

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР ОНКОЛОГИИ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

РОСТОРГУЕВ Эдуард Евгеньевич

**НОВЫЕ ПОДХОДЫ К ДИАГНОСТИКЕ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ
ТЕРАПИИ ГЛИАЛЬНЫХ ОПУХОЛЕЙ ВЫСОКОЙ СТЕПЕНИ
ЗЛОКАЧЕСТВЕННОСТИ**

14.01.12 – онкология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

Научный консультант:
член-корреспондент РАН
доктор медицинских наук,
профессор **Кит О.И.**

г. Ростов-на-Дону – 2021 г.

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
Глава 1. НЕКОТОРЫЕ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ, МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ, КЛИНИКО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ГЛИАЛЬНЫХ ОПУХОЛЕЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА У ВЗРОСЛЫХ (обзор литературы)	15
Глава 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	46
2.1. Дизайн исследования и характеристика используемого клинического материала	46
2.2. Общие методики обследования пациентов и способы забора биологического материала.....	51
2.3. Материал и методы молекулярно-генетического исследования.....	54
2.4. Материал и методы биохимического исследования	61
2.5. Материал и методы культурального исследования.....	61
2.6. Экспериментальные исследования	64
2.7. Статистический анализ.....	66
Глава 3. СОВРЕМЕННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В ОПЕРАТИВНОМ ЛЕЧЕНИИ ОПУХОЛЕЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА.....	67
Глава 4. ИНТЕГРАТИВНЫЙ АНАЛИЗ ТРАНСКРИПЦИИ мРНК И микроРНК В ГЛИАЛЬНЫХ ОПУХОЛЯХ ГОЛОВНОГО МОЗГА. ДАННЫЕ TCGA.....	78
4.1 Исследование генной экспрессии в глиальных опухолях разной степени злокачественности по данным TCGA	78
4.2 Дифференциальная экспрессия микроРНК в глиальных опухолях.....	102
Глава 5. ЭКСПРЕССИЯ КЛЮЧЕВЫХ РЕГУЛЯТОРОВ ОНКО-АССОЦИИРОВАННЫХ СИГНАЛЬНЫХ ПУТЕЙ В ГЛИАЛЬНЫХ ОПУХОЛЯХ	118
5.1 Характеристика депозитария тканей, препаратов РНК и ДНК глиальных опухолей	118
5.2 Исследование относительной экспрессии генов в глиальных опухолях	125

5.3	Влияние изменения относительной экспрессии генов на продолжительность жизни у больных с глиальными опухолями.....	127
5.4	Сравнительный анализ экспрессии генов в глиальных опухолях разной степени злокачественности	129
5.5	Диагностика взаимосвязи степени злокачественности глиальных опухолей и экспрессии генов <i>KDM1A</i> и <i>SMAD7</i>	148
5.6	Исследование относительной экспрессии микроРНК в глиомах высокой степени злокачественности	150
Глава 6. ИССЛЕДОВАНИЕ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ микроРНК В ПЛАЗМЕ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С ГЛИАЛЬНЫМИ ОПУХОЛЯМИ ГОЛОВНОГО МОЗГА.....		154
Глава 7. ОПРЕДЕЛЕНИЕ НЕКОТОРЫХ МАРКЕРОВ РОСТА ГЛИАЛЬНЫХ ОПУХОЛЕЙ ВЫСОКОЙ СТЕПЕНИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОСТИ.....		173
7.1	Ростовые факторы.....	173
7.2	Роль гормональных факторов в развитии глиальных опухолей высокой степени злокачественности	178
7.3	Система регуляции плазминогена.....	181
7.4	Способ дифференциальной диагностики доброкачественных и злокачественных опухолей головного мозга	186
Глава 8. РАЗРАБОТКА МОДЕЛЬНЫХ СИСТЕМ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ГЛИОМ ДЛЯ ДОКЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....		189
8.1	Экспериментальное моделирование нейроэпителиальных опухолей <i>in vitro</i>	189
8.2	Создание ортотопической ксеногенной опухолевой модели глиобластомы <i>in vivo</i>	201
ЗАКЛЮЧЕНИЕ		236
ВЫВОДЫ		251
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....		254
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....		256
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ		259

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования

По данным анализа заболеваемости населения России в 2018 г., абсолютное число пациентов с впервые в жизни установленным диагнозом злокачественного новообразования (ЗНО) центральной нервной системы (ЦНС) (без дополнительных уточнений) составило 4311. Показатель заболеваемости в Российской Федерации составил 6,08 на 100 000 населения. С 2008 по 2018 г. прирост ЗНО ЦНС – 2,78 на 100 000 населения. Средний возраст больных с впервые в жизни установленным диагнозом ЗНО ЦНС в России составил 54,7 года (Каприн А.Д. и соавт., 2019). В данном регистре не учитываются многообразные гистологические варианты первичных опухолей головного мозга (Дяченко А.А., 2014), а также вновь выделенные подгруппы на основе хромосомных aberrаций и молекулярно-генетических маркеров (Louis D.N. et al., 2016). Современная диагностика опухолей головного мозга основывается на нейровизуализационных данных РКТ (рентгеновской компьютерной томографии), МРТ (магнитно-резонансной томографии) и ПЭТ (позитронно-эмиссионной томографии) (Louis D.N., Schiff D., Batchelor T., Wen P.Y., 2017).

Данные методы позволяют диагностировать опухоль, определить локализацию, метаболическую активность, биохимические параметры, но не способны в полной мере определить гистологический профиль опухоли. Кроме того, МРТ-нейровизуализация иногда имеет ряд временных препятствий для выполнения: избыточный вес, клаустрофобия, беременность, наличие металлических или электрических имплантов и т. д. Биомаркеры биологических жидкостей широко изучаются в клинической диагностике и мониторинге онкологической патологии, а некоторые из них уже используются в клинической практике. Было показано, что микроРНК принимают участие во многих биологических процессах, таких как регуляция иммунитета, эмбриогенез и развитие опухолей посредством посттранскрипционных модификаций. Механизм действия заключается в связывании комплементарной 3' UTR мРНК-мишени и деградации мРНК (Lu J., Getz G., Miska E.A. et al., 2005).

Несколько исследований показали, что отдельная группа циркулирующих микроРНК может быть использована в качестве диагностических инструментов для нескольких типов рака, включая рак мочевого пузыря, гепатоцеллюлярную карциному, рак легких, рак шейки матки, рак яичников, рак желудка и рак прямой кишки с высокой чувствительностью и специфичностью (Banno K., Iida M., Yanokura M. et al., 2014). Уровень циркулирующей микроРНК также может коррелировать с исходом заболевания (Kosaka N., Iguchi H., Ochiya T., 2010).

Q. Zhou et al. (2018) рассмотрели 28 статей, посвященных диагностике глиом на основании анализа микроРНК, и сообщили об общей чувствительности 85%, специфичности 90% и площадь под ROC-кривой ошибок 93% для выявленных моделей. Несмотря на то, что имеющиеся исследования предполагают, что микроРНК могут эффективно диагностировать глиальные опухоли у пациентов без клинических проявлений, на сегодняшний день перспективы их использования в скрининге пока до конца не ясны. Это может быть связано с неоднородностью дизайна исследований (пациенты с гетерогенной группой глиом по сравнению со здоровыми контрольными пациентами), типом образца (например, сыворотка против плазмы, цельная кровь против экзосом), пулом микроРНК и применяемых аналитических методов.

Главной задачей хирургического лечения опухолей головного мозга является микрохирургическое удаление опухоли в максимально возможном объеме, но с минимальным повреждением функционально значимых зон головного мозга. Рандомизированных контролируемых исследований, изучающих эффект разной степени циторедукции опухоли, не существует. Клинические данные свидетельствуют о том, что максимально функционально безопасная резекция улучшает состояние и снижает смертность при глиомах любой степени злокачественности (Chaichana K.L. et al., 2014; Noorbakhsh A., Tang J.A., Marcus L.P. et al., 2014; NCCN, 2018).

Молекулярно-генетические методы в последнее время используются не только для поиска новых предикторов прогноза и диагностических маркеров, но и для определения тактики лечения. При наличии метилирования промотора гена

MGMT некоторые исследователи выявили лучшую эффективность комбинации темозоломида с лучевой терапией. Несмотря на доказанную прогностическую значимость, исследование метилирования промотора *MGMT* в клинической практике проводится нечасто, поскольку алкилирующая химиотерапия и так является стандартом лечения всех глиобластом, включая неоперабельные глиобластомы и глиобластомы у пожилых пациентов (Malmström A., Grønberg B.H., Marosi C. et al., 2012; Wick W., Platten M., Meisner C. et al., 2012; Perry J.R., Laperriere N., O’Callaghan C.J. et al., 2017).

Мутация V600E в гене *BRAF* чаще всего встречается при доброкачественных отграниченных глиомах, таких как плеоморфная ксантоastroцитомы (60–80%), дисэмбриопластическая нейроэпителиальная опухоль (30%), ганглиоглиома (25%), пилоцитарная астроцитомы (5–15%) (Malmström A., Grønberg B.H., Marosi C. et al., 2012; Park S.-H., Won J., Kim S.-I. et al., 2017; National Comprehensive Cancer Network. Central nervous system cancers (version 1.2018). https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/cns.pdf).

HIF-1 α регулирует гены, играющие ключевую роль в процессах, связанных с опухолями – пролиферация, ангиогенез, апоптоз/аутофагия, метаболизм, миграция и инвазия клеток (Hu X., Li X., Valverde K. et al., 2009). В нескольких исследованиях сообщалось о значительной взаимосвязи между плохим прогнозом и избыточной экспрессией гена *HIF1A* у пациентов с глиомами. В связи с этим *HIF1A* считается привлекательной мишенью для терапии глиобластом (Liao Z., She C., Ma L. et al., 2019). Было показано, что ингибирование *KDM1A* негативно регулирует уровни белка HIF-1 α , активируя процессы старения, и ухудшает возможности миграции клеток при нормоксических и гипоксических состояниях. Таким образом, повышение *KDM1A* активирует управляемую HIF-1 α адаптацию к гипоксии в клетках глиобластом (Chen Y. et al., 2020).

Для доказательства противоопухолевой эффективности новых лекарственных субстанций, используемых в лечении злокачественных опухолей головного мозга, применяют immortalized клеточные линии, такие как U87, U251, T98G и A172. Две наиболее широко изученные из них – U87 и U251,

были сгенерированы в шестидесятые годы прошлого века из биоматериала больных с глиобластомой (Lenting K., Verhaak R., Laan M. et al., 2017). Примечательно, что клетки U87 из-за роста на пластике в условиях культивирования в течение длительного времени, генетического дрейфа и клональной селекции на сегодняшний день существуют в виде субклонов U87, обладающих различающимися характеристиками, что влияет на воспроизводимость результатов эксперимента.

В настоящее время большое внимание уделяется созданию первичных клеточных культур и PDX-моделей глиом головного мозга на иммунодефицитных животных (Ji X., Chen S., Guo Y. et al., 2017).

Несмотря на прогресс в выявлении молекулярных основ первичных опухолей головного мозга, по-прежнему остается крайне мало эффективных методов лечения данной патологии. Рассматривается несколько причин такого разочаровывающего результата: слабое проникновение лекарственного препарата через гематоэнцефалический барьер, избыточность внутриклеточных сигнальных путей, молекулярная гетерогенность опухоли и отсутствие подтвержденных биомаркеров. Соответственно, текущие экспериментальные стратегии включают иммунотерапию, таргетную терапию, генную терапию и новые технологии доставки лекарств, которые легко проникают через гематоэнцефалический барьер. Также существует единодушное мнение о том, что достижение широкого и длительного противоопухолевого ответа может быть осуществлено в рамках комбинированной терапии (Filley A.C., Dey M., 2017; Weller M., Van Den Bent M., Tonn J.C. et al., 2017; Bagley S.J. et al., 2018).

Таким образом, изменение сложившейся ситуации в нейроонкологии видится в применении мультидисциплинарного подхода к исследованиям, результаты которых должны быть подтверждены на современных экспериментальных моделях как *in vivo*, так и *in vitro*.

Степень разработанности темы

Результаты лечения злокачественных опухолей головного мозга, несмотря на успехи, достигнутые в развитии хирургической техники и методов лучевой

терапии, разработке и внедрении новых химиопрепаратов, остаются крайне неудовлетворительными. Уровень инвалидизации больных злокачественными глиомами – высокий, а медиана выживаемости – непродолжительная (Ростовцев Д.М., 2016). Ассоциацией нейрохирургов Российской Федерации разработаны и Министерством здравоохранения Российской Федерации утверждены стандарты лечения данной категории больных; их применение на практике не во всех случаях приводит к желаемому результату: увеличению продолжительности и улучшению качества жизни пациентов. Причины этого кроются как в низкой эффективности самих методик лечения, так и в поздней диагностике заболевания.

Диссертационное исследование Д.М. Ростовцева (2016) было посвящено оценке ближайших и отдаленных результатов комплексного лечения пациентов с низкодифференцированными астроцитарными супратенториальными опухолями, в процессе которого использовались различные методики, позволившие выработать оптимальную тактику хирургического лечения и послеоперационной адъювантной терапии. Данная работа была выполнена в эпоху, когда молекулярно-генетические методы были практически недоступны для широкого круга исследователей, а именно на них в последнее время возлагают большие надежды нейроонкологи. Автором на большом клиническом материале изучены ближайшие и отдаленные результаты лечения больных, которым проведена интраоперационная фотодинамическая терапия и комбинация фотодинамической терапии со специфической противоопухолевой иммунотерапией на основе аутологичных дендритных клеток.

В свою очередь, диссертационная работа М.В. Мацко (2020) посвящена изучению молекулярно-генетических характеристик нейроэпителиальных опухолей с целью поиска путей персонифицированного подхода в лечении нейроонкологических больных с учетом их клинических особенностей и молекулярного портрета опухоли в каждом конкретном случае. Автором впервые в мире в эмбриональных опухолях ЦНС, основываясь на экспрессии мРНК генов *ERCC1* и *MGMT*, изучена чувствительность к препаратам платины, которая

выявлена в нейробластоме и ганглионейробластоме в 53% и 27% случаев и препаратам алкильной группы, обнаруженная в 60% и 40% случаев соответственно. М.В. Мацко доказано, что нейроэпителиальные опухоли характеризуются молекулярно-генетической гетерогенностью, а именно – разной экспрессией мРНК генов (*MGMT*, *VEGF*, *PDGFR*, *TP*, *TUBB3*, *ERCC1*, *KIT*, *TOP2A*) у разных больных в рамках одной нозологии.

Ни коим образом не оспаривая важность результатов данного исследования, дизайн которого – несомненный шаг вперед в изучении глиальных опухолей, в своей диссертации мы не только продолжили поиск таргетных мишеней и предиктивных факторов на основе микроРНК и панели генов, но и разработали новые *in vivo* и *in vitro* модели для подтверждения выдвигаемых гипотез.

Цель исследования

Повысить эффективность клинической диагностики и улучшить результаты экспериментальной терапии глиальных опухолей высокой степени злокачественности.

Задачи исследования

1. Создать биобанк образцов глиальных опухолей различной степени злокачественности за счет использования биоматериала от пациентов ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России (астроцитомы (GII, GIII), глиобластомы (GIV)) с целью оценки экспрессии панели генетических маркеров в опухоли и условно-здоровой ткани головного мозга пациента.

2. Провести сравнительный анализ профилей экспрессии генов в глиальных опухолях различной степени злокачественности с целью обнаружения прогностических маркеров и потенциальных мишеней для таргетной терапии.

3. Изучить пул микроРНК глиальных опухолей высокой степени злокачественности в сравнении со здоровой тканью с целью обнаружения прогностических маркеров и потенциальных мишеней для таргетной терапии.

4. Оценить ассоциацию изменения экспрессии выбранной панели генов и микроРНК с общей выживаемостью больных с глиальными опухолями высокой степени злокачественности.

5. В сравнительном аспекте изучить содержание ростовых факторов, гормонов и белков системы регуляции плазминогена в глиальных опухолях высокой степени злокачественности и менингиомах.

6. Создать PDX-модель глиальной опухоли высокой степени злокачественности, апробировав на ней лекарственный препарат, действующий на мишень для таргетной терапии, полученную в ходе молекулярно-генетических исследований.

Научная новизна исследования

В диссертационной работе впервые:

– разработан и применен на практике способ имплантации фрагмента глиальной опухоли высокой степени злокачественности в ткань головного мозга иммунодефицитного животного, который позволил получить PDX-модель глиобластомы (GIV) на иммунодефицитных мышах Balb/c Nude (патент РФ №2742449 от 05.02.2021). Доказана возможность ее применения в доклинических исследованиях;

– доказано потенциально высокое терапевтическое значение анти-EGFR, анти-HIF1A и анти-TGF- β препаратов для лечения глиальных опухолей высокой степени злокачественности на основе сравнения транскрипционных профилей экспрессии генов *KDM1A*, *SMAD7*, *EGFR*, *HIF1A* и *SMAD4/7*;

– достоверно доказано, что применение анти-HIF1A препарата бортезомиб в сочетании с темозоломидом обладает лучшим противоопухолевым эффектом по сравнению только с темозоломидом в доклинических исследованиях, проведенных на PDX-моделях глиобластом;

– отобраны маркеры, перспективные в качестве мишеней таргетной и генной терапии, в том числе 15 генов и 13 микроРНК на основании полученных транскрипционных паттернов и последующей валидации интерактомного

анализа взаимодействия микроРНК и мРНК генов, ассоциированных с выживаемостью.

Теоретическая и практическая значимость

В работе на большом экспериментальном и клиническом материале:

– выявлены существенные различия в транскрипционной активности опухоли относительно условно нормальной ткани для астроцитом (GII, GIII) и глиобластом (GIV), а именно: для группы диффузной астроцитомы (GII) достоверное изменение относительной экспрессии отмечено для гена *KDM1A*; в группе анапластических астроцитом (GIII) достоверное повышение относительной экспрессии в опухолевой ткани отмечено для гена *HIF1A*; в группе глиобластом (GIV) статистически значимые отличия относительной экспрессии зафиксированы для генов *EGFR*, *EGLN1*, *EGLN3*, *HIF1A*, *HBPI*, *SMAD7*;

– выявлено высокое количество обеих форм PAI-1 и uPA в тканях глиальных опухолей высокой степени злокачественности по сравнению с их перифокальными зонами и перифокальными зонами менингиом, что позволяет считать эти белки опухоль-ассоциированными;

– разработана и апробирована оригинальная тест-система по выявлению специфичного паттерна микроРНК в плазме крови для неинвазивной диагностики глиальных опухолей высокой степени злокачественности и для их дифференцировки с метастатическими опухолями головного мозга (патент РФ №2709651 от 19.12.2019);

– разработан и апробирован способ дифференциальной диагностики доброкачественных и злокачественных опухолей головного мозга, заключающийся в определении величины активности трипсиноподобных протеиназ плазмы крови (патент РФ №2628816 от 22.08.2017);

– разработан оригинальный способ профилактики инфекционных осложнений, связанных с послеоперационной раной, включая раневую ликворею, заключающийся в использовании композиции их фибриноген-тромбинового клея и костной стружки, полученной во время операционного доступа (патент РФ №2715191 от 25.02.2020);

– разработан и апробирован способ диагностики глиальных опухолей головного мозга высокой степени злокачественности, основанный на анализе экспрессии микроРНК в образце плазмы крови (патент РФ №2742413 от 05.02.2021).

Внедрение результатов исследования в практику здравоохранения

Результаты исследования внедрены в практику работы отделения нейроонкологии ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России. Фундаментальные теоретические положения включены в учебный процесс преподавания на кафедре онкологии ФГБОУ ВО РостГМУ Минздрава России.

Методология и методы диссертационного исследования

Методы научного познания и последовательное их применение явились методологической основой диссертационной работы, которая выполнялась в дизайне сравнительного исследования с использованием общеклинических, анамнестических, лабораторных и статистических методов исследования.

Основные положения, выносимые на защиту

- Выявлены молекулярно-генетические предикторы благоприятного прогноза течения глиальных опухолей высокой степени злокачественности, к которым относятся: низкая экспрессия *KDM1A* для диффузных астроцитом (GII); низкий уровень *HIF1A* для анапластических астроцитом (GIII); сниженная экспрессия *EGFR* и *HIF1A* для глиобластом (GIV).
- Исследование транскрипционных профилей глиальных опухолей высокой степени злокачественности позволило доказать высокое терапевтическое значение анти-EGFR, анти-HIF1A и анти-TGF-В препаратов.
- Для доказательства выдвинутой на основе молекулярно-генетического исследования гипотезы о значении анти-HIF1A препаратов в лечении глиом нами была создана PDX-модель глиобластомы (GIV) на иммунодефицитных мышах. Применение препарата бортезомиб, блокирующего рецепторы к *HIF1A*, на

разработанной модели *in vivo* подтвердило значимость данного сигнального пути в развитии глиальных опухолей высокой степени злокачественности.

- Для получения глиальных опухолей высокой степени злокачественности на иммунодефицитных животных доказано значение ортотопического сайта имплантации. Рост первого пассажа PDX-импланта в головном мозге иммунодефицитной мыши Balb/c Nude позволил получить достаточный объем биологического материала для последующих перевивок с целью выполнения доклинического исследования лекарственного препарата.

Степень достоверности результатов работы и их апробация

Автором проведен анализ отечественной и зарубежной литературы, касающийся проблем лечения, молекулярно-генетической диагностики и экспериментальных моделей глиальных опухолей высокой степени злокачественности. Разработан дизайн исследования. Выполнены хирургические вмешательства при глиальных опухолях различной степени злокачественности. Автором осуществлены экспериментальные исследования на животных. Статистическая обработка данных, интерпретация полученных результатов, оформление диссертации проведены автором лично.

Апробация результатов работы состоялась 10.12.2020 на заседании диссертационного совета ФБГУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России.

Результаты работы доложены на XX Российском онкологическом конгрессе (г. Москва, 15–17 ноября 2016 г.); Втором онкологическом форуме юга России (г. Ростов-на-Дону. 31 октября – 01 ноября 2016 г.); Первом Всероссийском междисциплинарном онкологическом форуме с международным участием «Актуальные вопросы онкологической помощи», приуроченном к 70-летию ГБУЗ РК «Крымского республиканского онкологического клинического диспансера имени В.М. Ефетова» (Крым. 20–21 апреля 2018 г.); научно-практической конференции «Актуальные вопросы нейрохирургии» с сертификационным курсом кафедры детской нейрохирургии ФГБОУ ДПО «РМАНПО» Минздрава России (г. Ростов-на-Дону, 4–6 июля 2018 г.); VI съезде биофизиков России

(г. Сочи, 16–21 сентября 2019 г.); на Международной научно-практической конференции «Генетика – фундаментальная основа инноваций в медицине и селекции» (г. Ростов-на-Дону, 26–27 сентября 2019 г.)

Соответствие диссертации паспорту специальности

Научные положения диссертации соответствуют пункту 2 «Исследования по изучению этиологии и патогенеза злокачественных опухолей, основанные на достижениях ряда естественных наук (генетики, молекулярной биологии, морфологии, иммунологии, биохимии и др.)» и пункту 4 «Дальнейшее развитие оперативных приемов с использованием всех достижений анестезиологии, реаниматологии и хирургии» паспорта специальности 14.01.12 – онкология.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 28 печатных работ, из них 12 в журналах, рекомендованных ВАК Министерства науки и высшего образования Российской Федерации для публикаций основных результатов диссертаций на соискание ученой степени доктора медицинских наук, получено 5 патентов на изобретение Российской Федерации.

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа изложена на 300 страницах печатного текста и состоит из введения, обзора литературы, характеристики материала и методов, 6 глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка литературы, включающего 385 источника, в том числе 63 отечественных и 322 зарубежных. Работа иллюстрирована 115 рисунками и 49 таблицами.

Глава 1

**НЕКОТОРЫЕ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ, МОЛЕКУЛЯРНО-
ГЕНЕТИЧЕСКИЕ, КЛИНИКО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ
ГЛИАЛЬНЫХ ОПУХОЛЕЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА У ВЗРОСЛЫХ
(обзор литературы)**

Определение нейроэпителиальных (нейроэктодермальных) опухолей

Первичные опухоли головного мозга представляют собой гетерогенную группу опухолей, возникающих из тканей, составляющих оболочки и вещество головного мозга (Кобяков Г.Л. и соавт., 2018; Ostrom Q.T., Gittleman H., Liao P. et al., 2017). К глиомам относят опухоли нейроэктодермального происхождения, возникающие из глиальных клеток или клеток, эмбриогенетически связанных с эмбриональным эпителием наружного зародышевого листка (Мацко Д.Е., 2015). Классификация глиом претерпела значительную реструктуризацию в версии ВОЗ «Классификация опухолей ЦНС» 2016 года (Louis D.N., Ohgaki H., Wiestler O.D. C.W., 2016), что впоследствии отразилось на выборе диагностических биомаркеров, подходах к верификации, прогнозу и планированию лечения. Включение в эту классификацию хромосомных aberrаций, молекулярных и гистологических параметров определило новую эру в нейроонкологии (Мацко Д.Е., Мацко М.В., Имянитов Е.Н., 2017).

Эпидемиологические данные и факторы риска развития первичных опухолей головного мозга и глиом

На первичные опухоли головного мозга (ОГМ) приходится около 2% всех онкологических заболеваний, а общая годовая заболеваемость составляет 22 на 100 000 человек населения. Глиомы занимают около 75% первичных злокачественных опухолей головного мозга у взрослых. Зафиксировано, что заболеваемость увеличивается с возрастом и является самой высокой у лиц старше 85 лет. В 2018 году в США ожидалось около 80 000 новых случаев первичных опухолей головного мозга, из которых одна треть должна была быть злокачественной (Ostrom Q.T., Gittleman H., Liao P. et al., 2017). Среднегодовой

уровень смертности от первичных злокачественных глиальных ОГМ составляет 4,32 на 100 000 населения, что приводит к 14 500 случаев смерти в год в США. Средняя выживаемость в течение 5 лет составляет 35%.

Менее 5% первичных ОГМ развиваются в рамках семейных наследственных синдромов (таблица 1.1), а большинство пациентов не имеют идентифицируемых факторов риска (Reuss D.E., Piro R.M., Jones D.T.W. et al., 2013; Dunbar E.M., Eppolito A., Henson J.W., 2016).

Таблица 1.1 – Основные наследственные синдромы, связанные с первичными опухолями головного мозга

Генетический синдром	Ген	Наследование	Опухоли ЦНС	Другие наиболее часто встречаемые опухоли
Нейрофиброматоз 1 тип	<i>NF1</i>	50% аутосомно-доминантный 50% de novo	15–20% глиома зрительных трактов, 4% глиома низкой степени злокачественности (ствол), 1% глиобластома	Феохромоцитома, лейкемия, нейрофиброматоз, злокачественные опухоли из невралной оболочки периферических нервов, гастроинтестинальные стромальные опухоли
Нейрофиброматоз 2 тип	<i>NF2</i>	50% аутосомно-доминантный, 50% de novo	50% интракраниальные менингиомы, 20% спинальные менингиомы, 30% спинальные эпендимомы, глиома	Билатеральные вестибулярные шванномы, невестибулярные шванномы
Шванноматоз	<i>SMA</i> <i>RCB1</i>	аутосомно-доминантный	Менингиома	Невестибулярные шванномы
Синдром Ли – Фраумени	<i>TP53</i>	80% аутосомно-доминантный, 20% de novo	Широкий спектр опухолей головного мозга 20–60%, глиобластома, медуллобластома, карцинома сосудистого сплетения	Саркома мягких тканей и костей, карцинома молочной железы, лейкемия, аденокарцинома, колоректальный рак
Синдром Фон Хиппеля – Линдау	<i>VHL</i>	80% аутосомно-доминантный, 20% de novo	80% гемангиобластома (мозжечок/ спинной мозг/ сетчатка)	Почечноклеточный рак, феохромоцитома, нейроэндокринные опухоли поджелудочной железы, опухоль эндолимфатического мешка, ретикулярная ангиома

Окончание таблицы 1.1

Синдром Туркота 1 тип	MMR гены*: <i>MLH1</i> , <i>PMS2</i> , <i>MSH2</i> , <i>MSH6</i> , <i>EPCAM</i>		3% глиобластома (гипермутированный фенотип)	колоректальный рак, эндометриальная аденокарцинома, карцинома желудка, яичников, тонкого кишечника, билиарного тракта, уротелиальная и/или поджелудочной железы
Синдром Туркота 2 тип	<i>APC</i>	85% аутосомно-доминантный, 15% de novo	Медуллобластома (WNT-активированная)	Колоректальный рак, рак желудка, 12ПК, билиарного тракта, гепатобластома, рак щитовидной железы
Синдром Горлина	<i>PTCH1</i> ; <i>SUFU</i>	75% аутосомно-доминантный, 25% de novo	5% медуллобластома (SHNактивированная), менингиома	Базальноклеточная карцинома, саркома
Туберозный склероз	<i>TSC1</i> ; <i>TSC2</i>	85% аутосомно-доминантный	10% субэпендимальная гигантоклеточная астроцитома	Ангиомиолипома почки, кардиальная рабдомиома
Меланома-астроцитома (семейная атипичная множественная меланома – FAMMM)	<i>CDKN2A</i> , <i>CDKN2B</i> , <i>P14/ARF</i>	аутосомно-доминантный	Астроцитома, плеоморфная ксанто-астроцитома, менингиома	Меланома, опухоли поджелудочной железы, опухоли нервной оболочки
Рак молочной железы (BRCA)	<i>BRCA-1</i> ; <i>BRCA-2</i>		Глиома	Рак молочной железы, яичников, простаты, поджелудочной железы
Синдром Каудена (синдром множественной гамартомы)	<i>PTEN</i>	50% аутосомно-доминантный, 50% de novo	Диспластическая ганглиоцитома мозжечка (Лермитта – Дюкло синдром)	Рак молочной железы, щитовидной железы, почечно-клеточный рак, колоректальный рак
DICER1 синдром (наследственная плевропульмональная бластома и синдром дисплазии)	<i>DICER1</i>	аутосомно-доминантный	Бластома эпифиза, бластома гипофиза	Плевропульмональная бластома, эмбриональная рабдомиосаркома, опухоль Вилмса, интраокулярная медуллоэпителиома
Синдром множественной нейроэндокринной неоплазии (тип 1) (Вермера синдром)	<i>MEN1</i>	аутосомно-доминантный	Аденома гипофиза, эпендимома	Аденомы околощитовидных желез, нейроэндокринные опухоли поджелудочной железы, карциноид (бронхиальный, дуоденальный, тимуса), аденокортикальные аденомы, гастроэнтерохромафинноподобные аденомы

Примечание: * – MMR гены – гены репарации неспаренных оснований

В настоящее время ионизирующее излучение считается единственным неоспоримым фактором риска развития первичных ОГМ (Lee E.Q., Schiff D., Wen P.Y., 2011; Braganza M.Z. et al., 2012). Никакое другое воздействие или сочетание факторов окружающей среды не доказано (Wrensch M. et al., 2002). Вопрос о возможной роли вирусных агентов в развитии первичных глиальных опухолей головного мозга по-прежнему остается актуальным ввиду противоречивости имеющихся данных (Lisyanyi N.I. et al., 2016).

Особый интерес представляла потенциальная связь между использованием мобильного телефона и риском развития первичной ОГМ. Несмотря на многочисленные крупные исследования, для ОГМ убедительной причинно-следственной связи с радиочастотными электромагнитными полями, включая использование сотового телефона, не установлено (Coble J.B., Dosemeci M., Stewart P.A. et al., 2009; Kheifets L., Ahlbom A., Crespi C.M. et al., 2010). Тем не менее совокупные данные свидетельствуют об очень незначительном повышенном риске глиомы при использовании мобильного телефона более 10 лет (Wang Y., Guo X., 2016; Carlberg M., Hardell L., 2017; Yang M., Guo W., Yang C. et al., 2017). В связи с этим в 2011 году радиочастотные электромагнитные поля были классифицированы ВОЗ и Международным агентством по изучению рака как «возможно канцерогенные для человека» (Baan R., Grosse Y., Lauby-Secretan A. et al., 2011), а в 2015 году переклассифицированы в «вероятно канцерогенные» (Morgan L.L., Miller A.B., Sasco A., Davis D.L., 2015).

Выживаемость значительно варьируется в зависимости от возраста пациента, типа опухоли и молекулярных особенностей (таблица 1.2). Прогностические факторы существенно различаются в зависимости от типа глиальной опухоли. Так, молодой возраст, низкая степень злокачественности опухоли и тотальная степень резекции опухоли являются благоприятными прогностическими фактором для большинства взрослых с первичными опухолями головного мозга. Тем не менее в настоящее время именно молекулярно-генетические особенности признаны наиболее точными прогностическими и

предиктивными маркерами по сравнению с гистологическими типами глиом в отдельности (таблица 1.2) (Hartmann C., Hentschel B., Wick W. et al., 2010; Eckel-Passow J.E., Lachance D.H., Molinaro A.M. et al., 2015; Reuss D.E., Mamatjan Y., Schrimpf D. et al. 2015; National Comprehensive Cancer Network. Central nervous system cancers (version 1. 2018) (NCCN, 2018) https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/cns.pdf).

Таблица 1.2 – Средний возраст на момент постановки диагноза, средняя выживаемость за 5 и 10 лет и основные прогностические биомаркеры некоторых первичных опухолей головного мозга у взрослых

Гистологический тип опухоли	Средний возраст на момент диагноза, лет	Частота выживаемости, %		Прогностические биомаркеры	
		5-летняя	10-летняя	благоприятный прогноз	неблагоприятный прогноз
Пилоцитарная астроцитома (ВОЗ I)	12	94%	>90%	BRAF-KIAA1549 fusion	-
Олигодендроглиома (ВОЗ II)	43	81%	65%	мутация в <i>IDH1/2</i> , 1p/19q ко-делеция	-
Диффузная астроцитома (ВОЗ II)	48	50%	40%	мутация в <i>IDH1/2</i>	-
Анапластическая олигодендроглиома (ВОЗ III)	50	57%	43%	мутация в <i>IDH1/2</i> , 1p/19q ко-делеция	-
Анапластическая астроцитома (ВОЗ III)	53	30%	20%	мутация в <i>IDH1/2</i> , метилирование <i>MGMT</i>	-
Глиобластома (ВОЗ IV)	64	5,5%	Казуистика	мутация в <i>IDH1/2</i> , метилирование <i>MGMT</i>	Мутация K27M в <i>H3F3A</i>
Эпендимома (ВОЗ I–III)	45	83%	~80%	-	<i>RELA</i> -fusion, наличие плеча 1q хромосомы

Клинические, диагностические и хирургические особенности лечения глиальных опухолей

У пациентов с первичными опухолями головного мозга имеет место как очаговая, так общемозговая симптоматика. Часты нарушения электрогенеза головного мозга, проявляющиеся различными вариантами эпилепсий. В зависимости от скорости роста и локализации опухоли симптомы могут

беспокоить как в течение нескольких дней и недель, так и месяцев или лет. Кроме того, опухоли ЦНС могут быть случайно обнаружены при проведении нейровизуализационных исследований, выполненных по совершенно иным диагностическим поводам, а также явиться находкой при патологоанатомическом или судебно-медицинском исследовании (Rossetti A.O., Stupp R., 2010; Giulioni M., Marucci G., Martinoni M. et al., 2014; Kirby S., Purdy R.A., 2014).

У пациента с подозрением на ОГМ использование МРТ с гадолинием является золотым стандартом исследования. Тем не менее мультимодальные МРТ-исследования, такие как диффузионно-взвешенная визуализация, диффузионно-тензорная визуализация, МР-перфузия и МР-спектроскопия, дополняют характеристики сосудистой сети и метаболизма опухоли и, соответственно, имеют более высокие диагностические характеристики в дифференциальной диагностике опухолевых и неопухолевых процессов, включая биохимические и структурные изменения от лечения (Bangiyev L., Camilla M., Espagnet R. et al., 2014; Mabray M.C., Barajas R.F., Cha S., 2015; Brindle K.M. et al., 2017; NCCN, 2018).

В послеоперационном периоде контрольную контрастную МРТ следует проводить всем больным в течение первых 72 часов после операции для определения степени резекции (NCCN, 2018).

Степень циторедукции в условиях общей анестезии в значительной степени зависит от локализации опухоли, опыта хирурга, использования предоперационных методов картирования функционально значимых зон и интраоперационных методов нейрофизиологического мониторинга (Aldave G., Tejada S., Pay E. et al., 2013; Ferraro N., Barbarite E., Albert T.R. et al., 2016; Rao G., 2017).

При опухолях, примыкающих к функционально значимым областям головного мозга, максимально безопасное ее удаление может быть достигнуто с использованием таких методов предоперационной нейровизуализации, как функциональная МРТ (Berntsen E.M., Gulati S., Solheim O. et al., 2010; Brindle

K.M., Izquierdo-Garcia J.L., Lewis D.Y. et al., 2017) и диффузно-тензорная визуализация (Brindle K.M., Izquierdo-Garcia J.L., Lewis D.Y. et al., 2017; Abhinav K. et al., 2015). С помощью данных методов возможно точно локализовать функциональные области коры и ассоциативные пути, соответственно. Несмотря на это, в настоящее время золотым стандартом остается операция в состоянии бодрствования с интраоперационным мониторингом с помощью кортикального би- или монополярного электрода (Hervey-Jumper S.L., Berger M.S., 2016).

Вопросы классификации нейроэктодермальных опухолей

Опухоли головного мозга стратифицируются в соответствии с системой классификации опухолей ЦНС ВОЗ (Louis D.N., Ohgaki H., Wiestler O.D. C.W., 2016). До недавнего времени идентификация первичных опухолей ЦНС была основана на гистологических критериях, в зависимости от которых опухоли присуждалась степень злокачественности от GI до GIV.

В 2016 году классификация опухолей ЦНС от 2007 года была пересмотрена с целью включения характерных молекулярно-генетических маркеров. Актуальная классификация является комбинированной (фенотипической и генотипической), что требует выставления интегрированного диагноза, где за гистологическим названием следуют генетические признаки (например, глиобластома, отсутствие мутации в генах *IDH1/2*). В случае дискордантных результатов гистологического описания и молекулярно-генетических маркеров, генотип считается более информативным, чем гистологический фенотип (Мацко Д.Е., Мацко М.В., Имянитов Е.Н., 2017; Louis D.N., Ohgaki H., Wiestler O.D. C.W., 2016). Таким образом, использование молекулярных параметров повышает объективность диагноза и, вероятно, приведет к более точному определению прогноза и реакции на лечение (Мацко М.В., Лучин Е.И., Иевлева А.Г., 2011; Мацко М.В., Мацко Д.Е., Моисеенко В.М., 2016).

До обновления классификации ВОЗ 2016 года все астроцитарные опухоли были сгруппированы вместе. По состоянию на 2016 г. глиомы разделили на

отграниченные глиомы (GI ВОЗ) и диффузно инфильтрирующие глиомы (G II–IV ВОЗ), будь то астроцитарная или олигодендроглиальная дифференцировка, в зависимости от локализации их роста, наличия или отсутствия мутации *IDH*, ко-делеции 1p/19q, мутации K27M в гене *H3F3A*.

Отграниченные глиомы представляют собой доброкачественные опухоли с хорошим прогнозом при полном удалении. Описанные глиомы не имеют мутации в генах *IDH1/2*, но часто имеют мутации в гене *BRAF* (например, пилоцитарная астроцитома, плеоморфная ксантоастроцитома) (Louis D.N., Ohgaki H., Wiestler O.D. C.W., 2016).

Диффузные глиомы никогда не излечиваются операцией, классифицируются согласно диагностическим морфологическим и молекулярным маркерам: диффузные астроцитомы GII (низкой степени злокачественности) имеют только ядерную атипию, GIII (анапластические) демонстрируют повышенную митотическую активность, GIV (глиобластомы) характеризуются дополнительной микрососудистой пролиферацией и/или некрозом.

В классификации 2016 года глиомы II–III степени злокачественности далее делятся на три диагностические и прогностические подгруппы в зависимости от их статуса *IDH*, *ATRX* и 1p/19q (таблица 1.3) (Eckel-Passow J.E., Lachance D.H., Molinaro A.M. et al., 2015; Batista R., Cruvinel-Carlioni A., Vinagre J. et al., 2016).

Большинство глиом GII–GIII степени имеют ключевую драйверную мутацию в генах *IDH1/2* и характерные мутации в *TP53* и *ATRX* (Louis D.N., Ohgaki H., Wiestler O.D. C.W., 2016). Такие глиомы называются диффузной астроцитомой, *IDH*-мутантный тип. Для глиом GII–GIII степени, имеющих мутацию *IDH1*, но не мутацию в *ATRX*, требуется оценка состояния 1p/19q, чтобы отличить астроцитому от олигодендроглиомы (Labussière M., Di Stefano A.L., Gleize V. et al., 2014; Louis D.N., Ohgaki H., Wiestler O.D. C.W., 2016).

Несмотря на тот факт, что некоторые обсервационные исследования показали многообещающую роль мутации промотора *TERT* в прогнозировании клинического исхода глиом GII–GIII степени с одинаковым статусом *IDH* и среди глиобластом независимо от их статуса *IDH*, его прогностическое значение

остается спорным (Labussière M., Di Stefano A.L., Gleize V. et al., 2014; Chan AK-Y., Yao Y., Zhang Z. et al., 2015; Simon M., Hosen I., Gousias K. et al., 2015; Weller M., Van Den Bent M., Tonn J.C. et al., 2017; Gia Vuong H., Altibi A.M., Duong U.N. et al., 2018; NCCN, 2018).

Таблица 1.3 – Упрощенная классификация ВОЗ 2016 года некоторых нейроэпителиальных опухолей ЦНС

Другие астроцитарные опухоли	Эпендимальные опухоли
ВОЗ GI Пилоцитарная астроцитома ВОЗ G II Плеоморфная ксантоастроцитома ВОЗ GIII Анапластическая плеоморфная ксантоастроцитома	ВОЗ GI Субэпендимомы Миксопапиллярная эпендимомы ВОЗ GII Эпендимомы Эпендимомы, с химерой <i>RELA</i> (<i>RELA</i> fusion-positive) ВОЗ GII или GIII Эпендимомы, с химерой <i>RELA</i> (<i>RELA</i> fusion-positive) ВОЗ GIII Анапластическая эпендимомы
Диффузные астроцитарные и олигодендроглиальные опухоли	Нейрональные и смешанные нейронально-глиальные опухоли
ВОЗ GII Диффузная астроцитома, IDH-мутантный тип Диффузная астроцитома, IDH-дикий тип Диффузная астроцитома, БДУ Олигодендроглиомы, IDH-мутантный тип и делецией 1p/19q Олигодендроглиомы, БДУ ВОЗ G III (анапластические) Анапластическая астроцитома, IDH-мутантный тип Анапластическая астроцитома, IDH-дикий тип Анапластическая астроцитома, БДУ Анапластическая олигодендроглиомы, мутантный тип и ко-делецией 1p/19q Анапластическая олигодендроглиомы, БДУ ВОЗ GIV Глиобластома, IDH-дикий тип Глиобластома, IDH-мутантный тип Глиобластома, БДУ Диффузная глиомы средней линии, K27M в гене H3F3A (H3)-мутантный тип	ВОЗ GI Диффузная лептоменингеальная глионевральная опухоль Дизэмбриопластическая нейроэпителиальная опухоль Ганглиоглиомы Ганглиоцитомы Диспластическая ганглиоцитомы мозжечка (болезнь Лермитта – Дюкло) ВОЗ GIII Анапластическая ганглиоглиомы Современная классификация ВОЗ 2016 года отдельных видов опухолей из нейроэпителиальной ткани. Стоит отметить, что из классификации удалены следующие состояния: церебральный глиоматоз и варианты протоплазматической и фибриллярной астроцитомы, вариант клеточной эпендимомы. В настоящее время церебральный глиоматоз считается клинико-радиологическим паттерном, встречающимся при любой диффузной глиоме.

Значимые молекулярные маркеры в прогнозе и диагностике глиальных опухолей

Фермент изоцитратдегидрогеназа – гетерополимер, открытый D. Parsons в 2008 году, является катализатором реакции превращения изолимонной кислоты в альфа-кетоглутаровую с восстановлением НАД (Parsons D.W., Jones S., Zhang X., 2008). Работами L. Dang et al. в 2009 году уточнено, что при возникновении мутации в гене *IDH1* изменяется ферментативная активность последнего в третьей реакции цикла трикарбоновых кислот с накоплением в клетках канцерогенного метаболита – 2-гидроксиглутаровой кислоты. В дальнейшей цепи событий происходит эпигенетическая дизрегуляция с метилированием гистонов и генов, тем самым обеспечивая бесконтрольный онкогенез (Dang L., White D.W., Gross S., 2009).

Для нейроэпителиальных опухолей наиболее важными являются гены *IDH1* и *IDH2*. В настоящее время роль мутаций этих генов только прогностическая (Turcan S., Rohle D., Goenka A., 2012). Мутации *IDH1/2* не встречаются в опухолях за пределами ЦНС. Мутации *IDH1/2* чаще встречаются при глиомах более низкой степени злокачественности (более 70% астроцитом II–III ВОЗ, 80–100% олигодендроглиом). Данная мутация практически не выявляется при первичной глиобластоме (Мацко Д.Е., Мацко М.В., Имянитов Е.Н., 2017; Amelot A., De Cremoux P., Quillien V., 2015; Sarmiento J.M., Mukherjee D., Black K.L., 2016), а при вторичной глиобластоме показатель встречаемости может достигать 60–80% (Van Den Bent M.J., Brandes A.A., Taphoorn M.J.B. et al., 2013; Chan AK-Y., Yao Y., Zhang Z. et al., 2015). Диффузные глиомы, включая вторичную глиобластому с мутациями *IDH1/2*, имеют лучший прогноз, чем диффузные глиомы без них (Wick W., Hartmann C., Engel C. et al., 2009; Louis D.N., Ohgaki H., Wiestler O.D. C.W., 2016).

Ко-делеция 1p/19q является результатом несбалансированной центромерной транслокации t (1:19) (q10: p10) (Wesseling P., Van Den Bent M., Perry A., 2015). С выходом новой классификации ОГМ ВОЗ 2016 диагноз олигодендроглиомы может быть подтвержден в случае сочетания ко-делеции 1p/19q и мутации *IDH*

(олигодендроглиома, *IDH*-мутантный тип и ко-делеция 1p/19q) (Labussière M., Di Stefano A.L., Gleize V. et al., 2014; Louis D.N., Perry A., Reifenberger G. et al., 2016).

Сочетанная делеция 1p/19q у больных с анапластической олигодендроглиомой достигает 61–86%, реже встречается в олигодендроглиомах GII. По данным некоторых авторов ко-делеция 1p/19q в 25% наблюдений может отмечаться и при пилоцитарной астроцитоме (Mellai M., Monzeglio O., Piazzzi A., 2012; Suh J.H., Park C.K., Park S.H., 2013; Sim J., Nam D.H., Kim Y., 2018).

Исследованиями D. Ricard et al. (2007) показана роль этой аберрации для продолженного роста диффузной глиомы GII: при отсутствии данной аберрации опухоль растет практически в два раза быстрее. Таким образом, ко-делеция 1p/19q рассматривается как диагностический, так и как маркер благоприятного прогноза среди диффузных глиом и свидетельствует о предстоящем повышенном ответе на алкилирующую химиотерапию (Jenkins R.B., Blair H., Ballman K.V. et al., 2006; Weller M., Stupp R., Hegi M.E. et al., 2012; Van Den Bent M.J., Brandes A.A., Taphoorn M.J.B. et al., 2013; Wesseling P., Van Den Bent M., Perry A., 2015; Louis D.N., Ohgaki H., Wiestler O.D. C.W., 2016; Wick W., Roth P. et al., 2016).

Мутации в генах, кодирующих белки гистонов H3.3 (*H3F3A*) или H3.1 (*HIST1H3B*), приводящие к замене лизина на метионин в 27 аминокислоте (Lys27Met или K27M) (Khuong-Quang D.A., Buczkowicz P., Rakopoulos P. et al., 2012; Schwartzentruber J., Korshunov A., Liu X.-Y. et al., 2012; Wu G., Broniscer A., McEachron T.A. et al., 2012), объясняют сущность патогенеза диффузной глиомы, H3 Lys27Met – мутантный тип, ВОЗ G IV (Louis D.N., Perry A., Reifenberger G. et al., 2016). Мутация Lys27Met является взаимоисключающей с мутацией *IDH*, и как было предположено, ее присутствие характерно для ранних стадий нейроонкогенеза (Fontebasso A.M., Liu X.-Y., Sturm D., Jabado N., 2012; Bender S., Tang Y., Lindroth A.M. et al., 2013; Chan K., Fang D., Gan H. et al., 2013). У молодых людей эти опухоли обычно возникают в таламусе или спинном мозге (Castel D., Philippe C., Calmon R. et al., 2015; Ferris S.P. et al., 2017).

Среди всех диффузных глиом, как, в частности, и среди диффузных глиом средней линии, опухоли с мутацией Lys27Met имеют наихудший прогноз

(2-летняя выживаемость менее 10%). Им присваивается GIV злокачественности ВОЗ, даже если их гистологическая картина соответствует низкой степени или анапластической (Louis D.N., Ohgaki H., Wiestler O.D. C.W., 2016). Было показано, что пациенты с диффузными глиомами средней линии с *H3F3A* мутантным типом (мутация H3.3) имели худший прогноз, чем те, которые имели мутацию *HIST1H3B* (Castel D., Philippe C., Calmon R. et al., 2015). Безусловно, необходимы дополнительные исследования, чтобы подтвердить эти данные.

Таким образом, при диффузной глиоме IDH-wt тип, локализующейся в срединных структурах ЦНС, обязательно должна оцениваться мутация Lys27Met *H3F3A* методом иммуногистохимии или секвенирования.

O⁶-метилгуанин-ДНК-метилтрансфераза (MGMT) представляет собой белок, участвующий в репарации ДНК повреждений, вызванных алкилирующими агентами, такими как темозоломид.

Метилирование промотора гена *MGMT* тормозит транскрипционную активность гена, что часто отмечается при глиобластомах (30–50% первичных глиобластомах IDH-wt) и при олигодендроглиомах (>90%), реже встречается при астроцитомах низкой степени злокачественности (Zawlik I. et al., 2009; Louis D.N., Perry A., Reifenberger G. et al., 2016). Наличие метилирования *MGMT* дает благоприятный прогноз при анапластических астроцитомах (Wick W., Hartmann C., Engel C. et al., 2009; Weller M., Stupp R., Hegi M.E. et al., 2012). Метилирование промотора *MGMT* является предиктором эффективности алкилирующей химиотерапии у пациентов с глиобластомой, увеличивая общую продолжительность жизни, включая пациентов пожилого возраста (Stupp R. et al., 2005; Criniere E., Kaloshi G., Laigle-Donadey F., 2007; Dunn J. Baborie A., Alam F., 2009; Christmann M., Nagel G., Horn S., 2010; Rossetti A.O., Stupp R., 2010; Louis D.N., Ohgaki H., Wiestler O.D. C.W., 2016).

BRAF является протеинкиназой, регулирующей клеточный сигнальный путь RAS-RAF-MEK-ERK. Изменения *BRAF*, такие как мутация V600E или слияние KIAA1549-BRAF, активируют этот путь и в конечном итоге приводят к росту опухоли (Hawkins C., Walker E., Mohamed N. et al., 2011). Наличие слияния

KIAA1549-BRAF характерно для пилоцитарных астроцитом и обнаруживается примерно в 75% случаев, а также является предиктором благоприятного течения (Hawkins C., Walker E., Mohamed N. et al., 2011; Park S.-H., Won J., Kim S.-I. et al., 2017; Sturm D., Pfister S.M. et al., 2017). Данная мутация обнаруживается примерно в половине случаев вторичных глиобластом, не имеющих мутаций *IDH* (Ferris S.P., Hofmann J.W., Solomon D.A., Perry A., 2017; Park S.-H., Won J., Kim S.-I. et al., 2017). Роль мутации V600E в гене *BRAF* в процессе злокачественной трансформации диффузной астроцитомы GII во вторичную глиобластому четко не определена, клиническая роль данной мутации не выявила преимуществ в продолжительности жизни при исследованиях эффективности бевацизумаба совместно с темозоломидом (Kanamori M., Suzuki H., Takei H., 2016; Bent van den M.J., Klein M., Smits M., 2018).

Образование химеры из генов *C11ORF95* и *RELA* обнаруживается более чем в 70% супратенториальных эпендимом и является предиктором плохого прогноза, так как оно активирует путь NFkB, что приводит к неконтролируемому росту опухоли (Pajtler K.W., Mack S.C., Ramaswamy V. et al., 2017).

Особенности ведения пациентов с конкретными видами опухолей головного мозга

Пилоцитарная астроцитома (GI)

Пилоцитарные астроцитомы являются наиболее распространенными неинфильтративными глиомами низкой степени злокачественности. Они, как правило, возникают главным образом в мозжечке, спинном мозге и зрительных путях, причем последние особенно часто встречаются у пациентов с нейрофиброматозом типа 1. Пилоцитарные астроцитомы, по-видимому, представляют собой так называемое заболевание одного патологического процесса; при этом на сегодняшний день выявлены только изменения в клеточном сигнальном пути RAS-RAF-MEK-ERK. Прогноз в целом крайне благоприятный, хотя выживаемость значительно снижается с увеличением возраста и низкой степенью резекции опухоли (Louis D.N., Perry A., Reifenberger G. et al., 2016; Ferris S.P., Hofmann J.W., Solomon D.A., Perry A., 2017; Ostrom Q.T., Gittleman H.,

Liao P. et al., 2017). Тотальное удаление является стандартом медицинской помощи при пилоцитарных астроцитомах и прямо коррелирует с наиболее благоприятным прогнозом. Так, общая выживаемость за 10 лет достигает 100%, по сравнению с 74% у тех пациентов, кому была выполнена субтотальная резекция.

Поэтому в случае субтотальной резекции рекомендуется регулярное наблюдение (Forsyth P.A., Shaw E.G., Scheithauer B.W. et al., 1993; Brown P.D., Buckner J.C., O'Fallon J.R. et al., 2004; Bornhorst M., Frappaz D., Packer R.J., 2016; Louis D.N., Perry A., Reifenberger G. et al., 2016). Роль предварительной адъювантной химиотерапии или лучевой терапии субтотально резецированной пилоцитарной астроцитомы является предметом споров в настоящий момент (Burkhard C., Di Patre P.-L., Schüller D. et al., 2003; Brown P.D., Buckner J.C., O'Fallon J.R. et al., 2004; Kidd E.A. et al., 2006; Johnson D.R. et al., 2012).

Диффузные глиомы низкой степени злокачественности (GII)

Диффузные глиомы низкой степени злокачественности включают диффузные астроцитомы ВОЗ GII и олигодендроглиомы. Ранняя и максимальная безопасная резекция является стартовой терапией для пациентов с такой патологией (Jakola A.S., Skjulsvik A.J., Myrnes K.S. et al., 2017; Weller M., Van Den Bent M., Tonn J.C. et al., 2017; NCCN, 2018).

Послеоперационное ведение основывается на стратификации риска. Необходимо указать, что понятие «глиома низкого риска» и «глиома высокого риска» сильно варьируется в литературе (Gorlia T., Wu W., Wang M. et al., 2013). Согласно обновленной классификации ВОЗ 2016 года, глиомы низкой степени злокачественности разделяют на три диагностические и прогностические подгруппы в зависимости от наличия/отсутствия мутации IDH1/2 и делеции 1p/19q (Buckner J., Giannini C., Eckel-Passow J. et al., 2017).

Опухоли IDH-мутантного типа и с ко-делецией 1p/19q (которые соответствуют олигодендроглиомам) имеют лучший прогноз, после чего следует IDH-мутантный тип, 1p/19q интактные опухоли, далее следуют опухоли IDH-дикого типа. Низкий риск при глиоме низкой степени злокачественности

подразумевает, что это пациент моложе 40 лет, у которого отсутствуют очаговые и общие неврологические симптомы, кому была выполнена тотальная резекция опухоли IDH-мутантного типа +/- ко-делеция 1p/19q.

У таких пациентов тактика наблюдения включает в себя проведение МРТ каждые 3–6 месяцев (Weller M., Van Den Bent M., Tonn J.C. et al., 2017; NCCN, 2018).

Анализ долгосрочных данных исследования EORTC 22845 Европейской организации по изучению и лечению рака показал эквивалентную общую выживаемость при немедленной лучевой терапии против отсроченной лучевой терапии, выполненной при диагностировании прогрессии заболевания. Тем не менее, стоит отметить, что немедленная лучевая терапия значительно увеличивает выживаемость без прогрессирования до 2 лет (Van Den Bent M.J., Afra D., de Witte O. et al., 2005).

Высокий риск при глиоме низкой степени злокачественности подразумевает, что это пациент старше 40 лет, у которого присутствуют очаговые и общие неврологические симптомы, опухоль более 5 см в диаметре, или кому была выполнена субтотальная резекция. Эти параметры основаны на стратификации риска в исследованиях 3 фазы EORTC 22033/26033/84 и RTOG 9802 (Daniels T.B., Brown P.D., Felten S.J. et al., 2011; Buckner J.C., Shaw E.G., Pugh S.L. et al., 2016).

Глиомы IDH-wt низкой степени злокачественности в настоящее время рассматриваются как опухоли высокого риска, так как обычно они имеют общие молекулярные особенности и аналогичное клиническое течение, схожее с глиобластомой IDH-wt. Таким образом, лечение астроцитомы IDH-wt проводится как лечение глиобластомы, хотя ни в одном из исследований не проводилась конкретная оценка этой подгруппы (Louis D.N., Ohgaki H., Wiestler O.D. C.W., 2016; Louis D.N., Perry A., Reifenberger G. et al., 2016).

Актуальным стандартом послеоперационного лечения высокого риска глиом IDH-мутантного типа низкой степени злокачественности является фокальная лучевая терапия до 50–54 Gy с последующими 6 циклами адъювантной

химиотерапии прокарбазин-ломустин и винкристина (PCV) (Karim A.B.M.F., Maat B., Hiitlevoll R. et al., 1996; Shaw E., Arusell R., Scheithauer B. et al., 2002; NCCN, 2018). Данные рекомендации базируются на основе недавно опубликованных долгосрочных данных исследования фазы 3 RTOG 9802 (Buckner J.C., Shaw E.G., Pugh S.L. et al., 2016). В этом исследовании сравнивали стандартную лучевую терапию с режимом стандартной лучевой терапии, после которой следовали 6 циклов адъювантной химиотерапии PCV (глиома низкой степени злокачественности высокого риска: пациенты младше 40 лет с субтотальной резекцией или пациенты старше 40 лет). Было продемонстрировано увеличение выживаемости без прогрессирования заболевания и общей выживаемости после комбинированного лечения: медиана выживаемости без прогрессирования заболевания увеличилась с 4,0 до 10,4 года, а общая выживаемость возросла с 7,8 до 13,3 года (отношение шансов 0,59; $p=0,003$) (Buckner J.C., Shaw E.G., Pugh S.L. et al., 2016). Результаты этого исследования также показали, что немедленное послеоперационное лечение, включающее лучевую терапию и химиотерапию PCV, превосходит режим, когда имеет место изначально радиотерапия, а режим химиотерапии PCV назначают при прогрессии заболевания. Однако в современной практике PCV часто заменяют одним ломустинном ввиду меньшего количества токсических эффектов и мнения, что винкристин не проходит через гематоэнцефалический барьер, а прокарбазин имеет очень ограниченную эффективность. Более того, в реальной клинической практике вместо PCV часто используется темозоломид, как наиболее хорошо переносимый алкилирующий агент (Weller M., Van Den Bent M., Tonn J.C. et al., 2017).

Со временем признание того факта, что анапластические олигодендроглиомы являются химиочувствительными, в сочетании с надеждой, что можно избежать когнитивных нарушений после лучевой терапии, породило дополнительный интерес к изучению отдельных режимов химиотерапии у пациентов с глиомами высокого риска низкой степени злокачественности, в частности олигодендроглиомами (Cairncross G., Wang M., Shaw E. et al., 2012; Van

Den Bent M.J., Brandes A.A., Taphoorn M.J.B. et al., 2013; Wick W., Roth P., Hartmann C. et al., 2016; NCCN, 2018).

Стоит отметить, что режим химиотерапии формально еще не сравнивался с режимом химиорадиотерапии при глиоме низкой степени злокачественности. Однако совсем недавно были опубликованы интересные данные – первые результаты исследования фазы 3 EORTC 22033/26033, где сравнивали различные дозы темозоломида с лучевой терапией при глиоме высокого риска низкой степени злокачественности (определяемой как один из критериев: возраст >40 лет, прогрессия заболевания, опухоль >5 см или пересекающая среднюю линию, либо клинически грубые неврологические симптомы). Удивительно, но не было получено различий в выживаемости без прогрессирования между группами лечения, и особенно среди пациентов с глиомой с ко-делецией 1p/19q низкой степени злокачественности (Baumert B.G., Hegi M.E., Van Den Bent M.J. et al., 2016). Тем не менее необходим долгосрочный анализ для установления влияния на общую выживаемость.

Диффузные глиомы высокой степени злокачественности (GIII)

Диффузные глиомы высокой степени злокачественности включают анапластические астроцитомы GIII ВОЗ и анапластические олигодендроглиомы. Стандарт оказания медицинской помощи пациентам с глиомами высокой степени злокачественности – максимально безопасная хирургическая резекция с последующей химиорадиотерапией, основанная на отдаленных результатах трех исследований III фазы и первых результатах исследования CATNON 88 (Cairncross G., Wang M., Shaw E. et al., 2012; Van Den Bent M.J., Brandes A.A., Taphoorn M.J.B. et al., 2013; Wick W., Roth P., Hartmann C. et al., 2016).

Химиорадиотерапия включает в себя лучевую терапию до 60 Gy с проведением последующих 6 циклов адъювантной химиотерапии PCV либо с одновременной и адъювантной терапией темозоломидом. Промежуточный анализ исследования CATNON, опубликованный в 2017 году, показал, что при анапластических астроцитомах с интактным статусом 1p/19q (для исключения

олигодендроглиом) добавление 12 циклов темозоломида к лучевой терапии по сравнению с одной радиотерапией улучшает показатели выживаемости: выживаемость без прогрессирования заболевания 3,6 лет против 1,5 лет; медиана общей выживаемости еще не рассчитана против 3,4 лет; отношение шансов 0,65, 95% ДИ 0,45–0,93).

В настоящее время в исследовании CODEL изучается, может ли темозоломид заменить PCV при анапластической олигодендроглиоме с ко-делецией 1p/19. В частности, сравнивают лучевую терапию, сопровождаемую PCV, с лучевой терапией с одновременной и адъювантной химиотерапией темозоломидом. Кроме того, сегодня исследуется вопрос о том, можно ли отложить лучевую терапию для предотвращения нейротоксичности, индуцированной радиотерапией, в этих химиочувствительных опухолях (ко-делеция 1p/19q). Так, в исследовании POLCA сравнивают послеоперационную лучевую терапию плюс PCV против PCV плюс отложенная лучевая терапия при прогрессии.

Глиобластома (GIV)

Из всех первичных опухолей головного мозга у взрослых глиобластома сопровождается самой большой летальностью. Так, большинство пациентов не доживают до года, и примерно 5% пациентов доживают до 5 лет. В настоящий момент в двух исследованиях III фазы сообщается об улучшении этого прогноза при проведении только лучевой терапии (Stupp R., Mason W.P., Van Den Bent M.J. et al., 2005; Stupp R., Taillibert S., Kanner A.A. et al., 2015; Ostrom Q.T., Gittleman H., Liao P. et al., 2017). У пациентов с хорошим неврологическим статусом (по шкале Карновского ≥ 60) лучевая терапия до 60 Gy в течение 6 недель с одновременным ежедневным приемом темозоломида, за которым следуют как минимум 6 циклов адъювантного темозоломида (5 дней в течение 21 дневного цикла), является стандартом лечения с 2005 года (по сравнению с только лучевой терапией: отношение шансов 0,63, 95% ДИ 0,52–0,75; $p < 0,001$) (Stupp R., Mason W.P., Van Den Bent M.J. et al., 2005). Применение адъювантной

терапии темозоломидом в течение 6 циклов, по-видимому, не продлевает общую выживаемость и увеличивает частоту токсичных эффектов, связанных с лечением. Стоит отметить, что эти данные были взяты из ретроспективного анализа четырех рандомизированных исследований (Blumenthal D.T., Gorlia T., Gilbert M.R. et al., 2017).

В 2015 году промежуточный анализ исследования III фазы показал существенное увеличение общей выживаемости при добавлении к адъювантной терапии темозоломидом терапии переменным электрическим током с минимальным увеличением частоты токсичных эффектов (Stupp R., Taillibert S., Kanner A.A. et al., 2015). В этом исследовании 695 пациентов были случайным образом распределены (2:1) для получения комбинированной терапии электрическим током и темозоломидом и только темозоломидом. В декабре 2017 года окончательный анализ показал, что добавление терапии электрическим током увеличивало медиану общей выживаемости примерно на 5 месяцев, от 16 до 20,9 месяцев (ОШ 0,63, 95% ДИ 0,533 0,76; $p < 0,001$), и увеличило 5-летнюю выживаемость в 2,5 раза, с 5% до 13%. Важно, что во всех подгруппах пациентов был отмечен эффект от лечения электрическим током, независимо от возраста, пола, балла по шкале Карновского, статуса MGMTp или степени резекции (Stupp R., Taillibert S., Kanner A.A. et al., 2017). В настоящее время устройство для терапии электрическим током одобрено в Европе, Израиле, Японии, Австралии и США. Кроме того, в последних актуальных клинических рекомендациях NCCN 2018 года для терапии электрическим током указан уровень доказанности 1 (NCCN, 2018).

У пациентов с глиобластомой в возрасте старше 70 лет, для которых не рассматривается проведение традиционного 6-недельного режима лучевой терапии, низкофракционированная радиотерапия в течение 3-недельного курса с одновременным и адъювантным приемом темозоломида, как недавно было показано, превосходит терапию только низкофракционированной радиотерапией (9,3 против 7,6 месяцев; $p < 0,001$) и позволяет сократить время лечения без снижения качества жизни (Perry J.R., Laperriere N., O'Callaghan C.J. et al., 2017).

Другие опции лечения для пациентов с метилированием MGMTp включают либо только низкофракционированную радиотерапию, либо только терапию темозоломидом (Roa W., Brasher P.M.A., Bauman G. et al., 2004; Malmström A., Grønberg B.H., Marosi C. et al., 2012; Wick W., Platten M., Meisner C. et al., 2012).

Ведение пациентов при рецидиве

Рецидив пилоцитарной астроцитомы без изменения степени анаплазии может случиться и спустя 25 лет после операции, особенно при субтотальной резекции. В свою очередь большинство диффузных глиом низкой степени злокачественности и почти все глиомы высокой степени злокачественности со временем будут рецидивировать и сопровождаются изменением степени на более высокую (Bornhorst M., Frappaz D., Packer R.J., 2016; NCCN, 2018).

Отсутствие положительных результатов исследований III фазы и доказательств уровня 1 в клинических руководствах по ведению пациентов с прогрессией заболевания или рецидивом приводит к тому, что в реальной клинической практике используются все известные варианты лечения по отдельности или в комбинации, а участие пациентов в клинических испытаниях только активно приветствуется. Нет единого мнения относительно наиболее подходящей терапии и в руководствах EANO и NCCN (Weller M., Van Den Bent M., Tonn J.C. et al., 2017; NCCN, 2018; Rudà R., Reifenberger G., Frappaz D. et al., 2018). В качестве основы для выбора терапии могут служить определенные мутации и молекулярные изменения, для которых разработана и одобрена таргетная терапия (NCCN, 2018). Как правило, максимально безопасная повторная операция является методом выбора для всех рецидивирующих опухолей, когда это возможно. Наиболее часто используемая системная химиотерапия при прогрессирующих или рецидивирующих диффузных глиомах (BO3 GII-GIII-GIV) включает в себя повторную терапию темозоломидом (Van Den Bent M.J., Keime-Guibert F., Brandes A.A. et al., 2001; Van Den Bent M.J., Taphoorn M.J.B., Brandes A.A. et al., 2003; Perry J.R., Be K., Mason W.P. et al., 2010; Van Den Bent M.J., Chinot O., Boogerd W. et al., 2003), препараты нитрозомочевины (Wick W., Puduvalli V.K., Chamberlain M.C. et al., 2010), схему

PCV (Van Den Bent M.J., Erdem-Eraslan L., Idbaih A. et al., 2013; Brandes A.A., Tosoni A., Vastola F. et al., 2004; Triebels V.H.J.M., Taphoorn M.J.B., Brandes A.A. et al., 2004) и режимы с препаратами платины (Brandes A.A., Basso U., Vastola F. et al., 2003). В случае рецидива глиомы низкой степени злокачественности, когда первоначальное лечение было представлено только химиотерапией, предпочтительно проведение повторной химиотерапии в сочетании с лучевой терапией. Стоит отметить, что на настоящий момент не доказана положительная роль бевацизумаба в лечении рецидивирующей глиомы низкой степени злокачественности (Van Den Bent M.J., Klein M., Smits M. et al., 2017). При рецидивирующих глиомах высокой степени злокачественности и глиобластомах дополнительные опции лечения включают имплантационные пластины с кармустином (Valtonen S., Timonen U., Toivanen P. et al., 1997; Westphal M., Hilt D.C., Bortey E. et al., 2003), химиотерапию иринотеканом (Chamberlain M.C., Wei-Tsao D.D., Blumenthal D.T., Glantz M.J., 2008) или этопозидом (Fulton D., Urtasun R., Forsyth P., 1996), бевацизумабом, терапией электрическим током и др.

Бевацизумаб получил ускоренное одобрение Управления по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) в 2009 году на основе результатов двух исследований II фазы, показавших снижение перитуморального отека, снижение частоты и дозы использования кортикостероидов, а также значительное увеличение выживаемости без прогрессирования, но без улучшения общей выживаемости (Friedman H.S., Prados M.D., Wen P.Y. et al., 2009; Kreisl T.N., Kim L., Moore K. et al., 2009). В 2017 году III фаза исследования EORTC 26101110 показала увеличение выживаемости без прогрессирования, но не общей выживаемости, от начала добавления бевацизумаба к терапии ломустином по сравнению с только ломустином (выживаемость без прогрессирования 4,2 против 1,5 месяцев), что привело к полному одобрению FDA. В 2011 году FDA также одобрило терапию электрическим током для лечения опухолей на основе результатов рандомизированного исследования с выживаемостью, аналогичной другим

химиотерапиям, но с меньшей миелотоксичностью и улучшенным качеством жизни (Stupp R., Wong E.T., Kanner A.A. et al., 2012).

Исследования послеоперационного ведения пациентов с диффузными глиомами

Актуальные завершившиеся и текущие исследования – EORTC 22844, NCCTG/RTOG/ECOG, EORTC 22845, RTOG 9802, EORTC 22033-26033, RTOG 9402, EORTC 26951, NOA-04, CATNON (NCT00626990) (2017 промежуточный анализ), EORTC 22981-26981/NCIC CE.3, RTOG/EORTC/NCCTG, RTOG 0825, AVAGlio, EORTC 26071-22072 (CENTRIC), ACT IV (2017 промежуточный анализ), EF-14, HSK-tk, ANOCEF, NOA-08, Roa, NORDIC, EORTC 26062-22061, EORTC 26101 – послеоперационного ведения пациентов с диффузными глиомами представлены в таблице 1.4.

Таблица 1.4 – Некоторые результаты прошлых и текущих исследований (фаза III) лечения диффузных глиом (ВОЗ GII, GIII и GIV)

Глиома (ВОЗ II)	Название исследования	Основные результаты
Низкодозовая РТ против высокодозовой РТ	EORTC 22844 NCCTG/RTOG/ECOG	Высокие дозы РТ повышают нейротоксичность, но не увеличивают выживаемость без прогрессирования и общую выживаемость
Ранняя РТ против отсроченной РТ	EORTC 22845	Ранняя РТ увеличивает выживаемость без прогрессирования (на ~ 2 года), но не общую выживаемость
РТ против РТ + PCV	RTOG 9802	Адьювантная PCV увеличивает выживаемость без прогрессирования и общую выживаемость (~ в два раза)
РТ против ТМД (21/28 дней x 12 циклов)	EORTC 22033-26033	Нет разницы выживаемости без прогрессирования (особенно среди опухолей с ко-делецией 1p/19). Медиана общей выживаемости еще не рассчитана
Олигодендроглиома (ВОЗ III), коделеция 1p/19q	Название исследования	Основные результаты
РТ против РТ + PCV	RTOG 9402 EORTC 26951	Неoadьювантная или адьювантная PCV увеличивает выживаемость без прогрессирования и общую выживаемость в группе опухолей с ко-делецией 1p/19q (удвоение общей выживаемости в два раза)
РТ + PCV против РТ/ТМД + ТМД	CODEL (NCT00887146)	Продолжается

РТ + PCV против PCV (РТ при прогрессии)	POLCA (NCT02444000)	Продолжается
Астроцитома (ВОЗ III), интактна 1p/19q	Название исследования	Основные результаты
РТ против PCV против ТМД	NOA-04	Нет разницы в выживаемости без прогрессирования и общей выживаемости при проведении первичной ХМТ (PCV или ТМД) и отдельной РТ в любой из подгрупп анапластической глиомы
РТ против РТ + ТМД (12 циклов)	CATNON (NCT00626990) (2017 промежуточный анализ)	Добавление ТМД увеличивает выживаемость без прогрессирования (примерно в два раза) Медиана общей выживаемости еще не рассчитана
Глиобластома	Название исследования	Основные результаты
РТ против РТ/ТМД + ТМД	EORTC 22981-26981/NCIC CE.3	Сопутствующая и адъювантная терапия ТМД увеличивает выживаемость без прогрессирования и общую выживаемость
РТ/ТМД + ТМД (5/28 дней) против РТ/ТМД+ТМД (21/28 дней)	RTOG/EORTC/NC CTG	Высокодозный режим ТМД увеличивает токсичность, но не выживаемость без прогрессирования и общую выживаемость
РТ/ТМД + ТМД против РТ/ТМД + ТМД + БЕВ	RTOG 0825 AVA Glio	Сопутствующая и адъювантная терапия БЕВ увеличивает частоту побочных эффектов, но не общую выживаемость
РТ/ТМД + ТМД против РТ/ТМД/Цилегитид + ТМД/Цилегитид	EORTC 26071-22072 (CENTRIC)	Цилегитид не увеличивает общую выживаемость
РТ/ТМД + ТМД против РТ/ТМД+ТМД/Риндопепимут	ACT IV (2017 промежуточный анализ)	Преждевременно завершено ввиду бесполезности Риндопепимут не увеличивает общую выживаемость в группе пациентов с глиобластомой, экспрессирующей EGFRvIII
РТ/ТМД + ТМД против РТ/ТМД + ТМД/терапия электрическим полем (ТЭП)	EF-14	Адъювантная ТЭП увеличивает выживаемость без прогрессирования и общую выживаемость
РТ/ТМД + ТМД против РТ/ТМД/HSV-tk + ТМД	HSK-tk	Сопутствующая HSV-tk не увеличивает выживаемость без прогрессирования и общую выживаемость <i>HSV-tk – тимидинкиназа вируса простого герпеса</i>
РТ/ТМД против РТ/Ниволумаб	CheckMate 498 (NCT02617589)	Продолжается <i>Ниволумаб – моноклональное антитело против белка запрограммированной смерти 1; глиобластома без MGMT-метилирования</i>
РТ/ТМД + ТМД против РТ/ТМД/Ниволумаб+ТМД/Ниволумаб	CheckMate 548 (NCT02667587)	Продолжается <i>Ниволумаб – моноклональное антитело против белка запрограммированной смерти 1;</i>

		<i>глиобластома MGMT-метилирование</i>
РТ/ТМД + ТМД против РТ/ТМД + ТМД/DCVax-L	DCVax-L (NCT00045968)	Продолжается <i>DCVax-L-дендритная вакцина из лизата опухолевых клеток</i>
РТ/ТМД + ТМД против РТ/ТМД + ТМД/ICT107	ICT107 (NCT02546102)	Продолжается <i>CT107-пептидная дендритная вакцина</i>
РТ/ТМД + ТМД против РТ/ТМД+ТМД/Велипариб	Велипариб (NCT02152982)	Продолжается <i>Велипариб – ингибитор PARP глиобластома MGMT-гиперметилирование</i>
РТ/ТМД + ТМД против РТ/ТМД/АВТ414 + ТМД/АВТ414	АВТ-414 (NCT02573324)	Продолжается <i>АВТ-414 – конъюгат лекарства и антитела, связывающего EGFR, глиобластома (экспрессия EGFR)</i>
Глиобластома у пожилых пациентов (старше 65–70 лет)	Название исследования	Основные результаты
РТ против лучшей поддерживающей терапии	ANOCEF	РТ увеличивает выживаемость без прогрессирования и общую выживаемость без снижения качества жизни
РТ (60 Gy) против ТМД	NOA-08	ТМД в отдельности не уступает стандартной РТ
РТ (60 Gy) против низкофракционированной РТ (40 Gy)	Roa	Низкофракционированная РТ эквивалентна РТ
РТ (60 Gy) против низкофракционированной РТ (34 Gy) против ТМД	NORDIC	Низкофракционированная РТ и ТМД увеличивают общую выживаемость по сравнению с РТ
низкофракционированная РТ (40 Gy) против низкофракционированной РТ/ТМД + ТМД	EORTC 26062-22061	Низкофракционированная РТ с сопутствующей и адъювантной терапией ТМД увеличивает выживаемость без прогрессирования и общую выживаемость
Рецидивирующая анапластическая астроцитома	Название исследования	Основные результаты
Ломустин против Ломустин + Эфлорнитин	STELLAR (NCT02796261)	Продолжается Ингибитор фермента ODC
Рецидивирующая глиобластома	Название исследования	Основные результаты
Ломустин против Ломустин + Бевацизумаб	EORTC 26101	Добавление бевацизумаба увеличивает выживаемость без прогрессирования, но не общую выживаемость
Бевацизумаб против Ниволумаб против Ниволумаб/ Ипилимумаб	CheckMate 143 (NCT02017717)	Продолжаются. Предварительные результаты: комбинация Ниволумаб/Ипилимумаб увеличивает частоту побочных эффектов, но не общую выживаемость. Ниволумаб не увеличивает общую выживаемость по сравнению с бевацизумабом

Будущие возможные направления лечения

Иммунотерапия опухоли – это стимуляция иммунной системы пациента с целью активации специфических иммунных клеток для атаки на опухолевые клетки. Стратегии иммунотерапии, которые в настоящее время изучаются при опухолях головного мозга, включают противоопухолевые вакцины (Filley A.C., Dey M., 2017; Weller M. et al., 2017; Bagley S.J. et al., 2018), онколитические виротерапевтические препараты (Gardeck A.M. 2017; Lang F.F., Conrad C., Gomez-Manzano C. et al., 2018), моноклональные антитела (чекпойнт-ингибиторы) (Huang J., Liu F., Liu Z. et al., 2017) и адаптивную Т-клеточную терапию Tcell (CAR Tcell) (Bagley S.J., Desai A.S., Linette G.P. et al., 2018) (таблица 1.5).

В настоящее время проводятся исследования III фазы по эффективности дендритных вакцин (лизат опухоли и пептидные), NCT0045968 и NCT02546102 соответственно. Кроме того, продолжаются исследования II и III фазы по изучению эффективности чекпойнт-ингибиторов для лечения глиобластомы (Huang J., Liu F., Liu Z. et al., 2017), в частности, ниволумаба у пациентов с впервые диагностированной глиобластомой, а также в зависимости от статуса метилирования *MGMT* (NCT02667587 и NCT02617589).

Как известно, таргетная терапия подавляет aberrантные пути передачи сигналов в первичных опухолях головного мозга. Большинство таргетных агентов представляют собой либо внеклеточные моноклональные антитела, либо внутриклеточные низкомолекулярные ингибиторы тирозинкиназы. Наиболее частыми сигнальными путями, для которых разрабатывается таргетная терапия, являются пути фактора роста опухоли (такие как PDGF/PDGFR, EGF/EGFR), пути ангиогенеза (VEGF/VEGFR) или внутриклеточные пути обоих процессов (такие как путь PI3K/AKT/mTOR (Zhao H., Wang J., Shao W. et al., 2017), MAPK путь и поли-АДФрибоза полимеразная система [PARP]). Другие молекулярные мишени включают гистондеацетилазы и протеасомы. В настоящее время единственное продолжающееся исследование III фазы оценивает добавление к терапии ингибитора PARP (велипариб) при глиоме со статусом метилирования *MGMT* (NCT02152982).

Таблица 1.5 – Исследования некоторых видов иммунотерапии первичных опухолей головного мозга у взрослых

Иммунотерапия		Препараты	Способы провокации иммунного ответа с целью уничтожения опухолевых клеток
Вакцины	вся опухоль	EGFRvIII (Риндопепимут)	Индукция иммунного ответа против всех известных и неизвестных антигенов опухоли, содержащихся в лизате опухоли
	пептидные	Глиома-ассоциированные антигены: IDH1, IL-13Ra2, EphA2, Her-2, CD133, Sox-2, Nestin	Индукция иммунного ответа против специфических иммуногенных антигенов опухоли
	дендритные	Аутологичный опухолевый лизат (DCVax-L) Глиома-ассоциированные антигены	Антигены получают из резецированной опухоли. Дендритные клетки (ДК) пациента соединяют с антигенами опухоли <i>in vitro</i> . Далее сенсibilизированные ДК (содержат на поверхности АГ опухоли) повторно вводят для активации Т-клеток. Активированные Т-клетки пересекают ГЭБ и повреждают опухолевые клетки
Клеточная терапия	Адаптивная клеточная терапия (Т-клеточная терапия)	Таргеты CAR Т клеток: EGFRvIII, IL-13Ra2, CD122	Аутологичные Т-лимфоциты, полученные <i>in vitro</i> , реализуют иммунный ответ, соединяясь с белками на поверхности или антигенами опухоли или антигенами
Моно-клональные антитела	Ингибиторы контрольных точек иммунного ответа	CTLA-4 (Пембролизумаб) PD-1 (Николумаб) PDL-1 (Авелумаб)	Чекпойнт-ингибиторы подавляют супрессию нормального антитуморального ответа
Вирусная терапия	Инъекции онколитических вирусов	Полиовирус Вирус простого герпеса	Генетически модифицированный вирус не способен убивать нормальные клетки мозга, но сохраняет способность непосредственно убивать опухолевые клетки, что инициирует вторичный противоопухолевый ответ

Примечание. CAR=рецептор химерного антигена; CTLA-4=цитотоксический Т-лимфоцитарный антиген-4; PD-1=белок запрограммированной смерти 1; PDL-1=лиганд 1 запрограммированной смерти 1

Что касается генной терапии, то в настоящий момент используются вирусы, клеточные носители (стволовые клетки) и наномолекулы в качестве векторов для доставки генов в клетки-мишени и модификации известных онкогенных мутаций или сенсibilизации опухолевых клеток к лечению (Gardeck A.M., Sheehan J., Low W.C., 2017). Текущие исследования по рецидивирующим глиомам высокой

степени злокачественности включают фазу II с использованием репликационно-компетентного ретровирусного вектора (NCT02414165) и фазу I с использованием генетически модифицированных нервных стволовых клеток (NCT02192359, NCT02015819).

С помощью конвекционно-усиленной доставки происходит поступление более крупных молекул непосредственно в ЦНС через стереотаксически размещенные катетеры, тем самым снижая системную токсичность. При использовании градиента давления, а не градиента концентрации, в опухоли могут достигаться более эффективные концентрации терапевтических агентов. Соединения, созданные для конвекционно-усиленной доставки, включают рекомбинантный токсин, состоящий из IL13 и модифицированной формы *Pseudomonas* exotoxin (NCT02858895), и нанOLIпосомалиринотекан (NCT02022644). Создание «The Cancer Cell Map Initiative» – это новое усилие, направленное на картирование геной сети опухолевых клеток для идентификации ключевых факторов, влияющих на опухоль, и генетического влияния на лечение. Такое картирование приведет к разработке испытаний препаратов на основе биомаркеров, в которых лечение будет основано на молекулярных факторах, а не только на гистологическом типе (Krogan N.J., Lippman S., Agard D.A. et al., 2015; Trippa L., Alexander B.M., 2017; Woodcock J., LaVange L.M., 2017). Геномные платформы смогут улучшить диагностику, стратификацию риска и выбор лечения возможно в ближайшем будущем (Alexander B.M., Galanis E., Yung W.K.A. et al., 2015). Биомаркер-основанные исследования первичных опухолей головного мозга в настоящий момент включают INSIGHt (NCT02977780), N2M2 (NCT03158389) и GBM AGILE (Alexander B.M., Ba S., Berger M.S. et al., 2018).

Современные тенденции в экспериментальном моделировании глиобластомы

За последние несколько лет изучение геномных и протеомных характеристик опухолей пациентов, а также использование животных моделей позволило достичь лучшего понимания основных сигнальных путей,

задействованных в патогенезе глиальных опухолей, что дает повод для оптимизма в отношении новых стратегий, направленных на лечение этого заболевания.

На сегодняшний день ключевую роль в валидации и продвижении потенциальных лекарств в клинику играют исследования *in vivo*. Результативность таких работ чрезвычайно сильно зависит от животных моделей, поскольку с помощью них можно определить биологическую значимость воздействия на молекулярные мишени, ответственные за рост опухоли или ее жизнеспособность, что позволит подтвердить диагностические гипотезы, выявить биомаркеры опухолевого ответа и довести разработку лекарственных препаратов до применения на практике (Lenting K., Verhaak R., Laan M. et al., 2017). В качестве модельных организмов в экспериментальных исследованиях в области онкологии чаще всего используют мышей, благодаря значительному сходству кодирующей части генома мыши и человека, а также из-за относительной простоты разведения, содержания и проведения различных манипуляций. Разумеется, необходимо принимать во внимание и неизбежные ограничения в использовании животных моделей, продиктованные принципиальными видовыми различиями между организмом человека и мыши. Тем не менее в последние годы наблюдается экспоненциальный рост в числе и разнообразии мышиных моделей, доступных для доклинических исследований в области онкологии.

Используемые в течение предыдущих десятилетий спонтанные и индуцированные инъекциями химических веществ, например, этилнитрозомочевина (ЭНМ), глиальные опухоли грызунов характеризуются генетической гетерогенностью, а также адекватным микроокружением, однако плохая воспроизводимость влечет за собой необходимость использования большого количества животных, что делает эксперименты с такими моделями весьма трудоемкими и дорогостоящими (Lenting K., Verhaak R., Laan M. et al., 2017).

Непредсказуемый характер образования спонтанных и индуцированных опухолей головного мозга стимулировал исследователей к созданию стабильных культур клеток *in vitro* из индуцированных ЭНМ глиом крысы, среди которых

наиболее широко используемые клеточные линии C6, 9L, T9, RG2, F98 и BT4C и RT-2 применяют для создания сингенных моделей.

Развитие молекулярной биологии и клеточных технологий привело к появлению генно-инженерных моделей (genetically engineered mouse models – GEMM), с помощью которых удобно изучать специфические сигнальные пути нейроонкогенеза и роль генов-кандидатов. Знание драйверов мутаций, которые участвуют в нейроонкогенезе, а также возможность проведения манипуляций с геномом, таких как введение ранее отсутствующего гена, нокаут, нокдаун, принудительная сверхэкспрессия позволили разработать ряд моделей, которые можно использовать для улучшения знаний о молекулярных механизмах возникновения глиальных опухолей и тестирования таргетных препаратов.

Тем не менее рутинное использование GEMM в доклинических испытаниях противоопухолевого лечения может быть затруднено из-за различной длительности латентного периода опухоли и неполной пенетрантности (Miyai M., Tomita H., Soeda A. et al., 2017).

Классическим объектом для тестирования новых методов терапии являются гетеротопические (подкожные) ксенотрансплантаты клеточных линий. Ранее наиболее часто применяемая процедура создания ксенографтов опухоли человека заключалась в использовании клеток, взятых из клеточных культур для подкожного введения мышам с ослабленным иммунитетом.

Главным преимуществом моделей, представляющих собой подкожные опухолевые узлы, является возможность наблюдать и оценивать визуально размеры опухоли, что позволяет быстро проверить эффективность лечения. В настоящее время этот подход все еще часто используется во многих лабораториях, однако в последнее десятилетие акцент значительно сместился в сторону ортотопического ксенографирования, которое, в случае злокачественных новообразований головного мозга, требует введения опухолевых клеток в соответствующие нейроанатомические структуры.

Использование клеточных линий позволяет выполнять тестирование препаратов с большой скоростью и высокой степенью воспроизводимости

результатов, однако ксенографты культурального происхождения имеют ряд недостатков: они не в состоянии имитировать гетерогенность и сложность заболевания, а также не воспроизводят микроокружение реальных опухолей (Gould S., Junttila M., de Sauvage F., 2015).

Попытки создания модели, которая могла бы более точно повторить особенности человеческой опухоли, привели к созданию ксенотрансплантата, полученного в результате имплантации опухолевого материала, взятого непосредственно от пациента, – Patient-Derived Xenograft (PDX).

PDX характеризуется многообразием клеточных субклонов, поэтому является самой надежной моделью для прогнозирования терапевтических реакций и может служить окончательным фильтром для отбора фармакологических субстанций-кандидатов для клинических испытаний.

С началом применения этих моделей практика их использования является одним из наиболее быстро развивающихся направлений в области доклинических исследований в онкологии, а также их используют с целью подбора терапии для пациентов, ставших донорами опухоли (так называемая «аватарная» модель). Экспериментальные исследования, выполненные на ксенографтах с целью с определения наиболее эффективно действующих на опухоль схем и методов терапии и корректировки общих курсов облучения или приема химиопрепаратов, являются на сегодняшний день одним из наиболее полезных инструментов прецизионной медицины.

Нерешенные вопросы. Первичные опухоли головного мозга по-прежнему остаются крайне сложными заболеваниями для лечения, несмотря на существенный прогресс в понимании их генеза. Необходима дальнейшая работа, чтобы понять роль стволовых клеток глиомы в возникновении первичных опухолей головного мозга и как различные режимы терапии могут использоваться в таких условиях.

Несмотря на то, что очень немногие исследования перешли к III фазе, последние достижения в области иммунотерапии, таргетной и комбинированной терапии дают некоторую надежду. Кроме того, дальнейший анализ опухолевой

ДНК, РНК и белков дополнительно уточнит важные особенности биологии глиом, возможно, приведет к появлению новых стратегий лечения. В идеале совместные усилия учреждений должны привести к созданию платформы, которая будет содержать эпидемиологические, клинические, диагностические, патогистологические, геномные данные по всему миру, что оптимизирует исследования в поиске таргетных мишеней и фармакологических субстанций, улучшающих лечение больных.

Глава 2

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**2.1 Дизайн исследования и характеристика используемого клинического материала**

Методом сплошной текущей выборки с 2015 по 2019 г. было проведено проспективное исследование 314 больных старше 18 лет с нейроэктодермальными опухолями головного мозга. В исследование вошли пациенты обоих полов с глиальными опухолями головного мозга, имеющие показания для безрамной стереотаксической биопсии, либо краниотомии с циторедуктивным удалением опухоли супра, субтенториальной локализации, а также больные с менингиомами и метастазами аденокарцином толстой кишки и немелкоклеточного рака легкого, подвергшиеся хирургическому лечению. Кроме того, нами использовалась плазма здоровых доноров, давших согласие на участие в исследовании.

Морфологический диагноз устанавливался в соответствии с критериями ВОЗ (2016): ГБ – глиобластома; АА – анапластическая астроцитома; ДА – диффузная астроцитома; ОДГ – олигодендроглиома; АОДГ – анапластическая олигодендроглиома (таблица 2.1).

Параллельно с морфологической верификацией диагноза выполнялось молекулярно-генетическое исследование (Кит О.И. и соавт., 2018; патент РФ №2709651 от 19.12.2019).

Таблица 2.1 – Распределение больных с нейроэпителиальными опухолями в соответствии с классификацией ВОЗ (2016), абс. ч. (%)

Мутация/ко-делеция	Диагноз				
	ДА (n=87)	АА (n=51)	ОДГ (n=13)	АОДГ (n=6)	ГБ (n=157)
Мутация в генах IDH (+)	61 (70,1)	28 (54,9)	11 (84,6)	5 (83,3)	23 (14,6)
Мутация в генах IDH (-)	26 (29,9)	23 (45,1)	2 (15,4)	1 (16,7)	134 (85,4)
Ко-делеция 1p19q (+)	-	-	12 (92,3)	6 (100,0)	-
Ко-делеция 1p19q (-)	-	-	1 (7,7)	0	-

Средний возраст больных составил $52,1 \pm 16,3$ года. Мужчин было 163, женщин 151 человек. Клиническая характеристика больных согласно гистологическому диагнозу (АА, ДА, ГБ, ОДГ, АОДГ) представлена в таблице 2.2. Объем опухоли у больных колебался в широких пределах: от 0,5 до 307 см³. Распространение опухолей при АА, ДА, ГБ, ОДГ, АОДГ представлено в таблице 2.3.

Таблица 2.2 – Клиническая характеристика больных, абс. ч. (%)

Клинические характеристики		ДА (n=87)	АА (n=51)	ГБ (n=157)	ОДГ (n=13)	АОДГ (n=6)
Пол	мужчины	47 (54,0)	20 (39,2)	84 (53,5)	8 (61,5)	4 (66,7)
	женщины	40 (46,0)	31 (60,8)	73 (46,5)	5 (38,5)	2 (33,3)
Возраст (среднее значение)		45,8 $\pm$ 8,3	51,8 $\pm$ 6,4	56,4 $\pm$ 12,3	41,9 $\pm$ 20,1	55,2 $\pm$ 13,7
Функциональный статус по шкале Карновского, балл	90–100	16 (18,4)	5 (9,8)	8 (5,1)	3 (23,1)	1 (6,7)
	60–80	68 (78,1)	39 (76,5)	136 (86,6)	8 (61,5)	5 (83,3)
	< 60	3 (3,5)	7 (13,7)	13 (8,3)	2 (15,4)	-
	средний	76,3	70,4	70	74,2	76,7

Таблица 2.3 – Распространение опухоли, абс. ч. (%)

Локализация	ДА (n=87)	АА (n=51)	ГБ (n=157)	ОДГ (n=13)	АОДГ (n=6)
Лобная доля	17 (19,5)	8 (15,7)	26 (16,6)	2 (15,4)	1 (16,7)
Височная доля	10 (11,5)	9 (17,6)	19 (12,1)	1 (7,7)	2 (33,3)
Теменная доля	13 (14,9)	7 (13,6)	12 (7,6)	-	-
Затылочная доля	1 (1,2)	1 (2,0)	1 (0,6)	-	-
Базальные ганглии	8 (9,2)	1 (2,0)	4 (2,5)	-	-
Мозолистое тело	-	1 (2,0)	4 (2,5)	-	-
Ствол и полушария мозжечка	4 (4,6)	1 (2,0)	2 (1,3)	-	-
Несколько локализаций	34 (39,1)	23 (45,1)	89 (56,7)	10 (76,9)	3 (50,0)
Всего	87 (100,0)	51 (100,0)	157 (100,0)	13 (100,0)	6 (100,0)

Весь биологический материал пациентов с опухолями головного мозга был депонирован в биобанке Федерального государственного бюджетного

учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Формируя биобанк, мы столкнулись с рядом трудностей. Во-первых, поскольку мы работали с РНК, была необходимость в замораживании нативного опухолевого материала непосредственно в операционной. Во-вторых, электронная база паспортизированных образцов, хранимых в биобанке, не могла быть полностью интегрирована в электронную базу пациентов, содержащую информацию о клиническом течении заболевания от момента постановки диагноза до летального исхода (рисунок 2.1).

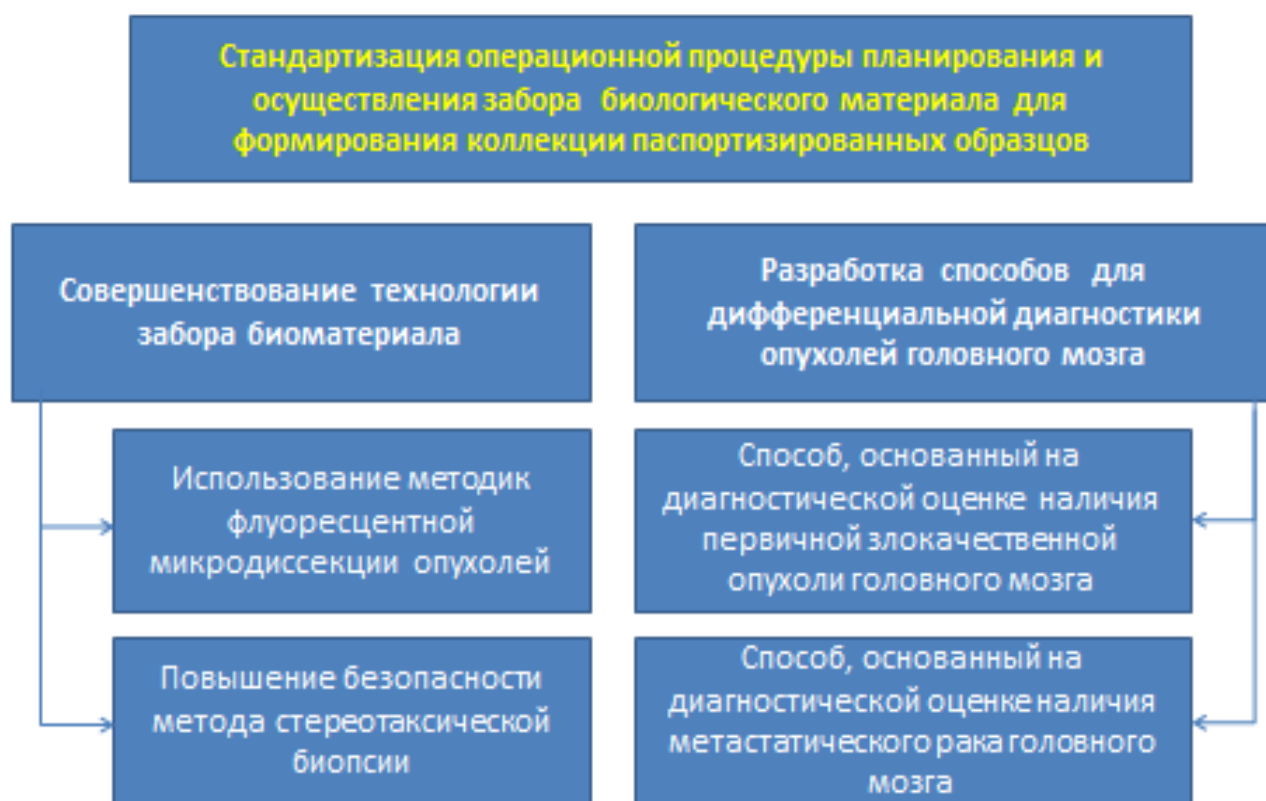


Рисунок 2.1. Формирование биобанка опухолей головного мозга

Пациенты, вошедшие в исследование, подписывали добровольное информированное согласие на передачу биологического материала для исследования в научных подразделениях центра: лабораторию изучения патогенеза злокачественных опухолей, лабораторию молекулярной онкологии. Дизайн исследования был одобрен этическим комитетом ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России. Кроме депонирования образцов ткани опухоли

для исследования сохраняли также биологический материал из зоны, непосредственно прилегающей к опухолевому очагу (перифокальная зона). При удалении менингиом забор перифокальной ткани объемом не менее 0,25 см³ проводили в функционально незначимой зоне головного мозга.

Биологический материал из биобанка использовался нами в клиническом исследовании. Часть материала поступала на биохимическое исследование для определения уровня гормонов, ростовых факторов и белков регуляции системы плазминогена. На данном материале также была апробирована диагностическая система дифференциальной диагностики глиобластом и менингиом, основанная на определении уровня трипсиноподобной протеинкиназы крови (рисунок 2.2).

Другая часть материала использовалась для молекулярно-генетического исследования. На основе анализа панели генов и микроРНК нами были выделены предиктивные маркеры и таргетные мишени опухолей головного мозга.

На основе исследования панели микроРНК нами также была разработана оригинальная тест-система по дифференциальной диагностике глиальных опухолей и метастатического поражения головного мозга. Для создания PDX-моделей на иммунодефицитных мышах и первичных клеточных культур для доклинических исследований новых фармакологических субстанций биологический материал забирался нами непосредственно в операционной.

Идея, объединившая клиническое и экспериментальное исследование, заключалась в доказательстве особой роли гипоксия-индуцибельного фактора (Hif-1 α), обнаруженного молекулярно-генетическими методами, в развитии опухолей головного мозга высокой степени злокачественности. Его значение было подтверждено на PDX-моделях, созданных на иммунодефицитных мышах, применением препарата бортезомиба, который блокировал рецепторы Hif-1 α за счет его гиперпродукции. В результате противоопухолевый эффект комбинации препаратов бортезомиба и темозоломида был наибольшим.

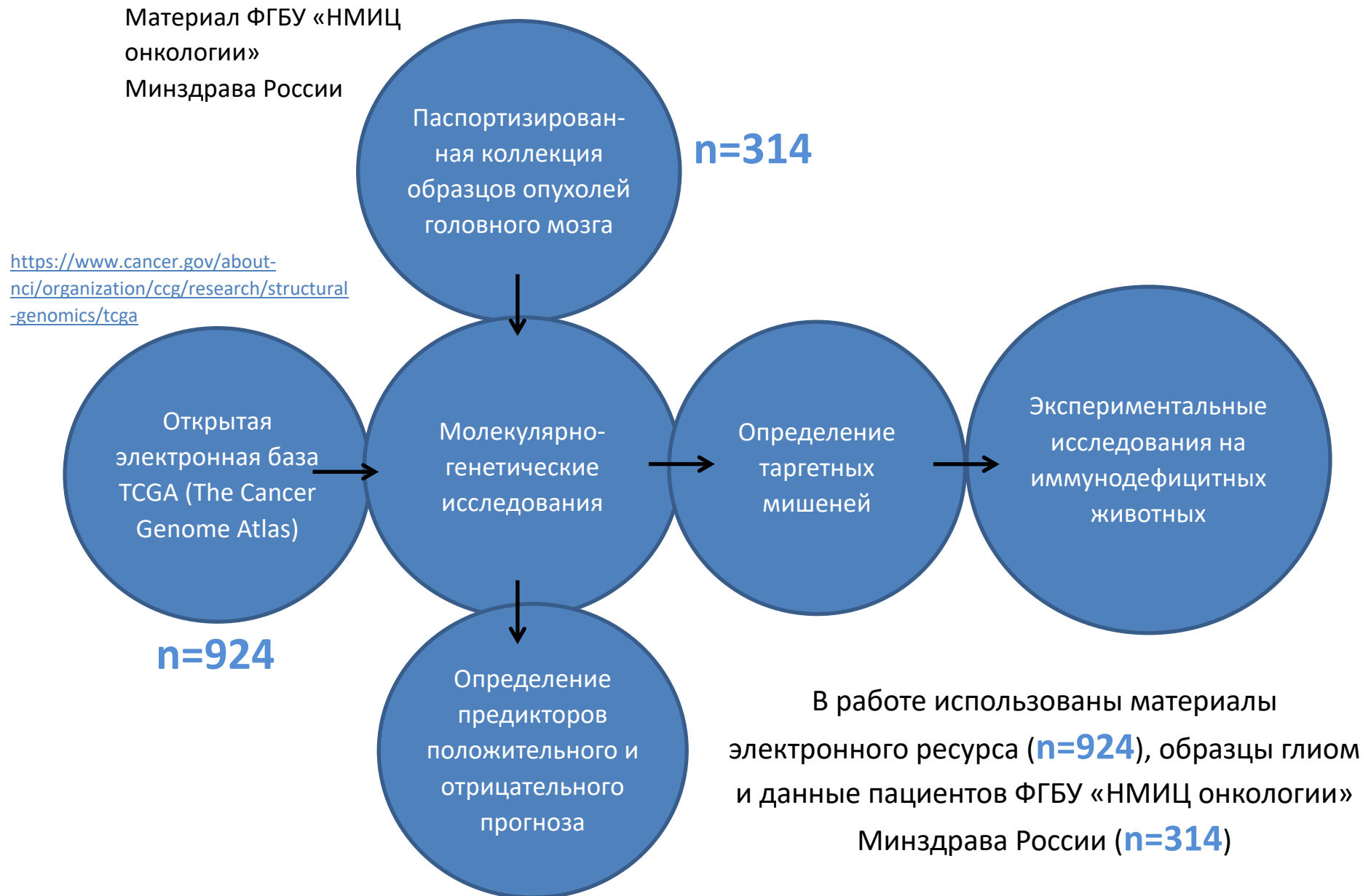


Рисунок 2.2. Дизайн исследования

2.2 Общие методики обследования пациентов и способы забора биологического материала

Отбор больных на хирургическое лечение проводился в условиях консультативно-диагностического центра Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Перечень клинико-диагностических исследований был стандартным. Предоперационное амбулаторное обследование больного включало МРТ головного мозга с учетом требований к стереотаксической нейрохирургии с захватом крайних точек головы и необходимым отступом от них.

На этапе стационарной помощи в предоперационном периоде в отделении нейроонкологии ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России пациенты осмотрены неврологом с целью фиксации неврологического статуса, дополнительно проводилась оценка общего состояния онкологического больного по шкале Карновского (0–100%) и шкале ECOG (0–4 балла). Для объективизации неврологического дефицита проводили оценку по шкале инсульта NIHSS (<http://www.cardioneurology.ru/nihss/>), для оценки когнитивных нарушений использовали Монреальскую когнитивную шкалу MoCA (<https://www.mocatest.org>).

Формирование биобанка опухолей головного мозга. Полиморфизм опухоли и методика забора материала

С начала прошлого столетия изучена морфологическая гетерогенность нейроэпителиальных опухолей, а работами современных генетиков и нейроморфологов доказана и молекулярно-генетическая разнородность опухолевой ткани, что обуславливает сложность диагностики нейроэпителиальных опухолей (Смирнов Л.И., 1935; Земская А.Г., 1976; Мацко Д.Е., 2015).

Трудности морфологической диагностики опухолей ЦНС дополнительно могут быть связаны с недостаточным количеством материала и ошибками,

допущенными при его взятии, недостаточным поиском, незнанием специфических диагностических критериев, неправильной интерпретацией клеточного состава. Так в материале, взятом из периферических участков опухоли ЦНС, почти всегда определяются реактивно измененные астроциты, которые трудно отличить от клеток астроцитомы низкой степени злокачественности. Затруднения диагностики нередко связаны с получением материала из очагов некроза, широко представленных в глиомах высокой степени злокачественности (Кит О.И. и соавт., 2015).

Одним из стандартов в хирургии глиальных опухолей высокой степени злокачественности является применение метаболической флуоресцентной диагностики с использованием 5-аминолевуленовой кислоты (5-АЛК) (Ковалев Г.И., Кочарян В.Э., Музлаев Г.Г., 2016). 5-АЛК – эндогенное соединение, являющееся одним из промежуточных продуктов синтеза гема (Якубовская Р.И., Панкратов А.А., Филоненко Е.В. и соавт., 2018). Введение в организм 5-АЛК в избыточных количествах приводит к увеличению образования протопорфирина IX, для которого в здоровых тканях характерна быстрая переработка в гем под действием фермента феррохелатазы (Stepp H., Baumgartner R., Beyer W. et al., 1995; Geavlete B., Mulțescu R., Georgescu D., Geavlete P., 2008).

В отличие от нормальных клеток, в опухолевых имеется дефицит феррохелатазы, что приводит к значительному повышению уровня протопорфирина IX в клетках опухоли в течение нескольких часов. В результате, для различных опухолей, флуоресцентный контраст между опухолевой и окружающей тканью увеличивается в 10–15 раз (Kennedy J.C., Pottier R.H., 1994).

Визуализация флуоресценции осуществляется фильтром операционного микроскопа в области спектра с максимумом длины волны 635 нм, обеспечивая возможность обнаружения опухоли и уточнения границ ее распространенности (Филоненко Е.В., Гришаева А.Б., 2011).

Взятие опухолевой ткани в операционной происходило под визуальным контролем нейрохирурга, морфолога и генетика с применением метаболической

5-АЛК навигации (рисунок 2.3), что способствовало получению достаточного количества живых опухолевых клеток/тканей из различных участков опухоли для введения в культуральную среду, получения PDX-трансплантатов на иммунодефицитных животных и осуществления цитологической, морфологической и молекулярно-генетической диагностики нейроэпителиальных опухолей (Межевова И.В. и соавт., 2019; Шамова Т.В. и соавт., 2019; Кит О.И. и соавт., 2020).



Рисунок 2.3. Стрелками обозначены удаленные, метаболически активные фрагменты нейроэпителиальной опухоли высокой степени злокачественности, четко визуализируемые с применением фильтра операционного микроскопа после введения больному препарата 5-АЛК за 2 часа до операции

Для формирования молекулярной коллекции тканей глиом отбирали случаи, которые удовлетворяли следующим критериям: наличие информированного согласия, подписанного пациентом или его представителем; локализация опухоли в головном мозге; отсутствие химиолучевого лечения; первичный характер новообразования; предварительная верификация диагноза инструментальными и интраоперационными методами (предоперационных данных РКТ, МРТ в стандартных режимах, набор визуальных признаков глиальной опухоли, полученных в момент оперативного вмешательства).

Забор тканей выполняли непосредственно в операционном блоке во время проведения оперативного вмешательства. Для транспортировки в лабораторию молекулярной генетики и хранения в криобанке ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России материал помещали в криопробирки и мгновенно

замораживали в жидком азоте без использования крио-транспортных РНК-сред. В дальнейшем биологический материал транспортировали в криохранилище, представляющее собой низкотемпературный вертикальный морозильник MDF-U500VX (PHC Corporation, Сингапур), поддерживающий постоянную температуру минус 80°C.

Ткани для молекулярно-генетических исследований забирали в трех точках: опухолевая ткань, перифокальная ткань – 5 мм от опухоли и условно здоровая ткань по траектории доступа операционного вмешательства – 10 мм или более от опухоли. Точки забора материала рассчитывали до операции с использованием навигационной станции Medtronic StealthStation® S7®. Контрольная точка забора материала локализовалась вне функционально значимой зоны головного мозга. Контрольный биоптат при визуальной оценке модулем Blue 400 микроскопа Carl Zeiss OPMI PENTERO (Zeiss AG, Германия) всегда был без активного свечения. В локальной папке института был сформирован раздел «Глиомы». В нем составляли список пациентов и поэтапно фиксировали первичные данные о пациенте: Ф.И.О., пол, возраст, клинический диагноз, результаты исследования МРТ и КТ, № истории болезни и амбулаторной карты, код образцов, гистологическое заключение. Впоследствии данные актуализировали дополнительной информацией: послеоперационного МРТ- и КТ-контроля, объема операции, результатов ИГХ и молекулярно-генетической верификации, выживаемости.

2.3 Материал и методы молекулярно-генетического исследования

2.3.1 Описание выборки для биоинформационного анализа

Биоинформационный анализ был проведен на основании данных открытой базы TCGA (The Cancer Genome Atlas, <https://www.cancer.gov/about-nci/organization/ccg/research/structural-genomics/tcga>). Для этого были сформированы 5 основных групп: диффузная астроцитома (GII), анапластическая астроцитома (GIII), олигодендроглиома (GII), анапластическая олигодендроглиома (GIII) и глиобластома GBM (GIV), подвергнутых РНК- и микроРНК-секвенированию (проекты TCGA-GBM и TCGA-LGG), а также микрочиповому анализу микроРНК (для GBM).

Сбор и обработку данных проводили с помощью вычислительной программной среды R 3.6.2 (пакет «TCGABiolinks») (Colaprico A. et al., 2016). Пакет «TCGABiolinks» представляет собой набор алгоритмов для языка программирования R, направленный на решение проблем анализа данных в области биоинформатики с использованием управляемого рабочего процесса, позволяющего пользователям запрашивать, загружать и выполнять комплексный анализ данных TCGA. Пакет объединяет методы программирования и математической статистики. Включает алгоритмы воспроизводимости, интегративного анализа и использования различных пакетов для исследования данных TCGA. Сводная информация о возрасте, поле и выживаемости пациентов, включенных в исследование, приведена в таблице 2.4. Период наблюдения составлял один год.

Таблица 2.4 – Клиническая характеристика пациентов, вошедших в интерактивный анализ из базы TCGA

Клинические данные		Астроцитомы (GII), n=58	Астроцитомы (GIII), n=128	Олигодендроглиомы (GII), n=102	Олигодендроглиомы (GIII), n=72	Глиобластомы (GIV), n=564
Возраст, лет медиана (min-max)		35,5 (20-66)	43,5 (21-74)	43 (17-87)	51,5 (25-75)	59 (10-89)
Пол, абс.ч.(%)	мужчины	33 (57)	70 (55)	59 (58)	41 (57)	344 (61)
	женщины	25 (43)	58 (45)	43 (42)	31 (43)	220 (39)
Статус, абс.ч.(%)	выжило	53 (91)	93 (73)	87 (85)	59 (82)	136 (24)
	умерло	5 (9)	35 (27)	15 (15)	13 (18)	428 (76)
Медиана ОВ, дни, (min-max)		743 (3-4412)	586,5 (0-6423)	788 (0-4752)	650,5 (2-4084)	372 (3-3881)

В выборку для исследования значимых для глиом генетических маркеров и транскрипционной активности генов и микроРНК были включены 75 пациентов (34 женщины и 38 мужчин), проходивших лечение на базе ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России, средний возраст составил 54 года (стандартное отклонение – 14), с верифицированными глиальными опухолями головного мозга: 43 пациент с глиобластомой (GIV) – 57%, 11 пациентов с анапластической астроцитомой/олигодендроглиомой (GIII) – 14%, 21 пациент с диффузной астроцитомой/олигодендроглиомой (GII) – 29%. Для оценки специфичности и

чувствительности выявленного паттерна циркулирующих микроРНК были сформированы группы сравнения: доноры без онкопатологии (4 мужчин, 6 женщин, медиана возраста 51 год), пациенты с метастазами в головной мозг и основным диагнозом аденокарцинома толстой кишки (n=10) и немелкоклеточный рак легкого (n=10) (10 мужчин, 10 женщин, медиана возраста 62 года). Забор тканей выполнялся непосредственно в операционном блоке во время проведения костно-пластической краниотомии с нейрофизиологическим мониторингом.

2.3.2 Биоинформационный анализ дифференциальной экспрессии генов и генной онтологии на базе данных TCGA

Для анализа дифференциальной экспрессии генов (ДЭГ) и дифференциальной экспрессии микроРНК (ДЭ-миРНК) использовали пакет «limma» (Ritchie M.E. et al., 2015) и glmLRT-критерий (Gene-Wise Likelihood Ratio Test). Гены, выбранные в ходе анализа дифференциальной экспрессии, были разделены на группы в зависимости от их генетической онтологии (молекулярные функции, биологические процессы, клеточная локализация и сигнальные пути) с помощью базы данных DAVID (Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery) (Sherman B.T., & Lempicki R.A., 2009).

2.3.3 Алгоритм оценки выживаемости пациентов на базе данных TCGA

Анализ выживаемости пациентов предполагал несколько этапов. Вначале с помощью метода Каплана – Майера отбирали гены, экспрессия которых оказывала значительное влияние на продолжительность общей выживаемости. Экспрессию каждого гена с учетом квантильных точек отсечения (верхняя – 0,6, нижняя – 0,33) подразделяли на низкую, умеренную и высокую. Затем взаимосвязь с выживаемостью генов с высокой и низкой экспрессией оценивали с помощью многофакторного регрессионного анализа Кокса. Гены, отобранные в регрессионном анализе, были кластеризованы на основании белок-белковых взаимодействий их продуктов с использованием базы данных String (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins, <https://string-db.org>). Мы визуализировали зависимость выживаемости пациентов от экспрессии генов, выбранных на основании двух предыдущих этапов и интерактивного анализа, с

помощью пакетов «UCSCXenaTools» (Wang S., Liu X., 2019). UCSCXena позволяет пользователям исследовать функциональные наборы геномных данных для корреляции между геномными и /или фенотипическими переменными.

2.3.4 Проведение интерактивного анализа

Для отборочного скрининга был проведен корреляционный анализ экспрессий генов и микроРНК. Пары сравнения ген – микроРНК, у которых коэффициент корреляции Пирсона превышал «-0,5», были отсеяны (рисунок 2.4).

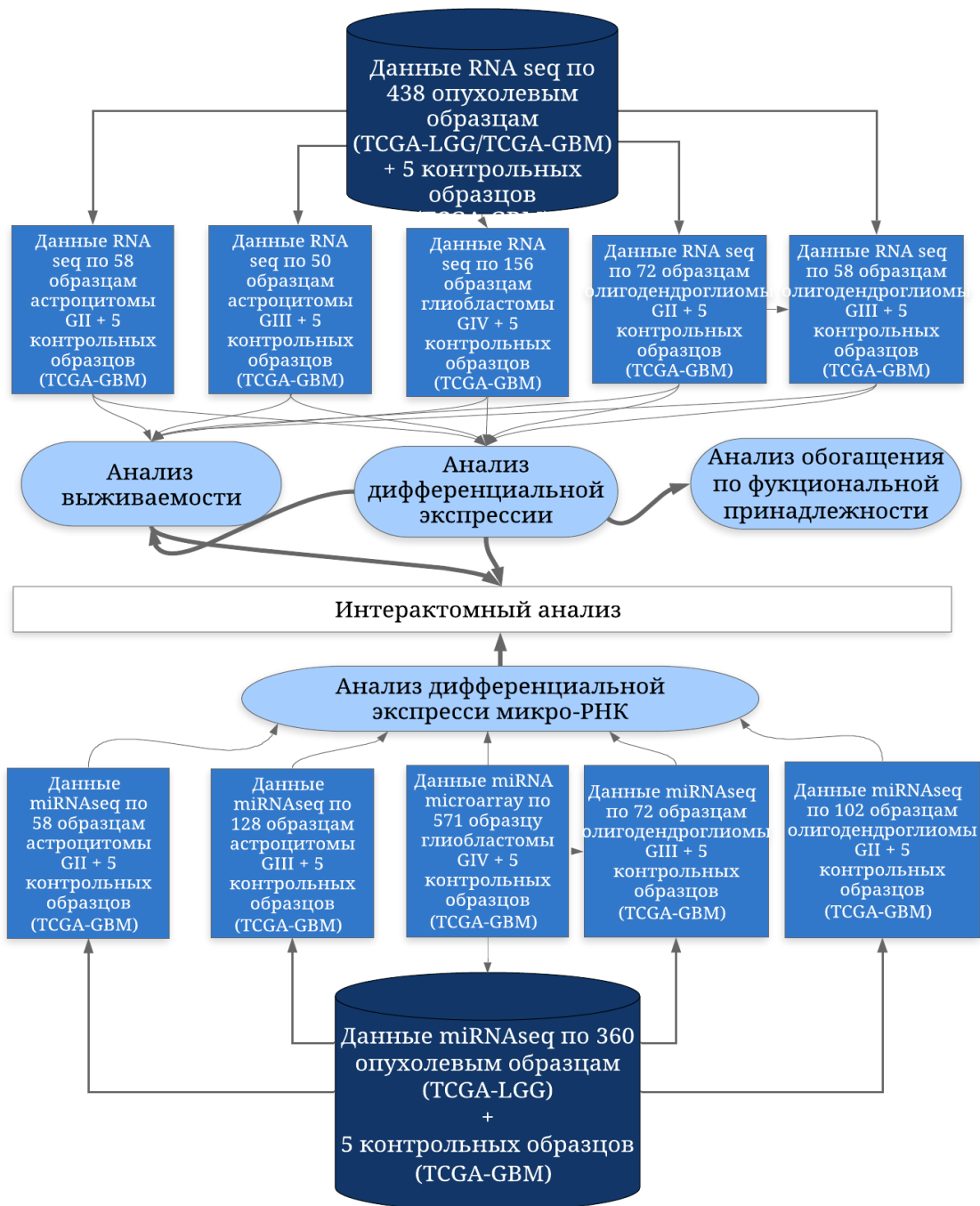


Рисунок 2.4. Схема формирования и фильтрации данных по экспрессионному профилю генов и микроРНК в образцах глиальных опухолей

Оставшиеся пары были верифицированы по десяти базам данных пакета «multiMiR» (Ru Y. et al., 2014). «multiMiR» – пакет R и база данных взаимодействия miRNA-target, которая включает несколько функций: компиляция почти 50 миллионов записей для людей из 14 различных баз данных, что больше, чем любая другая коллекция; расширение баз данных на те, которые основаны на аннотациях болезней и ответах на микроРНК-терапию, в дополнение ко многим экспериментальным и вычислительным базам данных; и определяемые пользователем пороговые значения для прогнозируемой силы связывания для обеспечения наиболее уверенного выбора. В итоговую сеть взаимодействий микроРНК-мишень вошли валидированные пары. Прогнозируемые пары были отобраны на основании результатов по выживаемости пациентов (рисунок 2.6).

2.3.5 Генотипирование мутационных изменений

Мутации в генах *IDH1* и *IDH2* определяли методом RT-qPCR с помощью набора theascreen® IDH1/2 RGQPCR (Qiagen, Германия) с использованием амплификатора Rotor Gene (Qiagen, Германия). Метод позволяет детектировать семь мутаций в гене *IDH1* и пять мутаций в гене *IDH2* (таблица 2.5).

Таблица 2.5 – Детектируемые мутации в генах *IDH1* и *IDH2*

Ген	Мутация	Изменение основания	COSMIC ID
<i>IDH1</i>	Arg132His (R132H)	395G>A	COSM28746
	Arg132Cys (R132C)	394C>T	COSM28747
	Arg132Ser (R132S)	394C>A	COSM28748
	Arg132Gly (R132G)	394C>G	COSM28749
	Arg132Leu (R132L)	395G>T	COSM28750
	Arg132Val (R132V)	394_395CG>GT	COSM28751
	Arg100Gln (R100Q)	299G>A	COSM88208
<i>IDH2</i>	Arg172Lys (R172K)	515G>A	COSM33733
	Arg172Met (R172M)	515G>T	COSM33732
	Arg172Trp (R172W)	514A>T	COSM34039
	Arg172Ser (R172S)	516G>T	COSM34090
	Arg172Gly (R172G)	514A>G	COSM33731

Генотипирование двух «горячих точек» гена *ATRX* осуществляли прямым секвенированием по Сэнгеру. Дизайн специфичных олигонуклеотидных праймеров был выполнен с использованием референсных последовательностей NCBI GenBank и программы Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Последовательности праймеров, позволяющих оценивать наличие мутаций, приведены в таблице 2.6.

Таблица 2.6 – Последовательность праймеров для гена *ATRX*

Мутация	Прямой праймер	Обратный праймер
R1803	GGTCAGTGTGCAGATTCTACCAT	GAAAGAACGGGAAAGAAAACACA
R221	GTTGTTCTTTTCCATAAAACCCTGG	CCTTTCGACCAAGGTTGCG

Амплификацию исследуемых участков гена *ATRX* проводили с использованием CFX96 (Bio-Rad, США) со следующим температурным режимом 5 минут 95°C, 40 циклов: 95°C 10 с, 58°C 30 с, 72°C 30 с. Каждый образец ПЦР-смеси содержал 1х ПЦР-буффер (Синтол, Россия), 0,2 мМ смеси dNTPmix (Синтол, Россия), 1 ед. акт. Таq-полимераза (Синтол, Россия), 0,5 мМ каждого праймера, 10 нг матричной ДНК.

Последующее секвенирование проводили в системе Applied Biosystems 3500 (Thermo Fisher Scientific, США) согласно инструкции производителя.

Наличие ко-делеции 1p/19q определяли с помощью фрагментного анализа с использованием генетического анализатора Applied Biosystems 3500, как описано ранее (Broholm H. et al., 2008).

2.3.6 Оценка экспрессии генов с помощью двухступенчатой RT-qPCR

Для оценки уровней относительной экспрессии генов использовали реакцию обратной транскрипции (для наработки кДНК) с последующей полимеразной цепной реакцией в реальном времени (RT-qPCR).

Методом RT-qPCR определяли величины относительной экспрессии 15-ти генетических локусов: *EGFR*, *SMAD4*, *SMAD7*, *SMO*, *NOTCH1*, *NOTCH2*, *HBPI*, *HIF1A*, *EGLN1*, *EGLN3*, *KDM1B*, *KDM1A*, *MSI1*, *MSI2*, *TET1*. В качестве референсных, после серии предварительных экспериментов, использовали гены

PSMC, *TBP* и *RPL0*. Стабильность экспрессии для подбора референсных генов оценивали с помощью программы geNorm (Wang, Q. et al., 2012). Дизайн специфичных олигонуклеотидных праймеров осуществляли с использованием референсных последовательностей NCBI GenBank и программы Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).

2.3.7 Подбор микроРНК, таргетирующих 3'UTR мРНК исследуемых генов

Поиск микроРНК, таргетирующих гены *EGFR*, *SMAD4*, *SMAD7*, *SMO*, *NOTCH1*, *NOTCH2*, *HBPI*, *HIF1A*, *EGLN1*, *EGLN3*, *KDM1B*, *KDM1A*, *MSI1*, *MSI2*, *TET1*, осуществляли в базах данных miRTarBase (<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/php/index.php>). Визуализация сети взаимодействия мРНК – микроРНК реализовывалась с использованием Cytoscape 3.7.2 (<https://cytoscape.org/>).

2.3.8 Оценка экспрессии микроРНК

Для оценки уровней относительной экспрессии микроРНК использовали реакцию обратной транскрипции (для наработки кДНК), реакцию полиаденилирования с последующей полимеразной цепной реакцией в реальном времени. Методом RT-qPCR определяли величины относительной экспрессии miR-215-5p, miR-22-3p, miR-122-5p, miR-107, miR-324-5p, miR-34a-5p, miR-155-5p, miR-21-5p, miR-497-5p, miR-330-3p, miR-146a-5p, miR-92a-1-5p, miR-326. В качестве референсных, после серии предварительных экспериментов, использовали микроРНК miR-191-5p, miR-103a-1-5p и RNU49. Стабильность экспрессии для подбора референсных генов оценивали с помощью программы geNorm (Vandesompele J. et al., 2002).

Дизайн специфичных олигонуклеотидных праймеров осуществляли с использованием алгоритма Balcells I (Balcells I., Cirera S., Busk P.K., 2011).

2.3.9 Определение степени метилирования гена *MGMT*

Для определения метилирования 5-ти CpG-сайтов в позициях с +17 по +39 первого экзона гена *MGMT* (Ensembl ID: OTTHUMT00000051009) использовали набор праймеров PyroMark Q24 CpG *MGMT* (Qiagen, Германия).

Количественное метилирование CpG-сайтов оценивали методом пиросеквенирования с использованием системы генетического анализа PyroMarkQ24 (Qiagen, Германия) согласно инструкции производителя.

Постановку пиросеквенирования каждого образца проводили как минимум в двух повторах. Полученные данные анализировали с помощью программного обеспечения PyroMark Q24 Software (Qiagen, Germany).

2.4 Материал и методы биохимического исследования

Исследовали образцы тканей, полученных из созданного биобанка опухолей головного мозга ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Минздрава России (24 – глиобластомы, 13 – менингиомы без перитуморального отека), на уровень ростовых факторов, стероидных гормонов, факторов системы регуляции плазминогена.

Определяли методом иммуно-ферментного анализа (ИФА):

- уровень стероидных гормонов: кортизола, тестостерона, прогестерона, эстрадиола, эстриола, пролактина (ИФА, ХЕМА, Россия), эстрона (ИФА, DBC, Канада), а также секс-стероид-связывающего глобулина (ССГ) (ИФА, Алкор-Био, Россия) и гормонов аденогипофиза – адренокортикотропного гормона (АКТГ) и соматотропного гормона (СТГ);

- содержание проурокиназы, урокиназы, протромбокиназы, тромбокиназы (uPA-АГ, uPA-акт, tPA-АГ, tPA-акт), а также их ингибитора PAI-1 (PAI-1-АГ и PAI-1-акт) методами ИФА со стандартными тест-наборами ELISA. Результаты пересчитывали на 1 мг влажной ткани;

- уровень ростовых факторов – VEGF-A и его рецептора VEGF-R1 (BenderMedSystem, Австрия), VEGF-C и его рецептора VEGF-R3 (BenderMedSystem, Австрия), EGF (Biosource, США), IFR-1 и IFR-2 (Mediagnost, США), TGF- β 1 (BenderMedSystem, Австрия).

2.5 Материал и методы культурального исследования

Для данного исследования были отобраны пациенты обоих полов в возрасте от 21 до 77 лет. Работа была одобрена локальным этическим комитетом ФГБУ

«НМИЦ онкологии» Минздрава России. Все больные подписывали информированное согласие. Пациенты представлены с диагнозами: диффузная астроцитома GII, анапластическая астроцитома GIII, анапластическая олигодендроглиома GIII, глиобластома GIV. Для создания первичных культур изымали 5-ALA метаболически активные фрагменты нейроэпителиальных опухолей. Фрагменты опухолей размером 0,5×0,5 см в условиях операционной помещали в 20 мл стерильного HBSS (Gibco, США) с 1% раствора антибиотика-антимикротика (Gibco, США). Образцы опухолевой ткани доставляли в стерильный бокс в течение 10 минут. Последующие манипуляции с тканью осуществляли в ламинарном шкафу II класса защиты.

Образец опухоли разделяли на небольшие фрагменты равного размера (эксплантаты), которые помещали в культуральную посуду с полной питательной средой. Применение данного метода обеспечивает минимальное повреждение клеточного материала, что необходимо при работе с небольшим количеством ткани. Фрагмент опухоли отмывали и измельчали, полученные эксплантаты вместе с питательной средой осаждали в пробирках объемом 15 мл (Biofil, Китай) типа Falcon при 300 g в течение 5 минут. Весь объем среды с осадком (5 мл) переносили в культуральные флаконы с площадью поверхности 25 см² (T25, Thermo Scientific, США) и культивировали при 37°C и 5,5% CO₂.

Каждые 3–5 суток выполняли микроскопическое исследование и фотофиксацию клеток во флаконах. После образования монослоя со 100%-ной конфлюентностью на дне культурального флакона проводили снятие клеток 2,5 мл раствора трипсин-Версена в соотношении 1:2 в течение 3 минут. Клетки на первый пассаж вносили также в культуральные флаконы T25.

По достижении монослоем 100%-ной конфлюентности клетки снимали 5 мл раствора трипсин-Версена (1:2) в течение 3 минут, ингибировали ферментативное действие трипсина добавлением 5 мл питательной среды DMEM с 10% FBS, весь объем (10 мл) переносили в центрифужную пробирку и осаждали в течение 5 мин при 300 g. Клетки подсчитывали на автоматическом счетчике клеток EVE (NanoEnTek Inc., Южная Корея) с окрашиванием 0,4%-ным трипановым синим

(NanoEnTek Inc., Южная Корея) в соотношении 1:1. Половину клеток криоконсервировали в криопробирках (Greiner Bio-One International, Германия) в низкотемпературном холодильнике (-80°C) из расчета 1 мл среды для криоконсервации (90% DMEM и 10% FBS) на каждые 1×10^6 клеток. Другую помещали во флакон с площадью поверхности 75 cm^2 (T75, Thermo Scientific, США), далее культивировали.

Цитологические мазки готовили на нулевом, первом, пятом и восьмом пассажах. Препараты окрашивали по Паппенгейму, фиксатором эозин метиленовым синим по Май-Грюнвальду (МиниМед, Россия), красителем Азур-Эозином по Рамоновскому (МиниМед, Россия).

Для иммуноцитохимического исследования клетки пассировали в 6-луночные планшеты в объеме 100 тыс. клеток/лунка. Далее оценивали экспрессию глиального фибриллярного кислого белка (GFAP) и маркера пролиферативной активности (Ki-67).

После отмывки в DPBS образцы окрашивали гематоксилином, обезвоживали и заключали в среде BioMount (Bio Optica, Италия). Образцы визуализировали на микроскопе Axio Imager с использованием увеличения в 200 и в 400 раз (Zeiss, Германия).

С помощью анализа MSI (microsatellite instability – MSI) определяли спорадические нарушения системы репарации неспаренных оснований (mismatch repair-deficient, MMR), которые могли появиться в период пассирования первичных клеточных линий в сравнении с послеоперационным материалом больных. Образцы восьми пассажей каждой из первичных опухолевых клеточных линий анапластической астроцитомы ($n=5$) и глиобластомы ($n=13$) были исследованы по следующим локусам D17S250, D2S123, D5S346, NR21, NR24, NR27, BAT25, BAT26 методом ПЦР. Ампликоны разделяли с помощью капиллярного гель-электрофореза (Applied Biosystems, Калифорния, США) в соответствии с протоколами производителя. Полученные данные анализировали с помощью пакетов программного обеспечения Gene Scan Analysis и Genotyper (Applied Biosystems).

2.6 Экспериментальные исследования

Для работ по созданию PDX-моделей опухолей головного мозга использовали 65 мышей линии Balb/c Nude с SPF-статусом. Животные были получены из «SPF-вивария» ИЦиГ СО РАН (г. Новосибирск).

Мышей содержали в SPF-зоне вивария Испытательного лабораторного центра в системе IVC для мышей, BIOSCAPE в помещении с контролируемыми параметрами микроклимата (температура 22–26°C, относительная влажность воздуха 50–60%, световой режим день/ночь по 12 часов). Для экспериментальных животных использовали подстил для лабораторных животных Rehofix MK 2000. Животные получали полнорационный гранулированный экструдированный корм производства ООО «Лабораторкорм» и чистую питьевую воду. Корм и вода предоставлялись без ограничений. Клетки, подстил, корм и бутылочки с водой подвергались автоклавированию при помощи автоклава проходного типа DGM AND 300.

Для создания ксенографтов опухолей головного мозга был использован опухолевый материал, переданный в Испытательный лабораторный центр ФГБУ «НМИЦ онкологии» из отделения нейроонкологии ФГБУ «НМИЦ онкологии», полученный в ходе процедур хирургической резекции. От всех пациентов было получено письменное согласие на передачу биологического материала.

Для создания ортотопической ксеногенной модели глиобластомы с использованием суспензии опухолевых клеток выполняли инъекцию предварительно дезагрегированного при помощи гомогенизатора для тканей (BD Medimachine, США) опухолевого материала в бессывороточной среде RPMI-1640 в правое полушарие головного мозга мыши при помощи стереотаксической установки (RWD, Китай) и шприца Гамильтона (Hamilton Company, Румыния) в количестве $5\text{--}8 \times 10^5$ клеток в объеме не более 5 мкл.

Для создания ортотопической ксеногенной модели глиобластомы с использованием фрагмента донорской опухоли выполняли имплантацию в правое полушарие головного мозга мыши фрагмента опухоли размером $1,5 \times 1,5 \times 1,5$ мм.

Для создания подкожной ксеногенной модели глиобластомы фрагменты ортотопического ксенографта размером $2 \times 2 \text{ мм}^3$ имплантировали подкожно.

Все процедуры по имплантации опухолевого материала иммунодефицитным мышам выполняли с использованием инъекционной анестезии (ветеринарные препараты «Ксила», «Золетил-100» применяли в дозировках 20 мг/кг и 50 мг/кг соответственно).

Исследуемые препараты: темозоломид («Темодал»), бортезомиб («Бортезомиб»), комбинация темозоломида с бортезомибом. Исследуемые дозы: для темозоломида – 5 мг/кг, для бортезомиба – 0,25 мг/кг. Способ введения тестируемых препаратов – внутривентрикулярная инъекция, в качестве вещества-носителя использовали физиологический раствор в объеме 200 мкл для каждого введения. Режим введения препаратов – 1 раз в день. Контрольной группе с той же кратностью, что и тестируемые препараты, вводили физиологический раствор в объеме 200 мкл. Длительность введения препаратов 21 сутки, время наблюдения – 26 суток после осуществления первого введения препаратов.

Животные были поделены на 4 группы:

- группа 1 – темозоломид (n=5),
- группа 2 – бортезомиб (n=5),
- группа 3 – темозоломид+бортезомиб (n=5),
- группа 4 – контроль (физиологический раствор) (n=5).

В качестве критерия распределения по группам использовали размер опухолевого узла на момент начала введения препарата – $100 \pm 20\% \text{ мм}^3$. Животные были распределены по группам так, чтобы разброс средних значений объема опухолевых узлов между группами был минимальным.

Замеры опухолевых узлов при подкожной имплантации выполняли при помощи штангенциркуля. Размеры ксенографтов рассчитывали по формуле Шрека для эллипсоида:

$$V = a \times b \times c \times \pi / 6,$$

где V – объем опухоли (мм^3), a , b , c – максимальные диаметры эллипсоида в трех плоскостях (мм).

Приживление и рост ортотопического ксенографта оценивали по наличию экзофитного образования. Замеры и оценку динамики роста ортотопических ксенографтов не выполняли.

Критерием эффективности исследуемых препаратов и их комбинации являлись показатель торможения роста опухоли (ТРО, %) и индекс прироста опухоли (I), которые вычисляли по формулам:

$$\text{ТРО (\%)} = \frac{V_k - V_o}{V_k} * 100,$$

где V_k и V_o – средний объем опухоли (мм³) в контрольной и опытных группах соответственно.

$$I_i = V_i / V_o,$$

где I – индекс прироста опухоли, i – сутки эксперимента, V_o – объем опухоли в день начала лечения.

2.7 Статистический анализ

Статистический анализ результатов выполняли с использованием пакета прикладных статистических программ Microsoft Excel 2013 (Microsoft Corporation, США) и STATISTICA 8.0 (Stat Soft Inc., США).

Достоверность отличий в экспрессии генов/микроРНК в опухолевой ткани сравнительно с условно-здоровой определяли с помощью непараметрического W-критерия Уилкоксона. Оценку различий в уровнях экспрессии между группами пациентов проводили с использованием непараметрического U-критерия Манна – Уитни.

Глава 3

СОВРЕМЕННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В ОПЕРАТИВНОМ ЛЕЧЕНИИ ОПУХОЛЕЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА

Пациенты, вошедшие в исследование, получали хирургический компонент лечения (таблица 3.1) в отделении нейроонкологии ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России.

Таблица 3.1 – Объем оперативных вмешательств, абс. ч. (%)

Объем операции	ДА (n=87)	АА (n=51)	ГБ (n=157)	ОДГ (n=13)	АОДГ (n=6)
Стереотаксическая биопсия	22 (25,3)	28 (54,9)	54 (34,4)	-	-
Открытая биопсия	-	1 (1,95)	-	-	-
Частичное удаление опухоли	-	1 (1,95)	3 (1,9)	-	-
Субтотальное удаление опухоли	-	16 (31,4)	30 (19,1)	-	-
Тотальное удаление опухоли	65 (74,7)	5 (9,8)	70 (44,6)	13 (100,0)	6 (100,0)
Всего	87 (100,0)	51 (100,0)	157 (100,0)	13 (100,0)	6 (100,0)

Предположение о наличии у больного глиальной опухоли строилось на стандартных МРТ-признаках. Исследование выполнялись на магнитно-резонансном томографе Signa HD (производства Дженерал Электрик, США), генерирующем магнитное поле с индукцией 1,5 Тесла. Результаты МРТ-исследований передавались в отделение нейроонкологии для планирования оперативного вмешательства.

Программный продукт StealthViz[®], позволяющий осуществить реконструкцию диффузного тензора в условиях предоперационного планирования в стационаре, предоставлен в комплексе с навигационной системой Medtronic StealthStation[®] S7[®], интегрированной в нейрохирургический операционный блок (StealthViz with Stealth DTI Application Reference Guide Part Number 9733786, revision 4, StealthViz on StealthStation[®] Planning Station (Linux) and Synergy Cranial on StealthStation[®] S7[®]). StealthViz[®] для хирургического планирования позволял импортировать наборы данных DICOM, осуществлять обзор изображений в 2D, 3D, выполнять слияния изображений, сегментировать структуры и

экспортировать результаты в PACS или StealthStation™ системы для отображения во время операции (рисунок 3.1). Данная технология широко использовалась нами в обеспечении безопасности оперативного вмешательства в непосредственной близости к функционально значимым зонам, обычно в комбинациях с нейрофизиологическим мониторингом и пробуждением больного при локализации опухоли в зонах Вернике или Брока (рисунок 3.2).

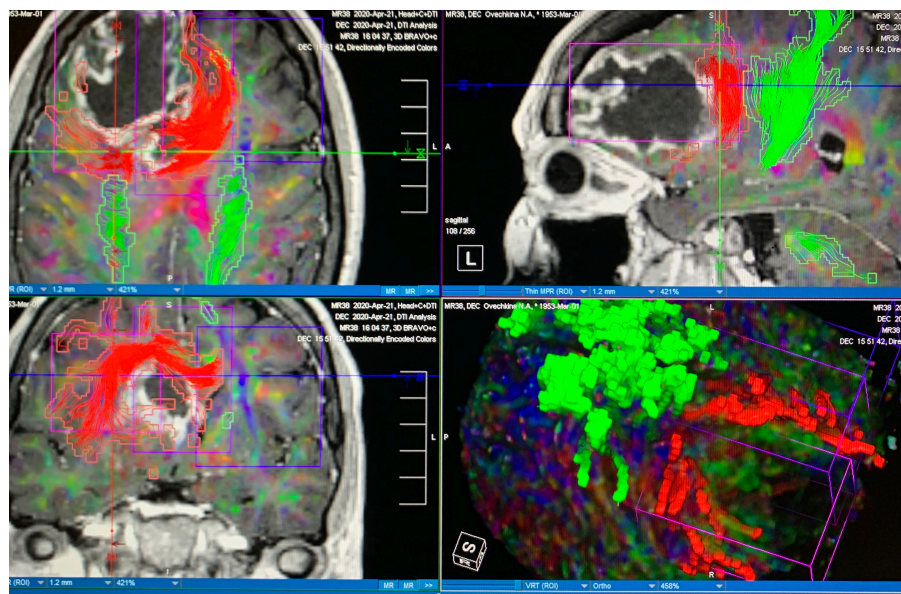


Рисунок 3.1. Глиобластома левой лобной доли с ростом в коллено мозолистого тела. Красным цветом показаны комиссуральные связи между лобными долями. По данным трактографии определяется прорастание трактов. Зеленым цветом выделены проекционные связи: кортикоспинальный тракт

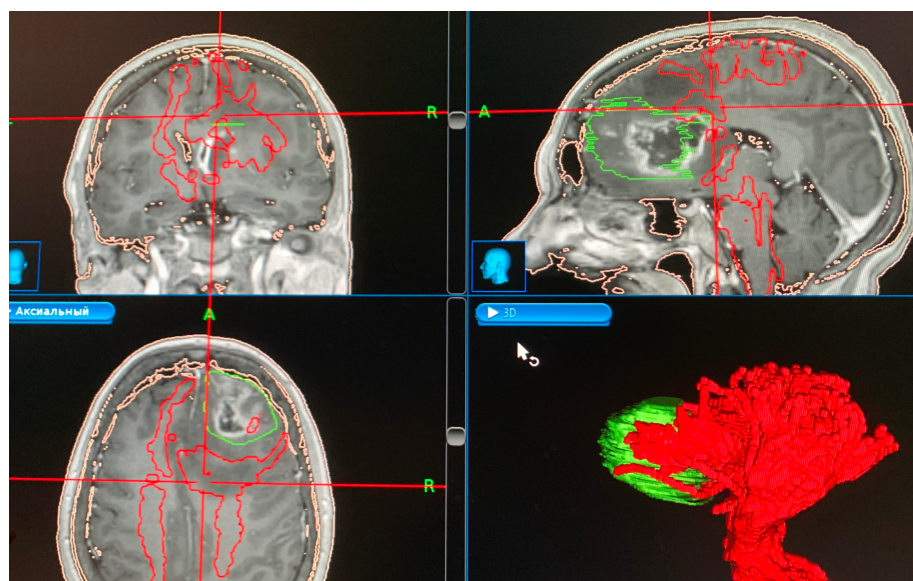


Рисунок 3.2. Загруженные в навигационную систему Medtronic StealthStation® S7® границы комиссуральных и проекционных трактов выделены красным цветом, опухоль – зеленым цветом. Вид на мониторе навигационной системы Medtronic и в дополненной реальности микроскопа Karl Zeiss Omni Pentero

Роль стереотаксической биопсии (СТБ) головного мозга в диагностике и оценке патоморфоза первичных и вторичных опухолей головного мозга неуклонно возрастает (Кит О.И. и соавт., 2015). СТБ опухолей головного мозга позволяет максимально малоинвазивным путем верифицировать диффузные и глубинно расположенные опухоли головного мозга. Цель биопсии – наиболее васкуляризированный участок патологической ткани. Точку забора ткани определяли методом совмещения MRT BRAVO с DTI, 2D-TOF, 3D-TOF, PC, T2*, ASL, 1H, SWAN режимами (рисунок 3.3). При необходимости исследование в системе Medtronic StealthStation[®] S7[®] совмещалось с данными ПЭТ КТ с 11C-метионином, траектория также учитывала данные DTI при локализации опухоли в функционально значимых зонах головного мозга.

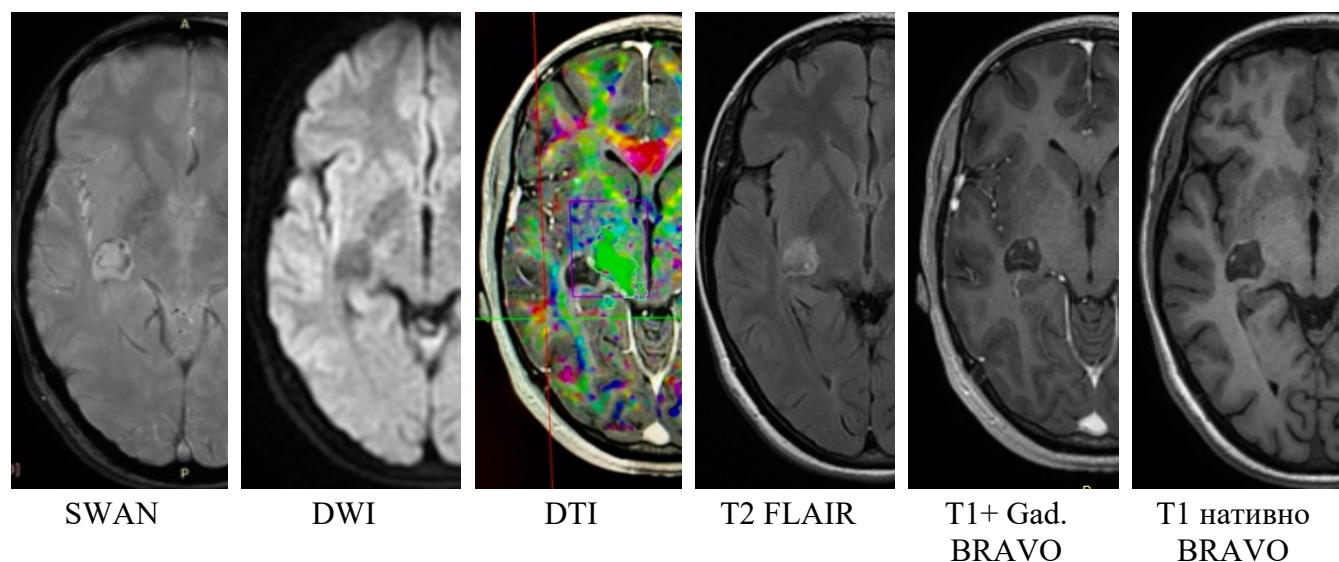


Рисунок 3.3. МР-перфузия (T2*, ASL) в выборе мишени для стереотаксической биопсии. Участкам гиперперфузии соответствует максимальная малигнизация опухоли

Оперативное вмешательство выполнялось в условиях общей анестезии. Контрольная компьютерная томография выполнялась в течение 24 часов после операции. Учитывая отсутствие визуального интраоперационного контроля траектории иглы к расчетной точке, иногда встречаются послеоперационные осложнения различной степени тяжести, даже приводящие к фатальному исходу (Kit O.I. et al., 2018).

В международном исследовании «Complications following stereotactic needle biopsy of intracranial tumors», оконченом в 2017 году проанализировано

7514 пациентов после СТБ (Malone J. et al., 2017). Наиболее частым осложнением, по данным этого исследования СТБ, являлось внутримозговое кровоотечение, которое было диагностировано у 5,8% пациентов. Такие осложнения, как послеоперационное инфицирование (0,1%) и осложнения, связанные с областью послеоперационной раны (0,2%), встречались редко. Факторы риска кровоотечения в данном исследовании достоверно ассоциированы с возрастом выше 40 лет, гидроцефалией и отеком головного мозга. Стационарная смертность составила 2,8%.

В ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России метод СТБ диффузных и глубоко расположенных опухолей головного мозга внедрен с 2015 года. Нами проведено 104 оперативных вмешательства. Средний возраст больных составил $51,2 \pm 10,4$ года. Женщины составляли 57% наблюдений. С одиночными очагами оперировано 40% пациентов, с двумя очагами – 15%, 45% пациентов имели множественное не верифицированное поражение. Новообразования в 28,3% наблюдений локализовались в подкорковых структурах головного мозга, в 18,3% – различных отделах мозолистого тела с двусторонним распространением, в 53,4% случаях в перивентрикулярных областях под функционально значимыми зонами головного мозга. Неврологическая симптоматика зависела от локализации очага поражения в головном мозге. Всем больным в дооперационном периоде проводилась комплексная оценка системы гемостаза.

Несмотря на трудности установления морфологического диагноза (недостаточное количество материала, бидермальность глиом, субъективная степень установки анаплазии опухоли, высокая зависимость диагноза от человеческого фактора), новообразования морфологически верифицированы во всех случаях. В 4 случаях (6,66%) в ближайшем послеоперационном периоде было выявлено формирование массивных внутримозговых гематом, что потребовало выполнения срочных оперативных вмешательств, включающих удаление гематомы и циторедукцию опухоли, обычно локализованной в функционально значимой зоне головного мозга. Один пациент (1,66%) умер в ближайшем послеоперационном периоде (рисунок 3.4).

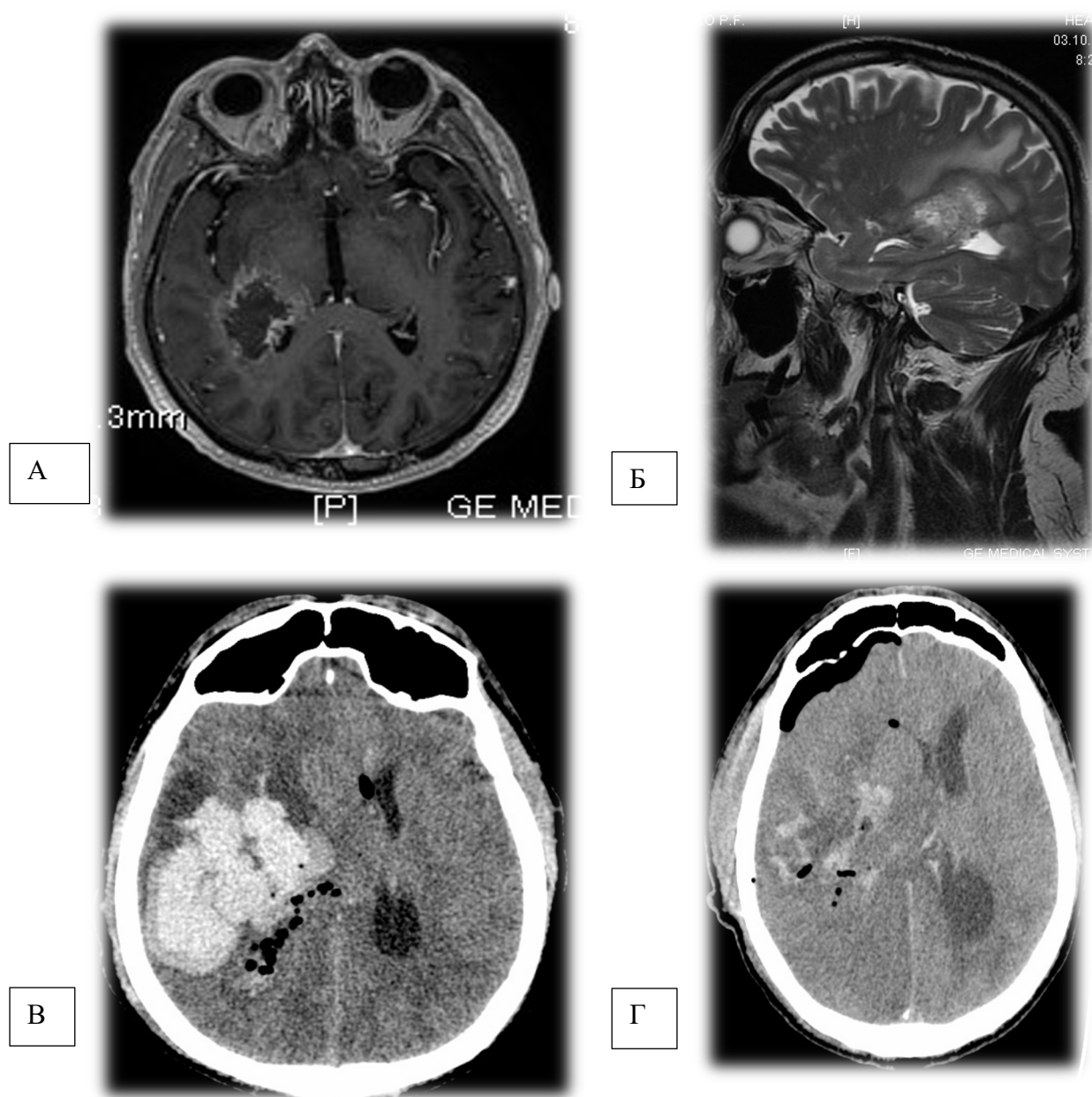


Рисунок 3.4. Больной Т., 67 лет. А–Б-данные МРТ-нейровизуализации опухолевого поражения, госпитализирован 07.10.2016 г. с диагнозом опухоль височной, теменной доли и островка с распространением на таламический бугор. 10.10.2016 выполнена стереотаксическая биопсия Гистологическое исследование: глиобластома. В ближайшем послеоперационном периоде пациент находился в сознании. Через 7 часов после окончания операции у пациента отмечено внезапное угнетение сознания до комы I, появление правосторонней анизокории с последующим регрессом, быстрым появлением развития вторичных ишемических стволовых повреждений в виде выпадения фотореакции зрачков, выпадения окулоцефалических рефлексов. Выполнена РКТ головного мозга, выявлено обширное кровоизлияние (В) в области опухоли с распространением в височную и теменную доли головного мозга, прорыв крови в желудочковую систему головного мозга, выраженный латеральный дислокационный синдром влево, вторичные ишемические повреждения головного мозга. Взят в операционную по жизненным показаниям, гематома и опухоль удалена. Смерть 12.10.2016.

Оценка возможных факторов риска массивных послеоперационных кровоизлияний после СТБ в нашей серии не выявлена. Все больные были с начальным баллом по шкале Карновского выше 70 баллов, без нарушений гемостаза в дооперационном периоде. После гистологической верификации два наблюдения обширных кровоизлияний были ассоциированы с лимфомой ЦНС, два других с глиобластомой (Росторгуев Э.Е., 2018).

Для профилактики инфекционных осложнений, связанных с послеоперационной раной, включая раневую ликворею, нами разработан способ закрытия костного дефекта после выполнения стереотаксических вмешательств на головном мозге (рисунок 3.5).

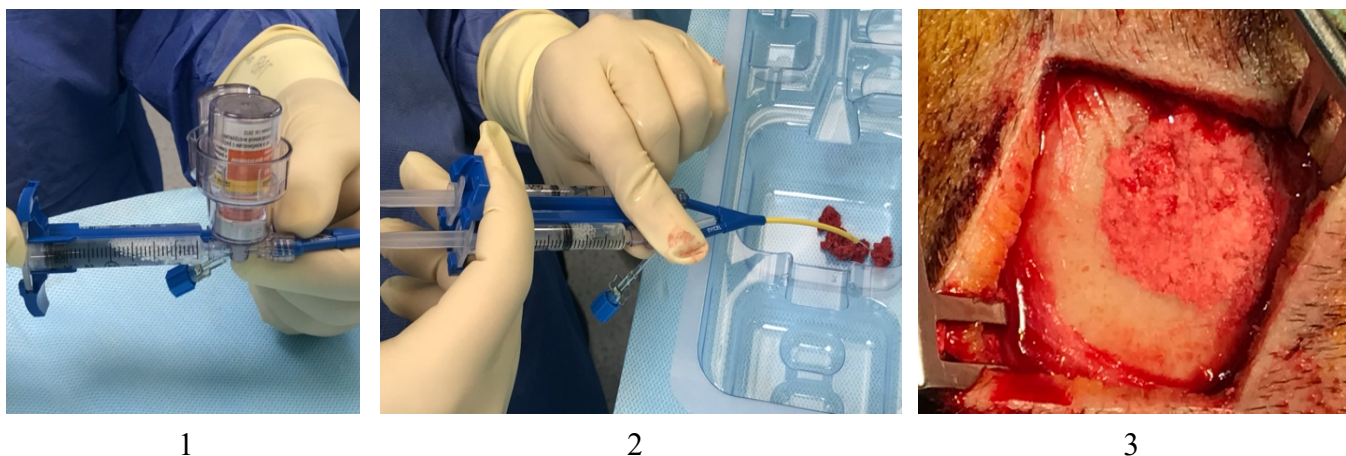


Рисунок 3.5. Этапы изготовления смеси костной стружки и фибриноген-тромбинового клея Ивисел® (Evisel) для герметизации костного окна. 1 – приготовление клея Ивисел®; 2 – смешивание клеевой композиции с костной стружкой; 3 – герметизация костного дефекта полученной смесью

После выполнения забора опухолевой ткани через фрезевое отверстие, приготовленный согласно инструкции фибриноген-тромбиновый клей Ивисел® (Evisel) соединяли с костной стружкой, полученной во время операционного доступа. Полученной смесью выполняли герметичное закрытие костного дефекта с последующим сшиванием мягких тканей. Данный способ обеспечивал надежную герметизацию полости черепа, предупреждая развитие раневых осложнений в раннем и позднем послеоперационном периоде (Кит О.И., Росторгуев Э.Е., Кузнецова Н.С., 2019). Эта методика легла в основу патента РФ №2715191 от 25.02.2020.

Открытая хирургия использовалась нами в решении вопросов циторедуктивного удаления глиальных опухолей. Для достижения необходимых результатов в арсенале исследования использовался операционный микроскоп «Carl Zeiss» OPMI PENTERO с блоком флюоресценции, навигационная система Medtronic StealthStation[®] S7[®], операционный стол с системой жесткой фиксации головы и регулируемой гравитационной тракцией; высокоскоростной электрический краниотом с набором дрелей различных конфигураций и диаметров и набором боров; холодноплазменный и высокочастотный радиохирургический коагулятор. Для хирургии использовались набор микроинструментов и ультразвуковой аспиратор. Объем циторедукции определялся в соответствии с рекомендациями NCCN (Guidelines Version 1.2018, Central Nervous System Cancers), рассчитанный методом волюметрии на послеоперационных МРТ с контрастным веществом. Последний обозначался как тотальное удаление, субтотальное удаление, частичное удаление, открытая биопсия и игольчатая стереотаксическая биопсия. Под макроскопически тотальным удалением понималась резекция опухоли 95% и более, под субтотальным – 80–94%, частичным – 79–50% и открытой биопсией – <50%.

В связи со снижением двигательной активности у больных с опухолями головного мозга, частота встречаемости вторичных тромбоэмболических осложнений (ВТЭО), по нашим данным, в предоперационном периоде достаточно высокая и составляла 16,6% (Кательницкая О.В. и соавт., 2017). При этом жалобы на боли и отеки нижних конечностей, наличие варикозно расширенных вен предъявляли лишь 15 больных (5%). Все больные с риском ВТЭО использовали госпитальный трикотаж на период госпитализации. Антикоагулянтная профилактика (фондапаринукс 2,5 мг в сутки) начиналась с 3-х суток послеоперационного периода при низком геморрагическом риске (95,5% больных). Контроль развернутой коагулограммы выполнялся на 3-и и 7-е сутки после операции. При повышении уровня D-димеров повторяли УЗТС вен нижних конечностей. ВТЭО в послеоперационном периоде диагностировали у

45 больных (14,3%): сегментарный тромбоз глубоких вен голени у 21 пациента (6,7%) и рецидив тромбоза в 10 случаях (3%). Геморрагических осложнений, обусловленных применением антикоагулянта, в нашей серии наблюдений не выявлено.

Таким образом, тщательное предоперационное обследование на наличие ВТЭО у нейрохирургического больного оправдано высокой частотой встречаемости тромботических осложнений. Активный поиск ВТЭО на амбулаторном и стационарном этапе оказания помощи с использованием лабораторных маркеров тромбинемии и ультразвукового исследования венозной системы нижних конечностей позволял резко снизить частоту тромботических осложнений в отделении нейроонкологии (Katelnitskaya O.V. et al., 2019).

Адьювантная дистанционная лучевая терапия начиналась в сроки от 2-х до 4-х недель после операции. Больные с глиальными новообразованиями головного мозга подвергались дистанционной конформной лучевой терапии на линейном ускорителе «Novalis Tx» (Varian, США) или «Unique» (Varian, США).

МРТ головного мозга выполнялось непосредственно перед началом лучевой терапии. Интервал между исследованием и началом лучевой терапии не превышал 5 дней.

Все наборы изображений были сопоставлены и объединены в программах iPlan/ELEMENTS, BrainLab. Контроль над объединением осуществлял радиотерапевт. Разовая очаговая доза составляла (РОД)=2–3 Гр. При глиомах низкой степени злокачественности GII СОД составляла 50–54 Гр, при глиомах GIII–GIV – СОД 60 Гр. Сеансы лучевой терапии проводились 1 раз в день, 5 дней в неделю, от 18 до 30 фракций. Лучевая терапия сопровождалась приемом темозоломида в дозировке 70 мг/м² в дни лечения.

Пациенты с глиобластомами, анапластическими астроцитомами, диффузными астроцитомами в 1-й линии терапии получали лечение по схеме:

Темозоломид в режиме 5/23: 150–200 мг/м² – дни 1–5; каждые 28 дней, от 2 до 12 циклов в зависимости от продолжительности жизни.

Эффективность терапии глиобластом представлена в таблице 3.2.

Таблица 3.2 – Ответ на терапию, абс. ч. (%)

Ответ на терапию 1-й линии	ДА (n=87)	АА (n=51)	ГБ (n=157)	ОДГ (n=13)	АОДГ (n=6)
Полный	12 (13,8)	4 (7,8)	3 (1,9)	3 (23,1)	-
Частичный	20 (23,0)	6 (11,8)	29 (18,5)	2 (15,4)	-
Стабилизация	32 (36,8)	17 (33,3)	45 (28,6)	3 (23,1)	1 (6,7)
Прогрессирование	23 (26,4)	24 (47,1)	80 (51,0)	5 (38,4)	5 (83,3)
Всего	87 (100,0)	51 (100,0)	157 (100,0)	13 (100,0)	6 (100,0)

Поскольку одной из основных задач работы был поиск предикторов положительного и отрицательного прогноза течения злокачественных опухолей головного мозга, нам при использовании материала для молекулярно-генетических исследований необходимо было учитывать значения медианы выживаемости больных в зависимости от гистологического типа опухоли (рисунки 3.6–3.8).

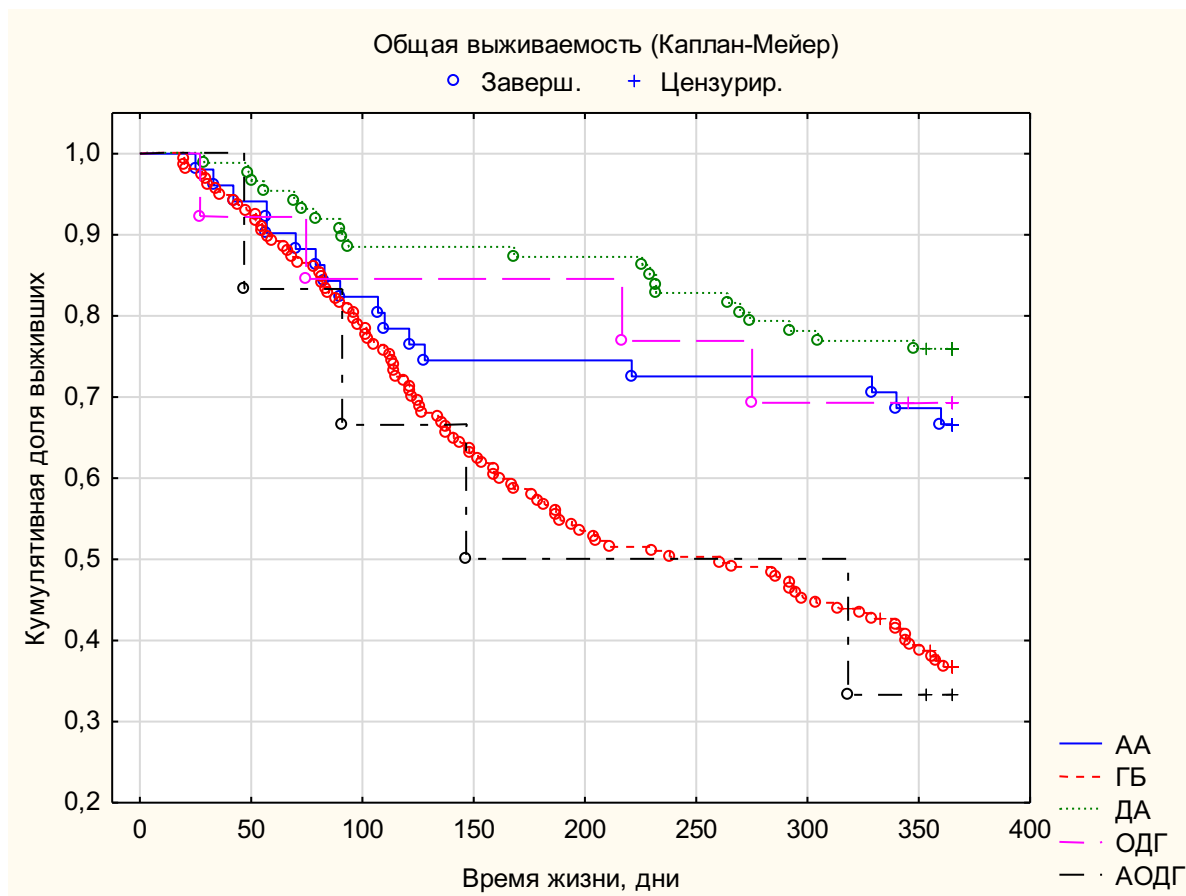


Рисунок 3.6. 1-летняя общая выживаемость больных

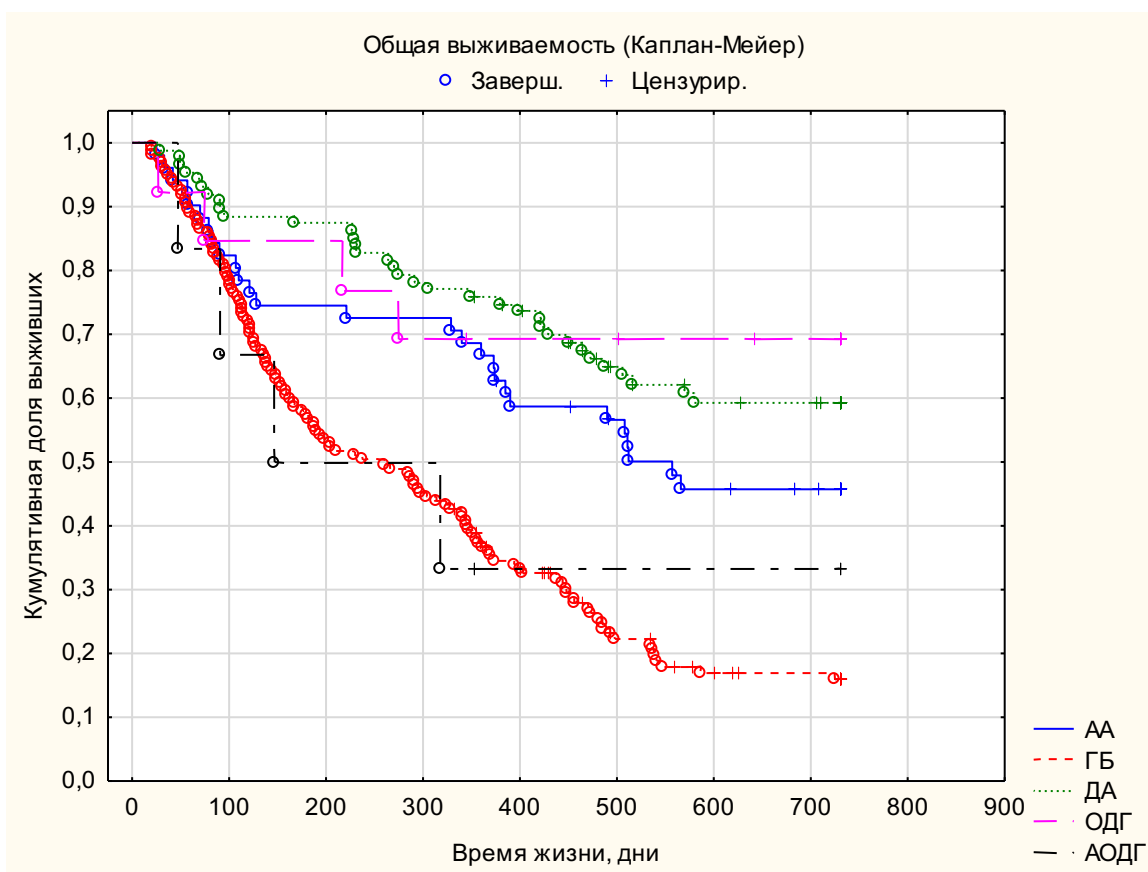


Рисунок 3.7. 2-летняя общая выживаемость больных

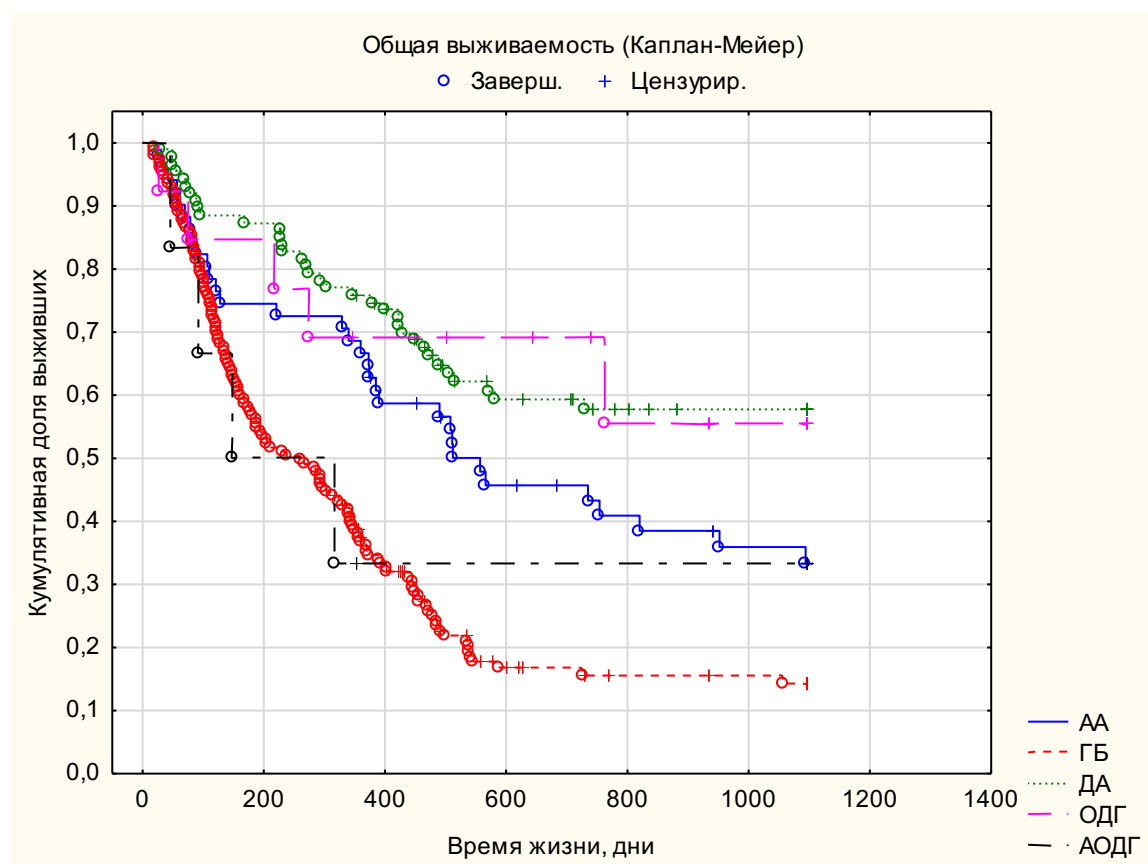


Рисунок 3.8. 3-летняя общая выживаемость больных

Анализируя графики выживаемости больных, мы смогли сразу определить наиболее благоприятно протекающие опухоли: ДА и ОДГ, медиана выживаемости которых в нашем исследовании не была достигнута. Анапластические астроцитомы текли менее благоприятно – медиана выживаемости составила 510 дней. Крайне неблагоприятный прогноз имели глиобластомы и анапластические олигоастроцитомы и олигодендроглиомы: медиана выживаемости – 240 и 149 дней, соответственно.

Таким образом, оценка результатов лечения больных со злокачественными опухолями головного мозга показала крайне низкую эффективность известных методик лечения: хирургического, лучевого, химиотерапии. Даже комбинации этих методов не привели в нашем исследовании к желаемому результату – увеличению продолжительности жизни больных. Проведенный анализ ближайших и отдаленных исходов лечения доказал необходимость поиска новых таргетных мишеней и маркеров эффективности терапии, который мы выполнили в дальнейших наших исследованиях, используя паспортизированный биологический материал сформированного биобанка.

Глава 4

ИНТЕГРАТИВНЫЙ АНАЛИЗ ТРАНСКРИПЦИИ мРНК и микроРНК В ГЛИАЛЬНЫХ ОПУХОЛЯХ ГОЛОВНОГО МОЗГА. ДАННЫЕ TCGA

4.1 Исследование генной экспрессии в глиальных опухолях разной степени злокачественности по данным TCGA

На основании данных открытой базы TCGA было сформировано пять основных групп образцов: диффузная астроцитома (ДА, GII), анапластическая астроцитома (АА, GIII), олигодендроглиома (ОДГ, GII), анапластическая олигодендроглиома (АОДГ, GIII) и глиобластома (ГБ, GIV), подвергнутых РНК- и микроРНК-секвенированию (TCGA-GBM и TCGA-LGG), а также микрочиповому анализу микроРНК (для глиобластом) (см. таблицу 2.6). В качестве образцов сравнения использовали условно нормальные ткани головного мозга (n=15).

В общей сложности было проанализировано 939 образцов глиальных опухолей. Для изучаемых подтипов глиом определена дифференциальная экспрессия генов (ДЭГ), суммарное количество которых приведено в таблице 4.1.

Таблица 4.1 – Дифференциально экспрессирующиеся гены и микроРНК в различных подтипах глиом

Показатель	ДА GII	ОДГ GII	АА GIII	АОДГ GIII	ГБ GIV
Количество ДЭГ	3392	2723	3387	2896	4815
logFC>1, p<0,05	1988	1051	1400	1158	2324
logFC <-1, p<0,05	1404	1672	1987	1738	2491
Количество ДЭ-миРНК	372	317	484	440	69
logFC >1, p<0,05	242	212	344	316	32
logFC <-1, p<0,05	130	105	140	124	37

При сравнении с неопухолевыми образцами в общей сложности было выявлено 3392 ДЭГ для ДА GII и 3387 ДЭГ для образцов АА GIII. В aberrantном профиле опухолей преобладали случаи повышения транскрипционной активности в образцах ДА GII (1988 vs 1404) и, напротив, снижения экспрессии в образцах

АА GIII (1400 vs 1987). В группе ГБ GIV с повышенной экспрессией дифференцировалось 2324 гена, а с пониженной – 2491 ген. Несколько меньшее количество дифференциально-экспрессируемых генов было описано для олигоденроглиом (таблица 4.1): 2723 ДЭГ в образцах олигодендроглиомы и 2896 в образцах анапластической олигодендроглиомы при сравнении с неопухолевыми образцами. Для двух подтипов глиальных опухолей преобладали ДЭГ с пониженной экспрессией: 1672 vs 1051 гена с повышенной регуляцией для ОДГ GII и 1738 vs 1158 для АОДГ GIII.

На рисунке 4.1 проиллюстрировано распределение генов, дифференциально экспрессирующихся либо во всех проанализированных опухолях, либо в некоторых подтипах, либо специфично для каждого подтипа.

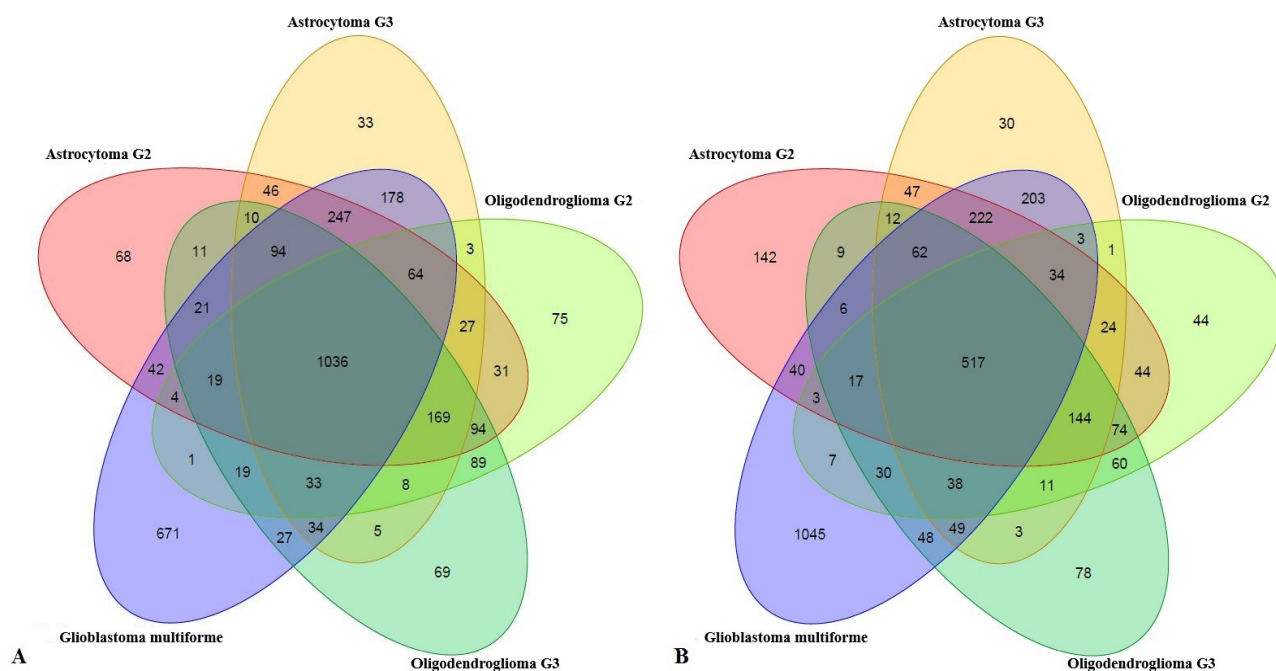


Рисунок 4.1. Распределение ДЭГ по 5 подтипам глиальных опухолей. А – ДЭГ $FC < -1$. В – ДЭ-микроРНК $FC > 1$

В итоге выявлено 1036 и 517 универсальных ДЭГ, соответственно понижающих и повышающих свою транскрипционную активность в образцах глиальных опухолей. Из 1553 неспецифичных ДЭГ наиболее представленными являются участники следующих сигнальных путей: «Calcium signaling», «MAPK signaling», «Oxytocin signaling», «Neuroactive ligand-receptor». Данные сигнальные пути могут опосредовать активность нейронных сетей и пролиферацию клеток.

Более выраженное перекрытие aberrantных ДЭГ наблюдали между группами глиобластом (GIV), диффузных астроцитом (GII), анапластических астроцитом (GIII). При оценке генетической онтологии ДЭГ астроцитом в целом были выявлены гены, ассоциированные с сигналингом «EIF2», «Axonal Guidance», «Neuropathic Pain Signaling In Dorsal Horn Neurons» (таблица 4.2). Кроме того, для диффузных астроцитом GIII определены ДЭГ, ассоциированные с «G-Protein Coupled Receptor», «cAMP-mediated» сигналингом, для анапластических астроцитом – ассоциированные с сигналингом «Role of NFAT in Cardiac Hypertrophy» и «Synaptic Long Term Potentiation».

Анализ генетической онтологии ДЭГ (таблица 4.2) выявил общие для олигодендроглиом значимые сигнальные пути «EIF2», «mTOR», «Dopamine-DARPP32 Feedback in cAMP Signaling» и специфичные для каждого подтипа. В топ-5 сигнальных путей олигодендроглиомы GII вошли «Axonal Guidance Signaling» и «Neuropathic Pain Signaling In Dorsal Horn Neurons»; анапластической олигодендроглиомы GIII – «G-Protein Coupled Receptor Signaling» и «Synaptic Long Term Potentiation». Отметим сигналинг «Synaptic Long Term Potentiation», aberrantное изменение транскрипции ДЭГ которого становится значимым на более продвинутой стадии GIII как астроцитом, так и олигодендроглиом (таблица 4.2).

Для глиобластом топ-5 сигнальных путей составляют «Axonal Guidance Signaling», «Signaling by Rho Family GTPases», «Breast Cancer Regulation by Stathmin1», «Molecular Mechanisms of Cancer» и «IL-8 Signaling». При этом 4 (последних) сигнальных пути дискриминируют GBM в отдельную группу.

На основании данных первичного скрининга, был сформирован пул генов, дифференциальная экспрессия которых не только уникальна для каждого подтипа, но и коррелирует с общей выживаемостью пациентов. Полученная панель включает 26 ДЭГ, уникальных для ДА GII; 15 ДЭГ – для АА GIII; 17 ДЭГ – для ОДГ GII; 7 ДЭГ – для АОДГ GIII и 151 для ГБ. В таблице 4.3 приведена краткая характеристика уникальных, связанных с выживаемостью ДЭГ, которые ранее не упоминались в исследованиях по глиальным опухолям.

Таблица 4.2 – Сигнальные пути, входящие в топ-5 и ассоциированные с дифференциальной экспрессией генов в профилях экспрессии первичных глиальных опухолей

[illegible]

Таблица 4.3 – Дифференциальная экспрессия генов (ДЭГ), ассоциированных с выживаемостью

Ген	Log FC	Функция	Ассоциация ДЕГ с выживаемостью *	Данные о связи ДЕГ с выживаемостью для других нозологий
Диффузная астроцитома				
ZNF642	1,2	Транскрипционный фактор	Прямая	Прямая при раке эндометрия (ТНРА)
C19orf18	2,3	Транскрипционный фактор	Прямая	Прямая при тестикулярном раке и раке эндометрия (ТНРА)
LUZP2	2,5	Ген, экспрессия которого специфичная для спинного и головного мозга	Прямая	-
SEPHS1	1,1	Синтез селенцистеина	Прямая	Обратная при раке почки, прямая при раке поджелудочной железы (ТНРА)
PLBD2	-1,1	Вероятно, фосфолипаза B-like 2	Обратная	Обратная при раке почки (ТНРА)
PCDHGA9	-2	Са-зависимая межклеточная адгезия	Обратная	Прямая при раке желудка (Weng J, 2018)
HSPA4L	-1,2	Белок-шоперон, ингибирует агрегацию ацетат-синтазы	Обратная	Прямая при раке почки, обратная при уротелиальном раке
Анапластическая астроцитома				
CEP110	1,2	Формирование centrosомы	Обратная	Обратная при раке головы и шеи (ТНРА)
C2orf50	-2,5	-	Обратная	-
DHRS11	-1	Дегидрогеназа/редуктаза	Обратная	Обратная при раке почки (ТНРА)
MGC45800	-2,9	Некодирующая РНК	Обратная	Обратная при раке легкого (Park S.M., 2018)
Диффузная олигодендроглиома				
DCAF12L2	-2,2	Участвует в регуляции клеточного цикла, апоптоза и экспрессии генов	Прямая	-
Анапластическая олигодендроглиома				
HKDC1	3,1	Гексокиназная активность	Прямая	-
LOC283392	-2,2	-	Прямая	-
RPS6KA1	-1	Серин/треонин киназная активность	Обратная	Прямая при раке эндометрия, почки, желудка и обратная при уротелиальном раке (ТНРА)

Глиобластома				
ANKRD16	-1,2	Модификация тРНК	Прямая	Обратная при раке почки, обратная при раке поджелудочной железы
FRY	-1,8	Негативная регуляция каталитической активности	Прямая	Прямая при раке почки (ТНРА)
CEP97	-1	Связывание белков	Прямая	Прямая при раке шейки матки
SLC2A11	-1,3	Трансмембранный транспорт глюкозы	Прямая	Прямая при раке почки, поджелудочной железы
ADAT3	1,3	тРНК-специфичная аденозин ³⁴ деаминазная активность	Прямая	Прямая при раке желудка, головы и шеи
TMED9	1,1	Связывание синтаксина	Обратная	Обратная при раке почки
LOC407835	1,2	МАРКК активность (псевдоген)	Прямая	-

Примечание. * – по данным нашего исследования

4.1.1 Дифференциальная экспрессия генов в опухолях пациентов с диагнозом диффузная астроцитома GII

При сравнении с неопухолевыми образцами в общей сложности было выявлено 3392 ДЭГ для диффузных астроцитом GII (ДА). В aberrantном профиле опухолей преобладали случаи повышения транскрипционной активности в образцах ДА GII (1988 vs 1404) (таблица 4.1, рисунок 4.2).

К топ-10 ДЭГ с повышенной активностью для ДА отнесли мРНК генов *KDM1A*, *MDF1*, *MSI1*, *TET1*, *AIM2*, *MSI2*, *LPL*, *RPL13AP3*, *RPE65*. Топ-10 генов с обратной активностью возглавили *CIQL3*, *RXFP1*, *KDM1B*, *KLHL1*, *ATP8A2*, *KIAA1239*, *KCNV1*, *MCHR2*, *CARTPT*, *KLK7* (рисунок 4.2).

Дифференцирующие ДА 210 ДЭГ участвуют в биологических процессах трансляционной элонгации, сенсорного восприятия запахов, химических стимулов и синаптической передачи. Располагаются белки выявленных ДЭГ преимущественно в рибосомах, цитозоле, клеточной мембране. Рассматривая категории молекулярной функции, выявленные ДЭГ можно отнести к поддержке активности обонятельных рецепторов, ионных каналов, трансмембранной транспортной активности, как активной, так и пассивной (рисунок 4.3).

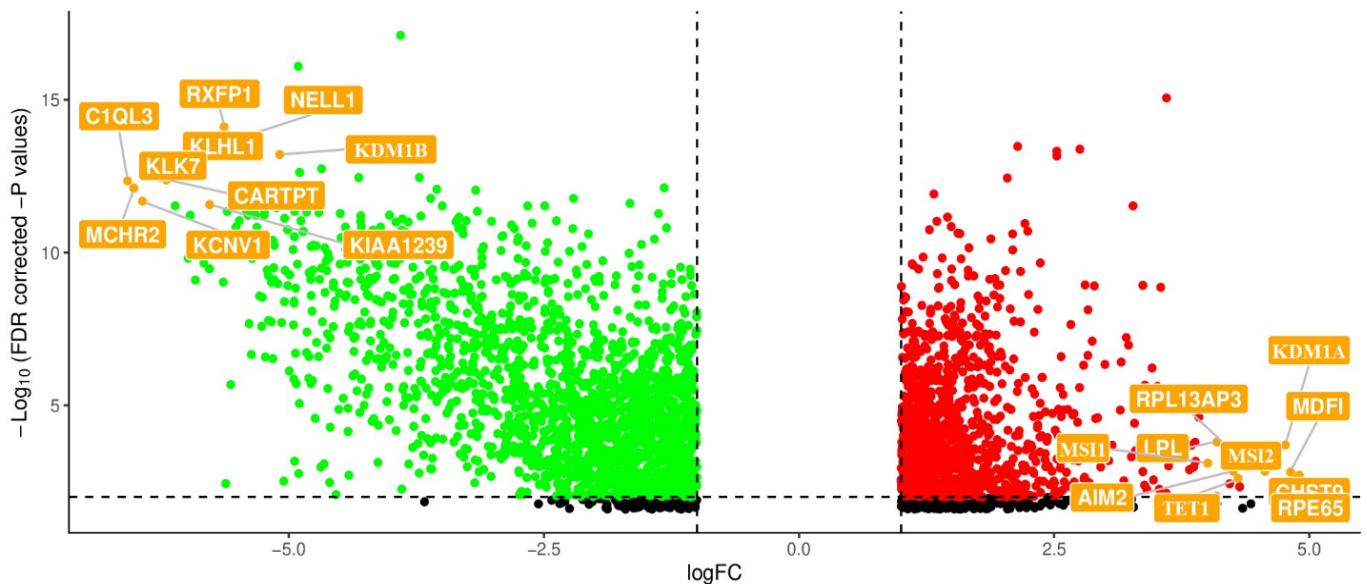


Рисунок 4.2. График рассеивания дифференциальной экспрессии генов диффузной астроцитомы. Ось абсцисс представляет $\log_{FC}$, ось ординат представляет $-\log_{10}(P - \text{значение с FDR поправкой})$. Красным и зеленым цветом отмечены гены с $\log_{FC} > 1$ и $\log_{FC} < -1$ при $p\text{-value} < 0,05$ соответственно. Подписями обозначены топ-10 генов с пониженной/повышенной экспрессией

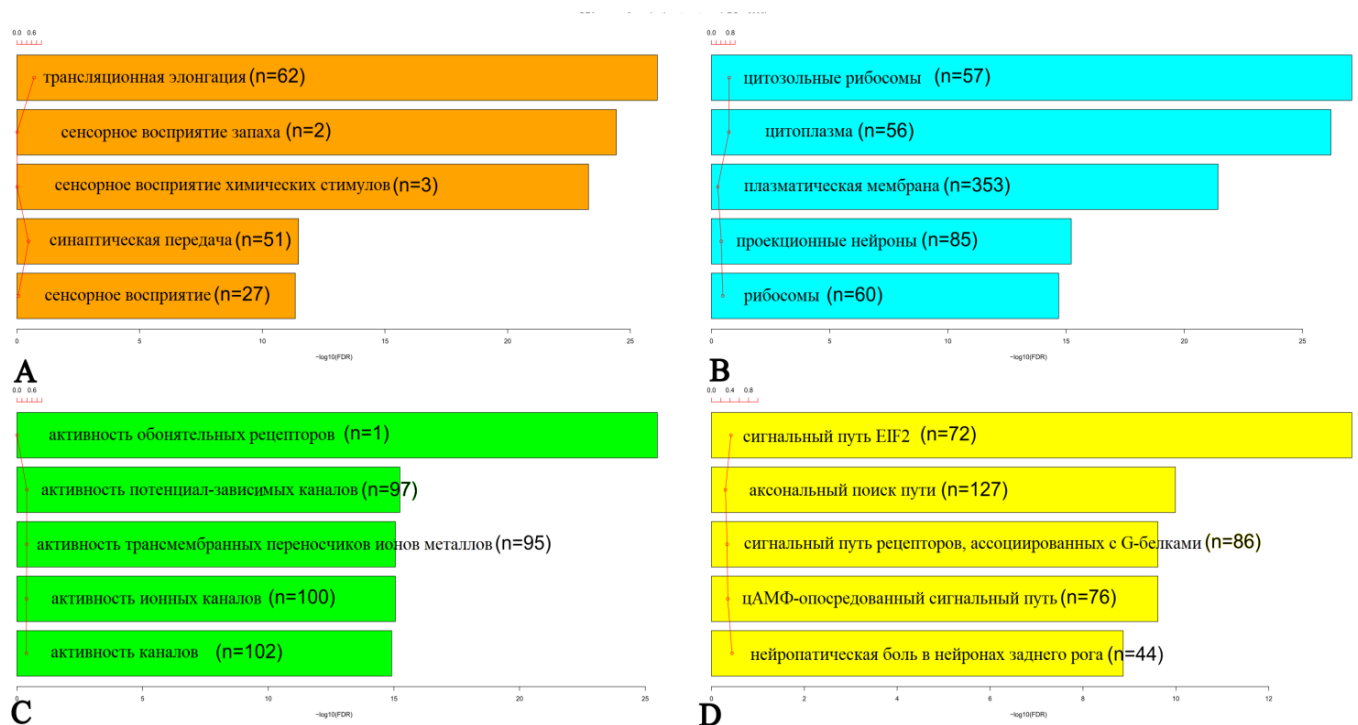


Рисунок 4.3. Генная онтология ДЭГ, уникальных для диффузной астроцитомы. Биологические процессы (A); Клеточные компоненты (B); Молекулярные функции (C); Сигнальные пути (D)

Для каждого подтипа опухолей был проведен анализ ассоциаций ДЭГ с выживаемостью пациентов. Для ДА выявлено 360 дифференциально-экспрессируемых генов, ассоциированных с выживаемостью пациентов. По

данным однофакторного регрессионного анализа, число генов, определяющих выживаемость пациентов, сократилось до 219. Гены, коррелирующие с выживаемостью, были кластеризованы в зависимости от уровня значимости PPI (белок-белковые взаимодействия по STRING DB) (рисунок 4.4). Для диффузных астроцитом выявлено 6 кластеров белок-белковых взаимодействий.

Среди выявленных ДЭГ, ассоциированных с выживаемостью, – 16 генов были уникальны только для диффузной астроцитомы (таблица 4.4). Часть из них ($HR < 1$) обладала протективным эффектом, т.е. повышение их экспрессии связано с увеличением выживаемости; 8 ДЭГ ($HR > 1$) реализуют опухолестимулирующий эффект, о чем можно судить по повышению их экспрессии, сопряженной с прогрессированием опухоли и снижением выживаемости.

Таблица 4.4 – Однофакторный анализ уникальных для диффузной астроцитомы ДЭГ, ассоциированных с общей выживаемостью

Ген	Однофакторный анализ	
	HR	p
<i>ZNF642</i>	0,27	0,008
<i>C19orf18</i>	0,05	0,034
<i>LUZP2</i>	0,30	0,031
<i>PCDH15</i>	0,05	0,02
<i>SEPHS1</i>	0,27	0,03
<i>GSTM2</i>	0,06	0,04
<i>KDM1B</i>	0,37	0,028
<i>PLBD2</i>	4,68	0,005
<i>PCDHGA9</i>	1,73	0,01
<i>TET1</i>	2,16	0,032
<i>HSPA4L</i>	3,88	0,002
<i>MSI1</i>	2,11	0,012
<i>SERINC3</i>	2,30	0,012
<i>KDM1A</i>	2,28	0,002
<i>MSI2</i>	1,63	0,032

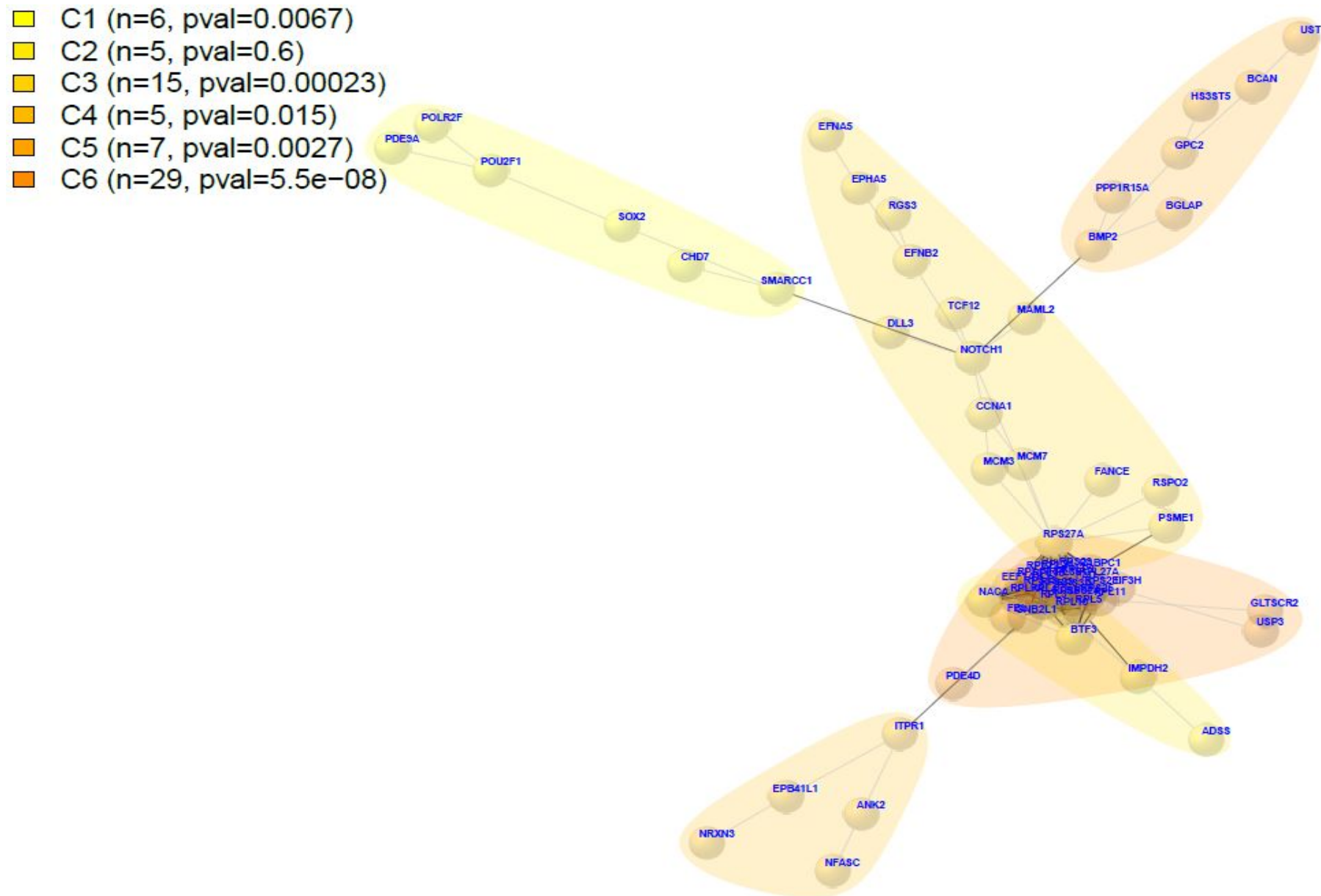


Рисунок 4.4. Интерактомный анализ генов, ассоциированных с выживаемостью пациентов при диффузной астроцитоме, кластеризованных в зависимости от p-value PPI

4.1.2 Дифференциальная экспрессия генов в опухоли пациентов с диагнозом анапластическая астроцитома

При сравнении с неопухолевыми образцами в общей сложности было выявлено 3387 ДЭГ для анапластических астроцитов (АА). В aberrантном профиле опухолей преобладали случаи снижения транскрипционной активности в образцах АА (1400 vs 1987) (таблица 4.1, рисунок 4.5).

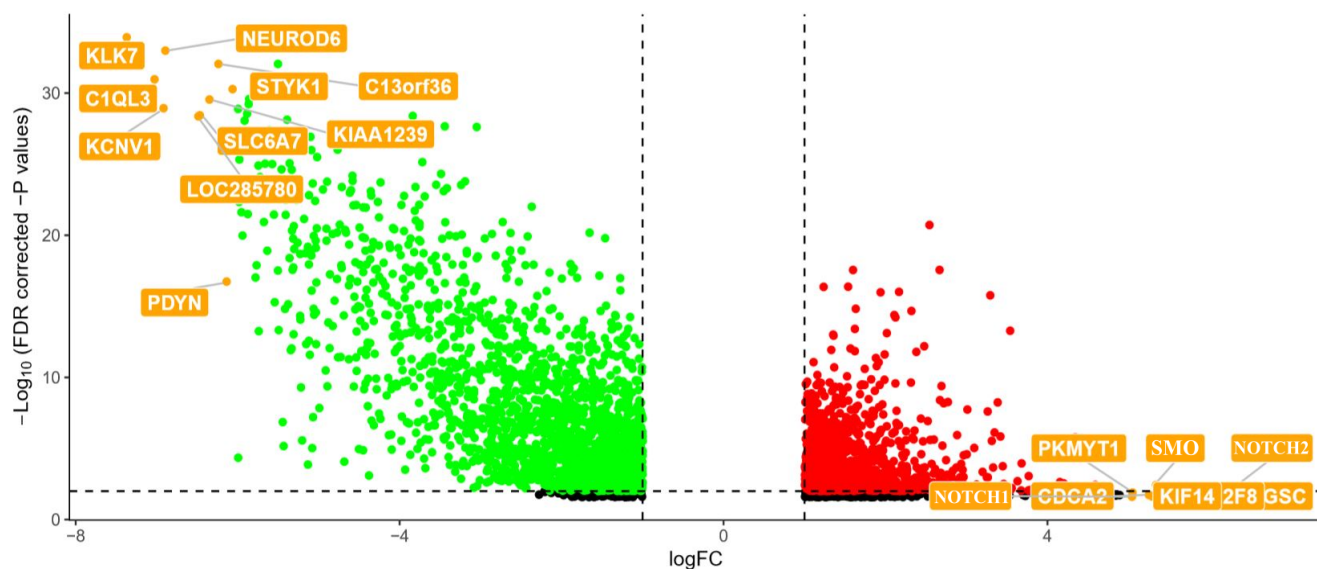


Рисунок 4.5. График рассеивания дифференциальной экспрессии генов анапластической астроцитомы. Ось абсцисс представляет logFC, ось ординат представляет $-\log_{10}$ (P – значение с FDR-поправкой). Красным и зеленым цветом отмечены гены с $\log_{FC} > 1$ и $\log_{FC} < -1$ при $p\text{-value} < 0,05$ соответственно. Подписями обозначены топ-10 генов с пониженной/повышенной экспрессией

К топ-10 ДЭГ с повышенной активностью для АА отнеслись мРНК генов *GSC*, *NOTCH1*, *E2F8*, *SMO*, *KIF14*, *CDCA2*, *PKMYT1*, *NOTCH2*, *APOBEC3B*, *CER55*. Топ-10 генов с обратной активностью возглавили *KLK7*, *C1QL3*, *KCNV1*, *NEUROD6*, *LOC285780*, *SLC6A7*, *KIAA1239*, *C13orf36*, *PDYN*, *STYK1* (рисунок 4.5).

Дифференцирующие АА 99 ДЭГ участвуют в биологических процессах сенсорного восприятия запаха и химических стимулов, трансляционной элонгации и ионного транспорта. Располагаются белки выявленных ДЭГ преимущественно в цитозоле, рибосомах, клеточной мембране и участвуют в формировании синаптической мембраны. При оценке молекулярных функций, выявленных ДЭГ была выделена поддержка активности обонятельных

рецепторов, ионных каналов, трансмембранной транспортной активности, как активной, так и пассивной (рисунок 4.6).

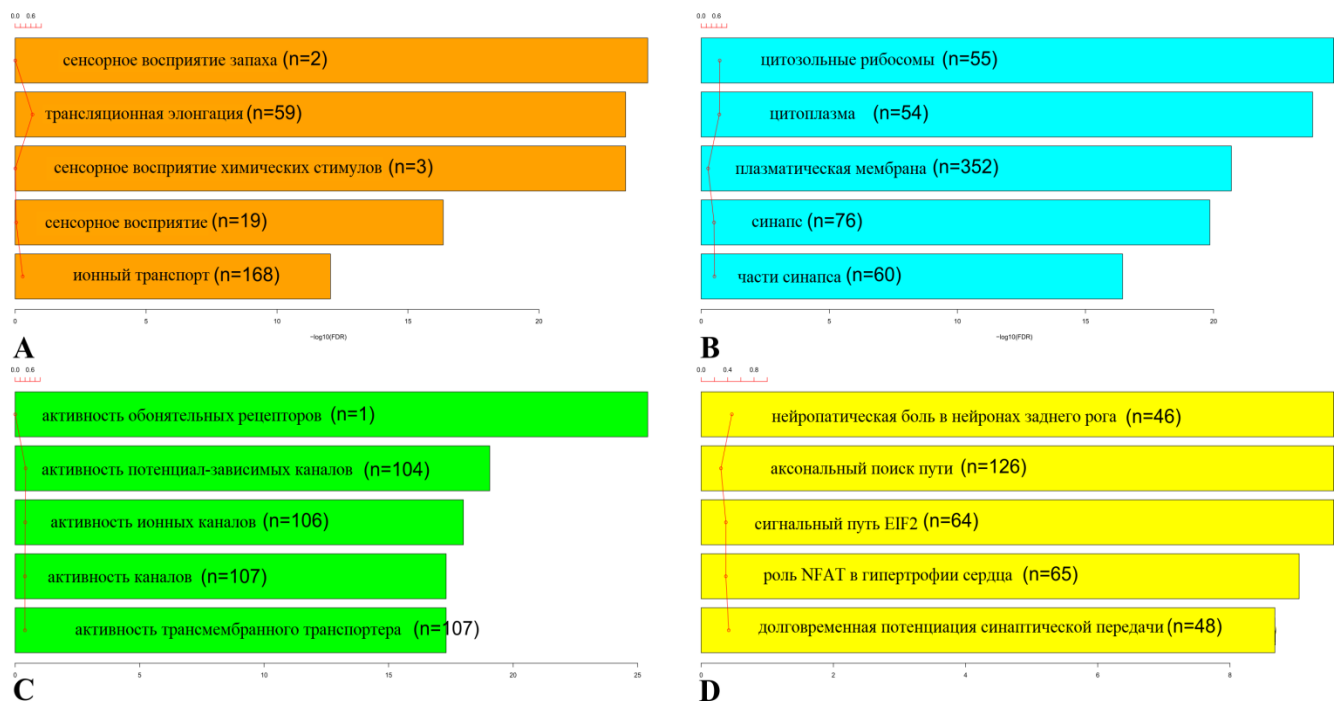


Рисунок 4.6. Генная онтология ДЭГ, уникальных для анапластической астроцитомы. Биологические процессы (А); Клеточные компоненты (В); Молекулярные функции (С); Сигнальные пути (D)

Для анапластической астроцитомы было выявлено 835 дифференциально-экспрессируемых генов, ассоциированных с выживаемостью пациентов. По данным однофакторного анализа число ДЭГ, ассоциированных с выживаемостью, сократилось до 580. Гены, коррелирующие с выживаемостью при анапластической астроцитоме, были кластеризованы в зависимости от уровня значимости PPI (белок-белковые взаимодействия по STRING DB) (рисунок 4.7). Для анапластической астроцитомы выявлено 10 кластеров белок-белковых взаимодействий генов, ассоциированных с выживаемостью пациентов.

Уникальные ДЭГ, ассоциированные с выживаемостью при анапластической астроцитоме, составили группу из 11 генов (таблица 4.5). Среди них 5 генов ($HR < 1$) ассоциированы с онкосупрессорной ролью, тогда как остальные ($HR > 1$) – с онкогенной. Стоит отметить вклад в выживаемость двух генов GPR27 и SMO, эффекты которых были взаимосвязаны.

- C1 (n=8, pval=0.0028)
- C2 (n=4, pval=0.058)
- C3 (n=68, pval=1.5e-22)
- C4 (n=39, pval=1e-10)
- C5 (n=11, pval=0.14)
- C6 (n=56, pval=8.4e-20)
- C7 (n=3, pval=1)
- C8 (n=1, pval=1)
- C9 (n=1, pval=1)
- C10 (n=8, pval=6e-04)

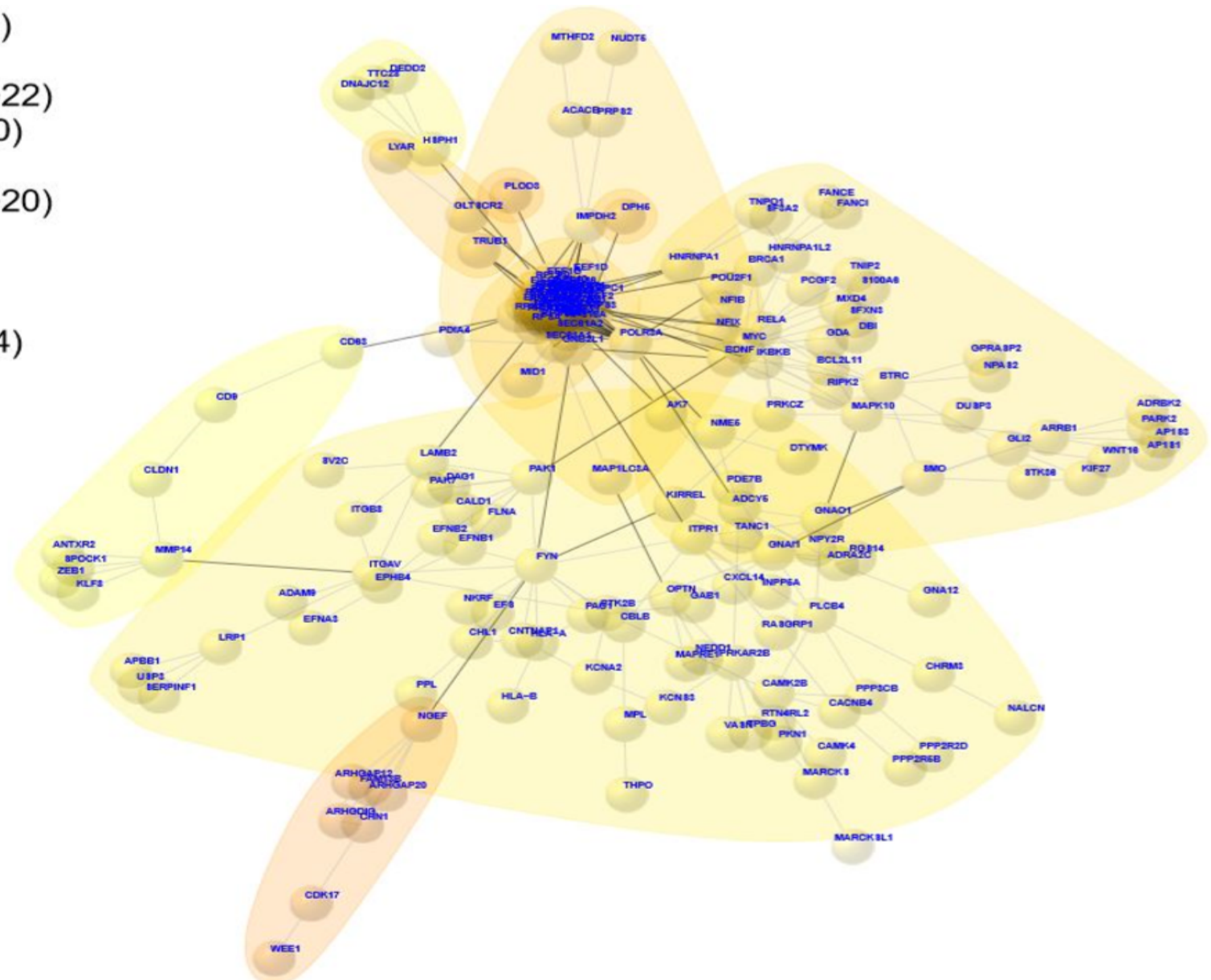


Рисунок 4.7. Интерактомный анализ генов, ассоциированных с выживаемостью пациентов при анапластической астроцитоме, кластеризованных в зависимости от p-value PPI

Таблица 4.5 – Однофакторный и многофакторный анализ уникальных для анапластической астроцитомы ДЭГ, ассоциированных с общей выживаемостью

Ген	Однофакторный анализ		Многофакторный анализ	
	HR	p	HR	p
<i>SMO</i>	1,89	0,001	2,38	0,018
<i>GAB1</i>	0,61	0,045	-	-
<i>CEP110</i>	1,55	0,006	-	-
<i>C2orf50</i>	1,80	>0,001		
<i>PGAM4</i>	0,40	>0,001	-	-
<i>GPR27</i>	0,52	0,014	0,45	0,018
<i>NOTCH1</i>	1,60	0,002	-	-
<i>NOTCH2</i>	1,71	0,006	-	-
<i>KCNS3</i>	0,50	0,019	-	-
<i>MGC45800</i>	1,52	0,010	-	-
<i>PCMT1</i>	0,62	0,039	-	-

4.1.3 Дифференциальная экспрессия генов в опухолях пациентов с диагнозом олигодендроглиома

При сравнении с неопухолевыми образцами в общей сложности было выявлено 2723 ДЭГ для олигодендроглиомы. В aberrantном профиле опухолей преобладали случаи понижения транскрипционной активности в образцах (1672 vs 1051) (таблица 4.1, рисунок 4.8).

К топ-10 ДЭГ с повышенной активностью отнеслись мРНК генов *DLL3*, *ADAMTS12*, *ATP6V1B1*, *VAX2*, *SHD*, *TMEM100*, *FHDCl*, *MEX3A*, *PKMYT1*, *FERMT1*. Топ-10 генов с обратной активностью возглавили *FCER2*, *PDYN*, *KLHL1*, *C1QL3*, *SELE*, *KCNV1*, *CARTPT*, *KLK7*, *MCHR2*, *WIF1* (рисунок 4.8).

Дифференцирующие олигодендроглиому ДЭГ участвуют в биологических процессах трансляционной элонгации, трансляции, сенсорного восприятия запаха и химических стимулов. Располагаются белки выявленных ДЭГ преимущественно в цитозоле, рибосомах, клеточной мембране. Молекулярные функции выявленных ДЭГ в основном заключаются в поддержке активного и пассивного транспорта (рисунок 4.9).

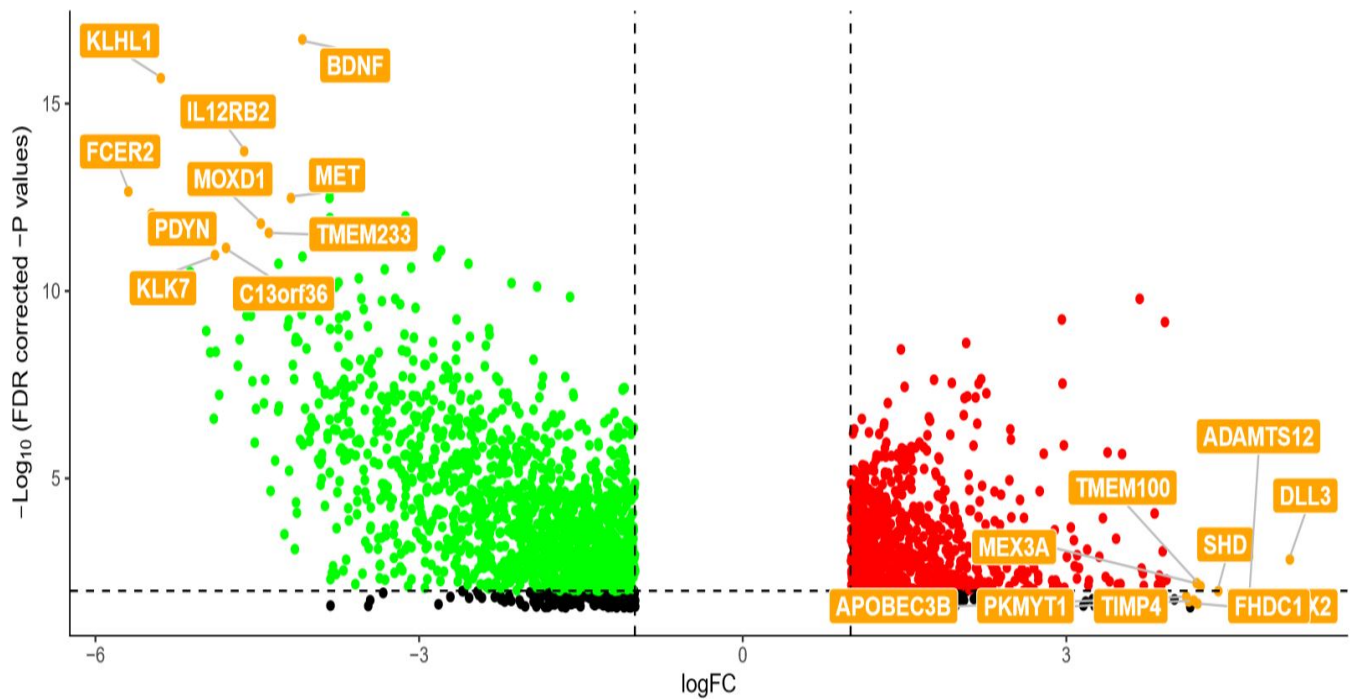


Рисунок 4.8. График рассеивания дифференциальной экспрессии генов олигодендроглиомы. Ось абсцисс представляет logFC, ось ординат представляет $-\log_{10}$ (P – значение с FDR-поправкой). Красным и зеленым цветом отмечены гены с $\log_{FC} > 1$ и $\log_{FC} < -1$ при $p\text{-value} < 0,05$ соответственно. Подписями обозначены топ-10 генов с пониженной/повышенной экспрессией

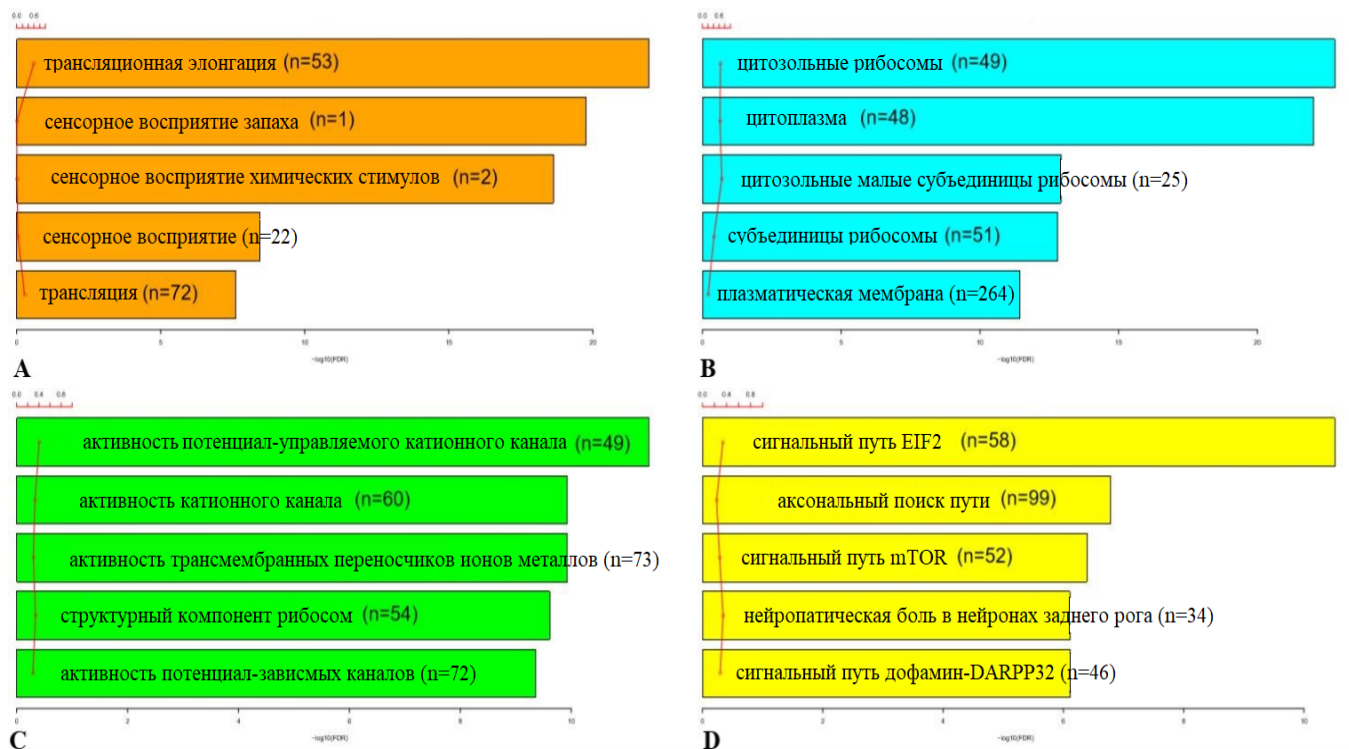


Рисунок 4.9. Генная онтология ДЭГ, уникальных для олигодендроглиомы. Биологические процессы (A); Клеточные компоненты (B); Молекулярные функции (C); Сигнальные пути (D)

Для олигодендроглиомы было выявлено 227 дифференциально-экспрессируемых генов, ассоциированных с выживаемостью пациентов. По данным однофакторного анализа, число ДЭГ, ассоциированных с выживаемостью, сократилось до 93. Гены, коррелирующие с выживаемостью при олигодендроглиоме, были кластеризованы в зависимости от уровня значимости PPI (белок-белковые взаимодействия по STRING DB) (рисунок 4.10). Для олигодендроглиомы выявлен только один кластер белок-белковых взаимодействий генов, ассоциированных с выживаемостью пациентов.

Для диффузной олигодендроглиомы идентифицировано 6 уникальных генов, ассоциированных с выживаемостью (таблица 4.6). Показано, что только для *TNFRSF11B* характерна онкогенная роль, тогда как *TNK2*, *ACCN2*, *EYA1* и *DCAF12L2* обладали протективным эффектом. Отмечено взаимозависимое влияние экспрессий *TNFRSF11B* и *DCAF12L2* на выживаемость при диффузной олигодендроглиоме.

Таблица 4.6 – Однофакторный и многофакторный анализ уникальных для диффузной олигодендроглиомы ДЭГ, ассоциированных с общей выживаемостью

Ген	Однофакторный анализ		Многофакторный анализ	
	HR	p	HR	p
<i>TNK2</i>	0,24	0,006	-	-
<i>ACCN2</i>	0,33	0,008	-	-
<i>SHD</i>	0,54	0,029	-	-
<i>EYA1</i>	0,55	0,028	-	-
<i>TNFRSF11B</i>	1,89	<0,001	1,62	0,006
<i>DCAF12L2</i>	0,33	0,013	0,26	0,018

■ C1 (n=4, pval=0.018)

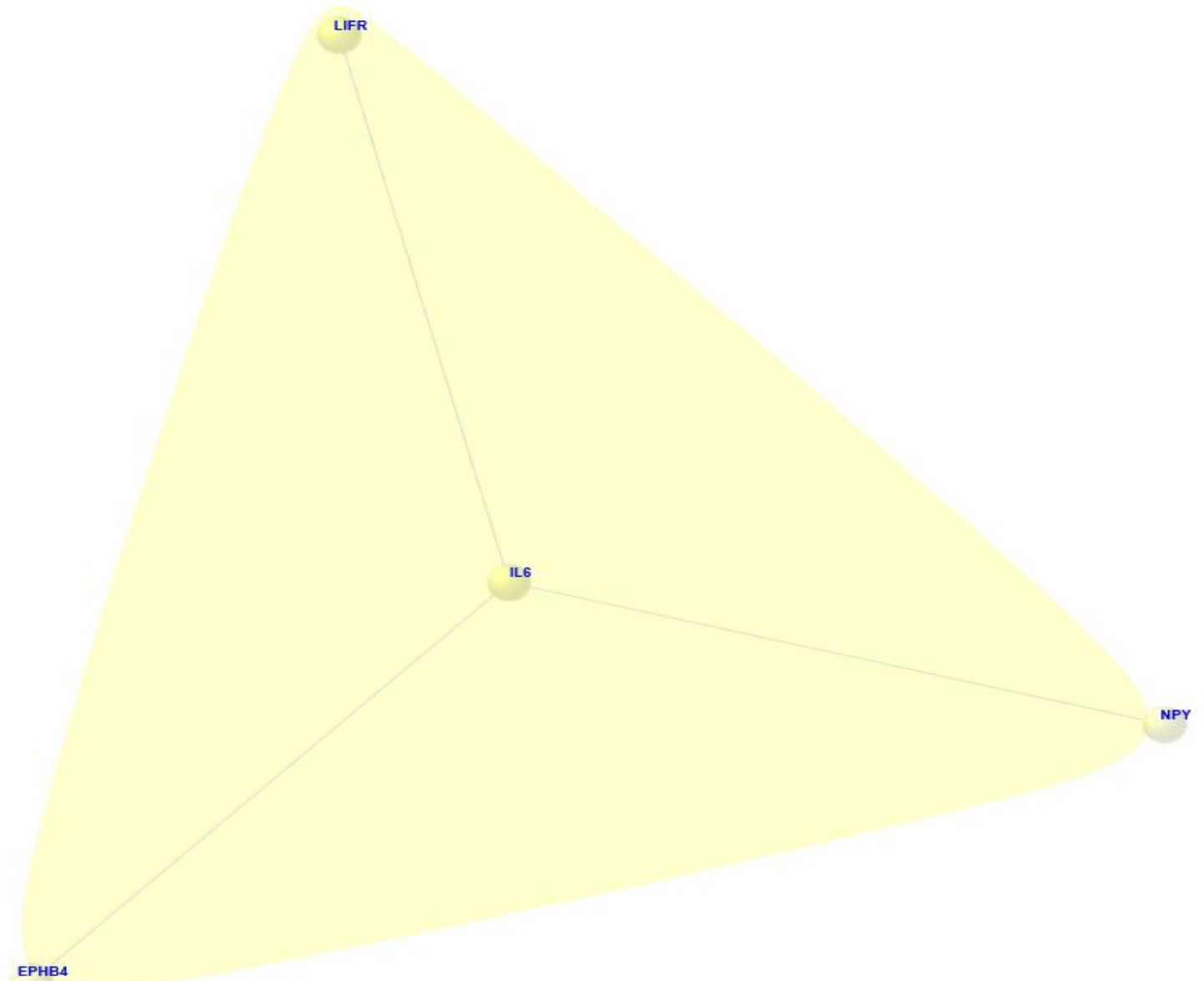


Рисунок 4.10. Интерактивный анализ генов, ассоциированных с выживаемостью пациентов при диффузной олигодендроглиоме, кластеризованных в зависимости от p-value PPI

4.1.4 Дифференциальная экспрессия генов в образцах анапластической олигодендроглиомы

При сравнении с неопухолевыми образцами в общей сложности было выявлено 2896 ДЭГ для анапластической олигодендроглиомы (АО). В aberrантном профиле опухолей преобладали случаи понижения транскрипционной активности в образцах АО (1672 vs 1051) (таблица 4.1, рисунок 4.11).

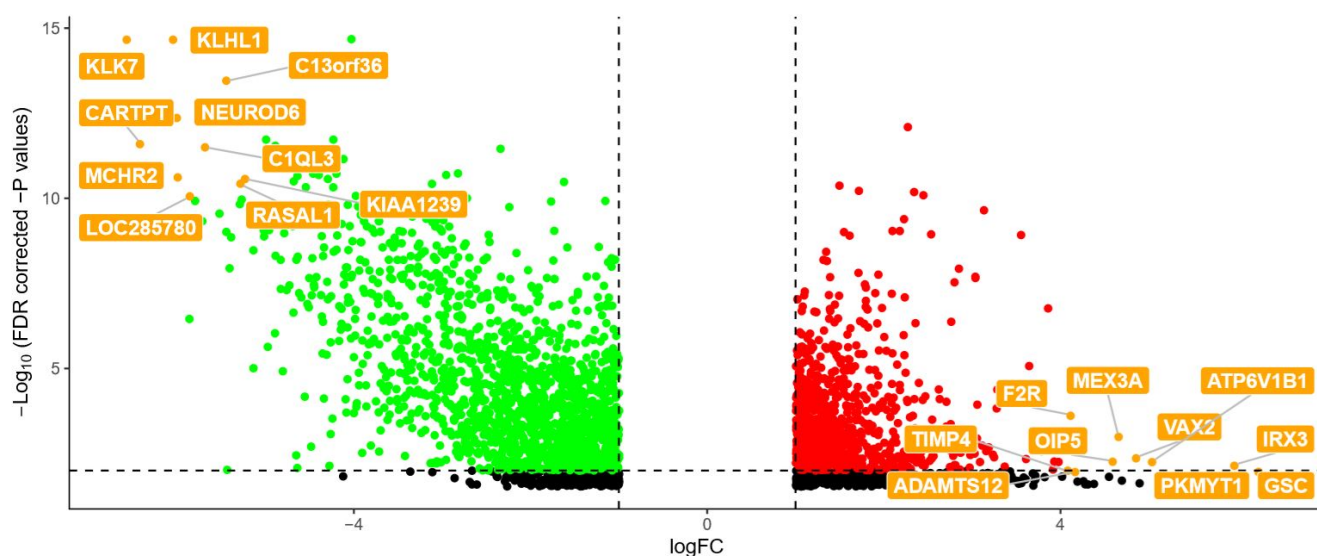


Рисунок 4.11. График рассеивания дифференциальной экспрессии генов анапластической олигодендроглиомы. Ось абсцисс представляет logFC, ось ординат представляет $-\log_{10}$ (P-значение с FDR поправкой). Красным и зеленым цветом отмечены гены с $\log_{FC} > 1$ и $\log_{FC} < -1$ при $p\text{-value} < 0,05$ соответственно. Подписями обозначены топ-10 генов с пониженной/повышенной экспрессией

К топ-10 ДЭГ с повышенной активностью для АО отнесли мРНК генов *CLEC4F*, *GSC*, *IRX3*, *PKMYT1*, *KIFC1*, *E2F8*, *ATP6V1B1*, *KIF14*, *VAX2*, *CDCA2*. Топ-10 генов с обратной активностью возглавили *KLK7*, *CARTPT*, *KLHL1*, *NEUROD6*, *MCHR2*, *OPALIN*, *LOC285780*, *SLC6A7*, *WIF1*, *C1QL3* (рисунок 4.11).

Дифференцирующие АО 147 ДЭГ участвуют в биологических процессах трансляционной элонгации, сенсорного восприятия запаха и химических стимулов, и ионного транспорта. Располагаются белки выявленных ДЭГ преимущественно в цитозоле, рибосомах и клеточной мембране. Относительно категории молекулярной функции, выявленные ДЭГ участвуют в поддержке

активного и пассивного транспорта, а также структурной поддержке рибосом (рисунок 4.12).

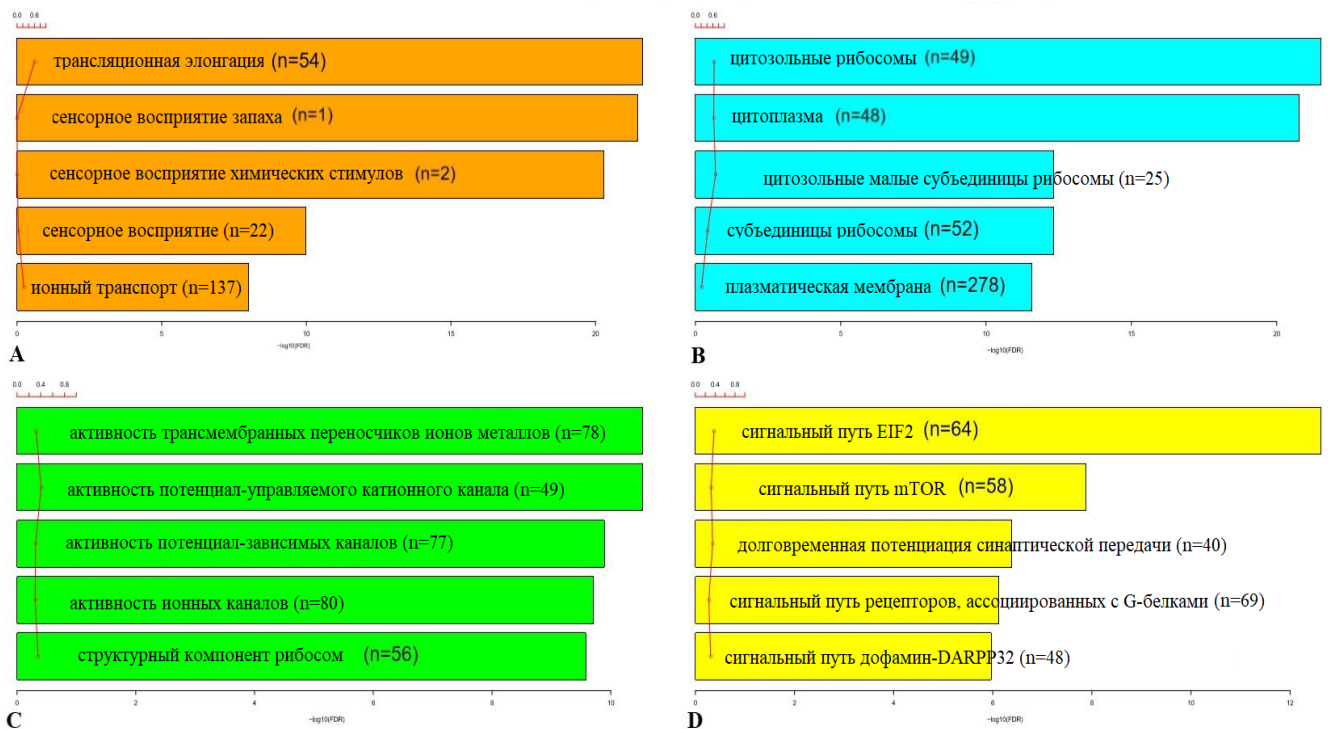


Рисунок 4.12. Генная онтология ДЭГ, уникальных для анапластической олигодендроглиомы. Биологические процессы (A); Клеточные компоненты (B); Молекулярные функции (C); Сигнальные пути (D)

Для анапластической олигодендроглиомы было выявлено 468 дифференциально-экспрессируемых генов, ассоциированных с выживаемостью пациентов. По данным однофакторного анализа, число ДЭГ, ассоциированных с выживаемостью, сократилось до 248. Гены, коррелирующие с выживаемостью при диффузной олигодендроглиоме, были кластеризованы в зависимости от уровня значимости PPI (белок-белковые взаимодействия по STRING DB) (рисунок 4.13). Для анапластической олигодендроглиомы выявлено 8 кластеров белок-белковых взаимодействий генов, ассоциированных с выживаемостью пациентов.

Для анапластической олигодендроглиомы идентифицировано 4 уникальных гена, ассоциированных с выживаемостью (таблица 4.7). Из них два (*MYBL1*, *RPS6KA1*) связаны с онкогенным эффектом и два (*HKDC1*, *LOC283392*) – с онкосупрессорным.

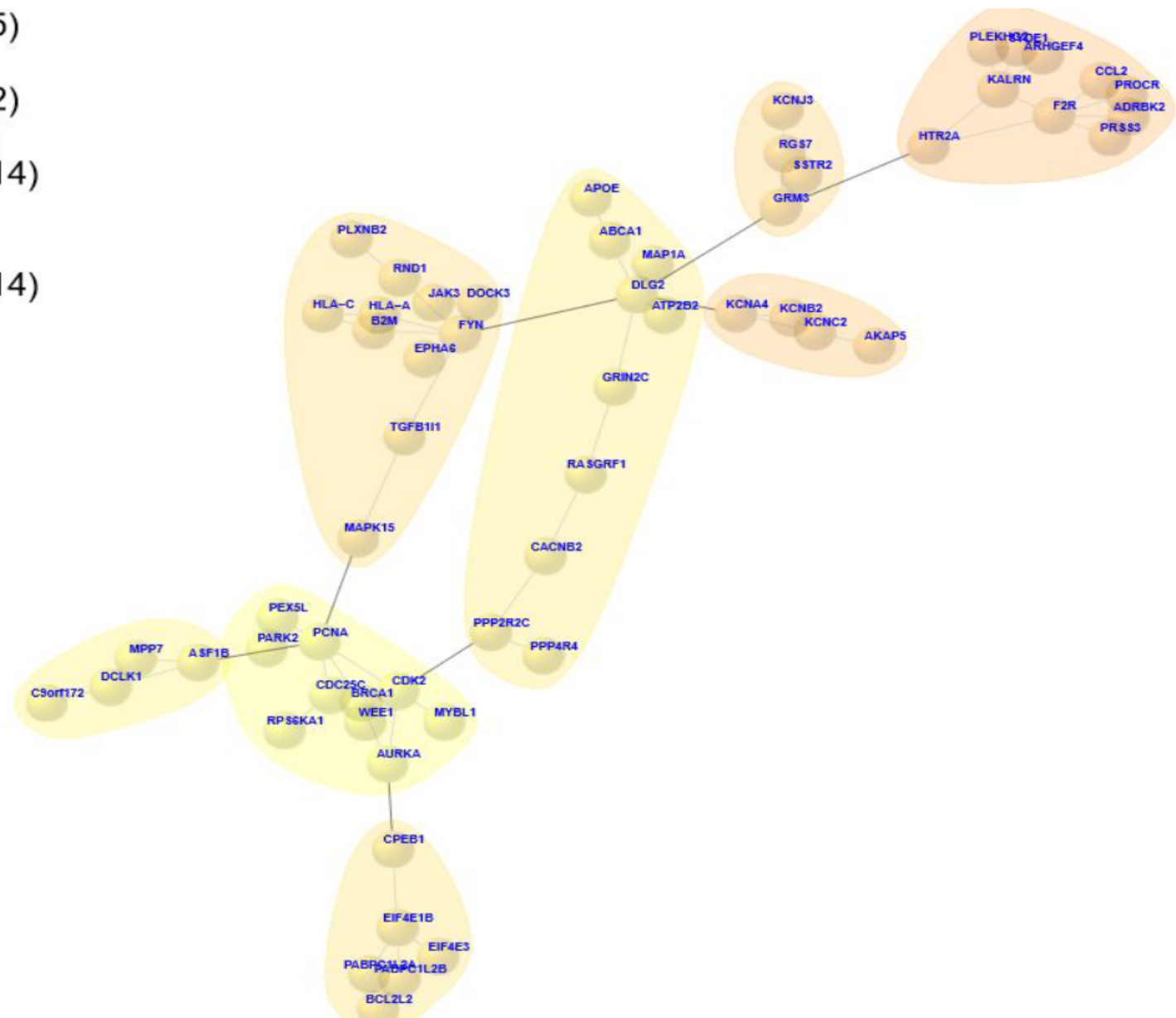


Рисунок 4.13. Интерактивный анализ генов, ассоциированных с выживаемостью пациентов при анапластической олигодендроглиоме, кластеризованных в зависимости от p-value PPI

Таблица 4.7 – Однофакторный и многофакторный анализ уникальных для анапластической олигодендроглиомы ДЭГ, ассоциированных с общей выживаемостью

Ген	Однофакторный анализ		Многофакторный анализ	
	HR	p	HR	p
<i>HKDC1</i>	0,24	0,012	0,28	0,032
<i>MYBL1</i>	1,54	0,005	-	-
<i>LOC283392</i>	0,47	0,035	-	-
<i>RPS6KA1</i>	1,87	0,007	-	-

4.1.5 Дифференциальная экспрессия генов в глиальных опухолях высокой степени злокачественности

При сравнении с неопухолевыми образцами в общей сложности было выявлено 4818 ДЭГ для глиобластомы (ГБ). В aberrантном профиле опухолей преобладали случаи понижения транскрипционной активности в образцах ГБ (2491 vs 2324) (таблица 4.1, рисунок 4.14).

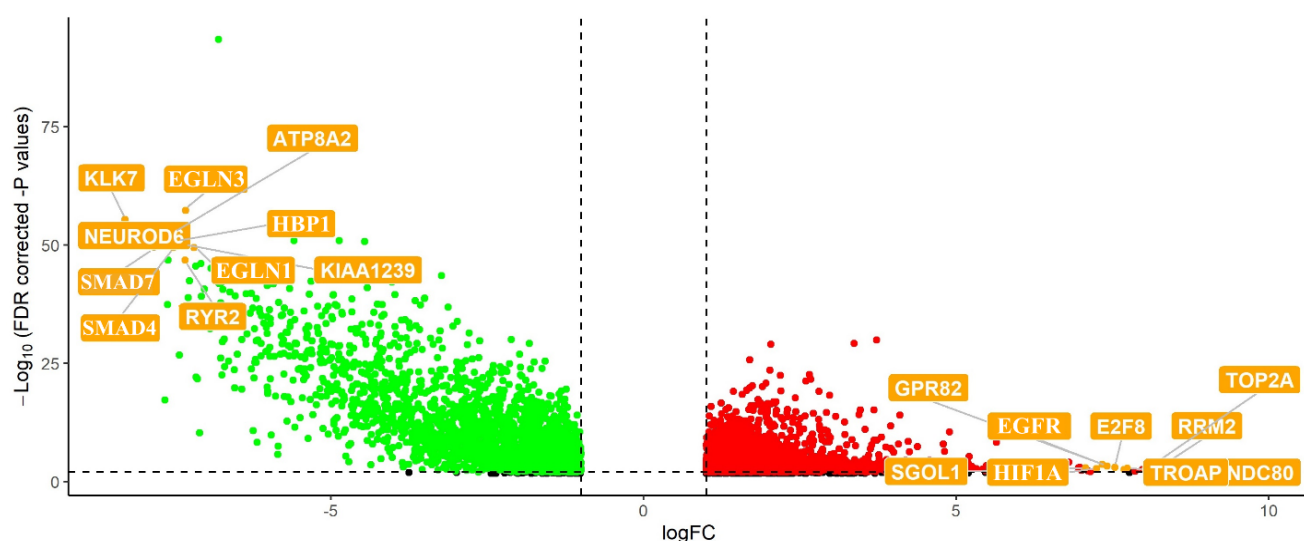


Рисунок 4.14. График рассеивания дифференциальной экспрессии генов глиобластомы. Ось абсцисс представляет logFC, ось ординат представляет $-\log_{10}$ (P – значение с FDR поправкой).

Красным и зеленым цветом отмечены гены с $\log_{2}FC > 1$ и $\log_{2}FC < -1$ при $p\text{-value} < 0,05$ соответственно. Подписями обозначены топ-10 генов с пониженной/повышенной экспрессией

Для глиобластом также были определены топ-10 ДЭГ с измененной транскрипционной активностью, которые были представлены генами с повышенным уровнем мРНК: *GPR82*, *SGOL1*, *E2F8*, *RRM2*, *TOP2A*, *HIF1A*, *TROAP*, *EGFR*, *NDC80*, *CDC45*, и генами со сниженным уровнем мРНК *KLK7*,

NEUROD6, *EGLN1*, *EGLN3*, *HBPI*, *SMAD4*, *ATP8A2*, *SMAD7*, *KIA1239*, *RYR2* (рисунок 4.14). Дифференцирующие ГБ 1716 ДЭГ участвуют в биологических процессах трансляционной элонгации, сенсорного восприятия запаха и химических стимулов, когнитивных и неврологических процессов. Располагаются белки выявленных ДЭГ преимущественно в плазматической и синаптической мембране (рисунок 4.15).

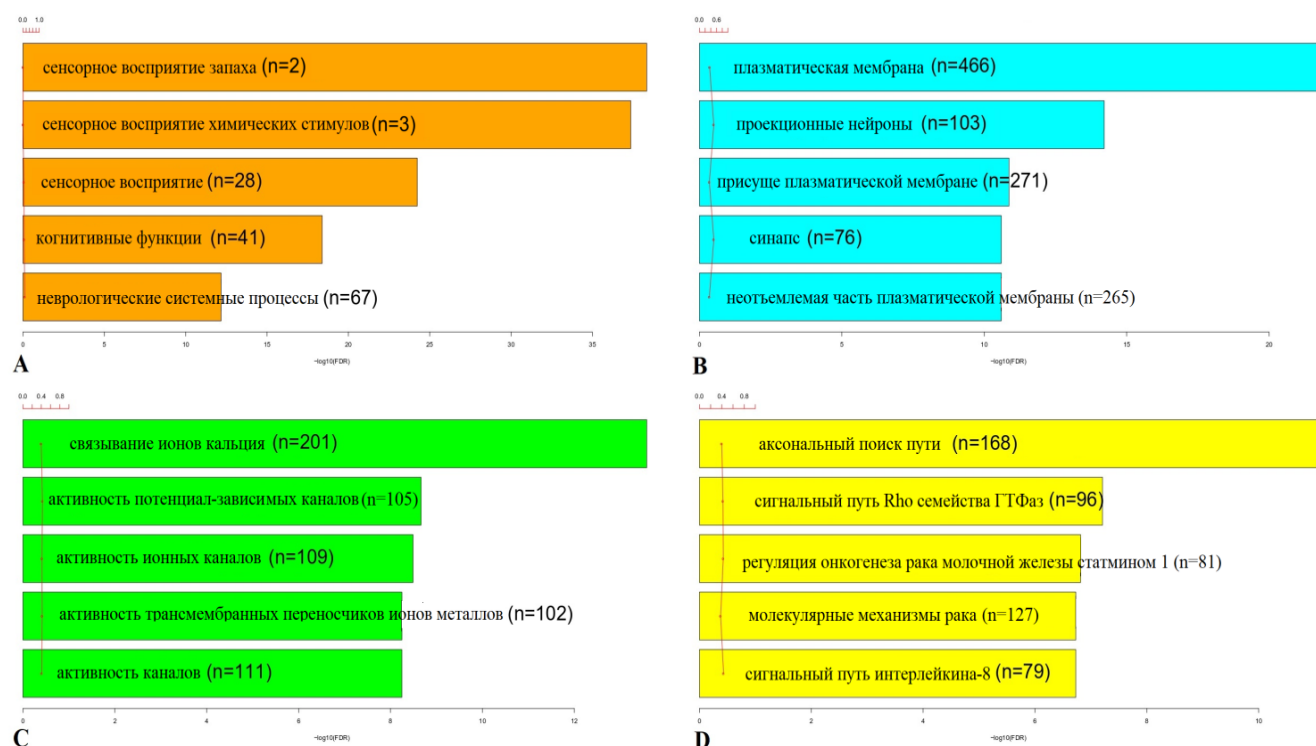


Рисунок 4.15. Генная онтология ДЭГ, уникальных для глиобластом. Биологические процессы (А); Клеточные компоненты (В); Молекулярные функции (С); Сигнальные пути (D)

Для глиобластом выявлено 403 дифференциально-экспрессируемых гена, ассоциированных с выживаемостью пациентов. По данным однофакторного анализа, число ДЭГ, ассоциированных с выживаемостью, сократилось до 201. Гены, коррелирующие с выживаемостью при глиобластоме, были кластеризованы в зависимости от уровня значимости PPI (белок-белковые взаимодействия по STRING DB) (рисунок 4.16).

При глиобластоме выявлено 8 кластеров белок-белковых взаимодействий генов, ассоциированных с выживаемостью пациентов. Определено 69 ДЭГ, уникальных и характерных только для глиобластом (таблица 4.8). Среди них 39 связаны с онкогенным эффектом, 30 – с онкосупрессорным.

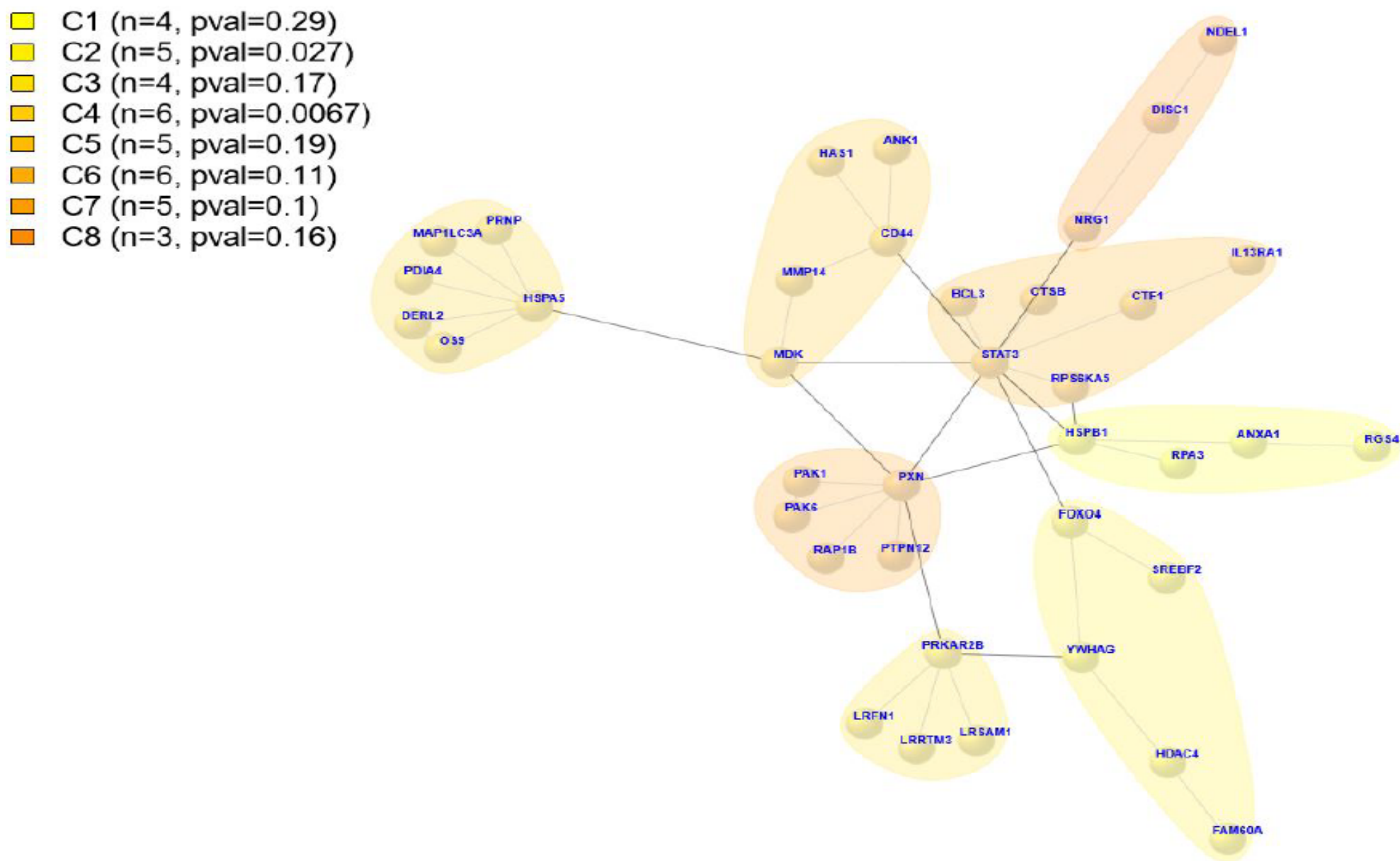


Рисунок 4.16. Интерактивный анализ генов, ассоциированных с выживаемостью пациентов при глиобластоме, кластеризированных в зависимости от p-value PPI

Таблица 4.8 – Однофакторный и многофакторный анализ уникальных для глиобластомы ДЭГ, ассоциированных с общей выживаемостью

Ген	Однофакторный анализ		Многофакторный анализ	
	HR	p	HR	p
<i>LDHA</i>	1,35	0,001	-	-
<i>GNS</i>	3,88	0,004	-	-
<i>G6PC3</i>	1,28	0,005	-	-
<i>LILRB3</i>	1,25	0,010	0,63	0,037
<i>LSP1</i>	1,26	0,008	-	-
<i>UPP1</i>	1,24	0,010	-	-
<i>LOC407835</i>	0,79	0,012	-	-
<i>POM121L9P</i>	1,31	0,001	1,78	0,009
<i>FAM115C</i>	1,31	0,004	-	-
<i>HSPB1</i>	1,20	0,031	-	-
<i>SLC16A3</i>	1,30	0,007	-	-
<i>OS9</i>	1,25	0,022	-	-
<i>CTSB</i>	1,34	0,002	-	-
<i>HSPA5</i>	1,25	0,008	-	-
<i>BCL3</i>	1,17	0,047	-	-
<i>FAM20C</i>	1,32	0,002	-	-
<i>PTRF</i>	1,31	0,002	-	-
<i>ARSD</i>	1,28	0,003	-	-
<i>MXRA8</i>	1,40	<0,001	2,35	0,002
<i>ADAMTSL4</i>	1,18	0,032	-	-
<i>FKBP9</i>	1,27	0,003	0,43	0,001
<i>MALT1</i>	1,20	0,028	-	-
<i>TCTN2</i>	1,22	0,021	-	-
<i>SMAD7</i>	0,82	0,045	0,55	0,035
<i>TWSG1</i>	1,19	0,027	-	-
<i>SYPL1</i>	1,20	0,040	1,95	0,014
<i>RAP1B</i>	1,30	0,015	0,47	0,019
<i>IGFBP2</i>	1,27	0,004	2,28	0,005
<i>EFEMP2</i>	1,38	0,001	-	-
<i>LITAF</i>	1,33	0,002	-	-
<i>SMAD4</i>	0,82	0,025	0,46	0,001
<i>ZNF432</i>	0,76	0,004	-	-
<i>DUSP6</i>	1,29	0,005	-	-
<i>LBH</i>	1,48	0,001	-	-

Окончание таблицы 4.8

<i>CCDC46</i>	1,25	0,016	-	-
<i>KDELC2</i>	1,27	0,009	0,47	0,021
<i>TMED9</i>	1,20	0,026	-	-
<i>MYO1G</i>	1,24	0,020	-	-
<i>MDK</i>	1,26	0,009	-	-
<i>CTSZ</i>	1,27	0,019	-	-
<i>PDIA3P</i>	1,26	0,011	-	-
<i>STAT3</i>	1,22	0,046	-	-
<i>ADAT3</i>	0,76	0,010	-	-
<i>SLC2A11</i>	0,72	0,002	-	-
<i>SAMD8</i>	0,78	0,025	-	-
<i>HIF1A</i>	1,34	<0,001	1,99	0,014
<i>HDAC4</i>	0,76	0,004	-	-
<i>ATE1</i>	0,75	0,005	-	-
<i>EGLN3</i>	0,71	0,003	0,57	0,044
<i>SLC16A14</i>	0,82	0,048	-	-
<i>NEU3</i>	0,78	0,011	-	-
<i>SREBF2</i>	0,79	0,022	-	-
<i>PAR.SN</i>	0,77	0,026	-	-
<i>STOX1</i>	0,72	0,009	-	-
<i>HBPI</i>	0,61	0,002	0,39	0,02
<i>RANBP17</i>	0,70	0,013	1,69	0,016
<i>CEP97</i>	0,79	0,024	2,34	0,015
<i>CYP2E1</i>	0,76	0,006	-	-
<i>PPM1L</i>	0,76	0,007	-	-
<i>FSD1</i>	0,78	0,007	-	-
<i>FRY</i>	0,76	0,008	-	-
<i>EGLN1</i>	0,80	0,017	0,56	0,024
<i>PAR5</i>	0,60	0,032	-	-
<i>ANKRD16</i>	0,72	0,007	-	-
<i>ASXL3</i>	0,80	0,021	-	-
<i>SHF</i>	0,81	0,028	-	-
<i>KBTBD7</i>	0,81	0,030	1,81	0,027
<i>FOXO4</i>	0,82	0,034	-	-
<i>ADAM22</i>	0,81	0,037	-	-

4.2 Дифференциальная экспрессия микроРНК в глиальных опухолях

Результаты оценки дифференциальной экспрессии микроРНК, в зависимости от типа глиальной опухоли, указаны в таблице 4.1. Отметим на порядок меньшее количество выделенных микроРНК по сравнению с ДЭГ. При этом вектор aberrантного изменения транскрипционной активности астроцитом и олигодендроглиом оказался однонаправленным: микроРНК, повышающих свою экспрессию, примерно в 2 раза больше. Специфичных для ГБ маркерных микроРНК было обнаружено на порядок меньше, и их распределение по степени измененной активности было примерно равным.

В результате было определено 35 микроРНК, изменение уровня которых было обычным явлением для всех типов глиальных опухолей, в том числе и для мультиформной глиобластомы. Следует отметить, что для астроцитом и олигодендроглиом GII и GIII было выделено 207 общих ДЭ-миРНК, тогда как ГБ имели только 69 ДЭ-миРНК общих с другими подтипами. Наибольшее число специфичных малых некодирующих РНК было определено для опухолей GIII: 65 (vs 21) микроРНК, дискриминирующих астроцитомы GIII; 51 (vs 10) микроРНК, дискриминирующих олигодендроглиомы GIII (рисунок 4.17).

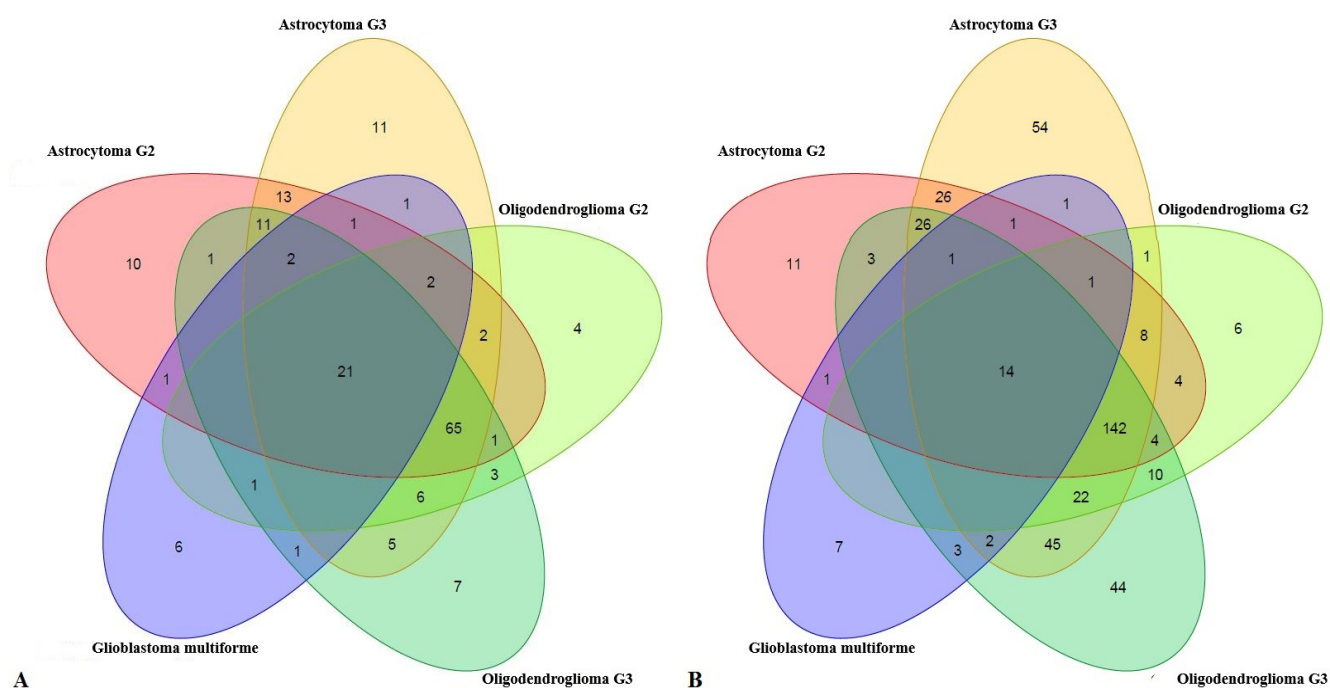


Рисунок 4.17. Распределение ДЭ-миРНК по 5 подтипам глиальных опухолей.
А – ДЭ-миРНК logFC < -1. В – ДЭ-миРНК logFC > 1

4.2.1 Дифференциальная экспрессия микроРНК в диффузной астроцитоме

Результаты дифференциальной экспрессии микроРНК для диффузной астроцитомы проиллюстрированы на рисунке 4.18. Для диффузной астроцитомы выявлено 372 дифференциально-экспрессируемых микроРНК (ДЭ-миРНК). Наиболее значимым изменениям подвергаются микроРНК 873-5p, 433-3p, 1224-5p, 211-5p, 323a-5p, 218-5p, 7-5p, 137 и микроРНК 3074-5p, 629-3p, 92b-5p, 135a-3p, 891b, 10b-5p, 183-5p, 96-5p, 548ba с понижением и повышением своей активности соответственно.

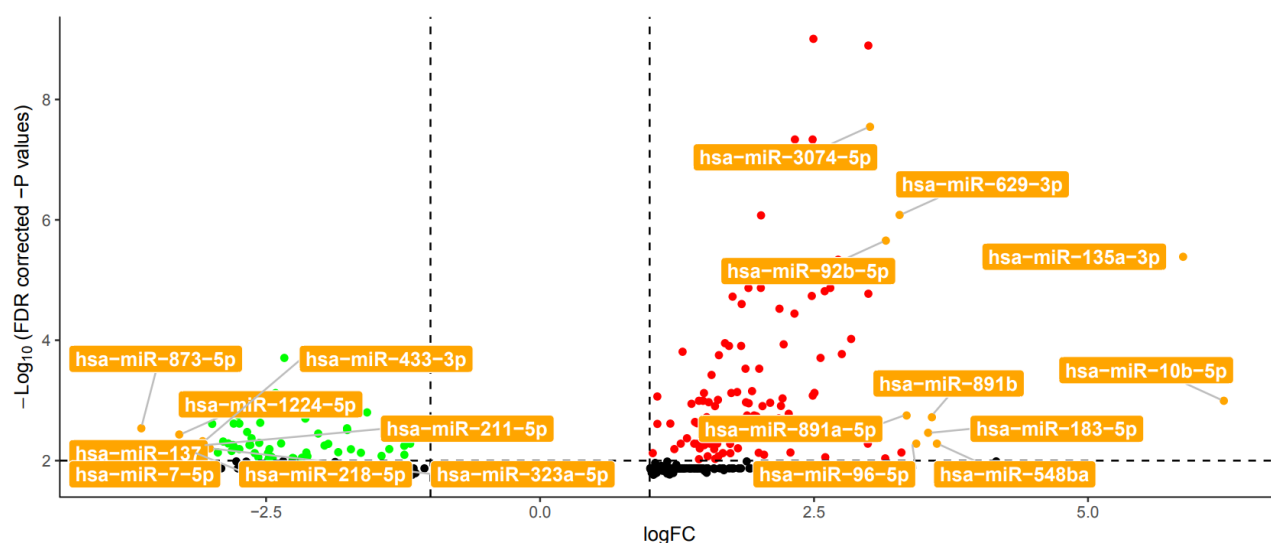


Рисунок 4.18. График рассеивания дифференциальной экспрессии микроРНК диффузной астроцитомы. Ось абсцисс представляет logFC, ось ординат – $-\log_{10}$ (P – значение с FDR поправкой). Красным и зеленым цветом отмечены гены с $\log_{FC} > 1$ и $\log_{FC} < -1$ при $p\text{-value} < 0,05$ соответственно. Подписями обозначены топ-10 генов с пониженной/повышенной экспрессией

В ходе исследования найдено две микроРНК – hsa-let-7c-5p и hsa-miR-125b-5p, специфичных для диффузных астроцитом и связанных с общей выживаемостью пациентов. Был проведен корреляционный анализ Пирсона для оценки взаимосвязи экспрессии отобранных генов (ассоциированных с выживаемостью) и микроРНК, по результатам которого учитывали сравниваемые пары со значением корреляции не выше -0,5. На рисунке 4.19 представлен пример результатов интерактивного анализа для диффузной астроцитомы, где визуализированы мРНК-микроРНК пары, прошедшие сверку по базам данных о валидированных/предсказанных мишенях микроРНК. Таким образом, для образцов диффузной астроцитомы выявлено 173 пар ДЭ-миРНК и мРНК ДЭГ.

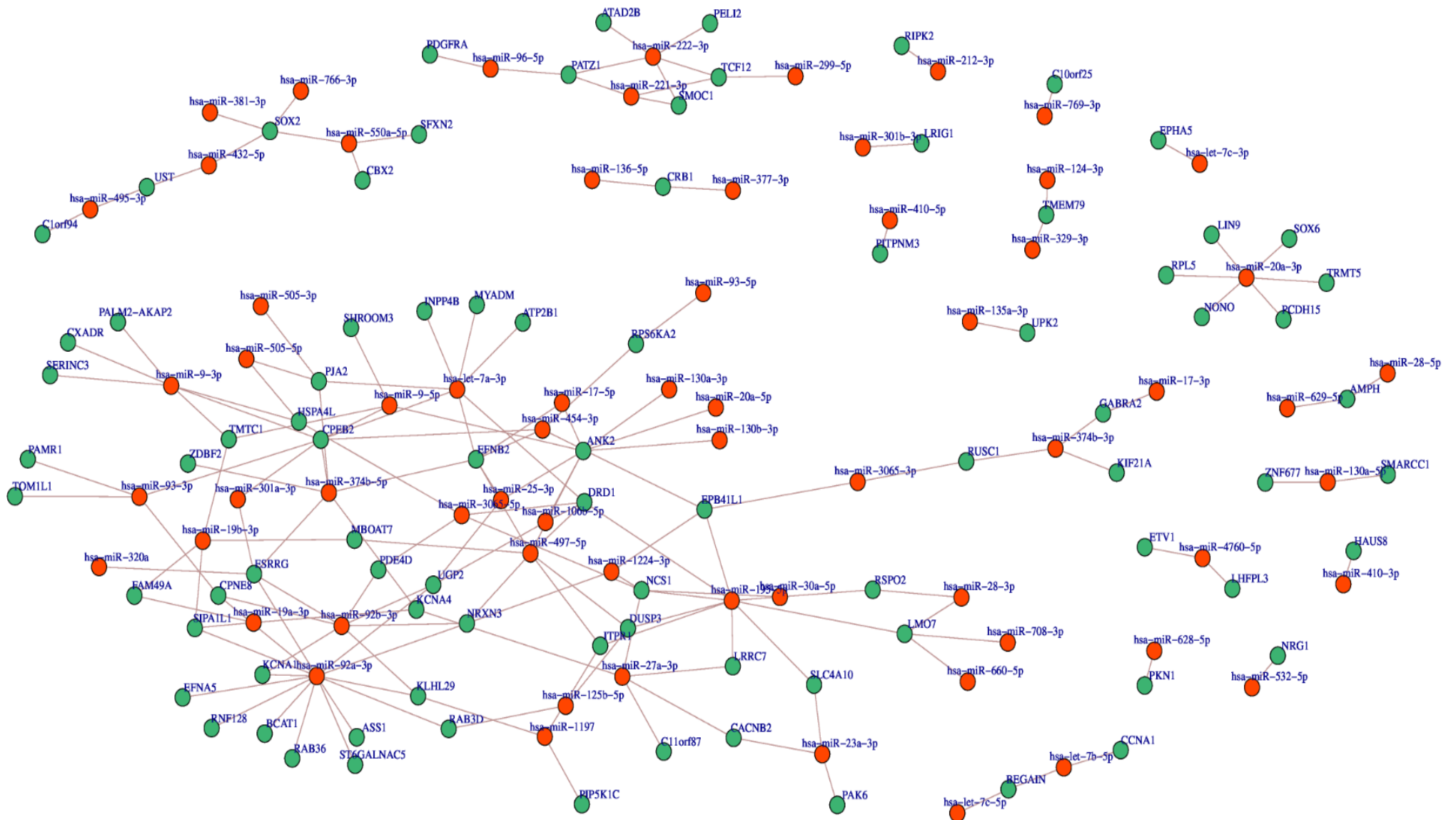


Рисунок 4.19. Схема интерактивного взаимодействия микроРНК и мРНК генов, ассоциированных с выживаемостью, в исследуемых образцах диффузных астроцитом. Красным обозначены ДЭ-миРНК, зеленым – ДЭГ

4.2.2 Дифференциальная экспрессия микроРНК в анапластической астроцитоме

Результаты дифференциальной экспрессии микроРНК для анапластической астроцитомы проиллюстрированы на рисунке 4.20. Для анапластической астроцитомы выявлено 484 дифференциально-экспрессируемых микроРНК (ДЭ-миРНК). Наиболее значимым изменениям с понижением и повышением своей активности подвергаются микроРНК hsa-miR-137, hsa-miR-873-5p, hsa-miR-1912, hsa-miR-1298-3p, hsa-miR-7-5p, hsa-miR-218-5p, hsa-miR-433-3p, hsa-miR-1224-5p, hsa-miR-490-3p, hsa-miR-139-3p и микроРНК hsa-miR-10b-5p, hsa-miR-135a-3p, hsa-miR-10b-3p, hsa-miR-196b-5p, hsa-miR-2114-3p, hsa-miR-891b, hsa-miR-3074-5p, hsa-miR-183-5p, hsa-miR-92b-5p, hsa-miR-629-3p. Анализ влияния выявленных ДЭ-миРНК на выживаемость пациентов выявил три микроРНК – hsa-miR-190b, hsa-miR-196a-3p, hsa-miR-218-2-3p, характерных только для анапластических астроцитом.

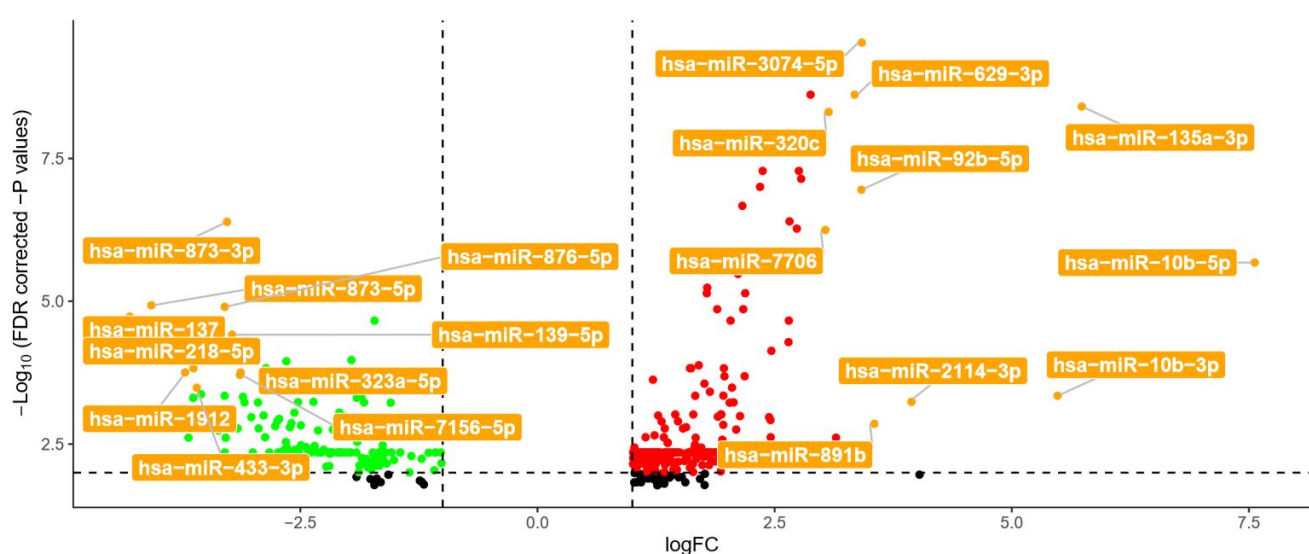


Рисунок 4.20. График рассеивания дифференциальной экспрессии микроРНК анапластической астроцитомы. Ось абсцисс представляет logFC, ось ординат – $-\log_{10}$ (P – значение с FDR поправкой). Красным и зеленым цветом отмечены гены с $\log_{FC} > 1$ и $\log_{FC} < -1$ при $p\text{-value} < 0,05$ соответственно. Подписями обозначены топ-10 генов с пониженной/повышенной экспрессией

Согласно результатам интерактивного анализа для анапластической астроцитомы выявлено 199 пар ДЭ-миРНК и мРНК ДЭ, прошедших сверку по базам данных о валидированных/предсказанных мишенях микроРНК. Анализ проиллюстрирован схемой интерактивных взаимодействий на рисунке 4.21.

Рисунок 4.21. Схема интерактивного взаимодействия микроРНК и мРНК генов, ассоциированных с выживаемостью, в исследуемых образцах анапластической астроцитом. Красным обозначены ДЭ-миРНК, зеленым – ДЭГ

4.2.3 Дифференциальная экспрессия микроРНК при диффузной олигодендроглиоме

Результаты дифференциальной экспрессии микроРНК для диффузной олигодендроглиомы проиллюстрированы на рисунке 4.22.

Для диффузной олигодендроглиомы выявлено 484 дифференциально-экспрессируемых микроРНК (ДЭ-миРНК). Наиболее значимым изменениям подвергаются микроРНК hsa-miR-873-5p, hsa-miR-412-5p, hsa-miR-7-5p, hsa-miR-433-3p, hsa-miR-1912, hsa-miR-137, hsa-miR-218-5p, hsa-miR-7156-5p, hsa-miR-432-5p, hsa-miR-485-3p и микроРНК hsa-miR-135a-3p, hsa-miR-10b-5p, hsa-miR-892a, hsa-miR-891b, hsa-miR-891a-5p, hsa-miR-96-5p, hsa-miR-183-5p, hsa-miR-888-5p, hsa-miR-182-5p, hsa-miR-892b с понижением и повышением своей активности, соответственно.

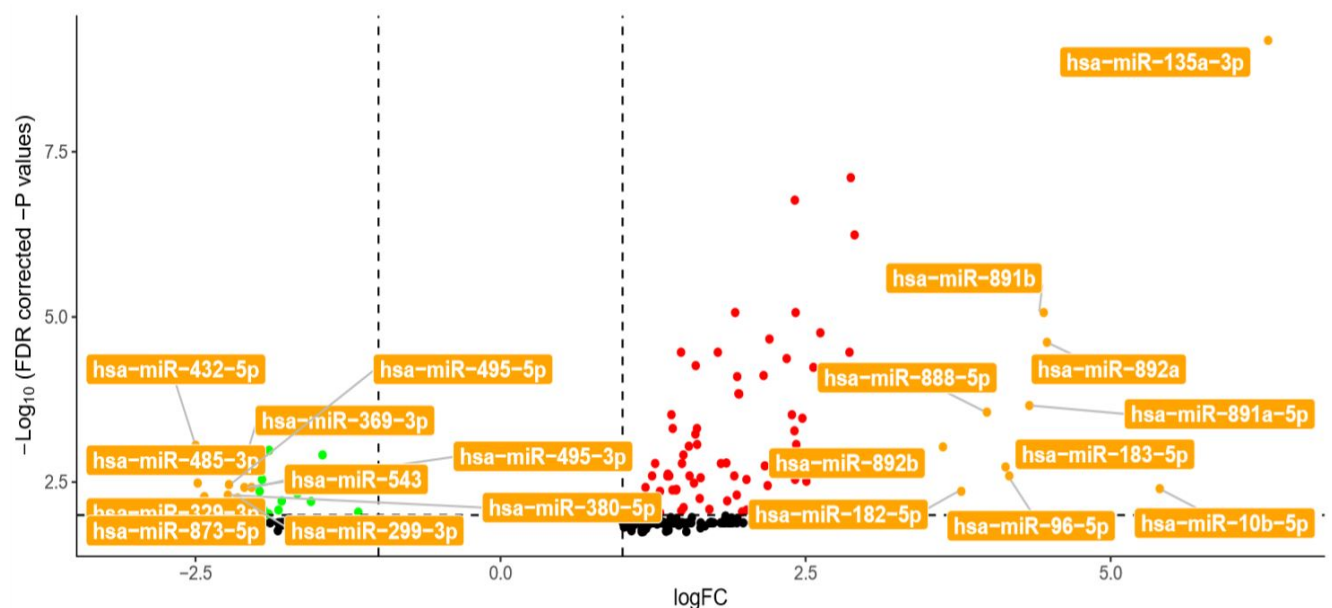


Рисунок 4.22. График рассеивания дифференциальной экспрессии микроРНК диффузной олигодендроглиомы. Ось абсцисс представляет logFC, ось ординат – $-\log_{10}$ (P – значение с FDR поправкой). Красным и зеленым цветом отмечены гены с $\log FC > 1$ и $\log FC < -1$ при $p\text{-value} < 0,05$ соответственно. Подписями обозначены топ-10 генов с пониженной/повышенной экспрессией

На рисунке 4.23 представлены результаты интерактивного анализа для диффузной олигодендроглиомы, где визуализированы 76 пар мРНК-микроРНК, прошедшие сверку по базам данных о валидированных/предсказанных мишенях микроРНК.

Рисунок 4.23. Схема интерактивного взаимодействия микроРНК и мРНК генов, ассоциированных с выживаемостью, в исследуемых образцах диффузной олигодендроглиомы. Красным обозначены ДЭ-миРНК, зеленым – ДЭГ

4.2.4 Дифференциальная экспрессия микроРНК при анапластической олигодендроглиоме

На рисунке 4.24 приведены результаты дифференциальной экспрессии микроРНК для анапластической олигодендроглиомы.

Из пула ДЭ-миРНК анапластической олигодендроглиомы выявлено 440 дифференциально-экспрессируемых микроРНК. Наиболее значимым изменениям подвергаются микроРНК hsa-miR-873-5p, hsa-miR-137, hsa-miR-1298-3p, hsa-miR-1912, hsa-miR-433-3p, hsa-miR-329-3p, hsa-miR-412-5p, hsa-miR-770-5p, hsa-miR-7156-5p, hsa-miR-485-3p и микроРНК hsa-miR-10b-5p, hsa-miR-135a-3p, hsa-miR-891a-5p, hsa-miR-892a, hsa-miR-891b, hsa-miR-888-5p, hsa-miR-10b-3p, hsa-miR-96-5p, hsa-miR-183-5p, hsa-miR-892b с понижением и повышением своей активности соответственно. Анализ влияния обнаруженных ДЭ-миРНК на выживаемость пациентов выявил три микроРНК – hsa-miR-20b-5p, hsa-miR-466, hsa-let-7a-5p, характерных только для анапластических олигодендроглиом.

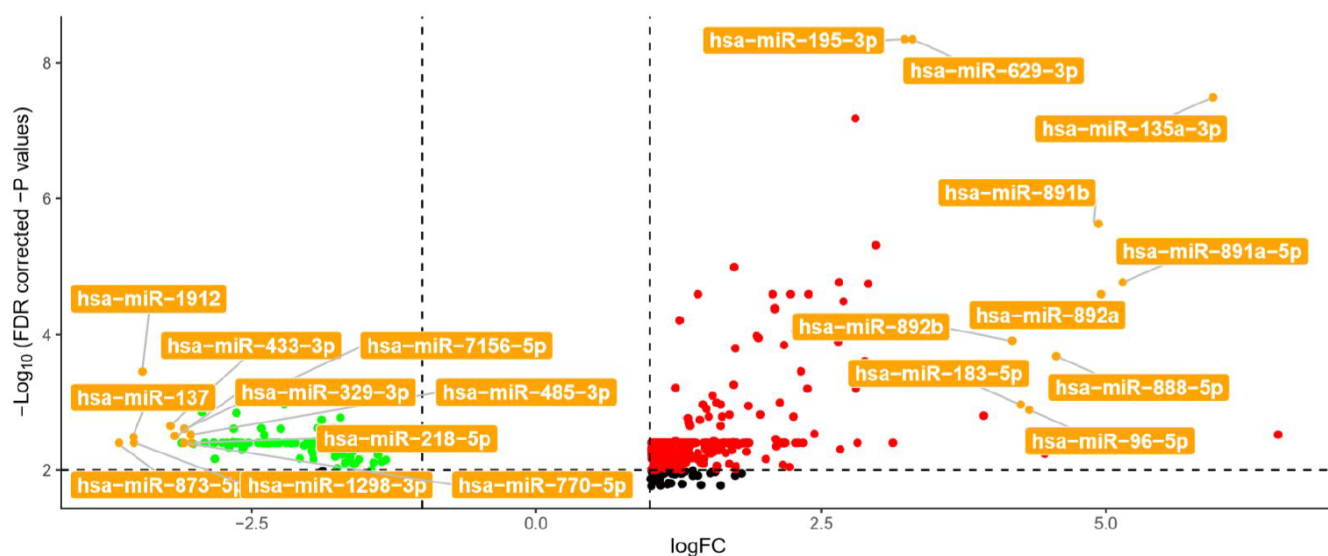


Рисунок 4.24. График рассеивания дифференциальной экспрессии микроРНК анапластической олигодендроглиомы. Ось абсцисс представляет logFC, ось ординат – $-\log_{10}$ (P – значение с FDR поправкой). Красным и зеленым цветом отмечены гены с $\log_{FC} > 1$ и $\log_{FC} < -1$ при $p\text{-value} < 0,05$ соответственно. Подписями обозначены топ-10 генов с пониженной/повышенной экспрессией

Результатом интерактивного анализа для анапластической олигодендроглиомы стало определение 372 пар ДЭ-миРНК и мРНК ДЭГ (рисунок 4.25).

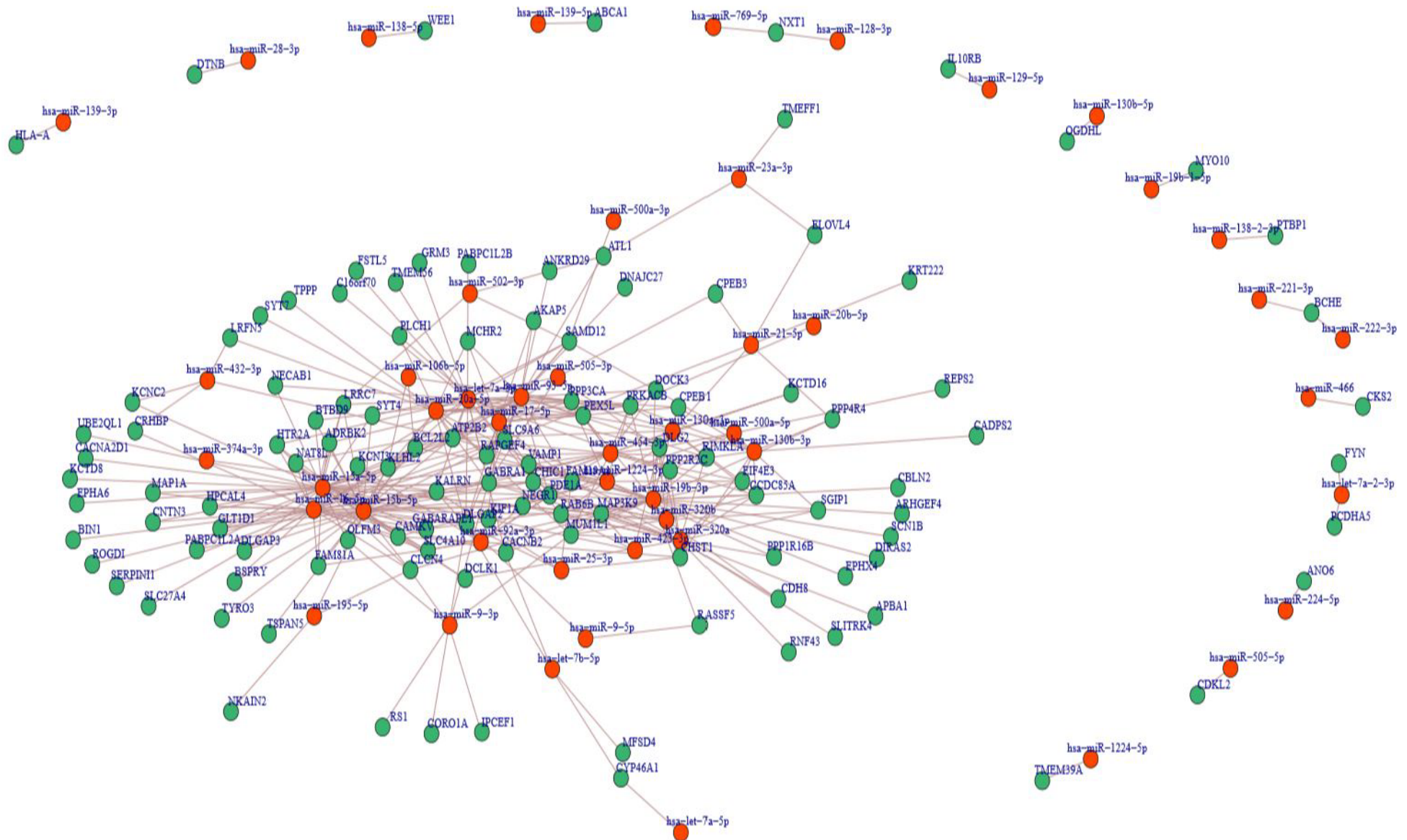


Рисунок 4.25. Схема интерактивного взаимодействия микроРНК и мРНК генов, ассоциированных с выживаемостью, в исследуемых образцах анапластической олигодендроглиомы. Красным обозначены ДЭ-миРНК, зеленым – ДЭГ

4.2.5 Дифференциальная экспрессия микроРНК при глиобластоме

Результаты дифференциальной экспрессии микроРНК для глиобластомы проиллюстрированы на рисунке 4.26.

Для глиобластомы выявлено 69 ДЭ-миРНК (дифференциальная экспрессия микроРНК). Наиболее значимым изменениям подвергаются микроРНК hsa-miR-124a, hsa-miR-139, hsa-miR-137, hsa-miR-7, hsa-miR-338, hsa-miR-219, hsa-miR-129, hsa-miR-218, hsa-miR-128b, hsa-miR-128a и микроРНК hsa-miR-21, hsa-miR-27a, hsa-miR-23a, hsa-miR-210, hsa-miR-10b, hsa-miR-155, hsa-miR-25, hsa-miR-106b, hsa-miR-15b, hsa-miR-148a с понижением и повышением своей активности соответственно.

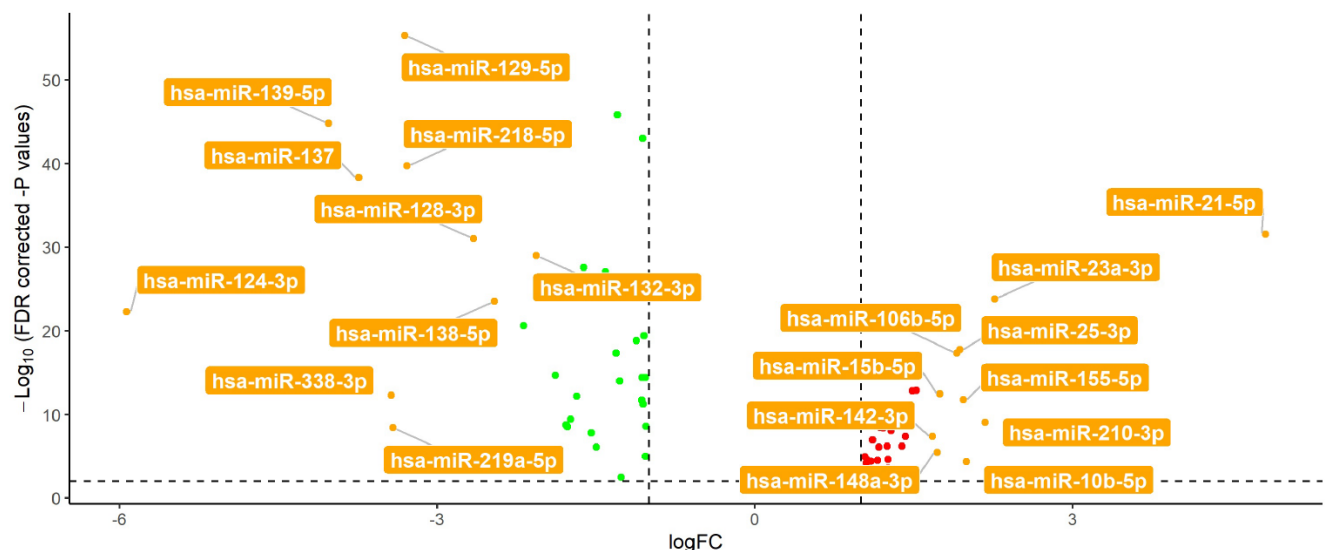


Рисунок 4.26. График рассеивания дифференциальной экспрессии микроРНК при глиобластоме. Ось абсцисс представляет logFC, ось ординат – $-\log_{10}$ (P – значение с FDR поправкой). Красным и зеленым цветом отмечены гены с $\logFC > 1$ и $\logFC < -1$ при $p\text{-value} < 0,05$ соответственно. Подписями обозначены топ-10 генов с пониженной/повышенной экспрессией

Для глиобластомы корреляционных пар ДЭГ и ДЭ-миРНК выявлено не было. Вероятно, это может быть связано с разными платформ-источниками данных.

В нашем исследовании для каждого из 5 подтипов глиом были описаны специфические профили экспрессии генов и микроРНК (таблица 4.3). В итоге были определены паттерны специфично экспрессирующихся маркеров: 211 уникальных ДЭГ и 21 ДЭ-миРНК для диффузной астроцитомы GII,

соответственно 63 и 65 для анапластической астроцитомы GIII, 119 и 10 для олигодендроглиомы GII, 147 и 51 для анапластической астроцитомы GIII.

Выявленные паттерны экспрессии по большей части представляют сигнальные пути, ассоциированные с нейронной активностью, пролиферацией и прогрессированием опухолевого роста. Для более ранних стадий глиальных опухолей GII–GIII продемонстрировано сходство в наборе сигнальных путей с аберрантной активностью (таблица 4.3). В то же время для группы GBM описаны сигнальные пути, не характерные для астро-/олигодендроглиом.

На основании данных первичного скрининга, была сформирована панель генов, дифференциальная экспрессия которых не только уникальна для каждого подтипа, но и коррелирует с общей выживаемостью пациентов. Панель включает 26 ДЭГ, уникальных для диффузной астроцитомы GII; 15 ДЭГ – для анапластической астроцитомы GIII; 17 ДЭГ – для олигодендроглиомы GII; 7 ДЭГ – для анапластической астроцитомы GIII и 151 для глиобластом. Краткая характеристика уникальных ДЭГ, ассоциированных с выживаемостью и не исследованных при глиальных опухолях, приведена в таблице 4.3.

Первичный анализ данных TCGA позволил дифференцировать от остальных подтипов глиом диффузные астроцитомы и олигодендроглиомы по экспрессии 21 и 10 микроРНК, соответственно; анапластическую астроцитому и олигодендроглиому – по 65 и 51 микроРНК, соответственно. Для группы GBM выделено 13 уникальных ДЭ-миРНК. После корреляционного анализа Пирсона и валидации корреляционных пар по базам данным, были выявлены уникальные микроРНК для некоторых подтипов, таргетирующих ДЭГ, которые ассоциированы с выживаемостью. Ниже кратко остановимся на их характеристике.

В диффузных астроцитомах было выявлено снижение уровня hsa-let-7c-5p и hsa-miR-125b-5p. Параллельно отмечено, что экспрессия hsa-let-7c-5p ассоциирована с уровнем транскрипционной активности гена BEGAIN; аналогична связь hsa-miR-125b-5p с уровнем мРНК генов *DUSP3* и *RAB3D*. Ранее в экспериментальном исследовании на клетках острой эритролейкемии

(Mortazavi D., Sharifi M., 2018) был продемонстрирован антипролиферативный эффект let-7c-5p, по мнению авторов, связанный с таргетированием онкогена *PBX2*. В клетках колоректального рака после воздействия 5-FU или голодания активировался пул микроРНК, включающий hsa-let-7c-5p (Zhou B. et al., 2017). Обнаруженная нами экспрессионная корреляция hsa-let-7c-5p согласуется с наличием одного сайт связывания (target score – 90) с 3'UTR мРНК гена *BEGAIN*. Белок *BEGAIN* участвует в регуляции активности постсинаптических нейротрансмисмиттерных рецепторов (GO:0098962), участие этого локуса в онкогенезе не подтверждено на сегодняшний день.

Противоопухолевый эффект MiR-125b был описан в ряде работ, исследовавших рак легких, гепатоцеллюлярную карциному и рак молочных желез (Gerloff D. et al., 2020). Например, в работе Ming Yuan с соавторами демонстрируется антипролиферативный эффект повышенной экспрессии микроРНК 125b-5p в клеточных линиях детской диффузной астроцитомы (Yuan M., Da Silva A.C.A., Arnold A. et al., 2018). Напротив, в некоторых исследованиях рака эндометрия, простаты и глиобластомы указывается на онкогенные эффекты микроРНК 125b-5p, которая таргетирует известные онкосупрессоры *TP53* и *GJA1* (Christopher A.F., Gupta M., Bansal P., 2016). Мишенью miR-125b-5p в диффузных астроцитомах, возможно, является мРНК гена *DUSP3*, члена подсемейства белковых фосфотаз, которые негативно регулируют участников суперсемейства митоген-активируемых протеинкиназ MAPK/ERK, SAPK/JNK, p38, и таким образом, контролируют пролиферацию и дифференцировку. Белок RAB3D (3 сайта связывания 3'UTR с miR-125b-5p) описывается как онкогенная малая ГТФаза, способствующая миграции клеток как при глиальных опухолях, так и метастазированию при раке молочных желез через внутриклеточный АКТ/GSK3 β -сигналинг. В итоге в границах одной опухоли miR-125b-5p проявляет как онкосупрессорный, так и проонкогенный эффект (Ferracin M., Bassi C., Pedriali M. et al., 2013).

Анапластические астроцитомы характеризовались изменением уровня трех уникальных миРНК – hsa-miR-190b-3p, hsa-miR-196a-3p и hsa-miR-218-2-3p.

Корреляционный анализ позволил нам связать уровень hsa-miR-190b-3p с экспрессией гена *EFNB1*, который участвует в адгезии клеток и формировании нейронных синапсов. В этом случае повышается экспрессия мишени hsa-miR-190b-3p, что можно объяснить наличием дополнительных механизмов регуляции транскрипции *EFNB1*. Однако hsa-miR-190b-3p может смягчать увеличение экспрессии *EFNB1*. Повышение уровня микроРНК-190b показано и в других типах злокачественных новообразований. Например, валидация данных анализа 1083 образцов рака молочной железы (TCGA) подтвердила повышенный уровень экспрессии микроРНК-190b как в операционных биоптатах, так и в клеточных линиях рака молочной железы, где значительно способствует пролиферации и миграции клеток (Naorem L.D., Muthaiyan M., Venkatesan A., 2019). hsa-miR-190b-3p коррелирует с экспрессией гена *C8orf34*, участвующего в регуляции экспрессии генов и клеточного цикла. Мутации в данном генетическом локусе могут опосредовать тяжелую токсичность при проведении химиотерапии (Patel J.N., McLeod H.L., Innocenti F., 2013).

В нашем исследовании экспрессия hsa-miR-196a-3p повышалась. Аналогично, высокий уровень микроРНК-196a-3p наблюдался при колоректальном раке в исследовании Ya-nan Wang с соавт. (2017). В то же время исследователи показали, что снижение экспрессии hsa-miR-196a-3p связано с высоким риском метастазирования при раке молочной железы (Wang X., Jiang D., Xu C. et al., 2017). Авторы обнаружили, что трансформирующий фактор роста $\beta 1$ негативно регулирует экспрессию hsa-miR-196a-3p и активирует нейропилин-2, который вызывает миграцию и инвазию опухолевых клеток.

Наше исследование демонстрирует снижение экспрессии микроРНК-218-2-3p. В результате корреляционного анализа, с последующей фильтрацией выявлена зависимость экспрессии микроРНК-218-2-3p и мРНК гена *LMO7*. Напротив, ранее в исследовании Zhuoying Feng была выявлена гиперэкспрессия микроРНК-218-2-3p, как в клеточных линиях, так и в операционных биоптатах глиальных опухолей различной степени злокачественности. В работе повышение активности данной микроРНК

ассоциировали с инвазивным и пролиферативным потенциалом глиальных опухолей. Возможная мишень hsa-218-2-3p – *LMO7* – описывается как транскрипционный фактор и стабилизатор адгезионных соединений, изменение экспрессии которого ассоциировано с некоторыми онкологическими нозологиями. Снижение экспрессии *LMO7* в мышинных моделях приводило к развитию аденокарциномы легкого, а низкая экспрессия в аденокарциноме легкого человека ассоциировалась с негативным прогнозом (Feng, Z., Zhang L., Zhou J., Zhou S., 2017). Известны и обратные результаты, в которых высокую экспрессию *LMO7* оценивали как негативный прогностический фактор при немелкоклеточном раке легких, ассоциированном с LRIG1 (Karlsson T., Kvarnbrink S., Holmlund C. et al., 2018).

Несмотря на многочисленность корреляционных пар ДЭ микроРНК-ДЭГ (n=75), выявленных для диффузных олигодендроглиом, подтип – уникальные микроРНК – среди них отсутствуют.

Проведенная фильтрация позволила выделить три ДЭ-миРНК, уникальные для анапластических олигодендроглиом – hsa-miR-20b-5p, hsa-miR-466, hsa-let-7a-5p.

Ранее в исследовании колоректального рака отмечена ассоциация hsa-miR-20b-5p с выживаемостью, а также отрицательная корреляция этой микроРНК с одним из регуляторов клеточного цикла E2F5 (Mullany L.E., Herrick J.S., Sakoda L.C. et al., 2018). Кроме того, повышенное содержание данной микроРНК в крови ассоциировалось с лучшим прогнозом у пациентов с метастатическим КРР, получающих ХТ на основе бевацизумаба. Проведенный нами анализ демонстрирует отрицательную корреляцию экспрессии микроРНК-20b-5p и мРНК гена *PRKACB*. Данный генетический локус был идентифицирован как значимый онкоген, участвующий в прогрессировании эндокринного рака, путем модулирования сигнальной активности цАМФ. В свою очередь, немелкоклеточный рак легких демонстрирует более низкие уровни мРНК гена *PRKACB*, по сравнению с уровнем в соответствующих нормальных тканях, а повышение транскрипционной активности *PRKACB* снижало количество

пролиферативных, колониальных и инвазивных клеток и увеличивало частоту апоптоза (Wang Y., Wang B., Zhou H. et al., 2020).

В работе, посвященной разработке предикторов терапии глиобластомы, (Maximilian Niyazi) высокая экспрессия микроРНК-let-7a-5p трактовалась как благоприятный прогностический фактор, ассоциированный с выживаемостью (Niyazi M., Pitea A., Mittelbronn M. et al., 2016). При раке молочной железы микроРНК-let-7a-5p опосредует чувствительность к ингибитору протеасом – бортезомибу, независимо от молекулярного подтипа. Потенциальную значимость let-7a-5p определили Xingni Zhou с коллегами при немелкоклеточном раке легких (Zhou X., Zhang Z., Liang X., 2020).

Послойная фильтрация данных выявила корреляционную пару let-7a-5p и ДЕ мРНК гена *CYP46A1*. Данный генетический локус кодирует холестерин 24-гидроксилазу – фермент, ответственный за элиминацию холестерина в 24(S)-гидроксистерин (24ОНС, оксистерол), специфичный для ГМ. Снижение экспрессии мРНК *CYP46A1* демонстрируется в исследовании Mingzhi Han и соавт., где был проведен анализ дифференциальной экспрессии генов *in silico*, с последующей верификацией *in vitro* для глиобластом. Данные «single cell» секвенирования транскриптома демонстрируют превалирующую экспрессию *CYP46A1* в нейронах, астроцитах и клетках-предшественниках олигодендроцитов по сравнению с опухолевыми клетками (Han M., Wang S., Yang N. et al., 2020). Сниженная экспрессия *CYP46A1* коррелирует с меньшей выживаемостью пациентов с ГБ, а повышение экспрессии *in vitro* модулирует снижение колониеобразования, пролиферации и образование сфероидов клеток ГБ за счет снижения накопления холестерина.

Уровень микроРНК-466 снижается при остеосаркоме и коррелирует с экспрессией гена *IRS1*. Повышение экспрессии ингибировало пролиферацию и инвазию клеток остеосаркомы *in vitro* (Liu H., Chen G.X., Liang, M.Y. et al., 2014). Аналогично, снижение экспрессии микроРНК-466 демонстрируют клетки гепатоцеллюлярной карциномы, а повышение экспрессии подавляет пролиферацию, индуцирует апоптоз и снижает метастатический потенциал

опухоли, за счет таргетирования мРНК гена *MTDH* (Tong F., Ying Y., Pan H. et al., 2018). При раке предстательной железы продемонстрировано снижение микроРНК-466 за счет активности длинной некодирующей РНК TUC338. Авторами также выявлен антипролиферативный потенциал микроРНК-466. Однако в злокачественных опухолях шейки матки определяли повышение транскрипционной активности микроРНК-466 (Li G., Zhang Y., Mao J. et al., 2019). В нашем исследовании повышенная экспрессия микроРНК-466 негативно коррелирует с уровнем мРНК онкогена *CKS2*. *CKS2* кодирует регуляторную субъединицу 2 циклин-зависимой киназы, которые являются зависимыми от клеточного цикла протеинкиназами. Повышенная экспрессия *CKS2* ассоциируется с прогрессированием опухоли при раке мочевого пузыря, гепатоклеточной карциноме, молочной железы и при глиобластомах (Zhang X.M., Wang J., Liu Z.L. et al., 2020).

Мы не выявили корреляционные пары микроРНК-мРНК в группе GBM. Стоит отметить, что в GBM проекте TCGA крайне не хватает данных по микроРНК-секвенированию. Будущие исследования с применением технологии секвенирования следующего поколения помогут раскрыть новые связи и механизмы в онкогенезе глиобластомы. Таким образом, выявленные ДЭ-миРНК после тщательной валидации могут быть использованы в качестве мишеней таргетной и генной терапии глиальных опухолей GII, GIII головного мозга.

Глава 5

ЭКСПРЕССИЯ КЛЮЧЕВЫХ РЕГУЛЯТОРОВ ОНКОАССОЦИИРОВАННЫХ СИГНАЛЬНЫХ ПУТЕЙ В ГЛИАЛЬНЫХ ОПУХОЛЯХ

5.1 Характеристика депозитария тканей, препаратов РНК и ДНК глиальных опухолей

В рамках выполнения данной работы был сформирован депозитарий тканей и нуклеиновых кислот, в который были депонированы в том числе образцы от пациентов, использованные в настоящем исследовании. Выборка биологического материала включает образцы опухолевой ткани, условно-здоровой ткани, плазмы крови до операции. Представленность разных типов тканей, пополнивших депозитарий, приведена на рисунке 5.1.А. Биоматериал перемещали на длительное хранение только после гистологической и иммуногистохимической верификации диагноза глиом разной степени злокачественности.

Информацию о пробах вносили в базу данных, представленную в виде таблицы Excel, которую в дальнейшем конвертировали в формат CSV и импортировали в специализированную программу FreezerPro. Биологический материал сопровождали сбором клинической информации. Пример учета пациентов и биологического материала представлен на рисунке 5.1.Б.

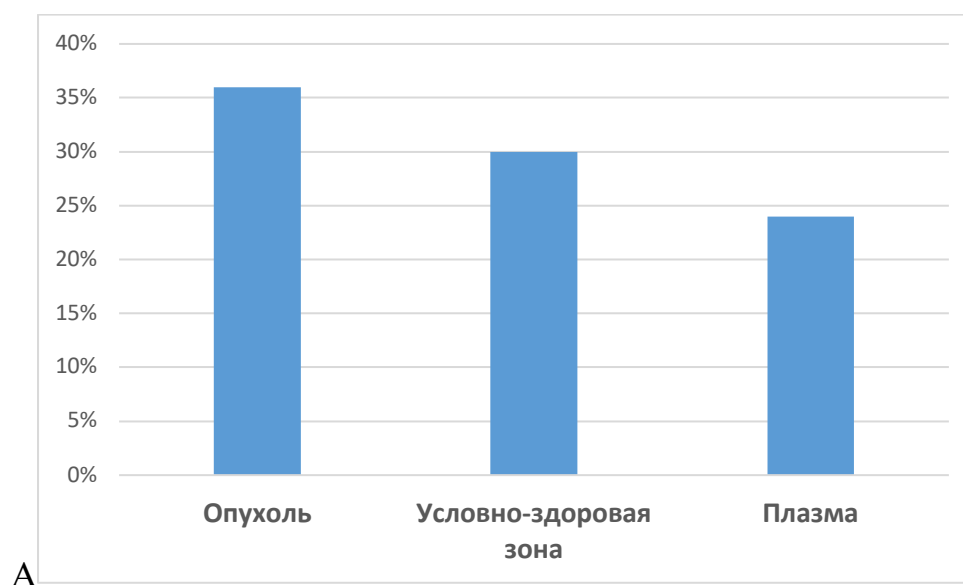


Рисунок 5.1. А – Представленность разных типов тканей, пополнивших депозитарий

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
	№ образца	Дата операции	№ карты, ИБ	Код по МКБ	ФИО пациента	В-ст	Пол	Диагноз, Гистозаключение	ИГХ, GRADE	Биоптаты	Консервация
1											
67	66	#####	C16654/3 п30422	C71.0	*****	18	1	Опухоль гиппокампа слева с распространением на левую височную долю ГМ. Кл. гр. 2 №95657-59/18 астроцитомы	Астроцитомы, 2	0- опухоль; 0.5 - 5 мм от опухоли и 1 - 10 мм опухоли	Мгновенная заморозка без РНК-среды
68	67	#####	C16941/3 п-37407/3	C71.0	*****	68	0	Первично-множественная опухоль ГМ: кистозно-солидная опухоль левой височной доли, диффузная глиальная опухоль базальных отделов левых височной доли и таламуса ГМ. Кл. гр. 2 № 97522-26/18 от 24.10.2018: глиобластома	Глиобластома, 4	Нет операционного материала; 2 - кровь до операции.	Выделение плазмы, заморозка Мгновенная заморозка без РНК-среды
69	68	#####	C-610/К П-34569/П	C 71.8	*****	48	0	Диффузная глиальная опухоль левых лобной, височной долей с распространением на островковую область гиппокампа, таламус и подкорковые ядра слева .	Анапластическая олигодендроглиомы, 3	0- опухоль; 1 - 10 мм опухоли, 2 - кровь до операции	Выделение плазмы, заморозка Мгновенная заморозка без РНК-среды
70	69	#####	c-829/к п33823/и	C71.8	*****	2	0	Диффузная глиальная опухоль правых лобной и височной долей ГМ.	Анапластическая олигодендроглиомы, 3	0- опухоль; 0.5 - 5 мм от опухоли; 1 - 10 мм опухоли; 2 - кровь до операции	Выделение плазмы, заморозка Мгновенная заморозка без РНК-среды
71	70	#####	c-944/к п-33983/и	C71.1	*****	52	0	Диффузная глиальная опухоль левой лобной доли ГМ.	Анапластическая астроцитомы, 3	0- опухоль; 0.5 - 5 мм от опухоли; 1 - 10 мм опухоли; 2 - кровь до операции	Выделение плазмы, заморозка Мгновенная заморозка без РНК-среды

Рисунок 5.1. Б – Формат сводной таблицы базы данных

Параллельно проводили работу по выделению и консервированию препаратов нуклеиновых кислот. В общей сложности было подготовлено 270 препаратов ДНК и РНК. Из них более 60% образцов были безвозвратно использованы в научно-исследовательской работе и для генотипирования опухолей в клинических целях.

В депозитарии ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России были размещены на длительное хранение 221 препарат тотальной РНК, экстрагированные из опухолевой, перифокальной, условно-нормальной ткани головного мозга и плазмы крови. Препараты РНК экстрагировали из свежих или подвергнутых глубокой заморозке операционных биоптатов глиом в трех точках по пути операционного вмешательства. Вид депонированного материала представлен на рисунке 5.2.

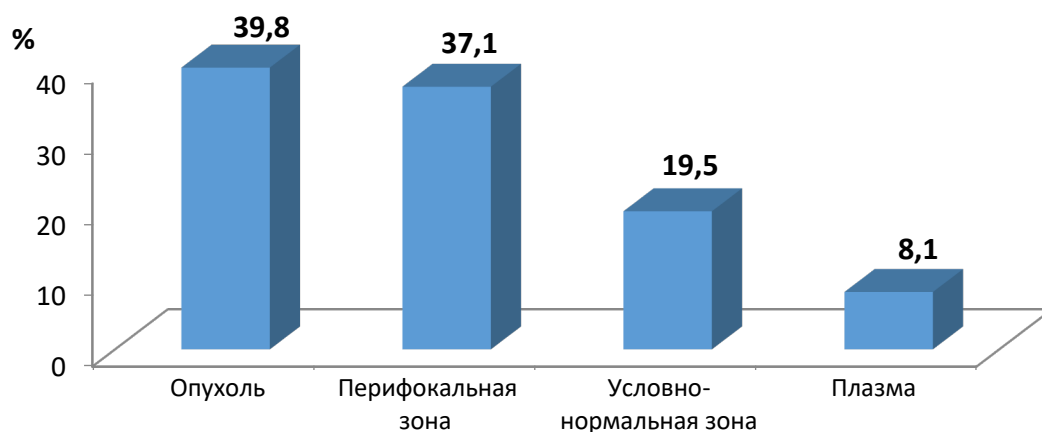


Рисунок 5.2. Диаграмма распределения препаратов РНК по источнику выделения

В выборке пациентов с диагнозом глиальная опухоль головного мозга преобладали мужчины (75%). Наиболее многочисленными были возрастные группы в диапазоне 46–60 лет (40,2%) и 61–75 лет (28,5%) (рисунок 5.3).

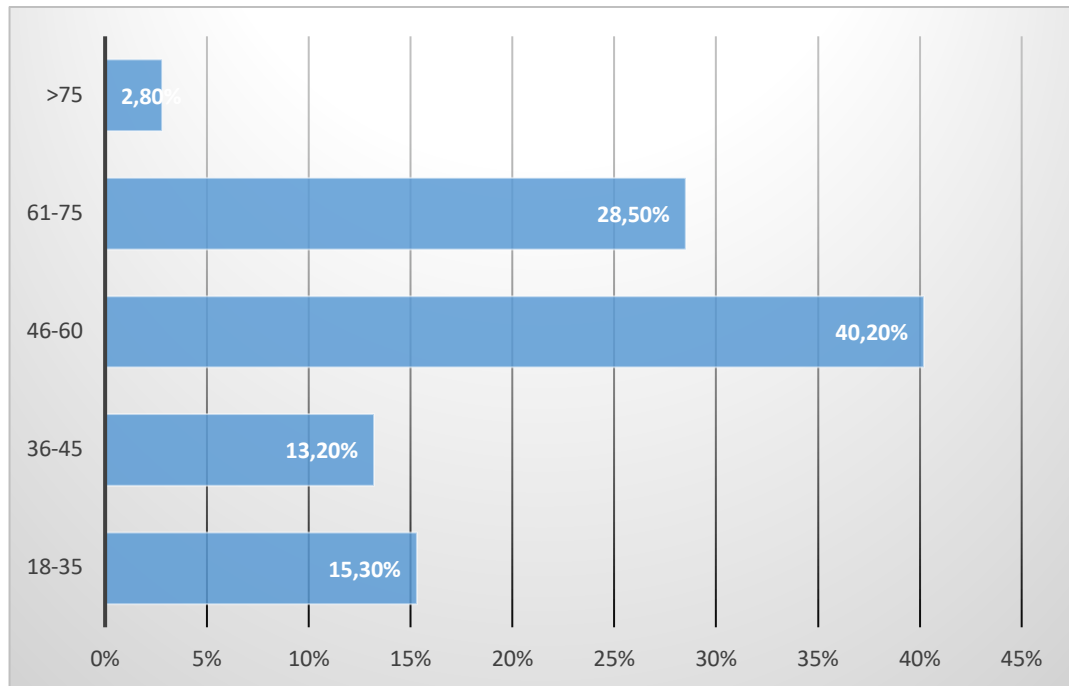


Рисунок 5.3. Возрастная характеристика пациентов, биоматериал которых включен в депозитарий

На сегодняшний день депозитарий представлен образцами глиальных опухолей разной степени злокачественности (рисунок 5.4), большую часть образцов составили низкодифференцированные злокачественные новообразования – 60%.

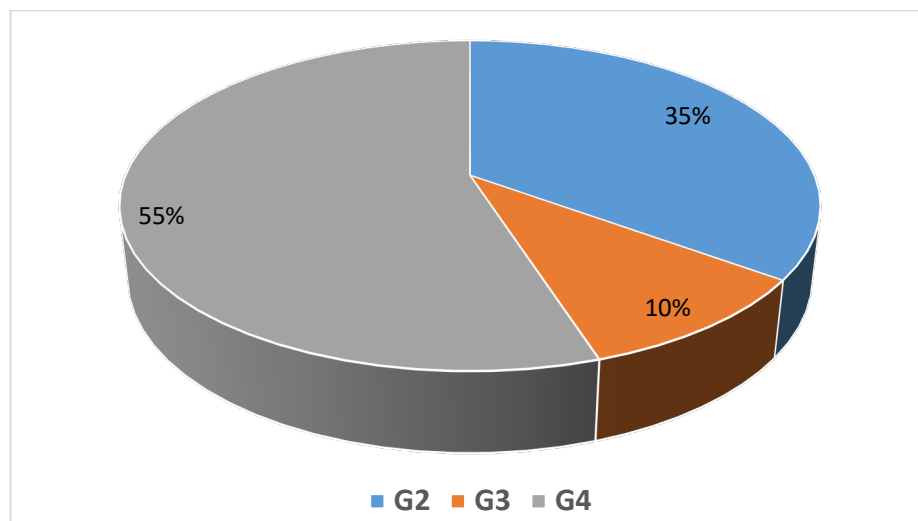


Рисунок 5.4. Диаграмма распределения образцов глиом по степени злокачественности

Глиальные опухоли, составившие коллекцию биоматериалов, были генотипированы на наличие ко-делеции 1p/19q и мутаций в генах *ATRX* и *IDH1/2*.

Молекулярно-генетическое тестирование глиальных опухолей на наличие генетических изменений, в том числе в *IDH1/2* и ко-делеции 1p/19q, необходимо в соответствии с актуальной классификацией опухолей ЦНС ВОЗ от 2016 года.

Генотипирование опухолей по статусу *IDH1/2* генов позволило выявить исключительно один тип мутации R132H в гене *IDH1*. Данное событие было отмечено в 20,3% выборки. При этом большую часть опухолей с мутантным статусом составили астроцитомы GII (48%). По данным базы COSMIC, соматические мутации в генах *IDH1/2* встречаются в 33,45% всех глиальных опухолей ЦНС, при этом мажорной мутацией является R132H. Некоторое расхождение по частоте мутаций в нашем исследовании мы относим к неравновесной представленности в выборке глиальных опухолей разной степени злокачественности.

С помощью фрагментного анализа было оценено наличие ко-делеций 1p/19q у пациентов с мутацией в генах *IDH1/2*. Наличие ко-делеции считали доказанным в случае обнаружения LOH по двум и более микросателлитным локусам. Результаты генотипирования представлены в таблице 5.1 и на рисунке 5.5.

Наличие ко-делеции 1p/19q оценивается только у *IDH*-мутантных образцов в соответствии с молекулярной классификацией глиальных опухолей от 2016 г., для дифференцировки астроцитом от олигодендроглиом (Komori T., 2017).

Таблица 5.1 – Частота встречаемости ко-делеции 1p19q и мутаций в генах *IDH1/2* в выборке глиальных опухолей

Мутация / ко-делеция		1p19q			Всего
		(-)	(+)	нет данных	
<i>IDH1/2</i> , абс. ч.	мутация (+)	16	32	0	48
	мутация (-)	0	0	0	0
	нет данных	0	0	0	0
Всего, абс. ч. (%)		16 (40,0)	32 (60,0)		48 (100,0)

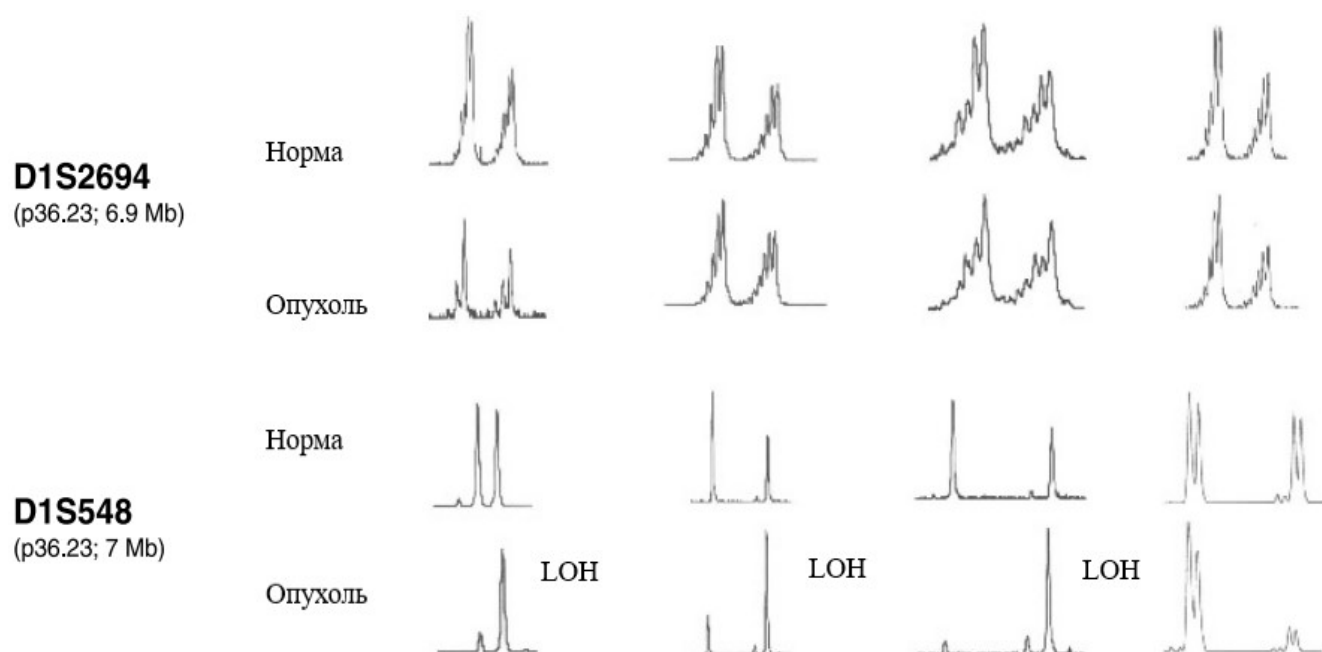


Рисунок 5.5. Пример аллельных профилей D1S2694 и с потерей аллеля D1S548 в опухолевой глиальной ткани. LOH – потеря гетерозиготности

Исследование выборки из 100 пациентов не привело к идентификации мутаций в гене *ATRX* в образцах глиальных опухолей. Отметим, что большинство исследованных опухолей были идентифицированы как глиобластомы GIV.

По данным базы «mycancergenome.org» (<https://www.mycancergenome.org/>), мутации в гене *ATRX* встречаются у 29,67% пациентов с астроцитомой, присутствуют у 40,68% всех пациентов с анапластической астроцитомой, и присутствуют у 10,44% всех пациентов с глиобластомой. Кроме того, мутации в данном гене встречаются в 8% диффузных олигодендроглиом и в 5% анапластических олигодендроглиом (AACR Project Genie Consortium et al., 2017).

В настоящем исследовании была дана оценка прогностического показателя – степени метилирования гена *MGMT*, которую провели для 50-ти опухолевых образцов, депонированных в биобанк. Наличие высокой степени метилирования присваивалось в случаях с более 10% средним уровнем метилирования пяти CpG-островков 1 экзона гена *MGMT* (рисунок 5.6) (Xie H., Tubbs R., Yang B., 2015).

Глобальное метилирование генома человека характеризуется постепенным снижением с возрастом. Ранее для злокачественных опухолей толстой кишки

была показана ассоциация метилирования промотора *MGMT* с возрастом пациентов (Кит О.И., Водолажский Д.И., Двадненко К.В. и соавт., 2016).

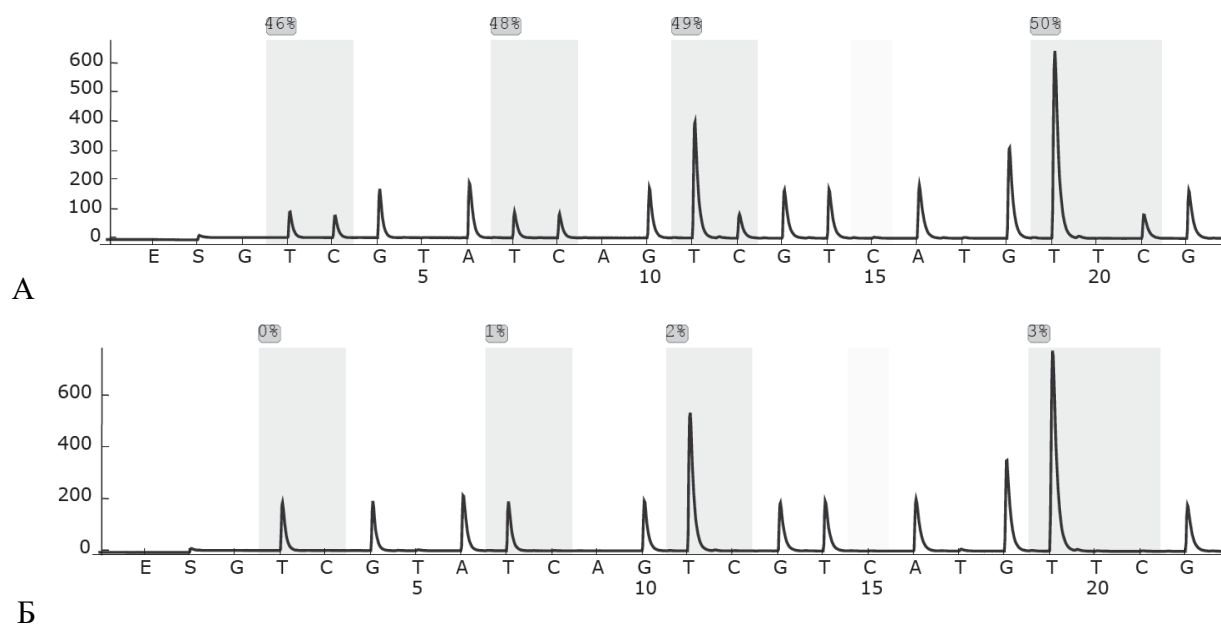


Рисунок 5.6. Пирограммы метилирования 5-ми CpG-островков 1 экзона гена *MGMT* в глиальной опухоли (А) и лимфоцитах крови здорового донора (Б)

В настоящей работе достоверной корреляции между процентом метилирования и возрастом не обнаружено ($r=0,017$ при $p>0,05$). По нашим данным, уровень Met (%) остается более высоким в молодом возрасте (рисунок 5.7), а также частота гиперметилированных случаев (77,8% vs 48,1%) значимо выше в группе моложе 45 лет ($\chi^2=4,853$, $p=0,028$).

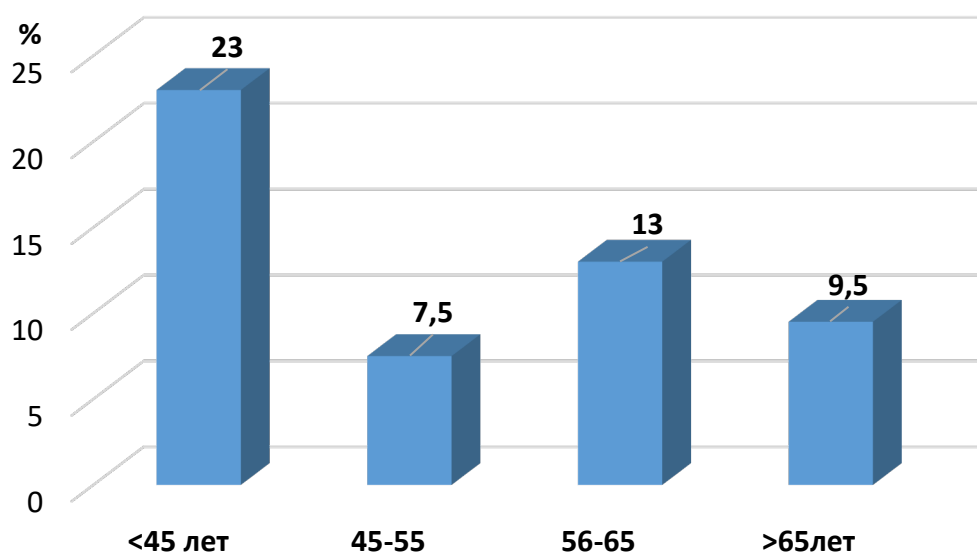


Рисунок 5.7. Уровень метилирования (%) гена *MGMT* в глиальных опухолях пациентов разных возрастных групп (частота)

Отметим, что при расчете показателей нами не учитывалась степень метилирования (средняя или высокая), как обычно принято при количественном описании данного показателя. Все случаи, превышающие пороговые 10%, были отнесены к гиперметилованному типу без оценки эффективности терапии темозоломидом. В целом выявленная тенденция согласуется с известной ассоциацией лучшего прогноза для молодых пациентов с первичной глиальной опухолью и наличием объективного ответа на терапию темозоломидом в первой линии (Мацко М.В., Мацко Д.Е., Волков Н.М. и соавт., 2019).

В группах GII и GIII преобладали случаи гиперметилования (соответственно 60,0 и 50,0%) (рисунок 5.8). Глиобластомы ожидаемо содержали статистически достоверно меньшее число метилированных образцов ($p < 0,01$).

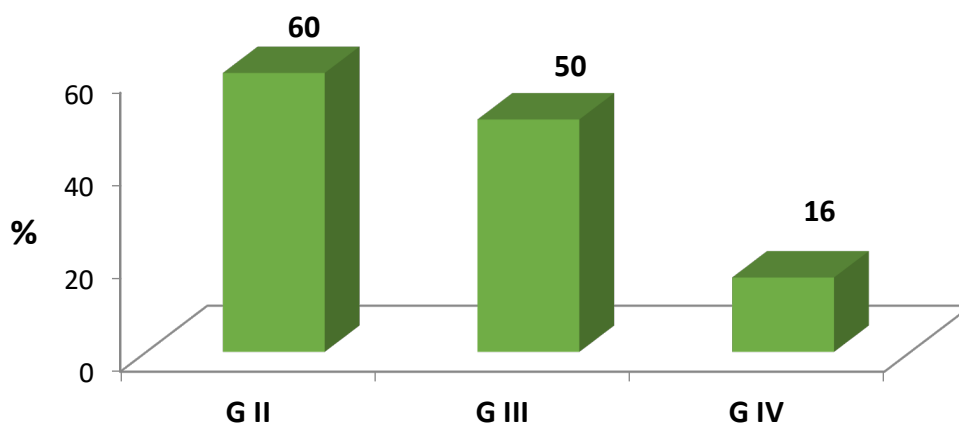


Рисунок 5.8. Частота (%) метилирования гена *MGMT* в образцах глиом разной степени злокачественности

В исследованной группе глиом опухолевые образцы, положительные по наличию мутации в генах *IDH1/2*, в 70% случаев имели высокую степень метилирования гена *MGMT*. В то же время 59% глиальных опухолей различной степени злокачественности без мутаций в генах *IDH1/2* имели гипометилированный ген *MGMT*. Таким образом, частота гиперметилования гена *MGMT* в глиальных опухолях с WT-статусом по генам *IDH1/2* не отличалась от среднего показателя, известного для спорадических опухолей этой локализации, тогда как мутация в гене *IDH* сопровождается гиперметилованием *MGMT*. В известных работах других авторов также не отмечалось полной ассоциации этих двух маркеров (Табачков Д.В. и соавт., 2017).

5.2 Исследование относительной экспрессии генов в глиальных опухолях

Полученный спектр транскрипционной активности 15-ти генов проиллюстрирован в таблицах 5.2 и 5.3 и на рисунке 5.9. Сравнительный анализ уровня экспрессии в опухолевых и условно нормальных образцах пациентов продемонстрировал увеличение транскрипционной активности 7-ми из 15-ти исследованных локусов. Статистически достоверных значений достигли для четырех локусов: *HIF1A*, *EGFR*, *SMO* и *KDM1A*, уровень мРНК которых повысился соответственно в 1,8; 1,2; 1,3; и 1,2 раза. Для остальных локусов либо не отмечено различий при сравнении экспрессии в опухоли и условной норме (*MSI2*), либо идентифицировано смещение транскрипции в сторону падения уровня транскрипционной активности по сравнению с контрольным образцом.

Таблица 5.2 – Значения изменения относительной экспрессии исследуемых генов в опухолевой ткани, относительно контрольной для всей группы глиом

Локус	Медиана 2dCt	Стандартное отклонение	p-значение
<i>EGFR</i>	1,761*	20,628941	0,009376*
<i>SMAD4</i>	0,880	1,135469	0,113157
<i>SMAD7</i>	0,476*	0,710451	0,000001*
<i>SMO</i>	1,200*	6,655797	0,024147*
<i>NOTCH1</i>	1,085	2,364945	0,865814
<i>NOTCH2</i>	1,052	4,595486	0,715591
<i>HBPI</i>	0,777*	0,840009	0,006035*
<i>HIF1A</i>	1,518*	5,495358	0,000576*
<i>EGLN1</i>	0,749*	0,832645	0,000446*
<i>EGLN3</i>	0,607*	0,942482	0,000185*
<i>KDM1B</i>	0,666	6,136442	0,347250
<i>KDM1A</i>	1,235*	2,176878	0,012316*
<i>MSI1</i>	1,275	4,139092	0,120548
<i>MSI2</i>	0,957	7,381148	0,649737
<i>TET1</i>	0,943	2,632561	0,899152

Примечание. * – статистически достоверные значения

Таблица 5.3 – Распределение частот встречаемости разных уровней экспрессии генов *EGFR*, *SMAD7*, *SMO*, *HBPI*, *HIF1A*, *EGLN1*, *EGLN3*, *KDM1A*, абс. ч. (%)

Уровень экспрессии генов		Число больных с диагнозом			Всего
		ДА	АА	ГБ	
<i>EGFR</i>	низкий	10 (48%)	3 (27%)	15 (34%)	28 (36%)
	средний	1 (4%)	1 (9%)	2 (4%)	4 (5%)
	высокий	10 (48%)	7 (64%)	26 (62%)	43 (57%)
<i>SMAD7</i>	низкий	13 (62%)	8 (73%)	34 (79%)	55 (73%)
	средний	1 (5%)	1 (9%)	4 (9%)	6 (8%)
	высокий	7 (23%)	2 (18%)	5 (12%)	14 (19%)
<i>SMO</i>	низкий	11 (52%)	2 (18%)	15 (35%)	28 (37%)
	средний	1 (5%)	1 (9%)	4 (9%)	6 (8%)
	высокий	9 (43%)	8 (73%)	24 (56%)	41 (55%)
<i>HBPI</i>	низкий	10 (47%)	6 (55%)	30 (70%)	46 (61%)
	средний	3 (14%)	2 (18%)	4 (9%)	9 (12%)
	высокий	8 (38%)	3 (27%)	9 (21%)	20 (27%)
<i>HIF1A</i>	низкий	7 (33%)	3 (27%)	17 (40%)	27 (36%)
	средний	0	0	2 (5%)	2 (3%)
	высокий	14 (67%)	8 (73%)	27 (63%)	49 (61%)
<i>EGLN1</i>	низкий	12 (57%)	5 (45%)	32 (75%)	49 (61%)
	средний	2 (10%)	5 (45%)	4 (9%)	11 (15%)
	высокий	7 (33%)	1 (9%)	7 (16%)	15 (20%)
<i>EGLN3</i>	низкий	14 (81%)	9 (82%)	30 (70%)	53 (71%)
	средний	2 (10%)	1 (9%)	2 (5%)	5 (7%)
	высокий	5 (24%)	1 (9%)	11 (26%)	17 (23%)
<i>KDM1A</i>	низкий	5 (23%)	4 (36%)	17 (40%)	26 (35%)
	средний	1 (4%)	1 (9%)	5 (12%)	8 (11%)
	высокий	15 (73%)	6 (55%)	21 (50%)	41 (55%)

Для локусов *SMAD7*, *HBPI*, *EGLN1* и *EGLN3* снижение показателя относительной экспрессии было статистически значимо ($p < 0,05$) соответственно в 2, 1,25; 1,4 и 1,6 раза соответственно (таблица 5.3, рисунок 5.9).

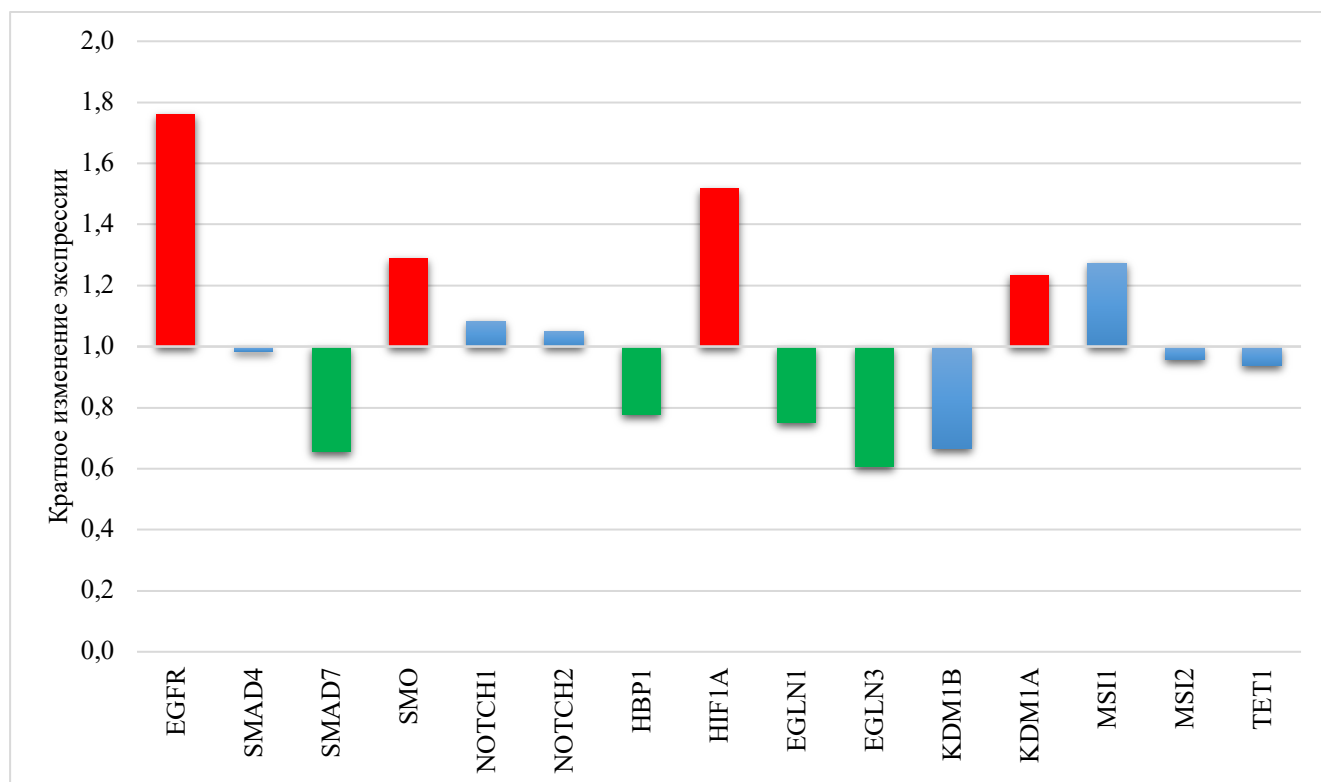


Рисунок 5.9. Изменение относительной экспрессии исследуемых генов в опухолевой ткани глиом. Красным цветом выделены значения генов с достоверно повышенной экспрессией в опухолевой ткани относительно неизменной. Зеленым – с достоверно сниженной экспрессией в опухолевой ткани относительно неизменной

5.3 Влияние изменения относительной экспрессии генов на продолжительность жизни у больных с глиальными опухолями

Медиана продолжительности жизни у больных с глиальными опухолями всех подтипов составила 355 дней. Для всей выборки глиальных опухолей различной степени злокачественности однофакторный анализ позволил установить, что основными предикторами, влияющими на выживаемость, явились возраст ($p=0,003203$), степень злокачественности опухоли ($p=0,04982$), статус гена *IDH* ($p=0,00794$), экспрессия генов *HIF1A* ($p=0,00431$), *HBP1* ($p=0,0237$), *EGLN3* ($p=0,02522$), *KDM1A* ($p=0,03555$), *EGFR* ($p=0,00091$), *SMAD7* ($p=0,00907$), *SMO* ($p=0,03121$).

Пол, экспрессия генов *SMAD4*, *NOTCH1*, *NOTCH2*, *EGLN1*, *KDM1B*, *MSI1*, *MSI2* не являются факторами, влияющими на продолжительность жизни у больных с глиальными опухолями головного мозга (таблица 5.4).

По уровню отношения рисков данные локусы делятся на онкогены и онкосупрессоры. Если отношение рисков ≥ 1 , то активность гена относится к онкогенной. В случае отношения рисков ≤ 1 активность генов связана с протективным эффектом. В данном случае протективным эффектом обладает статус гена *IDH*, экспрессия генов *SMAD7*, *HBPI* и *EGLN3*. Степень злокачественности опухоли, как и экспрессия генов *EGFR*, *SMO*, *HIF1A* и *KDM1A*, несут онкогенный эффект для глиальных опухолей в целом.

Таблица 5.4 – Результаты однофакторного анализа ассоциаций ряда факторов с продолжительностью жизни пациентов с глиальными опухолями головного мозга

Показатель	Отношение рисков	Стандартное отклонение	p-значение
Grade	1,35944247	0,163151295	0,04982*
Возраст	1,035305	0,0117701	0,003203*
Статус <i>IDH</i>	0,31190874	0,438873375	0,00794**
<i>EGFR</i>	1,02582999	0,007687785	0,00091**
<i>SMAD4</i>	1,04139154	0,122429776	0,74044
<i>SMAD7</i>	0,97766779	0,193601698	0,00907**
<i>SMO</i>	1,25931451	0,041094636	0,03121*
<i>NOTCH1</i>	0,88687692	0,099516844	0,22769
<i>NOTCH2</i>	0,88391067	0,115544049	0,28553
<i>HBPI</i>	0,38727808	0,145166444	0,0237*
<i>HIF1A</i>	1,56942539	0,07329233	0,00431*
<i>EGLN1</i>	0,87686284	0,203448605	0,51835
<i>EGLN3</i>	0,7144667	0,13967558	0,02522*
<i>KDM1B</i>	1,01649025	0,026507683	0,53722
<i>KDM1A</i>	1,45056575	0,053392355	0,03555*
<i>MSI1</i>	0,98749705	0,038727956	0,74528
<i>MSI2</i>	1,01167429	0,016403567	0,47921
<i>TET1</i>	0,96101894	0,073587353	0,58897

Примечание. * – статистически достоверные значения (* – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$)

5.4 Сравнительный анализ экспрессии генов в глиальных опухолях разной степени злокачественности

5.4.1 Изменение экспрессии *KDM1A* при диффузной астроцитоме (ДА, GII).

Влияние на выживаемость

Для группы ДА (GII) достоверное изменение относительной экспрессии в опухолевой ткани было отмечено только для гена *KDM1A* (медиана 2dCt=1,49; $p=0,00572$) (таблица 5.5, рисунок 5.10). У пациентов с диффузной астроцитомой наблюдается высокий уровень экспрессии *KDM1A* (в 73% случаев).

Таблица 5.5 – Значения изменения относительной экспрессии исследуемых генов в опухолевой ткани относительно контрольной для группы GII

Локус	Медиана 2dCt	Стандартное отклонение	p-значение
<i>EGFR</i>	1,01613	24,345055	0,91537
<i>SMAD4</i>	0,99956	2,000103	0,91254
<i>SMAD7</i>	0,69016	0,926349	0,18265
<i>SMO</i>	0,89914	5,228156	0,84527
<i>NOTCH1</i>	1,26431	1,257331	0,31537
<i>NOTCH2</i>	1,02553	8,494111	0,92352
<i>HBPI</i>	0,945	1,329970	0,49522
<i>HIF1A</i>	1,41554	9,884713	0,24583
<i>EGLN1</i>	0,6995	1,272935	0,13952
<i>EGLN3</i>	0,73815	0,937200	0,11525
<i>KDM1B</i>	0,67816	10,906759	0,76953
<i>KDM1A</i>	1,48767*	3,808062	0,00572*
<i>MSI1</i>	1,0353	6,443603	0,63285
<i>MSI2</i>	1,17952	13,749573	0,79265
<i>TET1</i>	1,13819	4,573658	0,43853

Примечание. * – статистически достоверные значения ($p<0,05$)

Уровни экспрессии генов *EGFR*, *SMAD4*, *SMAD7*, *SMO*, *NOTCH1*, *NOTCH2*, *HBPI*, *HIF1A*, *EGLN1*, *EGLN3*, *KDM1B*, *MSI1*, *MSI2* и *TET1* при диффузной астроцитоме не продемонстрировали статистически достоверных

отличий в уровнях экспрессии в опухолевой ткани относительно условно-здоровой.

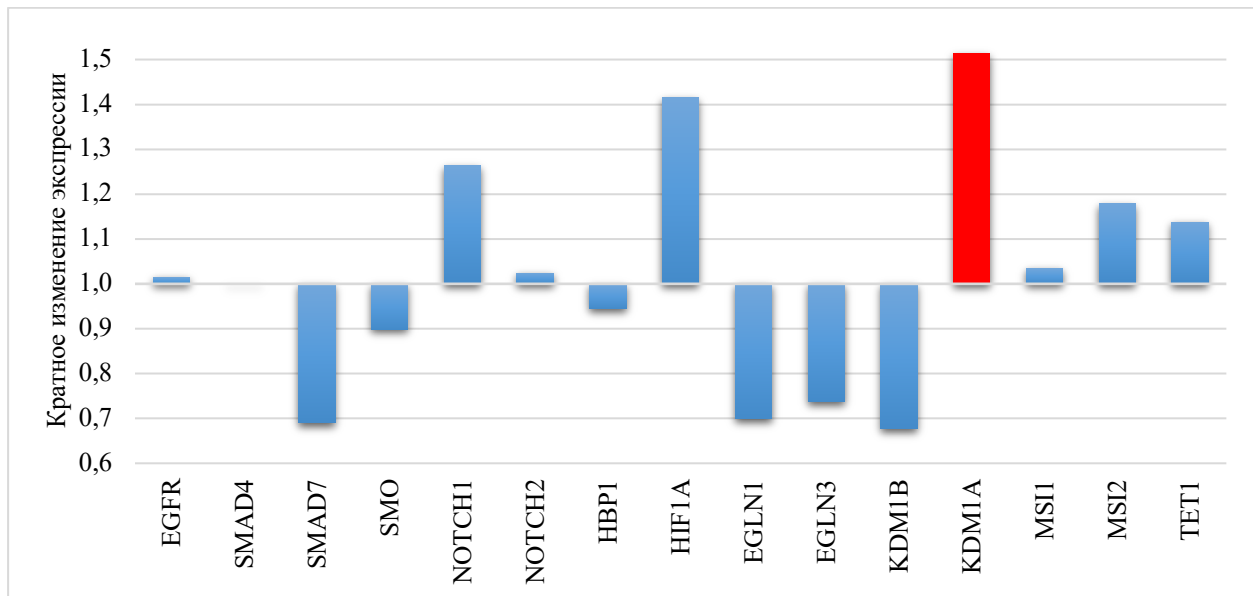


Рисунок 5.10. Изменение относительной экспрессии исследуемых генов в опухолевой ткани глиом GII. Значение *KDM1A* выделено красным

По данным TCGA, экспрессия *KDM1A* в опухолевой ткани также превышает экспрессию данного локуса в условно-здоровой ткани (рисунок 5.11).

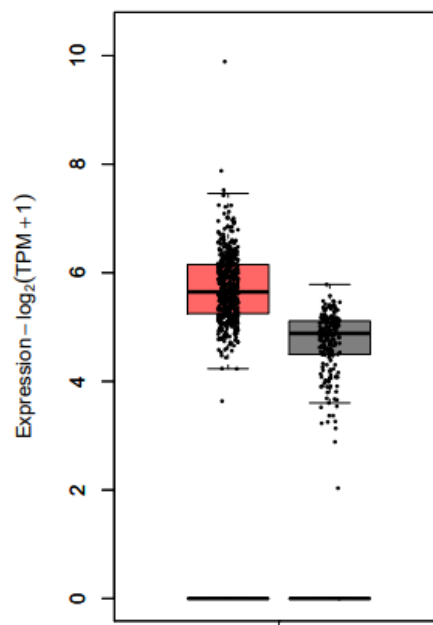


Рисунок 5.11. Экспрессия *KDM1A* в тканях диффузной астроцитомы по данным TCGA. Красным выделены показания опухолевой ткани, серым – условно-здоровой

Медиана продолжительности жизни у больных с диффузной астроцитомой составила 465 дней. Однофакторный анализ позволил установить, что основными

предикторами, влияющими на выживаемость, явились возраст ($p=0,012186167$), статус гена *IDH* ($p=0,012374622$, отношение рисков= $1,051390997$) и экспрессия гена *KDM1A* ($p=0,0174296$, отношение рисков= $0,064474171$) (таблица 5.6). Активность гена *KDM1A* при диффузной астроцитоме несет онкогенный эффект.

Таблица 5.6 – Факторы, влияющие на продолжительность жизни пациентов с диффузной астроцитомой

Показатель	Отношение рисков	Стандартное отклонение	p-значение
Возраст	1,7753	0,028952673	0,012186167 *
Статус <i>IDH</i>	0,1982	1,051390997	0,012374622 *
<i>EGFR</i>	1,0138	0,018646419	0,461107765
<i>SMAD4</i>	1,1091	0,151816102	0,495345086
<i>SMAD7</i>	1,1704	0,292903668	0,59118496
<i>SMO</i>	0,9535	0,284402774	0,866906635
<i>NOTCH1</i>	1,0991	0,248080205	0,703245306
<i>NOTCH2</i>	0,736	0,232862362	0,188037235
<i>HBPI</i>	1,235	0,211308818	0,317862431
<i>HIF1A</i>	0,6944	0,366881798	0,320239098
<i>EGLN1</i>	0,9551	0,327469106	0,88847374
<i>EGLN3</i>	0,8515	0,364074495	0,658866975
<i>KDM1B</i>	1,0387	0,029555598	0,199303099
<i>KDM1A</i>	1,5915	0,064474171	0,0174296 *
<i>MSI1</i>	1,0461	0,040961379	0,270900751
<i>MSI2</i>	1,0221	0,018642562	0,241979947
<i>TET1</i>	1,0419	0,066936645	0,539771312

Выявлена обратная зависимость уровня экспрессии гена *KDM1A* в тканях диффузной астроцитомы и общей продолжительности жизни пациентов. Медиана общей продолжительности жизни при низкой экспрессии гена *KDM1A* составила 475 дней, что больше по сравнению с группой больных, в опухоли которых наблюдалась высокая экспрессия *KDM1A* – 298,5 дня, что в полтора раза меньше (рисунок 5.12). Таким образом, низкая экспрессия *KDM1A* ассоциирована с

увеличением продолжительности жизни на 5,5 месяца (475 дня vs 298,5 дня) ($p=0,0022$). Показатели транскрипционной активности *KDM1A* в диффузных астроцитомах, выявленные в нашем исследовании методом ПЦР-РВ (рисунок 5.12), а также определенные по результатам анализа данных TCGA (рисунок 5.13), демонстрируют однонаправленную тенденцию влияния на общую выживаемость пациентов.

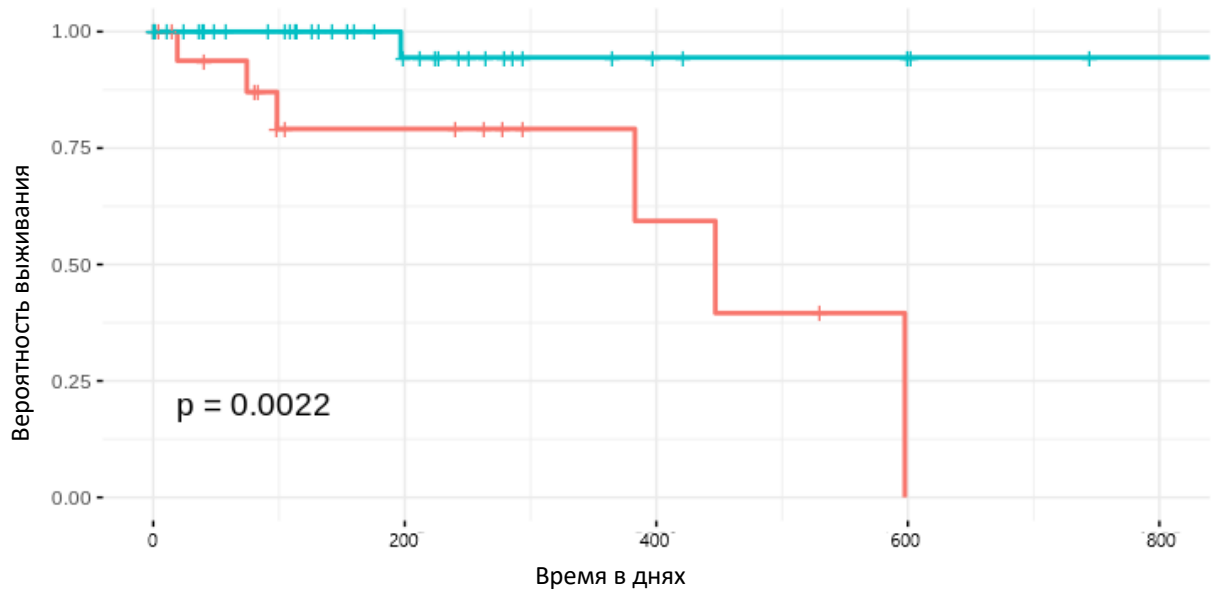


Рисунок 5.12. Общая продолжительность жизни у больных с ДА в зависимости от уровня экспрессии гена *KDM1A* (красная линия – высокая экспрессия, зеленая линия – низкая экспрессия)

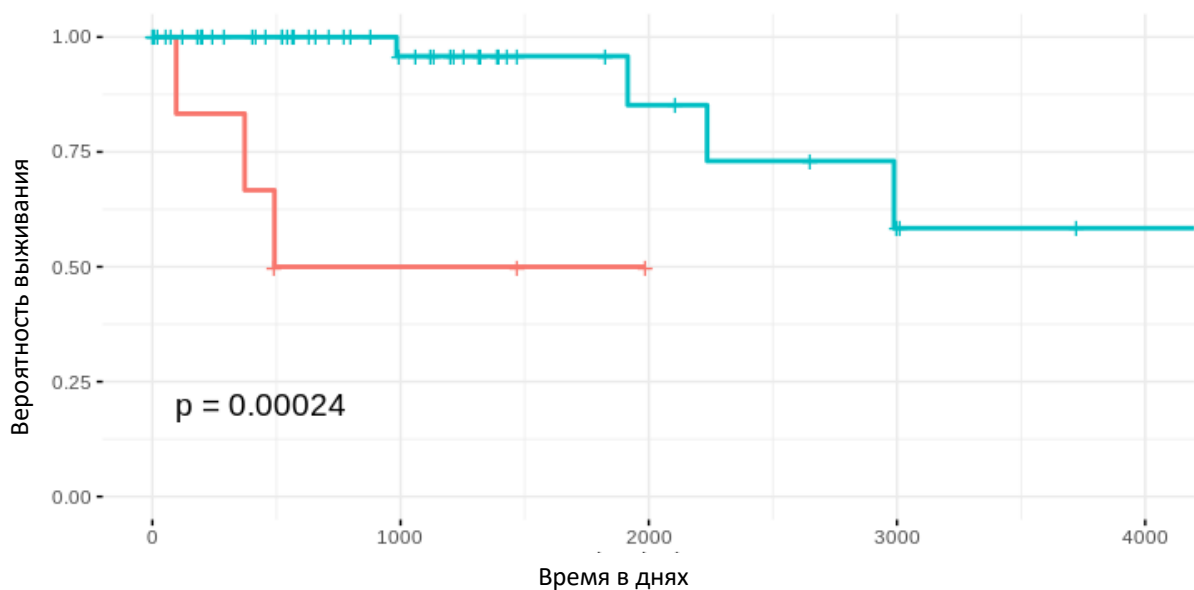


Рисунок 5.13. Общая продолжительность жизни у больных с ДА в зависимости от уровня экспрессии гена *KDM1A* (красная линия – высокая экспрессия, зеленая линия – низкая экспрессия) по данным TCGA

5.4.2 Изменение экспрессии *HIF1A* при анапластической астроцитоме (GIII).

Влияние на выживаемость

Для группы GIII глиальных опухолей достоверное изменение относительной экспрессии в опухолевой ткани было отмечено только для гена *HIF1A* (медиана 2dCt=1,39, $p=0,012367$, таблица 5.7, рисунок 5.14). У пациентов с анапластической астроцитомой также наблюдался высокий уровень экспрессии *HIF1A* в 73% случаев. Несмотря на значительное увеличение транскрипционной активности генов *EGFR*, *SMO*, *NOTCH1*, *NOTCH2*, *KDM1A*, *MSI1*, *TET1* и падение транскрипционной активности генов *SMAD7*, *HBPI*, *EGLN3*, *KDM1B* при анапластической астроцитоме не было зафиксировано статистически достоверных отличий относительно условно-здоровой ткани. Экспрессия генов *SMAD4*, *EGLN1*, *MSI2* в опухоли почти во всех образцах не отличалась от уровня в условно-здоровой ткани.

Таблица 5.7 – Значения изменения относительной экспрессии исследуемых генов в опухолевой ткани анапластической астроцитомы относительно контрольной ткани

Локус	Медиана 2dCt	Стандартное отклонение	p-значение
<i>EGFR</i>	2,865675	36,083623	0,075326
<i>SMAD4</i>	1,005993	0,425023	0,726751
<i>SMAD7</i>	0,668586	0,697816	0,066921
<i>SMO</i>	1,549534	15,471073	0,091274
<i>NOTCH1</i>	1,178239	1,148915	0,962874
<i>NOTCH2</i>	1,278344	1,028585	0,658297
<i>HBPI</i>	0,76425	0,544228	0,329687
<i>HIF1A</i>	1,393029*	1,432517	0,012367*
<i>EGLN1</i>	0,903822	0,304021	0,418529
<i>EGLN3</i>	0,431967	0,545901	0,063974
<i>KDM1B</i>	0,74151	4,194465	0,597269
<i>KDM1A</i>	1,138029	0,709303	0,186324
<i>MSI1</i>	2,136854	2,572129	0,042963
<i>MSI2</i>	1,083213	1,323126	0,079634
<i>TET1</i>	1,222158	1,216311	0,729384

Примечание. * – статистически достоверные значения ($p<0,05$)

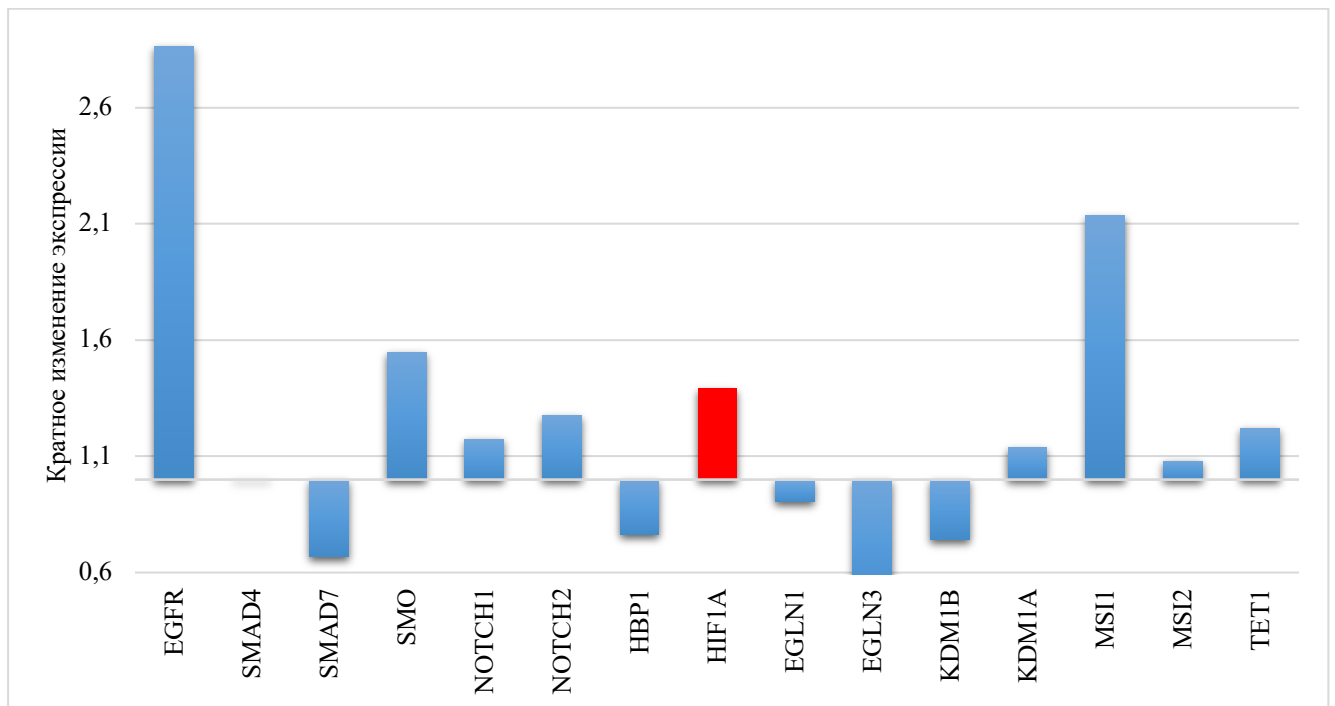


Рисунок 5.14. Изменение относительной экспрессии исследуемых генов в опухолевой ткани глиом GIII. Значение *HIF1A* выделено красным

Наряду с *HIF1A* наблюдается тенденция ($p=0,075326$) к повышению экспрессии гена *EGFR* ($2DcT=2,86$). Уровень экспрессии *EGFR* повышен у 64% (7/11) пациентов с анапластической астроцитомой (таблица 5.7, рисунок 5.14).

По данным TCGA, экспрессия *HIF1A* в опухолевой ткани глиом GIII также превышает экспрессию данного локуса в условно-здоровой ткани (рисунок 5.15).

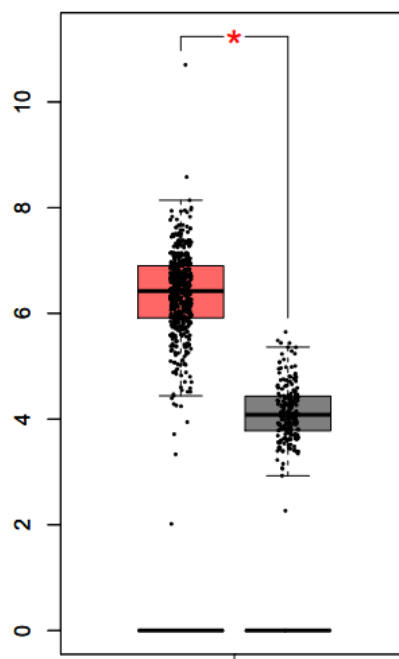


Рисунок 5.15. Экспрессия *HIF1A* в тканях анапластической астроцитомы по данным TCGA. Красным выделены показания опухолевой ткани, серым – условно-здоровой

Медиана продолжительности жизни у больных с анапластической астроцитомой составила 292 дня. Однофакторный анализ позволил установить, что основными предикторами, влияющими на выживаемость пациентов с анапластической астроцитомой, являются статус гена *IDH* ($p=0,009913277$) и экспрессия генов *HIF1A* ($p=0,01731698$), *EGLN3* ($p=0,02899147$) и *KDM1A* ($p=0,027778613$) (таблица 5.8).

Необходимо отметить, что два значимо прогностических локуса (*EGLN3* и *KDM1A*) не демонстрировали статистическую достоверность дифференциальной экспрессии. Пограничным фактором также является высокая экспрессия гена *EGFR* ($p=0,052863095$).

Таблица 5.8 – Результаты однофакторного анализа ассоциации ряда предикторов с продолжительностью жизни пациентов с анапластической астроцитомой

Показатель	Отношение шансов	Стандартное отклонение	p-значение
Возраст	1,6789	0,029699267	0,052863095
Статус <i>IDH</i>	0,3144	18942,29599	0,009913277**
<i>EGFR</i>	1,0258	0,013078458	0,05106375
<i>SMAD4</i>	9,6353	1,191224224	0,06720132
<i>SMAD7</i>	0,7716	0,56889591	0,648505152
<i>SMO</i>	0,9615	0,050261117	0,435228078
<i>NOTCH1</i>	1,1516	0,334013631	0,672638995
<i>NOTCH2</i>	1,4202	0,375623733	0,350383942
<i>HBP1</i>	2,1432	0,684788278	0,265623782
<i>HIF1A</i>	1,4903	0,292898617	0,01731698*
<i>EGLN1</i>	11,3	1,955626633	0,215010481
<i>EGLN3</i>	6,3357	0,845480247	0,02899147*
<i>KDM1B</i>	1,0959	0,093474037	0,327107598
<i>KDM1A</i>	6,7886	0,870406756	0,027778613*
<i>MSI1</i>	1,0156	0,14866572	0,917025254
<i>MSI2</i>	1,589	0,290828627	0,111302258
<i>TET1</i>	0,9418	0,297016568	0,839957783

Выявлена обратная зависимость уровня экспрессии гена *HIF1A* в тканях анапластической астроцитомы и общей продолжительности жизни пациентов. Медиана общей продолжительности жизни при низкой экспрессии гена *HIF1A* составила 639 дней, что больше по сравнению с группой больных, в опухоли которых наблюдалась высокая экспрессия *HIF1A* – 156 дней, что в 4 раза меньше (рисунок 5.16).

Таким образом, при низкой экспрессии *HIF1A* увеличивается продолжительность жизни на 16,1 месяца (639 дней vs 156 дней) ($p=0,049$).

Показатели транскрипционной активности *HIF1A* в анапластических астроцитомах, выявленные в нашем исследовании методом ПЦР-РВ (рисунок 5.16), а также определенные по результатам анализа данных TCGA (рисунок 5.17), демонстрируют однонаправленную тенденцию влияния на общую выживаемость пациентов.

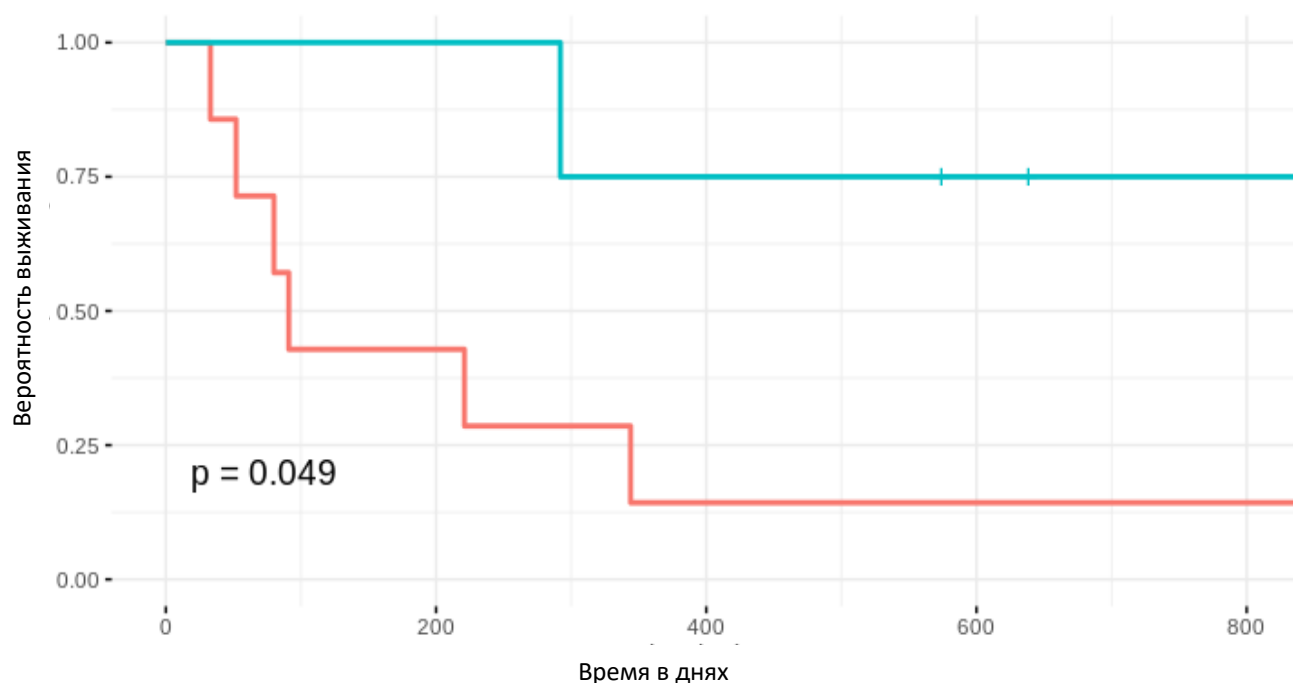


Рисунок 5.16. Общая продолжительность жизни у больных с анапластическими астроцитомами в зависимости от уровня экспрессии гена *HIF1A* (красная линия – высокая экспрессия, зеленая линия – низкая экспрессия)

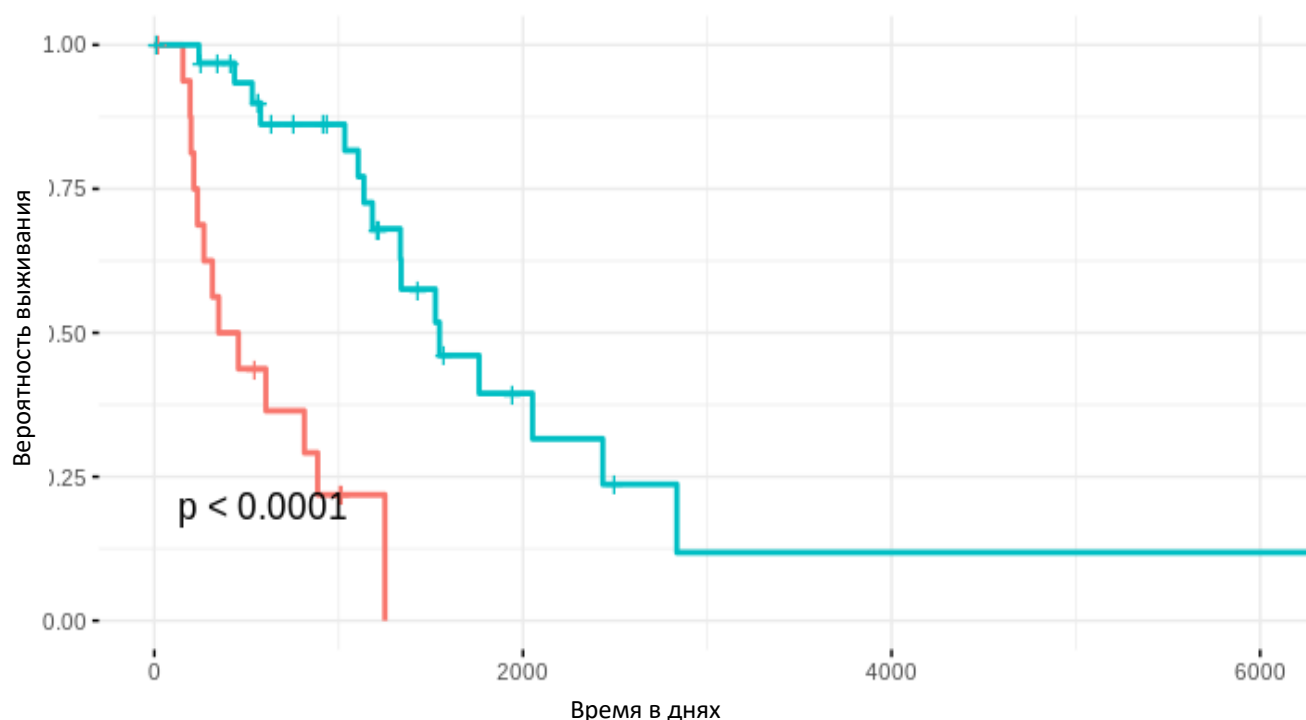


Рисунок 5.17. Общая продолжительность жизни у больных с анапластической астроцитомой в зависимости от уровня экспрессии гена *HIF1A* (красная линия – высокая экспрессия, зеленая линия – низкая экспрессия) по данным TCGA

5.4.3 Изменение экспрессии генов *EGFR*, *SMAD4*, *SMAD7*, *HBPI*, *HIF1A*, *EGLN1*, *EGLN3* при глиобластоме. Влияние на выживаемость

Для группы глиобластом GIV достоверное изменение относительной экспрессии в опухолевой ткани было отмечено для генов *HBPI*, *HIF1A*, *EGFR*, *EGLN1*, *EGLN3*, *SMAD4*, *SMAD7* (таблица 5.9, рисунок 5.18).

Паттерн экспрессии в глиобластоме также характеризовался повышением уровня мРНК гена *SMO* и падением уровня *NOTCH1*, *KDM1B*, *MSI2*, *TET1*, тогда как транскрипционная активность *NOTCH2*, *KDM1A*, *MSI1* не отличалась от условно-здоровой ткани. В итоге по этим локусам не зафиксировано статистически достоверных отличий в уровнях экспрессии в опухолевой ткани относительно условно-здоровой.

Полученные экспериментальные данные согласуются с данными TCGA только по направленности экспрессии генов *EGFR*, *SMAD7* и *HIF1A*. Для локусов *SMAD4*, *HBPI*, *EGLN1* и *EGLN3* полученные данные в настоящем исследовании не подтверждают скрининговые данные TCGA (рисунок 5.19).

Таблица 5.9 – Значения изменения относительной экспрессии исследуемых генов в опухолевой ткани относительно контрольной для группы глиобластом GIV

Локус	Медиана 2dCt	Стандартное отклонение	p-значение
<i>EGFR</i>	1,836822	11,570079	0,021324*
<i>SMAD4</i>	0,838454	0,411514	0,016534*
<i>SMAD7</i>	0,390712	0,541701	0,000003*
<i>SMO</i>	1,199904	1,720623	0,061523
<i>NOTCH1</i>	0,866146	2,963755	0,536213
<i>NOTCH2</i>	1,051693	0,818048	0,392631
<i>HBPI</i>	0,728470	0,531531	*
<i>HIF1A</i>	1,546421	2,256793	0,007612*
<i>EGLN1</i>	0,714268	0,628986	0,001623*
<i>EGLN3</i>	0,517692	1,025263	0,004231*
<i>KDM1B</i>	0,605925	1,369533	0,348261
<i>KDM1A</i>	1,026096	0,957387	0,392561
<i>MSI1</i>	1,004879	2,879825	0,193264
<i>MSI2</i>	0,833843	0,931850	0,536214
<i>TET1</i>	0,856908	1,182866	0,293215

Примечание. * – статистически достоверные значения ($p < 0,05$)

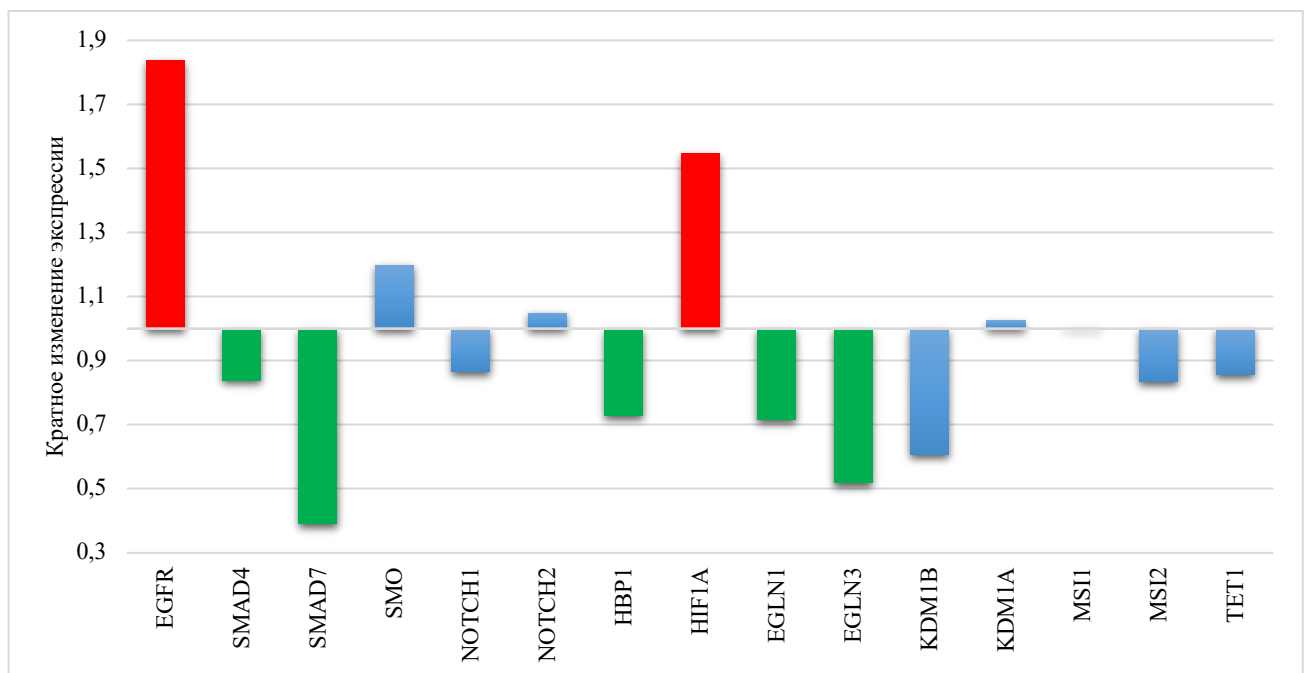


Рисунок 5.18. Изменение относительной экспрессии исследуемых генов в опухолевой ткани глиом GIV. Значение *EGFR* и *HIF1A* выделено красным. Значение *SMAD4*, *SMAD7*, *HBPI*, *EGLN1*, *EGLN3* выделено зеленым

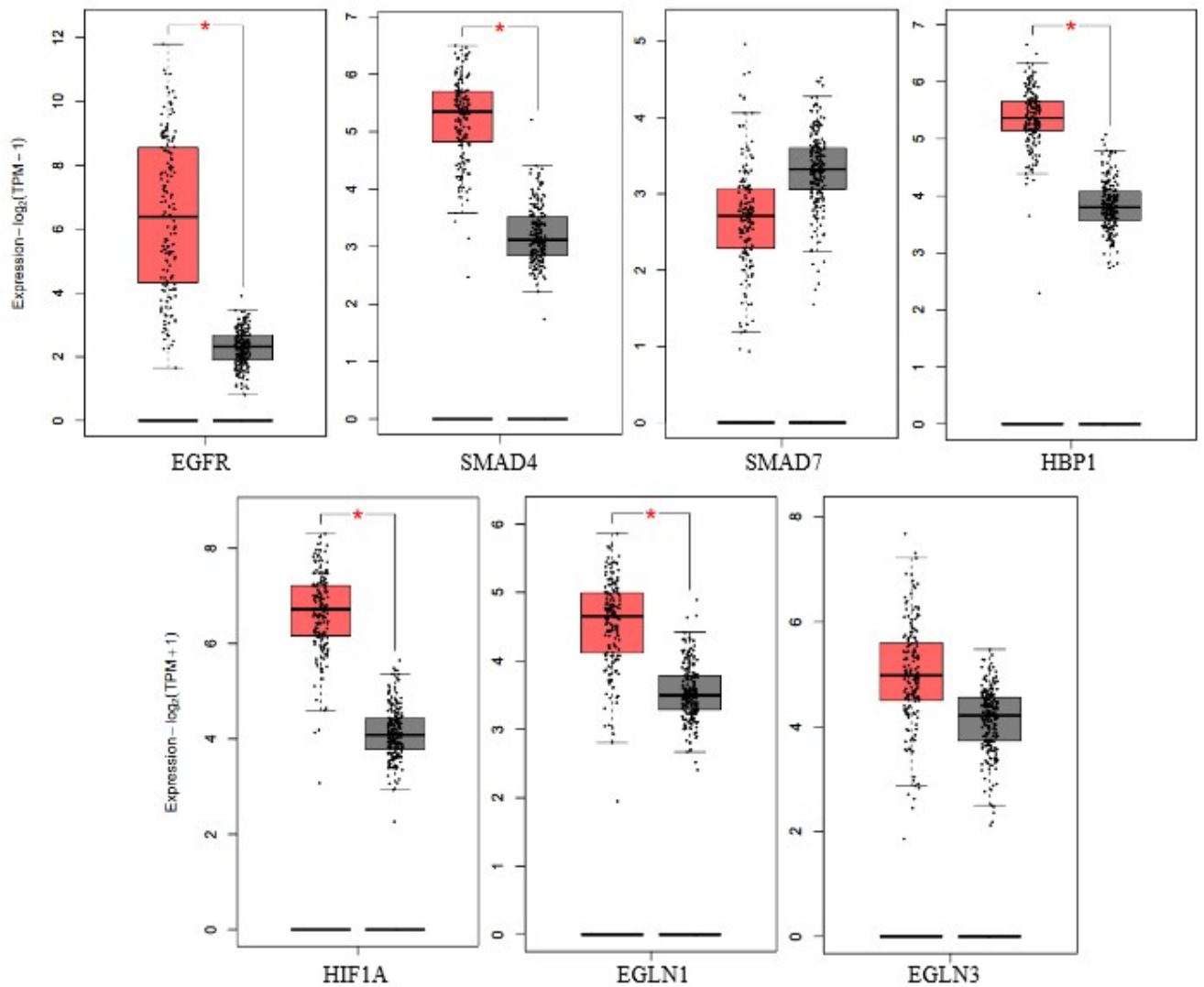


Рисунок 5.19. Экспрессия генов *EGFR*, *SMAD4*, *SMAD7*, *HBP1*, *HIF1A*, *EGLN1* и *EGLN3* в тканях глиобластомы по данным TCGA. Красным выделены показания опухолевой ткани, серым – условно-здоровой

Медиана продолжительности жизни у больных глиобластомой составила 340 дней. Однофакторный анализ позволил установить, что основными предикторами, влияющими на выживаемость, явились возраст ($p=0,034509179$, отношение рисков=1,785416272), статус гена *IDH1* ($p=0,012374622$, отношение рисков=0,333366729), экспрессия генов *EGFR* ($p=0,024386619$, отношение рисков=1,793645909), *HBP1* ($p=0,030627934$, отношение рисков=0,494875815), *HIF1A* ($p=0,017444508$, отношение рисков=1,767208993) и *EGLN1* ($p=0,040311798$, отношение рисков=0,427819121) (таблица 5.10). С экспрессионной активностью генов *EGFR*, *HIF1A* связан онкогенный эффект, тогда как с локусами *HBP1*, *EGLN1* и *EGLN3* – протективный.

Таблица 5.10 – Результаты однофакторного анализа и ассоциации ряда предикторов с продолжительностью жизни пациентов с глиобластомой

Показатель	Отношение рисков	Стандартное отклонение	p-значение
Возраст	1,785416272	0,01620358	0,034509179*
Статус <i>IDH</i>	0,333366729	0,486943142	0,019677315*
<i>EGFR</i>	1,793645909	0,020054165	0,024386619*
<i>SMAD4</i>	0,993117644	0,40699542	0,986461653
<i>SMAD7</i>	1,180491689	0,333252798	0,618545074
<i>SMO</i>	0,901777155	0,101004013	0,306023595
<i>NOTCH1</i>	0,82126588	0,150613171	0,191084304
<i>NOTCH2</i>	1,068040491	0,204836472	0,747939795
<i>HBPI</i>	0,494875815	0,39298088	0,030627934*
<i>HIF1A</i>	1,767208993	0,082356712	0,017444508*
<i>EGLN1</i>	0,427819121	0,282202641	0,040311798*
<i>EGLN3</i>	0,553756485	0,161711467	0,032821057*
<i>KDM1B</i>	0,847080857	0,136352538	0,223553752
<i>KDM1A</i>	0,94717371	0,173005002	0,753744065
<i>MSI1</i>	0,915246817	0,07770089	0,254380198
<i>MSI2</i>	1,07332661	0,148547944	0,63381549
<i>TET1</i>	0,848625496	0,159290436	0,302809204

Выявлена обратная зависимость уровня экспрессии гена *EGFR* в тканях глиобластомы и общей продолжительности жизни пациентов. Медиана общей продолжительности жизни при низкой экспрессии гена *EGFR* составила 340 дней, что в больше по сравнению с группой больных, в опухоли которых наблюдалась высокая экспрессия *EGFR* – 220 дней, что в полтора раза меньше (рисунок 5.20). Таким образом, низкая экспрессия *EGFR* увеличивает продолжительность жизни на 4 месяца (340 дней vs 220 дней) ($p=0,045$). Показатели транскрипционной активности *EGFR* в глиобластомах, выявленные в нашем исследовании методом ПЦР-РВ (рисунок 5.20), а также определенные по результатам анализа данных TCGA (рисунок 5.21), демонстрируют однонаправленную тенденцию влияния на общую выживаемость пациентов.

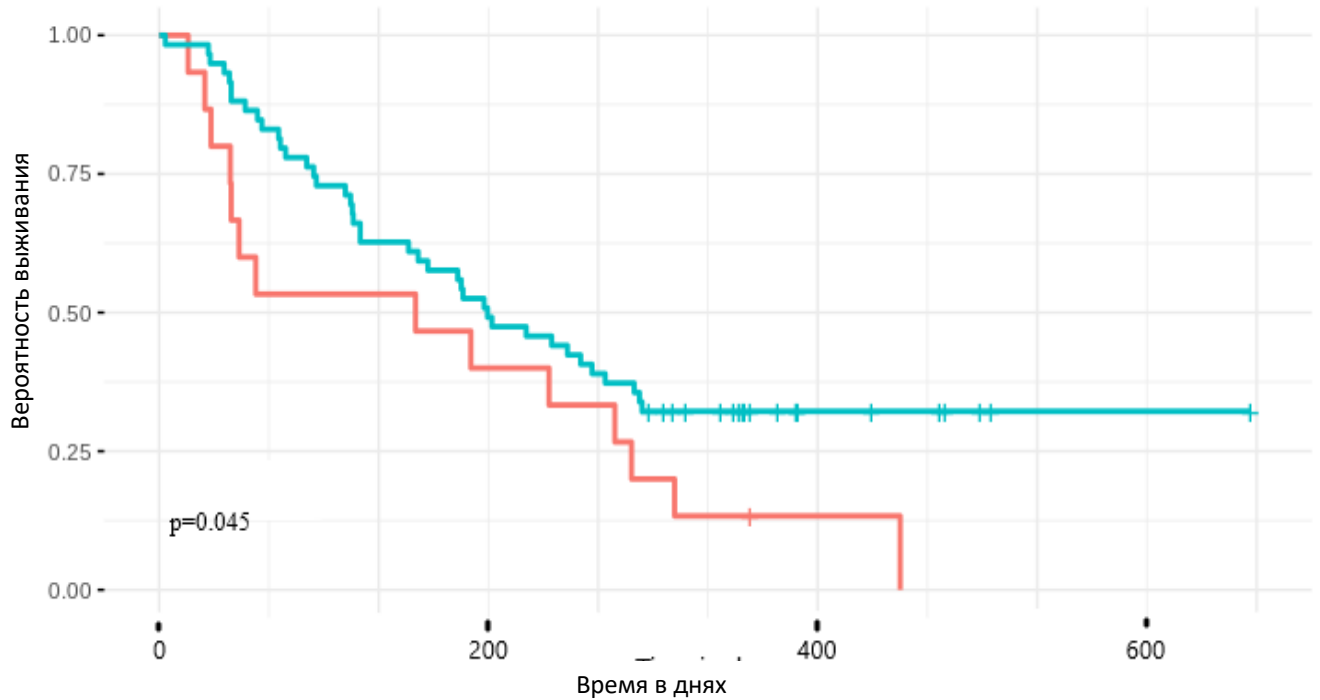


Рисунок 5.20. Общая продолжительность жизни у пациентов с глиобластомой в зависимости от уровня экспрессии гена *EGFR* (красная линия – высокая экспрессия, зеленая линия – низкая экспрессия)

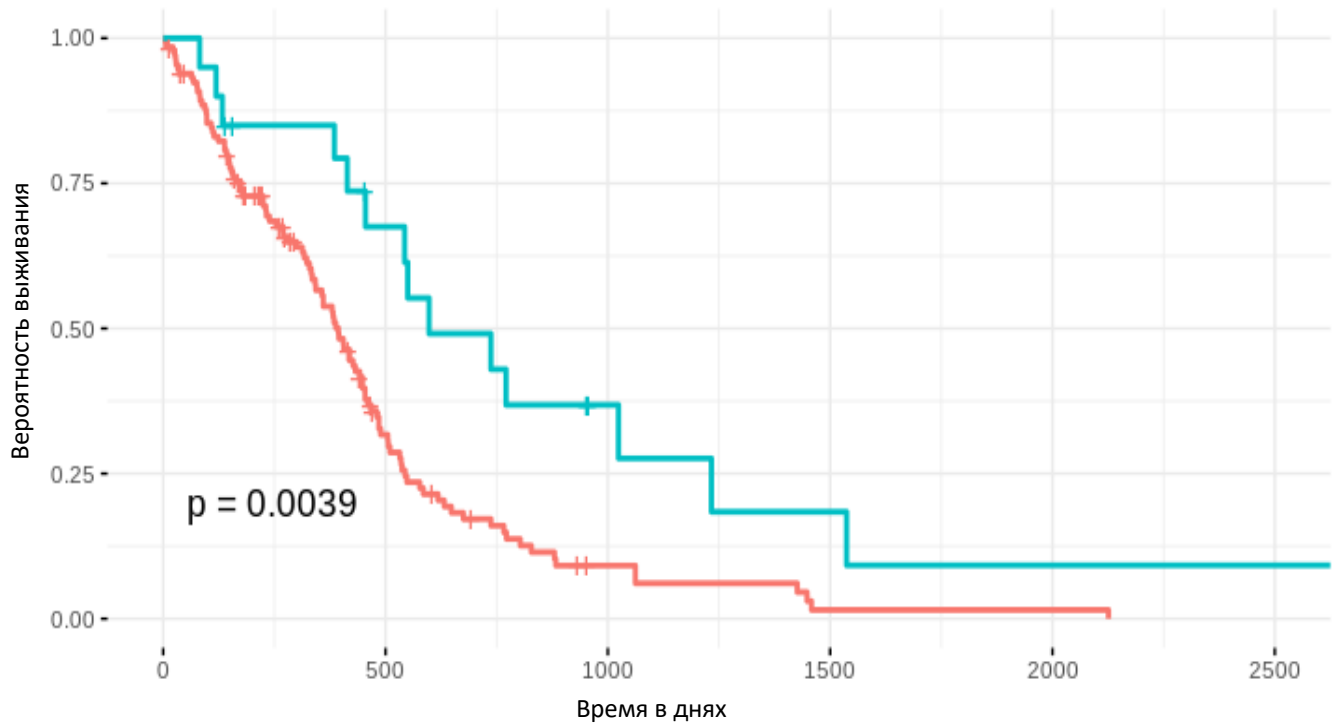


Рисунок 5.21. Общая продолжительность жизни у пациентов с глиобластомой в зависимости от уровня экспрессии гена *EGFR* (красная линия – высокая экспрессия, зеленая линия – низкая экспрессия) по данным TCGA

Показано, что повышение уровня экспрессии гена *HIF1A* в тканях глиобластомы обратно пропорционально коррелирует с общей продолжительностью жизни пациентов. Медиана общей продолжительности жизни пациентов при низкой экспрессии гена *HIF1A* составила 409 дней, что в 1,5 раза больше по сравнению с группой больных, в опухоли которых была определена высокая экспрессия *HIF1A* – 317 дней (рисунок 5.22). Таким образом, при низкой экспрессии *HIF1A* отмечается увеличение продолжительности жизни на 3 месяца (409 дней vs 317 дней) ($p=0,0081$).

Показатели транскрипционной активности *HIF1A* в глиобластомах, выявленные в нашем исследовании методом ПЦР-РВ (рисунок 5.22), а также определенные по результатам анализа данных TCGA (рисунок 5.23), демонстрируют однонаправленную тенденцию влияния на общую выживаемость пациентов.

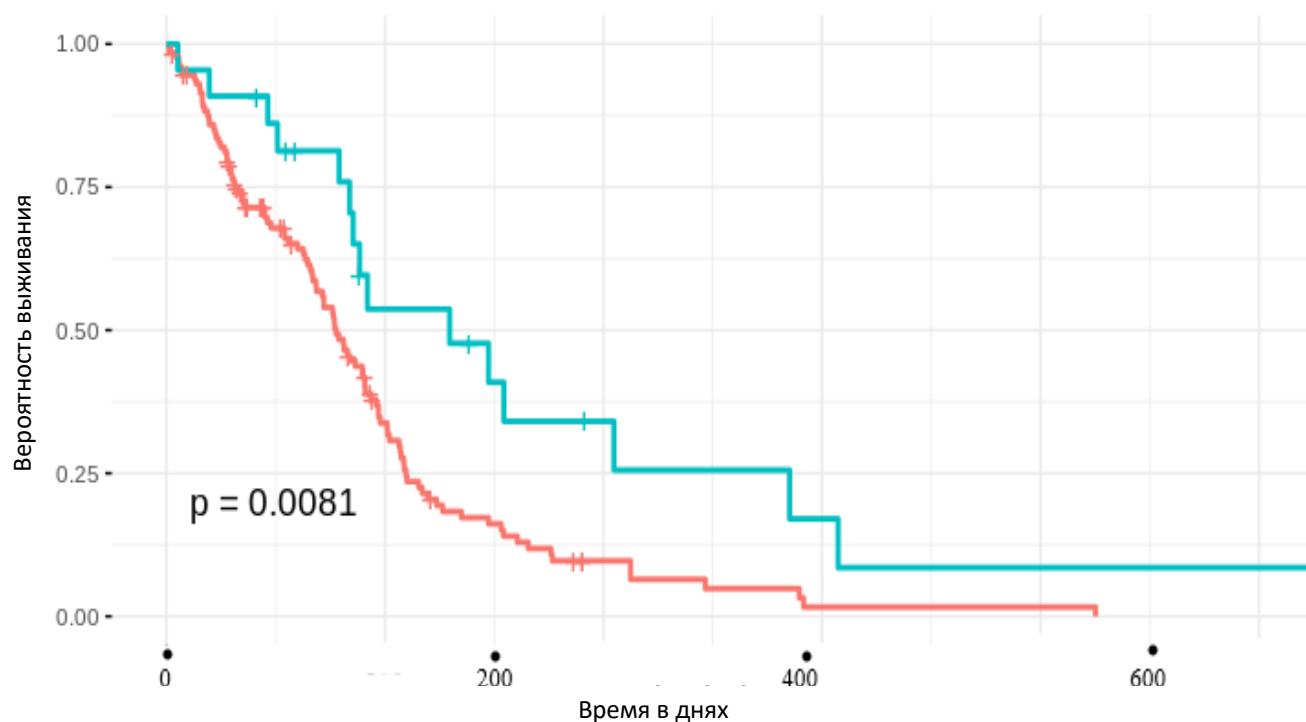


Рисунок 5.22. Общая продолжительность жизни у пациентов с глиобластомой в зависимости от уровня экспрессии гена *HIF1A* (красная линия – высокая экспрессия, зеленая линия – низкая экспрессия)

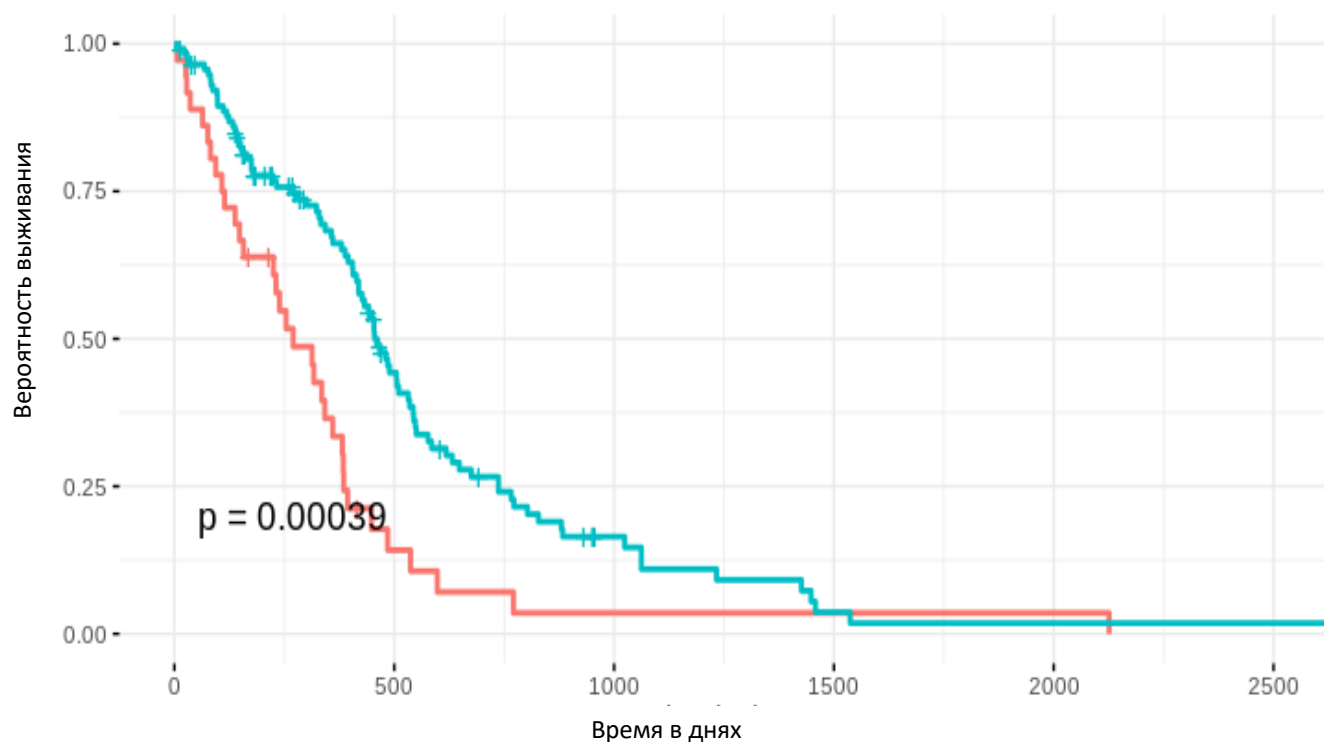


Рисунок 5.23 Общая продолжительность жизни у больных с глиобластомой в зависимости от уровня экспрессии гена *HIF1A* (красная линия – высокая экспрессия, зеленая линия – низкая экспрессия) по данным TCGA

Выявлена прямая зависимость между уровнем экспрессии гена *HBPI* в тканях глиобластомы и общей продолжительностью жизни пациентов. Медиана общей продолжительности жизни при низкой экспрессии гена *HBPI* составила 263 дня, что в 1,4 раза меньше по сравнению с группой больных, в опухоли которых наблюдалась высокая экспрессия *HBPI* – 358 дней (рисунок 5.24). Таким образом, низкая экспрессия *HBPI* увеличивает продолжительность жизни на 3,1 месяца (263 дней vs 358 дней) ($p=0,0058$).

Показатели транскрипционной активности *HBPI* в глиобластомах, выявленные в нашем исследовании методом ПЦР-РВ (рисунок 5.24), а также определенные по результатам анализа данных TCGA (рисунок 5.25), демонстрируют однонаправленную тенденцию влияния на общую выживаемость пациентов.

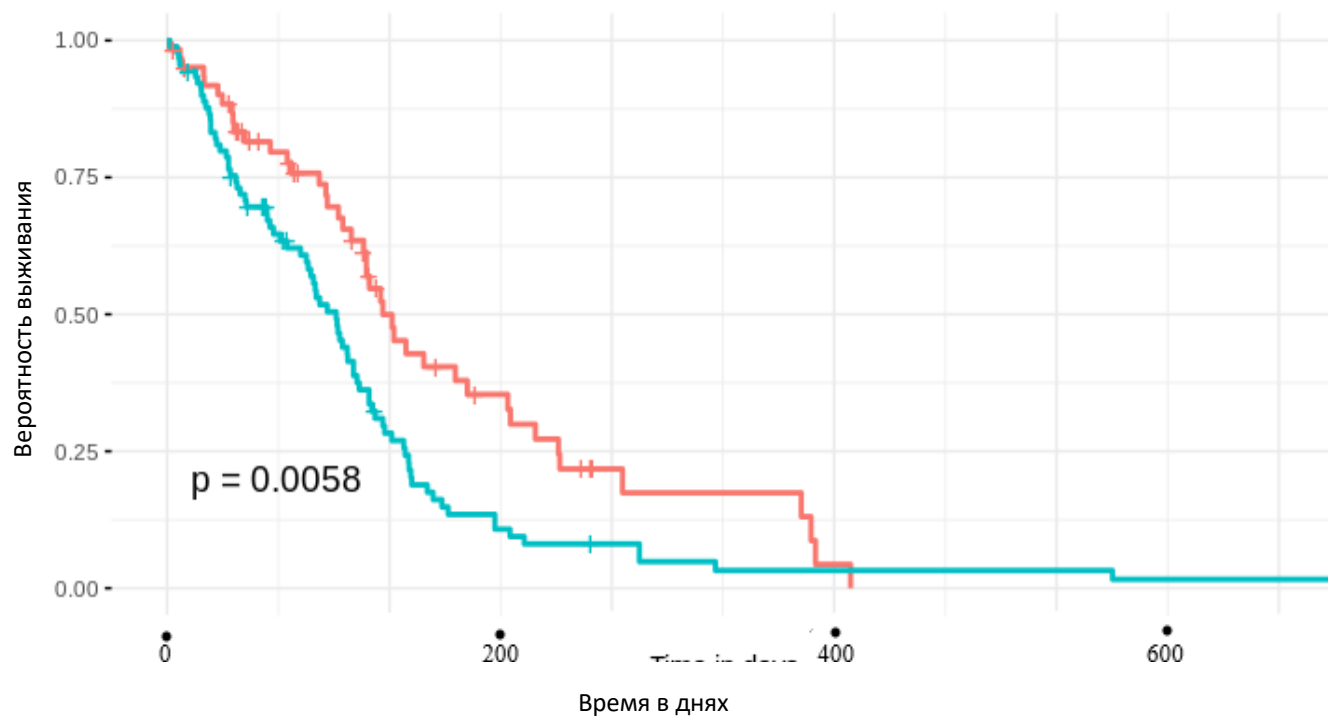


Рисунок 5.24. Общая продолжительность жизни у больных с глиобластомой в зависимости от уровня экспрессии гена *HBP1* (красная линия – высокая экспрессия, зеленая линия – низкая экспрессия)

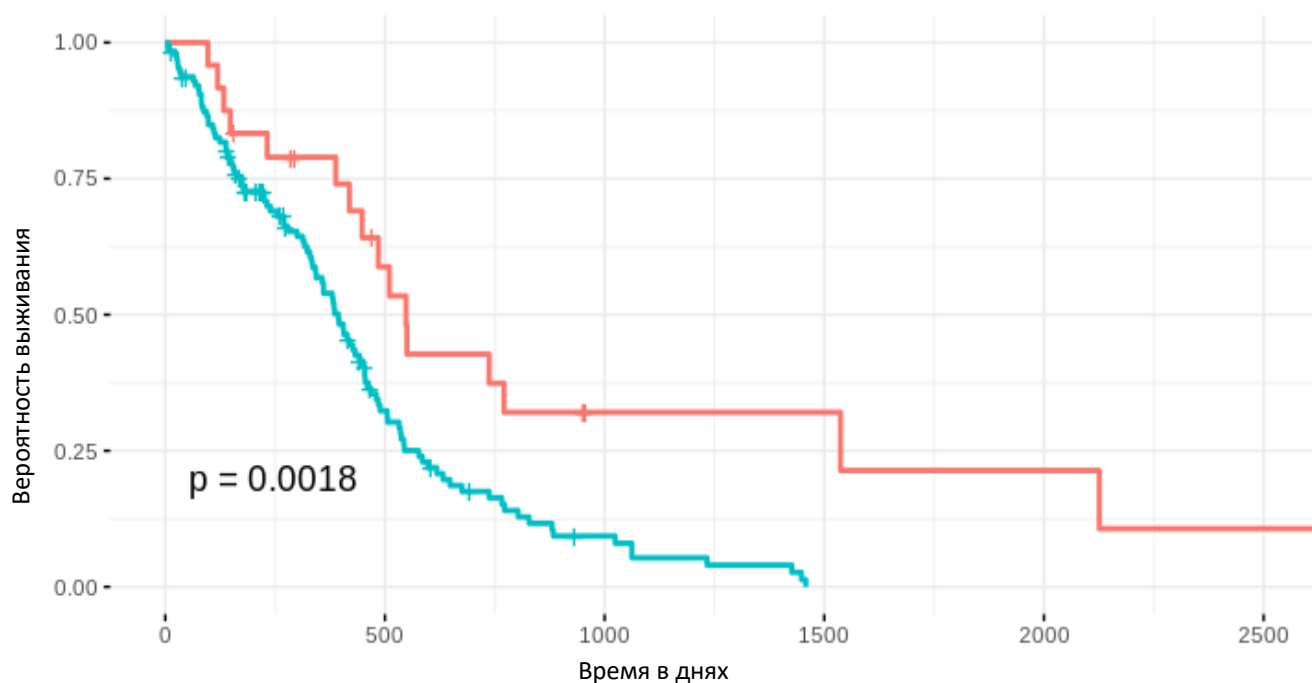


Рисунок 5.25. Общая продолжительность жизни у пациентов с глиобластомой в зависимости от уровня экспрессии гена *HBP1* (красная линия – высокая экспрессия, зеленая линия – низкая экспрессия) по данным TCGA

Выявлена прямая зависимость уровня экспрессии гена *EGLN1* в тканях глиобластомы и общей продолжительности жизни пациентов. Медиана общей продолжительности жизни при низкой экспрессии гена *EGLN1* составила 340 дней, что больше по сравнению с группой больных, в опухоли которых наблюдалась высокая экспрессия *EGLN1* – 480 дней, что в 1,4 раза больше (рисунок 5.26). Таким образом, высокая экспрессия *EGLN1* увеличивает продолжительность жизни на 4,6 месяца (340 дней vs 480 дней) ($p=0,00037$).

Показатели транскрипционной активности *EGLN1* в глиобластомах, выявленные в нашем исследовании методом ПЦР-РВ (рисунок 5.26), а также определенные по результатам анализа данных TCGA (рисунок 5.27), демонстрируют однонаправленную тенденцию влияния на общую выживаемость пациентов.

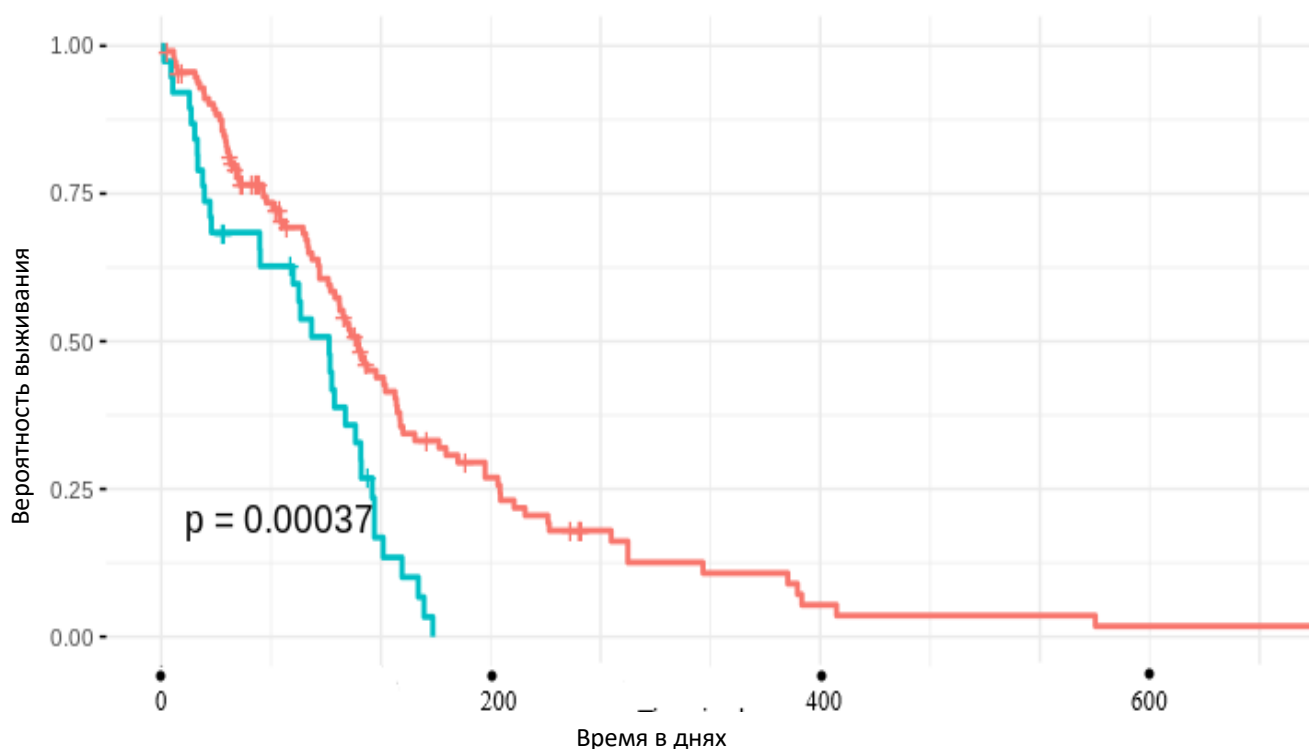


Рисунок 5.26. Общая продолжительность жизни у больных с глиобластомой в зависимости от уровня экспрессии гена *EGLN1* (красная линия – высокая экспрессия, зеленая линия – низкая экспрессия)

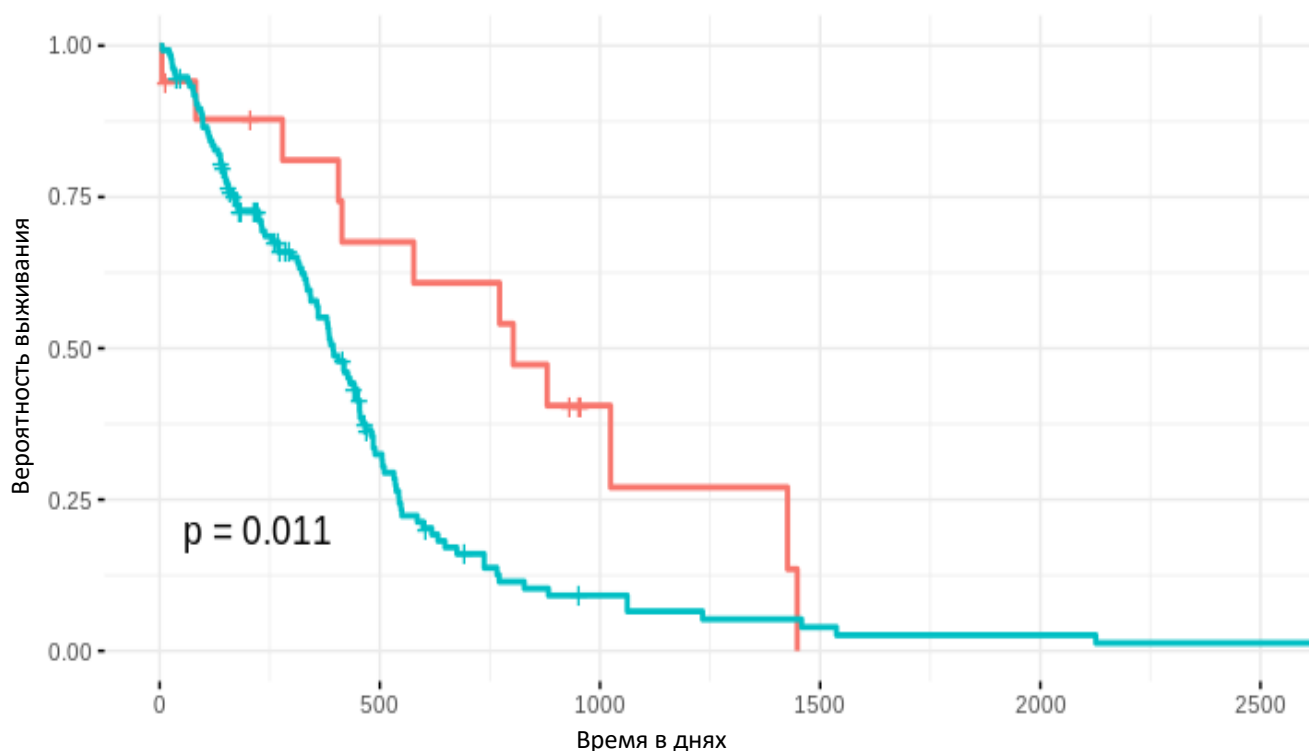


Рисунок 5.27. Общая продолжительность жизни у больных с глиобластомой в зависимости от уровня экспрессии гена *EGLN1* (красная линия – высокая экспрессия, зеленая линия – низкая экспрессия) по данным TCGA

Выявлена прямая зависимость уровня экспрессии гена *EGLN3* в тканях глиобластомы и общей продолжительности жизни пациентов. Медиана общей продолжительности жизни при низкой экспрессии гена *EGLN3* составила 289,5 дня, что больше по сравнению с группой больных, в опухоли которых наблюдалась высокая экспрессия *EGLN3* – 455,5 дня, что в 1,6 раза больше (рисунок 5.28). Таким образом, высокая экспрессия *EGLN3* связана с увеличением продолжительности жизни на 5,5 месяцев (289,5 дня vs 455,5) ($p=0,00023$).

Показатели транскрипционной активности *EGLN3* в глиобластомах, выявленные в нашем исследовании методом ПЦР-РВ (рисунок 5.28), а также определенные по результатам анализа данных TCGA (рисунок 5.29), демонстрируют однонаправленную тенденцию влияния на общую выживаемость пациентов.

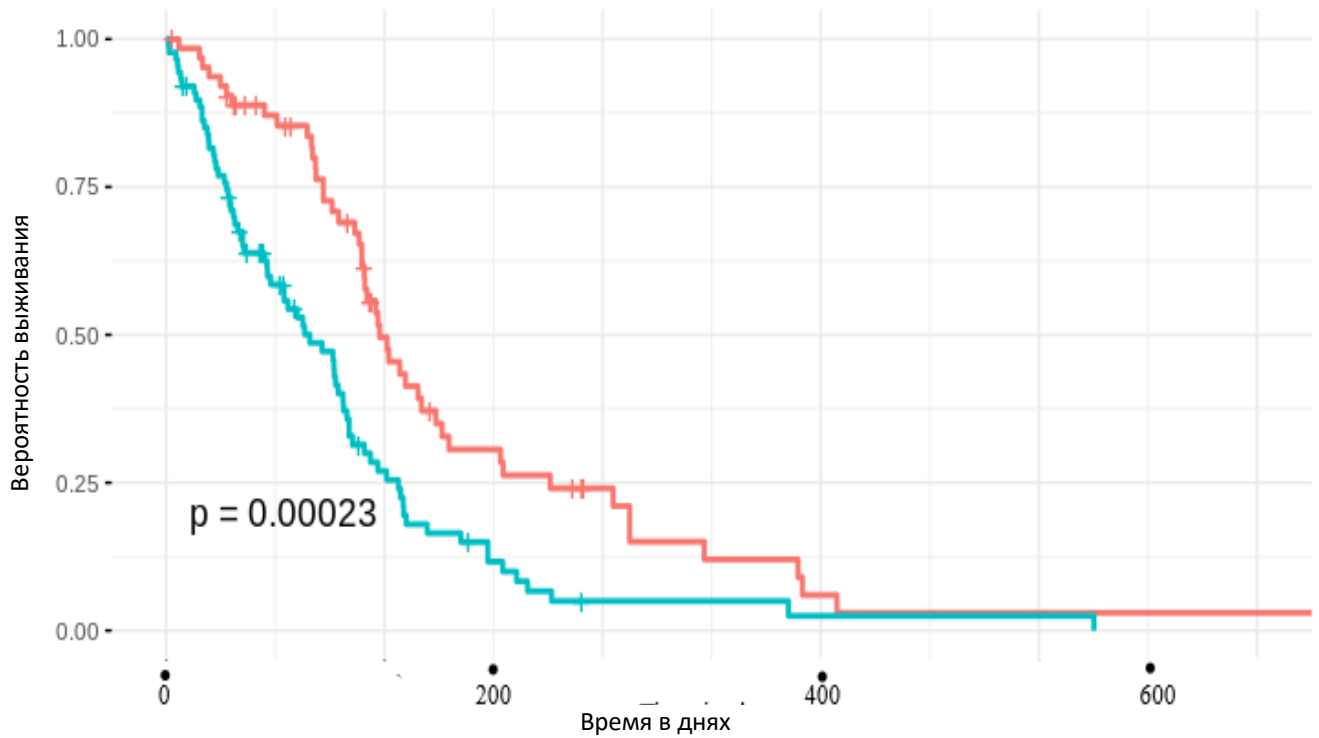


Рисунок 5.28. Общая продолжительность жизни у больных с глиобластомой в зависимости от уровня экспрессии гена *EGLN3* (красная линия – высокая экспрессия, зеленая линия – низкая экспрессия)

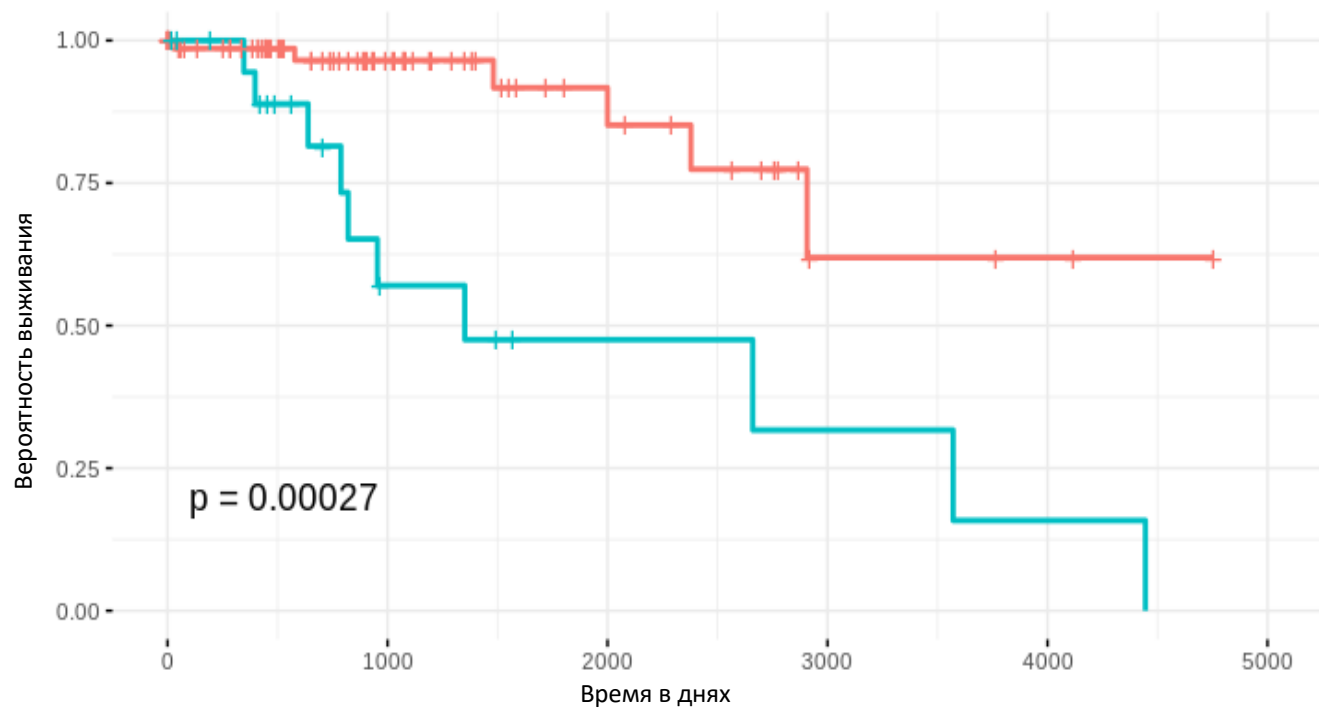


Рисунок 5.29. Общая продолжительность жизни у больных с глиобластомой в зависимости от уровня экспрессии гена *EGLN3* (красная линия – высокая экспрессия, зеленая линия – низкая экспрессия) по данным TCGA

5.5 Диагностика взаимосвязи степени злокачественности глиальных опухолей и экспрессии генов *KDM1A* и *SMAD7*

В исследованной выборке зафиксировано изменение экспрессии генов *KDM1A* и *SMAD7*, достоверно дифференцирующее группы глиальных опухолей G2 и G4 (соответственно $p=0,013$ и $p=0,049$) (таблица 5.11, рисунок 5.30).

Таблица 5.11 – Изменение относительной экспрессии генов *SMAD7* и *KDM1A* в опухолевой глиальной ткани G2 и G4

Показатель	<i>SMAD7</i>		<i>KDM1A</i>	
	медиана 2dCt	стандартное отклонение	медиана 2dCt	стандартное отклонение
G2	0,690157	0,926349	1,514187	0,752604
G4	0,390712	0,541701	1,026096	0,957387
G2 vs G4	$p=0,049$		$p=0,013$	

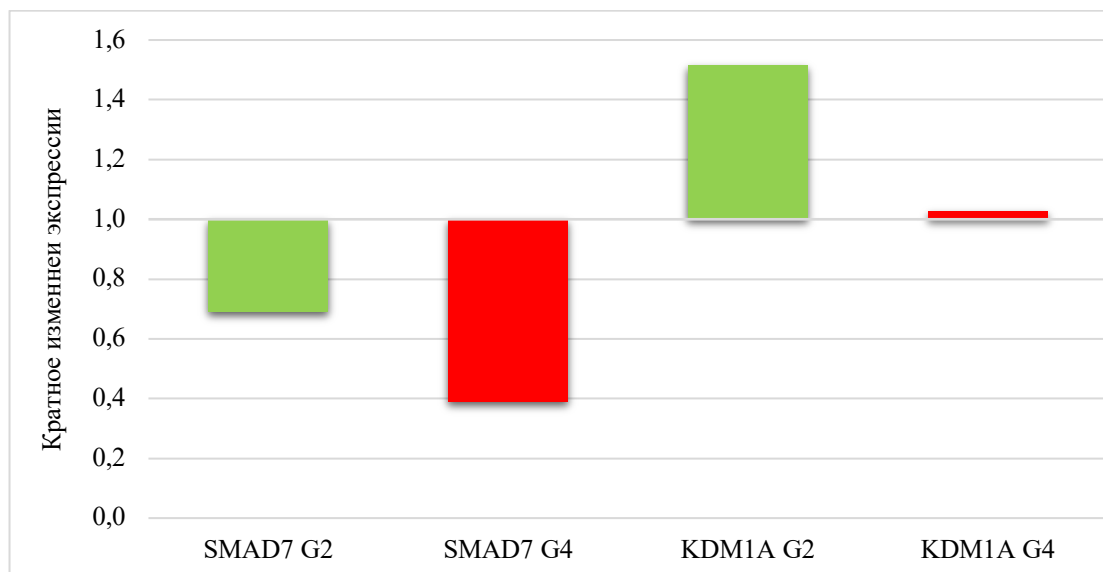


Рисунок 5.30. Изменение относительной экспрессии генов *SMAD7* и *KDM1A* в опухолевой глиальной ткани G2 и G4

Таким образом, выборка глиальных опухолей характеризовалась паттерном специфического изменения генной экспрессии в зависимости от степени злокачественности опухоли; более того, изменение относительной экспрессии *KDM1A* и *SMAD7* в опухолевых глиальных тканях может использоваться для дифференциальной диагностики высокодифференцированных глиом от глиобластом.

Ранее нами было показано, что изменения в уровнях экспрессии генетических локусов *EGFR*, *SMO*, *NOCH1* и *KDM1B* при малигнизации клеток мозга у пациентов мужского и женского пола имеют разнонаправленный характер (увеличивающийся у пациентов мужского пола и уменьшающийся у пациентов женского пола) (Кит О.И., Пушкин А.А., Росторгуев Э.Е. и соавт., 2018).

Аберрантная активация передачи сигналов *EGFR* является отличительной чертой многих опухолей. Относительная экспрессия гена *EGFR* (медиана 2dCt=2,8, $p=0,021324$) повышается в 30–50% злокачественных глиальных опухолей. Основным фактором, обеспечивающими такую транскрипционную активность, может быть увеличение копийности гена *EGFR*, что характерно для многих других типов злокачественных образований (Liu R. et al., 2017).

На данный момент онкогенная роль сверхэкспрессии *EGFR* при глиобластомах однозначно определена, что делает данный локус убедительным кандидатом для таргетной терапии. Но, несмотря на терапевтические преимущества тирозинкиназных ингибиторов *EGFR* при немелкоклеточном раке легкого, данные агенты показали скудную эффективность в отношении злокачественных глиом (Yung W.K.A. et al., 2010).

Гены *SMAD4* (медиана 2dCt=0,8; $p=0,016534$) и *SMAD7* (медиана 2dCt=0,4; $p=0,000003$) снижают свою транскрипционную активность в опухолевой ткани глиобластом относительно условно-здоровой. *SMAD* – это группа белков, передающих внеклеточные сигналы непосредственно в ядро через сигнальные пути TGF- β и BMP. *SMAD4* является участником ядерного комплекса *SMAD2/3/4*, активность которого стимулирует экспрессию проапоптотических генов *TIEG*, *DAPK*, *GADD45 β* и *Bim* (Tachibana I. et al., 1997). *SMAD7* является антагонистом TGF- β сигнального пути, рекрутируя соответствующий рецептор, что предотвращает его связывание со *SMAD2*. TGF- β -сигналинг часто рассматривается как фактор, обеспечивающий инвазию и малигнизацию опухолевых клеток, и при низком уровне *SMAD7* этот сигнальный путь более активен в опухолевых клетках (Yu J. et al., 2016). Полученные данные демонстрируют TGF β -сигнальный путь как потенциальную терапевтическую

мишень при глиобlastомах, против которого уже тестируются некоторые препараты (Clinical Trials.gov Identifier: NCT00431561).

По данным TCGA, снижение экспрессии гена *HBPI* характерно для химиорезистентных клеточных линий рака легкого, а у пациентов, имеющих повышенный уровень мРНК *HBPI*, прослеживается более благоприятный прогноз и более длительный период выживаемости (Cao Z. et al., 2019). В настоящем исследовании уровень мРНК гена *HBPI* был достоверно снижен (медиана $2dCt=0,72$; $p=0,003264$) в глиальной опухолевой ткани GIV относительно условной нормы. *HBPI*, в качестве транскрипционного фактора, ингибирует активность своих генов-мишеней: *p47phox*, *N-MYC*, *C-MYC*, *DNMT1* и *EZH2*. Данный белок также играет роль в активации транскрипции генов, кодирующих *p21*, *p16*. *HBPI* является антионкогенным транскрипционным фактором, снижение экспрессии которого в глиальных опухолях мозга может выступать негативным прогностическим фактором.

5.6 Исследование относительной экспрессии микроРНК в глиомах высокой степени злокачественности

В результате предварительного анализа баз данных TargetScan и miRTarBase были подобраны микроРНК, таргетирующие 3'UTR мРНК генов (рисунок 5.31), результаты анализа экспрессии которых приведены ниже.

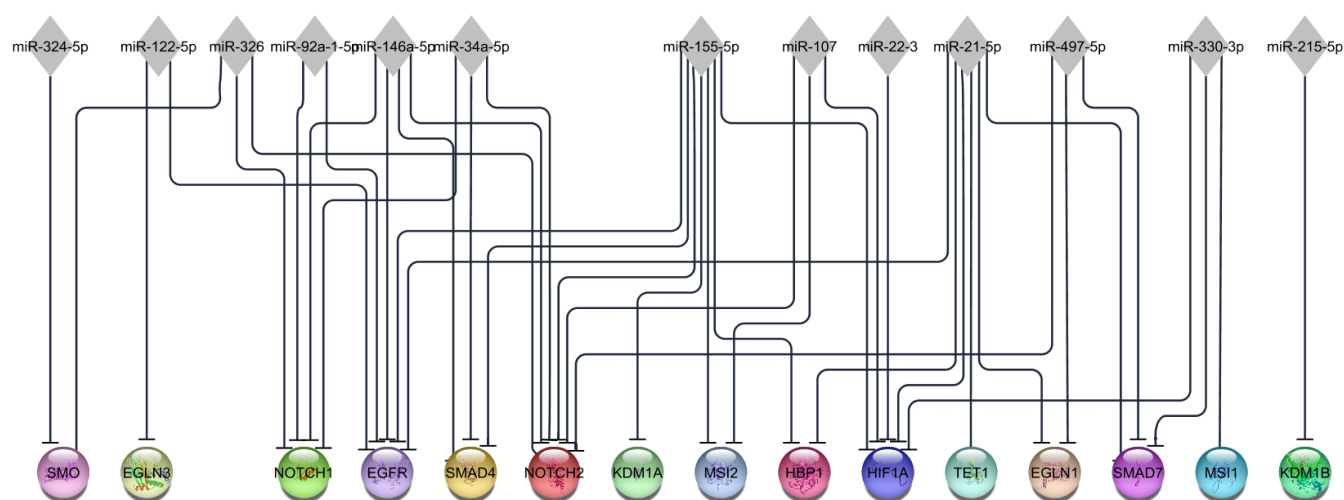


Рисунок 5.31. МикроРНК, таргетирующие 3'UTR мРНК исследуемых генов

Выборку для оценки изменения относительной экспрессии микроРНК сформировали из парных образцов (опухоль-норма), исследованных ранее по показателям генной экспрессии. Гистологически образцы верифицированы как глиомы высокой степени злокачественности (Аллилуев И.А., Пушкин А.А., Росторгуев Э.Е., Кузнецова Н.С., 2020).

Сравнительный анализ медиан относительной экспрессии продемонстрировал увеличение уровня экспрессии микроРНК hsa-miR-155-5p, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-497-5p, hsa-miR-146a-5p, hsa-miR-92a-1-5p в опухолевой ткани. Статистически достоверное увеличение подтверждено для hsa-miR-155-5p и hsa-miR-21-5p в 2,9 и 3,8 раза соответственно (таблица 5.12, рисунок 5.32).

Для остальных микроРНК наблюдали снижение уровня экспрессии в опухолевой ткани относительно условно-нормальной.

Таблица 5.12 – Значения изменения относительной экспрессии микроРНК в опухолевой ткани глиом высокой степени злокачественности

микроРНК	Медиана 2dCt	Стандартное отклонение	p-значение
miR-215-5p	0,520373224*	0,693539	0,000231*
miR-22-3p	0,640510639*	0,587637	0,001132*
miR-122-5p	0,571236616	0,509971	0,077569
miR-107	0,550401912*	0,289563	<0,000001*
miR-324-5p	0,46058548*	0,231875	<0,000001*
miR-34a-5p	0,852530942	1,499354	0,556469
miR-155-5p	2,946372582*	7,22025	0,000313*
miR-21-5p	3,753787176*	9,707387	0,002562*
miR-497-5p	1,264527018	1,456025	0,299312
miR-330-3p	0,084617351*	0,189951	<0,000001*
miR-146a-5p	1,357912328	1,672055	0,198326
miR-92a-1-5p	1,46433985	1,455385	0,119231
miR- 326	0,714225758*	1,31243	0,012362*

Примечание. * – статистически достоверные значения

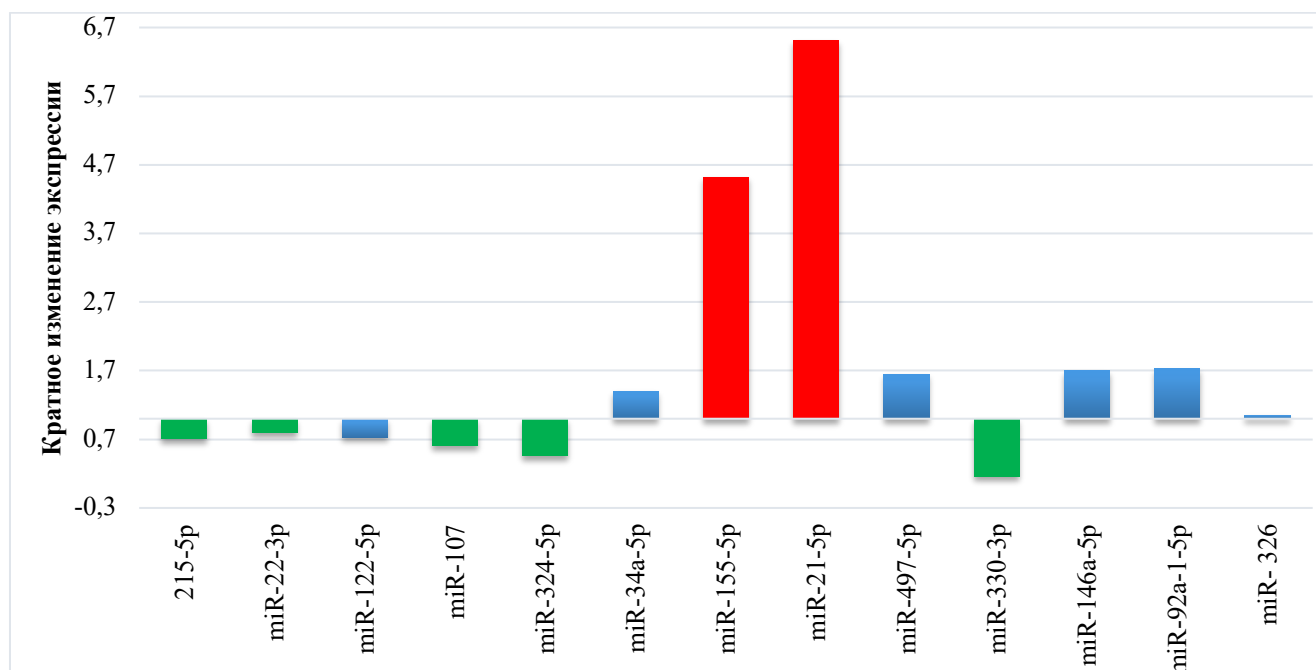


Рисунок 5.32. Относительная экспрессия исследуемых микроРНК в опухолевой ткани относительно условно-здоровой ткани в глиальных опухолях. Красным выделены статистически значимые повышения экспрессии. Зеленым – статистически значимые снижения экспрессии микроРНК

Статистически достоверное снижение подтверждено для hsa-miR-215-5p, hsa-miR-22-3p, hsa-miR-107, hsa-miR-324-5p, hsa-miR-330-3p, hsa-miR-326. Для первых четырех микроРНК значение снижения экспрессии составляет от 1,66 до 2 раз, экспрессия hsa-miR-326 снижается в 1,4 раза, а экспрессия hsa-miR-330 снижается более чем в 11 раз.

Следует отметить, что, несмотря на предварительный анализ *in silico*, не обнаружено значимых отрицательных корреляций микроРНК и их предсказанных мишеней. Согласно литературным данным miR-215-5p, продемонстрировавшая в образцах глиом GIII и GIV падение транскрипционной активности (медиана 2dCt=0,52; $p=0,000231$), считается онкогенной микроРНК и ее активность в глиомах описана как стимулирующая развитие агрессивных форм фенотипов клеточных линий глиомы через ингибирование мРНК гена *PCDH9*. Вероятно, в опухолевых глиальных тканях активность этой микроРНК отличается от активности в условиях культуры клеток (Wang C. et al., 2017).

Уровень miR-22-5p (медиана 2dCt=0,64; $p=0,001132$) и miR-107 (медиана 2dCt=0,55; $p<0,000001$) снижен в опухолевой ткани относительно условно-

здоровой. мРНК *HIF1A* выступает потенциальной мишенью данных микроРНК, сниженная активность которых, возможно, участвует в модуляции транскрипционной активности *HIF1A* в глиомах высокой степени злокачественности наряду с *EGLN1/3*. MiR-324-5p (медиана 2dCt=0,46; $p<0,000001$) и miR-326 (медиана 2dCt=0,71; $p=0,012362$) демонстрируют снижение транскрипционной активности в опухолевой ткани. Эти микроРНК таргетируют 3'UTR мРНК гена *SMO* (медиана 2dCt=1,19; $p=0,061523$), активность которого имеет тенденцию повышаться в глиомах высокой степени злокачественности. В эксперименте было показано, что увеличение экспрессии miR-326 подавляет активность не только гена *SMO*, но и всего сигнального пути Hedgehog в целом (Du W. et al., 2014).

Глава 6

**ИССЛЕДОВАНИЕ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ микроРНК
В ПЛАЗМЕ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С ГЛИАЛЬНЫМИ ОПУХОЛЯМИ
ГОЛОВНОГО МОЗГА**

Для верификации труднодоступных либо неоперабельных глиальных опухолей используют метод стереотаксической биопсии, что может негативно отражаться на точности диагноза, учитывая как малый объем получаемой опухолевой ткани, так и ее высокую морфологическую гетерогенность (Galbán S. et al., 2017).

В проведенных нами исследованиях в образцах глиальных опухолей выявлен широкий диапазон варьирования уровня относительной экспрессии 13-ти микроРНК: miR-215-5p, miR-22-3p, miR-122-5p, miR-107, miR-324-5p, miR-34a-5p, miR-155-5p, miR-21-5p, miR-497-5p, miR-330-3p, miR-146a-5p, miR-92a-1-5p, miR-326. Впоследствии были определены уровни десяти из 13 указанных микроРНК в образцах плазмы крови пациентов с различными онкологическими заболеваниями, в том числе глиальными опухолями головного мозга высокой степени злокачественности, и условно здоровых доноров. Выбор микроРНК был обусловлен аберрантным паттерном экспрессии в биоптатах глиальных опухолей, обнаруженных ранее (см. глава 3, 4). Исследование проводили по полуколичественному протоколу RT-PCR (Balcells I., Cirera S., Busk P. K., 2011), с использованием *cel-miR-39-5p* в качестве экзогенного референсного локуса.

Уровни относительной экспрессии микроРНК в плазме крови здоровых добровольцев (n=10) были приняты за референтные значения относительной экспрессии микроРНК (таблица 6.1), которые рассчитывали, как медианное значение относительной экспрессии каждой микроРНК. Выявленные уровни относительной экспрессии микроРНК в плазме крови больных, страдающих глиобластомой, представлены в таблице 6.2 в виде отрицательного двоичного логарифма ($-\log_2$). Статистически достоверные отличия в уровне экспрессии в плазме крови пациентов с глиобластомой относительно уровня в плазме крови

контрольной группы продемонстрировали восемь микроРНК: hsa-miR-22-3p, hsa-miR-122-5p, hsa-miR-107, hsa-miR-324-5p, hsa-miR-155-5p, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-330-3p и hsa-miR-146a-5p (таблица 6.3).

Таблица 6.1 – Референтные значения относительной экспрессии микроРНК в плазме крови здоровой группы. Значения относительной экспрессии представлены в виде отрицательного двоичного логарифма ($-\log_2$)

№ образца	миРНК									
	22-3p	122-5p	107	324-5p	155-5p	21-5p	330-3p	146a-5p	92a-1-5p	34a-5p
1	3,3	2,6	4,5	8,3	11,3	1,9	11,2	9,4	13,3	13,3
2	2,6	0,3	4,5	8,4	9,3	1,5	9,0	8,2	10,8	7,0
3	4,1	4,1	6,3	10,7	11,3	2,6	9,8	9,7	11,6	14,1
4	4,5	4,1	5,4	9,2	11,1	2,1	8,5	10,0	11,1	8,5
5	4,4	2,1	5,6	10,1	9,7	2,7	9,3	9,5	9,8	12,3
6	10,0	2,6	5,8	9,4	12,8	2,7	4,6	10,0	10,4	11,9
7	4,1	4,4	5,5	9,2	10,0	2,5	10,0	8,9	9,9	12,8
8	4,6	3,7	6,2	12,4	12,7	3,2	9,1	10,2	10,1	9,0
9	4,1	4,7	5,2	9,9	10,1	2,4	10,8	9,8	10,8	12,9
10	3,2	1,3	4,9	8,6	9,0	2,1	9,4	9,4	10,1	11,5
Станд. откл.	1,9	1,4	0,6	1,2	1,3	0,4	1,7	0,6	1,0	2,2
Медиана	4,1	3,1	5,5	9,3	10,6	2,5	9,4	9,6	10,6	12,1

Таблица 6.2 – Значения относительной экспрессии микроРНК в плазме крови пациентов с глиобластомой. Значения относительной экспрессии представлены в виде отрицательного двоичного логарифма ($-\log_2$)

№ образца	миРНК									
	22-3p	122-5p	107	324-5p	155-5p	21-5p	330-3p	146a-5p	92a-1-5p	34a-5p
1	2,6	4,1	3,1	7,3	8,7	1,0	7,2	4,3	11,3	14,8
2	1,3	1,7	1,7	5,6	8,0	-0,4	6,8	3,2	9,4	11,4
3	2,9	0,2	3,1	7,1	8,9	1,3	8,0	5,6	10,4	11,0
4	2,4	3,1	3,4	8,0	9,8	1,7	9,3	7,6	10,7	10,6
5	2,7	2,5	3,4	7,1	9,2	1,7	7,0	6,1	9,6	10,4
6	2,3	1,3	3,1	6,9	8,9	0,8	7,0	4,8	10,2	9,8
7	2,7	3,4	2,6	7,0	8,3	1,1	7,9	5,3	11,7	10,3
8	0,5	1,1	0,7	4,6	5,8	0,0	4,5	1,9	8,3	9,2

Окончание таблицы 6.2

9	1,8	0,4	3,4	6,4	8,5	0,5	6,7	6,0	8,8	11,2
10	1,9	1,1	4,1	6,8	8,5	0,1	7,6	8,5	10,9	8,3
11	1,4	3,7	2,8	6,2	8,3	-0,1	6,7	3,8	7,6	13,5
12	1,3	2,2	2,6	5,4	7,8	-0,5	4,8	3,4	5,0	7,5
13	2,3	0,4	3,4	6,9	10,2	0,9	7,0	5,6	7,6	9,7
14	0,6	0,8	2,8	5,3	7,4	-0,9	6,5	5,6	7,0	11,2
15	0,5	0,4	2,1	5,0	6,1	-1,0	6,4	3,3	6,4	9,3
16	0,1	1,3	2,1	5,0	7,0	-1,4	5,5	2,3	7,6	11,1
17	2,5	4,1	3,3	7,1	9,2	1,3	7,2	4,7	9,6	9,5
18	0,2	1,5	1,2	3,7	6,8	-1,3	4,3	1,9	6,7	8,2
19	1,5	0,3	3,9	6,3	8,2	0,3	5,6	5,9	6,6	13,1
20	2,4	1,5	4,4	7,2	9,1	1,3	8,1	7,8	8,3	10,3
Станд. откл	0,9	1,3	0,9	1,1	1,2	1,0	1,3	1,9	1,9	1,8
Медиана	1,8	1,4	3,1	6,6	8,4	0,4	6,9	5,0	8,5	10,3

Таблица 6.3 – Значения отношения уровней циркулирующих микроРНК в группе пациентов с глиомой высокой степени злокачественности к контрольной группе ($2dCt_{\text{cancer}} / 2dCt_{\text{norma}}$).

микроРНК	$2dCt_{\text{cancer}} / 2dCt_{\text{norma}}$	Стандартное отклонение	p-значение
hsa-miR-22-3p	4,722543	4,41129	0,000001*
hsa-miR-122-5p	3,103473	2,222169	0,02156*
hsa-miR-107	5,135867	6,40501	0,000001*
hsa-miR-324-5p	6,554255	10,83158	0,000001*
hsa-miR-155-5p	4,423473	6,549464	0,000001*
hsa-miR-21-5p	4,121041	3,931748	0,000001*
hsa-miR-330-3p	5,670813	9,047621	0,00026*
hsa-miR-146a-5p	23,71173	63,15652	0,000001*
hsa-miR-92a-1-5p	4,157589	10,47334	0,09746
hsa-miR-34a-5p	3,351811	6,028915	0,14633

Примечание. * – статистически достоверные отличия уровня экспрессии в плазме крови пациентов с глиобластомой относительно уровня в плазме крови контрольной группы

Для определения специфичности выявленного паттерна циркулирующих микроРНК был проведен скрининг уровня относительной экспрессии исследуемых маркеров в плазме крови пациентов, страдающих метастатическими опухолями головного мозга (таблица 6.4). Сравнительный анализ уровней исследованных микроРНК выявил статистически значимые различия между группой пациентов с глиальными опухолями и метастатическим поражением головного мозга по пяти микроРНК: hsa-miR-22-3p, hsa-miR-107, hsa-miR-324-5p, hsa-miR-330-3p и hsa-miR-146a-5p (таблица 6.4, рисунки 6.1–6.8). Все исследованные маркеры демонстрировали увеличение своего присутствия в плазме крови в группе глиобластом.

На рисунке 6.1 наглядно продемонстрировано, что уровень микроРНК hsa-miR-22-3p повышен в плазме крови как у пациентов с глиомами, так и у пациентов, страдающих метастатическими опухолями головного мозга. Однако изменение уровня циркулирующей микроРНК позволяет дискриминировать глиобластомы головного мозга как от контрольной группы ($p=0,02156$), так и от группы метастатических опухолей головного мозга ($p=0,003843$).

Таблица 6.4 – Значения относительной экспрессии исследуемых микроРНК в плазме пациентов с метастатическими опухолями головного мозга

микроРНК	Медиана 2dCt	Стандартное отклонение	p значение
hsa-miR-22-3p	0,180867	0,917686	0,00001*
hsa-miR-122-5p	0,258123	1,424533	0,021557*
hsa-miR-107	0,194426	0,523209	0,000001*
hsa-miR-324-5p	0,08118	0,991139	0,000001*
hsa-miR-155-5p	0,445642	2,920693	0,00164*
hsa-miR-21-5p	0,505696	0,495067	0,04144*
hsa-miR-330-3p	0,304121	6,116138	0,00002*
hsa-miR-146a-5p	0,048155	0,101689	0,00001*
hsa-miR-92a-1-5p	1,055989	8,189104	0,89256
hsa-miR-34a-5p	0,988656	71,1295	0,24040

Примечание. * – статистически значимые различия между группой пациентов с глиальными опухолями и метастатическим поражением головного мозга

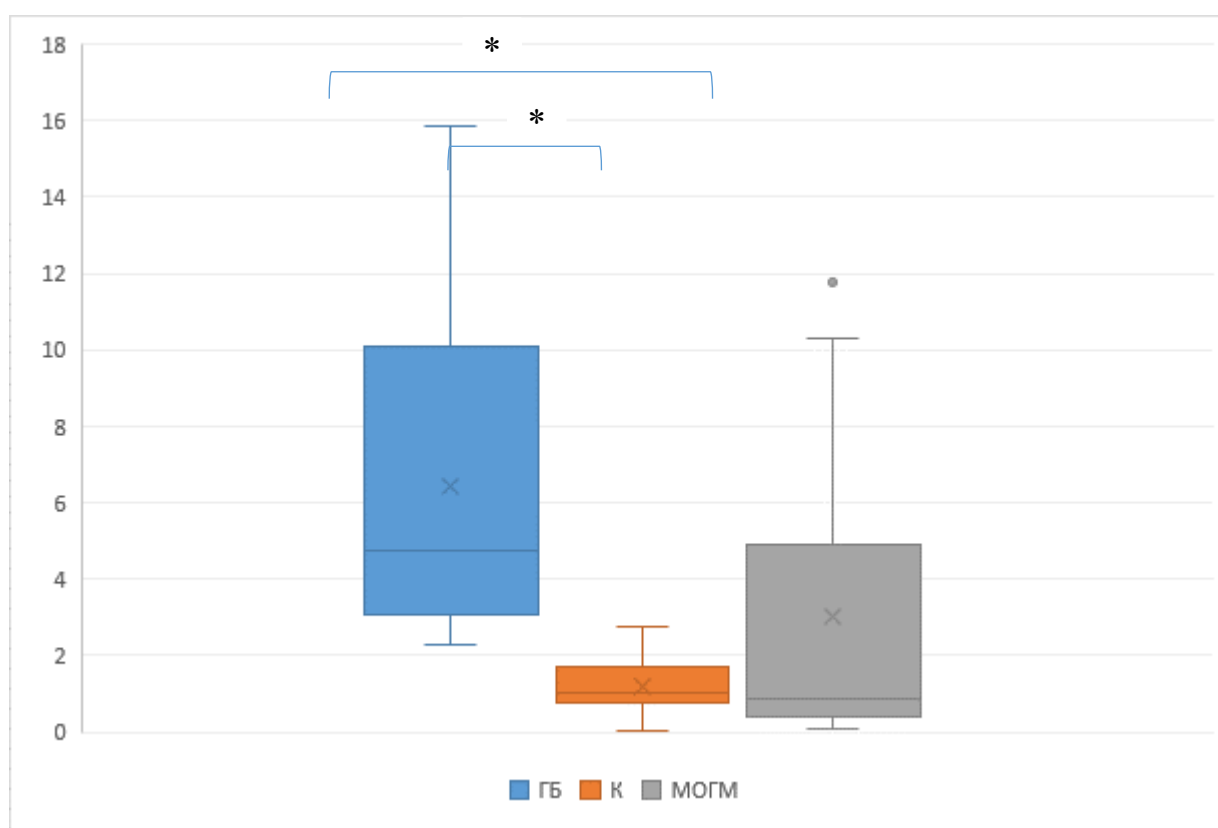


Рисунок 6.1. Уровни экспрессии hsa-miR-22-3p в исследуемых образцах плазмы. ГБ – глиобластомы, К – контроль, МОГМ – метастатические опухоли головного мозга. * – $p < 0,01$

Уровень hsa-miR-122-5p в плазме крови также демонстрирует повышение, как в группе пациентов, страдающих глиобластомой, так и в группе метастатического поражения головного мозга по сравнению с контрольной группой ($p=0,00001$). Между выборкой пациентов, страдающих метастатическими опухолями головного мозга, и пациентов с глиобластомой выявлена тенденция значимых различий ($p=0,054614$) (рисунок 6.2). Сравнительный анализ уровней hsa-miR-107 в плазме крови выявил значимое повышение показателя в группе глиобластом в отличие от контрольной группы ($p=0,00001$), и группы пациентов, страдающих метастатическими опухолями головного мозга ($p=0,000076$).

На рисунке 6.3 продемонстрировано, что при метастатическом поражении мозга вследствие прогрессирования рака легких или колоректального рака изменения уровня hsa-miR-107 в плазме крови не регистрируется. Обнаруженный у пациентов с глиобластомой высокий уровень hsa-miR-324-5p в плазме позволил с высокой степенью надежности дифференцировать эту группу от контрольной группы ($p=0,00001$), а также от группы пациентов, страдающих метастатическими

опухолями головного мозга ($p=0,001349$). Одновременно повышенный уровень маркера у пациентов с метастазами в головной мозг не достигает статистической значимости при сравнении с контрольной группой (рисунок 6.4).

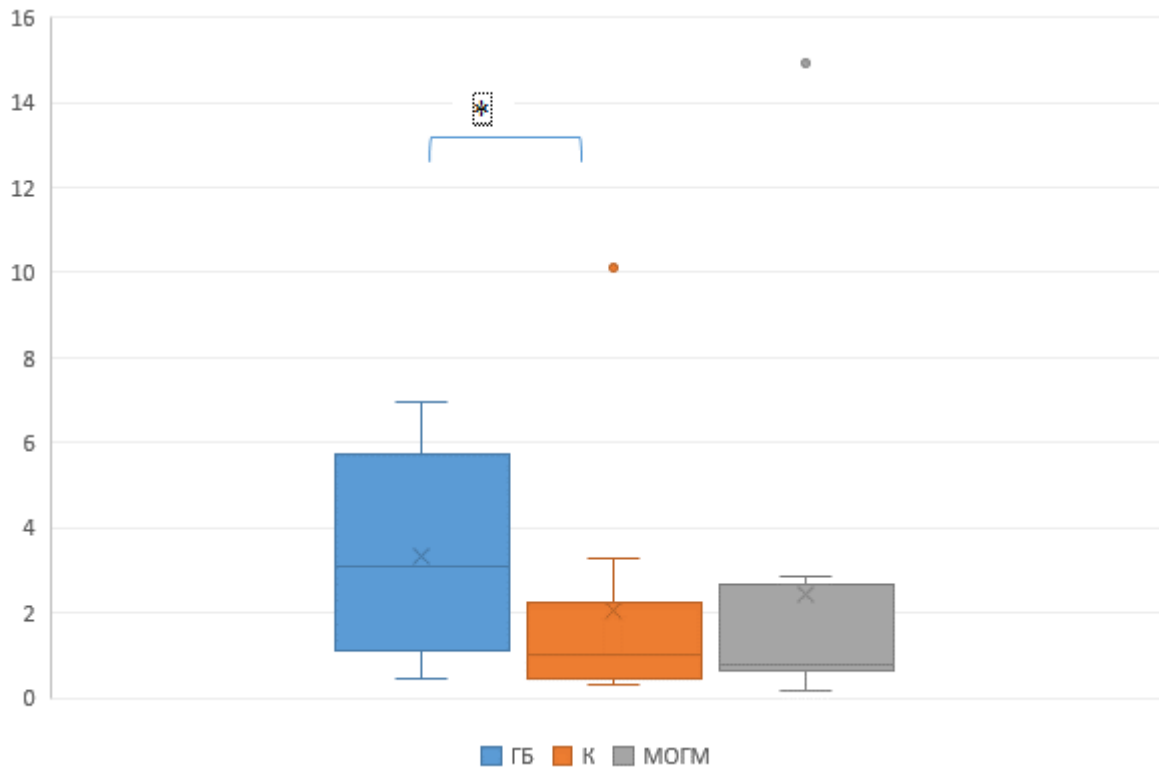


Рисунок 6.2. Уровни экспрессии hsa-miR-122-5p в исследуемых образцах плазмы. ГБ – глиобластомы, К – контроль, МОГМ – метастатические опухоли головного мозга. * – $p<0,05$

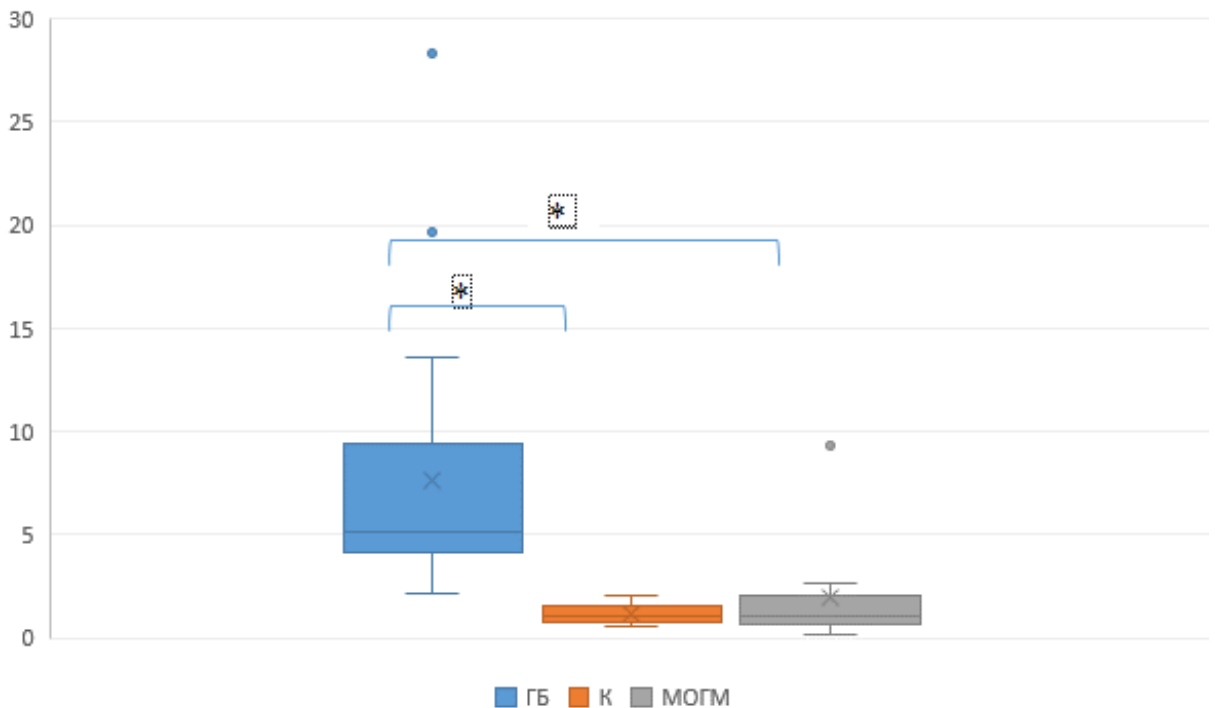


Рисунок 6.3 – Уровни экспрессии hsa-miR-107 в исследуемых образцах плазмы. ГБ – глиобластомы, К – контроль, МОГМ – метастатические опухоли головного мозга. * – $p<0,01$

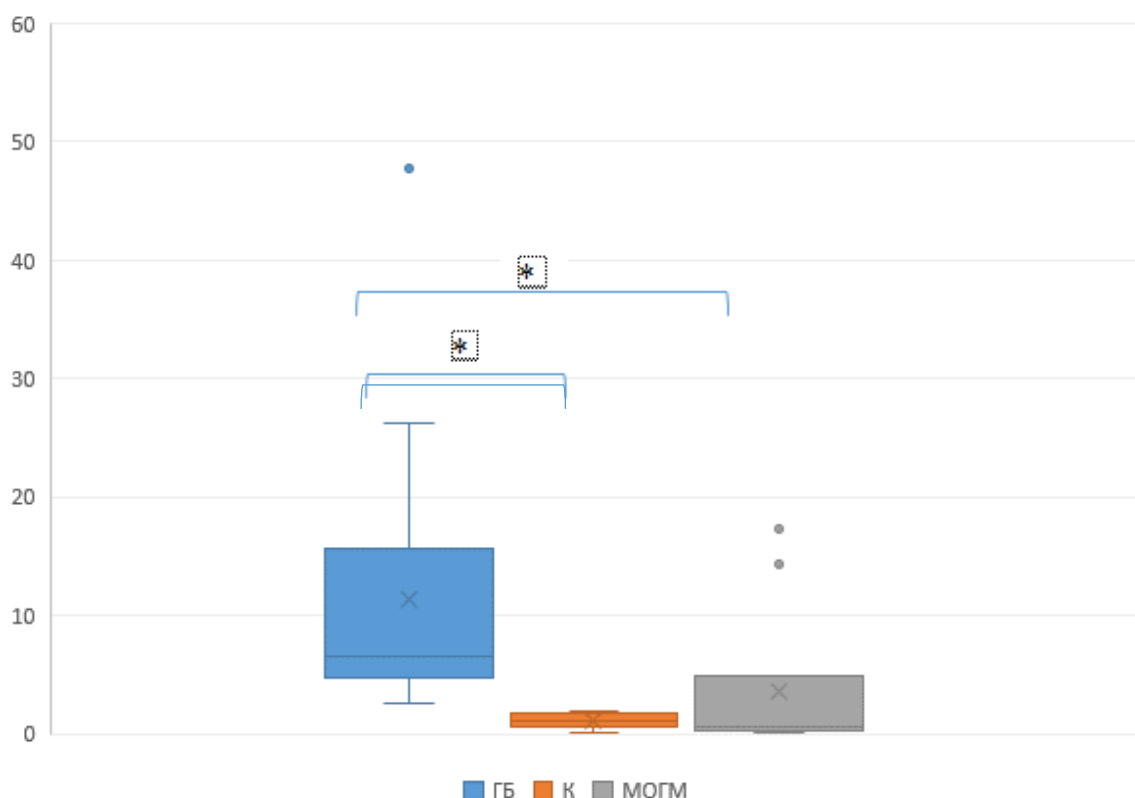


Рисунок 6.4 – Уровни экспрессии hsa-miR-324-5p в исследуемых образцах плазмы. ГБ – глиобластомы, К – контроль, МОГМ – метастатические опухоли головного мозга. * – $p < 0,01$

Уровень микроРНК hsa-miR-155-5p в плазме пациентов с глиобластомой статистически значимо превышает показатели в контрольной группе ($p = 0,000001$). Уровень маркера в группе с метастазами в головной мозг продемонстрировал широкий диапазон варьирования (рисунок 6.5), что в итоге не позволило дифференцировать пациентов с глиобластомой от пациентов, страдающих метастатическими опухолями головного мозга ($p = 0,267008$).

Аберрантно экспрессирующаяся hsa-miR-21-5p достоверно дифференцирует образцы плазмы пациентов, страдающих глиобластомой, от образцов плазмы контрольной группы ($p = 0,000001$). Между группой пациентов, страдающих метастатическими опухолями головного мозга, и группой глиобластом достоверных различий не выявлено ($p = 0,474503$). Показатели уровня данного маркера у пациентов с метастазами варьировали от падения до статистически значимого превышения референтных данных для группы контроля (рисунок 6.6). В итоге выявлено достоверное повышение уровня hsa-miR-21-5p в группе метастатических опухолей головного мозга по сравнению с контролем.

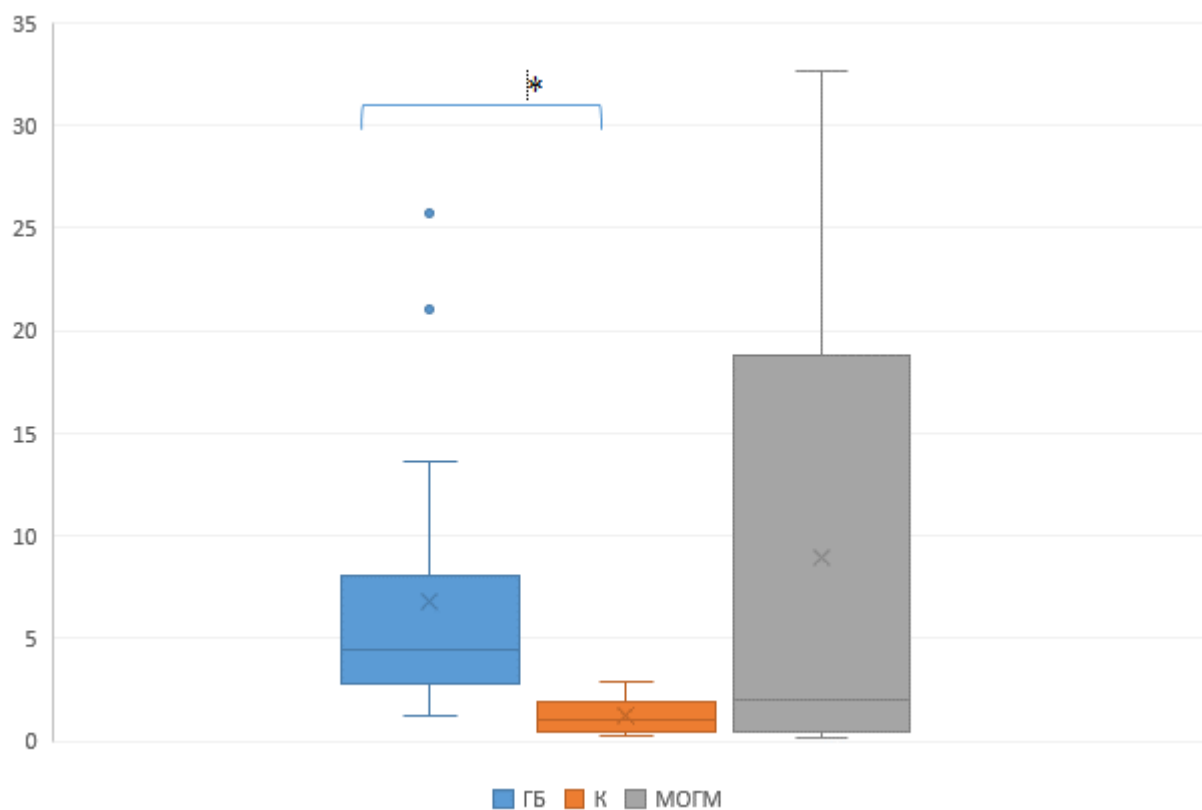


Рисунок 6.5 – Уровни экспрессии hsa-miR-155-5p в исследуемых образцах плазмы. ГБ – глиобластомы, К – контроль, МОГМ – метастатические опухоли головного мозга. * – $p < 0,01$

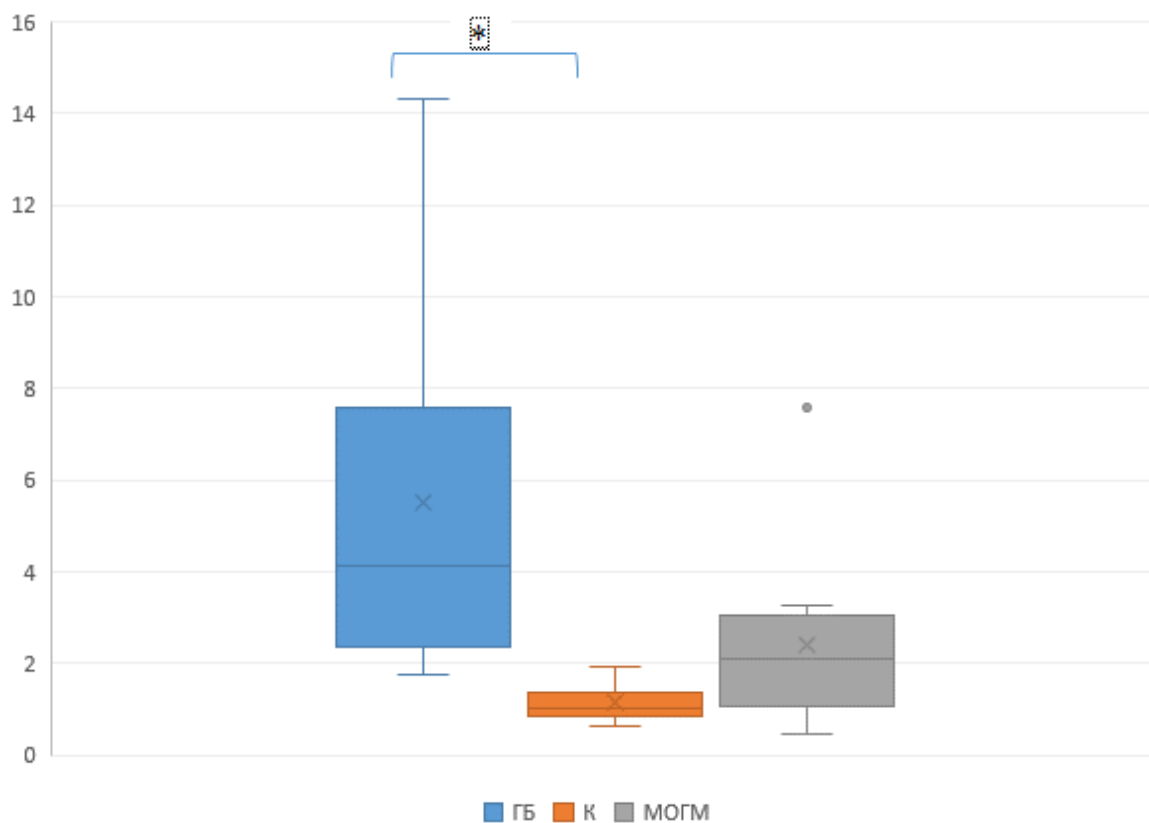


Рисунок 6.6. – Уровни экспрессии hsa-miR-21-5p в исследуемых образцах плазмы. ГБ – глиобластомы, К – контроль, МОГМ – метастатические опухоли головного мозга. * – $p < 0,01$

Согласно продемонстрированным на рисунке 6.7 данным aberrантные уровни hsa-miR-330-3p в плазме крови достоверно дифференцировали пациентов, страдающих глиобластомой, и доноров без онкопатологий ($p=0,00026$), а также группу глиобластом и пациентов, страдающих метастатическими опухолями головного мозга ($p=0,008319$). При этом в группе метастатических опухолей также отмечена тенденция повышения уровня hsa-miR-21-5p в плазме крови.

Отметим показательное изменение содержания в плазме hsa-miR-146a-5p (рисунок 6.8), которая практически отсутствует в плазме крови здоровых доноров, демонстрируя повышение титра незначительно при метастатических поражениях головного мозга и значимо при глиобластомах. Такая дифференциальная экспрессия позволила достоверно дискриминировать группу глиобластом от контрольной группы ($p=0,00001$), а также от группы пациентов, страдающих метастатическими опухолями головного мозга ($p=0,000009$).

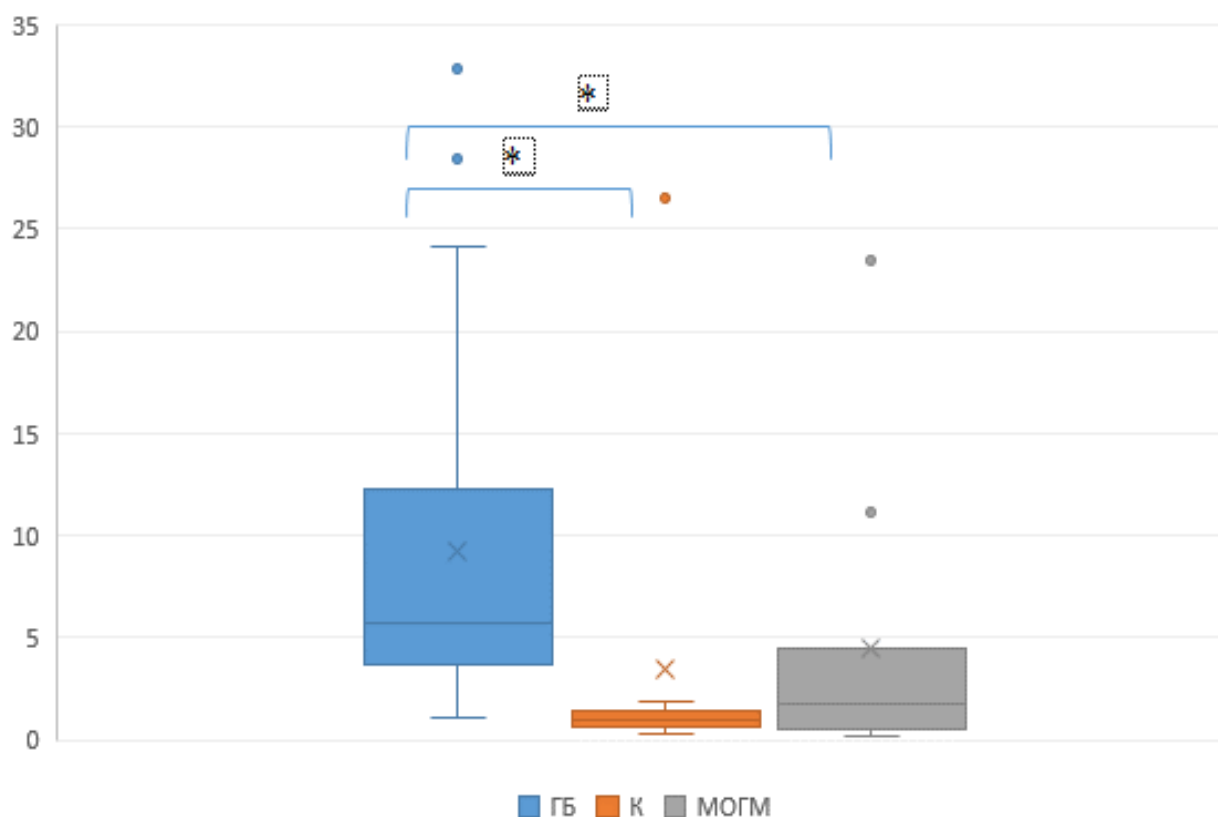


Рисунок 6.7. Уровни экспрессии hsa-miR-330-3p в исследуемых образцах плазмы. ГБ – глиобластомы, К – контроль, МОГМ – метастатические опухоли головного мозга.
* – $p<0,01$

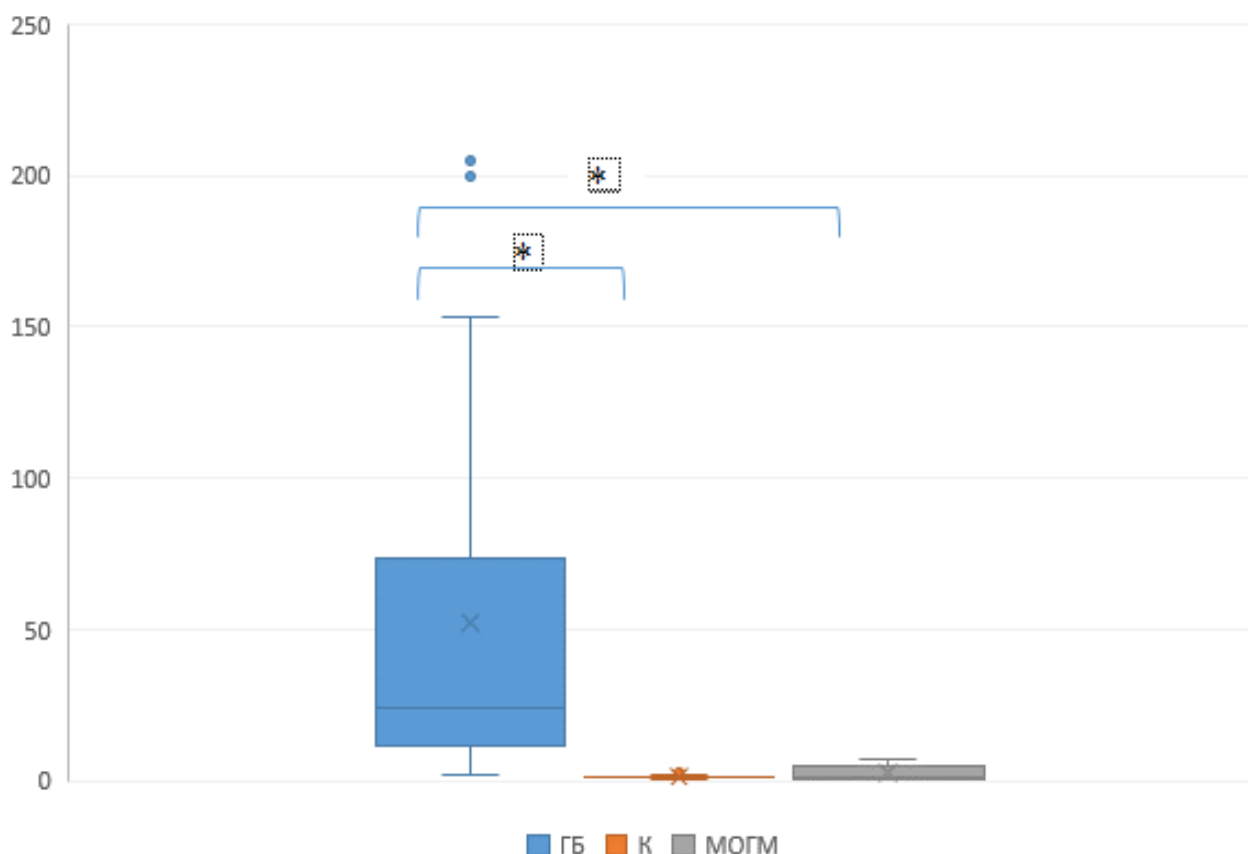
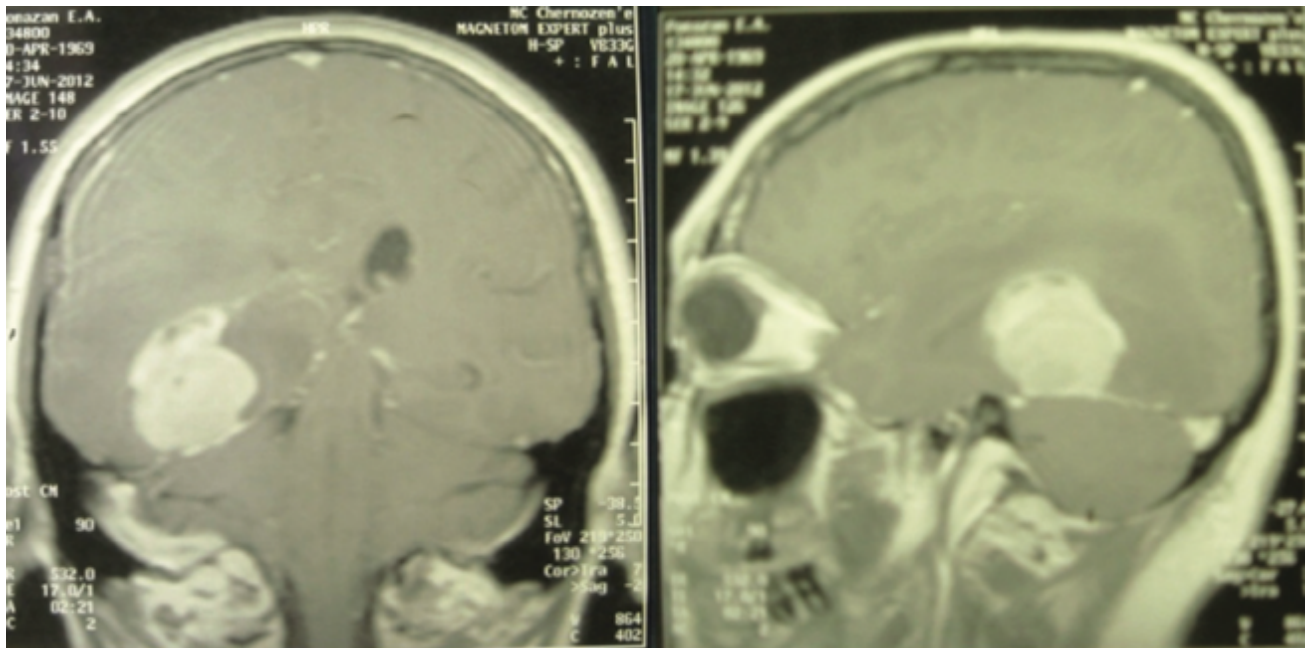


Рисунок 6.8. Уровни экспрессии hsa-miR-146a-5p в исследуемых образцах плазмы. ГБ – глиобластомы, К – контроль, МОГМ – метастатические опухоли головного мозга. * – $p < 0,01$

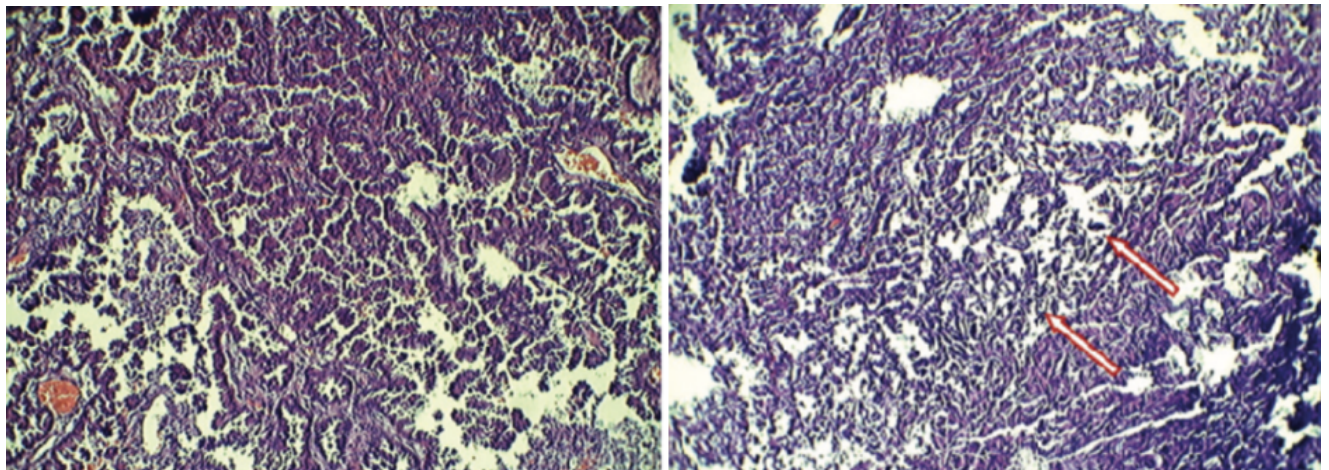
Выявленные закономерности изменения уровня исследованного пула микроРНК позволил и предложить способ молекулярно-генетической диагностики глиальных опухолей головного мозга на догоспитальном этапе.

Предварительный анализ 29-ти клинических случаев свидетельствует о возможности проведения диагностики глиом высокой степени злокачественности с использованием оценки уровня восьми микроРНК в плазме крови: hsa-miR-22-3p, hsa-miR-122-5p, hsa-miR-107, hsa-miR-324-5p, hsa-miR-155-5p, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-330-3p, hsa-miR-146a-5p относительно экзогенного контроля cel-miR-39-5p.

Широко известны трудности МРТ-дифференциальной диагностики злокачественных новообразований первичной, оболочечной или метастатической природы, проиллюстрированные на рисунках 6.9, 6.10 (Балязин-Парфенов И.В., Росторгуев Э.Е., Тодоров С.С. и соавт., 2015).



1



2

Рисунок 6.9. Данные МРТ-нейровизуализации с контрастным усилением, типичные для менингиомы намента мозжечка (1), и гистологическая верификация опухоли (2): метастаз папиллярной аденокарциномы легкого, врастающий в твердую мозговую оболочку, стрелками обозначена инвазия в листок твердой мозговой оболочки

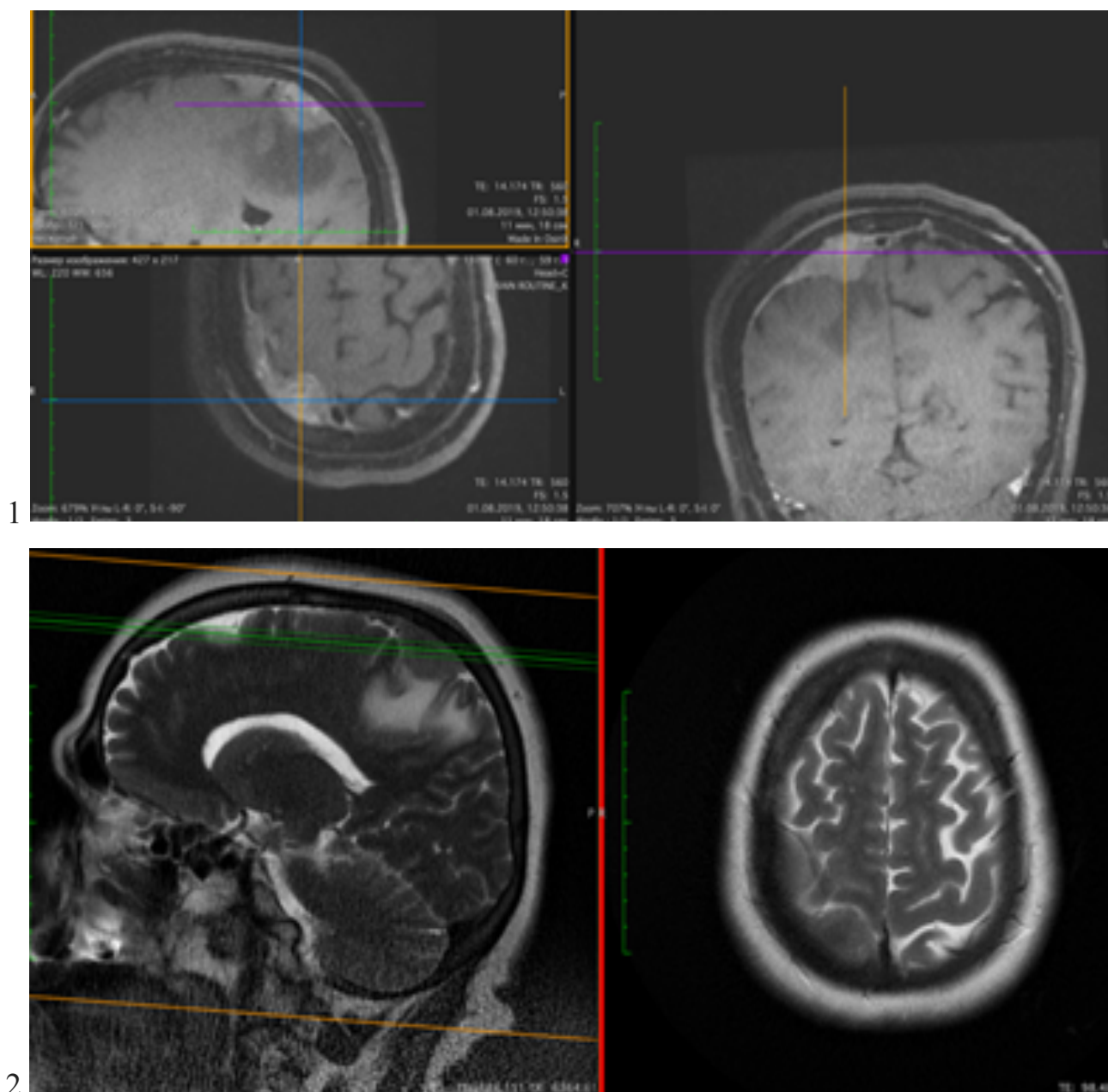


Рисунок 6.10. Данные МРТ-нейровизуализации с «признаками оболочечной опухоли» с инвазией верхнего сагиттального синуса в задней трети, контрастирование с гадолинием (1), T2 взвешенное изображение (2). Результат гистологической верификации: метастаз инфильтрирующей карциномы. Иммуногистохимическое исследование №957/2019/26.05.2019: экспрессия рецепторов эстрогена в 90% ядер, экспрессия рецепторов прогестерона отсутствует, экспрессия Ki-67 – 25% ядер, экспрессия Her2/Neu (C-erbB-2) на уровне 3(+)

Для оценки диагностической ценности исследуемых микроРНК был проведен анализ кривых ROC (данные приведены частично). На рисунках 6.11А и 6.11Б продемонстрированы результаты только для трех микроРНК, которые продемонстрировали наибольшую мощность, – hsa-miR-107, hsa-miR-155-5p и hsa-miR-122-5p.

Для сигнатуры микроРНК hsa-miR-107 и hsa-miR-122-5p диагностическая чувствительность и специфичность в определении глиобластом составила 100 % и 71,2% соответственно (AUC=88,5%) (рисунок 6.11А).

При использовании сигнатуры – hsa-miR-107, hsa-miR-155-5p и hsa-miR-122-5p для идентификации метастатических опухолей головного мозга диагностическая чувствительность и специфичность метода составила соответственно 100% и 61,1% (AUC=82%) (рисунок 6.11Б).

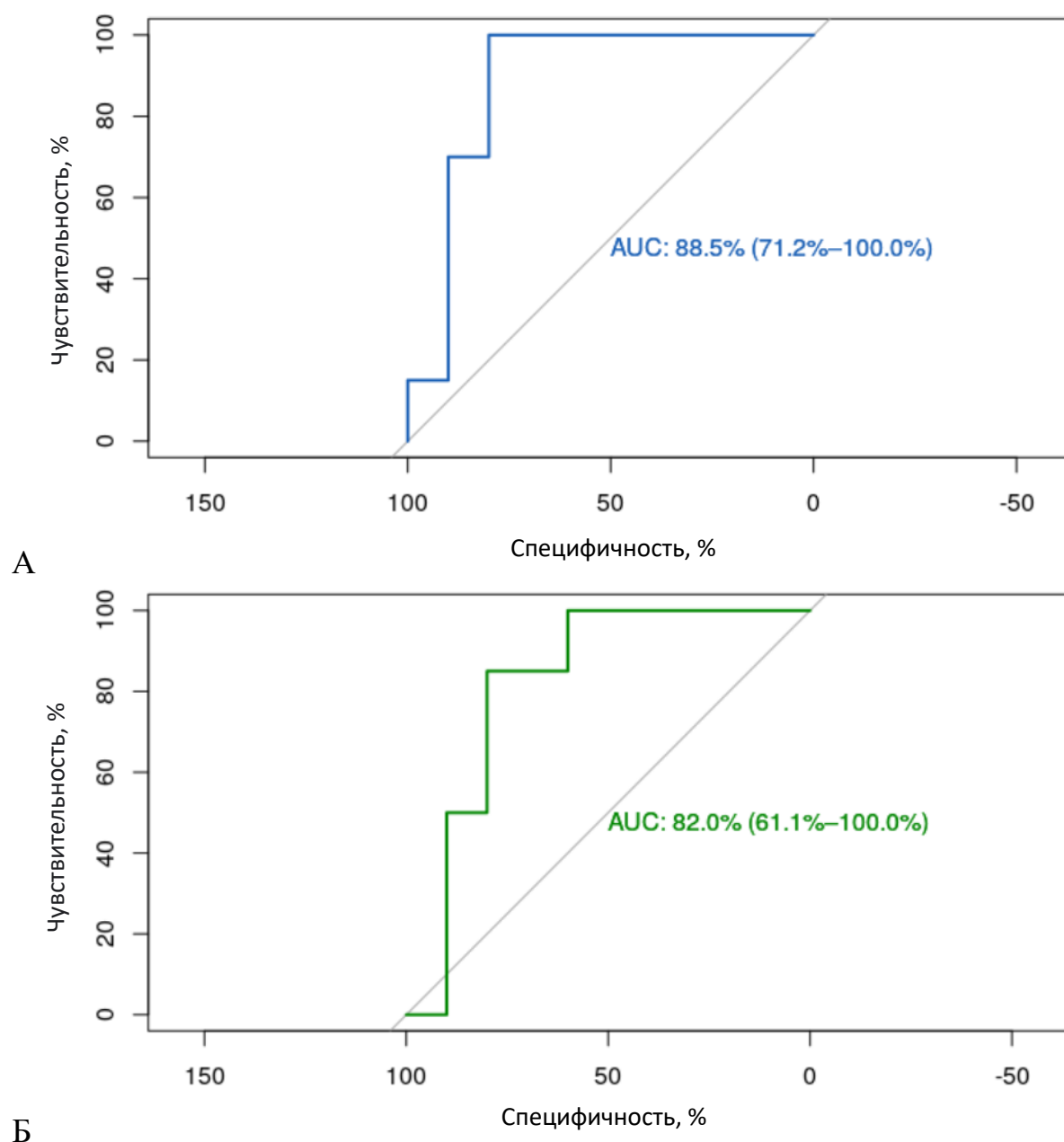


Рисунок 6.11. ROC-кривые сигнатуры микроРНК. А – для глиобластом (hsa-miR-107 и hsa-miR-122-5p), AUC=88.5%; Б – для метастатического рака головного мозга (hsa-miR-107, hsa-miR-155-5p и hsa-miR-122-5p), AUC=82%.

Разработана формула диагностической оценки (ДО) наличия глиальной опухоли головного мозга высокой степени злокачественности с использованием двух микроРНК:

$$ДО = 0,661 * 2^{-(Ct107 - Ct39)} + 0,241 * 2^{-(Ct122 - Ct39)},$$

где Ct107 и Ct122 – номер цикла, полученный в результате проведения полуколичественной RT-PCR для hsa-miR-107 и hsa-miR-122-5p, 39 – cel-miR-39-5p.

Для теста определено пороговое значение (рисунок 6.12). Если у пациента диагностическая оценка не превышает значения 0,075, предполагают отсутствие у него глиобластомы. Если ДО пациента равен или больше значения 0,075, с большой вероятностью предполагают у него глиобластому.

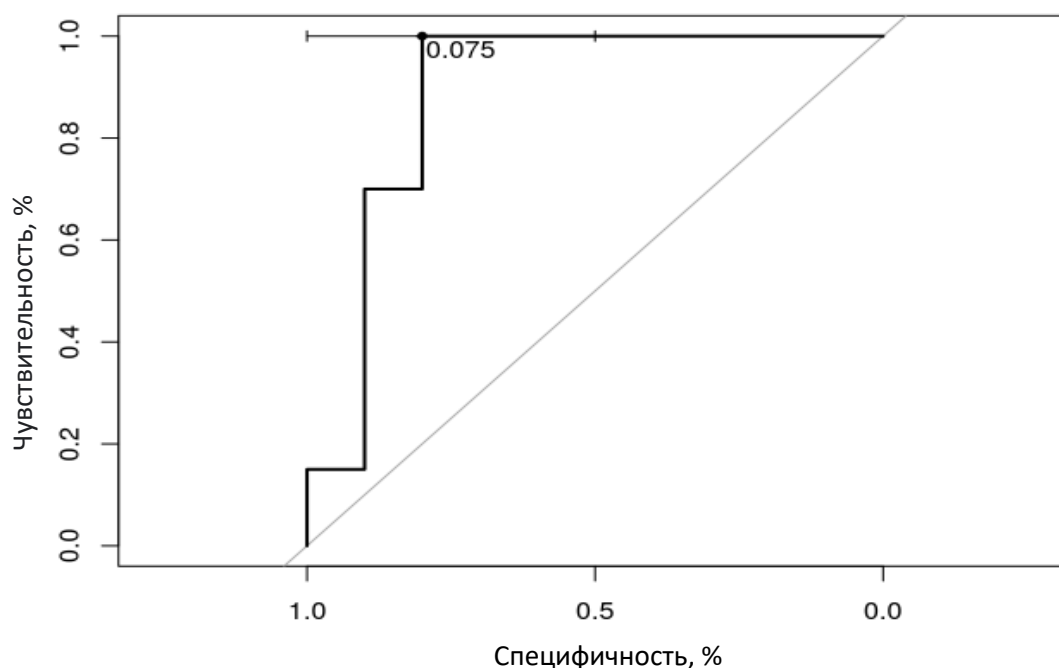


Рисунок 6.12. Пороговое значение диагностической оценки наличия или отсутствия глиобластомы равно 0,075

Разработана формула диагностической оценки наличия метастатической (ДОмет) опухоли головного мозга с использованием трех микроРНК:

$$ДО_{мет} = 0,697 * 2^{-(Ct107 - Ct39)} - 0,621 * 2^{-(Ct155 - Ct39)} + 0,376 * 2^{-(Ct122 - Ct39)},$$

где Ct107, Ct155 и Ct122 – номер цикла, полученный в результате проведения полуколичественной RT-PCR для hsa-miR-107, hsa-miR-155-5p и hsa-miR-122-5p, 39 – cel-miR-39-5p.

Для теста определено пороговое значение (рисунок 6.13). Если у пациента диагностическая оценка ниже значения 0,127, предполагают высокую вероятность наличия метастатического поражения головного мозга. Если у пациента диагностический балл равен либо превышает значение 0,127, с большой вероятностью предполагают наличие глиобластомы.

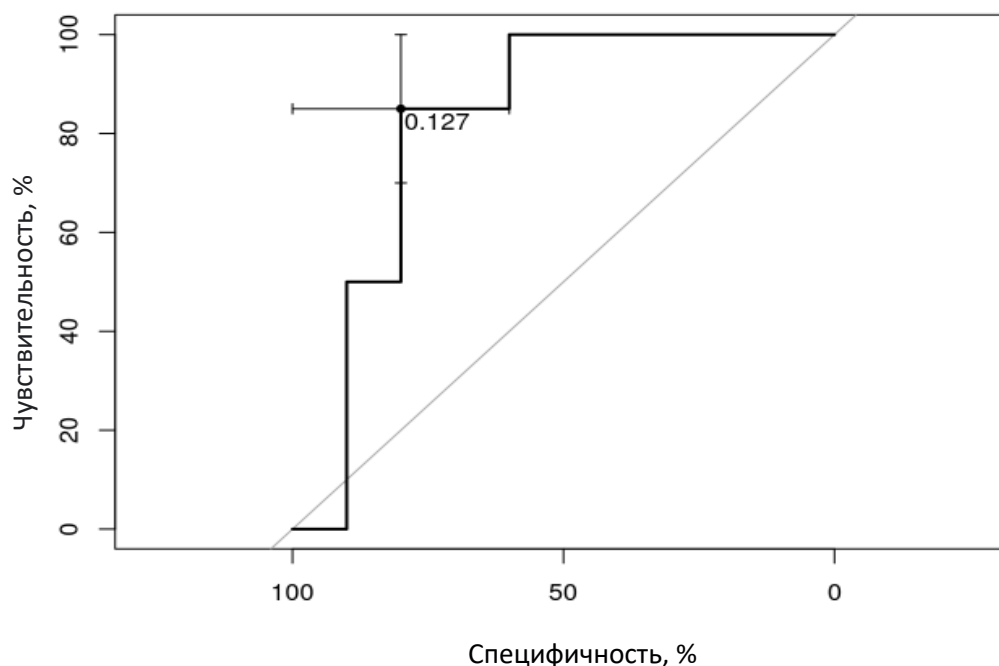


Рисунок 6.13. Пороговое значение диагностической оценки наличия глиобластомы или метастатического рака головного мозга равно 0,127

Для решения диагностических задач, на основании полученных в настоящем исследовании результатов, разработан метод неинвазивной диагностики злокачественных опухолей первичной или вторичной природы. Метод основан на оценке относительной экспрессии экспериментально подобранной сигнатуры микроРНК, прошедшей анализ диагностической ценности: hsa-miR-107, hsa-miR-155-5p и hsa-miR-122-5p.

Определение уровня относительной экспрессии микроРНК в образцах плазмы проводят методом RT-PCR с использованием экзогенной референсной микроРНК cel-miR-39-5p (экзогенный контроль) с известной последовательностью, не характерной для человека, которая вносится перед проведением анализа в стандартном количестве во все образцы плазмы крови для нормализации эффективности выделения и обратной транскрипции

(использование данного подхода повышает воспроизводимость и достоверность получаемых данных). Заключение о наличии глиальной опухоли высокой степени злокачественности делают на основании тестирования образцов плазмы крови, прошедших двухэтапную сепарацию при температуре +4°C сразу после взятия. Получение комплементарной ДНК реализуется при помощи полиаденилирования тотальной РНК и обратной транскрипции с использованием универсального праймера (Balcells I., Cirera S., Busk P. K., 2011).

Диагностика реализуется на основании анализа экспрессии микроРНК в образце плазмы, включающего внесение экзогенного контроля в образец плазмы и выделение тотальной РНК, обратную транскрипцию с последующей амплификацией в режиме реального времени, с использованием высокоспецифичных праймеров для микроРНК.

Для осуществления процедуры необходимо выполнение следующих этапов: забор крови, выделение плазмы посредством сепарации, внесение экзогенного контроля в плазму, выделение тотальной РНК из подготовленного образца плазмы; наработка комплементарной ДНК (кДНК), амплификация образцов кДНК в присутствии специфичных праймеров в режиме реального времени; обработка первичных данных; оценка изменения относительной экспрессии в плазме для расчета диагностической оценки.

Разработанный способ диагностики был апробирован при ведении нескольких пациентов, выписки из историй болезней которых приведены ниже.

Пример №1. Больной Щ., 51 год, пол мужской, обратился к неврологу по месту жительства по поводу слабости в левых конечностях, больше в ноге, и чувства онемения в левой руке. Проводилась симптоматическая терапия по месту жительства. Лечение – без эффекта.

Обратился в ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России, где была выполнена МРТ головного мозга в стандартных режимах с контрастным усилением и выявлена внемозговая опухоль правой теменной области, прилежащая к фальксу и верхнему сагиттальному синусу мозга (рисунок 6.14).

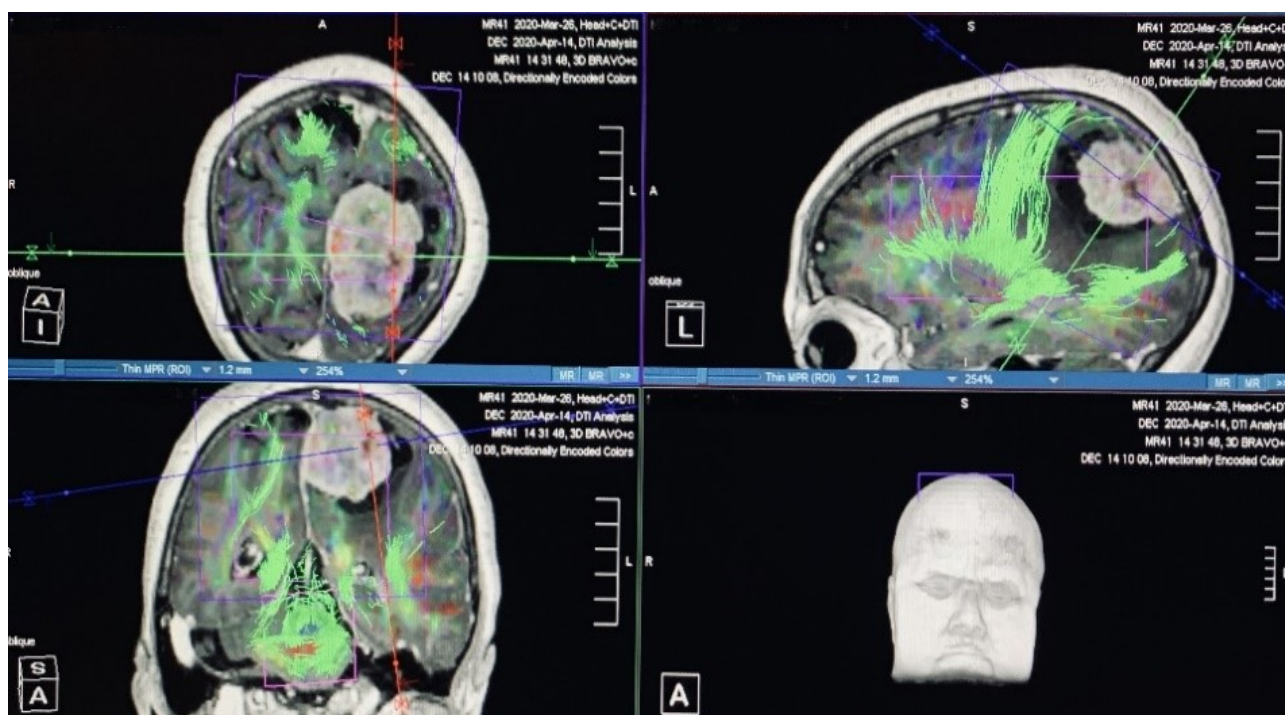


Рисунок 6.14. На МРТ признаки фалькс-менингиомы задней трети с ростом в стенку верхнего сагиттального синуса. При анализе DTI данных, кортикоспинальный тракт отеснен

При соматической оценке пациента патологии не выявлено. Предварительный диагноз: фалькс-менингиома задней трети справа.

Пациенту выполнено исследование относительной экспрессии микроРНК в плазме крови. Результаты молекулярно-генетического исследования, приведенные в таблице 6.5, свидетельствуют об отсутствии у пациента глиальной опухоли высокой степени злокачественности.

Таблица 6.5 – Результаты молекулярно-генетического исследования. Больной Щ.

микроРНК	Ct	ДО
hsa-miR-107	24	0,036553
hsa-miR-155-5p	21,2	
cel-miR-39-5p	18	

В отделении нейроонкологии ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России выполнена операция в объеме: костнопластическая краниотомия в правой теменной области, удаление опухоли (I степень радикальности по Симпсону). Иммуногистохимическое исследование характеризует опухоль как менинготелиоматозную менингиому. При плановом МРТ-обследовании

головного мозга с контрастным усилением через 6 месяцев продолженного роста или рецидива опухоли не выявлено. Установленный окончательный диагноз и дальнейшее течение заболевания согласуется с данными молекулярно-генетического исследования.

Пример №2. Больной П., 64 года, пол мужской, обратился в ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России с жалобами на диффузные головные боли в течение четырех месяцев. МРТ-исследование головного мозга в стандартных режимах с контрастным усилением выявило первичную глиальную опухоль правой лобной доли с распространением в коллено и клюв мозолистого тела. При комплексном обследовании других органов и систем патологии не выявлено. Предварительный диагноз: глиобластома правой лобной доли с распространением в коллено и клюв мозолистого тела. Без стадии, кл. гр. 2 (рисунок 6.15).

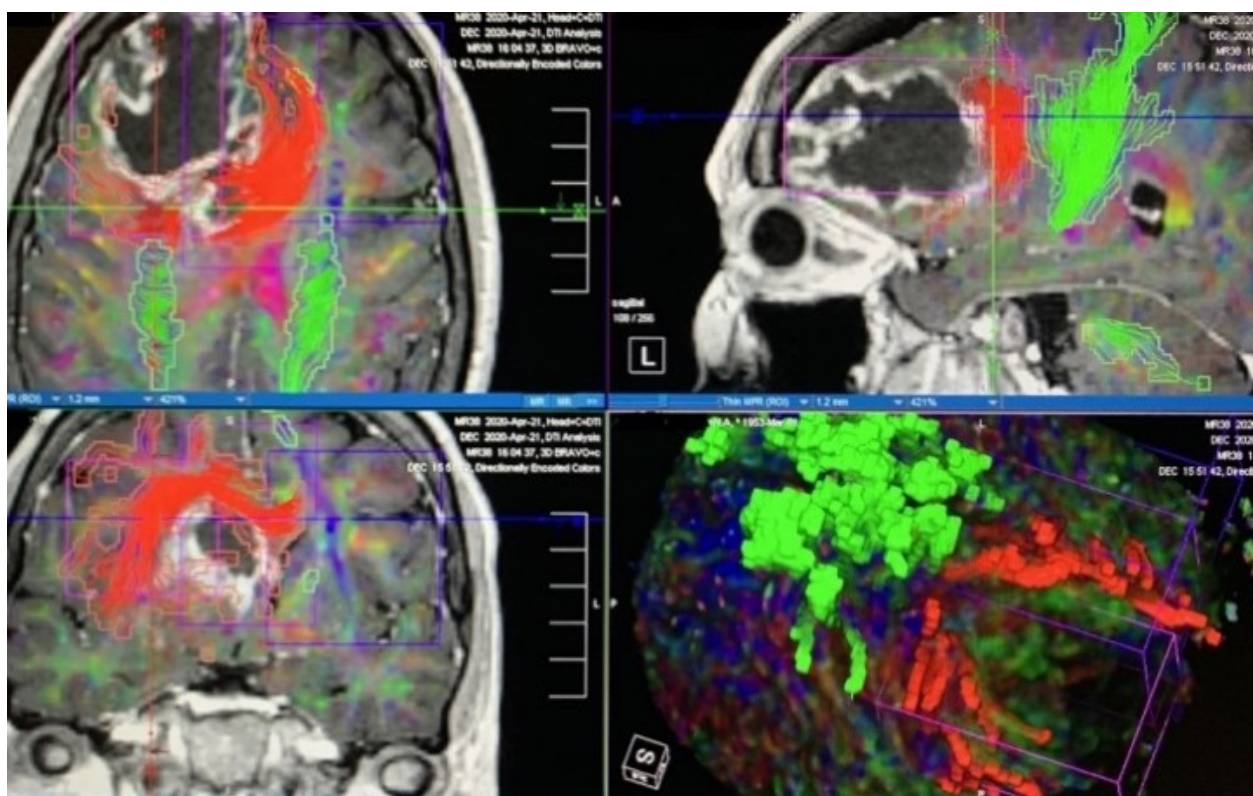


Рисунок 6.15. МРТ, диффузная глиальная опухоль правой лобной доли с распространением в коллено и клюв мозолистого тела. Красным цветом показаны комиссуральные связи между лобными долями: инфильтрация трактов, зеленым цветом – проекционные связи: кортикоспинальный тракт оттеснен

На этапе госпитализации выполнено исследование относительной экспрессии микроРНК в плазме крови пациента. Результаты молекулярно-

генетического исследования свидетельствуют о высоком риске наличия глиальной опухоли высокой степени злокачественности (таблица 6.6).

Таблица 6.6 – Результаты молекулярно-генетического исследования. Больной П.

микроРНК	Ct	ДО	ДОмет
hsa-miR-122-5p	20.1	0,100493	0,129543
hsa-miR-107	21,9		
hsa-miR-155-5p	25		
cel-miR-39-5p	18		

В отделении нейроонкологии ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России выполнена операция в объеме: костнопластическая краниотомия в правой лобной области, циторедуктивное удаление глиальной опухоли правой лобной доли головного мозга с применением флуоресцентной микроскопии (5-амино-левулиновая кислота), оптической навигации границ опухоли, комиссуральных и проекционных трактов в условиях нейрофизиологического мониторинга.

Иммуногистохимическое исследование характеризует опухоль как первичную глиобластому GIV, без мутаций *IDH1/2*.

Таким образом, показатели относительной экспрессии микроРНК в плазме крови пациента на этапе обследования демонстрировали наличие или отсутствие глиальной опухоли высокой степени злокачественности, что впоследствии было подтверждено морфологическими, иммуногистохимическими и молекулярными методами исследований.

В итоге, разработана оригинальная тест-система по выявлению специфичного паттерна микроРНК в плазме крови для не инвазивной диагностики глиальных опухолей высокой степени злокачественности (Sp 71,2% и Se 100%; AUC=88,5%) и для дифференцировки глиобластомы и метастатических опухолей головного мозга (Sp 61,1% и Se 100%, AUC=82%).

ОПРЕДЕЛЕНИЕ НЕКОТОРЫХ МАРКЕРОВ РОСТА ГЛИАЛЬНЫХ ОПУХОЛЕЙ ВЫСОКОЙ СТЕПЕНИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОСТИ

В главе представлены исследования роли ростовых факторов, гормональных факторов, системы регуляции плазминогена в патогенезе глиальных опухолей высокой степени злокачественности, а также данные предложенного нами способа предоперационной дифференциальной диагностики доброкачественной и злокачественной опухоли головного мозга по анализу плазмы крови больного с диагнозом «новообразование головного мозга».

7.1 Ростовые факторы

Расшифровка важных механизмов ангиогенеза в физиологическом и патологическом состоянии остается предметом повышенного интереса в течение последних 30 лет. Известно, что главным инициатором прорастания кровеносных сосудов в опухолевую ткань считается VEGF-A, являющийся специфическим митогенным сигналом для эндотелиальных клеток, запускающим механизмы клеточного деления и миграции. VEGF-индуцированная сосудистая сеть опухоли имеет ряд структурных и функциональных особенностей, которые обеспечивают рост и прогрессию опухоли; среди них повышенная проницаемость и хаотичное расположение сосудов.

В данном разделе исследования представлены результаты в сравнительном аспекте уровня некоторых факторов роста в ткани глиобластом и менингиом, а также соответствующих перифокальных зон.

Инфильтративный рост злокачественных новообразований головного мозга с вращением комплексов опухолевых клеток в прилежащую мозговую ткань обусловлен проникновением патологических клеток в мозговое вещество, в том числе и по интраадвентициальным щелям мозговых сосудов, просвет которых они нередко заполняют (Мартынов Б.В. и соавт., 2002; Мацко Д.Е., 2002). При ангиогенных заболеваниях, к которым относится опухолевый рост, имеет место патологический ангиогенез, в развитии которого особую роль играют фактор

роста эндотелия сосудов (VEGF), фактор роста фибробластов (FGF), трансформирующие факторы роста α и β , которые известны как факторы «запуска» ангиогенеза, и другие факторы (Gacche R.N., Meshram R.J., 2013; Nijaguna M.B., Patil V., Urbach S. et al., 2015).

Было установлено, что уровень VEGF-A в ткани глиобластом был выше, чем в ткани менингиом, в 65,6 и 80 раз соответственно, а VEGF-R1 – в 2,7 и 3,9 раза (таблица 7.1). При этом уровень VEGF-A в ткани глиобластом не имел достоверных различий. Коэффициент VEGF-A/VEGF-R1 в ткани глиобластом был выше, чем в ткани менингиом, в 24,6 и 20,3 раза соответственно и не имел достоверных различий между уровнем в тканях злокачественных новообразований головного мозга. Уровень VEGF-C и VEGF-R3 был повышен относительно менингиом в ткани глиобластом, в среднем в 1,7 раза. Коэффициент VEGF-C/VEGF-R3 был равнозначен во всех исследуемых опухолях.

Таблица 7.1 – Содержание некоторых факторов роста в ткани опухолевых образований головного мозга

Показатель	Исследуемая ткань			
	Глиобластома		Менингиома	
	опухоль	периф. зона	опухоль	периф. зона
VEGF-A	16974,5 $\pm$ 1205 ^{1, 2}	6850,8 $\pm$ 436,1 ^{1, 2}	258,8 $\pm$ 23,4 ²	65,1 $\pm$ 7,2
VEGF-R1	53,9 $\pm$ 5,4 ^{1, 2}	32,4 $\pm$ 4,1 ^{1, 2}	20,2 $\pm$ 1,7 ²	2,0 $\pm$ 0,2
VEGF-A/VEGF-R1	314,9 $\pm$ 28,6 ^{1, 2}	211,4 $\pm$ 18,3 ^{1, 2}	12,8 $\pm$ 1,4 ²	32,6 $\pm$ 2,9
VEGF-C	9,1 $\pm$ 0,8 ^{1, 2}	3,9 $\pm$ 0,4 ²	4,8 $\pm$ 0,6 ²	1,1 $\pm$ 0,1 ⁴
VEGF-R3	8,2 $\pm$ 0,7 ^{1, 2}	3,9 $\pm$ 0,3 ^{1, 2}	4,9 $\pm$ 0,4	4,8 $\pm$ 0,4
VEGF-C/VEGF-R3	1,1 $\pm$ 0,1 ²	1,0 $\pm$ 0,07 ²	1,0 $\pm$ 0,1 ²	0,2 $\pm$ 0,1 ⁸
EGF	267,1 $\pm$ 24,2 ^{1, 2}	112,2 $\pm$ 13,6 ^{1, 2}	60,7 $\pm$ 5,3 ²	83,6 $\pm$ 7,6
TGF- β 1	4095,4 $\pm$ 313,8 ^{1, 2}	3931,7 $\pm$ 324,2 ^{1, 2}	2213,5 $\pm$ 189,1	2382,1 $\pm$ 204,3
IFR-1	16,0 $\pm$ 1,3 ^{1, 2}	15,7 $\pm$ 1,6 ^{1, 2}	20,2 $\pm$ 1,8 ²	7,1 $\pm$ 0,8
IFR-2	17,3 $\pm$ 1,6 ^{1, 2}	17,9 $\pm$ 1,8 ^{1, 2}	31,7 $\pm$ 2,9 ²	5,6 $\pm$ 0,7

Примечание. 1 – достоверно по отношению к ткани менингиом; 2 – достоверно по отношению к ткани перифокальной зоны менингиом ($p < 0,01$); периф. зона – перифокальная зона опухоли

Содержание EGF в ткани глиобластом было выше, чем в ткани менингиом, в 4,4 раза, при этом имея достоверные отличия между показателями в ткани злокачественных новообразований: в ткани глиобластом показатель был выше в 1,5 раза (таблица 7.1). Повышенным относительно ткани менингиомы был и уровень TGF- β 1: в ткани глиобластомы – в 1,9 раза.

На наш взгляд, особый интерес представляли результаты изучения инсулиноподобных факторов роста. Так, в ткани менингиомы уровень IFR-1 превосходил показатели в ткани глиобластом в 1,3 раза, а IFR-2 – в 1,8 раза.

Эти результаты по некоторым параметрам согласуются с работой (Nordqvist A.C., Mathiesen T., 2002), показавшей, что рост менингиомы коррелирует с увеличением в ней IGF-II и IGFBP-6.

В ткани менингиом уровень VEGF-A был повышен только в 4 раза, а VEGF-R1 – в 10,1 раза. В связи с этим соотношение VEGF-A/VEGF-R1 в ткани менингиом оказалось ниже уровня в интактной ткани в 2,5 раза. Уровень VEGF-C в ткани глиобластомы был повышен в 8,3 раза, в перитуморальной зоне – в 3,5 раза. Содержание VEGF-R3 было повышено в 1,7 раза в ткани опухоли и, напротив, снижено в 1,2 раза в перитуморальной ткани, а соотношение VEGF-C/VEGF-R3 оказалось повышенным практически одинаково, в среднем в 5,2 раза. В ткани менингиом уровень VEGF-C превышал показатели в интактной ткани в 4,4 раза, уровень VEGF-R3 не имел достоверных отличий, а соотношение VEGF-C/VEGF-R3 было выше, чем в контрольных образцах, в 5 раз (таблица 7.1).

Содержание EGF в ткани глиобластом и перитуморальной зоны было повышено в 3,2 и 1,3 раза соответственно. В ткани менингиом содержание EGF было ниже контрольных величин в 1,4 раза.

Уровень TGF- β 1 был увеличен в злокачественных новообразованиях головного мозга, но не в доброкачественных. В ткани менингиом показатель не имел достоверных отличий от значений в интактной ткани.

Содержание инсулиноподобных факторов роста в ткани глиобластом и перитуморальной зоны было повышено в равной степени: IFR-1 – в среднем в 2,2 раза, IFR-2 – в среднем в 3,1 раза. Наибольшие уровни инсулиноподобных

факторов роста были обнаружены в ткани менингиом: относительно интактной ткани IFR-1 был повышен в 2,8 раза, а IFR-2 – в 5,7 раза.

Таким образом, найдены как общие, так и отличительные особенности содержания ростовых факторов в ткани опухолевых образований и соответствующих перитуморальных зон. К общим чертам метаболизма ткани опухоли глиобластом и менингиом следует отнести увеличение, хотя и разноуровневое, содержания VEGF-A, VEGF-R1, VEGF-C, IFR-1, IFR-2 и показателя соотношения VEGF-C/VEGF-R3. Различия заключались в том, что в доброкачественной опухоли не обнаруживалось увеличение уровня VEGF-R3 и TGF- β 1, а содержание EGF и показатель соотношения VEGF-A/VEGF-R1, в отличие от значений в злокачественных новообразованиях, были ниже контрольных величин.

Агрессивность злокачественных новообразований головного мозга связана не только с биологической природой опухоли, поддерживающей множественные генетические и эпигенетические изменения, но и с последствиями аномальных сигналов, обусловленных факторами роста (Nana A.W., Yang P.M., Lin H.Y., 2015).

Известно, что VEGF экспрессируются преимущественно опухолевыми клетками и в меньшей степени – клетками окружающих тканей глиом (Miletic H. et al., 2009). Известны исследования, посвященные изучению VEGF в ткани менингиом (Nassehi D., 2013; Lee S.H., Lee Y.S., Hong Y.G., Kang C.S., 2014). Однако относительно менингиом исследователи сходятся во мнении, что увеличение уровня VEGF-A в ткани определяет выраженность перитуморального отека: чем выше содержание фактора роста, тем больше отек.

В настоящем исследовании мы изучали ткань менингиом без сопровождающего перитуморального отека и обнаружили увеличение уровня VEGF-A и его растворимого рецептора VEGF-R, способного блокировать VEGF-A. Очевидно, что коэффициент VEGF-A/VEGF-R1 менингиом, сниженный относительно их интактной ткани и отражающий уровень свободного VEGF-A, показывает и отсутствие перитуморального отека.

Возникает вопрос, какие факторы роста участвуют в активации ангиогенеза при различных новообразованиях головного мозга. Процесс ангиогенеза, как биологический процесс, регулируется несколькими про- и антиангиогенными факторами, особенно фактором роста эндотелия сосудов, фактором роста фибробластов, эпидермальным фактором роста, фактором, индуцируемым гипоксией 1, и трансформирующим фактором роста.

Эндотелиальные клетки, предназначенные для образования сосудов, оснащены рецепторами этих ангиогенных пептидов (Jensen R., Lee J., 2012; Gacche R.N., Meshram R.J., 2014). Считается, что индукторами VEGF как в норме, так и патологии могут выступать также IGF (Ferrara N., Gerber H.P., LeCouter J., 2003; Nijaguna M.B., Patil V., Urbach S. et al., 2015).

В ткани глиобластом сильная положительная корреляционная связь уровня VEGF-A прослеживалась с содержанием EGF ($r=77$; $p<0,01$), IGF-I ($r=76$; $p<0,01$), IGF-II ($r=79$; $p<0,01$) и TGF- β 1 ($r=83$; $p<0,01$). Практически то же найдено и в ткани перифокальной зоны глиобластом, в которой сильная положительная корреляционная связь уровня VEGF-A прослеживалась с содержанием тех же факторов роста: EGF ($r=75$; $p<0,01$), IGF-I ($r=77$; $p<0,01$), IGF-II ($r=74$; $p<0,01$) и TGF- β 1 ($r=80$; $p<0,01$).

В ткани менингиом уровень VEGF-A коррелировал только с содержанием инсулиноподобных факторов роста: с IGF-I и IGF-II обнаружена сильная положительная связь ($r=76$; $p<0,01$ и $r=81$; $p<0,01$ соответственно). Не найдено корреляций с уровнем EGF и TGF- β 1. Известно, что подсемейство TGF- β , в частности, избыточно экспрессируется в некоторых видах глиобластом, которые проявляют агрессивные фенотипы (Nana A.W., Yang P.M., Lin H.Y., 2015), что тоже объясняет сниженный уровень эпидермального фактора роста в ткани менингиом. Вместе с тем имеются данные, что высокий уровень IGF-II обеспечивает рост опухоли при менингиомах (Nordqvist A.C., Mathiesen T., 2002).

Функции фактора роста эндотелия сосудов C (VEGF-C) и рецептора VEGFR-3 в нервной системе окончательно не выяснены (Bhuiyan M.I., Kim J.C., Hwang S.N. et al., 2015; Shin Y.J. et al., 2015).

Показано, что избыточная экспрессия VEGF-C и металлопротеиназы-1 может быть независимым неблагоприятным прогностическим фактором для глиом, указывая на неблагоприятный исход болезни (Xu Y. et al., 2013), и также VEGF-C и -D могут выступать в качестве альтернативных проангиогенных факторов при анти-VEGF терапии (Grau S. et al., 2011).

В нашем исследовании наибольший уровень VEGF-C обнаруживался в ткани глиобластом, затем следовала ткань метастатических опухолей, VEGF-R3 (в убывающем порядке) – в ткани менингиом, перифокальной зоны глиальных опухолей высокой степени злокачественности, однако во всех этих образцах содержание исследуемого фактора значимо превосходило значения в интактной ткани мозга. Уровень VEGF-R3 был повышен только в ткани глиобластом, тогда как в ткани перитуморальных зон злокачественных новообразований мозга этот показатель был ниже значений в интактной ткани. Вместе с тем соотношение VEGF-C/VEGF-R3 было повышенным во всех исследованных образцах.

Возможно, в повышение количества VEGF-C могут быть вовлечены глиальные реакции с помощью паракринных или аутокринных механизмов, связанных с ишемией ткани (Shin Y.J., Choi J.S., Lee J.Y. et al., 2011). Однако это утверждение требует дальнейшего исследования.

7.2 Роль гормональных факторов в развитии глиальных опухолей высокой степени злокачественности

Наличие ферментов, ответственных за синтез нейростероидов, выявлено в ткани мозга как в эмбриональный период развития организма, так и во взрослом возрасте (Schumacher M., Robel P., Baulieu E.E., 1996). Кроме того, получено значительное количество данных о наличии в клетках мозга рецепторов к стероидным гормонам. В разные периоды жизни влияние, оказываемое стероидами на нервные клетки, может менять морфофункциональное состояние головного мозга и проявляется в изменении миелинизации, нейронного роста, дифференцировании нервных клеток (Бабичев В.Н., 2005; Демидова О.В., Рыжавский Б.Я., 2013; Baulieu E.E., 1997).

Результаты исследования стероидных и пептидных гормонов в ткани опухолей различного генеза и их перифокальной зоне показаны в таблице 7.2. Ткань перифокальной зоны менингиом представляет собой интактную ткань головного мозга, поэтому в настоящем исследовании показатели концентрации гормонов в ней использовались как условная норма (для сравнения со значениями в остальных исследуемых образцах).

Для опухолевой ткани мозга оказалось характерным повышение уровня кортизола и АКТГ: в глиобластомах – в 5,3 и 2,5 раза, в менингиомах – в 4,0 и 3,3 раза, соответственно по сравнению с перифокальной зоной. Кроме того, в опухолях различного генеза установлено повышение насыщенности пролактином и СТГ: в глиобластомах – в 2,4 и 27,0 раза, а в менингиомах – в 9,1 и 116,7 раза соответственно по сравнению с перифокальной зоной. Что касается стероидных гормонов, то повышение уровней свободного тестостерона и эстриола отмечено в менингиомах – в 1,6 раза (таблица 7.2).

Таблица 7.2 – Уровни стероидных и пептидных гормонов в опухолевой и перифокальной зоне головного мозга

Показатель	Исследуемая ткань			
	Менингиома		Глиальная опухоль высокой степени злокачественности	
	перифокальная зона	опухоль	опухоль	перифокальная зона
Кортизол	19,3±1,1	76,5±4,5 ¹	102,7±7,3 ¹	98,7±4,1 ¹
АКТГ	14,2±0,9	46,6±2,1 ¹	34,9±2,5 ¹	28,4±1,7 ¹
Пролактин	2,6±0,14	23,62±1,1 ¹	6,3±0,4 ¹	4,48±0,2 ¹
СТГ	0,52±0,04	60,7±2,7 ¹	14,3±1,0 ¹	12,8±1,1 ¹
Тестостерон своб.	1,7±0,11	2,7±0,19 ¹	1,9±0,14	1,75±0,17
Эстрон	256,1±19,0	228,6±15,0	246,7±20,0	243,1±19,0
Эстрадиол	1,5±0,1	1,6±0,12	1,7±0,14	1,55±0,13
Эстриол	30,1±2,8	46,6±3,2 ¹	24,3±1,8	28,4±2,1
Прогестерон	9,6±0,7	0,76±0,45 ¹	1,2±0,1 ¹	10,8±0,9
ССГ	5,9±0,42	33,8±2,7 ¹	27,6±1,8 ¹	15,1±1,2 ¹
Кортизол / АКТГ	1,4±0,12	1,6±0,14	2,9±0,18 ¹	3,5±0,2 ¹

Примечание. 1 – достоверно по отношению к перифокальной зоне менингиомы (p<0,05)

Во всех опухолях вне зависимости от генеза выявлено снижение уровня прогестерона в 8,0–12,6 раза. Кроме того, установлено повышение уровня ССГ в опухолевой ткани в 3,2–5,7 раза по сравнению с перифокальной зоной. В исследовании не выявлено изменения насыщенности опухоли эстрадиолом.

В перифокальной зоне первичной глиобластомы уровень кортизола оказался повышен в 5,1 раза, АКТГ – в 2,0 раза, пролактина – в 1,7 раза, а СТГ – в 24,6 раза. При этом насыщенность перифокальной зоны стероидными гормонами не отличалась от условно интактной ткани, несмотря на повышенный в 2,6 раза уровень ССГ.

Для глиобластомы оказалась характерной идентичность опухолевой ткани и ткани перифокальной зоны по уровню кортизола, что не отмечают при опухолях другого генеза. Известно, что кортизол может не только синтезироваться нервными клетками, но и проникать через гематоэнцефалический барьер. Рецепторы кортикостероидов в структурах мозга осуществляют контроль функции гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы. Кортикостероиды через свои рецепторы осуществляют процессы тонкого регулирования адаптивных реакций на клеточном и системном уровнях (Берштейн Л.М., 2004).

Регуляцию локального синтеза, а возможно, еще и захват из крови кортизола осуществляет АКТГ. В случае глиобластом и их перифокальных зон соотношение кортизола и АКТГ превышало норму в 2,1–2,5 раза.

Кортикостероиды посредством ядерных и мембранных рецепторов способны оказывать как длительные продолжительные эффекты, регулируя экспрессию генов, так и быстрые негеномные эффекты, изменяя электрические свойства и проницаемость мембран (Сашков В.А., 2009). Возможно, повышенный синтез и / или захват кортизола нервными клетками является одним из факторов патогенеза глиобластом, так как стероиды надпочечников – ведущие стресс-реализующие компоненты, участвующие в адаптации организма к различным внешним и внутренним раздражителям.

В менингиомах обнаружены высокие концентрации кортизола, АКТГ, пролактина, СТГ, тестостерона и ССГ, а также низкий уровень прогестерона. В

настоящем исследовании менингиомы оказались «лидерами» по продукции пролактина и СТГ, а также эстриола – эстрогена с достаточно низкой активностью. Однако изменения гормонального фона менингиом являются локальными, изолированными от остальных тканей головного мозга. Вероятно, исследованные гормоны непосредственно в менингиомах являются неспецифическими факторами, стимулирующими пролиферацию. Очевидно, что для получения опухолью злокачественного потенциала необходимы дополнительные факторы, приводящие к необратимым изменениям и затрагивающие перифокальную зону доброкачественной опухоли.

7.3 Система регуляции плазминогена

Активность сериновых протеиназ и ингибиторов в перифокальной зоне дает информацию об изменении экстрацеллюлярного матрикса под влиянием опухоли и состоянии эндогенной защиты. Активаторы плазминогена являются сериновыми протеиназами, которые в норме осуществляют saniрующие функции, участвуют в росте, ремоделировании ткани, адаптационных реакциях и воспалении. При злокачественных процессах с урокиназой (uPA) и ее ингибитором-1 (PAI-1) связывают прогрессию опухолей и неоваскуляризацию (Witzel I., Milde-Langosch K., Schmidt M. et al., 2014; McMahon B.J., Kwaan H.C., 2015; Pasupuleti N., Grodzki A.C., Gorin F., 2015). Доказано участие регуляторов плазминогена в процессах деструкции базальной мембраны, внеклеточного матрикса и инвазии злокачественных клеток при многих локализациях неоплазии (Asuthkar S., Stepanova V., Lebedeva T. et al., 2013; Witzel I., Milde-Langosch K., Schmidt M. et al., 2014; Gong L., Liu M., Zeng T. et al., 2015), однако их роль и взаимодействие в различных видах опухолей головного мозга изучены недостаточно. Протеолитический каскад активации плазминогена нацелен, главным образом, на деградацию фибрина, тем не менее он играет важную роль в метаболизме мозга млекопитающих, где идет постоянный синтез его компонентов, как важных модуляторов выживаемости нейронов и сохранения их функций (Ortolano S., Spuch C., 2013). Особое значение в этих процессах придается тканевому активатору плазминогена (tPA). Сообщалось также о

непосредственной и опосредованной активной роли tPA в повышении проницаемости гематоэнцефалического барьера (Niego B., Medcalf R.L., 2014; Ma L., Zhang H., Liu Y.Z. et al., 2016).

Доброкачественные менингиомы, взятые для изучения, не имели перифокального отека, поэтому в качестве перифокальной зоны исследована гистологически неизменная ткань, окружавшая менингиому. Эта ткань рассматривалась нами как неповрежденная, или условно интактная. Установлено, что в менингиоме содержание uPA-АГ и uPA-акт было выше, чем в окружающей ее (перифокальной) ткани в 1,7 и 2,1 раза (таблица 7.3). Количество обеих форм tPA, наоборот, в очаге менингиомы достоверно снижено в 3,9 и 1,8 раза соответственно. Антигенная форма PAI-1 в менингиоме была ниже, чем в ее перифокальной ткани в 2,5 раза, а его активная форма имела четкую тенденцию к повышению. Приведенные результаты позволяют считать, что метаболизм активаторов плазминогена и их ингибитора PAI-1 в очаге доброкачественной менингиомы отличается от гистологически неизменной ткани. Математическое соотношение взаимодействующих компонентов подтвердило это предположение.

Так, в очаге менингиомы показатели равновесия uPA-АГ/uPA-акт и tPA-АГ/tPA-акт ниже, чем в гистологически неизменной ткани на 24,2% и в 2,2 раза, а PAI-1-АГ/PAI-1-акт – в 3 раза (таблица 7.3). Вероятно, PAI-1 не может являться продуктом метаболизма доброкачественной менингиомы, так как его антигенная форма в опухоли истощена. С другой стороны, в той же менингиоме активности PAI-1 вполне достаточно для блокирования tPA, но недостаточно для блокирования uPA. Коэффициент взаимодействия PAI-1-акт/uPA-акт в менингиоме ниже, чем в окружающей ткани в 1,8 раза, а коэффициент PAI-1-акт/tPA-акт – выше в 2,1 раза (таблица 7.3).

В настоящем исследовании в ткани менингиомы преобладает образование только обеих форм урокиназы, которая известна своим влиянием на плазминоген, способностью усиливать процессы клеточной пролиферации и ремоделирования тканей. J. Kandenwein et al. в 2015 г. предложили использовать PAI-1 и uPA как прогностические маркеры менингиом.

В тканях глиом высокой степени злокачественности метаболические процессы с участием урокиназы проходят активнее, чем с участием тромбокиназы (таблица 7.3).

Таблица 7.3 – Система регуляции плазминогена а различных опухолях головного мозга

Показатель	Исследуемая ткань			
	глиальная опухоль высокой степени злокачественности		менингиома	
	опухоль	периф. зона	опухоль	периф. зона
uPA-АГ, нг/г тк	33,27±2,5 ¹	29,1±2,2 ¹	17,13±1,3 ¹	10,06±0,8
uPA-акт, ед/г тк	0,194±0,02 ¹	0,98±0,007 ¹	0,300±0,02 ¹	0,142±0,01
tPA-АГ, нг/г тк	22,50±1,9 ²	17,58±1,3 ¹	6,033±0,5 ¹	23,25±1,8
tPA-акт, ед/г тк	1,738±0,1 ¹	1,992±0,2 ¹	4,195±0,3 ¹	7,403±0,6
РАI-1-АГ, нг/г тк	509,5±38,3 ^{1,2}	230,4±17,6 ¹	19,05±1,5 ¹	48,12±3,7
РАI-1-акт, ед/г тк	21,44±1,6 ^{1,2}	8,90±0,7 ¹	7,233±0,6 ^{1(p=0,05)}	6,100±0,5
Расчетные коэффициенты соотношений				
uPA-АГ/uPA-акт	172±13,1 ^{1,2}	297±22,3 ¹	57,1±4,4 ¹	70,9±5,4
tPA-АГ/tPA-акт	13,0±1,1 ^{1,2}	8,8±0,6 ¹	1,4±0,1 ¹	3,1±0,2
РАI-1-акт/uPA-акт	111±9,3 ^{1,2(p<0,05)}	90,8±6,9 ¹	24,1±1,8 ¹	43,0±3,2
РАI-1-акт/tPA-акт	12,3±1,1 ^{1,2}	4,5±0,3 ¹	1,7±0,1 ¹	0,8±0,06
РАI-1-АГ/РАI-1-акт	23,8±2,1 ¹	25,9±1,9 ¹	2,6±0,2 ¹	7,9±0,5

Примечание. 1 – различия достоверны по отношению к ткани менингиом; 2 – различия достоверны относительно ткани перифокальной зоны опухоли ($p<0,05$ во всех случаях, если в таблице не указано иначе); периф. зона – перифокальная зона опухоли

В глиомах достоверно повышено содержание uPA-АГ и uPA-акт, но, несмотря на это, коэффициент uPA-АГ/uPA-акт был значительно повышен только в глиобластоме и ее перифокальной зоне.

Коэффициент tPA-АГ/tPA-акт в глиобластомах был повышен на порядок в сравнении с менингиомой, соответствующий коэффициент перифокальной зоны глиобластомы был повышен в 2,8 раза по сравнению с перифокальной зоной менингиомы (таблица 7.3). Ингибитор РАI-1 во всех злокачественных тканях содержался в достоверно повышенном количестве относительно условно

нормальной ткани, окружающей менингиому, и относительно самой менингиомы также (таблица 7.3).

Проведенные исследования (Roomi M.W., Kalinovsky T., Niedzwiecki A., Rath M., 2014; McMahon B.J., Kwaan H.C., 2015; Pasupuleti N., Grodzki A.C., Gorin F., 2015; Ryu J., Yoon N.A., Lee Y.K. et al., 2015) доказывают, что повышенный уровень активаторов плазминогена и PAI-1 в злокачественных опухолях, в том числе злокачественных опухолях головного мозга, коррелирует с ее прогрессией, генерализацией и снижением сроков выживаемости пациентов. M.W. Roomi et al. (2014) в эксперименте воздействовали питательной смесью, содержащей ингибитор uPA, на культивированные клетки глиобластомы человека и получили дозозависимое торможение ее роста. В клинических исследованиях эти же авторы обнаружили корреляцию повышенного уровня uPA с прогрессией глиобластомы и сокращением сроков выживаемости пациентов. N. Pasupuleti et al. (2015) показана программируемая гибель высокодифференцированных клеток глиомы после контакта с противоопухолевыми малыми молекулами класса UCD38B. Причиной цитотоксичности молекул UCD38B оказалось принудительное перемещение эндосом, содержащих uPA, растворимый uPAR и PAI-1 в большом количестве, в перинуклеарное пространство, что приводило к AIF-опосредованной некротической гибели клеток. J. Ryu et al. (2015) обнаружили прекращение роста и инвазии клеток глиомы человека после подавления uPA и uPAR. В трудах, посвященных исследованию регуляции плазминогена при злокачественных новообразованиях, делается акцент на важной роли uPA и PAI-1 в их прогрессии, в том числе при злокачественных глиомах.

Значимое увеличение uPA во всех исследованных нами образцах опухолей и достоверные различия между злокачественными и доброкачественными опухолями по uPA и PAI-1 согласуются с имеющимися данными других исследователей. Очевидно, что во всех исследованных образцах опухолевой ткани усилено образование uPA-акт при повышенном содержании uPA-АГ. Однако в

первичных злокачественных глиомах uPA-акт в 1,6 раза меньше, чем в доброкачественных менингиомах. Резко повышенное количество PAI-1 во всех образцах злокачественных опухолей и их перифокальной зоны (с преобладанием в опухолях) (таблица 7.3) свидетельствует не только об участии ингибитора в злокачественной трансформации и ее прогрессии, но и о наличии в первичных и вторичных новообразованиях опухоль-ассоциированного PAI-1. Ранее был описан дисбаланс между тканевыми серпинами, а также между серпинами и активаторами плазминогена при аденокарциноме толстой кишки (Кит О.И., Франциянц Е.М., Козлова Л.С., Терпугов А.Л., 2014; Kit O.I., Frantsiyants E.M., Nikipelova E.A. et al., 2015) и в ликворе больных со злокачественной глиомой головного мозга (Козлова Л.С., Франциянц Е.М., Атмачиди Д.П., Горбунова Т.А., 2014). Значительный избыток серпинов ткани и ликвора не был связан с улучшением состояния больных, а значения серпинов, близкие к норме, встречались только у пациентов с благополучным течением послеоперационного периода. В менингиомах не только не наблюдали увеличения PAI-1-АГ, но и регистрировали усиленный его переход в PAI-1-акт с развитием дефицита предшественника и расценивали это как типичную защитную реакцию.

В отношении участия tPA в повреждении ткани исследователи (Simard B., Bouamrani A., Jourdes P. et al., 2011) не имеют общего мнения, так как одни считают, что tPA оказывает защитное действие, другие (Jiang W.G., Sanders A.J., Katoh M. et al., 2015; Schuliga M., 2015; Ma L., Zhang H., Liu Y.Z. et al., 2016) приводят весомые доказательства его непосредственного и опосредованного участия в развитии онкологической патологии. Наши результаты показали преобладание антигенной формы tPA в тканях первичных злокачественных глиом против доброкачественных менингиом и низкое содержание его активной формы (таблица 7.3). Имеющиеся данные могут служить достаточным основанием для предположения, что на территории злокачественной опухоли переход tPA-АГ в активную форму затруднен из-за токсического влияния опухоли и/или иных механизмов активации.

Напротив, в менингиомах и окружающей их гистологически неизменной ткани содержание tPA-акт было высоким, а содержание tPA-АГ было снижено только в самой опухоли. В доброкачественных менингиомах процесс активации протромбокиназы, содержащейся в ткани опухоли, в тромбокиназу проходил с настолько высокой активностью, что наблюдалось истощение профермента и снижение его соотношения с активной формой (таблица 7.3). Напрашивается вывод, что доброкачественная менингиома не содержит tPA в качестве собственного метаболита или его количество в опухоли недостаточно для выделения в окружающую среду.

Таким образом, проведенное исследование доказывает непосредственное участие сериновой протеиназы uPA и ее ингибитора PAI-1 в метаболизме злокачественных глиом. Оба компонента, скорее всего, являются собственными метаболитами первичных злокачественных опухолей с последующим перераспределением фракции uPA-АГ в перифокальную область.

7.4 Способ дифференциальной диагностики доброкачественных и злокачественных опухолей головного мозга

При развитии злокачественной опухоли в организме активизируется эндогенный протеолиз (Fröhlich E., 2004; Wolf K. et al., 2007). Злокачественные опухоли также выделяют в окружающую среду свои метаболиты, в их числе огромный перечень протеолитических ферментов, которые оказывают токсическое влияние на белки и клетки организма-носителя. Активность ферментов, синтезируемых и секретируемых злокачественной опухолью, в большинстве случаев не контролируется эндогенными ингибиторами (Зорин Н.А. и соавт., 2004; Wolf K. et al., 2007).

Ранее был выявлен факт активации протеиназ трипсинового типа при злокачественных новообразованиях (Франциянц Е.М. и соавт., 2012; 2013; Маслов А.А. и соавт., 2014).

Способ осуществлялся следующим образом. За 3 дня до операции у больного проводилось взятие крови в стандартную пробирку с 3,8%-ным

цитратом натрия (голубая крышка) в соотношении 9:1 для получения цитратной плазмы крови. Цитратную кровь центрифугировали, получали цитратную плазму и использовали ее для определения общей активности трипсиноподобных протеиназ в тот же день. Определение проводили унифицированным кинетическим методом.

Кинетический метод определения общей БАЭЭ-эстеразной активности трипсиноподобных протеиназ (АТП) (Пасхина Т.С., 1987) заключается в следующем. Отбирают 30 мкл цельной плазмы крови, доводят до 2,0 мл 0,05 М трис-НСl буфером рН 8,0, туда же вносят раствор низкомолекулярного синтетического субстрата N- α -бензоил-L-аргинина этилового эфира (БАЭЭ) в том же буфере и регистрируют реакцию его гидролиза протеиназами сыворотки (плазмы) крови на спектрофотометре в течение 30 минут при длине волны 253 нанометра против контроля на реактивы, не содержащего плазмы крови. Расчет результата проводится по формуле, указанной в описании метода, в миллиэстеразных единицах на 1 мл исследуемой жидкости за 1 минуту реакции: мЕ/мл по системе СИ. Одна миллиэстеразная единица соответствует гидролизу 1 мкмоль субстрата БАЭЭ за 1 минуту. Статистическую обработку цифровых данных проводили при помощи пакета сертифицированных прикладных программ Statistica v. 10. Достоверность различий между количественными показателями вычисляли с помощью t-критерия Стьюдента. Определение не требует высокой квалификации персонала и длительного времени. Для проведения анализа требуется 35–40 минут и обычное лабораторное оборудование. Разработанная нами методика была валидирована на 24 пациентах с глиальными опухолями высокой степени злокачественности и на 13 больных с менингиомами (таблица 7.4).

Таблица 7.4 – Активность трипсиноподобных протеиназ в плазме крови больных, имеющих новообразования головного мозга

Показатель	Менингиомы, n=13	Глиальные опухоли высокой степени злокачественности, n=24
АТП мЕ/мл ($M \pm T$)	333,0 $\pm$ 27,1	1331,0 $\pm$ 102,4 ¹

Примечание: ¹ – различия достоверны, относительно данных группы ($p < 0,01$)

Ретроспективный анализ позволил сделать вывод: регистрируемая до операции величина активности трипсиноподобных протеиназ (АТП) плазмы крови у больных, имеющих новообразования головного мозга, во всех случаях совпала с результатами гистологического анализа, полученного после изучения операционного материала. Величина АТП, находящаяся в пределах нормативных значений, указывает на неагрессивную (доброкачественную) природу новообразования головного мозга (подтверждено гистологическими заключениями). Значение АТП от 1228,6 до 1443,4 мЕ/мл свидетельствует о том, что новообразование является первичным злокачественным, что подтверждено гистологическими анализами операционного материала.

Глава 8

**РАЗРАБОТКА МОДЕЛЬНЫХ СИСТЕМ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ГЛИОМ
ДЛЯ ДОКЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ****8.1 Экспериментальное моделирование нейроэпителиальных опухолей
*in vitro*****Получение первичных клеточных линий глиальных опухолей**

Культуральные методы, а именно эксперименты на опухолевых клеточных линиях *in vitro*, являются неотъемлемой частью в исследовании опухолей и обеспечивают фундаментальное понимание биологии заболевания. В настоящее время, существует несколько коммерчески доступных перевиваемых линий клеток глиобластомы, часть из них являются онкогенными у иммунодефицитных грызунов (Hasselbach L.A., Irtenkauf S.M., Lemke N.W. et al., 2014). Однако наибольший интерес вызывают первичные опухолевые клеточные линии, то есть полученные непосредственно из тканей человека или животных. Они имеют ограниченный срок жизни – 8–10 пассажей, благодаря чему сохраняется большая гетерогенность общего клеточного пула опухоли (Caragher S., Chalmers A.J., Gomez-Roman N., 2019). В настоящее время нет единого мнения об идеальных средах для роста первичных опухолей. Огромный спектр используемых условий значительно затрудняет сравнение исследований, усугубляя и без того сложную гетерогенность глиом (Pítia Flores Ledur, Giovana Ravizzoni Onzi, Hui Zong, Guido Lenz, 2017).

В последнее время были разработаны новые модели *in vitro*, такие как трехмерные культуры клеток, тканевая инженерия, биоматериалы, микрофлюидика, что позволяет включать в культуры различные типы клеток и компоненты внеклеточного матрикса, а также контролировать пространственное и временное введение растворимых факторов (Katt M.E. et al., 2016).

Однако, помимо использования этих моделей высокой сложности, можно дополнительно изучить более простые концепции и идеи клеточных культур, чтобы избежать неправильной интерпретации результатов, что имеет решающее

значение при скрининге новых препаратов. Один из вопросов для обсуждения – это питательная среда, используемая в тестах. Поскольку все проверки препаратов зависят от этапа *in vitro* перед переходом к анализу *in vivo*, а затем к клиническим испытаниям (Ocana A., Pandiella A., Siu L.L., Tannock I.F., 2010), среда, в которой содержатся клетки, может играть ключевую роль в выборе лекарств, которые будут использоваться в доклинических условиях для клинической разработки. Недавно было показано, что клетки из модели ГБМ при культивировании в среде, подходящей для этого типа клеток, были более устойчивы к темозоломиду, чем те же клетки, культивируемые в среде NSC (бессывороточная среда, для культивирования нейрональных плюрипотентных стволовых клеток) (Ledur P.F., Liu C., He H. et al., 2016). Кроме того, выращивание этих клеток в среде NSC, содержащей EGF и FGF-2, увеличивало экспрессию и передачу сигналов EGFR, а также приобретенную чувствительность к селективным ингибиторам EGFR. Важно отметить, что эта модель напоминает пронеуральный подтип ГБМ и что опухоли с другими молекулярными профилями могут давать разные ответы.

Аналогичная тенденция наблюдалась в линии ГБМ человека, являющейся более гетерогенной и сложной, чем генетическая модель, и, возможно, состоящей из субпопуляций клеток, которые экспрессируют разные рецепторные тирозинкиназы (РТК) или даже более одной РТК одновременно (Szerlip N.J., Pedraza A., Chakravarty D. et al., 2012), что может привести к различным сценариям. Также важно подчеркнуть, что не существует простого теста для определения того, какое состояние вызывает ответы, более похожие на реакцию опухоли, но тот факт, что разные условия роста приводят к разным фармакологическим результатам, предполагает, что клетки с этими условиями или пластичностью для их адаптации присутствуют и потенциально могут быть в опухоли (Szerlip N.J., Pedraza A., Chakravarty D. et al., 2012). В связи с этим, стоит еще раз подчеркнуть важность подбора условий роста первичных клеточных линий *in vitro*, для сохранения клеточной гетерогенности, присущей первичной опухоли.

Еще одной проблемой при создании первичных клеточных линий является характерное для низкодифференцированных глиальных опухолей (глиобластома) выраженное некротизирование опухолевой ткани (Мацко Д.Е., 2015). Из-за ограниченного количества или полного отсутствия жизнеспособных клеток перевод ткани послеоперационного материала в первичную культуру не всегда является возможным.

В настоящее время стандартно в хирургии глиальных опухолей высокой степени злокачественности применяется метаболическая флуоресцентная диагностика с использованием 5-аминолевуленовой кислоты (5-АЛК) (Ковалев Г.И., Кочарян В.Э., Музлаев Г.Г., 2016). 5-АЛК является эндогенным соединением, одним из промежуточных продуктов синтеза гема (Якубовская Р.И., Панкратов А.А., Филоненко Е.В. и соавт., 2018). Известно, что введение в организм 5-АЛК в избыточных количествах вызывает увеличение образования протопорфирина IX (ППІХ). В здоровых тканях ППІХ быстро перерабатывается в гем под действием фермента феррохелатазы (Stepp H., Baumgartner R., Beyer W. et al., 1995; Geavlete B. et al., 2008). В опухолевых клетках, напротив, существует дефицит феррохелатазы, приводящий к значительному повышению уровня ППІХ в них в течение нескольких часов. В итоге флуоресцентный контраст между опухолевой и окружающей условно-нормальной тканью увеличивается в 10–15 раз (Kennedy J.C., Pottier R.H., 1994). Флуоресценция визуализируется в красной области спектра с максимумом длины волны на 635 нм, что помогает обнаруживать опухоль и уточнять границы ее распространенности (Филоненко Е.В., Гришаева А.Б., 2011).

Постоянные (иммортиализованные) клеточные линии являются удобным инструментом в нейронкологии, так как они имеют неограниченный потенциал деления, что позволяет получать необходимое для эксперимента количество клеток и стандартизировать получаемые на данных культурах клеток результаты. Однако последние исследования указывают на утрату гетерогенности опухолевых клеток из-за большого количества пассажей, что затрудняет экстраполяцию полученных данных на каждый отдельный клинический случай (Межевова И.В.,

Ситковская А.О., Росторгуев Э.Е. и соавт., 2019). В связи с этим, актуальность использования постоянных клеточных линий при персонализированном подходе в лечении злокачественных опухолей является сомнительной. Решение данной проблемы было найдено в использовании первичных клеточных культур, полученных из нативного опухолевого материала больного.

Нами проведено изучение эффективности применения 5-АЛК для получения жизнеспособной ткани глиальных опухолей, подбор условий среды культивирования для полученных из опухолевой ткани клеток и оценка генетической стабильности первичных клеточных линий глиальных опухолей в течение нескольких пассажей.

В результате исследования нами было получено 26 первичных клеточных линий нейроэпителиальных опухолей мозга. В таблице 8.1 представлена информация по полученным первичным линиям глиальных опухолей.

Опухолевый материал для создания первичных клеточных линий был получен от больных разного возраста. Так, в нашей выборке частота встречаемости глиальных опухолей разной степени злокачественности у больных в возрасте 20–29 лет и 70–79 лет была 7,7%; на долю больных в промежутке от 30 до 39 лет приходилось 19,2% случаев; немного меньше доля больных составляла в возрасте 50–59 лет (15,4%). Самые высокие уровни встречаемости глиальных опухолей у больных в нашей выборке были в возрасте 40–49 лет (26,9%) и 60–69 лет (23,1%) (таблица 8.1).

Гистологически верифицированы следующие типы опухолей: глиобластома (50,1%), глиобластома на фоне анапластической астроцитомы (7,7%), анапластическая астроцитома (19,2%), анапластическая олигодендроглиома (3,8%), диффузная астроцитома (15,4%), олигоастроцитома (3,8%) (таблица 8.1).

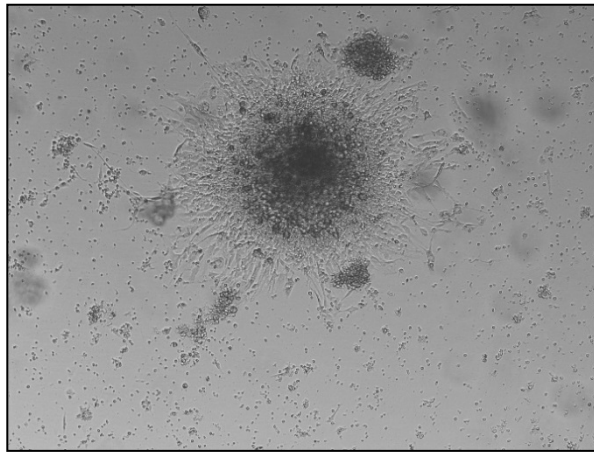
После разделения ткани опухоли на эксплантаты, их прикрепление ко дну культурального флакона осуществлялось в течение суток. Далее по дну флакона происходило радиальное расхождение клеток от эксплантата (рисунок 8.1А). Также наблюдали ошаренные клетки, напоминающие вид поврежденных

адгерентных клеток при переходе в состояние аноикиса. Однако впоследствии через 1–2 суток они прикреплялись и распластывались (рисунок 8.1Б).

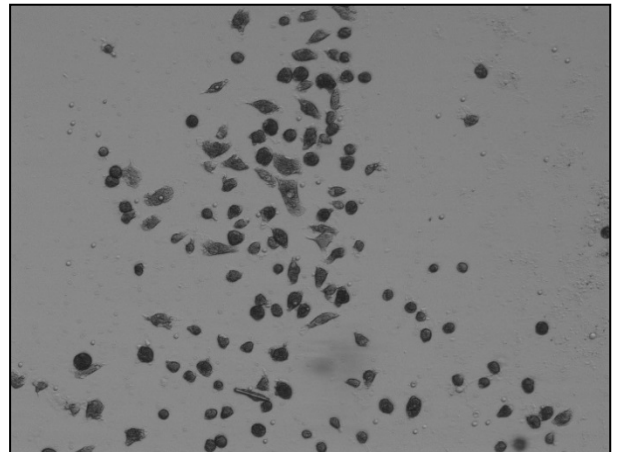
Таблица 8.1 – Характеристика первичных клеточных линий глиальных опухолей

№ п/п	Код образца	Возраст, лет	Пол	Гистологическая верификация	Стадия
1	RRIO-GT-01	52	женский	Диффузная астроцитома	GII
2	RRIO-GT-02	45	женский	Анапластическая астроцитома	GIII
3	RRIO-GT-03	60	мужской	Анапластическая олигодендроглиома	GIII
4	RRIO-GT-04	66	мужской	Глиобластома	GIV
5	RRIO-GT-05	64	женский	Глиобластома	GIV
6	RRIO-GT-06	47	мужской	Глиобластома	GIV
7	RRIO-GT-07	33	мужской	Глиобластома	GIV
8	RRIO-GT-08	22	мужской	Глиобластома на фоне анапластической астроцитомы	GIV
9	RRIO-GT-09	46	женский	Глиобластома на фоне анапластической астроцитомы	GIV
10	RRIO-GT-10	38	женский	Олигоастроцитома	GII
11	RRIO-GT-11	58	женский	Глиобластома	GIV
12	RRIO-GT-12	53	мужской	Глиобластома	GIV
13	RRIO-GT-13	39	мужской	Диффузная астроцитома	GII
14	RRIO-GT-14	74	мужской	Глиобластома	GIV
15	RRIO-GT-15	47	мужской	Глиобластома	GIV
16	RRIO-GT-16	48	женский	Диффузная астроцитома	GII
17	RRIO-GT-17	21	женский	Глиобластома	GIV
18	RRIO-GT-18	59	женский	Глиобластома	GIV
19	RRIO-GT-19	46	женский	Анапластическая астроцитома	GIII
20	RRIO-GT-20	68	мужской	Глиобластома	GIV
21	RRIO-GT-21	37	мужской	Диффузная астроцитома	GII
22	RRIO-GT-22	49	женский	Анапластическая астроцитома	GIII
23	RRIO-GT-23	77	мужской	Глиобластома	GIV
24	RRIO-GT-24	61	женский	Анапластическая астроцитома	GIII
25	RRIO-GT-25	62	мужской	Анапластическая астроцитома	GIII
26	RRIO-GT-26	36	мужской	Глиобластома	GIV

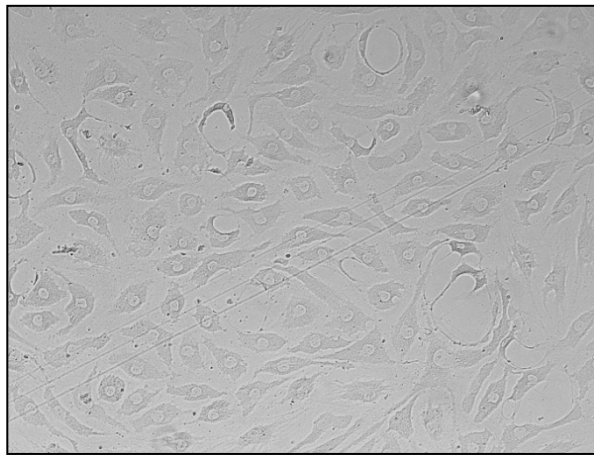
Примечание. G (WHO grade) – степень дифференцировки опухоли



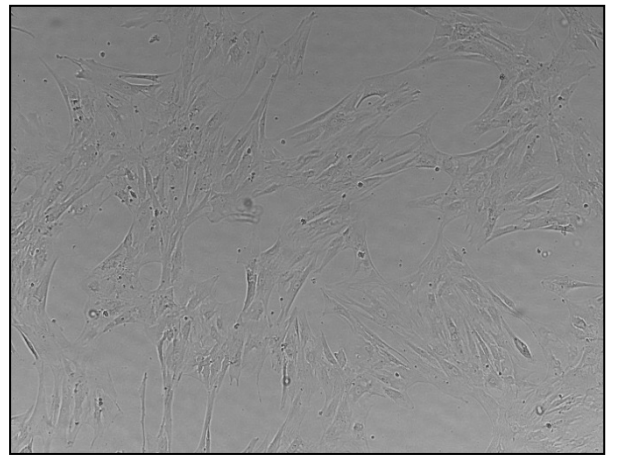
А



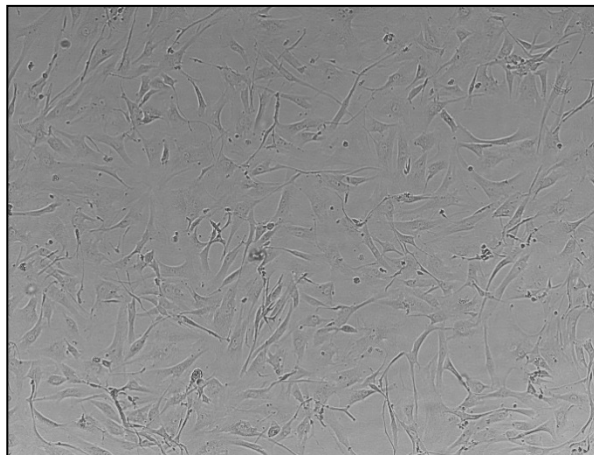
Б



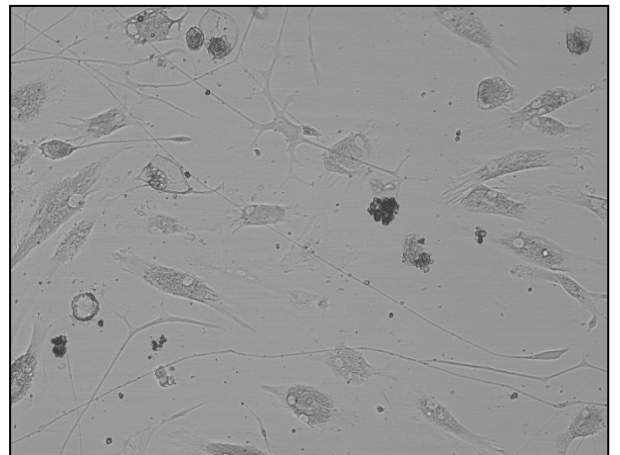
В



Г



Д



Е

Рисунок 8.1. Фото первичных клеточных линий на разных стадиях культивирования:

А – глиобластома, эксплантат, клетки только начинают радиально расплываться, 2-е сутки культивирования (Ув. $\times 7,5$); Б – анапластическая олигодендроглиома, прикрепляющиеся клетки, 13-е сутки культивирования (Ув. $\times 7,5$);

В – диффузная протоплазматическая астроцитомы, confluentный монослой из веретеновидных клеток, 66-е сутки культивирования (Ув. $\times 20$);

Г – глиобластома, confluentный монослой, фибробластоподобные клетки, 103-и сутки культивирования (Ув. $\times 7,5$); Д – диффузная астроцитомы, confluentный монослой, 138-е сутки культивирования (Ув. $\times 7,5$); Е – глиобластома, веретеновидные вакуолизованные клетки, клетки с отростками (Ув. $\times 15$)

В процессе культивирования менялась морфология клеток глиальных опухолей. При монослое со 100%-ной конфлюентностью, из-за плотного расположения клеток, они обретали веретеновидную форму без отростков (рисунок 8.1В). Напротив, при монослое с конфлюентностью от 10% до 90% наблюдали клетки богатые длинными отростками (рисунок 8.1Д, 8.1Е) и фибробластоподобные клетки (рисунок 8.1Г).

Культивирование диффузной астроцитомы в основном характеризовалось наличием клеток, образующих сеть на дне флакона. В культуре клеток анапластической астроцитомы при монослое с 30–50%-ной конфлюентностью визуализировали фибробластоподобные клетки, а при конфлюентности 100% происходило образование монослоя с интимно прилегающими клетками друг к другу.

При культивировании олигоастроцитомы наблюдали как фибробластоподобный характер роста, так и островки тесно переплетенных веретеновидных клеток. Аналогично этому выглядели клетки диффузной протоплазматической астроцитомы *in vitro*. Анапластическая олигодендроглиома в течение первых 7 суток культивирования была представлена преимущественно клетками округлой формы, которые впоследствии прикреплялись и активно пролиферировали (рисунок 8.2Б). При монослое с конфлюентностью 30–80% отмечали наличие фибробластоподобных клеток, а при 100% – плотно прилегающих друг к другу веретеновидных клеток.

В культурах глиобластом встречались клетки различной морфологии: веретеновидные, фибробластоподобные и клетки с длинными отростками, образующие сеть. Предположительно, различия в морфологии клеток глиобластомы связаны с гетерогенностью данного типа опухоли (Patel A.P., Tirosh I., Trombetta J.J. et al., 2014). Клеточные линии вторичной глиобластомы (на фоне анапластической астроцитомы) были представлены сетью клеток с длинными отростками, при этом одна из них в ходе культивирования на первом пассаже при монослое с конфлюентностью менее 80% была представлена преимущественно клетками полигональной формы с многочисленными

короткими отростками. А увеличение клеточной конfluenceности свыше 80% сопровождалось изменением характера роста на фибробластоподобный.

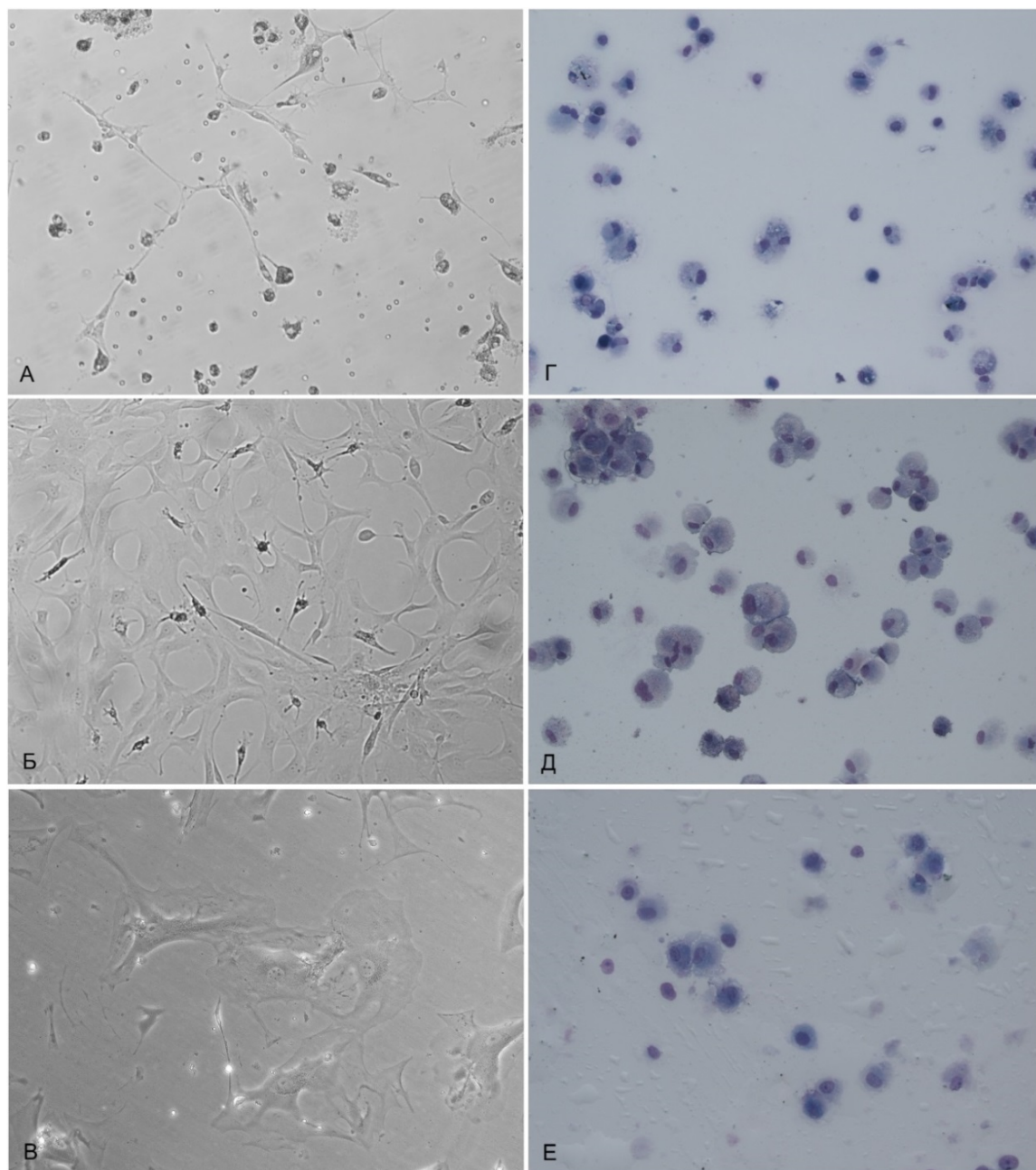


Рисунок 8.2. Культивирование клеток из эксплантатов опухолевой ткани глиом на нулевом, первом и восьмом пассажах. А – адгезия и распластывание клеток на поверхности культурального флакона, 2 сутки нулевой пассаж, Ув. $\times 100$; Б – субкультивирование первичной культуры глиом, первый пассаж, Ув. $\times 100$; В – субкультивирование первичной культуры глиом, восьмой пассаж, фазовый контраст, Ув. $\times 100$; Г – цитологический анализ, окрашивание азур-эозином, нулевой пассаж, Ув. $\times 200$; Д – цитологический анализ, окрашивание азур-эозином, первый пассаж, Ув. $\times 200$; Е – цитологический анализ, окрашивание азур-эозином, восьмой пассаж, Ув. $\times 200$

На нулевом пассаже скорость образования клетками монослоя со 100%-ной конfluenceнностью менялась от 22 до 85 суток, в среднем 46,3 суток (таблица 8.2).

Таблица 8.2 – Скорость образования монослоя первичных клеточных линий глиальных опухолей на нулевом и первом пассажах, сут.

№ п/п	Название клеточной линии	Гистологическая верификация	Время образования 100%-ного конфлюентного монослоя, сут.	
			на 0-м пассаже	на 1-м пассаже
1	RRIO-GT-01	Диффузная астроцитома	23	4
2	RRIO-GT-02	Анапластическая астроцитома	38	6
3	RRIO-GT-03	Анапластическая олигодендроглиома	24	7
4	RRIO-GT-04	Глиобластома	55	8
5	RRIO-GT-05	Глиобластома	42	5
6	RRIO-GT-06	Глиобластома	40	5
7	RRIO-GT-07	Глиобластома	70	5
8	RRIO-GT-08	Глиобластома на фоне анапластической астроцитомы	22	25
9	RRIO-GT-09	Глиобластома на фоне анапластической астроцитомы	23	14
10	RRIO-GT-10	Олигоастроцитома	53	5
11	RRIO-GT-11	Глиобластома	85	5
12	RRIO-GT-12	Глиобластома	64	5
13	RRIO-GT-13	Диффузная астроцитома	50	7
14	RRIO-GT-14	Глиобластома	53	5
15	RRIO-GT-15	Глиобластома	61	7
16	RRIO-GT-16	Диффузная астроцитома	29	5
17	RRIO-GT-17	Глиобластома	49	6
18	RRIO-GT-18	Глиобластома	55	6
19	RRIO-GT-19	Анапластическая астроцитома	50	8
20	RRIO-GT-20	Глиобластома	67	5
21	RRIO-GT-21	Диффузная астроцитома	38	4
22	RRIO-GT-22	Анапластическая астроцитома	35	9
23	RRIO-GT-23	Глиобластома	44	7
24	RRIO-GT-24	Анапластическая астроцитома	46	6
25	RRIO-GT-25	Анапластическая астроцитома	31	10
26	RRIO-GT-26	Глиобластома	58	5

Примечание. G (WHO grade) – степень дифференцировки согласно ВОЗ

Наибольший срок образования монослоя со 100%-ной конфлюентностью на нулевом пассаже был отмечен в образцах линии глиобластомы – в среднем 57,1 суток. Наименьшее время для достижения 100%-ной конфлюентности понадобилось клеткам, полученным из анапластической олигодендроглиомы (одна клеточная линия, 24 суток) и глиобластомы на фоне анапластической астроцитомы (в среднем 22,5 суток); у клеток диффузной астроцитомы в среднем это занимало 35 суток, а у анапластической астроцитомы – 40 суток. Олигоастроцитома была представлена в единичном образце и на нулевом пассаже образовала полный монослой за 53 суток.

На первом пассаже клетки достигали 100%-ного монослоя быстрее – в пределах от 4 до 25 суток, в среднем 7,1 суток, что показывает тенденцию к увеличению скорости пролиферации клеток в 6,5 раза (согласно разнице средних значений) при переходе с нулевого пассажа на первый. Это косвенно свидетельствует об эффективности подобранных условий культивирования первичных клеточных линий из биоматериала глиальных опухолей. Последнее имеет большое значение при создании банка первичных клеточных линий для последующего скрининга противоопухолевых агентов.

На полученных первичных клеточных линиях низкодифференцированных глиальных опухолей (анапластическая астроцитома, глиобластома) был проведен анализ цитологических мазков, иммуноцитохимическое исследование первичных клеточных линий в сравнении с первичным опухолевым материалом.

Цитологический анализ определил, что в образцах на нулевом пассаже содержатся только опухолевые клетки с эпителиоподобной морфологией, это подтверждало чистоту выделения материала (рисунок 8.2 Г).

В цитологических препаратах анапластической астроцитомы наблюдали диффузно расположенные клетки, а также комплексы клеток, переменного размера, с интенсивно окрашенными апикально сдвинутыми полиморфными ядрами, округлой, овальной и неправильной формы, с глыбчатой структурой хроматина, с ядрышками в количестве от 1 до 5. Определяли базофильную

цитоплазму клеток с размытыми краями, липидными вакуолями, внутрицитоплазматическим аксофильным веществом (рисунок 8.2Д). В мазках, приготовленных с 8-го пассажа, визуализировали некоторые изменения: переменные размеры ядер и наличие более выраженных ядрышек. Митотическую активность определяли в 5% клеток. Встречали «голые» ядра. Визуализировали выраженную анаплазию клеток (рисунок 8.2Е). За исключением менее выраженной анаплазии клеток, цитологическая картина первичных клеточных линий глиобластом была аналогична.

Отличительной особенностью *in vitro* была медленная скорость роста клеток первичной глиобластомы, в сравнении с анапластической астроцитомой.

На рисунке 8.3 А, Б, В с изображением субкультивированных клеток на разных пассажах видны изменения морфологии клеток, характеризующиеся увеличением длины и ширины клеточных отростков и появлением межклеточных контактов.

Иммуноцитохимическое исследование проводили на восьмом пассаже. На препаратах с окрашиванием гематоксилином отчетливо прослеживали характер роста и прикрепления клеток первичных линий низкодифференцированных глиальных опухолей. Наблюдали «пленочное» распластывание, с визуально не четко отграниченными отростками (рисунок 8.3 Г), что являлось не типичным для перевиваемых клеточных линий, представленными клетками с эпителиоподобной морфологией с вытянутыми, частично заостренными отростками, интимно сочлененными друг с другом в монослойном состоянии. В образцах с окрашиванием GFAP отмечали резко выраженную ядерно-цитоплазматическую реакцию в клетках, в отдельных очагах отчетливо визуализировали положительную экспрессию антитела на клеточных отростках звездчатой формы – морфологическая особенность астроцитарных опухолей (рисунок 8.3 А, Б). Индекс мечения Ki-67 – 70% (рисунок 8.3В).

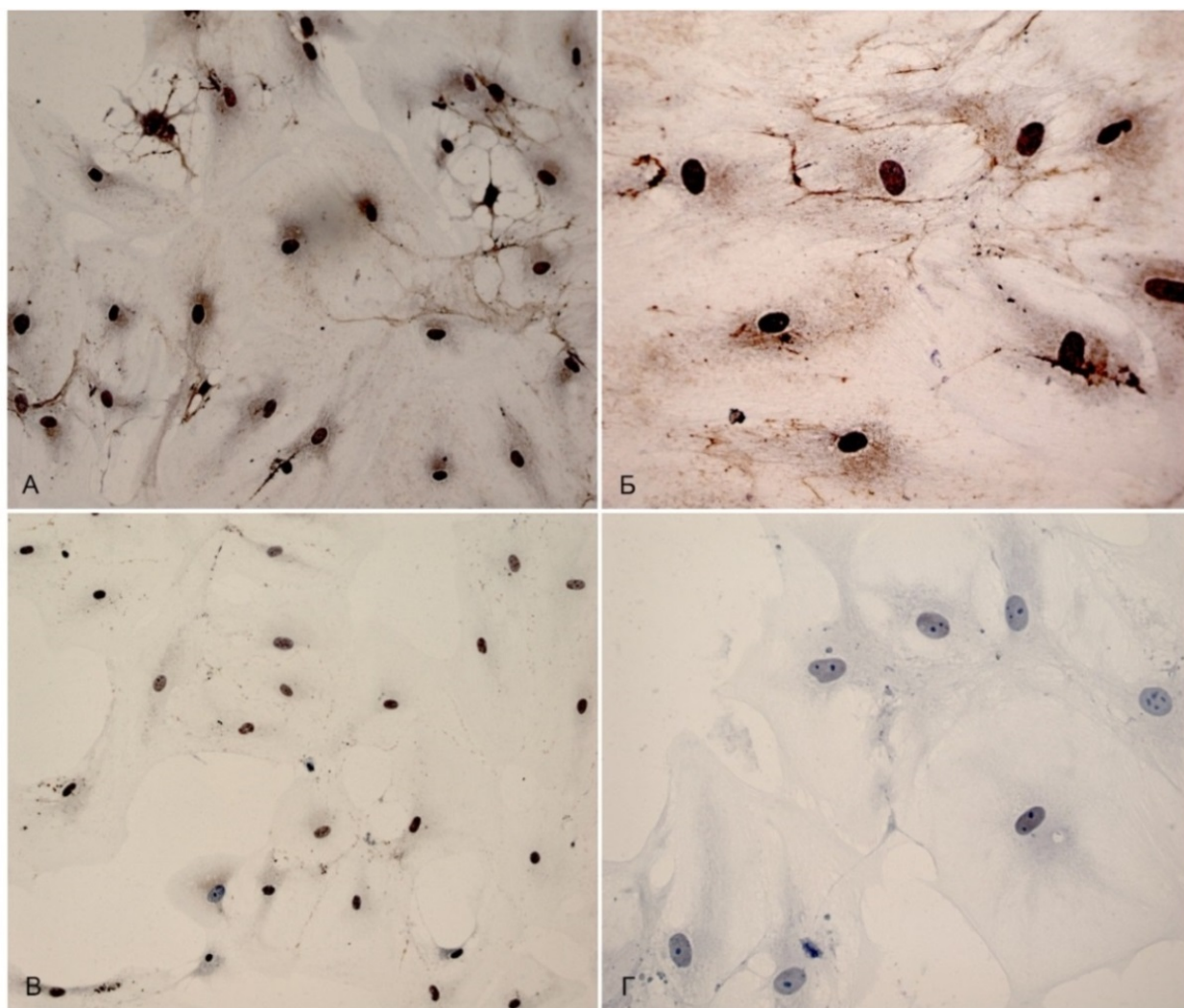


Рисунок 8.3. Иммуноцитохимическое исследование первичной культуры глиальной опухоли, восьмой пассаж. А – экспрессия GFAP, Ув. x200; Б – экспрессия GFAP, Ув. x400; В – экспрессия белка Ki-67 в ядрах клеток первичной глиомы, Ув. x200; Г – окрашивание гематоксилином, Ув. x400

Стандартно при паспортизации человеческих клеточных линий проводится STR-анализ (метод коротких tandemных повторов), или анализ ДНК-профилей человека. В нашем исследовании определяли спорадические нарушения системы репарации неспаренных оснований (mismatch repair-deficient, MMR), которые могли появиться в период пассирования первичных клеточных линий, проводили микросателлитный анализ методом ПЦР на первичных культурах анапластической астроцитомы (n=5) и глиобластомы (n=13) с использованием маркеров D17S250, D2S123, D5S346, NR21, NR24, NR27, BAT25, BAT26. Система MMR является одной из составляющих сложного механизма поддержания стабильности генома клетки. Микросателлитная нестабильность (microsatellite

instability – MSI) в опухоли является отражением дефицита системы MMR (Трякин А.А., Федянин М.Ю., Цуканов А.С., Шелыгин Ю.А., Покатаев И.А. и соавт., 2019). В 2004 году Национальный раковый институт США принял стандартную панель из 5-ти последовательностей, включающих две моонуклеотидных последовательности (BAT-25, BAT-26) и три динулеотидных последовательности (D2S123, D5S346, D17S250), которые сравниваются в опухоли и здоровой ткани (как правило, лимфоциты крови). При этом панель, которая включает все 5 моонуклеотидных повторов, является более чувствительной в выявлении опухолей с микросателлитной нестабильностью (Цуканов А.С., Шелыгин Ю.А., Семенов Д.А. и соавт., 2017; Umar A., Boland C.R., Terdiman J.P. et al., 2004).

Микросателлитный анализ первичных клеточных линий низкодифференцированных глиальных опухолей на разных пассажах не определил статистически значимых различий, по сравнению с контролем. Однако анализ первичной культуры клеток анапластической астроцитомы после шестого пассажа показал изменения в локусе D17S250 (148-148/148-152) по сравнению с первичным материалом опухолевой ткани пациента. В образцах первичной клеточной линии глиобластомы в зависимости от пассажей не было обнаружено изменений. В связи с этим, первым этапом бортезомиб был отобран на первичных культурах глиобластом, где показал свою эффективность.

8.2 Создание ортотопической ксеногенной опухолевой модели глиобластомы *in vivo*

Существует два разных способа пересадки биоматериала для генерации пациентоподобных ксенографтов. Первый представляет собой инъекцию клеточной суспензии, а второй – имплантацию фрагмента ткани, каждый из вариантов имеет ряд преимуществ и недостатков в использовании. В связи с этим, в ходе работы было выполнено создание модели глиобластомы с использованием опухолевого материала пациентов согласно нескольким вариантам стандартных и модифицированных нами протоколов.

За последние четыре десятилетия было опубликовано более 2000 статей с результатами экспериментальных работ, выполненных на линиях U87, U251, T98G и A172. В частности, их использовали как для тестирования препаратов, обладающих цитостатическими свойствами (Li W., Liu J., Fuet W. et al., 2018), так и для изучения противоопухолевой эффективности молекул, действующих на конкретные мишени, таких как ингибитор Pan-ERBB (Yoshida Y., Ozawa T., Yao T. et al., 2014), ингибитор белкового комплекса mTOR (Garros-Regulez L., Aldaz P., Arrizabalaga O. et al., 2016), ингибитор транскрипционного фактора STAT3 (Akiyama Y., Nonomura C., Ashizawa T. et al., 2017), а также для оценки терапевтического потенциала относительно глиобластомы новых комбинаций известных препаратов (метформин+темозоломид) (Lee J., Lim J., Hong Y. et al., 2018).

Тем не менее примечательно, что клетки U87 из-за роста на пластике в течение длительного времени, генетического дрейфа и клональной селекции в условиях культивирования на сегодняшний день существуют в виде субклонов U87, обладающих различающимися характеристиками, что может повлиять на воспроизводимость результатов эксперимента. Это, в свою очередь, влечет за собой необходимость регулярной аутентификации клеточной линии, что уже нередко требуется в ряде научных журналов. Таким образом, данная линия имеет как различия между своими субклонами, так и генетические отклонения от оригинальной опухоли (Freedman L., Gibson M., Ethier S. et al., 2015). Считается, что PDX могут лучше воспроизводить биологические особенности глиальных опухолей пациентов, чем иммортализованные клеточные линии (Patrizii M., Bartucci M., Pineet S. et al., 2018).

По результатам анализа массива литературных данных нами были найдены и проанализированы протоколы создания ортотопических ксеногенных моделей опухолей головного мозга с использованием клеточных линий, предполагающих как ручной метод имплантации клеток, так и использование стереотаксической установки (Ozawa T., James C.D., 2010; Bianco J., Bastiancich C., Joudiou N. et al., 2017) (рисунок 8.4).

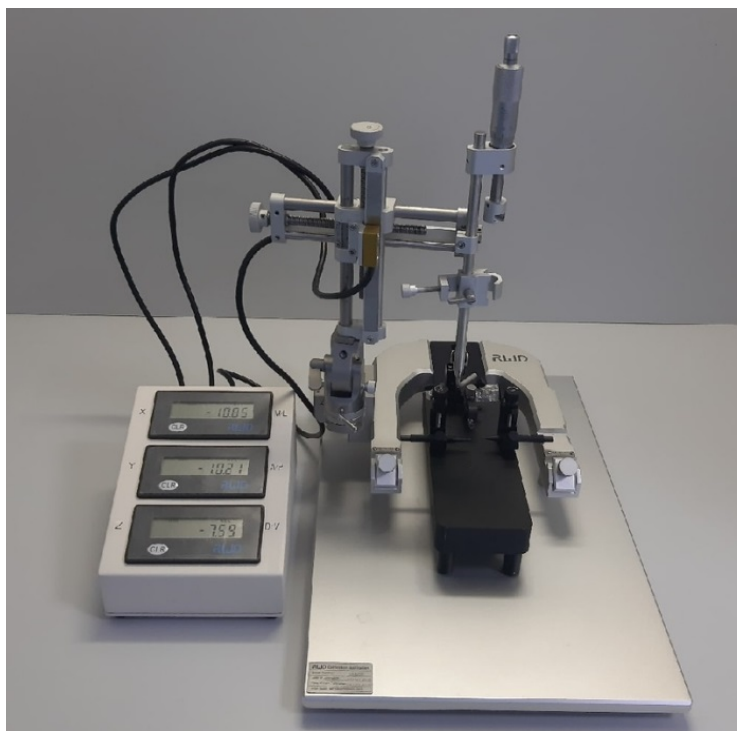


Рисунок 8.4. Стереотаксическая установка для работы с мелкими лабораторными животными

Создание ортотопической модели в рамках данной работы было выполнено с использованием обоих возможных вариантов.

С целью создания модели глиобластомы, максимально близкой по своим основным биологическим характеристикам к человеческой опухоли была выполнена серия экспериментов, предполагающих процедуру интракраниальной имплантации опухолевого материала путем инъекции суспензии опухолевых клеток иммунодефицитным мышам линии Balb/c Nude.

Для этого были использованы образцы глиобластомы, полученные от пациентов в процессе хирургической резекции.

Всего было выполнено восемь процедур. Для создания первой генерации ксенографтов в рамках одной процедуры инъекцию опухолевого материала, взятого от одного пациента, выполняли группе, включающей три иммунодефицитные мыши линии Balb/c Nude. Общие характеристики пациентов и оценка результатов соответствующей процедуры ксенотрансплантации представлены в таблице 8.3.

Таблица 8.3 – Характеристики пациентов-доноров опухолевого материала и оценка результатов ксенотрансплантации (инъекция суспензии опухолевых клеток) иммунодефицитным мышам линии Balb/c Nude

Общие характеристики ортотопической ксенотрансплантации опухолевого материала от пациентов иммунодефицитным мышам							
Характеристика пациентов-доноров опухолевого материала						Оценка результатов инъекции суспензии донорских опухолевых клеток (1-й пассаж)	
Порядковый номер процедуры	Пол	Возраст, лет	Диагноз	Объем	Grade	Время приживления, сутки	Результаты имплантации общее кол-во/ кол-во приживлений
1	Ж	49	Диффузная астроцитома	-	II	-	3/0
2	Ж	46	Анапластическая астроцитома	5,5*4,5*4,0 см	III	-	3/0
3	Ж	53	Диффузная астроцитома	-	II	-	3/0
4	М	48	Глиобластома	7,0*5,0*4,0 см	IV	-	3/0
5	М	58	Глиобластома	4,0*4,0*1,0 см	IV	11	3/1
6	М	68	Глиобластома	6,2*8,2*5,9 см	III–IV	-	3/0
7	М	38	Диффузная астроцитома	-	II	-	3/0
8	Ж	50	Анапластическая астроцитома	4,6*5,8*5,7 см	III	-	3/0

Одним из главных факторов успеха подобных процедур является сохранение жизнеспособности тканей и/или клеток посредством транспортировки их в питательных средах (RPMI1640, DMEM, 199) и соблюдение условий стерильности (Мурашко Д.А., Семенов М., Ильин М., 2017). Также немаловажно определение координат для забора донорского биоматериала – необходимо избегать участков некроза и ориентироваться на зоны роста опухоли.

В ходе данной работы транспортировка свежих фрагментов опухолевой ткани из операционной в лабораторию выполнялась в фальконе с питательной средой для культуры клеток RPMI-1640 с добавлением 1% пенициллина/стрептомицина.

Клеточная суспензия для создания ксенотрансплантатов была получена путем механической дезагрегации опухолевых фрагментов в стерильных условиях при помощи гомогенизатора тканей BD Medimachine (США) в небольшом количестве культуральной питательной среды RPMI-1640, не содержащей сыворотки. Согласно стандартным протоколам по созданию ортотопических моделей опухолей головного мозга на лабораторных мышах в случае использования иммортализованных культур необходимо вводить 2,5 мкл клеточной суспензии, содержащей 3×10^4 клеток линии U87 (Bianco J., Bastiancich C., Joudiou N. et al., 2017), или $3\text{--}5 \times 10^5$ клеток (без уточнения клеточной линии) в 3 мкл бессывороточной среды (Ozawa T., James C.D., 2010).

Приведенные протоколы в рамках данного этапа работы были адаптированы под наши задачи, а именно, было принято решение увеличить количество имплантируемых клеток до $5\text{--}8 \times 10^5$ и, соответственно, объем клеточной суспензии до 5 мкл среды.

Необходимость использования большего количества клеток объясняется тем, что человеческая опухоль, в отличие от культуральной линии, включает в себя несколько субпопуляций клеток, в том числе и не способных к туморогенезу. Таким образом, увеличивая количество и объем клеточного микса для имплантации, можно повысить шансы на успех в работе по созданию ксенографтов.

Для выполнения премедикации и анестезии лабораторных животных применяли инъекции ветеринарных препаратов «Ксила» и «Золелил-100» в дозировках 20 мг/кг и 50 мг/кг соответственно (рисунок 8.5).

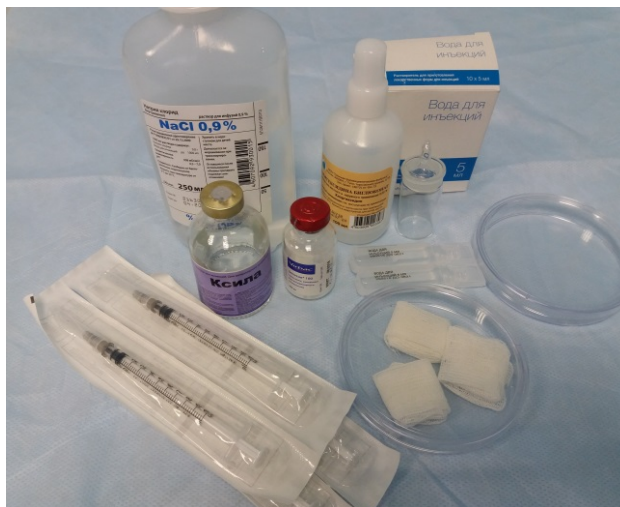


Рисунок 8.5. Материалы и препараты для премедикации и анестезии лабораторных животных

Отсутствие «педального» рефлекса свидетельствовало о надлежащей глубине наркоза.

Затем мышей фиксировали в стереотаксической рамке (рисунок 8.6А). После наркотизации и фиксации животных-реципиентов опухолевого материала, кожу головы мышей обрабатывали стерильным марлевым тампоном, смоченным в растворе хлоргексидина или бетадина. Затем, используя стерильный скальпель, выполняли сагиттальный разрез кожи над теменно-затылочной костью длиной около 1 см (рисунок 8.6Б).



А



Б

Рисунок 8.6. Создание ортотопической ксеногенной модели глиобластомы при помощи инъекции суспензии опухолевых клеток. А – фиксация наркотизированной мыши в стереотаксической рамке. Б – выполнение сагиттального разреза над теменно-затылочной костью

После этого очищали поверхность черепа, используя ватный тампон, пропитанный 3%-ным раствором перекиси водорода, что делало брегму хорошо заметной. Перед инъекцией опухолевых клеток при помощи стерильной остроконечной иглы размером 25 g выполняли прокол черепа, отступив на 1 мм вперед от коронарного шва и на 2 мм правее от брегмы, тем самым создав отверстие для инъекции опухолевых клеток (рисунок 8.7А).

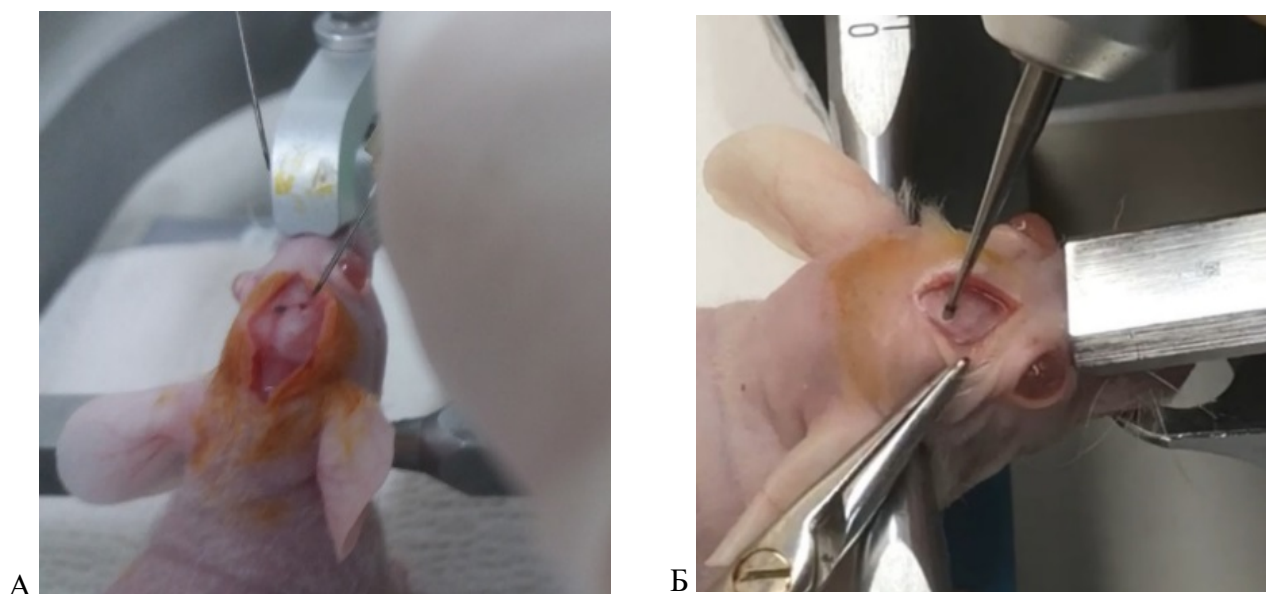


Рисунок 8.7. Создание ортотопической ксеногенной модели глиобластомы при помощи инъекции суспензии опухолевых клеток. А – создание отверстия для инъекции опухолевых клеток путем прокола черепа остроконечной иглой 25 g. Б – создание отверстия для инъекции опухолевых клеток при помощи ручного бора

Также нами была проведена успешная попытка выполнения данного этапа процедуры с учетом модификации протокола Т. Ozawa, С.D. James (2010), что предполагало использование ручной высокоскоростной дрели вместо иглы для создания отверстия в черепе мыши (рисунок 8.7Б). Анализ результатов эксперимента показал, что животные одинаково хорошо переносили оба варианта выполнения этой процедуры.

Координаты места введения опухолевых клеток могут варьировать. Выполненная в ходе данной работы процедура предполагает интракраниальное формирование опухоли.

Согласно анализу литературных данных, использование именно таких координат упоминается в преобладающем количестве публикаций последних лет,

посвященных созданию ортотопических ксенографтов глиальных опухолей (Ozawa T., James C.D., 2010; Bianco J., Bastiancich C., Joudiou N., 2017). Другие координаты, представляющие интерес для изучения опухолей головного мозга, включают Варолиев мост – для моделирования опухолей ствола мозга (Hashizume R, Ozawa T, Dincaet E. et al., 2010) и субдуральную область введения – для моделирования менингеальных опухолей (Baia G., Dinca E., Ozawa T. et al., 2008).

После формирования отверстия в черепе мыши согласно заданным координатам набирали необходимое количество микролитров в шприц Гамильтона, затем фиксировали его в манипуляторе стереотаксиса и перемещали вниз таким образом, чтобы игла шприца вошла в мозг животного-реципиента на 3 мм, и осуществляли введение клеточной суспензии. По окончании инъекции крайне важно медленно и аккуратно извлечь иглу, чтобы уменьшить рефлюкс клеток опухоли. После этого операционную рану ушивали, шов обрабатывали водным раствором хлоргексидина или бетадином (рисунок 8.8).

Как уже упоминалась выше, процедуру имплантации клеток возможно выполнять как с использованием стереотаксического оборудования, так и без него (Ozawa T., James C.D., 2010; Danhier F., Messaoudi K., Lemaire L. et al., 2015; Lenting K., Verhaak R., Laan M. et al., 2017; Lee J., Jo D., Kim J. et al., 2019).

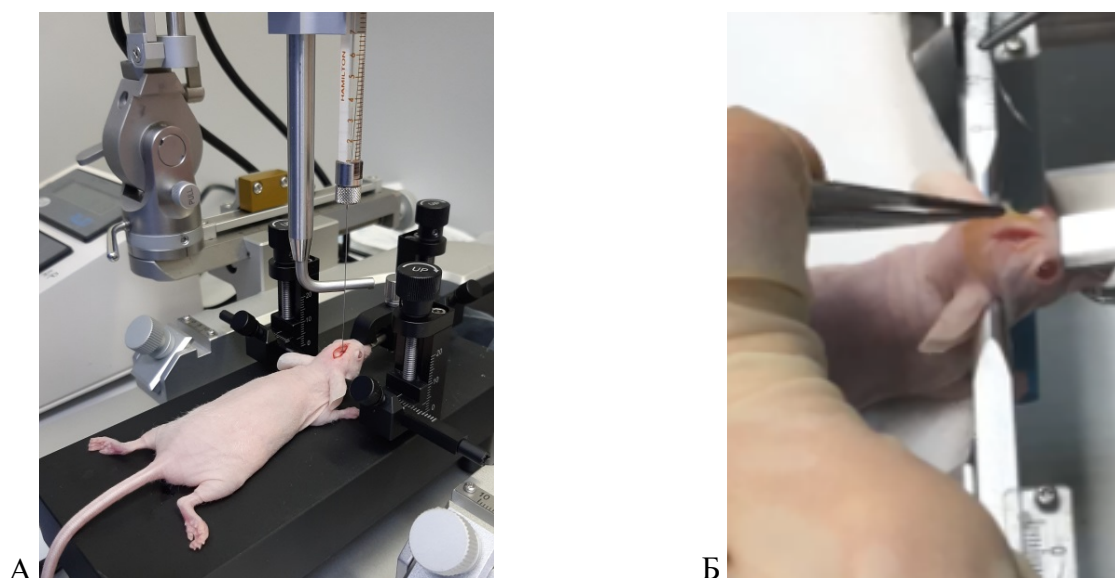


Рисунок 8.8. Создание ортотопической ксеногенной модели глиобластомы при помощи инъекции суспензии опухолевых клеток. А – введение суспензии опухолевых клеток. Б – ушивание операционной раны

К преимуществам применения ручного способа создания ортотопических ксенотрансплантатов опухолей головного мозга можно отнести быстроту выполнения всей процедуры (рисунок 8.9А–8.9Г). Это может быть важным фактором в случае использования большого количества животных в одном эксперименте, так как этот способ помогает сократить время, в течение которого перевиваемые опухолевые клетки находятся вне живого организма, а значит, теряют жизнеспособность.

В серии экспериментов по созданию ортотопических ксеногенных опухолей головного мозга вместо шприца Гамильтона было принято решение использовать дозатор 0,5–10 мкл шприца (рисунок 8.9В).

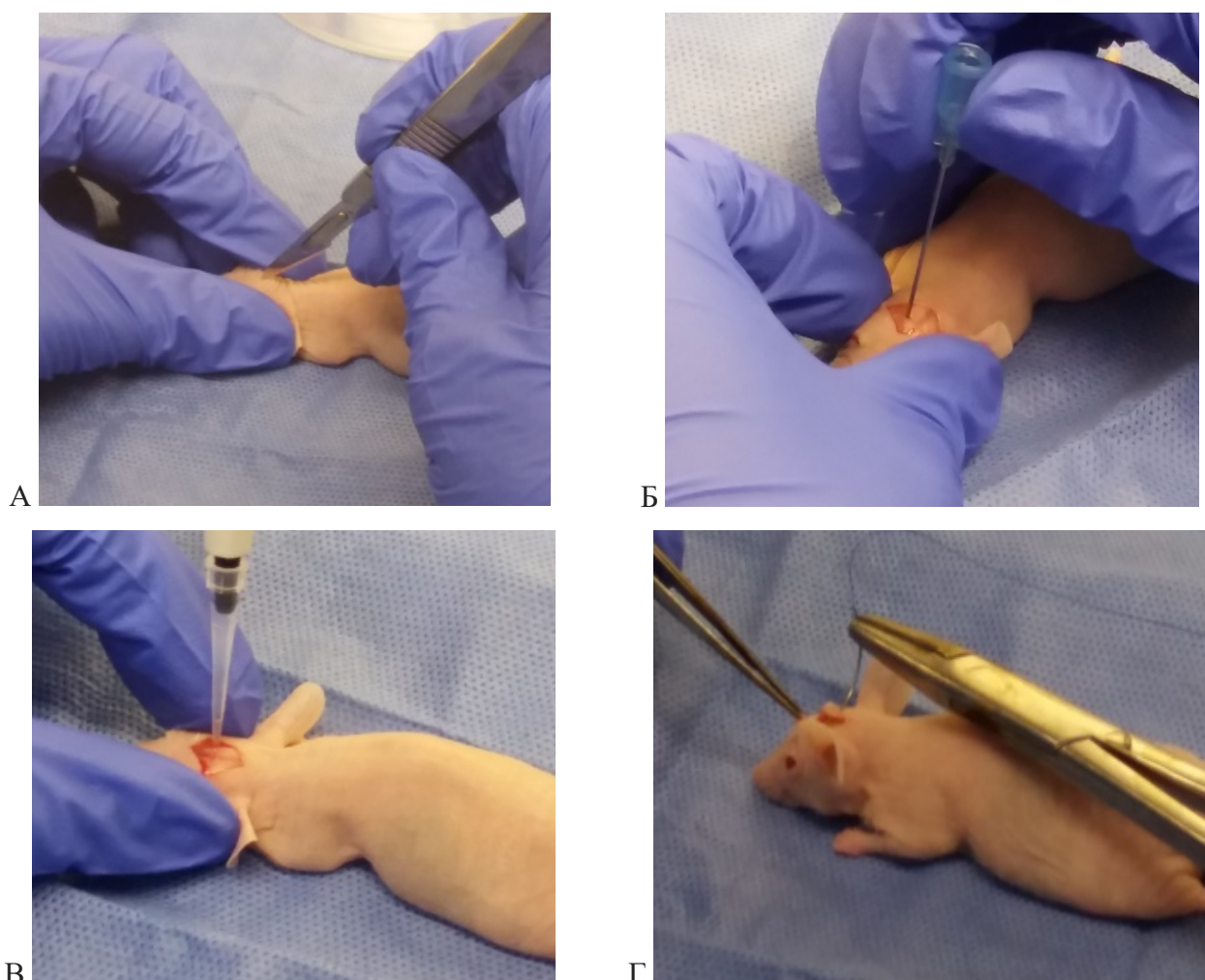


Рисунок 8.9. Создание ортотопический ксеногенной модели глиобластомы при помощи ручной процедуры без использования стереотаксиса. А – выполнение сагиттального разреза над теменно-затылочной костью; Б – создание отверстия для инъекции опухолевых клеток при помощи остроконечной иглы 25 g; В – введение опухолевых клеток при помощи автоматического дозатора; Г – ушивание операционной раны

Это оказалось весьма целесообразным, так как конусообразная форма наконечника способствовала ограничению его проникновения более чем на 3 мм, что было бы механически сложно проконтролировать в случае использования иглы. Преимуществами введения опухолевых клеток в мозг лабораторным животным при помощи стереотаксической установки является возможность четко соблюдать заданные координаты, благодаря манипуляторам, позволяющим ориентировать иглу шприца по трем осям с точностью до десятой доли миллиметра. Неправильная ориентация шприца может привести к внутрижелудочковому введению клеток и последующему их рассеиванию в спинномозговом канале и невозможности формирования опухолевого узла в интересующем сайте (Ozawa T., James C.D., 2010).

Кроме того, стереотаксическое оборудование позволяет с точностью до десятых долей миллиметра воспроизвести заданные координаты для каждого животного в группе, что является немаловажным фактором при стандартизации модельного объекта в ходе доклинических исследований противоопухолевых препаратов и позволяет избежать ошибочной интерпретации при оценке различий опухолевого роста и инвазии, которые могут возникать вследствие погрешностей манипуляций при ручном вводе клеток.

Все животные, выйдя из наркоза, восстанавливали нормальную активность и характерное для них поведение через 1,5–3 часа после окончания процедуры. За ними было установлено наблюдение в течение пяти месяцев с еженедельным клиническим осмотром и измерением массы тела (рисунок 8.10).



Рисунок 8.10. Экстракраниальный рост ксенографта, установленного интракраниально

На всем протяжении времени наблюдения у всех животных отсутствовали клинические признаки дистресса (паралич, выгнутая спина, отсутствие движения), потеря массы тела, что косвенно могло бы указывать на интракраниальное развитие глиомы, также не наблюдался эктопический рост опухоли, что можно было бы расценивать как успешное приживание опухолевых клеток.

Помимо методик по созданию ортотопических опухолей головного мозга при помощи интракраниальной инъекции, нами был найден относительно новый метод J. Lee с соавт. (2019) создания модели глиобластомы посредством интравитреальной инъекции. Для формирования внутричерепных ксенографтов и проведения последующей оценки терапевтической эффективности часто требуется значительное количество времени, в связи с чем авторами было предложено создание модели с более быстрым развитием и улучшенной визуализацией опухолевого процесса в среде, имитирующей мозг. В частности, сетчатка состоит из слоев нейрональных клеток, в которых формируется множество синапсов среди различных типов нейрональных клеток (Lee J., Jo D., Kim J. et al., 2019).

Кроме того, микрососудистые эндотелиальные клетки как в головном мозге, так и в сетчатке образуют барьеры с окружающими клетками, включая перициты и астроциты, а также другие клеточные компоненты мозга и сетчатки, формирующие опухолевое микроокружение довольно сходны (Matias S., Lottem E., Dugue G.P., Mainen Z.F., 2017; Poon C.C., Gordon P.M.K., Liu K. et al., 2019).

В работе J. Lee с соавт. (2019) выполняли инъекцию клеток глиобластомы, полученных от пациента, в полость стекловидного тела мышей Balb/c Nude, что приводило к образованию внутриглазных опухолей. Согласно системе визуальной оценки, наблюдалось прогрессирование новообразований от бляшек через 2 недели до масс через 4 недели после интравитреального введения. Сформировавшиеся ксенографты воспроизводили гистологические и иммуногистохимические (наличие нестина, виментина и глиального

фибриллярного кислого белка GFAP) характеристики, что соответствовало исходным опухолям.

Учитывая относительную простоту манипуляций и возможность оценки динамики опухолевого роста без применения дополнительного оборудования для визуализации *in vivo* нами было принято решение о создании модели глиобластомы при помощи интравитреального введения опухолевых клеток согласно протоколу, предложенному J. Lee et al. (2019). После введения животных в стадию хирургического наркоза была выполнена инъекция опухолевого материала при помощи шприца Гамильтона в объеме 3 мкл в количестве 1×10^5 клеток (рисунок 8.11).



Рисунок 8.11. Создание модели глиобластомы при помощи интравитреального введения опухолевых клеток

В результате наблюдения за животными в течение четырех месяцев опухолевого роста обнаружено не было.

Отсутствие положительного результата в виде приживания опухолевого материала пациентов в данном случае, вероятно, связано с клеточным аноиксом (форме апоптоза, наступающего в ответ на потерю связи с матриксом или обусловленного отрывом клетки от клеток-соседей), вызванным механической дезагрегацией в ходе приготовления клеточной суспензии. Проанализировав полученные результаты, мы приняли решение продолжить эксперименты по созданию ксеногенной модели глиобластомы человека, учитывая вышеописанные особенности и внеся необходимые изменения в алгоритм процедуры.

Создание ортотопической ксеногенной опухолевой модели глиобластомы путем имплантации опухолевого фрагмента

В рамках данной работы было рассмотрено несколько вариантов решения проблемы отсутствия опухолевого роста у модельных животных. Один из эффективных способов инициации туморогенеза *in vivo* является трансплантация популяции предварительно выделенных опухолевых клеток, обладающих свойствами стволовости, так как доказано, что именно они являются родоначальниками опухолей (Ayob A., Ramasamy T., 2018). Согласно этой концепции, использование опухолевых стволовых клеток, с одной стороны, значительно повышает шансы на успех в создании ксенографтов, с другой стороны, это приводит к быстрому и агрессивному росту, уменьшению временного промежутка до появления первых симптомов и снижению общей выживаемости, что делает невозможным проведение исследования эффективности новых терапевтических средств и/или их комбинаций с препаратами, уже применяющимися в клинической практике.

К признакам терминальной опухолевой нагрузки у мышей можно отнести деформацию черепа, вялость, нарушение походки, судороги, снижение массы тела, а также признаки дистресса (паралич, выгнутая спина, отсутствие движения), что является критерием прекращения эксперимента по гуманным соображениям (рисунок 8.12) (Irtenkauf S., Sobiechowski S. et al., 2017).



Рисунок 8.12. Терминальная опухолевая стадия у экспериментального животного; характеризуется истощением, отсутствием аппетита, нарушением координации, наличием признаков дистресса, таких как паралич, выгнутая спина, отсутствие движения

Вторым рассматриваемым вариантом возможного решения проблемы являлось создание ортотопической ксеногенной модели глиобластомы путем прямой имплантации фрагмента опухоли, взятой от пациента.

К преимуществам этой стратегии можно отнести отсутствие промежуточных этапов обработки *in vitro* перед имплантацией фрагментов опухоли в мышь для создания PDX, что, безусловно, положительным образом отражается на выживаемости опухолевого материала и увеличивает шансы на приживание и реализацию его туморогенного потенциала.

Кроме того, трансплантация биологического материала в виде фрагментов способствует поддержанию межклеточных взаимодействий, а также сохранению тканевой архитектуры исходной опухоли, тем самым имитируя ее микроокружение (Jung J., Seol H., Chang S., 2018).

Поиск тематических публикаций в базах данных PubMed, MedLine, Cyber Leninka показал значительное число работ по созданию путем трансплантации фрагмента опухоли PDX моделей различных нозологий (рак молочной железы, колоректальный рак, рак поджелудочной железы), но не PDX моделей опухолей головного мозга.

В публикации, описывающей создание собственной коллекции PDX (21 образец глиобластомы), полученных из опухолевого фрагмента, не подвергавшегося дезагрегации, применяли исключительно метод гетеротопической (подкожной) имплантации (Ji X., Chen S., Guo Y. et al., 2017). Однако в известных публикациях не было найдено протоколов по трансплантации опухолевого фрагмента непосредственно в головной мозг иммунодефицитного животного. Такой протокол был разработан нами в ходе экспериментального исследования.

Для создания первой генерации ксенографтов в рамках одной процедуры опухолевый материал пациента имплантировали трем иммунодефицитным мышам линии Balb/c Nude. Всего было выполнено пять процедур. В таблице 8.4 представлены общие характеристики пациентов и оценка результатов соответствующей процедуры ксенотрансплантации.

Таблица 8.4 – Характеристики пациентов-доноров опухолевого материала и оценка результатов ксенотрансплантации (имплантация опухолевого фрагмента) иммунодефицитным мышам линии Balb/c Nude

Характеристики пациентов-доноров опухолевого материала						Оценка результатов имплантации фрагментов донорской опухоли (1-й пассаж)	
№ процедуры	Пол	Возраст, лет	Диагноз	Объем	Grade	Время приживления, сутки	Результаты имплантации общее кол-во / кол-во приживл.
1	М	48	Глиобластома	44×55×35	IV	75 (60-90)	3/3
2	Ж	47	Глиобластома	5,5×4×4	IV	-	3/0
3	М	79	Глиобластома	29×46×34	IV	-	3/0
4	М	72	Анапластическая астроцитома	-	III	-	3/0
5	М	52	Диффузная астроцитома	-	II	-	3/0

После погружения мышей-реципиентов в наркоз, как это было описано выше, хирургическую стадию анестезии подтверждали наличием/потерей pedalного рефлекса. Далее кожу головы мышей обрабатывали стерильным марлевым тампоном, смоченным в растворе хлоргексидина или бетадина, затем стерильным скальпелем выполняли сагиттальный разрез кожи над теменно-затылочной костью длиной около 1 см (рисунок 8.13).

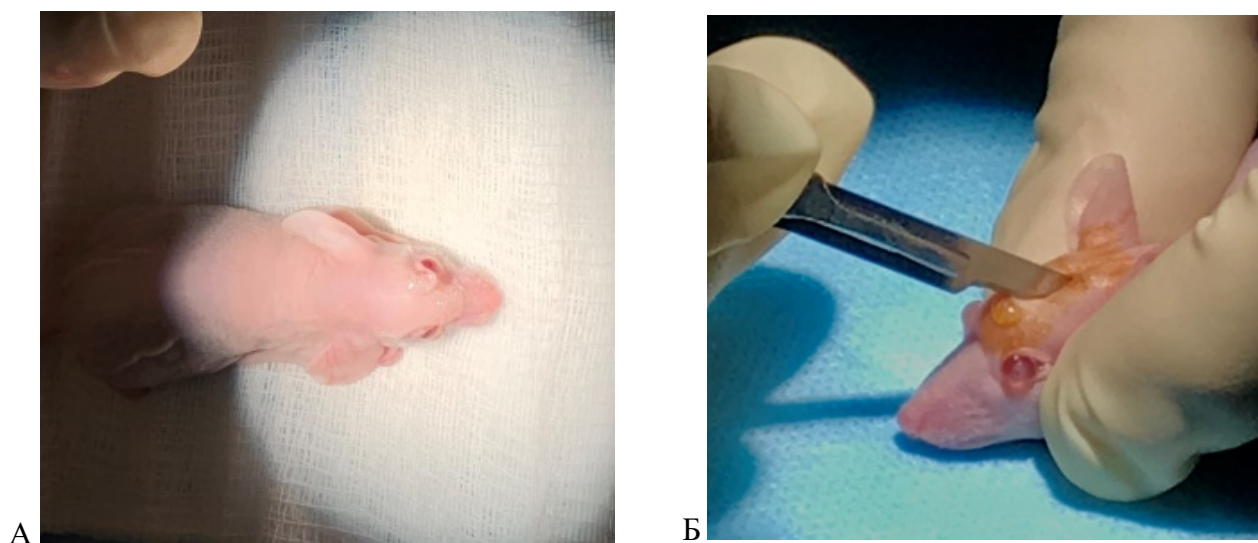


Рисунок 8.13. Создание ортотопической ксеногенной модели глиобластомы путем имплантации опухолевого фрагмента. А – подготовка мыши к операции; Б – выполнение сагиттального разреза кожи над теменно-затылочной костью

Для формирования отверстия, которое позволит разместить достаточный объем опухолевого материала, череп мышей сверлили в правой лобной доле на 2 мм правее брегмы с помощью высокоскоростной дрели Medtronic (рисунок 8.14).

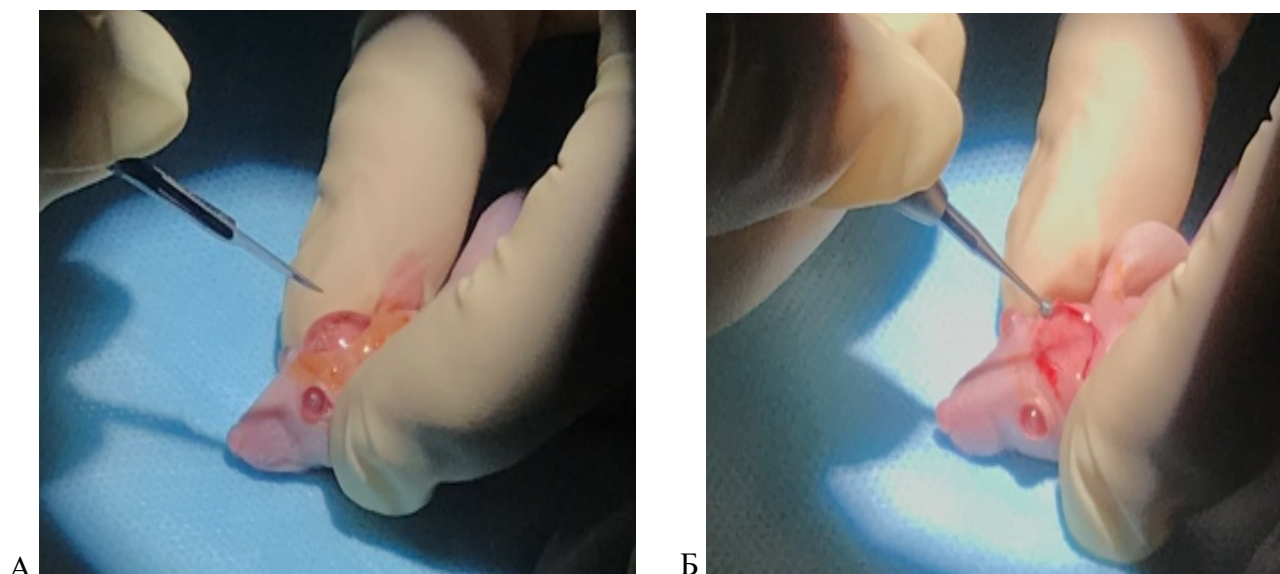


Рисунок 8.14. Создание ортотопической ксеногенной модели глиобластомы путем имплантации опухолевого фрагмента. А – смачивание поверхности мозга физиологическим раствором; Б – формирование отверстия в черепе для последующей имплантации опухолевого фрагмента

Во время выполнения этой процедуры возможно возникновение осложнения в виде отека паренхимы мозга, что ведет к ограничению размера полости для имплантируемого фрагмента. Кроме того, были зафиксированы случаи кровотечения; основным фактором, предрасполагающим к возникновению этого осложнения, являлось наличие крупных кровеносных сосудов, расположенных в зоне манипуляций. Чаще всего, кровотечение прекращалось в течение 1–2 минут. Затем в сформированное в черепе мыши отверстие помещали фрагмент опухоли (рисунок 8.15).

Применение фотосенсибилизирующего препарата «Аласенс» в клинической практике для контроля объема резекции опухоли пациента позволяет убедиться в том, что животным-реципиентам был имплантирован фрагмент метаболически активной опухолевой ткани (рисунок 8.16).

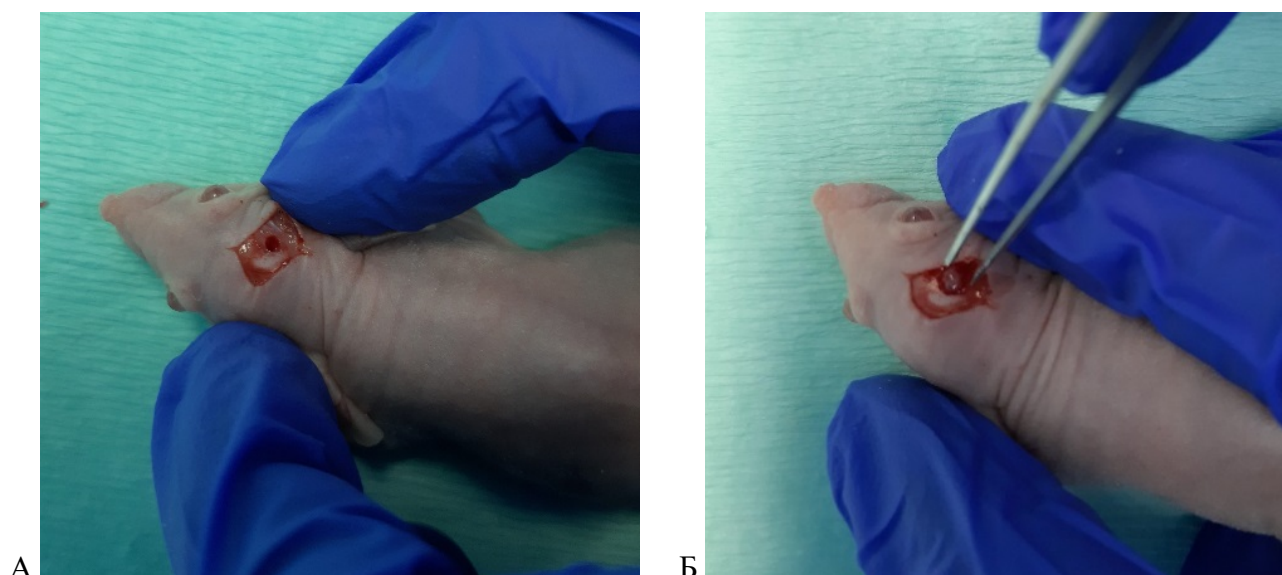


Рисунок 8.15. Создание ортотопической ксеногенной модели глиобластомы путем имплантации опухолевого фрагмента. А – сформированное при помощи высокоскоростной дрели отверстие в правой лобной доле мыши; Б – размещение опухолевого фрагмента в образовавшемся «окне»

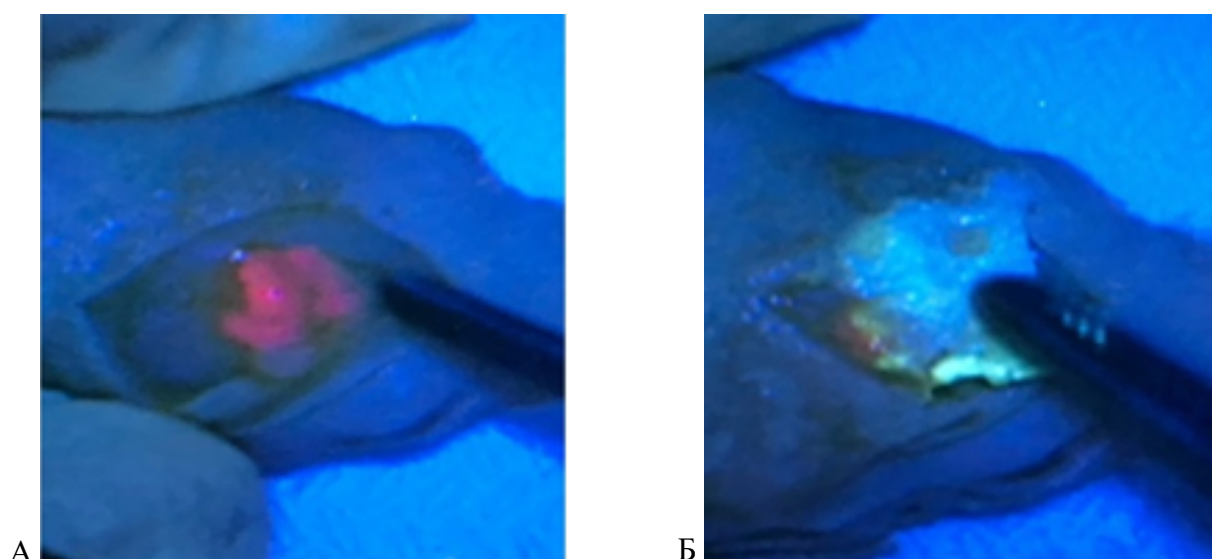


Рисунок 8.16. Создание ортотопической ксеногенной модели глиобластомы. А – метаболически активный фрагмент нейроэпителиальной опухоли высокой степени злокачественности, четко визуализируемый с применением фильтра операционного микроскопа после введения больному препарата 5-АЛК за 2 часа до операции, имплантируется под твердую мозговую оболочку; Б – размещение тахокомба над зоной установки ксенотрансплантата

Было принято решение не выполнять закрытие отверстия костным воском, чтобы не создавать препятствия для экзофитного роста ксенографта, так как при отсутствии системы визуализации для лабораторных животных, подкожный рост опухоли можно использовать в качестве критерия оценки результатов

имплантации, вместо этого закрывали рану тахокомбом. В завершении процедуры операционную рану ушивали, шов обрабатывали водным раствором хлоргексидина или бетадином (рисунок 8.17).

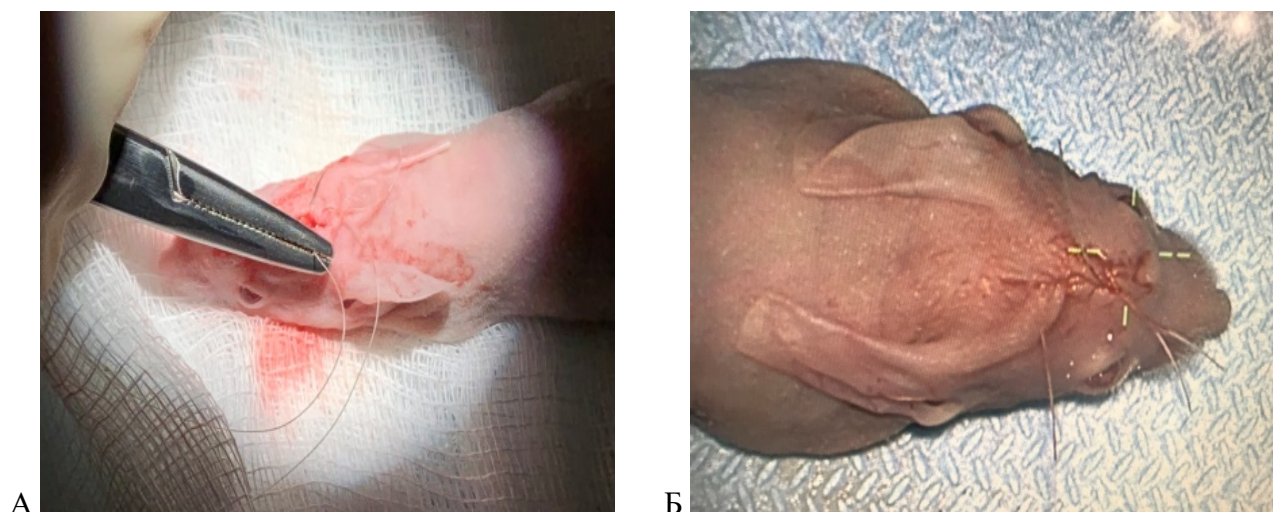


Рисунок 8.17. Создание ортотопической ксеногенной модели глиобластомы путем имплантации опухолевого фрагмента. А – ушивание операционной раны на голове мыши; Б – финальный вид после окончания процедуры

Все животные, выйдя из наркоза, были активны и не демонстрировали признаки ухудшения здоровья, случаи смерти или гемиплегии в ближайшие 3–4 дня после процедуры не наблюдались. Далее было установлено наблюдение в течение пяти месяцев с еженедельным клиническим осмотром и измерением массы тела за всеми группами животных. Положительные результаты были зафиксированы только для одной из пяти процедур, что соответствует данным, представленным в мировой научной литературе, согласно которым только 10–20% PDX могут быть успешно выращены на мышах (Huszthy P.C. et al., 2012).

У всех мышей в группе в сроки от 2-х до 4-х месяцев был отмечен экстра-интракраниальный рост ксенографта, что указывало на успешное приживление донорской опухолевой ткани в организме животного-реципиента (рисунок 8.18). Эти сроки также согласуются с литературными данными – считается, что для создания PDX трансплантируемым фрагментам требуется в среднем от 2 до 4-х месяцев для приживления. Продолжительность латентного периода может варьировать в зависимости от типа опухоли, расположения имплантата и степени иммунодефицита мышей-реципиентов (Jung J., Seol H., Chang S., 2008).

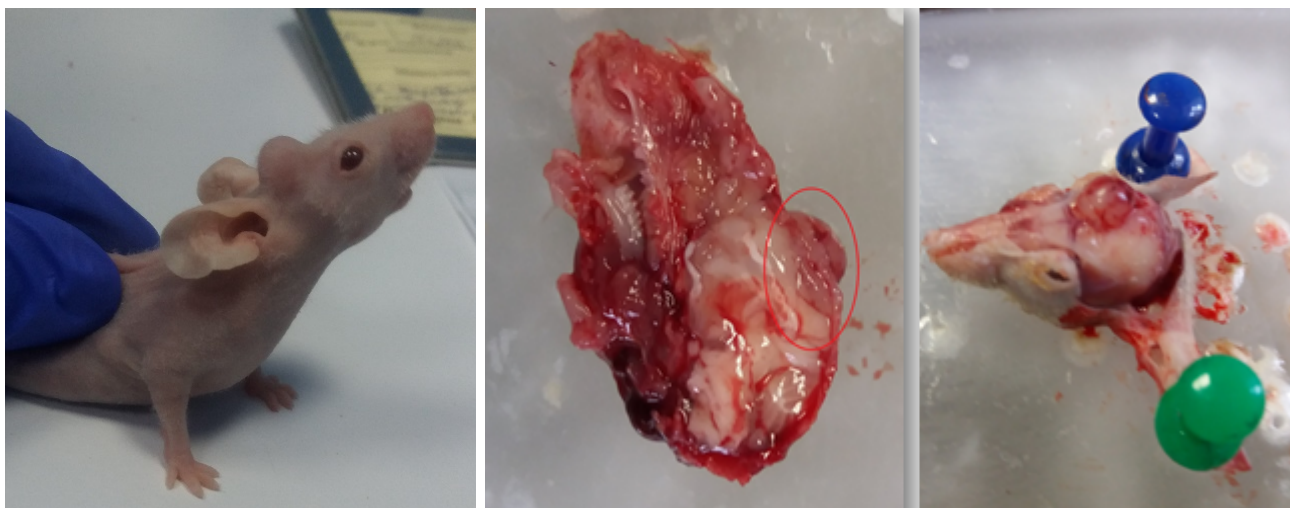


Рисунок 8.18. Экстра-интракраниальный рост ксенографта при интракраниальной имплантации опухолевого фрагмента иммунодефицитной мыши линии Balb/c Nude. Обведенная зона демонстрирует рост трансплантируемой опухоли в вещество мозга мыши

Полученный PDX поддерживали путем серийной ортотопической трансплантации (1-я, 2-я и 3-я генерация ксенографтов), каждая последующая генерация показывала более высокую скорость роста, чем предыдущая.

В ходе гистологического исследования донорский биоматериал был охарактеризован как глиобластома, состоящая преимущественно из мелких клеток (рисунок 8.19).

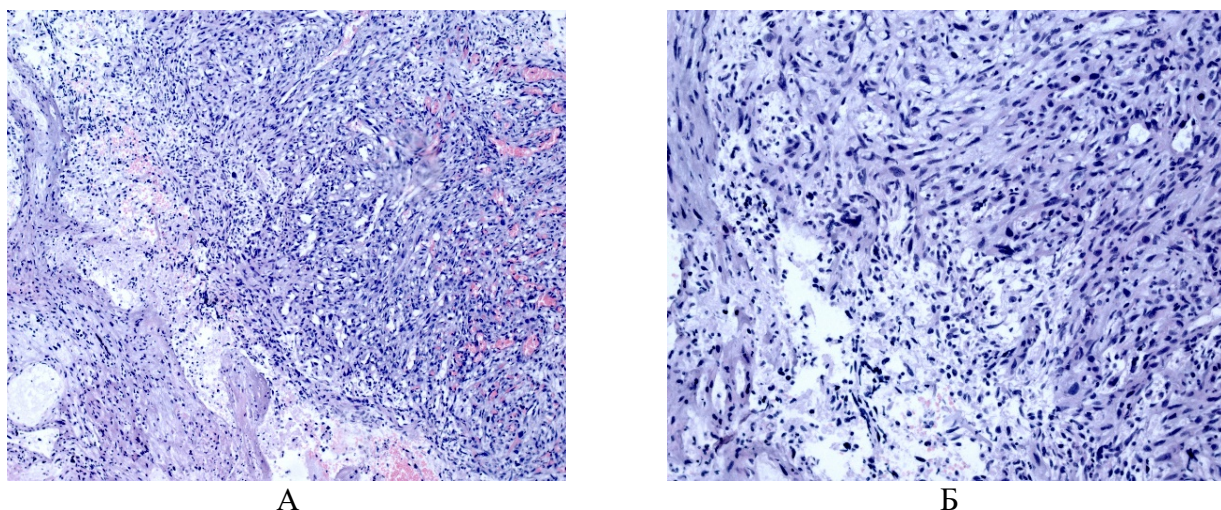


Рисунок 8.19. Глиобластома. Гистологические препараты донорской опухоли:
А – окраска гематоксилином и эозином, $\times 100$; Б – окраска гематоксилином и эозином, $\times 400$

Отмечались очаги некроза, располагающиеся в ткани мозга и вокруг сосудов. Очаги некроза, расположенные вокруг сосудов, характеризовались псевдопалисадными структурами, представленными многорядным частоклом

вытянутых гиперхромных ядер. В большинстве полей зрения встречались атипичные клетки, высокая митотическая активность.

Благодаря проведенному иммуногистохимическому исследованию была выявлена экспрессия кислого фибриллярного белка GFAP (glial fibrillary acidic protein) в опухолевых клетках, что дало основание подтвердить диагноз глиобластома (рисунок 8.20). ИГХ-исследование выявило высокую пролиферативную активность (экспрессия Ki-67 – 70%), и высокий уровень экспрессии p53 – 90%.

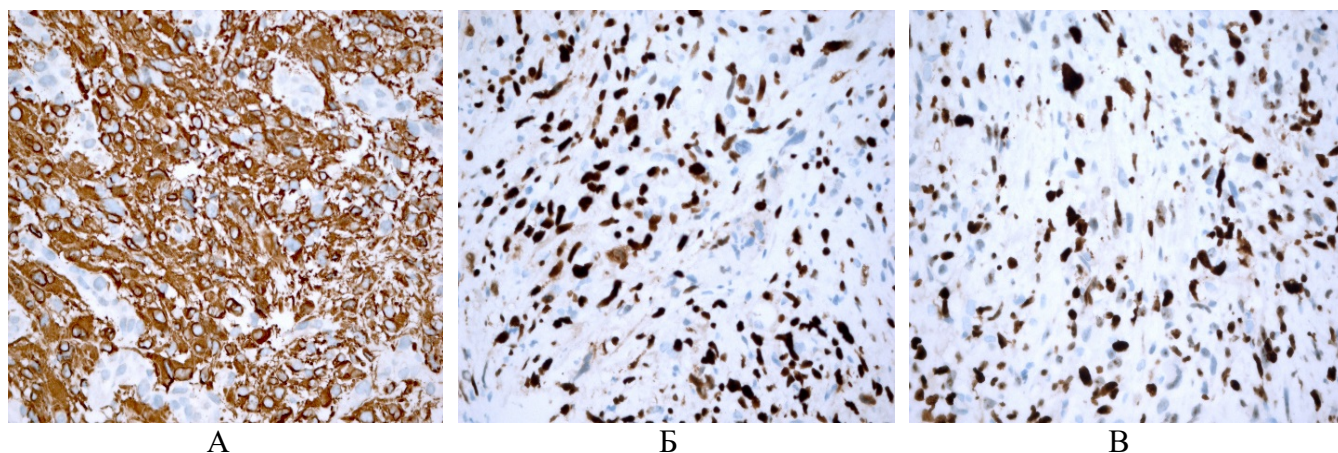


Рисунок 8.20. Иммуногистохимические препараты: А – иммуногистохимическое окрашивание с антителами к GFAP; Б – иммуногистохимическое окрашивание с антителами p53; В – иммуногистохимическое окрашивание с антителами Ki-67

В результате гистологического исследования ксенографтов было продемонстрировано, что опухолевая ткань проявляет морфологию и плотность, отличную от нормальной ткани мозга мыши (рисунок 8.21).

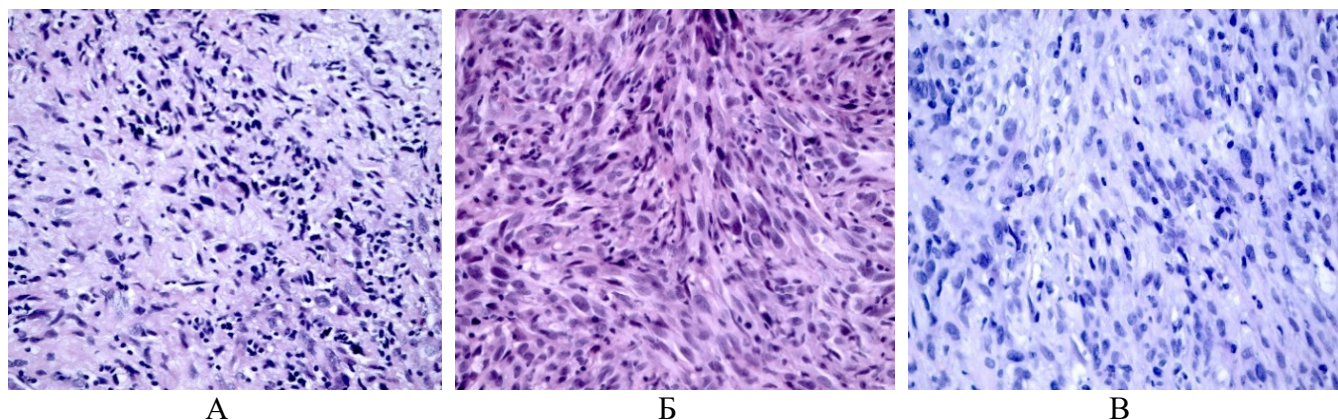


Рисунок 8.21. Гистологические препараты PDX-модели глиобластомы человека на иммунодефицитных мышах. А – ксенографт глиобластомы первой генерации; Б – ксенографт глиобластомы второй генерации, $\times 400$; В – ксенографт глиобластомы третьей генерации; А, Б, В – окраска гематоксилином и эозином, $\times 400$

Также было показано, что гистотип всех PDX (первая, вторая и третья генерация ксенографтов) соответствовал гистотипу донорской опухоли.

Для возможности валидации различных терапевтических методов и получения надежного прогноза модели глиобластомы должны отвечать строгим требованиям. В идеальном случае модель *in vivo* для доклинических исследований соответствует следующим критериям: отражает основные генетические характеристики человеческой опухоли; воспроизводит адекватное микроокружение; стабильна и воспроизводима с течением времени.

Разработанная нами ортотопическая ксеногенная модель продемонстрировала гистологическое сходство с исходной опухолью.

Что касается стандартизации пациентоподобных ксенографтов по молекулярно-генетическим признакам, на данный момент существуют различия в способах проверки соответствия PDX моделей этим критериям. С момента создания пациентоподобных ксенографтов в качестве основной процедуры для оценки терапевтических ответов в доклинических исследованиях, стали появляться публикации, посвященные разработке методов валидации PDX, и результаты этих работ показали отличия как мутационного, так и транскриптомного профилей ксенотрансплантатов от оригинальных опухолей (Collins A., Lang S., 2018).

Эти расхождения могут быть следствием как опухолевой гетерогенности, так и процесса клональной селекции, сопровождающего развитие PDX (Pompili L., Porru M., Caruso C. et al., 2016; Ben-David U., Porru M., Caruso C. et al., 2017). В пользу этого аргумента свидетельствуют результаты работы по получению гетерогенных клонов PDX, происходящих от одной пациентской опухоли (Soeda A., Hara A., Kunisada T. et al., 2015).

Учитывая вышеизложенные факты, подтверждающие серьезные ограничения в использовании транскриптомного профилирования в качестве инструмента стандартизации опухолевой модели для доклинических исследований, следует применять более стабильные параметры, такие как наличие/отсутствие генетических мишеней, наряду с оценкой ответа на

стандартную противоопухолевую терапию в качестве критерия оценки полезности модели.

Исследование противоопухолевой активности комбинации бортезомиба и темозоломида на подкожных ксенографтах глиобластомы

Стандартные терапевтические процедуры, направленные на лечение пациентов с глиобластомой, на сегодняшний день представляют собой максимальную хирургическую резекцию в сочетании с адъювантной лучевой терапией и/или химиотерапией темозоломидом (TMZ) (Braun K., Ahluwalia S., 2017; Lu V., Jue T., McDonaldet K. et al., 2018).

Тем не менее рецидивы опухоли из-за инфильтрации клетками, оставшимися по краю резекции, неизбежны, что приводит к неудовлетворительной выживаемости (медиана около 14 месяцев) (Lu V., Jue T., McDonaldet K. et al., 2018; Tykocki T., Eltayeb M., 2018). Как следствие, необходим прогресс в понимании механизмов лекарственной устойчивости и поиске новых терапевтических мишеней для улучшения стандартов лечения этой фатальной опухоли.

Одним из возможных вариантов таких мишеней можно рассматривать убиквитин-протеасомную систему, которая играет важную роль в регуляции роста и выживания клеток. Известно, что онкогенные клетки более чувствительны к протеасомному торможению, чем обычные, что дает повод рассматривать ингибиторы протеасом (ИП) в качестве препаратов, обладающих противоопухолевым действием (Johnson D., 2015; Teicher B., Tomaszewski J., 2015).

Первым из ИП, одобренным FDA, стал препарат «Бортезомиб», используемый для лечения множественной миеломы, рецидивирующей/рефрактерной миеломы плазмы и мантийноклеточной лимфомы (Gandolfi S., Laubach J., Hideshima T. et al., 2017). Дальнейшие исследования показали, что «Бортезомиб» проявил себя как активное противоопухолевое средство во множестве моделей солидных злокачественных опухолей как *in vitro*, так и *in vivo*, что соответствовало представленной концепции, доказывающей эффективность

использования системы убиквитин-протеасома в качестве мишени для лечения рака (Manasanch E., Orlowski R., 2017; Roeten M., Cloos J., Jansen G., 2018).

Бортезомиб (Velcade®, PS-341) представляет собой дипептидное соединение и является производным борной кислоты (Scalzulli E., Grammatico S., Vozella F. et al., 2018; Fernandes G., Denny W., Dos Santos L., 2019). Он способен обратимо ингибировать химотриптическую активность 20S субъединицы 26S протеасомы за счет высокой аффинности и специфичности связывания между атомом бора и субъединицей 20S (Tan C., Abdul-Majeed S., Cael B. et al., 2019). Протеасома регулирует экспрессию и функцию белков за счет деградации убиквитинированных белков и очищает клетку от нефункционирующих протеинов. Ингибирование протеасомы бортезомибом приводит к нарушению внутриклеточного обмена белков, что ведет к нарушению пролиферации и индукции апоптоза в опухолевых клетках (Tan C., Abdul-Majeed S., Cael B. et al., 2019).

Биологические эффекты, возникающие вследствие ингибирования протеасом, многочисленны и, помимо нарушения пролиферации, включают подавление экспрессии молекул адгезии и ингибирование ангиогенеза (Burroughs S., Kaluz S., Wang D. et al., 2013).

Поскольку основной мишенью бортезомиба является протеасома, он предотвращает деградацию убиквитинированного HIF α , что приводит к его накоплению при нормоксии. Парадоксально, но HIF-1 α , который накапливается при наличии протеасомной блокады транскрипционно, неактивен (Onnis B., Rapisarda A., Melillo G., 2009; Bhattarai D., Xu X., Lee K., 2018). По предполагаемому механизму действия, ингибиторы HIF можно условно разделить на агенты, модулирующие: экспрессию мРНК HIF-1 α , трансляцию α -белка HIF-1, деградацию белка HIF-1 α , связывание с ДНК HIF-1 α и транскрипционную активность HIF-1 α (Onnis B., Rapisarda A., Melillo G., 2009).

Противоопухолевая активность протеасомного ингибитора бортезомиба обусловлена в том числе его способностью репрессировать HIF-1 α -

транскрипционную активность. При низких концентрациях бортезомиб способен нарушать взаимодействие ко-активатора p300-HIF-1 α , путем усиления связывания FIH (factor inhibiting HIF-1) с HIF-1 α . FIH – диоксигеназа гидроксилирует Asn803 в С-концевом домене HIF-1 α , тем самым предотвращая рекрутирование ко-активатора p300, что необходимо для реализации биологических эффектов HIF-1 α в качестве транскрипционного фактора (Li J., Xi W., Li X. et al., 2019).

Интересно, что нужны гораздо более низкие концентрации бортезомиба для подавления активности HIF-1 α , чем требуется для нарушения функций протеасом, предполагая, что механизм ингибирования HIF бортезомибом может быть независимым от протеасомного ингибирования (Onnis B., Rapisarda A., Melillo G., 2009).

Бортезомиб – прекрасный пример одобренного FDA противоопухолевого терапевтического средства, которое косвенно ингибирует HIF и его функции, а также имеет различные механизмы действия в разных моделях рака, что наглядно иллюстрирует всю сложность данной области онкологии.

В ряде исследований была продемонстрирована клеточная гибель после воздействия бортезомиба и комбинации его с бевацизумабом на резистентные к темозоломиду линии глиомы D54, U251 и U87 (Zaky W., Marton C., Miller C. et al., 2017; Tang J.H. et al., 2019).

Тем не менее многие перспективные соединения, показавшие весьма обнадеживающие результаты на стадии исследований *in vitro*, могут демонстрировать низкую клиническую эффективность на поздних стадиях, что составляет около 70% для испытаний фазы II и 60% для испытаний фазы III (Gould S., Junttila M., de Sauvage F., 2015). Эти высокие показатели отсева могут быть связаны с несколькими факторами, включающими влияние гипоксического и/или кислого микроокружения опухоли; достоверность и надежность доклинических моделей; особенности абсорбции, распределения, метаболизма и экскреции лекарства; способ доставки лекарств *in vivo* (Gould S., Junttila M., de Sauvage F., 2015).

Для получения удовлетворительных результатов клинических испытаний на пациентах с глиобластомой важно предварительно оптимизировать проведение доклинических исследований. С этой целью в ряде биомедицинских центров проводятся работы по созданию библиотек ксенотрансплантатов солидных опухолей, в том числе и глиобластомы, с использованием хирургических образцов пациентов, а также по проведению исследования их основных характеристик (Miyai M., Tomita H., Soeda A. et al., 2017; Ji X., Chen S., Guo Y. et al., 2017).

Как уже упоминалось выше, именно такие опухолевые модели считаются лучшими предикторами терапевтического ответа, так как они сохраняют клеточную гетерогенность, особенности микроокружения и молекулярные характеристики исходного рака.

Одним из наиболее часто используемых подходов для подтверждения концепции об эффективности противоопухолевого препарата является подкожная ксенотрансплантация клеток или фрагментов глиобластомы человека в мышей с ослабленным иммунитетом. Подкожная локализация опухоли позволяет визуально наблюдать и оценивать размеры ксенографта, благодаря чему можно быстро проверить эффективность лечения.

Такие эксперименты могут дать ценные результаты, особенно если тестируемые лекарственные средства непосредственно воздействуют на опухолевые клетки, а не на микроокружение, как, например, в случае антиангиогенных препаратов или ингибиторов метаболизма. Исследования такого рода фармакологических субстанций на подкожных моделях могут привести к некорректной интерпретации полученных результатов. Тем не менее, помня об отсутствии золотого стандарта и оценив все преимущества и недостатки опухолевых моделей, можно с уверенностью сказать, что перевитый подкожно PDX является одним из самых предпочтительных объектов для проведения доклинических исследований. В связи с этим было принято решение провести исследование противоопухолевой активности комбинации бортезомиба и темозоломида на подкожных ксенографтах глиобластомы.

Для этого у одной из экспериментальных мышей (животное-донор из 3-й генерации ксенографтов) выделили опухоль, которая характеризовалась как интракраниальным ростом, так и подкожным, сохраняя при этом гистотип исходной опухоли (рисунок 8.22).

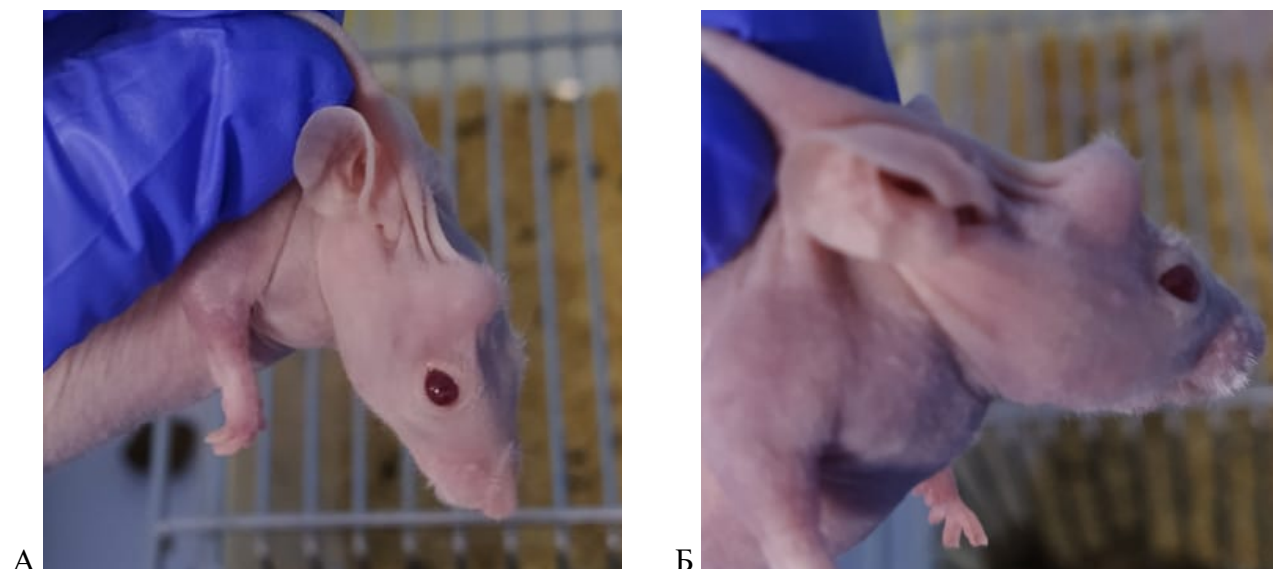


Рисунок 8.22. Экстра-интракраниальный рост ксенографта глиобластомы (3-я генерация) при интракраниальной имплантации опухолевого фрагмента иммунодефицитной мыши линии Balb/c Nude

Затем фрагмент выделенной опухоли имплантировали под правое бедро животному-реципиенту, погружая его в предварительно сформированный при помощи глазного пинцета в жировой прослойке «карман» (рисунок 8.23).

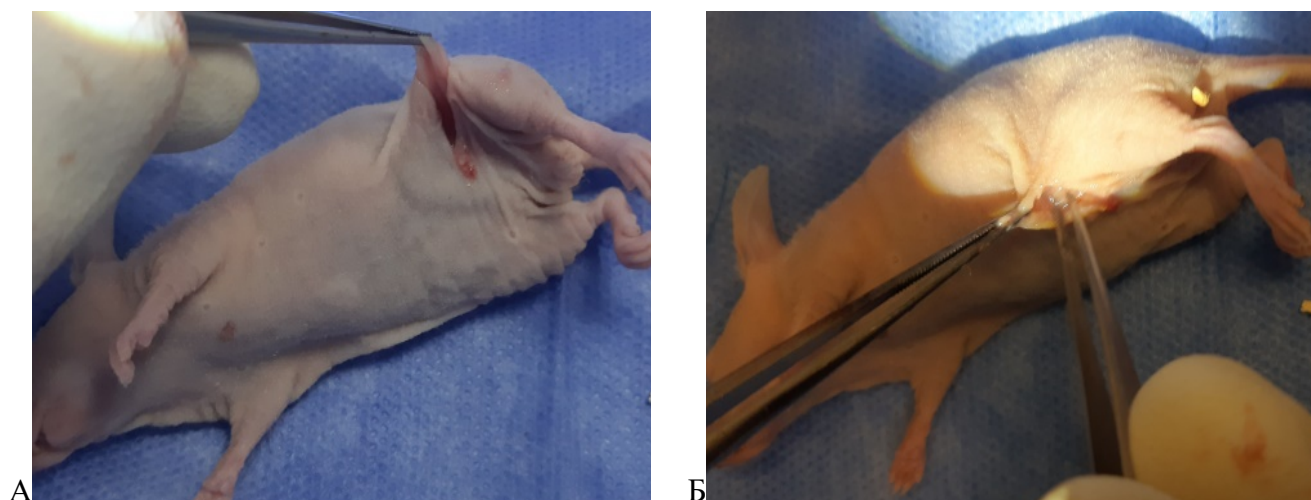


Рисунок 8.23. Создание гетеротопической (подкожной) ксеногенной модели глиобластомы:

А – отделение от кожи пинцетом жировой прослойки и формирование «кармана» для имплантации опухолевого фрагмента; Б – подкожная имплантация опухолевого фрагмента

Другой фрагмент этой же опухоли передали на гистологическое исследование для подтверждения гистотипа исходной опухоли. После этого установили наблюдение за животным-реципиентом с еженедельным клиническим осмотром и измерением массы тела, замеры линейных размеров подкожного ксенографта выполняли дважды в неделю. Благодаря подкожной, а не интракраниальной локализации ксенотрансплантата стало возможным получение опухолевого материала в объеме, достаточном для имплантации его необходимому количеству мышей, что позволило сформировать экспериментальные группы с оптимальным числом животных-опухоленосителей для проведения исследования противоопухолевой активности бортезомиба, темозоломида и их комбинации.

После достижения подкожным ксенографтом объема $\approx 2500 \text{ мм}^3$, выполнили выделение опухолевого узла, аккуратно отделяя кожу и окружающие ткани (рисунок 8.24).

Ткань выделенного опухолевого ксенографта была однородна по цвету и плотности, не содержала некротических участков (рисунок 8.25).

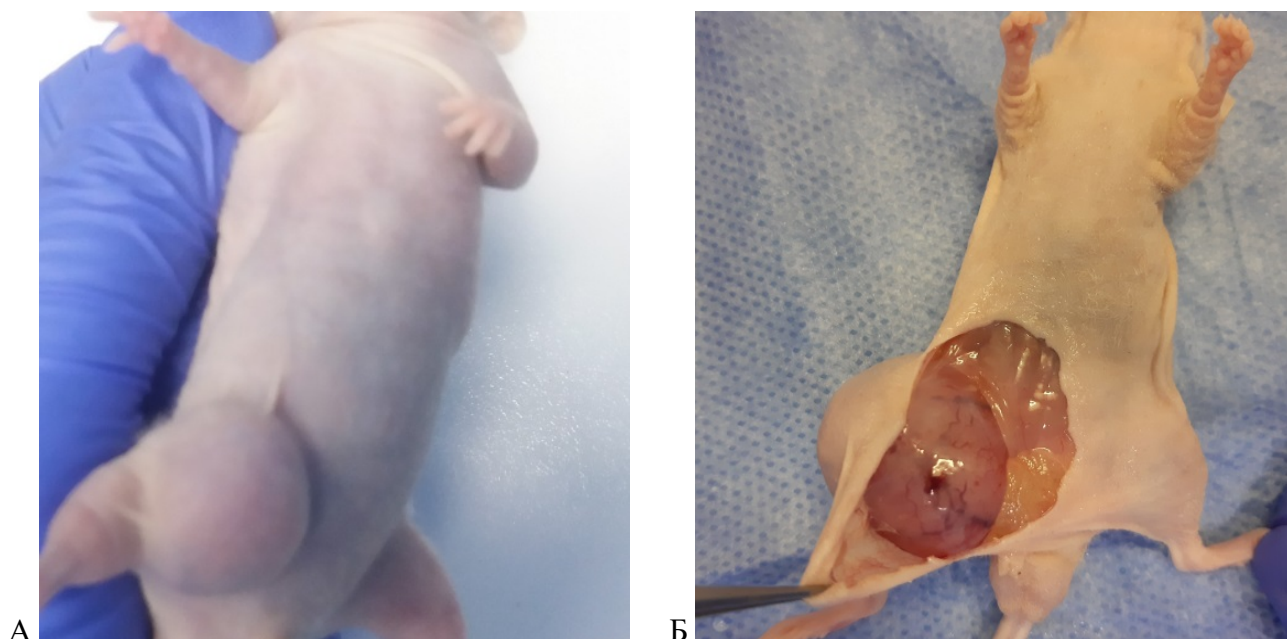


Рисунок 8.24. Создание гетеротопической (подкожной) ксеногенной модели глиобластомы:
 А – вид гетеротопического (подкожного) ксенографта глиобластомы человека;
 Б – выделение подкожного опухолевого узла



Рисунок 8.25. Создание гетеротопической (подкожной) ксеногенной модели глиобластомы.
Вид выделенного ксенографта на разрезе

Выделенный ксенографт помещали в чашку Петри в питательную среду для клеток RPMI-1640, содержащую 1% стрептомицина, и разделяли на фрагменты размером 2×2 мм для последующей подкожной имплантации двадцати иммунодефицитным мышам линии Balb/c Nude (рисунок 8.26).

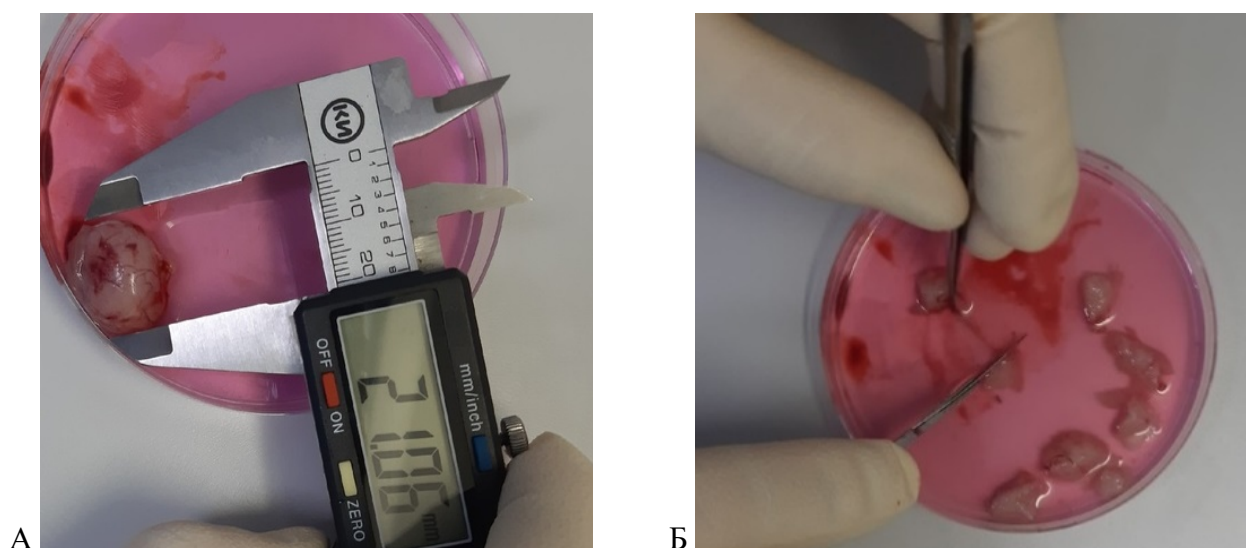


Рисунок 8.26. Создание гетеротопической ксеногенной модели глиобластомы:
А – вид опухолевого узла в чашке Петри с питательной средой; Б – разделение опухолевого узла на фрагменты размером 2×2 мм для последующей подкожной имплантации

Принципиально важный момент заключается в том, что необходимо минимизировать время от момента выделения опухоли до момента имплантации фрагментов животным-реципиентам с целью сохранения жизнеспособности клеток. Чтобы этот временной промежуток был в равной степени мал для каждого

животного из серии, процедуру перевивки подкожных ксенографтов выполняли две пары операторов.

После достижения опухолевыми узлами объема $\approx 100 \text{ мм}^3$ (объем был рассчитан по формуле Шрека $V=\pi/6*L*W*H$) было проведено распределение животных по группам таким образом, чтобы разброс значений между группами был минимальным. Количество животных в группе ($n=5$) было определено согласно принципам 3R (replacement, reduction, refinement) (Workman P. et al., 2010). Информация о распределении мышей по группам, а также о дозах и режимах введения тестируемых препаратов представлена в таблице 8.5.

В качестве контрольного вещества, а также вещества-носителя использовали 0,9%-ный раствор хлорида натрия. В течение всего срока эксперимента проводились клинический осмотр животных, измерение массы тела и оценка роста опухоли.

Информация о проводимых в ходе эксперимента манипуляциях представлена в таблице 8.6.

Для выполнения оценки роста опухоли измеряли линейные размеры опухоли (длину, ширину, высоту) при помощи штангенциркуля и рассчитывали объем опухоли, а затем вычисляли индекс прироста опухоли.

Таблица 8.5 – Распределение животных по группам

Номер группы	Количество животных, пол	Препарат	Путь и режим введения	Доза, объем
1	5 ♀	Темозоломид	5 дней подряд и после этого 2 дня перерыва i.p.	5 мг/кг, в 200 мкл
1	5 ♀	Бортезомиб	Каждые 3 дня i.p.	0,25 мг/кг, в 200 мкл
3	5 ♀	Бортезомиб + темозоломид	Каждые 3 дня i.p. (бортезомиб) и 5 дней подряд и после этого 2 дня перерыва i.p. (темозоломид)	0,25 мг/кг, в 200 мкл для бортезомиба и 5 мг/кг, в 200 мкл для темозоломида
4	5 ♀	Натрия хлорида раствор 0,9% (контроль)	Каждые 3 дня i.p.*	200 мкл

Примечание. i.p.* – интраперитонеальное введение

Таблица 8.6 – Временной протокол исследования противоопухолевой активности препаратов

Этап	Сутки	Масса тела	Клинический осмотр	Измерение опухоли
Подкожная имплантация опухолевого фрагмента		✓	2qw	-
Рост опухолей (примерно 100 mm³)		2qw		2qw с момента появления опухоли
Введение препаратов	1–19			
Эвтаназия	26	✓	✓	✓

Примечание. 2qw – два раза в неделю

Средние значения объемов ксенографтов и индекса прироста опухоли в группе 1 (темозоломид) и группе 2 (бортезомиб) были статистически значимо ниже в сравнении с группой 4 (контроль) на протяжении всего срока эксперимента, начиная с 12-х суток после начала введения препаратов ($p < 0,05$) (рисунок 8.27).

В группе 3 с комбинированным воздействием темозоломидом и бортезомибом средние значения объемов ксенографтов и индекса прироста опухоли были статистически значимо меньше, чем в контрольной группе, начиная с 12-х суток после начала введения препаратов ($p < 0,05$). К завершению эксперимента эти различия стали более очевидны, средние значения объемов ксенографтов и индекс прироста опухоли группы с комбинированным воздействием темозоломидом и бортезомибом были ниже почти в 7 раз, чем соответствующие параметры контрольной группы ($p < 0,001$).

Экспериментальные данные, характеризующие динамику показателя индекса прироста опухоли в этих группах, приведены на рисунке 8.27.

На момент окончания эксперимента был определен показатель торможения роста опухоли (ТРО). Данные представлены на рисунке 8.28.

Наибольшее значение ТРО наблюдалось в группе 3 (темозоломид+бортезомиб), что составило 85,38%. Более низкие значения ТРО были зафиксированы для группы 1 (темозоломид) и группы 2 (бортезомиб), что составило 57,32% и 63,11% соответственно.

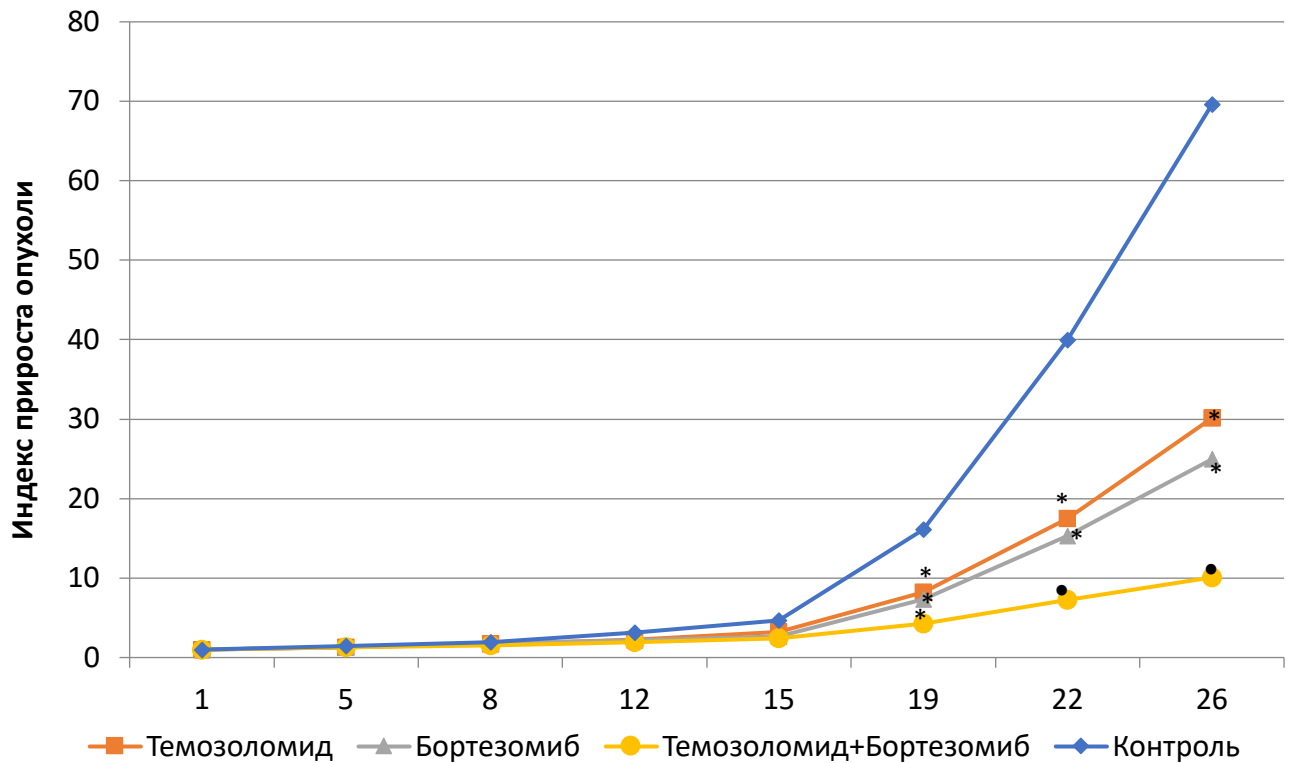


Рисунок 8.27. Динамика изменения индекса прироста опухоли в группах 1 (темозоломид), 2 (бортезомиб), 3 (темозоломид+бортезомиб) и 4 (контроль).

Примечание. * – статистически значимые различия между экспериментальными группами 1 (темозоломид), 2 (бортезомиб), 3 (темозоломид+бортезомиб) и группой 4 (контроль) по критерию Манна-Уитни ($p < 0,05$); • – статистически значимые различия между экспериментальной группой 3 (темозоломид+бортезомиб) и группой 4 (контроль) по критерию Манна-Уитни ($p < 0,001$)

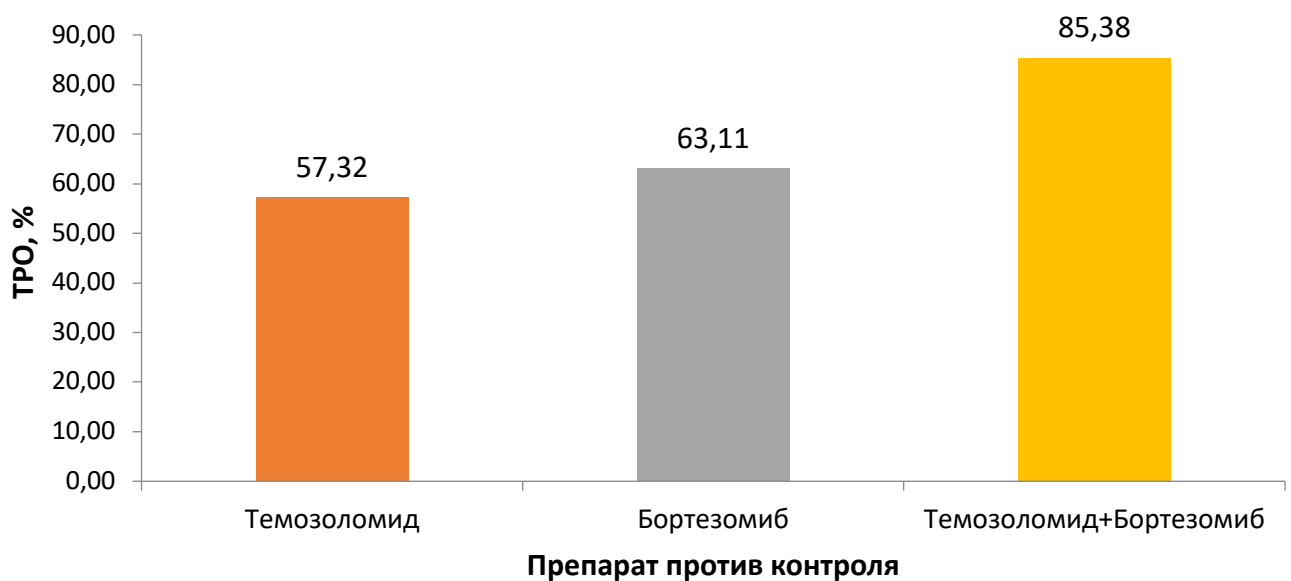


Рисунок 8.28. Показатели ТРО для экспериментальных групп 1 (темозоломид), 2 (бортезомиб) и 3 (темозоломид+бортезомиб)

Проведение последнего прижизненного измерения объемов опухолевых узлов показало, что среднее значение объемов ксенографтов контрольной группы составило $1746,3 \pm 64,3 \text{ мм}^3$, что было статистически значимо больше средних значений объемов ксенографтов группы мышей, принимающих темозоломид, бортезомиб и комбинацию бортезомиба с темозоломидом, что составило $745,3 \pm 57,3$, $644,27 \pm 67,3$ и $255,3 \pm 30,3 \text{ мм}^3$ соответственно.

После последнего прижизненного измерения объемов опухолевых узлов животные были подвергнуты эвтаназии, а опухолевые узлы выделены и взвешены (рисунок 8.29).

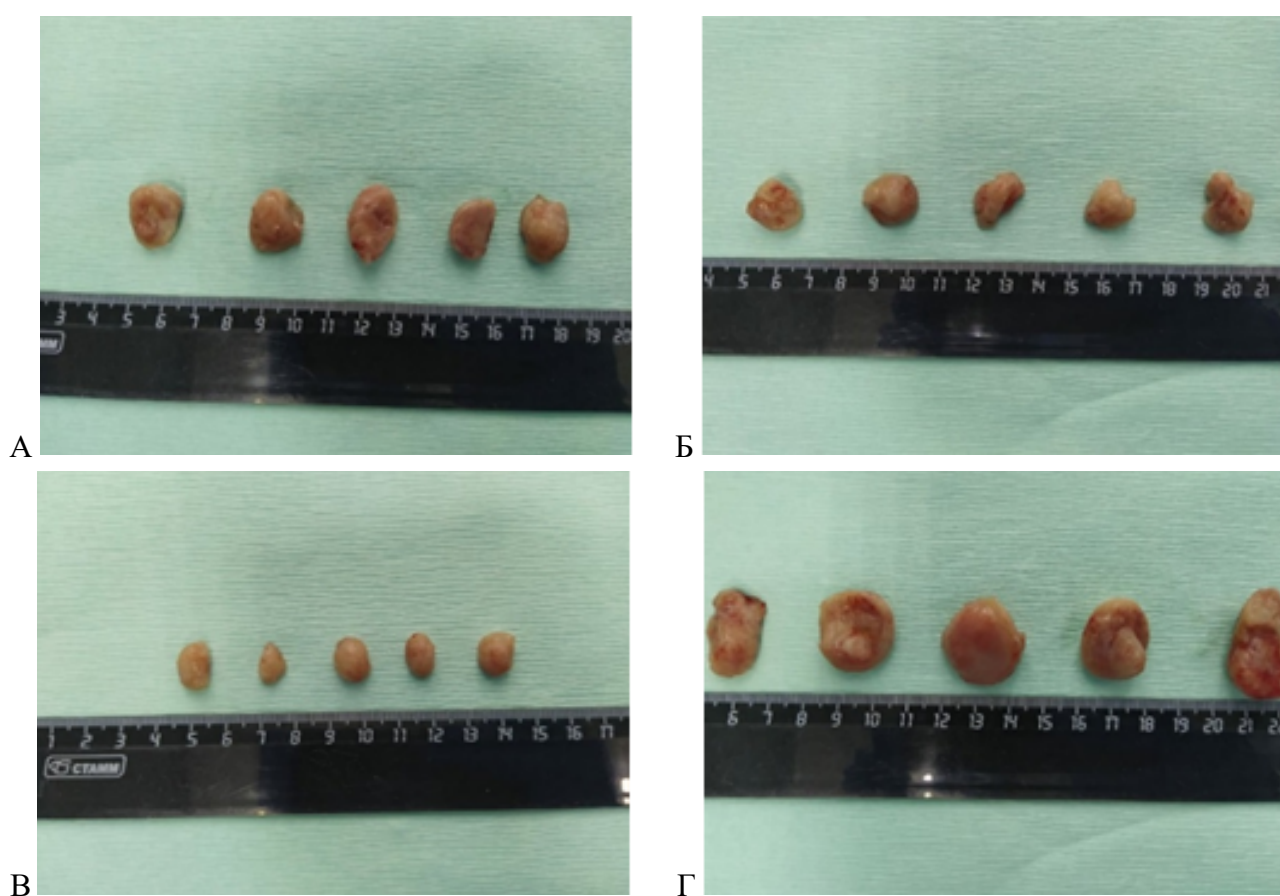


Рисунок 8.29. Вид выделенных опухолевых узлов глиобластомы: А – опухолевые узлы группы 1 (темозоломид); Б – опухолевые узлы группы 2 (бортезомиб); В – опухолевые узлы группы 3 (темозоломид+бортезомиб); Г – опухолевые узлы группы 4 (контроль)

Сформировавшиеся в ходе исследования ксенографты были отделены от окружающих мягких тканей капсулой, инвазии в близлежащие органы не наблюдалось. Полученный опухолевый материал был подготовлен для дальнейших иммуногистохимических и молекулярно-генетических исследований.

Полученные в ходе проделанной работы результаты демонстрируют наличие синергичного противоопухолевого эффекта темозоломида и бортезомиба в отношении первичных культур и PDX глиобластомы человека.

Результаты исследования исследования J.H. Tang et al. (2019) показали, что бортезомиб ингибирует рост опухоли и улучшает эффективность химиотерапии темозоломидом, вероятно, посредством отрицательной регуляции оси FOXM1 – сурвивин. Было продемонстрировано, что уровни экспрессии транскрипционного фактора FOXM1, играющего критическую роль в развитии клеточного цикла, и сурвивина, регулирующего процесс апоптоза, положительно коррелировали друг с другом и оба связаны с плохим прогнозом у больных глиальными опухолями. Выдвинутую гипотезу о возможности рассматривать ось FOXM1 – сурвивин в качестве мишени для бортезомиба подтвердили при помощи экспериментов с определением уровня мРНК и интенсивности иммунофлюоресценции FOXM1, а также проведя исследования на клетках со сверхэкспрессией и нокдауном этих потенциальных мишеней (Tang J.H. et al., 2019).

В работе этих же авторов показана небольшая разница в чувствительности к бортезомибу среди immortalized линий клеток глиомы: при концентрации 5 нмоль/л препарат продолжал оказывать цитотоксическое действие для клеток U87, чего не наблюдалось в отношении клеток U251 (Tang J.H. et al., 2019). Также важно обратить внимание на тот факт, что воздействие комбинации бортезомиба и темозоломида на подкожные ксенографты линии U87 привело к практически полной регрессии опухоли у мышей (Tang J.H. et al., 2019) (рисунок 8.30).

В нашей работе не наблюдалось такого ярко выраженного эффекта, несмотря на использование препаратов в тех же дозах и режимах введения. Причина этого расхождения, как мы полагаем, кроется в принципиальных различиях CDX (cell-line derived xenograft) и PDX (patient derived xenograft).

Ксенографты, созданные при помощи линий раковых клеток или CDX – это хорошо описываемая, легко контролируемая и быстрая с точки зрения временных затрат в эксперименте модель, но вследствие клональной селекции, процесса, возникающего в ходе адаптации клеточных культур к росту на пластике, модели

культурального происхождения не воспроизводят то биологическое разнообразие, которое наблюдается среди человеческих опухолей, а также уступают настоящим опухолям в гистологической, генетической и эпигенетической гетерогенности (Gould S., Junttila M., de Sauvage F., 2015).



Рисунок 8.30. Вид выделенных ксенографтов глиобластомы U87: А – ксенографты контрольной группы; Б – ксенографты группы, принимавшей бортезомиб; В – ксенографты группы, принимавшей темозоломид; Г – ксенографты группы, принимавшей (темозоломид+бортезомиб) (Tang J.H. et al., 2019)

Кроме того, одним из наиболее значимых и в то же время проблемных аспектов является интерпретация результатов. Во многих доклинических исследованиях оценивают статистические различия относительно контрольных групп или устанавливают произвольные пороговые значения и делают вывод о том, что они приведут к значимому, клинически релевантному ответу у пациентов. К сожалению, применение таких показателей эффективности мало подходит для того, чтобы обеспечить значимые результаты в организме человека, что указывает

на необходимость комплексной оценки всех вариантов терапевтического ответа модельной системы.

В связи с этим терапевтические прогнозы, сделанные на основе результатов исследования эффективности противоопухолевого препарата, полученных с использованием в качестве модельного объекта ксенографтов культурального происхождения, не подтверждаются в клинической практике.

Это относительное отсутствие клинического успеха можно рассматривать в качестве доказательства того, что стандартным доклиническим моделям *in vivo* не хватает прогностической значимости.

Однако полученные нами пациентоподобные ксенографты способны преодолеть ограничения клеточных линий в виде избирательной селекции *in vitro* и отсутствия гетерогенности. Разработка пациентоподобной модели и создание в ближайшей перспективе собственной коллекции PDX соответствует общемировому тренду в области экспериментального моделирования опухолевого процесса. Также немаловажным является тот факт, что полномасштабное тестирование лекарственных средств при помощи PDX становится все более обыденным явлением при определении молекулярных мишеней среди большого количества опухолевых популяций. Существует надежда, что подобный подход позволит помочь идентифицировать прогностические биомаркеры ответа на терапию, когда биология мишени не совсем понятна и использование клеточных линий ограничено.

Тем не менее, несмотря на утверждения, что одни модельные системы в доклинических исследованиях лучше других, необходимо понимать, что ни одна существующая модель не может быть единственным методом для подтверждения фармакологической мишени при выборе молекулы действующего вещества. Эта точка зрения обеспечивает разумное, хотя и несколько критическое представление обо всех представленных в данной работе моделях, и обрисовывает в общих чертах основу для правильного использования существующих доклинических моделей для тестирования и разработки новых лекарственных средств.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Вопреки несомненным успехам в лечении глиальных опухолей высокой степени злокачественности, достигнутым за последние 15 лет, только у небольшого числа больных удается получить хотя бы 3-летнюю продолжительность жизни (Мацко М.В., 2020). Большинство больных погибает в первый год от момента постановки диагноза и начала лечения. Быстрый рост опухоли после ее циторедуктивного удаления не позволяет получить хоть сколько-нибудь обнадеживающего результата.

В последние годы прорыв в развитии молекулярно-генетических методов как в фундаментальных исследованиях, так и достижения в современной фармакологии, основанные на результатах этих исследований, вселяют некоторую надежду. Следует признать, что углубленная работа с биологическим материалом пациентов, позволившая сделать открытия последнего времени и разработать на их основании новые трансляционные методы лечения, все-таки не нашла должного отражения в рутинной клинической работе нейроонкологов. Только результаты грамотно выполненных доклинических исследований, учитывающих все индивидуальные особенности пациента, дают возможность врачу поверить в успешность последующих клинических испытаний, и здесь глиальные опухоли стоят некоторым особняком по сравнению с новообразованиями других локализаций. Как оказалось, достаточно сложно произвести живую модель для исследования *in vivo*. В обычных условиях перевивка биологического материала от пациента с глиобластомой сразу под кожу иммунодефицитного животного, а также сама методика забора материала, особенно это касается PDX-моделей, считающихся максимально соответствующими трансляционной медицине, на современном этапе развития экспериментальной онкологии не является до конца отработанной. Нет модели *in vivo*, нет достоверных результатов доклинического исследования, нет возможности оценки эффективности фармакологической субстанции, в итоге — нет исследований в клинике. Анализируя литературу, мы нашли целый перечень таргетных мишеней для глиобластом и новых фармакологических субстанций,

исследованных *in vitro*, однако, учитывая вышесказанное, в арсенале современной нейроонкологии широко применяется только темозоломид. Таким образом, свое исследование мы построили не только с точки зрения поиска новых мишеней для терапии (для нас таковым стал *HIF1A*), но и создания модели *in vivo* для проверки достоверности выдвинутой гипотезы.

В связи с этим цель нашего исследования была следующей: повысить эффективность и улучшить результаты лечения больных глиальными опухолями высокой степени злокачественности путем разработки новых способов ранней диагностики, прогноза течения и лечения, основанных на изучении патогенетических механизмов.

Для реализации поставленной цели нами был создан биобанк образцов глиальных опухолей высокой степени злокачественности за счет использования материала от пациентов ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России (астроцитомы (GII, GIII), глиобластомы (GIV)) с целью валидации относительной экспрессии следующей панели генов: *KDM1A*, *HIF1A*, *EGFR*, *SMAD4*, *HBPI*, *EGLN1*, *EGLN3* – в опухоли и условно-здоровой ткани. Кроме того, нами был проведен сравнительный анализ транскрипционных профилей астроцитом (GII, GIII) и глиобластом (GIV) с целью обнаружения прогностических маркеров и потенциальных мишеней для таргетной терапии и изучен пул микроРНК глиальных опухолей высокой степени злокачественности с точки зрения разработки мишеней для таргетной и генной терапии, а также имеющих предиктивное значение положительного или отрицательного прогноза лечения.

Собранный в работе клинический материал позволил оценить ассоциацию изменения экспрессии выбранной панели генов с общей выживаемостью больных глиальными опухолями высокой степени злокачественности. Для проведения доклинических исследований *in vivo* и *in vitro* с учетом выдвинутой гипотезы нами были созданы клеточные линии глиальных опухолей высокой степени злокачественности и PDX-модель глиальной опухоли высокой степени злокачественности. На последней был апробирован лекарственный препарат, блокирующий сигнальный путь, связанный с *HIF1A*, значимость которого в

развитии глиобластом была доказана в ходе молекулярно-генетических исследований.

Формируя дизайн исследования, мы в первую очередь понимали необходимость создания коллекции образцов глиальных опухолей различной степени злокачественности. Здесь мы столкнулись с рядом трудностей. Во-первых, поскольку мы работали с микроРНК, была необходимость в замораживании нативного опухолевого материала непосредственно в операционной. Во-вторых, электронная база паспортизированных образцов, хранимых в биобанке, не может быть полностью интегрирована в электронную базу пациентов, содержащую полную информацию о клиническом течении заболевания от момента постановки диагноза до летального исхода. Кроме депонируемого материала нативные участки опухолевой ткани из операционной в кратчайшие сроки должны были быть доставлены в лабораторию культуры тканей для создания первичных опухолевых культур и в лабораторный испытательный центр для трансплантации животным. В ходе нашей работы была создана общая база хранимых образцов и клинических данных, которая позволила не только выполнить молекулярно-генетические исследования на паспортизированном материале, но и создать коллекцию первичных культур и PDX-моделей на иммунодефицитных животных для проведения доклинических испытаний *in vitro* и *in vivo*.

В депозитарии ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России были размещен на длительное хранение 221 препарат тотальной РНК, экстрагированный из опухолевой, перифокальной, условно нормальной ткани головного мозга и плазмы крови. Депонированные ткани клинически описанных случаев позволили провести молекулярно-генетическое исследование, сопоставления его результатов с выживаемостью больных. Ряд обнаруженных изменений экспрессии маркеров в разных подгруппах глиальных опухолей головного мозга был ассоциирован с прогностическими показателями:

– в группе диффузных астроцитом низкая экспрессия KDM1A увеличивает продолжительность жизни на 5,5 месяца (OS – 475 vs 298,5 дня; $p=0,0022$);

– у пациентов с анапластической астроцитомой уровень *HIF1A* отрицательно коррелировал с общей выживаемостью (OS – 639 vs 156 дней; $p=0,049$);

– в группе глиобластом сниженная экспрессия *EGFR* и *HIF1A* сопряжено с увеличением продолжительности жизни соответственно на 4 месяца (OS – 340 vs 220 дней, $p=0,045$) и на 3 месяца (OS – 409 vs 317 дней, $p=0,0081$); и напротив, повышение экспрессии *HBPI*, *EGLN1*, *EGLN3* ассоциировано с увеличением продолжительности жизни соответственно на 3,1 месяца (OS – 263 vs 358 дней, $p=0,0058$), на 4,6 месяца (OS – 340 vs 480 дней, $p=0,00037$) и на 5,5 месяца (OS – 289,5 vs 455,5 дня, $p=0,00023$).

Кроме того, нами в ходе работы были обнаружены новые мишени для таргетной терапии: сравнение транскрипционных профилей астроцитом (GII, GIII) и глиобластом (GIV) позволило дискриминировать глиомы GII и глиомы высокой степени злокачественности: для астроцитом (GII) характерно повышение экспрессии гена *KDM1A* ($p=0,00572$) и понижение экспрессии гена *SMAD7*, тогда как в глиомах (GIII, GIV) имеет место aberrантный уровень экспрессии генов *EGFR*, *HIF1A* и *SMAD4/7* ($p<0,01$), что предполагает потенциально высокое терапевтическое значение анти-EGFR, анти-HIF1A и анти-TGF-В препаратов.

Анализируя результаты молекулярно-генетического исследования, мы пришли к выводу о необходимости разделения дальнейших изысканий на три части. Первая – это доклиническое исследование препарата, действующего на мишень с потенциально высоким терапевтическим значением – *HIF1A*, вторая – это поиск предиктивных маркеров положительного и отрицательного исходов лечения, третья – это разработка способов дифференциальной диагностики злокачественных, доброкачественных и метастатических опухолей головного мозга по плазме крови больного.

В ходе исследования *HIF1A* показал свою значимость и как предиктивного маркера, связанного с выживаемостью больных, и как терапевтической мишени для таргетной терапии. В связи с этим основная часть заключения будет посвящена исследованию его значения в развитии глиальных опухолей.

Влияние гипоксии в онкогенезе хорошо изучено после доклада Томлинсона и Грея в 1950-х годах (Thomlinson R.H., Gray L.H., 1955). Они идентифицировали присутствие гипоксических клеток, окружающих некротический опухолевый центр, в гистологических срезах карцином. Через несколько десятилетий после этого первого описания гипоксических клеток Ван и Семенца открыли индуцируемый гипоксией фактор-1 α (*HIF1A*), важный фактор транскрипции для адаптации к гипоксии (Wang G.L., Semenza G.L., 1993). Хотя изначально *HIF1A* был идентифицирован как ключевой фактор ответа на гипоксию, и многие явления гипоксического ответа являются результатом активации передачи сигналов *HIF1A* (Suda T., Takubo K., Semenza G.L., 2011). Накапливающиеся в последнее время доказательства выявили множество независимых от гипоксии механизмов активации передачи сигналов HIF1A (Hayashi Y., Zhang Y., Yokota A. et al., 2018). Эти механизмы могут вызвать псевдогипоксическое состояние даже при наличии достаточного уровня кислорода. Термин «псевдогипоксия» первоначально использовался для обозначения метаболических изменений, подобных гипоксии, при диабете (Williamson J.R., Chang K., Frangos M. et al., 1993). Поскольку многие явления при гипоксии можно объяснить с помощью *HIF1A*, независимая от гипоксии активация передачи сигналов *HIF1A* может имитировать многие явления, опосредованные гипоксией, даже в условиях нормоксии.

Фактор-1 α , индуцируемый гипоксией, первоначально был определен как критический фактор клеточной адаптации к условиям гипоксии. Известно, что внутриопухолевая гипоксия является важной характеристикой солидных опухолей и приводит к активации индуцируемого гипоксией фактора 1- α (HIF1A). Таким образом, нарушение регуляции передачи сигналов HIF1A может приводить к множеству патологических состояний. Предыдущие исследования показали, что HIF1A играет критически важную роль в поддержании энергетического метаболизма опухолевых клеток (Hu L.P., Zhang X.X., Jiang S.H. et al., 2019), ангиогенезе опухоли, ускорении пролиферации и метастазирования опухоли (Wen Y., Zhou X., Lu M. et al., 2019).

Количество HIF1A-регулируемых генов превышает 1000, поскольку новые типы клеток и условия анализируются с помощью новых методов (Semenza G.L. 2013). Это транскрипционные факторы, которые позволяют клеткам справляться с гипоксией (Semenza G.L., 2013), они способствуют ангиогенезу (регулируя экспрессию VEGF) (Levy A.P., Levy N.S., Wegner S., Goldberg M.A., 1995) и выживанию клеток (через инсулиноподобный фактор роста-2) (Feldser D., Agani F., Iyer N.V. et al., 1999), они повышают метаболизм глюкозы (опосредовано через переносчик глюкозы-1,3-GLUT1, 3) (Keith B., Simon M.C., 2007) и способствуют инвазии опухоли (регулируя матриксные металлопротеиназы – MMP) (Ben-Yosef Y., Lahat N., Shapiro S. et al., 2002). Для различных типов опухолей высокие уровни HIF1A и HIF2A тесно связаны со злокачественностью, инвазивностью, метастазированием и плотностью сосудов (Liao D., Corle C., Seagroves T.N., Johnson R.S., 2007). Гипоксия-индуцибельный фактор-1 α экспрессируется повсеместно, а экспрессия *HIF1A* строго контролируется на транскрипционном, трансляционном и посттрансляционном уровнях (Masoud G.N., Li W., 2015). Среди них посттрансляционная модификация является наиболее важным регулированием HIF1A. Стабильность белка HIF1A регулируется кислородзависимым доменом деградации посредством гидроксилирования пролиновых остатков 402 и 564 белками пролилгидроксилазного домена (PHD/EGLN). Эти модификации способствуют взаимодействию с супрессором опухоли – белком фон Хиппель-Линдау (VHL) и последующей деградации (Kaelin W.G., 2005).

Повсеместно экспрессирующийся ингибитор субъединицы HIF-1 α HIF1AN (также известный как FIH1) может также подавлять транскрипционную активность *HIF1A* в условиях нормоксии путем гидроксилирования сайта 803 Asp белка HIF-1 α (Elkins J.M., Hewitson K.S., McNeill L.A. et al., 2003). Данные важные ферменты для посттрансляционной модификации HIF-1 α нуждаются в кислороде для их каталитической реакции. Таким образом, гипоксия может ингибировать посттрансляционные модификации HIF-1 α , что стабилизирует белок HIF-1 α , а также сохранять транскрипционную активность *HIF1A*. Но, важно

отметить, что были описаны пути независимой от кислорода активации *HIF1A* (Hayashi Y. et al., 2019).

В нашем исследовании выявленная высокая активность *HIF1A* коррелировала с результатами исследования ростовых факторов в ткани опухоли и перифокальной зоне. В развитии ангиогенеза особую роль играют фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), фактор роста фибробластов (FGF), трансформирующие факторы роста альфа и бета, которые известны как факторы «запуска» ангиогенеза, и другие факторы. Наши результаты согласуются с данными о том, что VEGF-A как ключевой фактор роста и его рецептор, участвующие в ангиогенезе, повышены в глиомах классов GII, GIII, GIV, менингиомах классов GI и GII (Hatva E., Kaipainen A., Mentula P. et al., 1995). Авторы показали, что в злокачественных опухолях уровень этого фактора роста был значимо выше, чем в менингиомах. Увеличение уровня VEGF в ткани глиобластом показано многочисленными исследованиями (Gacche R.N., Meshram R.J., 2013; 2014; Welti J., Loges S., Dimmeler S., Carmeliet P., 2013; Nijaguna M.B., Patil V., Urbach S. et al., 2015).

Было показано, что HIF участвует в поддержании транскрипции гена Oct4, широко экспрессируемого в глиальных стволовых клетках, что является причиной агрессивного роста и прогрессирования глиомы (Holmberg J. et al., 2011). Несмотря на явную терапевтическую значимость *HIF1A* при глиомах высокой степени злокачественности, на данный момент не существует клинических исследований, оценивающих эффективность ингибирования данного фактора.

Мы изучили также микроРНК, которые участвуют в регуляции активности HIF1A. Уровень miR-22-5p (медиана 2dCt=0,64; p=0,001132) и miR-107 (медиана 2dCt=0,55; p<0,000001) снижен в опухолевой ткани, относительно условно-здоровой. мРНК *HIF1A* выступает потенциальной мишенью данных микроРНК, сниженная активность которых, возможно, участвует в модуляции транскрипционной активности *HIF1A* в глиомах высокой степени злокачественности, наряду с *EGLN1/3*. MiR-324-5p (медиана 2dCt=0,46; p<0,000001) и miR-326 (медиана 2dCt=0,71; p=0,012362) демонстрируют снижение

транскрипционной активности в опухолевой ткани. Эти микроРНК таргетируют 3'UTR мРНК гена *SMO* (медиана 2dCt=1,19, p=0,061523), активность которого имеет тенденцию повышаться в глиомах высокой степени злокачественности. В эксперименте было показано, что увеличение экспрессии miR-326 подавляет активность не только гена *SMO*, но и всего сигнального пути Hedgehog в целом (Du W. et al., 2014).

Было продемонстрировано, что фармакологическое или генетическое ингибирование *KDM1A* вызывает апоптоз и снижает пролиферацию и миграцию опухолевых клеток за счет регуляции уровня белка HIF-1 α (Saccà C.D. et al., 2019). Регуляция HIF-1 α – не единственный механизм, связывающий ингибирование *KDM1A* и активацию старения. Укорочение теломер и повреждение ДНК также приводят к клеточному старению (Bernadotte A., Mikhelson V.M., Spivak I.M., 2016), и оба эти процесса регулируется KDM1A (Porro A., Feuerhahn S., Lingner J., 2014). Более того, было показано, что два разных типа деметилаз H3K9, KDM1A и JMJD2C отключают индуцированную онкогенами выживаемость клеток, обеспечивая экспрессию генов-мишеней E2F (Yu Y., Schleich K., Yue B. et al., 2018). Наконец, было показано, что инактивация *KDM1A* ускоряет старение стволовых клеток трофобласта путем индукции Sirt4 (Castex J., Willmann D., Kanouni T. et al., 2017). Таким образом, *KDM1A* может быть регуляторным центром, контролирующим различные аспекты клеточного старения, метаболические пути и онкогенез. Локальная активация старения при опухолевых заболеваниях может служить мощным инструментом для остановки онкогенеза (Nardella C. et al., 2011). Такая терапия не только способствует стабильной остановке роста клеток, но и действует как сильный стимул активации противоопухолевого иммунного ответа (Sieben C.J. et al., 2018).

Оценка относительной экспрессии генов *EGLN1* (медиана 2dCt=0,71; p=0,001623) и *EGLN3* (медиана 2dCt=0,51; p=0,004231) показала снижение мРНК этих маркеров в опухолевой глиальной ткани. Роль продуктов генов *EGLN1* и *EGLN3* заключается в инактивировании белка HIF-1 α через гидроксирование аминокислотных остатков пролина, входящих в состав полипептидной цепи

HIF-1 α , ведущей к дальнейшей деградации. Поскольку реакция гидроксирования в данном случае требует присутствия молекулярного кислорода, то таким образом любые изменения в его концентрации в клетке отслеживаются при участии данных ферментов. Помимо этого, EGLN3 и EGLN1 участвуют в гидроксировании ряда белков, включая α -субъединицы других HIF, субъединицу РНК-полимеразы II, пируваткиназы M2 и β 2-адренергические рецепторы. Роль *EGLN3* /1 в канцерогенезе до конца не ясна и вызывает множество споров. Данные факторы могут выступать в качестве супрессоров опухолевого роста, но в то же время и способствовать более интенсивной пролиферации и инвазии опухолевых клеток. Кроме того, была показана связь изменения экспрессии *EGLN3* с индукцией апоптоза (Мао К. et al., 2017).

Проведенное клиническое исследование значения молекулярно-генетических механизмов в развитии злокачественных опухолей головного мозга подтвердило важность HIF-1 α как потенциальной мишени для повышения эффективности лечения.

Известно, что онкогенные клетки более чувствительны к протеасомному торможению, чем обычные, что дает повод рассматривать ингибиторы протеасом (ИП) в качестве препаратов, обладающих противоопухолевым действием (Johnson D., 2015; Teicher B., Tomaszewski J. 2015). Первым из ИП, одобренным FDA, стал препарат «Бортезомиб», используемый для лечения множественной миеломы, рецидивирующей/рефрактерной миеломы плазмы и мантийноклеточной лимфомы (Gandolfi S., Laubach J., Hideshima T. et al., 2017).

Бортезомиб действует на протеасому, что предотвращает деградацию убиквитинированного HIF-1 α и приводит к его накоплению при нормоксии. Парадоксально, но HIF-1 α , который накапливается при наличии протеасомной блокады транскрипционно неактивен (Onnis B., Rapisarda A., Melillo G., 2009; Bhattarai D., Xu X., Lee K., 2018). Данный препарат был выбран нами для доклинического исследования как один из наиболее перспективных. На сегодняшний день в России нет известных исследований по изучению активности

фармакологических субстанций на индивидуальных клеточных культурах и PDX-моделях глиобластом. С нашей точки зрения, отработка алгоритма и методики таких исследований весьма актуальна.

При разработке более эффективных терапевтических подходов решающее значение имеют исходные модели *in vitro*, поскольку они служат платформой для скрининга новых терапевтических агентов. Несмотря на сложности в создании первичных культур и гетерогенность клеток в них, многие исследования показали корреляцию между чувствительностью первичных культур к химиотерапевтическим препаратам и результатами лечения пациентов. Также первичные клеточные культуры успешно используются в разработке индивидуализированного подхода в лечении онкологических заболеваний и для тестирования противоопухолевых препаратов (Ситковская А.О., Росторгуев Э.Е., Межевова И.В. и соавт., 2019).

Первичные клеточные культуры гораздо лучше, чем постоянные клеточные линии, отображают свойства опухоли *in vivo*, так как их получают непосредственно из послеоперационного материала (Timofeeva S.V., Kit O.I., Sitkovskaya A.O. et al., 2020).

В ходе экспериментов нами была изучена эффективность применения 5-АЛК для получения жизнеспособных тканей глиальных опухолей, подобраны условия среды культивирования для получения из опухолевой ткани клеток и отработана методика оценки генетической стабильности первичных клеточных линий в течение нескольких пассажей. В результате нами было получено 26 первичных клеточных линий нейроэпителиальных опухолей мозга. Первым этапом бортезомиб был отобран на первичных культурах глиом, где показал свою эффективность.

Полученные в ходе проделанной работы результаты демонстрируют наличие синергичного противоопухолевого эффекта темозоломида и бортезомиба в отношении глиобластом человека. Это согласуется с данными исследования J.H. Tang et al. (2019), где при помощи МТТ-теста было показано, что воздействие комбинации этих веществ привело к заметно более низким показателям

выживаемости клеток и значительно более высоким показателям ингибирования пролиферации, чем эти препараты по отдельности, что подтверждает гипотезу о значимости ИП в лечении глиобластом.

Результаты МТТ-теста авторы объясняют способностью бортезомиба подавлять жизнеспособность и пролиферацию клеток U251 и U87 в зависимости от дозы и времени путем индукции апоптоза и остановки клеточного цикла. Происходит ингибирование протеасомы 26S, которая присутствует в ядре и цитозоле и является ключевым компонентом, катализирующим расщепление ряда белков, участвующих в регуляции жизненного цикла клеток. Возникший процесс торможения протеолиза и приводит к апоптозу (Tang J.H. et al., 2019).

Понимание того, что особенности формирования опухолей мозга, а также их терапия во многом зависят от взаимодействия опухолевых клеток друг с другом и их микроокружением, привели к необходимости ортотопической ксенотрансплантации опухолевого материала, взятого непосредственно от пациентов.

Найденные нами в свободном доступе протоколы по созданию ортотопических ксеногенных моделей опухолей головного мозга описывают работы, предполагающие исключительно инъекцию культуральной линии или клеточной суспензии предварительно дезагрегированной опухолевой ткани (Joo K., Kim J., Jin J. et al., 2013; Lee J., Jo D., Kim J. et al., 2019). В связи с этим, было принято решение модифицировать протокол по установке интракраниальных ксенографтов (Ozawa T., James C.D., 2010) в части, касающейся процесса создания доступа к тканям мозга животного и непосредственно процедуры имплантации опухолевого материала. Для создания первой генерации ксенографтов в рамках одной процедуры опухолевый материал пациента имплантировали трем иммунодефицитным мышам линии Balb/c Nude. Полученный PDX поддерживали путем серийной ортотопической трансплантации (1-я, 2-я и 3-я генерация ксенографтов), причем каждая последующая генерация показывала более высокую скорость роста, чем предыдущая. Этот феномен может являться наглядной демонстрацией принципа клональной селекции, в ходе

которой происходит отбор наиболее быстро растущих клонов клеток, что, в свою очередь, приводит к стабилизации некоторых биологических характеристик, таких как процент перевиваемости, продолжительность латентной фазы, динамика роста ксенографта, с другой стороны, многократное пассирование со временем приводит к снижению внутриопухолевой гетерогенности. Разработанная нами ортотопическая ксеногенная модель продемонстрировала гистологическое сходство с исходной опухолью, а также способность воспроизводить соответствующее микроокружение.

Нами было проведено исследование противоопухолевой активности бортезомиба, темозоломида и их комбинации на подкожных ксенографтах глиобластомы. Для этого у одной из экспериментальных мышей (животное-донор из 3-й генерации ксенографтов) выделили опухоль, которая характеризовалась как интракраниальным ростом, так и подкожным, сохраняя при этом гистотип исходной опухоли. Затем фрагмент выделенной опухоли имплантировали под правое бедро 20 животным-реципиентам. В ходе дальнейшего доклинического исследования была выявлена эффективность использования схемы бортезомиба и темозоломида. Таким образом, разработанный нами протокол доклинических исследований с использованием первичных клеточных культур и PDX-моделей доказал свою эффективность, особенно для трансляции данных, полученных в ходе фундаментальных исследований в клинике.

В настоящее время роль отдельных микроРНК в глиальных опухолях изучена недостаточно. МикроРНК предоставляют собой малые некодирующие регуляторные РНК, направленные на снижение стабильности и/или ингибирование трансляции мРНК-мишеней, с которыми имеют полную или частичную комплементарность. Данные регуляторные молекулы, играя важную роль в патогенезе, развитии и прогрессировании опухоли, реализации ответа на терапию, особенно перспективны для диагностики, в том числе малоинвазивной (уровень в плазме, сыворотке или ликворе).

Результаты нашего исследования демонстрируют увеличение транскрипционной активности микроРНК-155-5p (медиана 2dCt=2,9; $p=0,003132$)

и микроРНК-21-5p (медиана 2dCt=3,7; $p=0,002556$), потенциальной мишенью которых является мРНК гена *HBP1* (медиана 2dCt=0,72; $p=0,003264$), что может обуславливать ингибирование уровня мРНК *HBP1*. В связи с тем, что *HBP1* контролирует ряд регуляторов клеточного цикла, отмеченные микроРНК проявляют онкогенный эффект и могут выступать как потенциальные терапевтические мишени.

В итоге идентифицировано две группы малых РНК с увеличенным уровнем экспрессии (*hsa-miR-155-5p*, *hsa-miR-21-5p*) в опухолевой ткани глиом высокой степени злокачественности или, наоборот, с достоверно меньшим уровнем экспрессии (*hsa-miR-215-5p*, *hsa-miR-22-3p*, *hsa-miR-107*, *hsa-miR-324-5p*, *hsa-miR-330-3p*, *hsa-miR-326*) по сравнению с условно нормальной тканью мозга, что может быть использовано для диагностических целей и разработки новых терапевтических подходов.

В нашем исследовании повышенная экспрессия микроРНК-466 негативно коррелирует с уровнем мРНК онкогена *CKS2*, кодирующего регуляторную субъединицу 2 циклин-зависимой киназы, которые являются зависимыми от клеточного цикла протеинкиназами. Повышенная экспрессия *CKS2* ассоциируется с прогрессированием опухоли при раке мочевого пузыря, гепатоклеточной карциноме, молочной железы и при глиобластомах (Zhang X.M., Wang J., Liu Z.L. et al., 2020).

Для генов, продемонстрировавших дифференциальную экспрессию в глиомах, был идентифицирован пул таргетирующих их микроРНК, которые в той же выборке глиальных опухолей обладали либо статистически значимой повышенной транскрипционной активностью (*hsa-miR-155-5p*, *hsa-miR-21-5p*, *hsa-miR-497-5p*, *hsa-miR-146a-5p*, *hsa-miR-92a-1-5p*), либо пониженным уровнем экспрессии (*hsa-miR-155-5p* и *hsa-miR-21-5p*), что может быть перспективно для разработки новых терапевтических подходов в лечении глиом высокой степени злокачественности.

Основной принцип диагностики глиальных опухолей основан на морфологическом, иммуногистохимическом и молекулярном анализе участков

ткани опухоли, изъятых интраоперационно. Диагноз зависит от опыта нейроморфолога, отличается трудоемкостью и длительностью проведения (5–6 дней), иногда требует повторных исследований в других центрах, удлиняя сроки установления диагноза (Perry A., Wesseling P., 2016).

Дерегулированные микроРНК могут быть обнаружены в хирургических образцах и биологических жидкостях – сыворотке, плазме, моче и спинномозговой жидкости пациентов, что позволяет предположить, что микроРНК могут стать неинвазивным биомаркером для диагностики опухолевых заболеваний (Kumar P., Dezso Z., MacKenzie C. et al., 2013).

Для решения задач дифференциальной диагностики злокачественных, доброкачественных и метастатических опухолей головного мозга нами разработаны способы, основывающиеся не только на микроРНК, но и на уровне биохимических маркеров (трипсиноподобных протеиназ плазмы крови).

Предыдущие исследования (Santangelo A., Imbrucè P., Gardenghi B. et al., 2018) демонстрировали различные сигнатуры микроРНК, дифференцирующих пациентов с глиальной опухолью от здоровых лиц с различной диагностической эффективностью. Например, в скрининговом исследовании (Hi F., Shao N., Wang R. et al., 2015), в рамках которого оценивали 739 микроРНК в образцах сыворотки 90 пациентов с астроцитомой, идентифицировали девять микроРНК (miR-15-5p, miR-16-5p, miR-19a-3p, miR-19b-3p, miR-20a-5p, miR-106a-5p, miR-130a-3p, miR-181b-5p и miR-208a-3p) в качестве потенциальных биомаркеров, способных дифференцировать астроцитомы от контрольной группы (AUC, 0,9722). Результатом настоящего исследования стали подбор и апробация диагностической панели с использованием микроРНК и экспрессии генов, дифференцирующих опухоли GII и GIII-IV (Кит О.И. и соавт., 2019). Кроме того были определены перспективные микроРНК и на основании относительного уровня их экспрессии в плазме крови разработаны подходы малоинвазивной диагностики глиальных опухолей высокой степени злокачественности.

Таким образом, улучшение результатов лечения глиальных опухолей, с нашей точки зрения, заключается во внедрении мультидисциплинарного подхода

в фундаментальные и клинические исследования. Обращает на себя внимание важность организации правильного оборота биологического материала в учреждениях, реализующих такие научные разработки, эффективность которого определяется не только внедрением административных протоколов и регламентов, но и общей заинтересованностью всех участников проекта. Результативность исследования во многом зависит от модератора команды, который должен не только выработать «бумажные» принципы взаимодействия, но и найти подход к специалистам разных сфер фундаментальных исследований. Работа над диссертацией заставила меня, как модератора команды, приобрести гибридные знания, позволившие участвовать на всех этапах научного поиска, объединив результаты молекулярно-генетических, культуральных, биохимических, экспериментальных исследований.

ВЫВОДЫ

1. Создан биобанк образцов глиальных опухолей пациентов ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России, который позволил валидировать отобранные в ходе биоинформационного анализа на базе данных TCGA маркеры астроцитом (GII, GIII) и глиобластом (GIV), при этом выявлены существенные различия в транскрипционной активности опухоли относительно условно-здоровой ткани, а именно:

- для группы диффузной астроцитомы (GII) достоверное изменение относительной экспрессии отмечено для гена *KDM1A* (медиана 2dCt=1,49; $p=0,00572$) с частотой встречаемости высокого уровня экспрессии у 73% пациентов;

- в группе анапластических астроцитом (GIII) достоверное повышение относительной экспрессии в опухолевой ткани отмечено для гена *HIF1A* (медиана 2dCt=1,39, $p=0,012367$) с частотой 73% случаев;

- в группе глиобластом (GIV) статистически значимые отличия относительной экспрессии зафиксированы для генов *HBPI* (медиана 2dCt=0,728470; $p=0,003264$), *HIF1A* (медиана 2dCt =1,546421; $p=0,007612$), *EGLN1* (медиана 2dCt=0,714268; $p=0,001623$), *EGLN3* (медиана 2dCt=0,517692; $p=0,004231$), *EGFR* (медиана 2dCt=1,836822; $p=0,021324$), *SMAD4* (медиана 2dCt=0,838454; $p=0,016534$), *SMAD7* (медиана 2dCt=0,390712; $p=0,000003$).

2. Достоверно доказано, что изменения экспрессии ряда генов являются прогностическими показателями глиальных опухолей высокой степени злокачественности:

- в группе диффузных астроцитом (GII) низкая экспрессия *KDM1A* ассоциирована с увеличением продолжительности жизни (медиана 475 дней (211–638) vs 298,5 дня (149–564); $p=0,0022$);

- у пациентов с анапластической астроцитомой (GIII) уровень *HIF1A* отрицательно коррелировал с общей выживаемостью (медиана – 639 (156–704) дней vs 156 (37–231) дней; $p=0,049$);

- в группе глиобластом (GIV) сниженная экспрессия *EGFR* и *HIF1A*

ассоциирована с увеличением продолжительности жизни соответственно, медиана – 340 (87–497) дней vs 220 (134–470) дней, $p=0,045$ и – 409 (140–517) дней vs 317 (130–503) дней, $p=0,0081$; и напротив, повышение экспрессии *HBPI*, *EGLN1*, *EGLN3* – с увеличением продолжительности жизни соответственно – 263 (85–506) дней vs 358 (128–499) дней, $p=0,0058$, и 340 (199–629) дней vs 480 (285–644) дней, $p=0,00037$ и медиана – 289,5 (157,5–573) дней vs 455,5 (217,5–628,5) дней, $p=0,00023$.

3. Сравнение транскрипционных профилей диффузных (GII) и анапластических астроцитом (GIII) и глиобластом (GIV) позволило дискриминировать глиомы GII и глиомы высокой степени злокачественности: для астроцитом (GII) характерно повышение экспрессии гена *KDM1A* ($p=0,00572$) и понижение экспрессии гена *SMAD7*, тогда как в глиомах (GIII, GIV) имеет место aberrантный уровень экспрессии генов *EGFR*, *HIF1A* и *SMAD4/7* ($p<0,01$), что предполагает потенциально высокое терапевтическое значение анти-EGFR, анти-HIF1A и анти-TGF- β препаратов.

4. Для генов, продемонстрировавших дифференциальную экспрессию в глиомах, был идентифицирован пул таргетирующих их микроРНК, которые в той же выборке глиальных опухолей обладали либо статистически значимой повышенной транскрипционной активностью (*hsa-miR-155-5p*, *hsa-miR-21-5p*, *hsa-miR-497-5p*, *hsa-miR-146a-5p*, *hsa-miR-92a-1-5p*), либо пониженным уровнем экспрессии (*hsa-miR-155-5p* и *hsa-miR-21-5p*), что может быть перспективно для разработки новых терапевтических подходов в лечении глиом высокой степени злокачественности.

5. На основании полученных транскрипционных паттернов и последующего интерактомного анализа взаимодействия микроРНК и мРНК генов, ассоциированных с выживаемостью, были отобраны маркеры, перспективные в качестве мишеней таргетной и генной терапии, в том числе 15 генов (*HIF1A*, *HBPI*, *EGLN1*, *EGLN3*, *EGFR*, *KDM1B*, *KDM1A*, *NOTCH1*, *NOTCH2*, *MSI1*, *MSI2*, *SMAD4*, *SMAD7*, *SMO*, *TET1*) и 13 микроРНК (*miR-215-5p*, *miR-122-5p*, *miR-146a-5p*; *miR-326*, *miR-497-5p*, *miR-92a-1-5p*, *miR-107*, *miR-22-3*, *miR-34a-5p*,

miR-324-5p, miR-330-3p, miR-155-5p и miR-21-5p).

6. В тканях глиальных опухолей высокой степени злокачественности и их перифокальных зонах достоверно ($p < 0,01$) выше содержание VEGF-A ($16974,5 \pm 12051$ и $6850,8 \pm 436,1$) TGF- β 1 ($4095,4 \pm 313,8$ и $3931,7 \pm 324,2$). В тканях глиальных опухолей высокой степени злокачественности и их перифокальных зонах сильная положительная корреляционная связь уровня VEGF-A прослеживалась с содержанием EGF, IGF-I, IGF-II и TGF- β 1.

7. В тканях глиальных опухолей высокой степени злокачественности содержание обеих форм ингибиторов активаторов плазминогена (PAI-1-АГ – $509,5 \pm 38,3$ нг/г тк и PAI-1-акт – $21,44 \pm 1,6$ ед/г тк) по сравнению с их перифокальными зонами ($230,4 \pm 17,6$ нг/г тк и $8,90 \pm 0,7$ ед/г тк) содержится достоверно ($p < 0,05$) более высокое количество, что позволяет считать эти белки опухоль-ассоциированными. Расчетный коэффициент соотношений проурокиназы (uPA-АГ)/ урокиназа (uPA-акт) в неизменной перифокальной зоне оболочечной опухоли составлял $70,9 \pm 5,4$, по сравнению к перифокальной зоне глиомы $297 \pm 22,3$, а в опухоли $172 \pm 13,1$ ($p < 0,05$), что доказывает непосредственное участие сериновой протеиназы и ее ингибитора PAI-1 в метаболизме злокачественных глиом.

8. Разработана многоэтапная PDX-модель глиом высокой степени злокачественности, включающая ортотопическую трансплантацию фрагментов ткани глиом иммунодефицитным мышам с последующими пассажами и подкожной перевивкой, на которой показан синергический эффект бортезомиба с темозоломидом в виде уменьшения объема опухоли в 6,8 раза по сравнению с контролем: среднее значение объемов ксенографтов контрольной группы составило $1746,3 \pm 64,3$ мм³, что было статистически значимо больше средних значений объемов ксенографтов группы мышей, получавших темозоломид ($745,3 \pm 57,3$ мм³), бортезомиб ($644,27 \pm 67,3$ мм³) и комбинацию этих препаратов $255,3 \pm 30,3$ мм³). Получены статистически значимые различия между экспериментальной группой с комбинацией препаратов и контрольной по критерию Манна – Уитни ($p < 0,001$).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Рекомендуем использовать разработанную оригинальную тест-систему по выявлению специфичного паттерна микроРНК в плазме крови для неинвазивной диагностики глиальных опухолей высокой степени злокачественности (специфичность – 71,2% и чувствительность – 100%; площадь под ROC-кривой – 88,5%) и для их дифференцировки с метастатическими поражениями головного мозга (специфичность – 61,1% и чувствительность – 100%, площадь под ROC-кривой – 82%).

2. Рекомендуем использовать разработанный оригинальный способ дифференциальной диагностики (первичной глиальной) доброкачественной и злокачественной опухоли головного мозга, заключающийся в определении величины активности трипсиноподобных протеиназ плазмы крови. Значение АТП от 1228,6 мЕ/мл до 1443,4 свидетельствует о том, что новообразование является первичным злокачественным.

3. Для определения прогноза течения первичных злокачественных опухолей головного мозга рекомендуем учитывать изменение экспрессии следующих маркеров, которые коррелируют с общей выживаемостью:

- в группе диффузных астроцитом экспрессия *KDM1A*;
- у пациентов с анапластической астроцитомой уровень *HIF1A*;
- в группе глиальных опухолей высокой степени злокачественности экспрессия *EGFR*, *HIF1A*, *HBP1*, *EGLN1*, *EGLN3*.

4. Для испытания новых фармакологических субстанций рекомендуем использовать PDX-модели глиобластом человека на иммунодефицитных мышах, первый пассаж которых получен в результате ортотопической трансплантации по разработанному нами методу.

5. Для профилактики инфекционных осложнений, связанных с послеоперационной раной, включая раневую ликворею, предлагаем использовать разработанный нами способ закрытия костного дефекта после выполнения

стереотаксических вмешательств на головном мозге, заключающийся в использовании композиции их фибриноген-тромбинового клея и костной стружки, полученной во время операционного доступа.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АА	– анапластическая астроцитома
АОДГ	– анапластическая олигодендроглиома
ГБ	– глиобластома
ДА	– диффузная астроцитома
ОДГ	– олигодендроглиома
ДЭГ	– дифференциальная экспрессия генов
ДЭ-миРНК	– дифференциальная экспрессия микроРНК
микроРНК	– малая не кодирующая рибонуклеиновая кислота
мРНК	– матричная рибонуклеиновая кислота
АКТГ	– адренокортикотропный гормон
ЗНО	– злокачественное новообразование
ИП	– ингибиторы протеасом
Ко-делеция 1p19q	– комбинированная потеря короткого плеча хромосомы 1 (1p) и длинного плеча хромосомы 19 (19q)
МРТ	– магнитно-резонансная томография;
ОГМ	– опухоли головного мозга
ПЭТ	– позитронно-эмиссионная томография
РКТ	– рентгеновская компьютерная томография;
ССГ	– стероид-связывающего глобулина
СТБ	– стереотаксическая биопсия
СТГ	– соматотропный гормон;
ТРО	– торможение роста опухоли
ЦНС	– центральная нервная система
3'UTR	– 3' не транслируемая область
5-АЛК	– 5-аминолевулиновая кислота
AUC	– площадь под ROC-кривой ошибок (AUC – area under the curve)
Balb/c Nude	– субштамм бэг-альбинос обнаженный (Bagg Albino Nude)
G	– степень анаплазии (Grade)
GMB	– глиобластома (Glioblastoma Multiforme)

LGG	– глиома низкой степени злокачественности (Low-Grade Glioma)
HIF-1 α	– альфа-субъединица гипоксия-индуцибельного фактора 1 (Hypoxia-inducible factor 1-alpha)
HIF1A	– ген, кодирующий альфа-субъединицу гипоксия-индуцибельного фактора 1
EGF	– эпидермальный фактор роста
EGFR	– рецептор эпидермального фактора роста
<i>EGLN1</i>	– ген, кодирующий индуцируемый гипоксией фактор1 EGL-9 семейства
<i>EGLN3</i>	– ген, кодирующий индуцируемый гипоксией фактор3 EGL-9 семейства
<i>ERCC1</i>	– ген, кодирующий фермент комплиментарной эксцизионной репарации ДНК
<i>HBP1</i>	– ген, кодирующий фактор транскрипции группы высокой мобильности 1
<i>IDH1/2</i>	– гены, кодирующие изоцитрат дегидрогеназу 1 и 2 соответственно
<i>KDM1A</i>	– ген, кодирующий лизин-специфическую гистоновую деметилазу 1A
<i>KDM1B</i>	– ген, кодирующий лизин-специфическую гистоновую деметилазу 1B
<i>KIT</i>	– ген, кодирующий рецепторную протеинкиназу
<i>MGMT</i>	– ген, кодирующий метилгуанин-ДНК-метилтрансфераза
<i>MSI1</i>	– ген, кодирующий РНК-связывающий белок Мусаши 1
<i>MSI2</i>	– ген, кодирующий РНК-связывающий белок Мусаши 2
<i>NOCTH2</i>	– ген, кодирующий NOTCH2 рецептор
<i>NOCTH1</i>	– ген, кодирующий NOTCH2 рецептор
<i>PDGFR</i>	– ген, кодирующий рецептор бета-фактора роста тромбоцитов
<i>SMAD4</i>	– ген, кодирующий 4 член семейства белков сигнальной трансдукции Smad
<i>SMAD7</i>	– ген, кодирующий 7 член семейства белков сигнальной трансдукции Smad
<i>SMO</i>	– ген, кодирующий кодирующий рецептор G-белка
<i>TOP2A</i>	– ген, кодирующий топоизомеразу 2-альфа
<i>TP</i>	– ген, кодирующий тимидин-фосфоорилазу

<i>TUBB3</i>	– ген, кодирующий убулин бета 3 класс III
<i>VEGF</i>	– ген, сосудистый эндотелиальный фактор роста
VEGF-C	– фактор роста эндотелия сосудов C
VEGF-A	– фактор роста эндотелия сосудов A
VEGF-R1	– рецептор фактора роста эндотелия сосудов 1
VEGF-R3	– рецептор фактора роста эндотелия сосудов 3
PAI-1	– ингибитор активаторов плазминогена 1
PAI-1-акт	– активная форма ингибитора активаторов плазминогена 1
PAI-1-AG	– ингибитор активаторов плазминогена 1 (антигенная, т.е. неактивная форма)
tPA-акт	– активный тканевой активатор плазминогена
tPA-AG	– антиген тканевого активатора плазминогена (антигенная, т.е. неактивная форма фермента)
uPA	– урокиназа
uPA-АГ	– проурокиназа (антигенная, т.е. неактивная форма фермента)
uPA-акт	– урокиназа (активная форма фермента)
TGF- β 1	– трансформирующий фактор роста бета 1
PCV	– винкристин
PDX	– модели ксенотрансплантата опухоли пациента (Patient-Derived Xenograft)
RT-PCR	– полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией
TMZ	– темозоломид

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аллилуев, И.А. Прогностическая значимость микроРНК miR-22-3p, miR-107 и miR-330-3p в оценке выживаемости пациентов с глиомами высокой степени злокачественности / И.А. Аллилуев, А.А. Пушкин, Э.Е. Росторгуев, Н.С. Кузнецова // Современные проблемы науки и образования. – 2020. – № 5. URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=30122> – Текст: электронный.
2. Арапова, Ю.Ю. Оценка организации бодрствования и сна у пациентов с первичной опухолью головного мозга / Ю.Ю. Арапова, Э.Е. Росторгуев, Н.С. Кузнецова, Т.П. Протасова, Е.В. Вербицкий, А.И. Шихлярова // Современные проблемы науки и образования. – 2016. – №4; <http://www.science-education.ru/article/view?id=25006> – Текст: электронный
3. Бабичев, В.Н. Нейроэндокринный эффект половых гормонов / В.Н. Бабичев В.Н. // Успехи физиологических наук. – 2005. – № 1. – С.54–67. – Текст: непосредственный.
4. Балязин-Парфенов, И.В. Метастаз рака легкого в намет мозжечка, симулирующий менингиому / И.В. Балязин-Парфенов, Э.Е. Росторгуев, С.С. Тодоров, С.Э. Кавицкий., Д.П. Атмачиди, Е.А. Федосов, И.А. Красноченко // Кубанский научный медицинский вестник. – 2015. – №3(152). – С.143-146. – Текст: непосредственный.
5. Березина, В.В. Реакция локального кровотока перитуморальной зоны супратенториальных опухолей на частичную декомпрессию мозга (вскрытие твердой мозговой оболочки) / В.В. Березина, Л.Я. Кравец, М.Г. Воловик, А.Ю. Шелудяков // Физиология человека. – 2008. – №4. – С.45–6. – Текст: непосредственный.
6. Берштейн, Л.М. Онкоэндокринология: традиции, современность и перспективы / Л.М. Берштейн. – СПб.: Наука, 2004. – 340 с. – Текст: непосредственный.
7. Демидова, О.В. Влияние половых стероидов на развитие головного мозга / О.В. Демидова, Б.Я. Рыжавский // Дальневосточный медицинский журнал. – 2013. – №2. – С.100–4. – Текст: непосредственный.

8. Дяченко А. А. Эпидемиология и выживаемость больных первичными опухолями центральной нервной системы: популяционное исследование: автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата медицинских наук: специальности: 14.01.12 «Онкология», 14.02.03 «Общественное здоровье и организация здравоохранения» / Дяченко Андрей Андреевич. – Санкт-Петербург, 2014. – 24 с. – Текст: непосредственный.
9. Земская, А.Г. Мультиформные глиобластомы головного мозга / А.Г. Земская. – Л.: Медицина, 1976. – 192 с.: ил. – Текст: непосредственный.
10. Зорин, Н.А. Роль альфа-2-макроглобулина при онкологических заболеваниях / Зорин Н.А. [и др.] // Вопросы онкологии. – 2004. – Т.50, №5. – С. 515-519. – Текст: непосредственный.
11. Каприн, А.Д. Злокачественные новообразования в России в 2018 году (заболеваемость и смертность) / А.Д. Каприн, В.В. Старинский, Г.В. Петрова. – М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2019. – 250 с. илл. ISBN 978-5-85502-251-3 <http://www.oncology.ru/service/statistics> – Текст: непосредственный.
12. Кательницкая, О.В. Частота геморрагических и тромботических осложнений у нейроонкологических больных на стационарном этапе оказания помощи / О.В. Кательницкая, Иг.И. Кательницкий, Э.Е. Росторгуев // XXXIII Международная конференция Российского общества ангиологов и сосудистых хирургов 22-24 июня 2017. г. Сочи. – 2017. – С. 190-191. – Текст: непосредственный.
13. Кит, О.И. Аберрантное метилирование промоторных участков генов APC, CDH13 и MGMT у больных колоректальным раком / О.И. Кит, Д.И. Водолажский, К.В. Двадненко, И.Ю. Ефимова, Е.Н. Олейникова, Д.Д. Олейников, Н.Н. Тимошкина // Сибирский онкологический журнал. – 2016. – Т. 15, №2. – С. 48-55. – Текст: непосредственный.
14. Кит, О.И. Гендерные особенности экспрессии генетических локусов в тканях глиом / О.И. Кит, А.А. Пушкин, Э.Е. Росторгуев, Д.Х. Поркшеян, Е.М. Франциянц, Н.С. Кузнецова, И.У. Черкиев, Д.И. Водолажский // Современные

проблемы науки и образования. 2018; №5. URL: <http://science-education.ru/ru/article/view?id=28068> – Текст: электронный

15. Кит, О.И. Гендерные особенности экспрессии генетических локусов в тканях глиом / О.И. Кит, А.А. Пушкин, Э.Е. Росторгуев, Д.Х. Поркшеян, Е.М. Франциянц, Н.С. Кузнецова ... & Д.И. Водолажский // Современные проблемы науки и образования. – 2018. – №5, 57. – Текст: электронный

16. Кит, О.И. Дифференциальная экспрессия 15-ти генов в глиальных опухолях различной степени злокачественности / О.И. Кит, А.А. Пушкин, Э.Е. Росторгуев, Н.Н. Тимошкина, Н.С. Кузнецова, С.Э. Кавицкий, А.М. Нальгиев // Современные проблемы науки и образования. – 2019. – № 5. URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=29039> – Текст: электронный

17. Кит, О.И. Изменение экспрессионного статуса генов при малигнизации клеток мозга / О.И. Кит, А.А. Пушкин, Э.Е. Росторгуев, Д.Х. Поркшеян, Е.М. Франциянц, Н.С. Кузнецова, И.У. Черкиев, Д.И. Водолажский // Современные проблемы науки и образования. – 2018. – № 6. URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=28148> – Текст: электронный

18. Кит, О.И. Молекулярно-генетические маркеры глиом / О.И. Кит, Д.И. Водолажский, Э.Е. Росторгуев, Е.М. Франциянц, С.Б. Панина // Молекулярная генетика. Микробиология и вирусология. – 2017. – №4. – С. 132-140. – Текст: непосредственный.

19. Кит, О.И. Мультиформная глиобластома: патогенез и молекулярные маркеры / О.И. Кит, Д.И. Водолажский, Э.Е. Росторгуев, Е.М. Франциянц, Д.Х. Поркшеян, С.Б. Панина // Вопросы онкологии. – 2017. – Т.63, №5. – С. 694-701. – Текст: непосредственный.

20. Кит, О.И. Некоторые факторы роста в тканях новообразований головного мозга различной гистологической структуры / О.И. Кит, Е.М. Франциянц, Э.Е. Росторгуев, И.В. Балязин-Парфенов, Н.Д. Черярина, Л.С. Козлова, Ю.А. Погорелова // Опухоли головы и шеи. – 2016. – Т. 6, №3. – С. 27-33. – Текст: непосредственный.

21. Кит, О.И. Ортотопические ксенографты глиальных опухолей

человека: история, технологии, достижения и проблемы / О.И. Кит, Г.В. Жукова, А.Ю. Максимов, А.С. Гончарова, Э.Е. Росторгуев, А.И. Жадобина, И.А. Попов, Е.Ю. Златник // Медицинский вестник Северного Кавказа. – 2020. – Т. 15, №1. – С. 133-139. – Текст: непосредственный.

22. Кит, О.И. Роль гормонального фактора в развитии первичного и вторичного опухолевого процесса в головном мозге / О.И. Кит, В.А. Бандовкина, Е.М. Франциянц, Э.Е. Росторгуев, И.В. Балязин-Парфенов, Н.Д. Черярина // Опухоли головы и шеи. – 2016. – Т. 6, №2. – С. 50-55. – Текст: непосредственный.

23. Кит, О.И. Роль микро-РНК в регуляции сигнальных путей при глиомах / О.И. Кит, Д.И. Водолажский, Э.Е. Росторгуев, Д.Х. Поркшеян, С.Б. Панина // Медицинская химия. – 2017. – Т.63, вып. 6. – С. 481-498. – Текст: непосредственный.

24. Кит, О.И. Серпины в гиперпластических тканях толстой кишки / О.И. Кит, Е.М. Франциянц, Л.С. Козлова, А.Л. Терпугов // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2014. – №10. – С.18-21. – Текст: непосредственный.

25. Кит, О.И. Система регуляции плазминогена в различных опухолях головного мозга / О.И. Кит, Е.М. Франциянц, Л.С. Козлова, Э.Е. Росторгуев, И.В. Балязин-Парфенов, Ю.А. Погорелова // Вопросы нейрохирургии имени Н.Н. Бурденко. – 2017. – Т. 81, №2. – С. 22-27. – Текст: непосредственный.

26. Кит, О.И. Цитологическая, морфологическая и иммуногистохимическая диагностика опухолей центральной нервной системы: монография / О.И. Кит, И.В. Балязин-Парфенов, Е.В. Балязина, В.А. Балязин, Е.М. Франциянц, Э.Е. Росторгуев, С.С. Тодоров, А.Н. Шакунов. – Новочеркасск: Лик, 2015. – 156 с.: ил. – Текст: непосредственный.

27. Кобяков, Г.Л. Классификация ВОЗ первичных опухолей центральной нервной системы 2016 г.: взгляд клинициста / Г.Л. Кобяков, О.В. Абсалямова, А.А. Поддубский, К.С. Лодыгина, Е.А. Кобякова // Вопросы нейрохирургии. – 2018. – № 3. – С.88-96. – Текст: непосредственный.

28. Ковалев, Г.И. Применение биохимической навигации с 5-АЛК в

хирургии опухолей головного мозга различных гистологических типов / Г.И. Ковалев, В.Э. Кочарян, Г.Г. Музлаев // Инновационная медицина Кубани. – 2016. – вып. 2. – С. 51-58. – Текст: непосредственный.

29. Козлова, Л.С. Ингибиторы протеолиза в ликворе больных злокачественными глиомами после двух видов локальной интраоперационной химиотерапии / Л.С. Козлова, Е.М. Франциянц, Д.П. Атмачиди, Т.А. Горбунова // Злокачественные опухоли. (J Malignant Tumours). – 2014. – Т.10, №3. – С.15-21. doi:10.18027/2224-5057-2014-3-15-17 – Текст: непосредственный.

30. Мартынов, Б.В. Метастатические опухоли головного мозга. Практическая нейрохирургия (руководство для врачей) / Б.В. Мартынов, Б.В. Гайдар, Ю.С. Щиголев, Г.Е. Труфанов. – СПб., 2002. – С. 476–448 (а). – Текст: непосредственный

31. Маслов, А.А. Трипсиноподобные протеиназы, кининовая система и ингибиторы в плазме крови больных при раке желудка и лимфоме селезенки / А.А. Маслов [и др.] // Биологические науки. Фундаментальные и прикладные проблемы медицины и биологии, ОАЭ (ДУБАЙ) 16-23 октября 2014 г., Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. 2014. – №10 (часть 1). – С. 127 (дата обращения 2014-08-15) – Текст: непосредственный.

32. Мацко, Д. Е. Нейроонкология / Д. Е. Мацко, М. В. Мацко, Е. Н. Имянитов // Практическая онкология. – 2017. – Т. 18, № 1. – С. 103–114.

33. Мацко, Д.Е. Нейрохирургическая патология. 2-е изд. [Текст] / Д.Е. Мацко. – СПб.: ФГБУ «РНХИ им. проф. А. Л. Поленова» Минздрава России, 2015. – 424 с.: ил. – Текст: непосредственный.

34. Мацко, Д.Е. Патологическая анатомия важнейших хирургических заболеваний нервной системы. Практическая нейрохирургия: руководство для врачей / Д. Е. Мацко. – СПб., 2002. – С. 613–635. – Текст: непосредственный.

35. Мацко, М.В. Значимый регресс глиобластомы с низкой экспрессией гена MGMT при химиолучевой терапии / М. В. Мацко, Е. И. Лучин, А. Г. Иевлева // Вопросы онкологии. – 2011. – № 2. – С. 245–249. – Текст: непосредственный

36. Мацко, М.В. Молекулярно-генетическая характеристика

нейроэпителиальных опухолей головного мозга и ее клиническое значение: специальность: 14.01.12 – онкология: диссертация на соискание ученой степени доктора медицинских наук / Мацко Марина Витальевна; ФГБУ «НМИЦ онкологии имени Н.Н. Петрова» Минздрава России. – Санкт-Петербург, 2020. – 324 с. – Текст: непосредственный.

37. Мацко, М.В. Морфологические и молекулярно-генетические особенности первичных глиобластом у пациентов с необычно высокой продолжительностью жизни / М.В. Мацко, Д.Е. Мацко, Н.М. Волков, А.Ю. Улитин, В.М. Моисеенко, Е.Н. Имянитов, А.Г. Иевлева // Сибирский онкологический журнал. – 2019. – Т.18, №3. – С.34-44. <https://doi.org/10.21294/1814-4861-2019-18-3-34-44> – Текст: непосредственный

38. Мацко, М.В. Предиктивная роль гена MGMT при лечении Темозоломидом больных с глиобластомой / М. В. Мацко, Д. Е. Мацко, В. М. Моисеенко // XII международный научный конгресс «Рациональная фармакотерапия»: сборник научных материалов. – СПб., 2016 – С. 97–98. – Текст: непосредственный

39. Межевова, И.В. Нейрохирургический подход для получения первичных клеточных линий глиальных опухолей / И.В. Межевова, А.О. Ситковская, Э.Е. Росторгуев, С.Ю. Филиппова, О.В. Нистратова, Н.С. Кузнецова, Н.С. Карнаухов // Исследования и практика в медицине. – 2019. – Т. 6, № 5. – С. 191. – Текст: непосредственный

40. Мурашко, Д.А. Перспективы забора живого опухолевого материала пациентов с агрессивными опухолевыми заболеваниями / Семенов М., Ильин М. // Здравоохранение, образование и безопасность. – 2017. – №1. – С. 7-17. – Текст: непосредственный

41. Пасхина, Т.С. Определение компонентов кининовой системы: методические рекомендации / Т.С. Пасхина. – М., 1987. – Текст: непосредственный

42. Патент №2628816 Российская Федерация, МПК G01N 33/52 (2006.01). Способ дифференциальной диагностики доброкачественных,

первичных и вторичных злокачественных опухолей головного мозга: № 2016137098: заявлено 15.09.2016: опубликовано 22.08.2017 / Кит О.И., Франциянц Е.М., Росторгуев Э.Е., Козлова Л.С.; заявитель и патентообладатель Ростовский научно-исследовательский онкологический институт. – 11 с. – Текст: непосредственный.

43. Патент №2709651 Российская Федерация, МПК C12N 15/00 (2006.01), C12Q 1/68 (2006.01). Способ дифференциальной диагностики глиом на основании анализа экспрессии генов и микроРНК: № 2018142345: заявлено 29.11.2018: опубликовано 19.12.2019 / Кит О.И., Тимошкина Н.Н., Пушкин А.А., Кутилин Д.С., Росторгуев Э.Е., Кузнецова Н.С.; заявитель и патентообладатель Ростовский научно-исследовательский онкологический институт. – 10 с. – Текст: непосредственный.

44. Патент №2715191 Российская Федерация, МПК A61B 17/00 (2006.01). Способ закрытия костного дефекта при выполнении стереотаксических вмешательств на головном мозге: № 2019113617: заявлено 30.04.2019: опубликовано 25.02.2020 / Кит О.И., Росторгуев Э.Е., Кузнецова Н.С.; заявитель и патентообладатель Ростовский научно-исследовательский онкологический институт. – 12 с.: илл. – Текст: непосредственный.

45. Патент №2742413 Российская Федерация, МПК G01N 33/48 (2006.01), C12Q 1/68 (2006.01). Способ диагностики глиальных опухолей головного мозга высокой степени злокачественности: №2020121030: заявлено 17.06.2020: опубликовано 05.02.2021 / Кит О.И., Росторгуев Э.Е., Тимошкина Н.Н., Пушкин А.А., Аллилуев И.А., Кузнецова Н.С., Нальгиев А.М.; заявитель и патентообладатель федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии Министерства здравоохранения Российской Федерации. – 10 с. – Текст: непосредственный.

46. Патент №2742449 Российская Федерация, МПК A61B 17/00 (2006.01), G09B 23/28 (2006.01). Способ ортотопической трансплантации фрагмента глиобластомы головного мозга человека в область Cortex Parietalis головного мозга иммунодефицитных мышей: №2020132531: заявлено 30.09.2020:

опубликовано 05.02.2021 / Кит О.И., Росторгуев Э.Е., Максимов А.Ю., Гончарова А.С., Заикина Е.В.; заявитель и патентообладатель федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии Министерства здравоохранения Российской Федерации. – 11 с. – Текст: непосредственный.

47. Протасова, Т.П. Интегративные нарушения и оценка их выраженности на этапах лечения у больных с опухолевым поражением головного мозга / Т.П. Протасова, Ю.Ю. Арапова, А.И. Шихлярова, Э.Е. Росторгуев, Н.С. Кузнецова // International Congress Neuroscience for Medicine and Psychology. Sudak, Crimea, Russia, May 30-June 10, 2017. – P. 345-346. – Текст: непосредственный.

48. Пушкин, А.А. Экспрессионный статус 15-ти генов в глиальных опухолях головного мозга / А.А. Пушкин, Н.Н. Тимошкина Н.Н., Э.Е. Росторгуев // Research'n Practical Medicine Journal. – 2019. – Т. 6. – №. Спецвыпуск. – Текст: непосредственный.

49. Ростовцев, Д.М. Злокачественные супратенториальные астроцитарные опухоли: организация медицинской помощи, новые технологии и результаты лечения: специальность 14.01.18 – нейрохирургия: автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора медицинских наук / Ростовцев Дмитрий Михайлович; Российский научно-исследовательский нейрохирургический институт им. проф. А.Л. Поленова филиал ФГБУ «Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова» Минздрава России. – Санкт-Петербург, 2016. – 43 с. – Текст: непосредственный.

50. Росторгуев, Э.Е. Изучение противоопухолевой эффективности комбинации бортезомиба и темозоломида на подкожных PDX-моделях глиобластомы человека / Э.Е. Росторгуев, О.И. Кит, А.С. Гончарова, Е.М. Непомнящая, А.В. Волкова, Е.В. Заикина, Д.В. Ходакова // Современные проблемы науки и образования. – 2020. – №3. URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=30191> – Текст: электронный.

51. Сашков, В.А. Роль нейростероидов мозга в его морфофункциональной организации и реализации процессов поведения, обучения и памяти в онтогенезе /

В.А. Сашков // Новые исследования. – 2009. – №1. – С.134–51. – Текст: непосредственный.

52. Ситковская, А.О. Возможность создания культуры клеток астроцитарных опухолей с использованием блока Blue E400 микроскопа Ormí Pentero и 5-аминолевулиновой кислоты (5ALA) / А.О. Ситковская, Э.Е. Росторгуев, И.В. Межевова, С.Н. Игнатов, Н.С. Кузнецова, Н.С. Карнаухов, О.В. Нистратова, С.Ю. Филиппова // Материалы X Съезда онкологов России. 17–19 апреля 2019 г. Нижний Новгород. – 2019. – С. 136. – Текст: непосредственный.

53. Ситковская, А.О. Исследование микросателлитной нестабильности в первичных клеточных линиях низкодифференцированных глиальных опухолей / А.О. Ситковская, Э.Е. Росторгуев, С.В. Тимофеев, И.В. Межевова, С.Ю. Филиппова, Т.В. Шамова, Н.Н. Тимошкина, Д.Ю. Гвалдин // Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины. – 2020. – Т. 10, №2. – С. 38-41. – Текст: непосредственный.

54. Смирнов, Л.И. Основы морфологии нервной системы в нормальном и патологическом состояниях. – Т.1. Общая нормальная и патологическая гистология / Л.И. Смирнов. – Киев-Харьков: Медиздат, 1935. – 360 с.: ил. – Текст: непосредственный.

55. Табаков, Д.В. Мутации изоцитратдегидрогеназ 1 и 2 и метилирование гена MGMT в глиомах / Д.В. Табаков [и др.] // Успехи молекулярной онкологии. – 2017. – Т. 4, №1. – С.53-59. – Текст: непосредственный.

56. Трякин, А.А. Микросателлитная нестабильность как уникальная характеристика опухолей и предиктор эффективности иммунотерапии / А.А. Трякин, М.Ю. Федянин, А.С. Цуканов, Ю.А. Шельгин, И.А. Покатаев [и др.] // Злокачественные опухоли. – 2019. – Т. 9, №4. – С.59–69. – Текст: непосредственный.

57. Филоненко, Е.В. Методологические аспекты флюоресцентной диагностики злокачественных опухолей с препаратом аласенс / Е.В. Филоненко, А.Б. Гришаева // Рос. онкол. журн. – 2011. – вып. 5. – С. 30–33. – Текст: непосредственный.

58. Франциянц, Е.М. Изучение трипсиноподобных протеиназ и ингибиторов ликвора при лечении злокачественных глиом локальной химиотерапией / Е.М. Франциянц [и др.] // Материалы конференции «Фундаментальные исследования», Израиль (Тель-Авив) 16-23 октября 2012 г. Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2012. – №10. – С. 107. – Текст: непосредственный.

59. Франциянц, Е.М. Исследование трипсиноподобных протеиназ и их ингибиторов в плазме крови больных раком носоглотки в динамике лучевого лечения / Е.М. Франциянц [и др.] // Паллиативная медицина и реабилитация. – 2013. – №1. – С. 31-36. – Текст: непосредственный.

60. Цуканов, А.С. Синдром Линча. Современное состояние проблемы / А.С. Цуканов, Ю.А. Шелыгин, Д.А. Семенов [и др.] // Медицинская генетика. – 2017. – Т. 16, № 2. – С. 11–18. – Текст: непосредственный.

61. Шамова, Т.В. 5-АЛК для создания первичных опухолевых клеточных линий глиальной этиологии / Т.В. Шамова, А.О. Ситковская, Э.Е. Росторгуев, И.В. Межевова, С.Ю. Филиппова, О.В. Нистратова, Н.С. Карнаухов, Н.С. Кузнецова // Материалы VIII Международной научно-практической конференции: «Генетика – фундаментальная основа инноваций в медицине и селекции». – 2019. – С. 102-103. – Текст: непосредственный.

62. Шамова, Т.В. Получение первичных клеточных линий глиальных опухолей / Т.В. Шамова, А.О. Ситковская, Э.Е. Росторгуев, Н.С. Кузнецова, С.Э. Кавицкий // Пермский медицинский журнал. – 2020. – Т.37, №5. – С. 79-89. – Текст: непосредственный.

63. Якубовская, Р.И. Сравнительное экспериментальное исследование специфической активности 5-АЛК и гексилового эфира 5-АЛК / Р.И. Якубовская, А.А. Панкратов, Е.В. Филоненко [и др.] // Biomedical Photonics. – 2018. – Т. 7, вып. 3. – С. 43–46. doi: 10.24931/2413–9432–2018–7–3–43–46. – Текст: непосредственный.

64. AACR Project Genie Consortium et al. AACR Project GENIE: powering precision medicine through an international consortium. *Cancer discovery*. 2017;7(8):

818-831.

65. Abhinav K., Yeh F.-C., Mansouri A., Zadeh G., Fernandez-Miranda J.C. High- definition fiber tractography for the evaluation of perilesional white matter tracts in high- grade glioma surgery. *Neuro Oncol.* 2015 Sep;17(9):1199-209. DOI:10.1093/neuonc/nov113.

66. Adamo A., Barrero M.J., Izpisua Belmonte J.C. LSD1 and pluri potency: a new player in the network. *Cell Cycle.* 2011 Oct 1;10(19):3215-6. doi: 10.4161/cc.10.19.17052.

67. Akiyama Y., Nonomura C., Ashizawa T. et al. The anti-tumor activity of the STAT3 inhibitor STX-0119 occurs via promotion of tumor-infiltrating lymphocyte accumulation in temozolomide-resistant glioblastoma cell line. *Immunology letters.* 2017; 190: 20-25.

68. Aldave G., Tejada S., Pay E. et al. Prognostic value of residual fluorescent tissue in glioblastoma patients after gross total resection in 5-aminolevulinic acid-guided surgery. *Neurosurgery.* 2013; 72: 915–21.

69. Alexander B.M., Ba S., Berger M.S. et al. Adaptive global innovative learning environment for glioblastoma: GBM AGILE. *Clin Cancer Res.* 2018;24:737–43.

70. Alexander B.M., Galanis E., Yung W.K.A. et al. Brain Malignancy Steering Committee clinical trials planning workshop: report from the Targeted Therapies Working Group. *Neuro Oncol.* 2015;17:180–88.

71. Alitalo K., Carmeliet P. Molecular mechanisms of lymphangiogenesis in health and disease. *Cancer Cell.* 2002;1:219–27.

72. Ambrosio S., Saccà C.D., Majello B. Epigenetic regulation of epithelial to mesenchymal transition by the lysine-specific demethylase LSD1/KDM1A. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech.* 2017;1860:905–910.

73. Amelot A., Amelot A., De Cremoux P., Quillien V. IDH-Mutation Is a Weak Predictor of Long-Term Survival in Glioblastoma Patients. *PLoS One.* 2015 Jul 9;10(7):e0130596. doi: 10.1371/journal.pone.0130596. eCollection 2015.

74. Ashton T.M., McKenna W.G., Kunz-Schughart L.A., Higgins G.S.,

Oxidative phosphorylation as an emerging target in cancer therapy. *Clin. Cancer Res.* 2018;24:2482–2490.

75. Asuthkar S., Stepanova V., Lebedeva T., Holterman A.L., Estes N., Cines D.B., Rao S.J., Gondi C.S. Multifunctional roles of urokinase plasminogen activator (uPA) in cancer stemness and chemoresistance of pancreatic cancer. *Mol Biol Cell.* 2013;24(17):2620-2632. doi:10.1091/mbc.E12-04-0306

76. Ayob A., Ramasamy T. Cancer stem cells as key drivers of tumour progression. *Journal of biomedical science.* 2018; 25: 1-18.

77. Baan R., Grosse Y., Lauby-Secretan A. et al. Carcinogenicity of radiofrequency electromagnetic fields. *Lancet Oncol.* 2011; 12: 624–26.

78. Baia G., Dinca E., Ozawa T. et al. An orthotopic skull base model of malignant meningioma. *Brain Pathology.* 2008; 18: 172-179.

79. Balcells, I., Cirera, S., & Busk, P. K. Specific and sensitive quantitative RT-PCR of miRNAs with DNA primers. *BMC biotechnology.* 2011;11(1):70.

80. Bangiyev L., Camilla M., Espagnet R. et al. Adult brain tumor imaging: state of the art. *Semin Roentgenol.* 2014;49:39–52.

81. Banno K., Iida M., Yanokura M., Kisu I., Iwata T., Tominaga E. et al. MicroRNA in cervical cancer: OncomiRs and tumor suppressor miRs in diagnosis and treatment. *The Scientific World Journal.* 2014:178075 doi: 10.1155/2014/178075

82. Batista R, Cruvinel-Carlioni A, Vinagre J, et al. The prognostic impact of TERT promoter mutations in glioblastomas is modified by the rs2853669 single nucleotide polymorphism. *Int J Cancer.* 2016;139:414–23.

83. Baulieu E.E., Neurosteroids: of the nervous system, by the nervous system, for the nervous system. *Recent Prog Horm Res.* 1997;52:1–32.

84. Baumert BG, Hegi ME, Van Den Bent MJ, et al. Temozolomide chemotherapy versus radiotherapy in high -risk low -grade glioma (extent of resection TC 22033-26033): a randomised, open-label, phase 3 intergroup study. *Lancet Oncol.* 2016;17:1521–32.

85. Ben-David U., Porru M., Caruso C. et al. Patient-derived xenografts undergo mouse-specific tumor evolution. *Nature genetics.* 2017;49:1567.

86. Bender S., Tang Y., Lindroth A.M. et al. Reduced H3K27me3 and DNA hypomethylation are major drivers of gene expression in K27M mutant pediatric high-grade gliomas. *Cancer Cell*. 2013;24:660–72.
87. Ben-Yosef Y., Lahat N., Shapiro S., Bitterman H., & Miller A. Regulation of endothelial matrix metalloproteinase-2 by hypoxia/reoxygenation. *Circulation research*. 2002;90(7):784-791.
88. Bernadotte A., Mikhelson V.M., Spivak I.M., Markers of cellular senescence. Telomere shortening as a marker of cellular senescence. *Aging (Albany NY)*. 2016;8:3–11.
89. Berntsen E.M., Gulati S., Solheim O. et al. Functional magnetic resonance imaging and diffusion tensor tractography incorporated into an intraoperative 3-dimensional ultrasound -based neuronavigation system: impact on therapeutic strategies, extent of resection, and clinical outcome. *Neurosurgery*. 2010;67:251–264.
90. Bhattarai D., Xu X., Lee K. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) inhibitors from the last decade (2007 to 2016): A “structure–activity relationship” perspective. *Medicinal Research Reviews*. 2018;38:1404-1442.
91. Bhuiyan M.I., Kim J.C., Hwang S.N. et al. Ischemic tolerance associated with VEGF-C and VEGFR-3 signaling in the hippocampus of mice. *Neuroscience* 2015;290:90–102.
92. Bianco J., Bastiancich C., Joudiou N. et al. Novel model of orthotopic U-87 MG glioblastoma resection in athymic nude mice. *Journal of Neuroscience Methods*. 2017;284:96-102.
93. Blumenthal DT, Gorlia T, Gilbert MR, et al. Is more better? The impact of extended adjuvant temozolomide in newly diagnosed glioblastoma: a secondary analysis of extent of resection TC and NRG Oncology/RTOG. *Neuro Oncol*. 2017;19: 1119–26.
94. Bornhorst M, Frappaz D, Packer RJ. Pilocytic astrocytomas. 2016 DOI:10.1016/B978-0-12-802997-8.00020-7.
95. Braganza M.Z., Kitahara C.M., Berrington de González A, Inskip PD, Johnson KJ, Rajaraman P. Ionizing radiation and the risk of brain and central nervous

system tumors: a systematic review. *Neuro Oncol.* 2012; 14: 1316–24.

96. Brandes AA, Basso U, Vastola F, et al. Carboplatin and teniposide as third-line chemotherapy in patients with recurrent oligodendroglioma or oligoastrocytoma: a phase 2 study. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* 2003; 14: 1727–31.

97. Brandes AA, Tosoni A, Vastola F, et al. Efficacy and feasibility of standard procarbazine, lomustine, and vincristine chemotherapy in anaplastic oligodendroglioma and oligoastrocytoma recurrent radiotherapy: a phase 2 study. *Cancer.* 2004;101:2079–85.

98. Braun K., Ahluwalia M.S. Treatment of glioblastoma in older adults. *Current oncology reports.* 2017;19:81.

99. Brindle K.M., Izquierdo-Garcia J.L., Lewis D.Y., Mair R.J., Wright A.J. Brain Tumor Imaging. *J Clin Oncol.* 2017;35:2432–39.

100. Broholm H. et al. Detecting chromosomal alterations at 1p and 19q by FISH and DNA fragment analysis--a comparative study in human gliomas. *Clinical neuropathology.* 2008; 27: 6: 378-387.

101. Brown P.D., Buckner J.C., O'Fallon J.R. et al. Adult patients with supratentorial pilocytic astrocytomas: a prospective multicenter clinical trial. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2004;58:1153–60.

102. Buckner J., Giannini C., Eckel-Passow J. et al. Management of diffuse low-grade gliomas in adults: use of molecular diagnostics. *Nat Publ Gr.* 2017;3:340–51.

103. Buckner J.C., Shaw E.G., Pugh S.L. et al. Radiation plus Procarbazine, CCNU, and Vincristine in Low-Grade Glioma. *N Engl J Med.* 2016. DOI:10.1056/NEJMoa1500925.

104. Burg J.M., Link J.E., Morgan B.S., Heller F.J., Hargrove A.E., McCafferty D.G. KDM1 class flavin-dependent protein lysine demethylases. *Peptide Science.* 2015; 104(4):213-246.

105. Burkhard C., Di Patre P.-L., Schüller D. et al. A population -based study of the incidence and survival rates in patients with pilocytic astrocytoma. *J Neurosurg.* 2003;98:1170–74.

106. Burroughs S., Kaluz S., Wang D. et al. Hypoxia inducible factor pathway

inhibitors as anticancer therapeutics (Review). *Future medicinal chemistry*. 2013;5:553-572.

107. Cairncross G., Wang M., Shaw E. et al. Phase III trial of chemoradiotherapy for anaplastic oligodendroglioma: long-term results of RTOG 9402. *J Clin Oncol*. 2012;31:1–10.

108. Cao Z. et al. MDM2 promotes genome instability by ubiquitinating the transcription factor HBP1. *Oncogene*. 2019;1.

109. Caragher S., Chalmers A.J., Gomez-Roman N. Glioblastoma's Next Top Model: Novel Culture Systems for Brain Cancer Radiotherapy Research. *Cancers (Basel)*. 2019 Jan 4;11(1):44. doi: 10.3390/cancers11010044. PMID: 30621226; PMCID: PMC6356812.

110. Carlberg M., Hardell L. Evaluation of Mobile Phone and Cordless Phone Use and Glioma Risk Using the Bradford Hill Viewpoints from 1965 on Association or Causation. *Biomed Res Int*. 2017. DOI:10.1155/2017/9218486.

111. Castel D., Philippe C., Calmon R. et al. Histone H3F3A and HIST1H3B K27M mutations define two subgroups of diffuse intrinsic pontine gliomas with different prognosis and phenotypes. *Acta Neuropathol*. 2015;130:815–27.

112. Castex J., Willmann D., Kanouni T., Arrigoni L., Li Y., Friedrich M. et al. Inactivation of Lsd1 triggers senescence in trophoblast stem cells by induction of Sirt4. *Cell Death Dis*. 2017;8:e2631

113. Chaichana KL, Jusue -Torres I, Navarro- Ramirez R, et al. Establishing percent resection and residual volume thresholds affecting survival and recurrence for patients with newly diagnosed intracranial glioblastoma. *Neuro Oncol*. 2014;16:113–22.

114. Chamberlain M.C., Wei-Tsao D.D., Blumenthal D.T., Glantz M.J. Salvage chemotherapy with CPT-11 for recurrent temozolomide-refractory anaplastic astrocytoma. *Cancer*. 2008;112:2038–45.

115. Chan A.K-Y., Yao Y., Zhang Z. et al. TERT promoter mutations contribute to subset prognostication of lower -grade gliomas. *Mod Pathol*. 2015;28:177–86.

116. Chan K., Fang D., Gan H. et al. The histone H3.3K27M mutation in pediatric glioma reprograms H3K27 methylation and gene expression. *Genes Dev*.

2013;27:985–90.

117. Chen Y. et al. Romance of the three kingdoms in hypoxia: HIFs, epigenetic regulators, and chromatin reprogramming. *Cancer Letters*. 2020;495: 211-223. DOI: 10.1016 / j.canlet.2020.09.009

118. Christmann M., Nagel G., Horn S. MGMT activity, promoter methylation and immunohistochemistry of pretreatment and recurrent malignant gliomas: a comparative study on astrocytoma and glioblastoma. *International Journal of Cancer*. 2010;127(9):2106–2118.

119. Christopher A.F., Gupta M., Bansal P. Micronome revealed miR-19a/b as key regulator of SOCS3 during cancer related inflammation of oral squamous cell carcinoma. *Gene*. 2016;594(1):30-40.

120. Coble J.B., Dosemeci M., Stewart P.A. et al. Occupational exposure to magnetic fields and the risk of brain tumors. *Neuro Oncol*. 2009;11:242–49.

121. Colaprico A., Silva T. C., Olsen C., Garofano L., Cava C., Garolini D., ... & Ceccarelli M. TCGAAbiolinks: an R/Bioconductor package for integrative analysis of TCGA data. *Nucleic acids research*. 2016;44(8):e71-e71.

122. Collins A., Lang S. A systematic review of the validity of patient derived xenograft (PDX) models: the implications for translational research and personalised medicine. *Peer J*. 2018;6:e5981.

123. Criniere E., Kaloshi G., Laigle-Donadey F. MGMT prognostic impact on glioblastoma is dependent on therapeutic modalities. *Journal of Neurooncology*. 2007;83(2):173–179.

124. Dang L., White D. W., Gross S. Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature*. 2009;462(7274):739–744.

125. Danhier F., Messaoudi K., Lemaire L. et al. Combined anti-Galectin-1 and anti-EGFR siRNA-loaded chitosan-lipid nanocapsules decrease temozolomide resistance in glioblastoma: in vivo evaluation. *International journal of pharmaceutics*. 2015;481:154-161.

126. Daniels T.B., Brown P.D., Felten S.J. et al. Validation of extent of resection TC Prognostic Factors for Adults with Low-Grade Glioma: a Report Utilizing

Intergroup 86-72-51 1. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2011;81:218–24.

127. Darst R.P., Pardo C.E., Ai L., Brown K.D., Kladde M.P. Bisulfite sequencing of DNA. *Current protocols in molecular biology*. 2010;91(1):7-9.

128. Du W. et al. Targeting the SMO oncogene by miR-326 inhibits glioma biological behaviors and stemness. *Neuro-oncology*. 2014;17(2):243-253.

129. Dunbar E.M., Eppolito A., Henson J.W. Genetic counseling and tumor predisposition in neuro-oncology practice. *Neuro Oncol Practice*. 2016;3:17–28.

130. Dunn J., Baborie A., Alam F. Extent of MGMT promoter methylation correlates with outcome in glioblastomas given temozolomide and radiotherapy. *British Journal of Cancer*. 2009;101(1):124–131.

131. Eckel-Passow J.E., Lachance D.H., Molinaro A.M. et al. Glioma groups based on 1p/19q, IDH, and TERT promoter mutations in tumors. *N Engl J Med*. 2015; 372: 2499–508.

132. Elkins J.M., Hewitson K.S., McNeill L.A. et al. Structure of factor-inhibiting hypoxia-inducible factor (HIF) reveals mechanism of oxidative modification of HIF-1 alpha. *JBiolChem*. 2003;278:1802–1806.

133. Feldser D., Agani F., Iyer N.V., Pak B., Ferreira G., & Semenza G. L. Reciprocal positive regulation of hypoxia-inducible factor 1 α and insulin-like growth factor 2. *Cancer research*. 1999;59(16):3915-3918.

134. Feng Z., Zhang L., Zhou J., Zhou S. mir-218-2 promotes glioblastomas growth, invasion and drug resistance by targeting CDC27. *Oncotarget*. 2017;8(4):6304.

135. Fernandes G., Denny W., Dos Santos L. Boron in drug design: Recent advances in the development of new therapeutic agents. *European journal of medicinal chemistry*. 2019;179:791-804.

136. Ferracin M., Bassi C., Pedriali M., Pagotto S., D'Abundo L., Zagatti B., ... & Volpato S. miR-125b targets erythropoietin and its receptor and their expression correlates with metastatic potential and ERBB2/HER2 expression. *Molecular cancer*. 2013;12(1):130.

137. Ferrara N., Gerber H.P., LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nature Med*. 2003;9(6):669–76.

138. Ferraro N., Barbarite E., Albert T.R. et al. The role of 5-aminolevulinic acid in brain tumor surgery: a systematic review. *Neurosurg Rev.* 2016;39:545–55.
139. Ferris S.P., Hofmann J.W., Solomon D.A., Perry A. Characterization of gliomas: from morphology to molecules. *Virchows Arch.* 2017;471:257–69.
140. Fontebasso A.M., Liu X.-Y., Sturm D., Jabado N. Chromatin remodeling defects in pediatric and young adult glioblastoma: a tale of a variant histone 3 tail. *Brain Pathol.* 2012; 23: 210–16.
141. Forsyth P.A., Shaw E.G., Scheithauer B.W. et al. Supratentorial pilocytic astrocytomas. A clinicopathologic, prognostic, and flow cytometric study of 51 patients. *Cancer.* 1993; 72: 1335–42.
142. Freedman L.P., Gibson M., Ethier S. et al. Reproducibility: changing the policies and culture of cell line authentication. *Nature methods.* 2015; 12: 493-497.
143. Friedman H.S., Prados M.D., Wen P.Y. et al. Bevacizumab Alone and in Combination With Irinotecan in Recurrent Glioblastoma. *J Clin Oncol.* 2009;27:4733–40.
144. Fröhlich E. Proteasen in Malignomen. DMW: Deutsche med. *Wochenschr.* 2004. 129(8): 391-395.
145. Fulton D., Urtasun R., Forsyth P. Phase II study of prolonged oral therapy with etoposide (VP16) for patients with recurrent malignant glioma. *J Neurooncol.* 1996; 27: 149–55.
146. Gacche R.N., Meshram R.J. Angiogenic factors as potential drug target: efficacy and limitations of anti-angiogenic therapy. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1846(1):161–79.
147. Gacche R.N., Meshram R.J. Targeting tumor micro-environment for design and development of novel anti-angiogenic agents arresting tumor growth. *Prog Biophys Mol Biol.* 2013;113(2):333–54.
148. Galbán S. et al. MRI-guided stereotactic biopsy of murine GBM for spatiotemporal molecular genomic assessment. *Tomography.* 2017;3(1):9.
149. Gandolfi S., Laubach J., Hideshima T. et al. The proteasome and proteasome inhibitors in multiple myeloma. *Cancer and Metastasis Reviews.* 2017; 36:

561-584.

150. Gardeck A.M., Sheehan J., Low W.C. Immune and viral therapies for malignant primary brain tumors. *Expert Opin Biol Ther.* 2017;17:457–74.

151. Garros-Regulez L., Aldaz P., Arrizabalaga O. et al. mTOR inhibition decreases SOX2-SOX9 mediated glioma stem cell activity and temozolomide resistance. *Expert opinion on therapeutic targets.* 2016;20:393-405.

152. Geavlete B., Muțescu R., Georgescu D., Geavlete P. Hexvix induced fluorescence blue light cystoscopy – a new perspective in superficial bladder tumors diagnosis. *Chirurgia (Bucur).* 2008;103(5):559–564.

153. Gerloff D. et al. Melanoma-derived exosomal miR-125b-5p educates tumor associated macrophages (TAMs) by targeting lysosomal acid lipase A (LIPA). *Cancers.* 2020;12(2):464.

154. Gia Vuong H., Altibi A.M., Duong U.N. et al. TERT promoter mutation and its interaction with IDH mutations in glioma_ Combined TERT promoter and IDH mutations stratifies lower -grade glioma into distinct survival subgroups: a meta-analysis of aggregate data. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2018;120:1–9.

155. Giulioni M., Marucci G., Martinoni M. et al. Epilepsy associated tumors: review article. *World J Clin Cases.* 2014;2:623–41.

156. Gong L., Liu M., Zeng T., Shi X., Yuan C., Andreasen P.A., Huang M. Crystal Structure of the Michaelis Complex between Tissue-type Plasminogen Activator and Plasminogen Activators Inhibitor-1. *J Biol Chem.* 2015;290(43):25795-25804. doi:10.1074/jbc.M115.677567

157. Gorlia T., Wu W., Wang M. et al. New validated prognostic models and prognostic calculators in patients with low-grade gliomas diagnosed by central pathology review: a pooled analysis of extent of resection TC/RTOG/NCCTG phase 3 clinical trials. *Neuro Oncol.* 2013;15:1568–79.

158. Gould S., Junttila M., de Sauvage F. Translational value of mouse models in oncology drug development. *Nature medicine.* 2015; 21: 431.

159. Grau S., Thorsteinsdottir J., von Baumgarten L. et al. Bevacizumab May cause reactivity to VEGF-C and -D in the human brain and tumor derived endothelial

cells. *J Neurooncol.* 2011;104(1): 103–12.

160. Gvaldin D.Y., Pushkin A.A., Timoshkina N.N., Rostorguev E.E., Nalgiev F.M., Kit O.I. Integrative analysis of mRNA and miRNA sequencing data for gliomas of various grades. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics.* 2020; 21:73

161. Han M., Wang S., Yang N., Wang X., Zhao W., Saed H. S., ... & Miletic H. Therapeutic implications of altered cholesterol homeostasis mediated by loss of CYP46A1 in human glioblastoma. *EMBO molecular medicine.* 2020;12(1): e10924.

162. Hartmann C., Hentschel B., Wick W. et al. Patients with IDH1 wild type anaplastic astrocytomas exhibit worse prognosis than IDH1-mutated glioblastomas, and IDH1 mutation status accounts for the unfavorable prognostic effect of higher age: implications for classification of gliomas. *Acta Neuropathol.* 2010;120:707–18.

163. Hashimoto I., Kodama J., Seki N. et al. Vascular endothelial growth factor-C expression and its relationship to pelvic lymph node status in invasive cervical cancer. *Br J Cancer.* 2001;85:93–7.

164. Hashizume R., Ozawa T., Dincaet E. et al. A human brainstem glioma xenograft model enabled for bioluminescence imaging. *Journal of neuro-oncology.* 2010; 96: 151-159.

165. Hasselbach L.A., Irtenkauf S.M., Lemke N.W. et al. Optimization of high grade glioma cell culture from surgical specimens for use in clinically relevant animal models and 3D immunochemistry. *J Vis Exp.* 2014;7(83):e51088. doi: 10.3791/51088

166. Hatva E., Kaipainen A., Mentula P. et al. Expression of endothelial cell-specific receptor tyrosine kinases and growth factors in human brain tumors. *Am J Pathol.* 1995;146(2):368–78.

167. Hawkins C., Walker E., Mohamed N. et al. BRAF-KIAA1549 Fusion Predicts Better Clinical Outcome in Pediatric Low-Grade Astrocytoma. *Clin Cancer Res Cancer Res.* 2011;17:4790–8.

168. Hayami S., Kelly J.D., Cho H. S., Yoshimatsu M., Unoki M., Tsunoda T., ... & Nakamura Y. Overexpression of LSD1 contributes to human carcinogenesis through chromatin regulation in various cancers. *International journal of cancer.* 2011; 128(3):574-586.

169. Hayashi Y. et al. Hypoxia/pseudohypoxia-mediated activation of hypoxia-inducible factor-1 α in cancer. *Cancer science*. 2019;110(5):1510.
170. Hayashi Y., Zhang Y., Yokota A. et al. Pathobiological pseudohypoxia as a putative mechanism underlying myelodysplastic syndromes. *Cancer Discov*. 2018;8: 1438-1457.
171. Hervey-Jumper S.L., Berger M.S. Maximizing safe resection of low- and high-grade glioma. *J Neurooncol*. 2016;130:269–82.
172. Hi F., Shao N., Wang R. et al. Identification of 9 serum microRNAs as potential noninvasive biomarkers of human astrocytoma. *Neuro Oncol*. 2015;17(3):383-391. doi:10.1093/neuonc/nou169Pub
173. Holmberg J. et al. Activation of neural and pluripotent stem cell signatures correlates with increased malignancy in human glioma. *PloS one*. 2011;6(3):e18454
174. Hu L.P., Zhang X.X., Jiang S.H., Tao L.Y., Li Q., Zhu L.L., Yang M.W., Huo Y.M., Jiang Y.S., Tian G.A., Cao X.Y., Zhang Y.L., Yang Q., Yang X.M., Wang Y.H., Li J., Xiao G.G., Sun Y.W., Zhang Z.G. Targeting Purinergic Receptor P2Y2 Prevents the Growth of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma by Inhibiting Cancer Cell Glycolysis. *Clin Cancer Res*. 2019 Feb 15;25(4):1318-1330.
175. Hu X., Li X., Valverde K., Fu X., Noguchi C., Qiu Y. et al. LSD1-mediated epigenetic modification is required for TAL1 function and hematopoiesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 2009;106:10141–10146.
176. Huang J., Liu F., Liu Z. et al. Immune checkpoint in glioblastoma: promising and challenging. *Front Pharmacol*. 2017;8:1–10.
177. Huszthy P.C. et al. In vivo models of primary brain tumors: pitfalls and perspectives. *Neuro-oncology*. 2012;14:979-993.
178. Irtenkauf S., Sobiechowski S. et al. Optimization of glioblastoma mouse orthotopic xenograft models for translational research. *Comparative medicine*. 2017; 67: 300-314.
179. Jakola A.S., Skjulsvik A.J., Myrnes K.S. et al. Surgical resection versus watchful waiting in low -grade gliomas. *Ann Oncol*. 2017;28:1942–48.
180. Janiszewska M., Suvà M.L., Riggi N., Houtkooper R.H., Auwerx J.,

Clément-Schatlo V. et al. Imp2 controls oxidative phosphorylation and is crucial for preserving glioblastoma cancer stem cells. *Genes Dev.* 2012;26:1926–1944.

181. Jenkins R.B., Blair H., Ballman K.V. et al. A t(1;19)(q10;p10) mediates the combined deletions of 1p and 19q and predicts a better prognosis of patients with oligodendroglioma. *Cancer Res.* 2006;66: 9852–61.

182. Jensen R., Lee J. Predicting outcomes of patients with intracranial meningiomas using molecular markers of hypoxia, vascularity, and proliferation. *Neurosurgery.* 2012;71(1):146–56.

183. Ji X., Chen S., Guo Y. et al. Establishment and evaluation of four different types of patient-derived xenograft models. *Cancer cell international.* 2017; 17: 1-11.

184. Jiang W.G., Sanders A.J., Katoh M., Ungefroren H., Gieseler F., Prince M., Thompson S.K., Zollo M., Spano D., Dhawan P., Sliva D., Subbaravan P.R., Sarkar M., Honoki K., Fujii H., Georgakilas A.G., Amedei A., Niccolai E., Amin A., Ashraf S.S., Ye L., Helferich W.G., Yang X., Boosani C.S., Guha G., Ciriolo M.R., Aquilano K., Chen S., Azmi A.S., Keith W.N., Bilsland A., Bhakta D., Halicka D., Nowsheen S., Pantano F., Santini D. Tissue invasion and metastasis: Molecular, biological and clinical perspectives. *Semin Cancer Biol.* 2015;244-275. doi:10.1016/j.semcancer.2015.03.008

185. Johnson D.E. The ubiquitin-proteasome system: opportunities for therapeutic intervention in solid tumors. *Endocrine-related cancer.* 2015;22:T1-T17.

186. Johnson D.R., Brown P.D., Galanis E., Hammack J.E. Pilocytic astrocytoma survival in adults: analysis of the surveillance, epidemiology, and end results program of the national cancer institute. *J Neurooncol.* 2012;108:187–93.

187. Joo K., J Kim, J Jin, et al. Patient-specific orthotopic glioblastoma xenograft models recapitulate the histopathology and biology of human glioblastomas in situ. *Cell reports.* 2013; 3: 260-273.

188. Jung J., Seol H., Chang S. The generation and application of patient-derived xenograft model for cancer research. *Cancer research and treatment: official journal of Korean Cancer Association.* 2018;50:1.

189. Kaelin W.G. Proline hydroxylation and gene expression. *Annu Rev Biochem.* 2005;74:115-128.

190. Kanamori M., Suzuki H., Takei H. Malignant transformation of diffuse astrocytoma to glioblastoma associated with newly developed BRAF V600E mutation. *Brain Tumor Pathology*. 2016;33(1);50–56.
191. Kandenwein J.A., Park-Simon T.W., Schramm J., Simon M. uPA/PAI-1 expression and uPA promoter methylation in meningiomas. *J Neurooncol*. 2011;103(3):533-539. doi:10.1007/s11060-010-0411-6
192. Karim A.B.M.F., Maat B., Hiitlevoll R. A randomized trial on dose-response in radiation therapy of low- grade cerebral glioma: European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) Study 22844. *Int J Radiat Oncol Bid Phys*. 1996;36:549–56.
193. Karlsson T., Kvarnbrink S., Holmlund C., Botling J., Micke P., Henriksson R., ... & Hedman H. LMO7 and LIMCH1 interact with LRIG proteins in lung cancer, with prognostic implications for early-stage disease. *Lung Cancer*. 2018;125:174-184.
194. Katelnitskaya O.V., Kit O.I., Rostorguev E.E., Natalya S. Kuznetsova, Porksheyana D.H., Atmachidi D.P., Kavitskiy S.E., Guskova N.K., Zakharchenko V.R., Nozdricheva A.S., Abakumova S.V. et al. Treatment of cancer-associated thrombosis after craniotomy. *J Clin Oncol*. 2019;37: ASCO (suppl;abstr13510) <https://meetinglibrary.asco.org/results/rostov?meetingView=2019%20ASCO%20Annual%20Meeting>
195. Katt M.E., Placone A.L., Wong A.D., Xu Z.S., Searson P.C. In Vitro Tumor Models: Advantages, Disadvantages, Variables, and Selecting the Right Platform. *Front Bioeng Biotechnol*. 2016;4:311–14.
196. Keith B., & Simon M.C. Hypoxia-inducible factors, stem cells, and cancer. *Cell*. 2007;129(3):465-472.
197. Kennedy J.C., Pottier R.H. Endogenous protoporphyrin IX, a clinically useful photosensitizer for photodynamic therapy (review). *Photobiol*. 1994;4:275–292.
198. Kheifets L., Ahlbom A., Crespi C.M. et al. A pooled analysis of extremely low- frequency magnetic fields and childhood brain tumors. *Am J Epidemiol*. 2010; 172:752–61.
199. Khuong-Quang D.A., Buczkowicz P., Rakopoulos P. et al. K27M mutation

in histone H3.3 defines clinically and biologically distinct subgroups of pediatric diffuse intrinsic pontine gliomas. *Acta Neuropathol.* 2012; 124: 439–47.

200. Kidd E.A., Mansur D.B., Leonard J.R., Michalski J.M., Simpson J.R., Perry A. The efficacy of radiation therapy in the management of grade I astrocytomas. *J Neurooncol.* 2006; 76: 55–58.

201. Kirby S., Purdy R.A. Headaches and brain tumors. *Neurol Clin NA.* 2014; 32: 423–32.

202. Kit O.I., Frantsiyants E.M., Nikipelova E.A., Komarova E.F., Kozlova L.S., Tavaryan I.S., Averkin M.A., Cheryarina N.D. Changes in markers of proliferation, neoangiogenesis and plasminogen activation system in rectal cancer tissue. *Eksp Klin Gastroenterol.* 2015;(2):40-45.

203. Kit O.I., Frantsiyants E.M., Rostorguev E.E., Kuznetsova N.S., Porsheyana D.Kh., Kavitskii S.E., Cherkiev I.U., Atmachidi D.P., Rostorguev V.E., Pandova O.V. Neurosurgical complications of stereotactic biopsy of brain tumors. Proceedings of the First International Forum of Oncology and Radiology, Moscow, September 23–28 2018. C 178.

204. Kit Oleg I., Atmachidi D.P., Shikhlyarova A.I., Rostorguev Ed.E., Engibaryan M.A., Ulyanova E.V., Protasova T.P., Arapova Yu.Yu., Korobeinikova E.P. Neurophysiological status and adaptation responses upon application of electromagnetic fields in complex treatment of patients with malignant gliomas of the brain. *Cardiometry Basic and applied research. Theory, practice, therapy, engineering, philosophy & methodology.* ISSN 2304-7232 Open Access e-Journal www.cardiometry.net Issue 11 November 2017. P.78-84.

205. Komori T. The 2016 WHO classification of tumours of the central nervous system: the major points of revision. *Neurologia medico-chirurgica.* 2017;57(7): 301-311

206. Korja M. et al. Glioblastoma survival is improving despite increasing incidence rates: a nationwide study between 2000 and 2013 in Finland. *Neuro-oncology.* 2019; 21: 370-379.

207. Korobeynikova E.P., Rostorguev Ed.E., Kuznetsova N.S. Постер на

конгресс ESMO ASTA Congress 17-19 November, Singapore. Influence of Emotiogenic Brain Structures on Tumor Growth in the Experiment Background.)

208. Kosaka N., Iguchi H., Ochiya T. Circulating microRNA in body fluid: a new potential biomarker for cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Sci.* 2010;101(10):2087–92.

209. Kreisl T.N., Kim L., Moore K. et al. Phase II Trial of Single- Agent Bevacizumab Followed by Bevacizumab Plus Irinotecan at Tumor Progression in Recurrent Glioblastoma. *J Clin Oncol.* 2009; 27: 740–45.

210. Krogan N.J., Lippman S., Agard D.A., Ashworth A., Ideker T. The cancer cell map initiative: defining the hallmark networks of cancer. *Mol Cell.* 2015; 58: 690–98.

211. Kumar P., Dezso Z., MacKenzie C., Oestreicher J., AgoulNIK S., Byrne M., et al. Circulating miRNA biomarkers for Alzheimer's disease. *PLoS One.* 2013; 8(7):e69807 doi: 10.1371/journal.pone.0069807

212. Labussière M., Di Stefano A.L., Gleize V. et al. TERT promoter mutations in gliomas, genetic associations and clinico-pathological correlations. *Br J Cancer.* 2014; 111: 2024–32.

213. Ledur P.F., Liu C., He H., Harris A.R., Minussi D.C., Zhou H.Y., Shaffrey M.E., Asthagiri A., Lopes M.B.S., Schiff D., Lu Y.C., Mandell J.W., Lenz G., Zong H. Culture conditions tailored to the cell of origin are critical for maintaining native properties and tumorigenicity of glioma cells. *Neuro Oncol.* 2016;18:1413–1424

214. Lee E.Q., Schiff D., Wen P.Y. Neurologic complications of cancer therapy. *New York: Demos Medical*, 2011

215. Lee J., Jo D., Kim J. et al. Development of a patient-derived xenograft model of glioblastoma via intravitreal injection in mice. *Experimental & molecular medicine.* 2019; 51: 1-9.

216. Lee J.E. Lim J., Hong Y. et al. High-dose metformin plus temozolomide shows increased anti-tumor effects in glioblastoma in vitro and in vivo compared with monotherapy. *Cancer research and treatment: official journal of Korean Cancer Association.* 2018;50: 1331.

217. Lee S.H., Lee Y.S., Hong Y.G., Kang C.S. Significance of COX-2 and VEGF expression in histopathologic grading and invasiveness of meningiomas. *APMIS*. 2014;122(1):16–24.
218. Lenting K., Verhaak R, Laan M. et al. Glioma: experimental models and reality. *Acta neuropathologica*. 2017; 133. – №. 2: 263-282
219. Levy A.P., Levy N.S., Wegner S., Goldberg M. A. Transcriptional regulation of the rat vascular endothelial growth factor gene by hypoxia. *Journal of Biological Chemistry*. 1995;270(22):13333-13340.
220. Li G., Zhang Y., Mao J., Hu P., Chen Q., Ding W., Pu R. LncRNA TUC338 is overexpressed in prostate carcinoma and downregulates miR-466. *Gene*. 2019;707: 224-230.
221. Li J. et al. Advances in inhibition of protein-protein interactions targeting hypoxia-inducible factor-1 for cancer therapy. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2019; 27: 1145-1158.
222. Li W., Liu J., Fuet W. et al. 3-O-acetyl-11-keto- β -boswellic acid exerts anti-tumor effects in glioblastoma by arresting cell cycle at G2/M phase. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 2018; 37(1): 132.
223. Liao D., Corle C., Seagroves T.N., Johnson R.S. Hypoxia-inducible factor-1 α is a key regulator of metastasis in a transgenic model of cancer initiation and progression. *Cancer research*. 2007;67(2): 563-572.
224. Liao Z., She C., Ma L., Sun Z., Li P., Zhang X., ... & Li W. KDELR2 promotes glioblastoma tumorigenesis targeted by HIF1 α via mTOR signaling pathway. *Cellular and molecular neurobiology*. 2019;39(8):1207-1215.
225. Lisyanyi N.I., Gnedkova I.A., Stanetskaya D.N., Rozumenko V.D., Kvasha M.S., Bel'skaya L.N., Klyuchnikova A.I., Shmeleva A.A. Connection of human cytomegalovirus and malignant gliomas of brain. *Ukrains'kii neurokhirurgichnii zhurnal*. 2016; 1:44-49. Accessed December 13, 2017. (In Russ.) <http://cyberleninka.ru/article/n/svyaz-tsitomegalovirusa-so-zlokachestvennymi-gliomami-golovnogo-mozga> (<http://cyberleninka.ru/article/n/svyaz-tsitomegalovirusa-so-zlokachestvennymi-gliomami-golovnogo-mozga>).

226. Liu H., Chen G.X., Liang M.Y., Qin H., Rong J., Yao J.P., & Wu Z.K. Atrial fibrillation alters the microRNA expression profiles of the left atria of patients with mitral stenosis. *BMC cardiovascular disorders*. 2014; 14(1): 10.
227. Liu R. et al. Genomic copy number gains of ErbB family members predict poor clinical outcomes in glioma patients. *Oncotarget*. 2017; 8(54): 92275
228. Louis D.N., Ohgaki H., Wiestler O.D. CW. WHO classification of Tumours of the central nervous system (revised 4th edition). *World Health Organization: Lyon*, 2016.
229. Louis D.N., Perry A., Reifenberger G. et al. The 2016 World Health Organization classification of tumors of the central nervous System: a summary. *Acta Neuropathol*. 2016; 131: 803–20.
230. Louis D.N., Schiff D., Batchelor T., Wen P.Y. Classification and pathologic diagnosis of gliomas. UpToDate, Waltham, MA: Walters Kluwer Health. 2017.
231. Lu J., Getz G., Miska E.A., Alvarez-Saavedra E., Lamb J., Peck D. et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*. 2005;435(7043):834–8. doi: 10.1038/nature03702
232. Lu V., Jue T., McDonaldet K.et al. The survival effect of repeat surgery at glioblastoma recurrence and its trend: a systematic review and meta-analysis. *World neurosurgery*. 2018; 115: 453-459.
233. Ma L., Zhang H., Liu Y.Z., Yin Y.L., Ma Y.Q., Zhang S.S. Ulinastatin decreases permeability of blood-brain barrier by inhibiting expression of MMP-9 and t-PA in postoperative aged rats. *Int J Neurosci*. 2016;126(5):463-468. doi:10.3109/00207454.2015.1025394
234. Mabray M.C., Barajas R.F., Cha S. Modern brain tumor imaging. *Brain Tumor Res Treat*. 2015; 3: 8–23.
235. Maiques-Diaz A., & Somervaille T.C. Inhibit a kinase to degrade a histone demethylase: a candidate therapeutic approach in glioblastoma. *TranslCancerRes*. 2017;6: S57-60.
236. Malmström A., Grønberg B.H., Marosi C. et al. Temozolomide versus

standard 6-week radiotherapy versus hypofractionated radiotherapy in patients older than 60 years with glioblastoma: the Nordic randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2012; 13: 916–26.

237. Malone J., Yang J., Hershman D.L. et al. Complications following stereotactic needle biopsy of intracranial tumors. *World Neurosurgery.* 2017; 84 (4): 1084.1089

238. Manasanch E., Orlowski R. Proteasome inhibitors in cancer therapy. *Nature reviews Clinical oncology.* 2017; 14: 417.

239. Mao K. et al. Potential regulation of glioma through the induction of apoptosis signaling via Egl-9 family hypoxia-inducible factor 3. *Oncology letters.* 2017;13(2):893-897.

240. Marra J.S. et al. Survival after radiation therapy for high-grade glioma. *Reports of Practical Oncology & Radiotherapy.* 2019; 24(1): 35-40.

241. Masoud G.N., Li W. HIF-1alpha pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy. *Acta Pharm Sin B.* 2015;5:378-389

242. Matias S., Lottem E., Dugue G.P., Mainen Z.F. Activity patterns of serotonin neurons underlying cognitive flexibility. *Elife.* 2017;6: e20552;

243. McMahon B.J., Kwaan H.C. Components of the Plasminogen-Plasmin System as Biologic Markers for Cancer. *Adv Exp Med Biol.* 2015;(867):145-156. doi:10.1007/978-94-017-7215-0_10

244. Mellai M., Monzeglio O., Piazzzi A. MGMT promoter hypermethylation and its associations with genetic alterations in a series of 350 brain tumors. *Journal of Neurooncology.* 2012;107(3):617–631.

245. Miletic H. et al. Anti-VEGF therapies for malignant glioma: treatment effects and escape mechanisms. *Expert Opin.* 2009;13(4):455–68.

246. Miyai M., Tomita H., Soeda A. et al. Current trends in mouse models of glioblastoma. *Journal of neuro-oncology.* 2017; 135: 423-432;

247. Morgan L.L., Miller A.B., Sasco A., Davis D.L. Mobile phone radiation causes brain tumors and should be classified as a probable human carcinogen (2A) (Review). *Int J Oncol.* 2015; 46: 1865–71.

248. Mortazavi D., Sharifi M. Antiproliferative effect of upregulation of hsa-let-7c-5p in human acute erythroleukemia cells. *Cytotechnology*. 2018;70(6):1509-1518.
249. Mullany L.E., Herrick J.S., Sakoda L.C., Samowitz W., Stevens J.R., Wolff R.K., Slattery M.L. miRNA involvement in cell cycle regulation in colorectal cancer cases. *Genes & cancer*. 2018;9(1-2):5
250. Nana A.W., Yang P.M., Lin H.Y. Overview of Transforming Growth Factor β Superfamily Involvement in Glioblastoma Initiation and Progression. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2015;16(16):6813–23.
251. Naorem L.D., Muthaiyan M., Venkatesan A. Identification of dysregulated miRNAs in triple negative breast cancer: A meta-analysis approach. *Journal of cellular physiology*. 2019;234(7):11768-11779.
252. Nardella C., Clohessy J.G., Alimonti A., Pandolfi P.P. Pro-senescence therapy for cancer treatment. *Nat. Rev. Cancer*. 2011;(11):503–511.
253. Nassehi D. Intracranial meningiomas, the VEGF-A pathway, and peritumoral brain oedema. *Dan Med J*. 2013;60(4):B4626.
254. National Comprehensive Cancer Network. Central nervous system cancers (version 1.2018). https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/cns.pdf (accessed Nov 22, 2017).
255. Niego B., Medcalf R.L. Plasmin-dependent modulation of the blood-brain barrier: a major consideration during tPA-induced thrombolysis? *J Cereb Blood Flow Metab*. 2014;34(8):1283-1296. doi:10.1038/jcbfm.2014.99
256. Nijaguna M.B., Patil V., Urbach S. et al. Glioblastoma-derived Macrophage Colony-stimulating Factor (M-CSF) Induces Microglial Release of Insulin-like Growth Factor-binding Protein 1 (IGFBP1) to Promote Angiogenesis. *J Biol Chem*. 2015;290(38):23401–15.
257. Niyazi M., Pitea A., Mittelbronn M., Steinbach J., Sticht C., Zehentmayr F., ... & Lauber K. A 4-miRNA signature predicts the therapeutic outcome of glioblastoma. *Oncotarget*. 2016;7(29):45764.
258. Noorbakhsh A., Tang J.A., Marcus L.P. et al. Gross-total resection outcomes in an elderly population with glioblastoma: a SEER-based analysis. *J*

Neurosurg. 2014;120:31–39.

259. Nordqvist A.C., Mathiesen T. Expression of IGF-II, IGFBP-2, -5, and -6 in meningiomas with different brain invasiveness. *J Neurooncol.* 2002;57(1):19–26.

260. Ocana A., Pandiella A., Siu L.L., Tannock I.F. Preclinical development of molecular-targeted agents for cancer. *Nat Rev Clin Oncol.* 2010;8:200–209.

261. Onnis B., Rapisarda A., Melillo G. Development of HIF-1 inhibitors for cancer therapy. *Journal of cellular and molecular medicine.* 2009;13:2780-2786.

262. Ortolano S., Spuch C. tPA in the central nervous system: relations between tPA and cell surface LRP6 (review). *Recent Pat Endocr Metab Immune Drug Discov.* 2013;7:65-76.

263. Ostrom Q.T., Gittleman H., Liao P. et al. CBTRUS statistical report: Primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2010–2014. *Neuro Oncol.* 2017;19:1–88.

264. Ozawa T., James C.D. Establishing intracranial brain tumor xenografts with subsequent analysis of tumor growth and response to therapy using bioluminescence imaging. *JoVE (Journal of Visualized Experiments).* 2010; 41: e1986.

265. Pajtler K.W., Mack S.C., Ramaswamy V. et al. The current consensus on the clinical management of intracranial ependymoma and its distinct molecular variants. *Acta Neuropathol.* 2017; 133: 5–12.

266. Park K. et al. Molecular and functional evaluation of a novel HIF inhibitor, benzopyranyl 1, 2, 3-triazole compound. *Oncotarget.* 2017; 8(5):7801.

267. Park S.-H., Won J., Kim S.-I., et al. Molecular testing of brain tumor. *J Pathol Transl Med.* 2017; 51: 205–23.

268. Parsons D.W., Jones S., Zhang X. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science.* 2008;321(5897):1807–1812.

269. Pasupuleti N., Grodzki A.C., Gorin F. Mis-trafficking of endosomal urokinase proteins triggers drug-induced gliomanonapoptotic cell death. *Mol Pharmacol.* 2015;87(4):683-696. doi:10.1124/mol.114.096602

270. Patel A.P., Tirosh I., Trombetta J.J., Shalek A.K., Gillespie S.M., Wakimoto H., Cahill D.P., Nahed B.V., Curry W.T., Martuza R.L., Louis D.N.,

Rozenblatt-Rosen O., Suvà M.L. et al. Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma. *Science*. 2014; 344:1396–1401.

271. Patel J.N., McLeod H.L., & Innocenti F. Implications of genome-wide association studies in cancer therapeutics. *British journal of clinical pharmacology*. 2013;76(3):370-380.

272. Patrizii M., Bartucci M., Pineet S. et al. Utility of glioblastoma patient-derived orthotopic xenografts in drug discovery and personalized therapy. *Frontiers in oncology*. 2018;8: 23.

273. Perry A., Wesseling P. Histologic classification of gliomas. *Handbook of clinical neurology*. – Elsevier. 2016;134:71-95.

274. Perry J.R., Be K., Mason W.P. et al. Phase II trial of continuous dose-intense temozolomide in recurrent malignant glioma: RESCUE Study. *J Clin Oncol*. 2010; 28: 2051–58.

275. Perry J.R., Laperriere N., O’Callaghan C.J. et al. Short-course radiation plus temozolomide in elderly patients with glioblastoma. *N Engl J Med*. 2017; 376: 1027–37.

276. Pítia Flores Ledur, Giovana Ravizzoni Onzi, Hui Zong, Guido Lenz. Culture conditions defining glioblastoma cells behavior: what is the impact for novel discoveries? *Oncotarget*. 2017 Sep 15; 8(40): 69185–69197. Published online 2017 Aug 11. doi: 10.18632/oncotarget.20193.

277. Pompili L., Porru M., Caruso C. et al. Patient-derived xenografts: a relevant preclinical model for drug development. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 2016; 35: 189.

278. Poon C.C., Gordon P.M.K., Liu K. et al. Differential microglia and macrophage profiles in human IDH-mutant and -wild type glioblastoma. *Oncotarget*. 2019;10(33): 3129-3143.

279. Porro A., Feuerhahn S., Lingner J. TERRA-reinforced association of LSD1 with MRE11 promotes processing of uncapped telomeres. *Cell Rep*. 2014;6:765–776.

280. Rao G. Intraoperative MRI and maximizing extent of resection. *Neurosurg Clin N Am*. 2017; 28: 477–85.

281. Reuss D.E., Mamatjan Y., Schrimpf D. et al. IDH mutant diffuse and anaplastic astrocytomas have similar age at presentation and little difference in survival: a grading problem for WHO. *Acta Neuropathol.* 2015; 129: 867–73.
282. Reuss D.E., Piro R.M., Jones D.T.W., Simon M., Ketter R., Kool M. et al. Secretory meningiomas are defined by combined KLF4 K409Q and TRAF7 mutations. *Acta Neuropathol.* 2013; 125:351–8.
283. Ricard D., Kakoshi G., Amiel-Benouach A. Dynamic history of low-grade gliomas before and after temozolomide treatment. *Annals of Neurology.* 2007;61(5): 484–490.
284. Ritchie M.E., Phipson B., Wu D.I., Hu Y., Law C.W., Shi W., Smyth G.K. Limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic acids research.* 2015;43(7): e47-e47.
285. Roa W., Brasher P.M.A., Bauman G. et al. Abbreviated course of radiation therapy in older patients with glioblastoma multiforme: a prospective randomized clinical trial. *J Clin Oncol.* 2004; 22: 1583–88.
286. Roeten M., Cloos J., Jansen G. Positioning of proteasome inhibitors in therapy of solid malignancies. *Cancer chemotherapy and pharmacology.* 2018; 81: 227-243.
287. Roomi M.W., Kalinovsky T., Niedzwiecki A., Rath M. Modulation of uPA, MMPs and their inhibitors by a novel nutrient mixture in human glioblastoma cell lines. *Int J Oncol.* 2014;45(2):887-894. doi:10.3892/ijo.2014.2465
288. Rossetti A.O., Stupp R. Epilepsy in brain tumor patients. *Curr Opin Neurol.* 2010; 23: 603–9.
289. Ru Y. et al. The multiMiR R package and database: integration of microRNA–target interactions along with their disease and drug associations. *Nucleic acids research.* 2014;42(17): e133-e133.
290. Rudà R., Reifenberger G., Frappaz D. et al. EANO guidelines for the diagnosis and treatment of ependymal tumors. *Neuro Oncol.* 2018;20: 445–56.
291. Ryu J., Yoon N.A., Lee Y.K., Jeong J.Y., Kang S., Seong H., Choi J., Park N., Kim N., Cho W.J., Paek S.H., Cho G.J., Choi W.S., Park J.Y., Park J.W., Kang S.S.

Tristetraprolin inhibits the growth of human glioma cells through downregulation of urokinase plasminogen activator/urokinase plasminogen activator receptor mRNAs. *Mol Cells*. 2015;38(2):156-162. doi:10.14348/molcells

292. Saccà C.D. et al. Inhibition of lysine-specific demethylase LSD1 induces senescence in Glioblastoma cells through a HIF-1 α -dependent pathway. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*. 2019;1862(5):535-546.

293. Santangelo A., Imbrucè P., Gardenghi B. et al. A microRNA signature from serum exosomes of patients with glioma as complementary diagnostic biomarker. *J Neurooncol*. 2018;136(1):51-62. doi:10.1007/s11060-017-2639-x

294. Sareddy G.R., Viswanadhapalli S., Surapaneni P., Suzuki T., Brenner A., & Vadlamudi R.K. Novel KDM1A inhibitors induce differentiation and apoptosis of glioma stem cells via unfolded protein response pathway. *Oncogene*. 2017;36(17):2423-2434.

295. Sarmiento J.M., Mukherjee D., Black K.L. Do Long-Term Survivor Primary Glioblastoma Patients Harbor IDH1 Mutations? *Journal of Neurological Surgery. Part. A: Central European Neurosurgery*. 2016;77(3):195–200.

296. Saxton R.A., Sabatini D.M. mTOR signaling in growth, metabolism, and disease. *Cell*. 2017;168:960–976.

297. Scalzulli E., Grammatico S., Vozella F. et al. Proteasome inhibitors for the treatment of multiple myeloma. *Expert opinion on pharmacotherapy*. 2018; 19: 375-386.

298. Schuliga M. The inflammatory actions of coagulant and fibrinolytic proteases in disease. *Mediators Inflamm*. 2015;2015:4376-4395. doi:10.1155/2015/437695

299. Schumacher M., Robel P., Baulieu E.E. Development and regeneration of the nervous system: a role for neurosteroids. *Dev Neurosci*. 1996;18(1–2):6–21.

300. Schwartzentruber J., Korshunov A., Liu X.-Y. et al. Driver mutations in histone H3.3 and chromatin remodelling genes in paediatric glioblastoma. *Nature*. 2012; 482: 226–32.

301. Semenza G.L. HIF-1 mediates metabolic responses to intratumoral hypoxia

and oncogenic mutations. *J Clin Investig.* 2013;123(9):3664-3671.

302. Shao G., Wang J., Li Y., Liu X., Xie X., Wan X., ... & Zhang L. (). Lysine-specific demethylase 1 mediates epidermal growth factor signaling to promote cell migration in ovarian cancer cells. *Scientificreports.* 2015;5:15344.

303. Shaw E., Arusell R., Scheithauer B. et al. Prospective randomized trial of low- versus high- dose radiation therapy in adults with supratentorial low-grade glioma: initial report of a north central cancer treatment group/radiation therapy oncology group/eastern cooperative oncology group study. *J Clin Oncol.* 2002; 20: 2267–76.

304. Sherman B.T., & Lempicki R.A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature protocols.* 2009;4(1):44.

305. Shin Y.J., Choi J.S., Lee J.Y. et al. Differential regulation of vascular endothelial growth factor-C and its receptor in the rat hippocampus following transient forebrain ischemia. *Acta Neuropathol.* 2008;116(5):517–27.

306. Shin Y.J., Riew T.R., Park J.H., Lee M.Y. Expression of Vascular Endothelial Growth Factor-C (VEGF-C) and its receptor (VEGFR-3) in glial reaction caused by human mesenchymal stem cell engraftment in normal rat brain. *J Histochem Cytochem.* 2015;63(3):170–80.

307. Sieben C.J., Sturmlechner I., vandeSluis B., van Deursen J.M. Two-stepsenescence-focusedcancertherapies. *TrendsCellBiol.* 2018;28:723–737.

308. Sim J., Nam D.H., Kim Y. Comparison of 1p and 19q status of glioblastoma by whole exome sequencing, array-comparative genomic hybridization, and fluorescence in situ hybridization. *Medical Oncology.* 2018;35(5):60.

309. Simard B., Bouamrani A., Jourdes P., Pernod G., Dimitriadou V., Berger F. Induction of the fibrinolytic system by cartilage extract mediates its antiangiogenic effect in mouse glioma. *Microvasc Res.* 2011;82(1):6-17. doi:10.1016/j.mvr.2011.03.002

310. Simon M., Hosen I., Gousias K. et al. TERT promoter mutations: a novel independent prognostic factor in primary glioblastomas. *Neuro Oncol.* 2015;17:45–52.

311. Soeda A., Hara A., Kunisada T. et al. The evidence of glioblastoma heterogeneity. *Scientific reports.* 2015; 5:1-7.

312. Stepp H., Baumgartner R., Beyer W. et al. Fluorescence imaging and spectroscopy of ALA-induced protoporphyrin IX preferentially accumulated in tumor tissue. *Proc. SPIE*. 1995;2627:13–24.
313. Stupp R., Mason W.P., Van Den Bent M.J. et al. Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *N Engl J Med*. 2005; 352: 987–96.
314. Stupp R., Taillibert S., Kanner A.A. et al. Maintenance therapy with tumor-treating fields plus temozolomide vs temozolomide alone for glioblastoma: a randomized clinical trial. *JAMA*. 2015; 314: 2535–43.
315. Stupp R., Wong E.T., Kanner A.A. et al. Novo TTF-100A versus physician's choice chemotherapy in recurrent glioblastoma: A randomised phase 3 trial of a novel treatment modality. *Eur J Cancer*. 2012; 48: 2192–202.
316. Sturm D., Pfister S.M., Jones D.T.W.W., Stefan M.P., Jones D.T.W.W. Pediatric gliomas: current concepts on diagnosis, biology, and clinical management. *J Clin Oncol*. 2017; 35: 2370–7.
317. Suda T., Takubo K., Semenza G.L. Metabolic regulation of hematopoietic stem cells in the hypoxic niche. *CellStemCell*. 2011;9:298-310.
318. Suh J.H., Park C.K., Park S.H. Alpha internexin expression related with molecular characteristics in adult glioblastoma and oligodendroglioma. *The Korean Academy of Medical Sciences*. 2013;28(4):593–601.
319. Szerlip N.J., Pedraza A., Chakravarty D., Azim M., McGuire J., Fang Y., Ozawa T., Holland E.C., Huse J.T., Jhanwar S., Leversha M.A., Mikkelsen T., Brennan C.W. Intratumoral heterogeneity of receptor tyrosine kinases EGFR and PDGFRA amplification in glioblastoma defines subpopulations with distinct growth factor response. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109:3041–3046.
320. Tachibana I. et al. Overexpression of the TGFbeta-regulated zinc finger encoding gene, TIEG, induces apoptosis in pancreatic epithelial cells. *The Journal of clinical investigation*. 1997;99(10):2365-2374.
321. Tan C., Abdul-Majeed S., Cael B. et al. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of bortezomib. *Clinical pharmacokinetics*. 2019; 58: 157-168.

322. Tang J.H. et al. Bortezomib inhibits growth and sensitizes glioma to temozolomide (TMZ) via down-regulating the FOXM1–Survivin axis. *Cancer Communications*. 2019;39(1): 81.
323. Teicher B., Tomaszewski J. Proteasome inhibitors. *Biochemical pharmacology*. 2015; 96: 1-9.
324. Thomlinson R.H., Gray L.H. The histological structure of some human lung cancers and the possible implications for radiotherapy. *Br J Cancer*. 1955;9:539-549.
325. Timofeeva S.V., Kit O.I., Sitkovskaya A.O., Mezhevova I.V., Filippova S.Yu., Shamova T.V., Rostorguev E.E., Ignatov S.N., Kuznetsova N.S., Atmachidi D.P., Kavitskiy S.E., Novikova I.A. In Vivo-like model of glial tumors: Creation of primary cell lines. *J Clin Oncol*. 2020;38: e14515.
326. Tong F., Ying Y., Pan H., Zhao W., Li H., & Zhan X. MicroRNA-466 (miR-466) functions as a tumor suppressor and prognostic factor in colorectal cancer (CRC). *Bosnian journal of basic medical sciences*. 2018;18(3):252.
327. Triebels V.H.J.M., Taphoorn M.J.B., Brandes A.A. et al. Salvage PCV chemotherapy for temozolomide -resistant oligodendrogliomas. *Neurology*. 2004; 63: 904–06.
328. Trippa L., Alexander B.M. Bayesian baskets: a novel design for biomarker-based clinical trials. *J Clin Oncol*. 2017; 35: 681–87.
329. Turcan S., Rohle D., Goenka A. IDH1 mutation is sufficient to establish the glioma hypermethylator phenotype. *Nature*. 2012;483(7390):479–483.
330. Tykocki T., Eltayeb M. Ten-year survival in glioblastoma. A systematic review. *Journal of Clinical Neuroscience*. 2018; 54: 7-13.
331. Umar A., Boland C.R., Terdiman J.P. et al. Revised bethesda guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst*. 2004; 96: 261–268.
332. Valtonen S., Timonen U., Toivanen P. et al. Interstitial chemotherapy with carmustine -loaded polymers for high -grade gliomas: a randomized double-blind study. *Neurosurgery*. 1997; 41: 44–49.

333. Van Den Bent M. J., Klein M., Smits M. Bevacizumab and temozolomide in patients with first recurrence of WHO grade II and III glioma, without 1p/19q co-deletion (TAVAREC): a randomised controlled phase 2 EORTC trial. *Lancet Oncology*. 2018;19(9):1170–1179.

334. Van Den Bent M.J., Afra D., de Witte O.M. et al. FK. Long-term efficacy of early versus delayed radiotherapy for low- grade astrocytoma and oligodendroglioma in adults: the extent of resection TC 22845 randomised trial. *Lancet*. 2005; 366: 985–90.

335. Van Den Bent M.J., Brandes A.A., Taphoorn M.J.B. et al. Adjuvant procarbazine, lomustine, and vincristine chemotherapy in newly diagnosed anaplastic oligodendroglioma: long -term follow- up of extent of resection TC Brain Tumor Group Study 26951. *J Clin Oncol*. 2013; 31: 344–50.

336. Van Den Bent M.J., Chinot O., Boogerd W. et al. Second-line chemotherapy with temozolomide in recurrent oligodendroglioma after PCV (procarbazine, lomustine and vincristine) chemotherapy: extent of resection TC brain tumor group phase 2 study 26972. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2003; 14: 599–602.

337. Van Den Bent M.J., Erdem-Eraslan L., Idhah A. et al. MGMT-STP27 methylation status as predictive marker for response to PCV in anaplastic oligodendrogliomas and oligoastrocytomas. A report from extent of resection TC study 26951. *Clin Cancer Res*. 2013; 19: 5513–22.

338. Van Den Bent M.J., Keime-Guibert F., Brandes A.A. et al. Temozolomide chemotherapy in recurrent oligodendroglioma. *Neurology*. 2001; 57: 340–42.

339. Van Den Bent M.J., Klein M., Smits M. et al. Final results of the extent of resection TC Brain Tumor Group randomized phase 2 TAVAREC trial on temozolomide with or without bevacizumab in 1st recurrence grade II/III glioma without 1p/19q co-deletion. 2017. <https://meetinglibrary.asco.org/record/153220/abstract> (accessed Nov 7, 2017).

340. Van Den Bent M.J., Taphoorn M.J.B., Brandes A.A. et al. Phase II study of first -line chemotherapy with temozolomide in recurrent oligodendroglial tumors: the European Organization for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor Group

Study 26971. *J Clin Oncol*. 2003; 21: 2525–28.

341. Vandesompele J. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome biology*. 2002; 3(7): research0034.

342. Wang C. et al. Dual inhibition of PCDH9 expression by miR-215-5p up-regulation in gliomas. *Oncotarget*. 2017;8(6):10287.

343. Wang G.L., Semenza G.L. General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia. *ProcNatlAcadSciUSA*. 1993;90:4304-4308.

344. Wang Q., Ishikawa T., Michiue T., Zhu B.L., Guan D.W., & Maeda H. Stability of endogenous reference genes in postmortem human brains for normalization of quantitative real-time PCR data: comprehensive evaluation using geNorm, NormFinder, and BestKeeper. *International journal of legal medicine*. 2012;126(6): 943-952.

345. Wang S., Liu X. The UCSCXenaTools R package: a toolkit for accessing genomics data from UCSC xena platform, from Cancer multi-omics to single-cell RNA-seq. *Journal of Open Source Software*. 2019;4(40):1627.

346. Wang X., Jiang D., Xu C., Zhu G., Wu Z., & Wu Q. Differential expression profile analysis of miRNAs with HER-2 overexpression and intervention in breast cancer cells. *Int. J. Clin. Exp. Pathol*. 2017;10:5039-5062.

347. Wang Y., Chen Z., Chen W. Novel circulating microRNAs expression profile in colon cancer: a pilot study. *European journal of medical research*. 2017;22(1):51.

348. Wang Y., Guo X. Meta-analysis of association between mobile phone use and glioma risk. *J Cancer Res Ther*. 2016; 12: 298–300.

349. Wang Y., Wang B., Zhou H., Zhang X., Qian X., & Cui J. MicroRNA-384 inhibits the progression of papillary thyroid cancer by targeting PRKACB. *BioMed research international*. 2020.

350. Warburg O. On respiratory impairment in cancer cells. *Science* (NewYork, NY). 1956;124:269-270.

351. Ward P.S., Thompson C.B. Metabolic reprogramming: a cancer hallmark even Warburg did not anticipate. *Cancer Cell*. 2012;21:297–308.
352. Weller M., Stupp R., Hegi M.E. et al. Personalized care in neuro-oncology coming of age: why we need MGMT and 1p/19q testing for malignant glioma patients in clinical practice. *Neuro Oncol*. 2012; 14: 100–08.
353. Weller M., Van Den Bent M., Tonn J.C. et al. European Association for Neuro-Oncology (EANO) guideline on the diagnosis and treatment of adult astrocytic and oligodendroglial gliomas. *Rev Lancet Oncol*. 2017; 18: 315–29.
354. Welte J., Loges S., Dimmeler S., Carmeliet P. Recent molecular discoveries in angiogenesis and antiangiogenic therapies in cancer. *J Clin Invest*. 2013 Aug;123(8): 3190–200.
355. Wen Y., Zhou X., Lu M., He M., Tian Y., Liu L., Wang M., Tan W., Deng Y., Yang X., Mayer M.P., Zou F., Chen X. Bclaf1 promotes angiogenesis by regulating HIF-1 α transcription in hepatocellular carcinoma. *Oncogene*. 2019 Mar; 38(11):1845-1859. doi: 10.1038/s41388-018-0552
356. Wesseling P., Van Den Bent M., Perry A. Oligodendroglioma: pathology, molecular mechanisms and markers. *Acta Neuropathol*. 2015; 129: 809–27.
357. Westphal M., Hilt D.C., Bortey E. et al. A phase 3 trial of local chemotherapy with biodegradable carmustine (BCNU) wafers (Gliadel wafers) in patients with primary malignant glioma. *Neuro Oncol*. 2003; 5: 79–88.
358. Wick W., Hartmann C., Engel C. et al. NOA-04 randomized phase III trial of sequential radiochemotherapy of anaplastic glioma with procarbazine, lomustine, and vincristine or temozolomide. *J Clin Oncol*. 2009; 27: 5874–80.
359. Wick W., Platten M., Meisner C. et al. Temozolomide chemotherapy alone versus radiotherapy alone for malignant astrocytoma in the elderly: the NOA-08 randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2012;13: 707–15.
360. Wick W., Puduvalli V.K., Chamberlain M.C. et al. Phase III study of enzastaurin compared with lomustine in the treatment of recurrent intracranial glioblastoma. *J Clin Oncol*. 2010; 28: 1168–74.
361. Wick W., Roth P., Hartmann C. et al. Long- term analysis of the NOA-04

randomized phase 3 trial of sequential radiochemotherapy of anaplastic glioma with PCV or temozolomide. *Neuro Oncol.* 2016;18: 1529–37.

362. Wigerup C., Pålman S., Bexell D. Therapeutic targeting of hypoxia and hypoxia-inducible factors in cancer. *Pharmacology & therapeutics.* 2016;164:152-169.

363. Williamson J.R., Chang K., Frangos M. et al. Hyper glycemipseudo hypoxia and diabetic complications. *Diabetes.* 1993;42:801-813.]

364. Witzel I., Milde-Langosch K., Schmidt M., Karn T., Becker S., Wirtz R., Rody A., Laakmann E., Schütze D., Jänicke F., Müller V. Role of urokinase plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor mRNA expression as prognostic factors in molecular subtypes of breast cancer. *Onco Targets Ther.* 2014; (7):2205-2213. doi:10.2147/OTT.S65344

365. Wolf K. et al. Multi-step pericellular proteolysis controls the transition from individual to collective cancer cell invasion. *Nature Cell Biol.* 2007; 9(8): 893-904.

366. Wolf K. et al. Multi-step pericellular proteolysis controls the transition from individual to collective cancer cell invasion. *Nature Cell Biol.* 2007;9(8):893-904.

367. Woodcock J., LaVange L.M. Master protocols to study multiple therapies, multiple diseases, or both. *N Engl J Med.* 2017; 377: 62–70.

368. Workman P. et al. Guidelines for the welfare and use of animals in cancer research. *British journal of cancer.* 2010; 102 (11): 1555-1577.

369. Wrensch M., Minn Y., Chew T., Bondy M., Berger M.S. Epidemiology of primary brain tumors: Current concepts and review of the literature. *Neuro Oncol.* 2002; 4: 278–99.

370. Wu G., Broniscer A., McEachron T.A. et al. Somatic histone H3 alterations in pediatric diffuse intrinsic pontine gliomas and non -brainstem glioblastomas. *Nat Genet.* 2012; 44: 251–53.

371. Xie H., Tubbs R., Yang B. Detection of MGMT promoter methylation in glioblastoma using pyrosequencing. *International journal of clinical and experimental pathology.* 2015;8(1):636.

372. Xu Y., Zhong Y.J, Zhang W.Q, Song, J.H. Cooverexpression of matrix

metalloproteinases-1 and vascular endothelial growth factor-C predicts poor prognosis in patients with glioma. *Epidemiol.* 2013;37(5):697–702.

373. Yang M., Guo W., Yang C. et al. Mobile phone use and glioma risk: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* 2017; 12: e0175136.

374. Yoshida Y., Ozawa T., Yao T. et al. NT113, a pan-ERBB inhibitor with high brain penetrance, inhibits the growth of glioblastoma xenografts with EGFR amplification. *Molecular cancer therapeutics.* 2014; 13(12): 2919-2929.

375. Yu J. et al. MicroRNA-182 targets SMAD7 to potentiate TGF β -induced epithelial-mesenchymal transition and metastasis of cancer cells. *Nature communications.* 2016;7:13884.

376. Yu Y., Schleich K., Yue B., Ji S., Lohneis P., Kemper K. et al. Targeting the Senescence-Overriding Cooperative Activity of Structurally Unrelated H3K9 Demethylases in Melanoma. 2018;36:

377. Yuan M., Da Silva A.C.A., Arnold A., Okeke L., Ames H., Correa-Cerro L.S., ... & Rodriguez F.J. MicroRNA (miR) 125b regulates cell growth and invasion in pediatric low grade glioma. *Scientific reports.* 2018;8(1):1-14.

378. Yung W.K.A. et al. Safety and efficacy of erlotinib in first-relapse glioblastoma: a phase II open-label study. *Neuro-oncology.* 2010;12(10):1061-1070.

379. Zaky W., Marton C., Miller C. et al. The ubiquitin-proteasome pathway in adult and pediatric brain tumors: biological insights and therapeutic opportunities. *Cancer and Metastasis Reviews.* 2017; 36(4): 617-633.

380. Zawlik I., Vaccarella S., Kita D., Mittelbronn M., Franceschi S., Ohgaki H. Promoter methylation and polymorphisms of the MGMT gene in glioblastomas: a population-based study. *Neuroepidemiology.* 2009; 32: 21–29.

381. Zhang X.M., Wang J., Liu Z.L., Liu H., Cheng Y.F., & Wang T. LINC00657/miR-26a-5p/CKS2 ceRNA network promotes the growth of esophageal cancer cells via the MDM2/p53/Bcl2/Bax pathway. *Bioscience Reports.* 2020;40(6).

382. Zhao H., Wang J., Shao W. Wu C., Chen Z., To S.T. et al. Recent advances in the use of PI3K inhibitors for glioblastoma multiforme: current preclinical and clinical development. *Mol Cancer.* 2017; 16: 100.

383. Zhou B. et al. Hsa-let-7c-5p augments enterovirus 71 replication through viral subversion of cell signaling in rhabdomyosarcoma cells. *Cell & bioscience*. 2017; 7(1):1-14.
384. Zhou Q., Liu J., Quan J., Liu W., Tan H., Li W. MicroRNAs as potential biomarkers for the diagnosis of glioma: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Sci*. 2018;109(9):2651-2659.
385. Zhou X., Zhang Z., & Liang X. Regulatory Network Analysis to Reveal Important miRNAs and Genes in Non-Small Cell Lung Cancer. *Cell Journal (Yakhteh)*. 2020; 21(4):459.