСГМ и ОГМ показывает, что частота таких событий для ОСГМ достоверно выше, так мутации BRAF и H3F3 при ОСГМ и ОГМ встречаются в 36 и 20%, мутации BRAF и IDH1 41,4 и 17,6 %, а IDH1 и H3F3A в 41,4 и 11,1 % соответственно.

Исследование встречаемости одновременно трех мутаций для группы 3А с ОСГМ показало, что частота такого варианта составила 32%, тогда как группа с локализацией опухоли не в стволе мозга с наличием одновременно трех мутаций составила только 13,3% (табл. 25).

Таблица 25 – Частота одновременной встречаемости трех исследованных мутаций BRAF, H3F3A и IDH1 в группе 3А с ОСГМ.

N=25 Наличие мутации H3F3A	Наличие мутации IDH1	Наличие мутации BRAF		Сумма
		Да	Нет	
Нет	Да	3	1	4
Нет	Нет	4	2	8
	Всего	7	3	12
Да	Да	8	3	11
Да	Нет	1	1	2
Всего	Всего	9	4	13

Наличие трех мутаций у пациентов данной группы может служить основанием для характеристики ОСГМ как гетерогенной структуры, требующей индивидуализированного подхода к определению лечебной тактики.

Мы также провели исследование связи частоты обнаружения соматических мутаций в периферической крови с появлением рецидива в период после лучевой терапии. Результаты анализа для суммарной группы пациентов показаны в таблице 26. Согласно полученным данным, наличие мутации BRAF достоверно снижает частоту рецидивов.

Таблица 26 – Суммарные данные о частоте мутаций BRAF при рецидиве у пациентов группы 3.

N=47 рецидив да/нет	Наличие мутации BRAF		Всего
	нет	да	
Нет	12	16	28
Да	12	7	19
Всего	24	23	47

Результаты для группы 3А и 3Б пациентов показаны в таблице 27- 28.

Таблица 27 – Частота рецидивов в группе 3А у пациентов с ОСГМ в зависимости от обнаружения соматической мутации BRAF в периферической крови.

N=25 рецидив да/нет	Наличие мутации BRAF		Сумма
	да	нет	
Да	6	5	11
Нет	9	5	14
Всего	15	10	25

Таблица 28 – Частота рецидивов в зависимости от наличия мутации BRAF в группе 3Б с ОГМ.

N=22 рецидив да/нет	Наличие мутации BRAF		Сумма
	нет	да	
Нет	7	7	14
Да	7	1	8
Всего	14	8	22

Дисперсионный анализ не выявил зависимости частоты рецидивов от наличия мутации BRAF в этой группе.

Анализ связи частоты рецидивирования и наличия мутации H3F3A показал, что для общей группы опухолей головного мозга имеется связь между наличием мутации K27M и частотой рецидивирования (табл. 29). Косвенно эти результаты могут говорить о том, что большую часть опухолей в группе составляют астроцитомы, т.к. для срединных K27M мутантных глиом показана высоко достоверная связь плохого прогноза и наличия мутации H3F3A K27M [42]. Объяснением относительно низкого риска рецидива при выявленной мутации в гене H3F3A может быть так же высокий процент обнаружения одновременной мутации в гене BRAF, что характерно для ганглиоглиом Grade II, которые имеют благоприятное течение заболевания.

Таблица 29 – Частота рецидивов в зависимости от наличия мутации H3F3A в группе 3 со всеми видами ОГМ.

N=42 рецидив да/нет	Наличие мутации H3F3A		Сумма
	нет	да	
Нет	13	13	26
Да	12	4	16
Всего	25	17	42

Эти же тенденции сохраняются и в группе опухолей ствола, хотя статистически эти отличия не достоверны. Для группы 3А пациентов ОСГМ достоверных зависимостей от наличия мутации НЗF3А не обнаружено (табл. 30). Проведенные исследования связи частоты мутаций гена IDH1 и появления рецидивов не обнаружили достоверных корреляций.

Таблица 30 – Частота рецидивов в зависимости от наличия мутации НЗF3А в группе 3А с ОСГМ.

N=26 рецидив да/нет	Наличие мутации НЗF3А		Сумма
	нет	да	
Да	9	3	12
Нет	6	8	14
Всего	15	11	26

### 3.5. Исследование динамики концентрации мутантной ДНК в периферической крови в процессе ЛТ

Было исследовано количество мутантной ДНК в плазме периферической крови пациентов с различной локализацией опухоли до, в процессе и после курса лучевой терапии.

Сравнение средних концентраций всех образцов для групп ОСГМ и ОГМ выявило общую закономерность, заключающуюся в том, что для опухолей ОСГМ характерна более высокая концентрация мутантной ДНК в плазме крови, а для опухолей ОГМ более высокая концентрация молекул дикого типа (табл. 31).

Сравнение средней концентрации в группах с и без рецидива для ОСГМ показывает, что имеется четкая тенденция (а для отношения количества

мутантной ДНК и ДНК дикого типа гена BRAF отличия достоверны) увеличения количества мутантной ДНК в образцах пациентов у которых после курса ЛТ наблюдался рецидив (табл. 32).

Таблица 31 – Сравнение величины средней концентрации молекул ДНК дикого и мутантного типа в плазме периферической крови пациентов группы 3 при опухолях ОГМ и ОСГМ.

Переменная	Т-критерии; Группа 1:ОСГМ Группа 2:ОГМ				
	Среднее ОСГМ	Среднее ОГМ	t-знач.	сс	p
m/w H3F3A*	0,401	0,136	0,745	110	0,457
m/w IDH1	0,104	0,009	4,243	108	0,001
дикий тип IDH1	46,200	88,241	-0,956	108	0,340
R132H IDH1	1,321	0,346	3,592	108	0,000
дикий тип H3F3A	10,441	90,923	-1,318	110	0,190
к27м H3F3A	2,731	0,278	1,279	110	0,203
m/w BRAF	0,326	0,156	2,179	95	0,031
дикий тип BRAF	34,862	68,952	-2,516	95	0,013
v600E BRAF	8,011	3,666	1,769	96	0,079

\*-индекс отображает отношение количества мутантных молекул ДНК к молекулам ДНК дикого типа.

Обнаруженные отличия позволили нам предположить, что концентрация ДНК в периферической крови пациентов с ОСГМ может иметь диагностическое значение для прогноза рецидива у этих пациентов. Для проверки этого факта мы провели дискриминантный анализ. В качестве анализируемых переменных были использованы концентрации ДНК как мутантных, так и дикого типа, а также их отношения. Всего 9 переменных. В качестве клинических показателей были

включены размер опухоли, определяемый по данным МРТ исследования и возраст пациентов.

Таблица 32 – Сравнение средней концентрации молекул ДНК в плазме периферической крови у пациентов группы 3А с ОСГМ в группах с наличием и отсутствием рецидива.

Переменная	Среднее Группа с рецидивом	Среднее Группа без рецидива	t- нач.	сс	p
v600E BRAF	3,76	6,54	-1,506	45	0,139
дикий тип BRAF	38,21	34,73	0,205	45	0,838
m/w BRAF	0,14	0,38	-2,178	45	0,034
к27M H3F3A	1,45	0,84	0,768	51	0,441
дикий тип H3F3A	10,26	6,87	0,804	51	0,424
R132H IDH1	1,11	1,53	-0,859	49	0,394
дикий тип IDH1	17,48	16,02	0,315	49	0,753
m/w H3F3A	0,10	0,15	-0,761	51	0,450
m/w IDH1	0,06	0,14	-1,851	49	0,070

На основании проведенного анализа удалось найти эффективное решение по дискриминации групп с плохим и хорошим прогнозом включающее только 4 показателя: возраст пациента, концентрацию мутантной ДНК генов IDH1 и H3F3A, а также отношение мутантной ДНК к ДНК дикого типа гена H3F3A. Матрица классификации показана в таблице 33.

Таблица 33 – Результаты классификации пациентов группы 3А с ОСГМ на группы с рецидивом и без после лучевой терапии на основании дискриминантного анализа показателей, включающий концентрации мутантных ДНК генов IDH1 и H3F3A в плазме периферической крови.

Группы	% правильных	Группа без рецидива	Группа с рецидивом
Группа без рецидива	92,8	13	1
Группа с рецидивом	100,0	0	11
Всего	96,0	13	12

В таблице 34 представлены коэффициенты для дискриминантных функций для переменных, вошедших в окончательное решение.

Таблица 34 Коэффициенты для дискриминантных функций для решения задачи классификации (рецидив «да-нет»).

Переменная	Группа без рецидива	Группа с рецидивом
m/w H3F3A	-5,01148	-35,1181
R132H IDH1	-0,40618	-2,1511
к27м H3F3A	1,14546	4,2001
возраст	1,10008	2,4632
Константа	-3,54753	-9,8712

Мы также исследовали изменение концентрации мутантной ДНК и ДНК дикого типа до, в процессе и после курса лучевой терапии у пациентов ОСГМ и ОГМ. В общем случае, концентрация мутантной ДНК в плазме периферической крови после начала лучевой терапии увеличивается. Однако сравнение групп пациентов с рецидивом и без после ЛТ показало, что зависимость изменения концентрации в процессе ЛТ у них достоверно отличается. Как видно из рисунков 31- 32 для мутантных генов IDH1 и BRAF увеличение концентрации ДНК

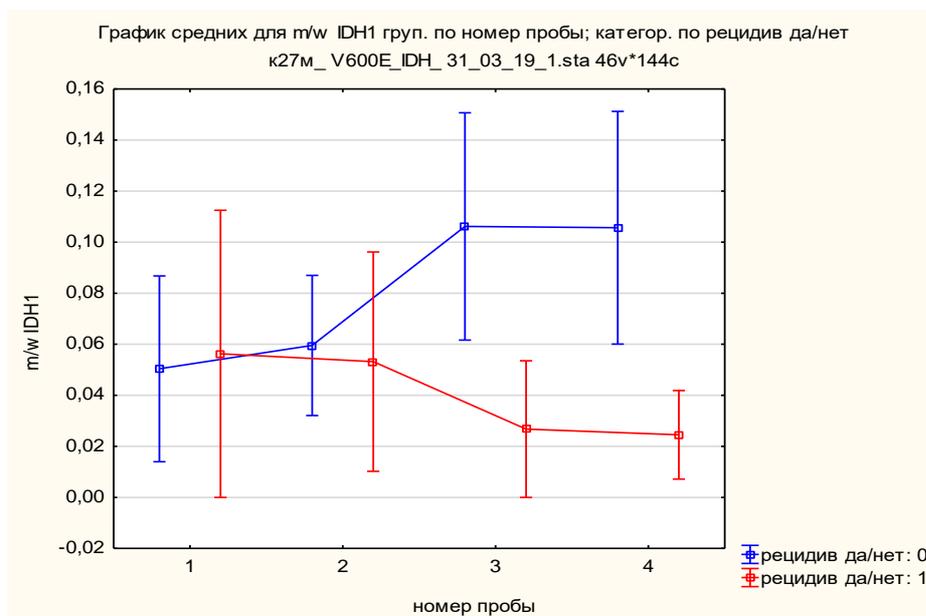


Рисунок 31 – Изменение относительной концентрации мутантной ДНК гена IDH1 (Мутантная/ Дикий тип) в плазме периферической крови в процессе лучевой терапии. 1- до начала ЛТ, 2- через 2-5 дней после начала, 3- в конце ЛТ, 4 – после завершения ЛТ.

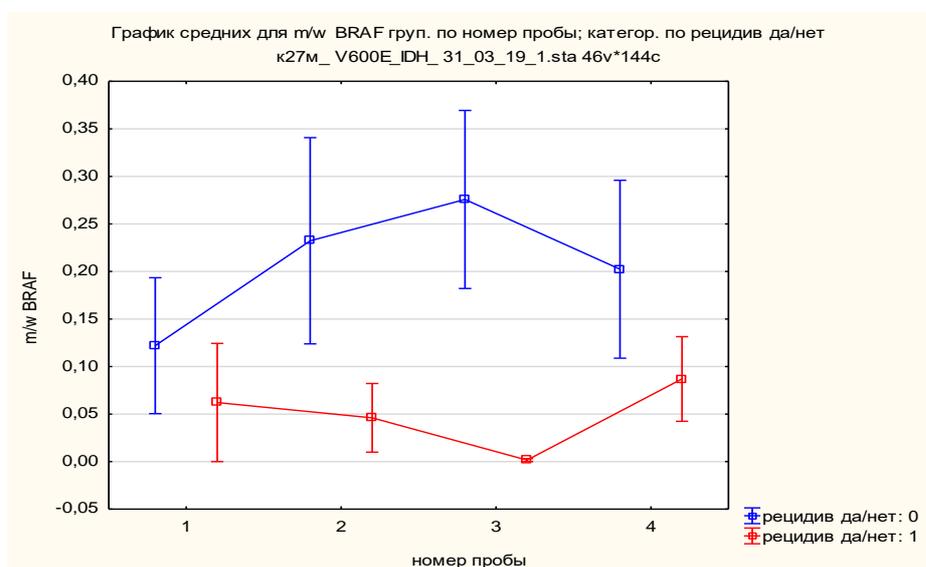


Рисунок 32 – Изменение относительной концентрации мутантной ДНК гена BRAF (Мутантная/ Дикий тип) в плазме периферической крови в процессе лучевой терапии. 1- до начала ЛТ, 2- через 2-5 дней после начала, 3- в конце ЛТ, 4 – после завершения ЛТ.

наблюдается только для группы пациентов без рецидива, тогда как для группы с рецидивом наблюдается уменьшение концентрации мутантной ДНК после начала ЛТ. Для НЗФ3 такой зависимости не обнаружено, т.е. для этого типа ДНК увеличения его концентрации в процессе ЛТ не наблюдается (рис. 33).

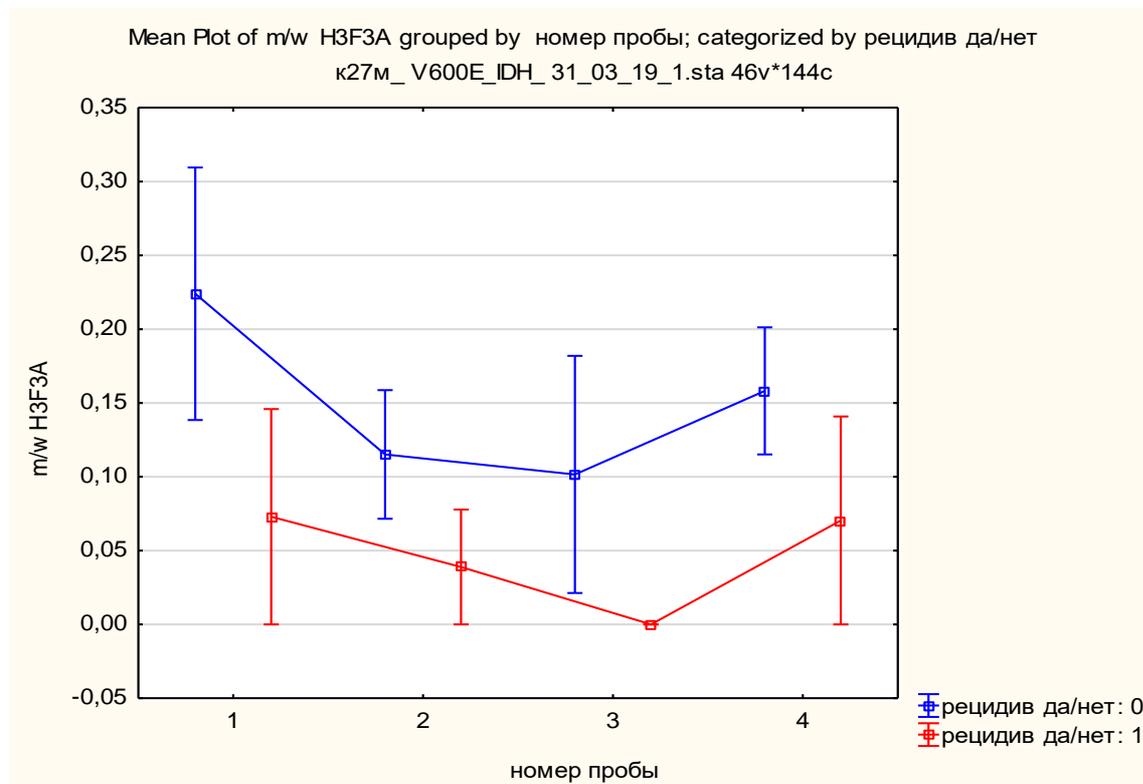


Рисунок 33 – Изменение относительной концентрации мутантной ДНК гена НЗФ3А (Мутантная/ Дикий тип) в плазме периферической крови в процессе лучевой терапии. 1- до начала ЛТ, 2- через 2-5 дней после начала, 3- в конце ЛТ, 4 – после завершения ЛТ.

### 3.6. Обсуждение результатов молекулярно-генетических исследований

Молекулярно-генетические исследования соматических мутаций в ткани опухоли последних лет показали, что спектр обнаруживаемых мутаций может сильно отличаться и зависеть не только от типа ткани, но и от ряда других клинических показателей, морфологической картины, локализации и стадии.

Масштабные исследования, проведенные в этом направлении, позволили выявить наиболее частые мутации, которые могут иметь решающее патогенетическое значение в возникновении опухоли и в появлении ее основных злокачественных свойств. Такие мутации получили название «драйверных». Дальнейшее исследование мутационного спектра опухолей головного мозга различной локализации у пациентов различных возрастных категорий привело к попыткам классификации злокачественных опухолей головного мозга, включающей наравне с морфологической характеристикой – наличие или отсутствие драйверных мутаций. Основными драйверными мутациями, на настоящий момент, предложено считать мутации гистона H3F3A, мутации гена IDH1 и гена BRAF. При этом мутации могут замещаться хромосомными перестройками, приводящими к тем же функциональным изменениям гена. В нашей работе мы исследовали наличие или отсутствие этих мутаций на основании изучения плазмы периферической крови у пациентов с опухолями ОСГМ (в качестве контроля использовали опухоли других локализаций). Такой выбор метода и объекта исследования был связан с тем, что для этой категории пациентов методически сложно получить образцы ткани опухоли для молекулярно-генетического исследования и получения необходимой информации для формулировки адекватного диагноза. В тоже время, исследования последних лет, показали, что метод цифрового ПЦР обладает рядом преимуществ перед секвенированием по специфичности и чувствительности, а плазма крови является субстратом исследования, который интегрирует в себе информацию о всей опухолевой ткани пациента. Последний момент очень важен, т.к. уже очевидно, что основным препятствием для получения адекватной информации о молекулярной картине злокачественной опухоли является ее гетерогенность, и исследование одного ее участка может не давать полноценной информации, в частности и о спектре имеющихся мутаций в опухолевой ткани. Именно поэтому, в исследованиях последних лет, анализ молекулярной картины в плазме крови (исследование циркулирующей опухолевой ДНК) предложено проводить наравне с

исследованием ткани первичной опухоли и выдвигается концепция комплексного молекулярно-генетического исследования – ткани и плазмы у онкологических пациентов. Такое исследование позволило бы преодолеть ряд методических и фундаментальных проблем и получить необходимую информацию для индивидуализации противоопухолевой терапии.

Полученные нами результаты показывают, что исследование соматических мутаций в плазме крови методом цифрового ПЦР адекватно отражает мутационный спектр опухолевой ткани. Кроме того, этот метод незаменим в случаях, когда получение материала опухоли невозможно или связано с большими рисками для пациента (как это имеет место при опухолях ствола мозга). В ходе исследования мы получили высоко достоверные отличия спектра соматических мутаций в зависимости от локализации опухоли. Это еще раз подтверждает возможности метода для молекулярных характеристик ткани опухоли. Исследования связи частоты мутаций с частотой рецидивирования после ЛТ показало совпадение наших результатов для опухолей, несущих мутацию BRAF V600E. Для этих вариантов опухолей наблюдается более благоприятное течение. В тоже время, исследование связи наличия мутации гена H3F3A K27M для нашей когорты пациентов (объединенная группа с опухолями всех вариантов локализации) показало, что пациенты с мутацией имеют более благоприятное течение. Эти результаты согласуются с данными, что H3F3A мутация имеет высоко достоверную связь с плохим прогнозом только для пациентов с диффузными глиомами, тогда как в нашей объединенной группе такие пациенты составляли менее трети. При других локализациях и клинико-морфологических характеристиках опухоли наличие мутации H3F3A может не влиять на вероятность рецидива или даже иметь связь с более благоприятным исходом заболевания.

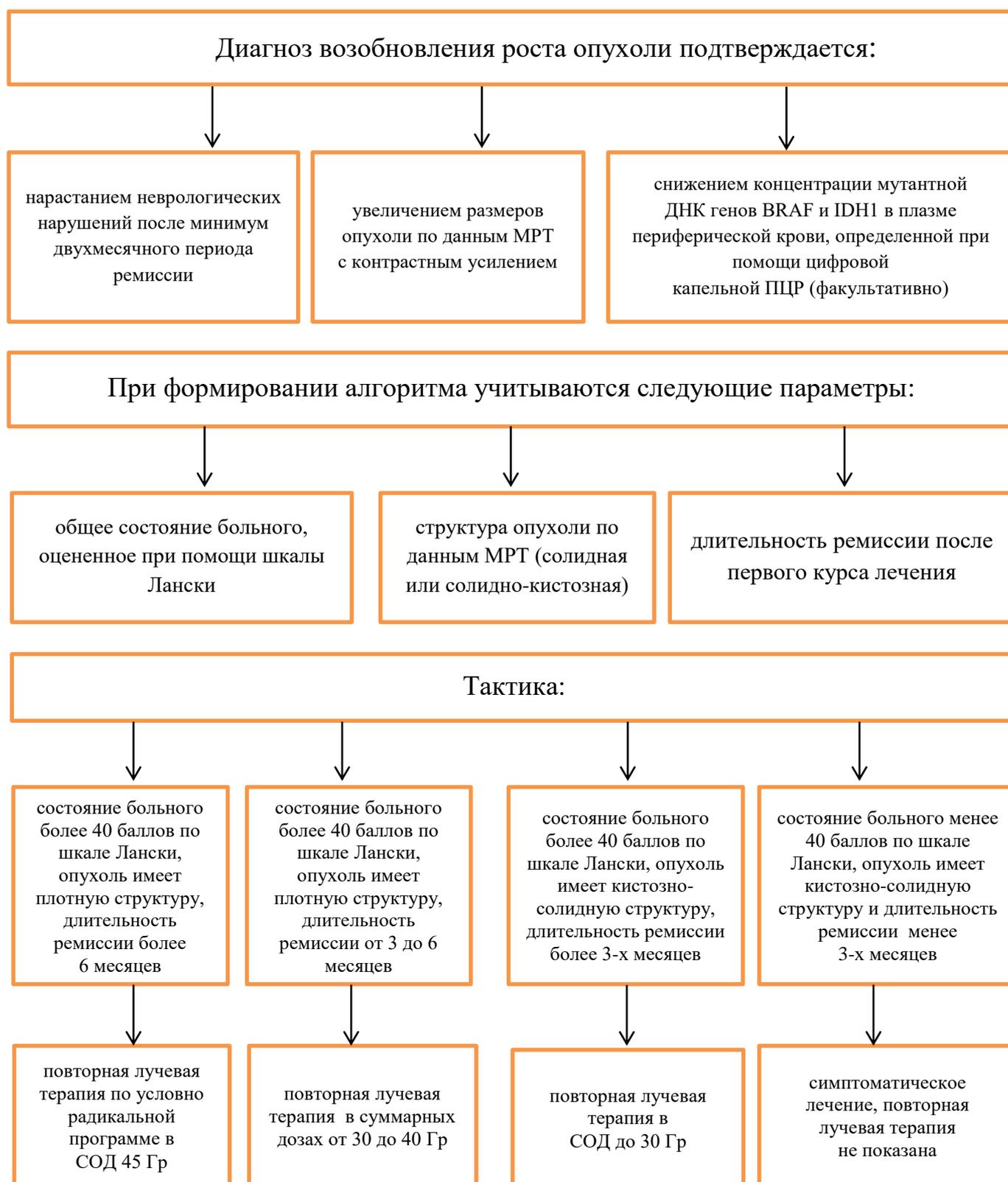
Метод цифрового ПЦР позволяет не только обнаружить мутантную ДНК в образцах, но и измерить ее абсолютную концентрацию. Мы проанализировали связь концентрации мутантной ДНК с такими клиническими показателями как

локализация опухоли и наступление рецидива у пациентов после ЛТ. Было обнаружено, что для опухолей мозга с локализацией в области ствола характерно более высокая концентрация мутантных молекул ДНК в плазме периферической крови. Кроме того, уровень концентрации коррелировал с исходом проводимого лечения. Это результаты позволили нам построить прогностическую модель, включающую концентрацию мутантной ДНК генов IDH1 и H3F3, а также возраст пациентов для предсказания эффективности ЛТ.

Интересные результаты, с практической точки зрения, были получены нами при исследовании количества мутантной ДНК в периферической крови. Мы подтвердили, что проведение лучевой терапии приводит к увеличению мутантных молекул ДНК в плазме пациентов. Однако дальнейшие исследования в процессе лучевой терапии показали, что у группы пациентов, имеющих впоследствии возобновление роста, наблюдается снижение концентрации мутантной ДНК после начала ЛТ.

Таким образом, жидкостная биопсия с использованием цифрового ПЦР позволяет адекватно исследовать мутационный спектр опухоли, что может быть использовано для назначения специфической таргетной терапии. Дополнительная информация о концентрации мутантных молекул в плазме периферической крови также имеет важное диагностическое значение для прогноза успешности ЛТ у пациентов с опухолями ствола мозга. Включение исследования соматических мутаций в плазме периферической крови методом цифрового ПЦР у пациентов с опухолями ствола мозга позволит оптимизировать и индивидуализировать программы лечения у этих пациентов.

### 3.7. Алгоритм выработки тактики при возобновлении роста ОСГМ



*Примечание: при наличии выраженных неврологических нарушений окончательная оценка состояния проводится после трех-пятидневной симптоматической гормональной и дегидратационной терапии.*

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Опухоли ствола головного мозга (ОСГМ) являются наиболее тяжелой онкологической патологией у детей. Удельный вес этих новообразований среди всех опухолей ЦНС в детском и подростковом возрасте составляет от 10 до 15%, но, в то же время, они являются причиной смерти около 40% всех детей, заболевших опухолями головного мозга. Инфильтративно растущие ОСГМ, составляющие более 80% от всех случаев, являются наиболее тяжелой формой патологии. Радикальное хирургическое лечение этих опухолей невозможно, так как они расположены близко к ядрам черепно-мозговых нервов и проводящим путям, находящимся в области ствола. Основными методами их лечения остаются лучевая и химиолучевая терапия. К сожалению, за последние 25-30 лет исследователям всего мира пока не удалось улучшить результаты лечения этой категории больных. Оказались малоэффективными использование различных источников излучения, попытки модификации режимов и доз лучевой терапии, дополнения лучевой терапии адъювантной и консолидирующей химиотерапией. При всех вариантах результаты были примерно одинаковы: для 60-80% больных удавалось достичь улучшения качества жизни за счет уменьшения выраженности неврологических нарушений. Однако практически у всех пациентов в различные сроки после лечения опухоль возобновляет рост. Медиана стабилизации роста опухоли после такой терапии составляет 6 мес. а медиана продолжительности жизни (МПЖ) не превышает 12 месяцев. В ситуации, когда после короткого периода относительного благополучия, достигнутого в результате лучевой терапии, наступает ухудшение состояния ребенка, перед врачом встает сложная проблема оказания реальной помощи больному. Выбор невелик: или отправить больного в паллиативное отделение, или попытаться облегчить его состояние и продлить жизнь, о чем, как правило, и просят родители ребенка. Поиск наиболее рациональных и эффективных вариантов оказания помощи таким детям определяет актуальность исследования.

Одним из вариантов помощи представляется проведение повторной лучевой или химиолучевой терапии, чему посвящены немногочисленные работы, основанные на небольшом числе наблюдений. Однако, до сих пор не сформулированы показания и противопоказания к повторному облучению, не определены допустимые границы предельных доз. Получение ответов на эти вопросы должно обеспечить реализацию всех современных возможностей лучевой терапии в улучшении качества жизни больных детей и увеличения ее продолжительности, что представляется важным не только с клинических, но и морально-этических позиций.

Наш опыт и данные литературы свидетельствуют, что дальнейший прогресс в радикальном лечении данной категории больных может быть обеспечен не столько развитием технических средств и приемов лучевой терапии, сколько созданием принципиально новых подходов, основанных на молекулярной структуре опухолей, по которой возможно обеспечить создание новых средств персонализированной и направленной (таргетной) терапии. Примером успешного применения такого подхода могут быть открытия последних лет в отношении генетических особенностей медуллобластом и некоторых других опухолей. Исследования такого рода при ОСГМ затруднены из-за сложности получения морфологического материала для генетической диагностики. Выполнение стереотаксической биопсии пока не получило широкого распространения в силу ее сложностей и опасностей. Альтернативой этому методу является использование жидкостной биопсии, которая заключается в исследовании содержания маркеров опухоли в периферической крови. По данным литературы, при исследовании гистологического материала обнаруживается корреляция между наличием в крови мутаций в генах IDH 1-2, H3, ATRX, BRAF, TERT, метилированием промотера гена MGMT и течением глиальных опухолей. Работ, посвященных изучению частоты встречаемости и роли этих маркеров с помощью жидкостной биопсии при ОСГМ в литературе нам пока не встретилось. Поэтому представилось актуальным параллельно с совершенствованием подходов к

использованию лучевой терапии при ОСГМ, изучить частоту встречаемости мутаций в маркерных генах глиом IDH1, H3F3A, BRAF и их динамику в процессе лечения в целях определения возможности их использования в планировании и индивидуализации лечения.

Целью исследования явилось повышение эффективности лечения опухолей ствола головного мозга у детей и подростков путем разработки на основе клинических и молекулярно-генетических факторов алгоритма повторной лучевой терапии при возобновлении роста опухоли.

Для достижения поставленной цели были сформированы следующие задачи:

- оценить прогностическое значение ряда клинических и рентгенологических характеристик заболевания при первичном и повторном лечении детей и подростков больных ОСГМ для определения показаний к повторному лечению при продолженном росте опухоли;

- изучить переносимость и результаты повторной радиотерапии у детей и подростков с продолженным ростом ОСГМ;

- изучить возможность использования метода цифровой капельной ПЦР для диагностики и прогнозирования течения опухолей ствола головного мозга у детей с помощью оценки содержания и динамики опухоль-специфических маркеров в плазме периферической крови;

- разработать алгоритм повторного комплексного лечения детей с продолженным ростом ОСГМ с учетом состояния клинико-рентгенологических и молекулярно-генетических параметров.

Данное исследование основано на ретроспективном анализе клинико-рентгенологических проявлений, выбора лечебной тактики, ближайших и отдаленных результатов лечения 102 детей и подростков, получавших лечение в ФГБУ «РНЦРР» за период 1990-2018 г.г., катамнез которых был прослежен вплоть до конца 2018 г. Вся популяция прослеженных пациентов разделена на две группы: группа 1 из 52 больных, которым лучевая или химиолучевая терапия

проводилась только в виде одного курса, и группа 2 из 50 детей, которым лечение проводилось дважды: первично и повторно, через различные интервалы времени, при возобновлении роста опухоли. Первичная и повторная лучевая терапия проводились при помощи гаммаустановок и линейных ускорителей с использованием традиционного варианта фракционирования дозы по 1,8 Гр 5 дней в неделю до суммарных доз 54 Гр при первичном лечении и от 15 до 50 Гр при повторном. При первичном лечении лучевая терапия сочеталась с адъювантной химиотерапией у 48 больных. В качестве химиопрепаратов использовались темозоломид, винкристин, ломустин, фторафур, онкофер (чаще всего темозоломид). После первого курса 38 детей (37%) получали цикловую консолидирующую химиотерапию темозоломидом и всем выполнялись контрольные осмотры с МРТ-исследования с интервалами от 1 до 3-х месяцев. При подтверждении признаков возобновления роста опухоли у 50 обратившихся в клинику больных, при длительности ремиссии более 3-х месяцев и состоянии, оцененном по шкале Лански, не менее чем в 40 баллов, применен повторный курс «спасающей» лучевой (у 22 больных) или химиолучевой (у 28) терапии. Методика лучевой терапии при повторном лечении оставалась такой же, как и при первом курсе, величина суммарных доз составляла от 15 до 50 Гр определялась в зависимости от длительности ремиссии, состояния больного и переносимости лечения. Оценивались переносимость лечения, непосредственные результаты, показатели продолжительности жизни от начала первичного и повторного лечения. Результаты анализировались с помощью пакета программ “Microsoft Excel”, “IBM SPSS Statistics” (20 версия), «StatSoft STATISTICA 8.0» и «STATA 20.0».

Молекулярно-генетические исследования, заключались в определении мутаций в опухолеспецифических генах методом цифровой капельной ПЦР (ddPCR) по плазме крови. На первом этапе методом цифрового ПЦР были проанализированы 11 образцов тканей опухоли, в которых ранее был проведен молекулярно-генетический анализ спектра соматических мутаций с применением

секвенирования нового поколения (NGS). При этом было показано, что методы цифрового ПЦР и NGS дают полное совпадение результатов как в негативных, так и в позитивных по соматическим мутациям образцах.

На следующем этапе были исследованы образцы плазмы, полученной от пациентов на наличие или отсутствие мутации генов BRAF (V600E), H3F3A (K27M) и IDH1 (R132H) и проанализирована частота встречаемости мутаций в исследованных группах. Всего методом цифровой ПЦР проанализировано 146 образцов плазмы периферической крови, полученных от 60 пациентов, из них у 31 был установлен диагноз ОСГМ и у 29 другие глиальные опухоли головного мозга.

К концу курса лечения у 77 (76%) из 102 прослеженных и включенных в данный анализ пациентов достигнуто уменьшение выраженности или полная регрессия неврологических нарушений. Так, из 70% пациентов, имевших исходно неврологический статус по шкале Лански до 40 баллов, состояние без динамики после проведенного лечения сохранялось лишь у 4% пациентов. В первую очередь регрессировали бульбарные симптомы и признаки поражения длинного тракта: восстанавливалась подвижность мягкого неба, улучшалось глотание, регрессировали вплоть до полного исчезновения двигательные нарушения в конечностях. Глазодвигательные нарушения регрессировали заметно медленнее и у части больных сохранялись до конца жизни. По данным контрольных МРТ в структуре и размерах опухолей отмечались изменения: у 21 ребенка (20%) по сравнению с исходными данными объем опухоли уменьшился, у остальных он существенно не изменялся. Накопление контраста в опухоли уменьшалось, в части случаев формировался кистозный компонент как проявление деструкции опухоли. Достигнутый положительный клинический эффект у большинства больных к моменту первого контрольного обследования сохранялся независимо от картины, получаемой при контрольной МРТ.

После периода ремиссии, длящейся от 3 до 48 месяцев, у 78 (76%) детей отмечалось нарастание неврологического дефицита. Это наблюдалось как у детей,

не получавших консолидирующей терапии темозоломидом, так и на ее фоне. Для большинства больных возобновление роста опухоли имело фатальный характер и к моменту проведения анализа из 102 пролеченных детей в живых оставалось 24, их медиана продолжительности жизни составляет 29,6 месяцев. Умерло 78 детей при медиане продолжительности жизни 15,9 месяцев.

Показатель общей кумулятивной 6-и и 12-месячной выживаемости составил соответственно 47% и 22%. (95% ДИ 9,5-37,5мес.). Медиана продолжительности жизни для всей группы- 18,8 мес. Период более 2-х лет пережили 36 пациентов (35,3%).

Был проведен анализ влияния ряда клинических и рентгенологических параметров на прогноз заболевания при первичном лечении. При этом установлено, что со статистически достоверной вероятностью (при  $p < 0,05$ ) прогноз в плане продолжительности жизни был у детей, начавших лечение в возрасте до 3-х лет, при длительности анамнеза до начала лечения более 2-х месяцев, при отсутствии в опухоли на МРТ-картине признаков деструкции. Достоверного влияния на показатели продолжительности жизни таких факторов как пол ребенка, проведение адъювантной и консолидирующей химиотерапии при статистическом анализе не выявлено.

Из 102 прослеженных пациентов, обратившихся в РНЦРР для повторного лечения, было выбрано 50 детей, имевших длительность ремиссии более 2-х месяцев и находящихся в состоянии, оцениваемом по шкале Лански более чем в 40 баллов. При наличии выраженных неврологических нарушений этой оценка состояния проводилась после 3-5 дневной интенсивной терапии с применением дексаметазона и диуретиков. Суммарные дозы лучевой терапии колебались от 15 до 50 Гр, в зависимости от состояния больного, длительности первой ремиссии, характера изображения опухоли на МРТ. У 86% больных суммарная доза была более 40 Гр.

Переносимость повторного лечения в большинстве случаев была удовлетворительной, за исключением 3 больных, которые поступали в состоянии,

близком к 40 баллам по шкале Лански, и имели на МРТ зоны деструкции в опухоли. Их лечение было прервано на суммарных дозах до 20 Гр. В результате повторного лечения из 35 детей, статус которых исходно оценивался в 40- 50 баллов, у 30 (85%) он улучшился, в группу с первичным статусом 70-90 баллов, представленную одним ребенком, включились дополнительно включилось еще 10 детей и только у 5 больных состояние ухудшилось или не изменилось. При сравнении кумулятивных показателей выживаемости установлено, что в срок до года показатели выживаемости больных, получивших один или два курса лечения, были одинаковы, в более поздние сроки явные и статистически достоверные преимущества ( $p=0,001$ ) имелись в группе детей с повторным лечением. Медиана продолжительности жизни в группе больных, после первичного лечения, составила 14,7 месяцев, в группе лечившихся повторно - 23,8 месяцев. Несомненно положительным также является факт улучшения качества жизни для большинства детей, получавших повторный курс лечения.

При оценке зависимости показателей продолжительности жизни после повторного лечения от ряда клинических и рентгенологических параметров установлено, что статистически достоверное положительное значение имела длительность первой ремиссии, плотная, без признаков деструкции (по данным МРТ) структура опухоли и суммарная доза повторного облучения более 30 Гр. Такие факторы как выполнение шунтирующей операции, проведение адьювантной и консолидирующей химиотерапии не имели статистически значимого влияния на кумулятивные показатели продолжительности жизни. Обращает на себя внимание факт длительной (более 5 лет) продолжительности жизни двоих больных с морфологически подтвержденным возобновлением роста пилоидной астроцитомы, у которых повторное лечение в дозах 45 и 46 Гр проводилось через 3 и 4 года после первичного и они наблюдаются со стабильной остаточной опухолью в состоянии ремиссии без тяжелых неврологических нарушений и признаков радиационного некроза в течение более 5 лет после повторного лечения.

Подводя итог анализу отдаленных результатов первичной и повторной лучевой терапии, можно сделать вывод, что лучевая терапия, как метод первичного лечения, так и в качестве спасающего средства, для большинства больных ОСГМ является эффективным средством стабилизации процесса, но длительность достигаемого эффекта полностью зависит от степени агрессивности опухоли. Наиболее стойкий эффект удается получить при ОСГМ низкой степени злокачественности, косвенными признаками которых являются: длительный первичный анамнез, плотная структура опухоли, длительная первая ремиссия. На представленном материале мы не получили убедительных доказательств существенного вклада в результаты лечения химиотерапии, но, поскольку в исследовании назначение химиопрепаратов не было рандомизированным, сделать окончательный вывод об их роли в лечении этого заболевания не представляется возможным.

В результате молекулярно-генетических исследований обнаружено, что в группе ОСГМ достоверно выше количество всех исследованных вариантов мутантных генов по сравнению с опухолями, расположенными в других частях мозга: IDH1 58,1 и 20%, H3F3A 51,6 и 33,3%, BRAF 61,3 и 33,3% соответственно. Выявлена также зависимость частоты обнаружения мутантных генов от наличия или отсутствия возобновления роста опухоли: чем меньшей была частота этих мутаций, тем чаще диагностировался продолженный рост опухоли и наоборот. Обнаруженные отличия позволили предположить, что концентрация мутантной ДНК в периферической крови пациентов с ОСГМ может иметь диагностическое значение для прогноза рецидива у этих пациентов. Для проверки этого факта был проведен дискриминантный анализ. В качестве анализируемых переменных были использованы концентрации ДНК как мутантных, так и дикого типа, а также их отношения. Всего 9 переменных. В качестве клинических показателей были включены размер опухоли, определяемый по данным МРТ исследования, и возраст пациентов. На основании проведенного анализа удалось найти эффективное решение по выделению групп с плохим и хорошим прогнозом по 4

показателям: возрасту пациента, концентрации мутантной ДНК генов IDH1 и N3F3A, а также отношению мутантной ДНК к ДНК дикого типа гена.

При исследовании динамики концентрации генов с мутантной ДНК и ДНК дикого типа до, в процессе и после курса лучевой терапии у пациентов ОСГМ установлено, что концентрация мутантных генов BRAF и IDH1 увеличивается только в группе пациентов, имеющих положительный результат лучевой терапии или находящихся в ремиссии, тогда как в группе с возобновлением роста опухоли наблюдается уменьшение концентрации мутантной ДНК этих генов.

Полученные результаты показывают, что исследование соматических мутаций в плазме крови методом цифрового ПЦР адекватно отражает мутационный спектр опухолевой ткани. Кроме того, этот метод незаменим в случаях, когда получение материала опухоли невозможно или связано с большими рисками для пациента, как это имеет место при опухолях ствола

Таким образом, результаты исследования показали, что возможности традиционной лучевой и химиолучевой терапии больных ОСГМ исчерпаны. Этот метод лечения позволяет временно затормозить рост опухоли и повысить качество жизни пациента, но не позволяет получить полного излечения. Стойкость достигаемого эффекта полностью зависит от степени агрессивности опухоли. Возобновление роста опухоли остается основной причиной фатальных исходов. В такой ситуации повторная лучевая терапия в суммарных дозах до 45 Гр, назначенная с учетом конкретной клинической ситуации, установленных клиничко-рентгенологических факторов прогноза и при адекватном сопроводительном лечении, может быть использована в качестве метода, позволяющего увеличить продолжительность жизни ребенка и улучшить ее качество без клинически значимого риска развития радиационных повреждений.

Полученные результаты молекулярно-генетических исследований показали сложность генетического спектра ОСГМ, реальную возможность его определения по плазме крови с помощью метода жидкостной биопсии. Кроме того, выявленные закономерности содержания и динамики в процессе лечения

мутировавших опухолеспецифических генов реально могут быть использованы для прогнозирования течения заболевания и ранней диагностики рецидивов и начала противорецидивной терапии. Установленный полиморфизм генетических aberrаций при ОСГМ должен учитываться при проведении исследований по созданию методов таргетной терапии.

## ВЫВОДЫ

1. Клинико-рентгенологическими признаками более благоприятного прогноза при первичном лечении ОСГМ являются: возраст в момент начала лечения менее 3-х лет, длительность анамнеза более 2-х месяцев, плотная структура опухоли по данным МРТ, повышение в процессе лечения концентрации в плазме крови мутантных опухоль-специфических генов. При повторном лечении положительными прогностическими признаками являются длительность первой ремиссии более 6 месяцев, плотная, по данным МРТ, структура опухоли, выполнение частичного удаления опухоли при выявлении рецидива.

2. Повторная лучевая терапия в режиме традиционного фракционирования и в суммарных дозах от 30 до 45 Гр в комбинации с адекватным сопроводительным лечением хорошо переносится, в 90% случаев позволяет увеличить срок ремиссии при плотных опухолях и временно улучшить качество жизни при кистозно-солидных опухолях.

3. Анализ плазмы периферической крови методом цифровой (капельной) ПЦР выявил достоверно более высокую частоту мутаций в генах BRAF, H3F3, IDH1 у больных ОСГМ по сравнению с опухолями, локализуемыми в других частях мозга. На основании динамики уровней концентрации мутантной ДНК в процессе лечения возможно построить прогностическую модель предсказания рецидива опухоли после лучевой терапии с достоверностью 96%.

4. Разработанный алгоритм тактики при возобновлении роста ОСГМ позволяет индивидуализировать подходы к лечению данной категории больных и полнее использовать возможности современной лучевой терапии для повышения качества и увеличения продолжительности жизни больных.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. При возобновлении роста ОСГМ через 3 и более месяцев после первичного лечения необходимо рассмотреть вопрос о возможности повторной лучевой терапии как средства улучшения качества и увеличения продолжительности жизни больного.

2. Показания к повторной лучевой терапии и ее объем должны основываться на объективной оценке общего состояния больного, продолжительности первой ремиссии и характере изображения опухоли на МРТ с контрастным усилением.

3. При состоянии больного, оцениваемом по шкале Лански менее 40 баллов, и длительности первой ремиссии более 3-х месяцев, решение вопроса о возможности повторной радиотерапии необходимо принимать после 3-5 дней интенсивной терапии кортикостероидами и диуретиками. При достижении положительного эффекта и переходе состояния больного на более высокий уровень по использованной шкале проведение повторного лечения оправдано.

4. Повторное лучевое лечение, как правило, проводится на фоне сопроводительной терапии дексаметазоном и диуретиками с определением дозировок препаратов в соответствии с клинической картиной и возрастом больного.

5. Длительность первой ремиссии менее 3-х месяцев и отсутствие эффекта от 3-5 дневной интенсивной гормональной и противоотечной терапии свидетельствуют об отсутствии показаний к повторному лучевому лечению.

6. Исследование динамики количества мутантной ДНК генов BRAF и IDH1 с помощью метода «жидкостной биопсии» в плазме крови может быть использовано для прогнозирования течения ОСГМ, ранней диагностики возобновления роста и начала противорецидивного лечения.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АХТ – адъювантная химиотерапия
- БЭД – биологически эффективная доза
- ВПШ –вентрикуло-перитонеальное шунтирование
- ГМ – головной мозг
- Гр – Грей, единица поглощённой дозы
- ДИ – доверительный интервал
- ДНК – Дезоксирибонуклеиновая кислота
- ЖБ – жидкостная биопсия
- ИГХ – иммуногистохимическое исследование
- КТ – компьютерная томография
- КУ – контрастное усиление
- КХТ – консолидирующая химиотерапия
- ЛТ – лучевая терапия
- МПЖ – Медиана продолжительности жизни
- МРТ – магнитно-резонансная томография
- МСН – медиана срока наблюдения
- ОВ – общая выживаемость
- ОНК – опухолевые нуклеиновые кислоты
- ОСГМ – опухоль ствола головного мозга
- ПА – пилоидная строцитомма
- ПЦР – полимеразная цепная реакция
- ПЭТ/КТ – позитронно-эмиссионная томография, совмещенная с компьютерной томографией
- РНК – Рибонуклеиновая кислота
- РОД – разовая очаговая доза
- РТ – радиотерапия
- СОД – суммарная очаговая доза

СТБ – стереотаксическая биопсия

ФГБУ РНЦРР МЗ РФ – федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научный центр рентгенорадиологии»

ХТ – химиотерапия

ЦКО – циркулирующие клетки опухоли

ЦНС – центральная нервная система

ЭС – экзосомы

BVZ – Бевацизумаб

Dd – PCR – цифровая капельная ПЦР

qRT – ПЦР – Полимеразная цепная реакция в реальном времени

TMZ – Темозоламид

VCR – Винкристин

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кит, О. И. Молекулярно-генетические аспекты глиом / О. И. Кит, Д. И. Водолажский, Э. Е. Росторгуев [и др.] // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2017. – №4.
2. Рокамм, Р. Центральная нервная система / Р. Рокамм // Цветной атлас по неврологии. 2017. – №1. С. 21 – 22.
3. Щербенко, О. И. Эффективность повторной лучевой терапии при продолженном росте диффузно растущих опухолей ствола мозга у детей / О. И. Щербенко, Р. А. Пархоменко, Н. И. Зелинская [и др.] // Российский журнал детской гематологии и онкологии. 2014. №2. – С. 7980.
4. Щербенко, О. И. Редкий случай псевдотуморозного энцефаломиелита, симулирующего неоперабельную опухоль ствола мозга / О. И. Щербенко, Н. И. Сергеев, О. С. Регентова // Вестник РНЦПР.– 2012.– Т. 12, № 4.
5. Adamczyk, L. A. Current understanding of circulating tumor cells - potential value in malignancies of the central nervous system / L. A. Adamczyk, H. Williams, A. Frankow A. [et al.] // Front. Neurol. – 2015. –Vol. 10, № 6. – P.174.
6. Akers, J. C. A cerebrospinal fluid microRNA signature as biomarker for glioblastoma / J. C. Akers., W. Hua, H. Li. [et al.] // Oncotarget. – 2017.– Vol. 8, № 40.– P. 68769–68779.
7. Akers, J. C. MiRNA contents of cerebrospinal fluid extracellular vesicles in glioblastoma patients / J. C. Akers, V. Ramakrishnan, R. Kim [et al.] // J. Neurooncol. – 2015. – Vol. 123, № 2. – P.205216.
8. Akers, J. C. Comparative analysis of technologies for quantifying extracellular vesicles (EVs) in clinical cerebrospinal fluids (CSF) / J. C. Akers, V. Ramakrishnan, J. P. Nolan [et al.] // PLoS. One. – 2016. – Vol. 11, № 2. – e0149866.
9. Akers, J. C. Optimizing preservation of extracellular vesicular miRNAs derived from clinical cerebrospinal fluid / J. C. Akers, V. Ramakrishnan, I. Yang [et al.] // Cancer Biomark. – 2016. – Vol. 17, № 2. – P. 125–132.

10. Alix-Panabières, C. Circulating tumor cells and circulating tumor DNA / C. Alix-Panabières, H. Schwarzenbach, K. Pantel // *Annu. Rev. Med.* – 2012. – Vol. 6, № 3 – 4. – P. 199–215.
11. Amsbaugh, M. J. A Phase I/II Trial of Reirradiation for diffuse intrinsic pontine glioma / M. J. Amsbaugh, A. Mahajan, P. F. Thall [et al.] // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* – 2019. – Vol. 104, № 1. – P. 144–148.
12. Bailey, S. Diffuse intrinsic pontine glioma treated with prolonged temozolomide and radiotherapy- results of a United Kingdom phase II trial (CNS 2007 04) / S. Bailey, A. Howman, K. Wheatley [et al.] // *Eur. J. Cancer.* – 2013. – Vol. 49, № 18. – P. 3856–3862.
13. Ballester, L.Y. Morphologic characteristics and immunohistochemical profile of diffuse intrinsic pontine gliomas / L. Y. Ballester, Z. Wang, S. Shandilya // *Am. J. Surg. Pathol.* – 2013. – Vol. 37, № 9. – P. 1357–1364.
14. Bar, E.E. Frequent gains at chromosome 7q34 involving BRAF in pilocytic astrocytoma / E. E. Bar, A. Lin, T. Tihan [et al.] // *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* – 2008. – Vol. 67. – P. 878–887.
15. Buczkowicz, P. Histopathological spectrum of paediatric diffuse intrinsic pontine glioma: diagnostic and therapeutic implications / P. Buczkowicz, U. Bartels, E. Bouffet [et al.] // *Acta. Neuropathol.* – 2014. – Vol. 128. – P. 573–581.
16. Basto, D. Mutation analysis of B-RAF gene in human gliomas / D. Basto, V. Trovisco, J. M. Lopes [et al.] // *Acta. Neuropathol.* – 2005. – Vol. 109, №2. – P. 207–210.
17. Bender, S. Reduced H3K27me3 and DNA hypomethylation are major drivers of gene expression in K27 M mutant pediatric high-grade gliomas / S. Bender, Y. Tang, A. M. Lindroth [et al.] // *Cancer. Cell.* – 2013. – Vol. 24. – P. 660–672.
18. Buczkowicz, P. Genomic analysis of diffuse intrinsic pontine gliomas identifies three molecular subgroups and recurrent activating ACVR1 mutations / P. Buczkowicz , C. Hoeman, P. Rakopoulos [et al.] // *Nat. Genet.* – 2014. – Vol. 46. – P. 451–456.

19. Chan, K. M. The histone H3.3K27M mutation in pediatric glioma reprograms H3K27M methylation and gene expression / K. M. Chan, D. Fang, H. Gan [et al.] // *Genes. Dev.* – 2013. – Vol. 27. – P. 985–990.
20. Chassot, A. Radiotherapy with concurrent and adjuvant temozolomide in children with newly diagnosed diffuse intrinsic pontine glioma / A. Chassot A., S. Canale, P. Varlet [et al.] // *J. Neurooncol.* – 2012. – Vol. 106, № 2. – P. 399–407.
21. Chen. J. Alu methylation serves as a biomarker for non-invasive diagnosis of glioma / J. Chen, W. Huan, H. Zuo [et al.] // *Oncotarget.* – 2016. – Vol. 7, № 18. – P. 26099–26106.
22. Chen, W.W. BEAMing and droplet digital PCR analysis of mutant IDH1 mRNA in glioma patient serum and cerebrospinal fluid extracellular vesicles / W. W. Chen, L. Balaj, L. M. Liau [et al.] // *Mol. Ther. Nucleic. Acids.* – 2013. – Vol. 23. – P. 109.
23. Cheng, C. Quantification of circulating cell-free DNA in the plasma of cancer patients during radiation therapy / C. Cheng, M. Omura-Minamisawa, Y. Kang [et al.] // *Cancer. Sci.* – 2009. – Vol. 100, № 3. – P. 303–309.
24. Chiang, K. L. Role of temozolomide in the treatment of newly diagnosed diffuse brainstem glioma in children: experience at a single institution / K. L. Chiang, K. P. Chang, Y. Y. Lee [et al.] // *Childs. Nerv. Syst.* – 2010. – Vol. 26, № 8. – P. 1035–1041.
25. Cohen, K. J. Temozolomide in the treatment of children with newly diagnosed diffuse intrinsic pontine gliomas: a report from the Children's Oncology Group / K. J. Cohen, R. L. Heideman, T. Zhou [et al.] // *Neuro. Oncol.* – 2011. – Vol. 13, № 4. – P. 410–416.
26. Collins, V. P. Pilocytic astrocytoma: pathology, molecular mechanisms and markers / V. P. Collins, D. T. Jones, C. Giannini // *Acta. Neuropathol.* – 2015. – Vol. 129, № 6. – P. 775–788.
27. Cooney, T. Contemporary survival endpoints: an International Diffuse Intrinsic Pontine Glioma / T. Cooney, A. Lane, U. Bartels [et al.] // *Registry study Oncol.* – 2017. – Vol. 19, № 9. – P. 1279–1280.

28. Dawson, S. J. Analysis of circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer / S. J. Dawson, D. W. Tsui, M. Murtaza [et al.] // *The New England journal of medicine*. – 2013. – Vol. 368. – P. 1199–1209.
29. Dias-Santagata, D. BRAF V600E mutations are common in pleomorphic xanthoastrocytoma: diagnostic and therapeutic implications / D. Dias-Santagata, Q. Lam, K. Vernovsky [et al.] // *PLoS. One*. – 2011. – Vol. 6, № 3. – P.17948.
30. Diehl, F. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics / F. Diehl, K. Schmidt, M. A. Choti [et al.] // *Nature medicine*. – 2008. – Vol. 14, № 9. – P. 985–990.
31. Ferreira, M. M. Circulating tumor cell technologies / M. M. Ferreira, V. C. Ramani, S. S. Jeffrey // *Mol. Oncol*. – 2016. – Vol. 10, № 3. – P. 374–394.
32. Figueroa, J. M. Detection of wtEGFR amplification and EGFRvIII mutation in CSF-derived extracellular vesicles of glioblastoma patients / J. M. Figueroa, J. Skog, J. Akers [et al.] // *Neuro Oncol*. – 2017. – Vol. 19, № 11. – P. 1494–1502.
33. Fleischhacker, M. Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer a survey / M. Fleischhacker, B. Schmidt // *Biochim. Biophys. Acta*. – 2007. – Vol. 1775, № 1. – P. 181–232.
34. Fontanilla, H. P. Palliative reirradiation for progressive diffuse intrinsic pontine glioma / H. P. Fontanilla, C. C. Pinnix, L. M. Ketonen [et al.] // *Am. J. Clin. Oncol*. – 2012. – Vol. 35, № 1. – P. 51–57.
35. Fontebasso, A M. Recurrent somatic mutations in ACVR1 in pediatric midline highgrade astrocytoma / A. M. Fontebasso, S. Papillon-Cavanagh, J. Schwartzentruber [et al.] // *Nat. Genet*. – 2014. – Vol. 46. – P. 462–466.
36. Forsheew, T. Activation of the ERK/MAPK pathway: a signature genetic defect in posterior fossa pilocytic astrocytomas / T. Forsheew, R. G. Tatevossian, A. R. Lawson [et al.] // *J. Pathol*. 2009. – Vol. 218, № 2. P. 172–181.
37. Freese, C. Radiation and subsequent reirradiation outcomes in the treatment of diffuse intrinsic pontine glioma and a systematic review of the reirradiation literature / C. Freese, V. Takiar, M. Fouladi [et al.] // *Pract. Radiat. Oncol*. – 2017. – Vol. 7, № 2. – P. 86–92.

38. Fritz, J.V. Sources and functions of extracellular small RNAs in human circulation / J. V. Fritz, A. Heintz-Buschart, A. Ghosal [et al.] // *Annu. Rev. Nutr.* – 2016. – Vol. 36. – P. 301–336.
39. Gao, F. Circulating tumor cell is a common property of brain glioma and promotes the monitoring system / F. Gao, Y. Cui, H. Jiang [et al.] // *Oncotarget.* – 2016. – Vol. 7, № 44. – P. 71330–71340.
40. Giussani, C. DTI fiber tracking to differentiate demyelinating diseases from diffuse brain stem glioma / C. Giussani, A. Poliakov, R. T. Ferri [et al.] // *Neuroimage.* – 2010. – Vol. 52. – P. 217–223.
41. Gokce-Samar, Z. Pre-radiation chemotherapy improves survival in pediatric diffuse intrinsic pontine gliomas / Z. Gokce-Samar, P. A. Beuriat, C. Faure-Contier [et al.] // *Childs. Nerv. Syst.* – 2016. – Vol. 32, № 8. – P. 1415–1423.
42. Green, A.L. Pediatric brainstem gliomas: new understanding leads to potential new treatments for two very different tumors / A. L. Green, M. W. Kieran. // *Curr Oncol. Rep.* – 2015. – Vol. 17, № 3. – P. 436.
43. Grimm, S. A. Brainstem glioma: a review / S. A. Grimm, M. C. Chamberlain // *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* – 2013. – Vol. 13, № 5. – P. 346.
44. Guillamo, J. S. Brain stem gliomas / J. S. Guillamo, F. Doz, J. Y. Delattre // *Current opinion in neurology.* – 2001. – Vol. 14, № 6. – P. 711–715.
45. Gururangan, S. Lack of efficacy of bevacizumab plus irinotecan in children with recurrent malignant glioma and diffuse brainstem glioma: a Pediatric Brain Tumor Consortium study / S. Gururangan, S. N. Chi, T. Young Poussaint [et al.] // *J. Clin. Oncol.* – 2010. Vol. 28, № 18. – P. 3069–3075.
46. Haas-Kogan, D.A. Phase II trial of tipifarnib and radiation in children with newly diagnosed diffuse intrinsic pontine gliomas / D. A. Haas-Kogan, A. Banerjee, T. Y. Poussaint [et al.] // *Neuro. Oncol.* – 2011. – Vol. 13, № 3. – P. 298–306.
47. Hargrave, D. Diffuse brainstem glioma in children: critical review of clinical trials / D. Hargrave, U. Bartels, E. Bouffet // *The Lancet Oncology.* – 2006. – Vol. 7, № 3. – P. 241–248.

48. Hu, X. Radiotherapy for diffuse brainstem glioma in children and young adults / X. Hu, Y. Fang, X. Hui [et al] // *Cochrane Database Syst. Rev.* – 2016. – Vol. 27, № 6. – P. 10439.
49. Huang, T.Y. Detection of Histone H3 mutations in cerebrospinal fluid-derived tumor DNA from children with diffuse midline glioma / T.Y. Huang, A. Piunti, R. R. Lulla [et al] // *Acta. Neuropathol. Commun.* – 2017. – Vol. 5, № 1. – P. 28.
50. Hummel, T. R. A pilot study of bevacizumab-based therapy in patients with newly diagnosed high-grade gliomas and diffuse intrinsic pontine gliomas / T. R. Hummel, R. Salloum, R. Drissi [et al.] // *J. Neurooncol.* – 2016. – Vol. 127, № 1. – P. 53–61.
51. Isa, O. N. Radiation therapy in the treatment of brain-stem tumors in children / O. N. Isa, C. M. Reyes, N. M. Russo // *Rev. Chil. Pediatr.* – 2014. – Vol. 85, № 1. – P. 40–45.
52. Janssens, G. O. Survival benefit for patients with diffuse intrinsic pontine glioma (DIPG) undergoing re-irradiation at first progression: a matched-cohort analysis on behalf of the SIOP-E-HGG/DIPG working group / G. O. Janssens, L. Gandola, S. Bolle [et al.] // *Eur. J. Cancer.* – 2017. – Vol. 73. – P. 38–47.
53. Janssens, G.O. Hypofractionation vs conventional radiation therapy for newly diagnosed diffuse intrinsic pontine glioma: a matched-cohort analysis / G. O. Janssens, M. H. Jansen, S. J. Lauwers [et al.] // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* – 2013. – Vol. 85, № 2. – P. 315–320.
54. Jones, D. T. Tandem duplication producing a novel oncogenic BRAF fusion gene defines the majority of pilocytic astrocytomas / D. T. Jones, S. Kocialkowski, L. Liu [et al.] // *Cancer Res.* – 2008. – Vol. 68, № 21. – P. 8673–8677.
55. Kim, C. Y. A prospective study of temozolomide plus thalidomide during and after radiation therapy for pediatric diffuse pontine gliomas: preliminary results of the Korean Society for Pediatric Neuro-Oncology study / C. Y. Kim, S. K. Kim, J. H. Phi [et al.] // *J. Neurooncol.* – 2010. – Vol. 100, № 2. – P. 193–198.

56. Knobbe, C. B. Mutation analysis of the Ras pathway genes NRAS, HRAS, KRAS and BRAF in glioblastomas / C. B. Knobbe, J. Reifenberger, G. Reifenberger // *Acta. Neuropathol.* – 2004. – Vol. 108, № 6. – P. 467–470.
57. Kwon, J. W. Paediatric brain-stem gliomas: MRI, FDG-PET and histological grading correlation / J. W. Kwon, I. O. Kim, J. E. Cheon [et al.] // *Pediatr. Radiol.* – 2006. – Vol. 36, № 9. – P. 959–964.
58. La Madrid, A. M. Second re-irradiation for DIPG progression, re-considering "old strategies" with new approaches / A. M. La Madrid, V. Santa-María, C. Martinez [et al.] // *Childs. Nerv. Syst.* – 2017. – Vol. 33, № 5. – P. 849–852.
59. Lassaletta, A. Reirradiation in patients with diffuse intrinsic pontine gliomas: The Canadian experience / A. Lassaletta, D. Strother, N. Laperriere [et al.] // *Pediatr Blood Cancer.* – 2018. – Vol. 65, № 6. – P. 26988.
60. Lee, A. The utilization of MGMT promoter methylation testing in United States hospitals for glioblastoma and its impact on prognosis / A. Lee, I. Youssef, V. W. Osborn [et al.] // *J. Clin. Neurosci.* – 2018. – Vol. 51. – P. 85–90.
61. Li, M. Sensitive digital quantification of DNA methylation in clinical samples / M. Li, W. D. Chen, N. Papadopoulos [et al.] // *Nat. Biotechnol.* – 2009. – Vol. 27, № 9. – P. 858–863.
62. Lindsey, M. Clinical, Radiologic, Pathologic, and Molecular Characteristics of Long-Term Survivors of Diffuse Intrinsic Pontine Glioma (DIPG): A Collaborative Report From the International and European Society for Pediatric Oncology DIPG Registries / M. Lindsey, L. M. Hoffman, E. M. Sophie [et al.] // *J. Clin. Oncol.* – 2018. – Vol. 36, № 19. – P. 1963–1972.
63. Lo, Y. M. Kinetics of plasma Epstein-Barr virus DNA during radiation therapy for nasopharyngeal carcinoma / Y. M. Lo, S. F. Leung, L. Y. Chan [et al.] // *Cancer research.* – 2000. – Vol. 60, № 9. P. 2351–2355.
64. Lobel, U. Quantitative diffusion-weighted and dynamic susceptibility-weighted contrast-enhanced perfusion MR imaging analysis of T2 hypointense lesion components

in pediatric diffuse intrinsic pontine glioma / U. Lobel, J. Sedlacik, W. E. Reddick [et al.] // *AJNR* *Am J. Neuroradiol.* – 2011. – Vol. 32, № 2. – P. 315–322.

65. Lobel, U. Three-dimensional susceptibility-weighted imaging and two-dimensional T2\*-weighted gradient-echo imaging of intratumoral hemorrhages in pediatric diffuse intrinsic pontine glioma / U. Lobel, J. Sedlacik, N. D. Sabin [et al.] // *Neuroradiology.* – 2010. – Vol. 52, № 12. – P. 1167–1177.

66. Lohr, J. G. Whole-exome sequencing of circulating tumor cells provides a window into metastatic prostate cancer / J. G. Lohr, V. A. Adalsteinsson, K. Cibulskis [et al.] // *Nat. Biotechnol.* – 2014. – Vol. 32, № 5. – P. 479–484.

67. Lu, V. M. Impact of the H3K27M mutation on survival in pediatric high-grade glioma: a systematic review and meta-analysis / V. M. Lu, M. A. Alvi, K. L. McDonald [et al.] // *J. Neurosurg. Pediatr.* – 2018. – Vol. 23, № 3. – P. 308–316.

68. Macarthur, K. M. Detection of brain tumor cells in the peripheral blood by a telomerase promoter-based assay / K. M. Macarthur, G. D. Kao, S. Chandrasekaran [et al.] // *Cancer Res.* – 2014. – Vol. 74. – P. 2152–2159.

69. Macy, M. E. A pediatric trial of radiation/cetuximab followed by irinotecan/cetuximab in newly diagnosed diffuse pontine gliomas and high-grade astrocytomas: A Pediatric Oncology Experimental Therapeutics Investigators' Consortium study. / M. E. Macy, M. W. Kieran, S. N. Chi [et al.] // *Pediatr Blood Cancer.* – 2017. – Vol. 64. – P. 11.

70. Manda, S. V. Exosomes as a biomarker platform for detecting epidermal growth factor receptor-positive high-grade gliomas / S. V. Manda, Y. Kataria, B. R. Tatireddy [et al.] // *J. Neurosurg.* – 2017. – Vol. 128, № 4. – P. 1091–1101.

71. Marc, H. Survival prediction model of children with diffuse intrinsic pontine glioma based on clinical and radiological criteria / H. Marc, Jansen, E. Sophie [et al.] // *Neuro Oncol.* – 2015. – Vol. 17, № 1. – P. 160–166.

72. Michalski, A. The addition of high-dose tamoxifen to standard radiotherapy does not improve the survival of patients with diffuse intrinsic pontine glioma / A. Michalski, E. Bouffet, R. E. Taylor [et al.] // *J. Neurooncol.* – 2010. – Vol. 100, № 1. – P. 81–88.

73. Mu, L. IDH1 R132H mutation is accompanied with malignant progression of paired primary-recurrent astrocytic tumours / L. Mu, W. Xu, Q. Li [et al.] // *Journal of Cancer*. – 2017. – Vol. 8, № 14. – P. 2704–2712.
74. Muller, C. Hematogenous dissemination of glioblastoma multiforme / C. Muller, J. Holtschmidt, M. Auer [et al.] // *Sci. Transl. Med.* – 2014. – Vol. 6. – P. 247–301.
75. Müller, K. Craniospinal irradiation with concurrent temozolomide and nimotuzumab in a child with primary metastatic diffuse intrinsic pontine glioma. A compassionate use treatment / K. Müller, A. Schlamann, C. Seidel [et al.] // *Strahlenther Onkol.* – 2013. – Vol. 189, № 8. – P. 693–696.
76. Negretti, L. Hypofractionated radiotherapy in the treatment of diffuse intrinsic pontine glioma in children: a single institution's experience / L. Negretti, K. Bouchireb, C. Levy-Piedbois [et. al.] // *J. Neurooncol.* – 2011. – Vol. 104, № 3. – P. 773–777.
77. Nicolaides, T. P. Targeted therapy for BRAFV600E malignant astrocytoma / T. P. Nicolaides, H. Li, D. A. Solomon [et al] // *Clin. Cancer. Res.* – 2011. – Vol. 17, № 24. P. 7595–7604.
78. Nieder, C. Update of human spinal cord reirradiation tolerance based on additional data from 38 patients / C. Nieder, A. L. Grosu, N. H. Andratschke [et al.] // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2006. Vol. 66, № 5. P. 1446–1149.
79. Ostrom, Q.T. CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2007–2011 / Q. T. Ostrom, H. Gittleman, P. Liao [et al.] // *Neuro Oncol.* 2014. – Vol. 16, № 4. – P. 1–63.
80. Oxnard, G. R. Noninvasive detection of response and resistance in EGFR-mutant lung cancer using quantitative next-generation genotyping of cell-free plasma DNA / G. R. Oxnard, C. P. Paweletz, Y. Kuang [et al.] // *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research.* – 2014. – Vol. 20, № 6. – P. 1698–1705.
81. Perez-Gomez, J. L. Stereotactic biopsy for brainstem tumors in pediatric patients / J. L. Perez-Gomez, C. A. Rodriguez-Alvarez, A. Marhx-Bracho [et al.] // *Childs. Nerv. Syst.* – 2010. – Vol. 26, № 1. – P. 29–34.

82. Pfister, S. BRAF gene duplication constitutes a mechanism of MAPK pathway activation in low-grade astrocytomas / S. Pfister, W. G. Janzarik, M. Remke [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 2008. – Vol. 118. – P. 1739–1749.
83. Porkholm, M. Radiation therapy and concurrent topotecan followed by maintenance triple anti-angiogenic therapy with thalidomide, etoposide, and celecoxib for pediatric diffuse intrinsic pontine glioma / M. Porkholm, L. Valanne, T. Lönnqvist [et al.] // *Pediatr. Blood. Cancer.* – 2014. – Vol. 61, № 9. – P. 1603–1609.
84. Pratt E. D. Rare cell capture in micro-fluidic devices / E. D. Pratt, C. Huang, B. G. Hawkins [et al.] // *Chem. Eng. Sci.* – 2011. Vol. 66, № 7. – P. 1508–152.
85. Rajshekhar, V. Status of stereotactic biopsy in children with brain stem masses: insights from a series of 106 patients / V. Rajshekhar, R. K. Moorthy // *Stereotact. Funct. Neurosurg.* – 2010. – Vol. 88, № 6. – P. 360–366.
86. Rizzo, D. Temozolomide in the treatment of newly diagnosed diffuse brainstem glioma in children: a broken promise / D. Rizzo, M. Scalzone, A. Ruggiero [et al.] // *J. Chemother.* – 2015. – Vol. 27, № 2. – P. 106–110.
87. Robison, N. J. Diffuse intrinsic pontine glioma: a reassessment / N. J. Robison, M. W. Kieran // *J. Neurooncol.* – 2014. – Vol. 119, № 1. – P. 7–15.
88. Roujeau, T. Shall we treat hydrocephalus associated to brain stem glioma in children? / T. Roujeau, F. Di Rocco, C. Dufour [et al.] // *Childs Nerv. Syst.* – 2011. – Vol. 27, № 10. – P. 1735–1739.
89. Roujeau, T. Stereotactic biopsy of diffuse pontine lesions in children / T. Roujeau, G. Machado, M. R. Garnett [et al.] // *J. Neurosurg.* – 2007. – Vol. 107. – P. 1–4.
90. Santiago-Dieppa, D. R. Extracellular vesicles as a platform for glioma therapeutic development / D. R. Santiago-Dieppa, D. D. Gonda, V. J. Cheung [et al.] // *Prog. Neurol. Surg.* – 2018. – Vol. 32, № 5. – P. 172–179.
91. Schiffman, J. D. Oncogenic BRAF mutation with CDKN2A inactivation is characteristic of a subset of pediatric malignant astrocytomas / J. D. Schiffman, J. G.

- Hodgson, S. R. Vandenberg [et al.] // *Cancer Res.* – 2010. – Vol. 15, № 70. P. 512–519.
92. Schindler, G. Analysis of BRAF V600E mutation in 1,320 nervous system tumors reveals high mutation frequencies in pleomorphic xanthoastrocytoma, ganglioglioma and extra-cerebellar pilocytic astrocytoma / G. Schindler, D. Capper, J. Meyer [et al.] // *Acta. Neuropathol.* – 2011. – Vol. 121, № 3. – P. 397–405.
93. Schrappe M. Detection and management of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia / M. Schrappe // *Hematology American Society of Hematology Education Program.* – 2014. – Vol. 2014, № 1. – P. 244–249.
94. Schwartzentruber, J. Driver mutations in histone H3.3 and chromatin remodelling genes in paediatric glioblastoma / *Nature.* – 2012. – Vol. 482. – P. 226–231.
95. Sethi, R. Prospective neuraxis MRI surveillance reveals a high risk of leptomeningeal dissemination in diffuse intrinsic pontine glioma / R. Sethi, J. Allen, B. Donahue [et al.] // *J. Neurooncol.* – 2011. – Vol. 102, № 1. – P. 121–127.
96. Shao, H. Protein typing of circulating micro-vesicles allows real-time monitoring of glioblastoma therapy / H. Shao, J. Chung, L. Balaj [et al.] // *Nat. Med.* – 2012. – Vol. 18, № 12. – P. 1835–1840.
97. Sievert, A. J. Duplication of 7q34 in pediatric low-grade astrocytomas detected by high-density single-nucleotide polymorphism-based genotype arrays results in a novel BRAF fusion gene / A. J. Sievert, E. M. Jackson, X. Gai [et al.] // *Brain. Pathol.* – 2009. – Vol. 19, № 3. – P. 449–458.
98. Skog, J. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers / J. Skog, T. Wurdinger, S. van Rijn [et al.] // *Nat. Cell. Biol.* – 2008. – Vol. 10, № 12. – P. 1470–1476.
99. Sorensen, B. S. Monitoring of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor-sensitizing and resistance mutations in the plasma DNA of patients with advanced non-small cell lung cancer during treatment with erlotinib / B. S. Sorensen, L. Wu, W. Wei [et al.] // *Cancer.* – 2014. – Vol. 120. – P. 3896–3901.

100. Steffen-Smith E. A. Proton magnetic resonance spectroscopy predicts survival in children with diffuse intrinsic pontine glioma / E. A. Steffen-Smith, Shih J. H., Hipp S. J. [et al.] // *J. Neurooncol.* – 2011. – Vol. 105, № 2. – P. 365–373.
101. Sullivan, J. P. Brain tumor cells in circulation are enriched for mesenchymal gene expression / J. P. Sullivan, B. V. Nahed, M. W. Madden [et al.] // *Cancer Discov.* – 2014. – Vol. 4, № 11. – P. 1299–1309.
102. Suo-Palosaari, M. Long-term survival of an infant with diffuse brainstem lesion diagnosed by prenatal MRI: a case report and review of the literature / M. Suo-Palosaari, H. Rantala, S. Lehtinen [et al.] // *Childs. Nerv. Syst.* – 2016. – Vol. 32, № 6. – P.1163–1168.
103. Taylor, K. R. Recurrent activating ACVR1 mutations in diffuse intrinsic pontine glioma / K. R. Taylor, A. Mackay, N. Truffaux [et al.] // *Nat. Genet.* – 2014. –Vol. 46. – P. 457–461.
104. Tinkle, C. L. Evaluation of 11 C- methionine PET and anatomic MRI associations in diffuse intrinsic pontine glioma / C. L. Tinkle, E. C. Duncan, M. Doubrovin [et al.] // *J. Nucl. Med.* – 2019. Vol. 60, № 3. P. 312–319.
105. Tisnado, J. Conventional and Advanced Imaging of Diffuse Intrinsic Pontine Glioma / J. Tisnado, R. Young, K. K. Peck [et al.] // *J. Child. Neurol.* – 2016. – Vol. 31, № 12. – P. 1386–1393.
106. Veldhuijzen van Zanten, S. M. E. State of affairs in use of steroids in diffuse intrinsic pontine glioma: an international survey and a review of the literature / M. E. Veldhuijzen van Zanten, O. Cruz, G. J. Kaspers [et al.] // *J. Neurooncol.* – 2016. – Vol. 128, № 3. – P. 387394.
107. Veldhuijzen van Zanten, S. E. M., A phase I/II study of gemcitabine during radiotherapy in children with newly diagnosed diffuse intrinsic pontine glioma / S. E. M. Veldhuijzen van Zanten, F. E. El-Khouly, M. H. A. Jansen [et al.] // *J. Neurooncol.* – 2017. – Vol. 135, № 2. – P. 307–315.
108. Veldhuijzen van Zanten, S. E. M. Development of the SIOPE DIPG network, registry and imaging repository: a collaborative effort to optimize research into a rare

- and lethal disease / S. E. M. Veldhuijzen van Zanten, J. Baugh, B. Chaney [et al.] // *J. Neurooncol.* – 2017. – Vol. 132, № 2. P. 255266.
109. Vuong Y. G. BRAF mutation is associated with an improved survival in glioma—a systematic review and meta-analysis / Y. G. Vuong, A. M. A. Altibi, U. N. P. Duong [et al.] // *Molecular Neurobiology.* – 2018. – Vol. 55, № 5. –P. 3718–3724.
110. Wang, Y. Detection of tumor-derived DNA in cerebrospinal fluid of patients with primary tumors of the brain and spinal cord / Y. Wang, S. Springer, M. Zhang [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2015. –Vol. 112, № 31. – P. 9704–9709.
111. Warren, K. E. Diffuse intrinsic pontine glioma: poised for progress / K. E. Warren // *Front. Oncol.* – 2012. – Vol. 2. – P. 205.
112. Wells, E. M. Pediatric brain tumors / E. M. Wells, R. J. Packer // *Continuum (Minneapolis, Minn). Neuro-oncology.* – 2015. – Vol. 21. – P. 373–396.
113. Wolff, J. E. Treatment of recurrent diffuse intrinsic pontine glioma: the MD Anderson Cancer Center experience / M. E. Rytting, T. S. Vats // *J. Neurooncol.* – 2012. – Vol. 106, № 2. – P. 391397.
114. Wu, G. Somatic histone H3 alterations in pediatric diffuse intrinsic pontine gliomas and non-brainstem glioblastomas / G. Wu, A. Broniscer, T. A. McEachron [et al.] // *Nat. Genet.* – 2012. – Vol. 44. – P. 251–253.
115. Wu, G. The genomic landscape of diffuse intrinsic pontine glioma and pediatric non-brainstem highgrade glioma / G. Wu, A. K. Diaz, B. S. Paugh [et al.] // *Nat. Genet.* – 2014. – Vol. 46. – P. 444450.
116. Zaghloul, M. S. Hypofractionated conformal radiotherapy for pediatric diffuse intrinsic pontine glioma (DIPG): a randomized controlled trial / M. S. Zaghloul, E. Eldebawy, S. Ahmed [et al.] // *Radiother. Oncol.* – 2014. – Vol. 111, №1. – P. 3540.
117. Zaky, W. Treatment of children with diffuse intrinsic pontine gliomas with chemoradiotherapy followed by a combination of temozolomide, irinotecan, and bevacizumab / W. Zaky, M. Wellner, R. J. Brown [et al.] // *Pediatr. Hematol. Oncol.* – 2013. – Vol. 30, № 7. – P. 623632.