

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Новосибирский научно-исследовательский институт травматологии
и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна» Министерства здравоохранения
Российской Федерации

На правах рукописи

СТУПАК

ЕВГЕНИЙ ВЯЧЕСЛАВОВИЧ



**ОНКОМИКРОРНК В ДИАГНОСТИКЕ И ПРОГНОЗЕ
У БОЛЬНЫХ С СУПРАТЕНТОРИАЛЬНЫМИ
ГЛИОМАМИ ГОЛОВНОГО МОЗГА**

14.01.18 – нейрохирургия

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

д-р мед. наук, проф.

Рабинович С.С.

Научный консультант:

канд. биол. наук

Титов С.Е.

Новосибирск

2019

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	16
1.1 Эпидемиология глиом и современные подходы к их лечению.....	16
1.2 МикроРНК в онкогенезе и диагностике глиом головного мозга.....	21
1.3 Перспективы использования микроРНК в диагностике глиальных опухолей и нейроонкологической практике	29
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	35
2.1 Общая характеристика больных.....	35
2.2 Методика молекулярно-генетических исследований	41
2.2.1 Выделение нуклеиновых кислот из операционных образцов.....	42
2.2.2 Обратная транскрипция.....	43
2.2.3 ПЦР в реальном времени	46
2.2.4. Детекция микроРНК с помощью технологии NanoString	48
2.3. Используемая аппаратура	48
2.4 Техника оперативных вмешательств при удалении супратенториальных глиом головного мозга.....	50
2.5 Методы исследования в клинике.....	51
2.5.1 Современные методы нейровизуализации в диагностике супратенториальных глиом головного мозга.....	51
2.5.2 Магнитно-резонансная томография головного мозга.....	52
2.5.3 Мультиспиральная компьютерная томография головного мозга.....	54
2.5.4 Навигационные технологии в хирургии супратенториальных глиом головного мозга	55
2.5.5 Морфологические методы верификации глиом и их гистологическая характеристика.....	62

2.6 Методика интраоперационного забора биоптата глиомы и морфологически неизменённой ткани головного мозга для молекулярно-генетических исследований.....	64
2.7 Методы статистического анализа.....	78
2.7.1 Непараметрический коэффициент Манна – Уитни.....	78
2.7.2 Построение дерева принятия решений.....	78
2.7.3 Метод ROC-анализа.....	78
2.7.4 Регрессионный анализа выживаемости пациентов с глиомами головного мозга.....	80
ГЛАВА 3. АНАЛИЗ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ ИССЛЕДУЕМЫХ СУПРАТЕНТОРИАЛЬНЫХ ГЛИОМ ГОЛОВНОГО МОЗГА	
3.1 МикроРНК-маркеры для дифференциальной диагностики глиом головного мозга различных степеней злокачественности.....	81
3.2 Способ дифференциальной диагностики глиом головного мозга человека.....	94
3.3 Платформа NanoString в поиске новых микроРНК-маркеров для дифференциальной диагностики глиом головного мозга.....	100
ГЛАВА 4. ПРОГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ ПРОФИЛЕЙ ЭКСПРЕССИИ МИКРОРНК И ДРУГИХ ФАКТОРОВ В ВЫЖИВАЕМОСТИ ПАЦИЕНТОВ.....	
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	130
ВЫВОДЫ	147
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	149
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	150
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	151

ВВЕДЕНИЕ

В многочисленных исследованиях последних лет, выполненных в различных странах мира, отмечен устойчивый рост онкологической заболеваемости центральной нервной системы (ЦНС) [3, 4, 5, 16, 18, 21, 24, 25, 29, 45, 64, 127]. На каждые 100000 населения, по данным разных авторов [18, 20, 24, 29, 142], ежегодно у взрослых выявляется от 7,42 до 13,9 случаев первичных опухолей головного мозга, значительную долю которых (50 - 55 %) составляют глиомы, причем более половины из них диагностируются как злокачественные [3, 4, 20, 24, 45, 127]. Главным образом именно они обуславливают высокую смертность и послеоперационную инвалидизацию нейроонкологических больных [3, 4, 23, 24]. Вышесказанное послужило причиной постоянно возрастающего интереса ученых и клиницистов к поиску новых методов лечения глиальных опухолей головного мозга.

В последние десятилетия, благодаря многим техническим новациям, в нейрохирургической практике достигнут значительный прогресс для всех этапов лечения опухолей (диагностика, удаление, послеоперационная терапия). Применение в диагностике современных томографов позволяет успешно идентифицировать заболевание на ранних (иногда доклинических) стадиях, результатом чего является успешное хирургическое лечение многих внемозговых опухолей [57, 66, 92, 204]. Широкомасштабное клиническое применение микрохирургической техники - операционного микроскопа с высокой кратностью увеличения, интраоперационных МРТ, нейронавигационных и флюоресцентных технологий, позволяет резецировать опухолевые образования с высокой степенью радикальности [12, 22, 39, 45, 56, 70, 74, 93, 99]. Тем не менее, далеко не всегда удаётся обеспечить тотальное удаление внутримозговых опухолей, особенно в тех случаях, когда патологический очаг распространяется на функционально значимые зоны головного мозга, где хирургические манипуляции зачастую приводят к грубой

инвалидизации больных. Кроме того, для глиальных опухолей характерна высокая способность к инфильтративному росту, что очень часто крайне затрудняет визуальное определение их границ со здоровой мозговой тканью и тотальное удаление. Даже при условии удаления всего опухолевого узла в перитуморозной зоне встречаются опухолевые клетки, последующий рост которых приводит к рецидивам заболевания [3, 4, 39, 42, 70, 87, 93, 99, 111, 130, 131, 147, 150, 157, 160, 203, 213, 216].

Особое положение среди всех глиальных новообразований занимают глиобластомы (ГБ), являющиеся наиболее частыми и агрессивными первичными злокачественными опухолями головного мозга с фатальным летальным прогнозом. Даже после успешной их резекции общая 1-, 2- и 3-летняя выживаемость (ОВ) составляет, соответственно, около 40, 15 и 7 - 8 %, а 5-летняя – варьирует от 0,05 до 5,5 % от общего числа пролеченных пациентов [3, 4, 5, 20, 142, 193].

В поисках путей достижения эрадикации низкодифференцированных внутримозговых опухолей усилиями многочисленных исследователей [0, 2, 9, 13, 26, 31, 44, 52, 55, 65, 67, 68, 71, 97, 126, 128, 158, 193] был сформирован единый комплексный подход к их лечению, в соответствии с которым оперативное вмешательство, направленное на максимальную опухолевую циторедукцию, дополнено лучевой и химиотерапией, а также опционально применяемой иммунокоррекцией. Тем не менее, и при использовании такого подхода к лечению, лишь в редких случаях удается остановить рост злокачественных глиальных опухолей и заметно продлить жизнь пациентам [18, 20, 24, 29, 56, 94, 103, 142, 143, 166, 191, 202].

Помимо комплекса проблем, стоящих на пути совершенствования лечения больных со злокачественными интракраниальными опухолями, серьёзное внимание следует уделять и прогнозу течения заболевания, успех которого в значительной степени определяется правильной оценкой степени злокачественности опухоли, определяющей в свою очередь, тактику выбора

комплексного лечения. Для отдаленного прогноза решающим фактором при лечении большинства опухолей остаётся гистологический диагноз. К сожалению, и в настоящее время, как при его проведении, так и при установлении степени злокачественности опухоли не удается полностью избежать ошибок, доля которых даже в лучших клиниках достигает 20 - 25 % [133].

В настоящее время в классификации опухолей важное место отводится определению молекулярно-генетических характеристик опухоли, поскольку они гораздо лучше коррелируют с прогнозом, чем существующая гистологическая характеристика глиом. Об этом свидетельствует принятая и опубликованная в 2016 году [125] новая гистологическая классификация ВОЗ опухолей ЦНС, предложенные поправки в которой касаются, прежде всего, нейроэктодермальных опухолей. Новая классификация основана не только на гистологической структуре опухолей, но и на обязательном исследовании ее наиболее значимых молекулярно-генетических характеристик. Конечно, по мере накопления новых данных о биологических особенностях и генетическом профиле новообразований центральной нервной системы, имеющих доказанное влияние на прогноз заболевания, классификация будет обязательно пополняться и совершенствоваться. Нам представляется, что одним из направлений ее совершенствования и, соответственно, оптимизации комбинированного лечения злокачественных интракраниальных глиом является изучение роли микроРНК в патогенезе их развития.

Термином «микроРНК» принято обозначать короткие некодирующие молекулы рибонуклеиновой кислоты, состоящие в среднем из 20 - 22 нуклеотидов и осуществляющие контроль экспрессии белок кодирующих генов [10, 0]. Накопленный научный материал убедительно свидетельствует об их важной роли в пролиферации, дифференцировке и апоптозе клеток [10, 47, 75, 114, 129, 164, 167, 189, 190]. Экспериментально доказана ассоциированность микроРНК с различными типами опухолей, а также их способность проявлять

себя в роли онкогенов и супрессоров новообразований, а, тем самым, служить первопричиной некоторых злокачественных превращений, как и соматические мутации в генах [47]. Несомненно, углубленное исследование роли микроРНК в онкогенезе головного мозга человека и спектра ключевых молекул - потенциальных маркеров злокачественных опухолей, может дать богатый материал для разработки новых методов диагностики, прогноза и, возможно, средств терапии.

Отмеченная проблема привлекает многих исследователей, о чем свидетельствует рост числа публикаций, посвященных сравнительному анализу экспрессии микроРНК в тканях глиом головного мозга. Выявлен ряд микроРНК, рекомендуемых и в качестве диагностических маркеров глиом головного мозга, и для определения степени их злокачественности. Тем не менее, общее число опубликованных работ, содержащих сравнительный анализ экспрессии микроРНК в ткани головного мозга и в ткани глиомы, пока невелико и не раскрывает в полной мере их роль в патогенезе данного вида опухолей. В частности, окончательно не определен спектр микроРНК, которые могли бы выступать в роли маркеров типа опухоли и степени ее злокачественности, в то время как выбор адекватной терапии опухоли в первую очередь может зависеть именно от этих параметров [15].

Цель исследования

На основании интегративной оценки клинических, гистологических и молекулярно-генетических показателей у больных супратенториальными глиомами оценить диагностические и прогностические возможности использования микроРНК в качестве биомаркеров степени злокачественности опухоли и предикторов выживания.

Задачи исследования

1. Разработать малотравматичную методику забора опухолевой и морфологически неизменной мозговой ткани у больных с глиомами головного мозга во время их резекции.

2. Для супратенториальных глиом различной степени злокачественности и морфологически неизменной ткани головного мозга определить на основании полимеразной цепной реакция (ПЦР) в реальном времени профиль экспрессии 10-и микроРНК: -124, -125b, -16, -181b, -191, -21, -221, -223, -31, -451 в образцах ткани и выполнить сравнительный анализ их уровней экспрессии.
3. Определить диагностические характеристики по выявлению степени злокачественности глиом на основе измерения уровней экспрессии 10-и микроРНК: -124, -125b, -16, -181b, -191, -21, -221, -223, -31, -451.
4. Для глиом разной степени злокачественности выявить характерные специфические профили экспрессии микроРНК и разработать оригинальный «Способ дифференциальной диагностики глиом головного мозга человека».
5. Методом NanoString определить профиль 800 микроРНК в образцах ткани глиом головного мозга различной степени злокачественности и морфологически неизменной ткани мозга и среди них выявить микроРНК-маркеры статистически достоверно различающиеся уровнем экспрессии.
6. На основании клинических результатов комплексного лечения глиом головного мозга охарактеризовать прогностическую значимость изучаемых микроРНК как потенциальных предикторов выживания больных и выявить среди них микроРНК с наибольшей прогностической ценностью.

Научная новизна данного исследования заключается в том, что первые:

– Разработан оригинальный «Способ интраоперационного забора биоптата глиомы и морфологически неизменной ткани головного мозга для молекулярно-генетических исследований», на который получен патент Российской Федерации № 0002651749.

– Впервые на основе набора 10-и микроРНК определен уникальный профиль для глиом головного мозга различной степени злокачественности и ткани неизмененного мозга. В двух случаях онкогенных микроРНК: микроРНК-221 и микроРНК-21 и в трех случаях онкосупрессорных микроРНК: микроРНК-31, микроРНК-124 и микроРНК-223 наблюдались наиболее ярко выраженные различия между опухолевой и прилежащей морфологически неизменной тканями головного мозга человека. Для глиом разной степени злокачественности головного мозга с учетом степени их злокачественности были выявлены специфические профили экспрессии микроРНК. Доказано, что уровни экспрессии отдельных микроРНК (-31, -124, -21, -221 и -223) могут использоваться в качестве маркеров в оценке степени злокачественности новообразования, а использование данных экспрессии сразу нескольких микроРНК (-21, -221, -223, -125b, -191, -124) позволяет диагностировать глиомы разной степени злокачественности с большей диагностической точностью.

– Детекцией микроРНК с помощью технологии NanoString установлено, что в тканях глиом различной степени злокачественности (grade II и grade III, grade II и grade IV) имеется достоверное увеличение уровня экспрессии микроРНК-199b. Напротив, уровень экспрессии микроРНК-144 и микроРНК-182 являлся сниженным. Также выявлено достоверное 10-кратное повышение показателей экспрессии микроРНК-7 между опухолями grade II и grade IV.

– Для различия между II и III, II и IV степенями анаплазии глиом наиболее подходящими оказались четыре микроРНК: -144, -182, -199b и -7. Полученные достоверно дифференцируемые различия показателей экспрессии этих четырех микроРНК в данных типах глиом могут являться дополнительными маркерами, позволяющими отличить быстро растущие злокачественные глиомы (grade III и grade IV) от медленно растущих опухолей (grade II) и своевременно назначить адекватное лечение.

– Диагностическая панель, созданная на основе изучаемых микроРНК, позволила различать доброкачественные опухоли и злокачественные

новообразования и разработать новый «Способ дифференциальной диагностики глиом головного мозга человек», на который получен патент Российской Федерации № 2583871.

– Проведенный регрессионный анализ по методу Кокса выявил четыре микроРНК (-31, -21, -221 и -223), уровень экспрессии которых достоверно связан со сроками выживаемости пациентов. Впервые показано, что такие факторы, как повышенная экспрессия микроРНК-31, микроРНК-21, микроРНК-223 и микроРНК-221, отсутствие в комплексном лечении химио- и лучевой терапии и возраст старше 48 лет, достоверно коррелировали с резким снижением выживаемости пациентов, что позволяет использовать эти микроРНК в качестве прогностических маркеров выживания больных с супратенториальными глиомами головного мозга. На основании полученных результатов оформлена заявка на предполагаемое изобретение «Способ определения прогноза выживаемости больных с глиомами головного мозга Grade II – Grade IV», на которое получена приоритетная справка № 2019121528 от 10.07.2019 года.

Практическая значимость работы заключается в том, что:

– Наряду с клиническими гистологическими предикторами злокачественности супратенториальных глиом выявлены специфические профили экспрессии микроРНК, что позволяет быстро и точно установить тип опухоли и, соответственно, своевременно и адекватно назначить дальнейшее лечение. В нейрохирургической практике в ситуациях с неясной патоморфологической картиной опухоли наличие уровня экспрессии пяти отдельных микроРНК (-221, -21, -31, -124 и -223) и данных уровней экспрессии сразу нескольких микроРНК (-21, -221, -223, -125b, -191, -124) могут использоваться в качестве маркеров в оценке степени злокачественности новообразования.

– Кроме этого, для дифференцировки между II и III, II и IV степенями анаплазии глиом можно использовать еще четыре микроРНК: -144, -182, -199b

и -7. Они могут являться дополнительными маркерами, позволяющими отличить быстро растущие злокачественные глиомы от медленно растущих опухолей.

– Вышеперечисленные микроРНК-маркеры оптимизируют и упрощают диагностику глиом головного мозга, а так же дополняют молекулярно-генетическую классификацию глиальных опухолей.

– Повышенная экспрессия четырех микроРНК (-31, -21, -223 и -221) в тканях глиом головного мозга позволяет прогнозировать течение опухолевого процесса у больных с супратенториальными глиомами головного мозга и свидетельствует о его неблагоприятном прогнозе. Данные о показателях экспрессии этих четырех микроРНК позволяют выявлять пациентов, относящихся к группе высокого риска, и назначить им курс более эффективной адъювантной терапии в дополнение к стандартному протоколу лечения.

Положения, выносимые на защиту:

1. Разработанный оригинальный способ забора опухолевой и морфологически неизменной мозговой ткани у больных с глиомами головного мозга во время их резекции позволяет изучать молекулярно-генетический профиль микроРНК у исследуемых видов опухолей.
2. Для исследуемых глиом разной степени злокачественности головного мозга человека выявлены специфические характерные профили экспрессии микроРНК, зависящие от степени злокачественности. Доказано, что уровни экспрессии отдельных микроРНК (-31, -124, -21, -221 и -223) могут использоваться в качестве маркеров в оценке степени злокачественности новообразования, а использование данных экспрессии сразу нескольких микроРНК (-21, -221, -223, -125b, -191, -124) позволяет диагностировать глиомы разной степени злокачественности с большей диагностической точностью.
3. Полученные достоверные различия показателей экспрессии четырех микроРНК (-144, -182, -199b и -7) в исследуемых типах глиом могут

являться дополнительными маркерами, позволяющими отличить быстро растущие злокачественные глиомы (grade III, IV) от медленно растущих опухолей (grade II) и своевременно назначить адекватное лечение.

4. С помощью анализа полученных клинических результатов комплексного лечения глиом головного мозга и профилей экспрессии их микроРНК показана прогностическая значимость четырех микроРНК (-31, -21, -221 и -223) как потенциальных предикторов выживания больных.

Апробация работы

Материалы диссертационной работы были представлены на: 1. Всероссийская конференция нейрохирургов «Поленовские чтения», 2015, 2017, 2018 и 2019 г., (Санкт-Петербург); 2. VII Всероссийский съезд нейрохирургов 2015 г., Казань; VIII Всероссийский съезд нейрохирургов 2018 г., Санкт-Петербург; 3. Всероссийская конференции «Цивьяновские чтения, 2015 г. и 2016 г.»; 4. Международная конференция «Физика рака: трансдисциплинарные проблемы и клинические применения», Томск, 2016 г. и 2017 г.; 5. Европейский съезд нейрохирургов, Италия, Венеция, 2017 г.; 6. 10 Азиатский конгресс нейрохирургов, Казахстан, Астана, 2014 г.

Публикации и сведения о внедрении в практику

По теме диссертации опубликовано 17 научных работ, из них 4 статьи в журналах, рекомендованных ВАК, 3 статьи в журнале, включённом в международные библиографические и реферативные базы данных SCOPUS.

Основные материалы работы были опубликованы в следующих отечественных журналах:

1. Ступак, Е.В. Значение профиля миРНК в диагностике злокачественных глиом головного мозга / Е.В. Ступак, Ю.А. Веряскина, С.Е. Титов, Л.Г. Ахмерова, В.В. Ступак, С.В. Мишинов, Н.А. Копорушко, Ю.В. Петрова, В.В. Пустаханов, М.К. Иванов, И.Ф. Жумулёв, Н.Н. Колесников // Российский нейрохирургический журнал им. профессора А.Л. Поленова. – 2016. – Т. 8, № 2. – С. 48–52.

2. Stupak, EV. MicroRNA profiling in the malignant progression of gliomas / EV Stupak, YuA Veryaskina, SE Titov, LG Achmerova, VV Stupak, MK Ivanov, IF Zhimulev, NN Kolesnikov // AIP Conference Proceedings. – 2016. – Vol. 1760. – 020065.
3. Stupak, EV. Studying the MicroRNA role as a survival predictor and revealing its part in malignancy level determination in patients with supratentorial gliomas of brain / EV Stupak, YuA Veryaskina, SE Titov, LG Achmerova, VV Stupak, DA Dolzhenko, SS Rabinovich, IF Zhimulev, NN Kolesnikov // AIP Conference Proceedings. – 2017. – Vol. 1882. – 020073.
4. Ступак, Е.В. МикроРНК в онкогенезе и диагностике глиом головного мозга / Е.В. Ступак, С.Е. Титов, Ю.А. Веряскина, Л.Г., Ахмерова, В.В. Ступак, С.С. Рабинович, Д.А. Долженко, И.Ф. Жимулёв // Современные проблемы науки и образования. – 2018. – № 6. – URL: <http://www.science-education.ru/article/view?id=28259>.
5. Ступак, Е.В. Поиск новых микроРНК-маркеров для дифференциальной диагностики глиом головного мозга различной степени злокачественности / Е.В. Ступак, С.Е. Титов, Ю.А. Веряскина, Л.Г. Ахмерова, В.В. Ступак, С.С. Рабинович, Д.А. Долженко, И.Ф. Жимулёв // Сибирский научный медицинский журнал. – 2018. – Т. 38, № 6. – С. 85–93.
6. Ступак, Е.В. Значимость микроРНК в прогнозе выживаемости больных с супратенториальными глиомами головного мозга / Е.В. Ступак, С.Е. Титов, Ю.А. Веряскина, Л.Г., Ахмерова, И.Ф. Жимулёв, В.В. Ступак, С.С. Рабинович, А.Е. Симонович, Д.А. Долженко // Патология кровообращения и кардиохирургия. – 2019. – Т. 23, № 1. – С. 61–70.

Патенты Российской Федерации

1. Пат. 2583871 Российская Федерация, МПК С12Q 1/68. Способ дифференциальной диагностики глиом головного мозга человека / Колесников Н.Н., Титов С.Е., Ахмерова Л.Г., Веряскина Ю.А., Иванов М.К., Ступак В.В., Ступак Е.В., Мишинов С.В., Жимулев И.Ф.; заявитель и патентообладатель

ИМКБ СО РАН, ФГБУ "ННИИТО им. Я.Л. Цивьяна" Минздрава России, ЗАО "Вектор-Бест"– 2015108718/10,; заявл. 12.03.2015; опубл. 10.05.2016, Бюл. № 13. – 13 с.

2. Пат. 2651749 Российская Федерация, МПК G01N 33/574, G01N 1/28, A61B 1/05. Способ интраоперационного забора биоптата глиомы и морфологически неизменной ткани головного мозга для молекулярно-генетических исследований/ Ступак Е.В., Рабинович С.С., Ступак В.В., Колесников Н.Н., Титов С.Е., Ахмерова Л.Г., Веряскина Ю.А., Жимулев И.Ф.; заявитель и патентообладатель ФГБУ "ННИИТО им. Я.Л. Цивьяна" Минздрава России, ИМКБ СО РАН, ФГБУ АО "Вектор-Бест"– 2017115002,; заявл. 27.04.2017; опубл. 23.04.2018, Бюл. № 12. – 4 с. 3.

3. Заявка 2019121528 Российская Федерация, Способ определения прогноза выживаемости больных с глиомами головного мозга Grade 2 – Grade 4/ Ступак Е.В., Рабинович С.С., Ступак В.В., Титов С.Е., Ахмерова Л.Г., Веряскина Ю.А., Жимулев И.Ф.; заявитель ФГБУ "ННИИТО им. Я.Л. Цивьяна" Минздрава России, ИМКБ СО РАН, ФГБУ АО "Вектор-Бест"; – № 2019121528/10; заявл. 10.07.2019; 28 с.

Внедрение результатов исследования

Результаты диссертационной работы внедрены в научно-исследовательскую, клиническую и педагогическую практику Федерального государственного бюджетного учреждения «Новосибирский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Объем и структура работы

Диссертационная работа изложена на 181 страницах, содержит 28 таблицы, 48 рисунков, состоит из введения, четырех глав, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и списка литературы, содержащего 232 источников, включая 31 отечественных и 201 зарубежный источник.

Личный вклад автора в работу

Автором изучены отечественные и зарубежные статьи и монографии по исследуемой проблеме, опубликованные за последние 20 лет. Разработана оригинальная малотравматичная методика забора под нейронавигационным контролем интраоперационного материала глиом головного мозга и прилегающей визуально неизменной мозговой ткани, оформлена заявка на изобретение, на которую получен патент № 0002651749 Российской Федерации «Способ интраоперационного забора биоптата глиомы и морфологически неизменной ткани головного мозга для молекулярно-генетических исследований».

Автор принимал участие в качестве ассистента в операциях у 80 % больных, отобранных в данное исследование, самостоятельно забирал биоптаты опухолевой ткани и морфологически неизменного мозга у 51 пациента. Курировал прооперированных больных от начала госпитализации до выписки из стационара. Сформировал базу данных оперируемых пациентов, содержащую клинические, гистологические, молекулярно-генетические показатели и отдаленные результаты лечения. Самостоятельно освоил методику ПЦР и определял уровни экспрессии исследуемых микроРНК. Принимал участие в анализе полученных результатов, проводил статистическую обработку показателей экспрессии изучаемых микроРНК и участвовал в оформлении заявок на изобретения по тема научной работы. Лично контролировал назначенную адъювантную терапию оперированных больных, изучал полученные результаты лечения.

Самостоятельно провел статистическую обработку результатов комплексного лечения данной группы больных с целью выявления наиболее информативных микроРНК в качестве предикторов выживания.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Эпидемиология глиом и современные подходы к их лечению

Частота встречаемости первичных опухолей головного мозга у взрослого населения по разным данным достигает 7,42 - 13,9 случаев на 100000 человек в год – это 0,7 - 1,5 % от общего числа онкологических заболеваний. Заболевания диагностируются приблизительно в равных количествах у мужчин и женщин: соотношение числа случаев составляет, соответственно, 1,1:1,0 [3, 4, 5, 16, 18, 20, 21, 24, 25, 29, 45, 64, 94, 103, 127, 142, 143, 193].

Статистические исследования (США) выявили тенденцию к ежегодному увеличению заболеваемости опухолями головного мозга: в 2000 году было зарегистрировано 13,8 случаев заболевания на 100000 населения, а по результатам исследований, проведенных спустя 8 лет Американским Онкологическим Обществом, этот показатель возрос до 16,5, причем лидирующая позиция принадлежит глиальным опухолям, доля которых составляет 50 - 55 % от всех опухолей головного мозга, а регистрируемая ежегодно частота встречаемости злокачественных глиом равна приблизительно 6,4 случаям на 100000 населения [142]. Таким образом, до 60 % глиальных опухолей диагностируются как злокачественные.

Отмечено, что ежегодный рост числа заболеваний опухолями ЦНС ранее объяснялся увеличением распространенности скрининговых исследований. Позднее, когда в развитых странах мира сформировался равномерный охват населения диагностической базой, было признано, что тенденция к росту числа онкологических заболеваний ЦНС (в том числе, и глиальных опухолей) носит объективный характер [3, 4, 5, 12, 18, 20, 22, 24, 29, 57, 66, 92, 204].

Глиомы (авторство термина принадлежит русскому хирургу Р. Вирхову, предложившему его более полутора веков назад) являются первичными опухолями головного мозга, развивающимися из глиальных клеток. Попытки

классификации глиальных опухолей, описанные в ряде статей и монографий, предпринимались с середины XX века [16]. В настоящее время под глиомами подразумевают нейроэпителиальные опухоли, исходящие из астроцитарного или олигодендроглиального ростка, а их морфологический диагноз устанавливают в соответствии с классификацией ВОЗ [124].

Классификация опухолей центральной нервной системы, в которой впервые указывались степени их злокачественности (grade), используемая в настоящее время и являющаяся основной для формулирования морфологического диагноза, была опубликована ВОЗ в 1979 году. В соответствии с ней степени злокачественности опухолей устанавливались по наличию следующих признаков:

grade I – опухоли зачастую дискретной природы, имеющие низкий пролиферативный потенциал и излечиваемые исключительно хирургическим путем;

grade II – опухоли, характеризующиеся инфильтративным ростом и склонностью к рецидивированию, несмотря на низкую митотическую активность. Некоторые их типы проявляют тенденцию к прогрессирующему снижению степени дифференцировки и трансформации в злокачественные формы;

grade III – опухоли с отчетливыми проявлениями инфильтративного роста и признаков анаплазии, таких как ядерная атипия и высокая митотическая активность;

grade IV – быстро прогрессирующие опухоли, имеющие высокий уровень митотической активности и склонные к образованию очаговых некрозов.

Классификации ВОЗ также подразделяет глиальные опухоли по уровню агрессивности их роста на медленно растущие (Low grade I - II) или глиомы с низкой степенью злокачественности и быстро растущие (High grade III - IV) или глиомы с высокой степенью злокачественности (WHO Classifications of Tumors of the Central Nervous System, 2007). Различают два варианта их роста [3, 4, 23]:

- узловой – с преобладанием экспансивного роста, при этом сама опухоль имеет четкую границу с мозговой тканью, а опухолевые клетки в перифокальной зоне либо отсутствуют полностью, либо обнаруживаются в незначительном количестве в непосредственной близости от опухоли;

- диффузный - с преобладанием инфильтративного роста и отсутствием четкой границы между опухолью и нормальной мозговой паренхимой, инфильтрированной опухолью на значительном протяжении.

Второй вариант типичен для злокачественных, быстрорастущих глиом (анапластических астроцитом и главным образом, глиобластом). Тенденция к инфильтративному росту проявляется заметно ярче при продолженном росте опухоли. С улучшением контроля над локальным продолженным ростом опухоли очаги её отдаленного продолженного роста, равно как и мультифокальные очаги обнаруживаются чаще [3, 4, 19, 20, 23].

Альтернативная классификация опухолей ЦНС, являющаяся частью общей онкологической классификации – ICD-O (International Classification of Diseases for Oncology), представлена в Международной классификации болезней (МКБ 10). В соответствии с ней все опухоли делятся на 5 групп, три из которых определены для глиальных: доброкачественные отнесены к группе 0; пограничные, неопределенные как доброкачественные или злокачественные, образуют группу 1; злокачественные опухоли составляют группу 3. В группу доброкачественных включены три типа смешанных нейронально-глиальных опухолей, которые в данном исследовании не представлены.

90 % глиом у взрослых пациентов локализуется в больших полушариях головного мозга. Риск возникновения глиальных опухолей увеличивается с возрастом примерно на 1,2 % для каждого прожитого года и достигает максимума у возрастной группы старше 70 лет [3, 4, 5, 16, 18, 20, 21, 23, 24, 25, 29, 45, 64, 94, 103, 127, 142, 143, 193].

Обобщенные результаты исследований, выполненных в клиниках Северной Америки и Европы, свидетельствуют, что после комбинированного

лечения глиом низкой степени злокачественности (Low grade) среднее значение медианы выживаемости больных составляет 80 месяцев, а 5-и и 10-и летняя выживаемость регистрируется соответственно в 54 % и 31 % случаев. Медиана безрецидивного периода достигает 56 месяцев, соответственно, признаков рецидива в течение 5-и лет не проявляется у 45 % и в течение 10-и лет у 24 % пролеченных пациентов. У дедифференцированных глиом (High grade) показатели различны для разных их типов. Например, у больных с анапластической астроцитомой (grade III) медиана выживаемости колеблется от 24 до 36 месяцев, коррелируя с объёмом полученного комбинированного лечения и с наличием повторных операций, выживаемость в течение 1 года составляет 85,5 %, 2-х лет - 70,9 %, 3-х лет - 27,3 %, а у 46 % больных рецидив не проявляется в течение года после операции. При заболеваниях глиобластомой (grade IV) медиана продолжительности жизни с момента установления диагноза находится в пределах 10 - 14 месяцев, а 5-и летняя выживаемость не превышает 4 % [3, 4, 5, 20, 142, 182, 192, 193].

Основная цель хирургического лечения онкологических патологий ЦНС - полное удаление опухолевых клеток – далеко не всегда реализуется при работе с глиальными опухолями, даже с применением современных методик и высоких технологий. Большинство глиом оказываются локализованными в функционально важных зонах мозга и попытки тотального их удаления сопровождаются серьёзным риском появления тяжелой послеоперационной инвалидизации пациентов. Высокая способность глиом к инфильтративному росту затрудняет различие опухолевой и интактной тканей мозга. Даже после полного удаления опухолевого узла в паратуморозной зоне зачастую остаются опухолевые клетки, последующий рост которых приводит к рецидиву. Для повышения шансов полного выздоровления больному в дополнение к хирургическому назначают курсы химио- и лучевого лечения наравне с другими методами адъювантной терапии [6]. При планировании подобного

рода комплексного лечения серьёзная роль отводится прогнозу течения заболевания.

Для формирования прогноза используются различные критерии, всё многообразие которых можно разделить на две группы. В первую объединены клинические критерии: размер и локализация опухоли, степень радикальности её удаления, возраст пациента, индекс качества жизни по шкале Карновского. В основу второй положены лабораторные критерии - результаты гистологического, иммуногистохимического, молекулярно-генетического и иммунологического исследований [6, 7, 14, 17, 16, 20, 29, 88, 94, 106, 112, 139, 149, 161, 165, 200].

В настоящее время критерии первой группы – конкретно, возраст и индекс качества жизни пациента, - являются самыми распространёнными прогностическими маркерами у больных глиомами [36], наравне со статусом метилирования промотора гена MGMT, поскольку последний позволяет с высокой вероятностью предсказать реакцию больных глиобластомами на прием темозоломида [181].

Выбор оптимальной комплексной терапии глиом в первую очередь определяется правильной оценкой степени их злокачественности, выполняемой по результатам гистологического исследования опухолевых препаратов, получаемых после удаления опухоли либо путём стереотаксической пункционной биопсии. Степень злокачественности оценивается по наличию ядерного атипизма, числу патологических митозов, по пролиферативной активности эндотелия в сосудах и присутствию некрозов в строме опухоли. В ряде случаев для уточнения диагноза дополнительно определяют молекулярный тип опухоли, для чего проводят иммуногистохимическое исследование новообразования: измеряют активность теломеразы и выполняют анализ уровней экспрессии GFAP, VEGF, IGF1 и рецепторов к ним, Ki-67 и других маркеров злокачественных опухолей ЦНС [11, 81].

Длительное время данный метод являлся основным инструментом постановки долгосрочного прогноза для большинства опухолей. Однако его применение в случаях глиальных опухолей при определении степени их злокачественности и верификации патоморфологического диагноза приводило к диагностическим ошибкам, доля которых в ведущих клиниках мира достигала 20 - 25 % [133].

Прогресс в области молекулярной нейроонкологии повысил статус молекулярно-генетического профиля опухолей – в настоящее время этот метод занимает одно из важных мест в их классификации, причём, в первую очередь, глиальных опухолей, - поскольку он обеспечивает более надёжный прогноз по сравнению с прогнозом, полученным на основе анализа гистологических характеристик опухоли [88, 98, 123, 139, 143, 149, 161, 162]. Об успешном применении этого метода в клинической практике свидетельствует опубликованная ВОЗ в 2016 году дополненная гистологическая классификация опухолей ЦНС [125], включая в себя не только гистологическую характеристику опухоли, но и её молекулярно-генетический профиль, причём новые дополнения касаются глиом головного мозга человека. Нет никаких сомнений в том, что классификация будет пополняться и совершенствоваться по мере накопления новых данных о генетическом профиле новообразований, имеющих свою прогностическую и диагностическую значимость. Одним из таких перспективных направлений её совершенствования и, соответственно, оптимизации комплексного лечения больных со злокачественными супратенториальными глиомами головного мозга является исследование роли микроРНК в онкогенезе головного мозга.

1.2 МикроРНК в онкогенезе и диагностике глиом головного мозга

МикроРНК - это короткие (20 - 22 нуклеотида) некодирующие РНК, контролирующие экспрессию генов, кодирующих белки [110]. Накопленные и систематизированные результаты многочисленных исследований

свидетельствуют, что микроРНК могут выступать как в роли супрессоров, так и способствовать росту опухоли, регулируя процессы роста и пролиферации клеток, инвазии опухоли и метастазирования. Отмечено, что микроРНК участвуют в регулировании таких процессов как апоптоз, ангиогенез и иммунный ответ [33, 117, 164, 167]. Множество участков, кодирующих микроРНК в геноме человека, расположены в местах распространения спонтанных генетических нарушений, провоцирующих развитие онкологических заболеваний [46]. Сбой в работе регуляторной функции некоторых микроРНК, особенно контролирующих экспрессию проонкогенов или генов-супрессоров опухолей, приводит к различным патологическим процессам. Например, развитие глиобластом сопровождалось изменением экспрессии или полным выключением синтеза многих микроРНК [189].

В настоящее время опубликован ряд работ, посвящённых исследованию роли отдельных микроРНК в глиомах головного мозга, где описана их диагностическая значимость как для диагностики глиом, так и для определения степени их злокачественности. В большинстве публикаций для определения уровня экспрессии микроРНК использовались методы, включающие ПЦР в реальном времени, цифровую капельную ПЦР, микрочипы и секвенирование.

К сожалению, во всех этих публикациях отсутствует четкая систематизация результатов исследований с описанием соответствия профилей микроРНК различным гистотипам глиом и степеням их злокачественности. В данной главе сделана попытка системного анализа имеющихся данных об экспрессии наиболее исследованных микроРНК.

Опубликованные данные, касающиеся глиом низкой степени анаплазии (grade I и grade II), свидетельствуют о снижении уровня экспрессии онкосупрессорных микроРНК-7, -137, -153, -181 и -128 и повышении его у микроРНК-9 в опухолях по сравнению с паратуморозной тканью [27, 59, 84, 101, 102, 115, 135, 134, 148, 173, 183, 195]. Для онкогенных, способствующих росту опухоли, микроРНК-21 и -221/222 выявлена корреляция между уровнем

их экспрессии в глиомах и степенью злокачественности глиом [27, 135, 183, 195], не позволяющая, однако, достоверно дифференцировать глиомы grade I и II по уровням экспрессии микроРНК [183].

Ткани глиом высокой степени злокачественности (grade III и grade IV) характеризуются пониженным уровнем экспрессии онкосупрессорных микроРНК-7, -31, -137, -153, -181, -128, -124 по сравнению с условно нормальными прилежащими тканями мозга [27, 59, 135, 148, 156, 170, 173, 174, 183, 195, 206, 225, 227, 232]. Онкогенные микроРНК-21, -23а, -221/222, напротив, характеризуются повышенным уровнем экспрессии в глиомах по сравнению с условно нормальными прилежащими тканями мозга [27, 89, 220, 221, 222, 224, 229, 230, 231]. Для глиобластом зафиксирован более высокий уровень экспрессии по сравнению с глиомами grade III. Подобное, но недостоверное различие отмечено для микроРНК-9 в глиомах grade III и grade IV [183].

По уровням экспрессии некоторых микроРНК глиомы разной степени злокачественности отличаются не только от паратуморозной ткани, но и различаются между собой. Например, в ряде случаев олигодендроглиому удаётся отличить от глиобластомы по уровням экспрессии микроРНК-218, -21, -132, -134, -155, и -409-5р: в мультиформных глиобластомах они выше, чем в олигодендроглиомах в 3 раза, а для микроРНК-128 даже в 4 раза [107].

Перейдём к более подробному и систематизированному описанию роли рассмотренных выше микроРНК в онкогенезе глиом головного мозга.

Visani M. et al. зарегистрировали снижение уровня экспрессии онкосупрессорной **микроРНК-7** в тканях глиом в сравнении с паратуморозной тканью [195]. Эта микроРНК участвует в регуляции PI3K/Akt- и Ras/Raf/MEK/ERK-зависимых сигнальных путей, осуществляя контроль процессов, ответственных за инвазию, пролиферацию, миграцию и апоптоз, - т.е. за рост и малигнизацию опухолей [120, 206].

Доказано, что в сравнении с граничащими с опухолью неизменными тканями мозга имеет место достоверное повышение уровня экспрессии онкосупрессивной **микроРНК-9**, наблюдаемое в тканях опухолей grade I - III, исключая глиобластомы, для которых подобных различий выявить не удалось [136]. При повышенном уровне экспрессии данной микроРНК в тканях глиомы наблюдается преобладание миграции клеток над процессами пролиферации вследствие снижения экспрессии CREB и NF1, в то время как при сниженном уровне экспрессии имеет место обратная картина [183]. Gomez G. et al. показали, что ген FOXP1 также служит мишенью для рассматриваемой микроРНК: повышенный уровень экспрессии данного гена в культурах клеток U251 и U373 стимулировал рост клеток глиом [84]. Так же отмечено, что увеличение уровня экспрессии микроРНК-9 повышает резистентность к темозоломиду вследствие активации экспрессии компонентов комплекса SHH множественной устойчивости к лекарствам [134].

Несмотря на тот факт, что уровень экспрессии **микроРНК-21** в физиологически нормальных клетках человека является одним из наиболее высоких, исследования показали, что в тканях глиом он намного выше [51, 59, 113, 163, 230, 231]. Многочисленные измерения уровня экспрессии данной микроРНК в тканях глиом выявили примерно 5-и, 15-и кратное его превышение над нормальным значением [59, 195]. Показано, что онкогенный эффект вызывается подавлением экспрессии генов-супрессоров опухолей RECK, TIMP3, TGFBR2/3, HNRPK, TAr63, JMY, TOPORS, TP53BP2, DAXX, PDCD4 [102, 140, 177]. Также было показано, что с повышением уровня экспрессии рассматриваемой микроРНК снижается апоптоз, а пролиферация и инвазия, наоборот, усиливаются. Кроме того, по данным атласа ракового генома (TCGA), низкий уровень её экспрессии слабо ассоциирован с повышенной выживаемостью. Ингибирование микроРНК-21 зачастую позволяет снизить экспрессию EGFR, а также остановить клеточный цикл в фазе G1/S, вследствие чего рост опухоли замедляется [229].

Исследователями онкогенной **микроРНК-23а** был выявлен повышенный уровень её экспрессии в тканях глиобластом и анапластических астроцитом [119, 159]. Такое повышение активирует инвазию клеток глиом за счёт ингибирования экспрессии транскрипционного фактора NOXD10, регулирующего, в свою очередь, экспрессию MMP-14 [89]. В своих исследованиях Tan X. et al. показали, что экспрессию рассматриваемой микроРНК активирует транскрипционный фактор CREB, вследствие чего подавляется экспрессия гена PTEN и создаются условия, благоприятствующие развитию и росту глиом [183]. В работе Rao et al. показано, что ингибирование экспрессии микроРНК-21 и микроРНК-23а в клеточной линии глиомы U138 приводило к уменьшению способности опухоли к формированию колоний [159].

МикроРНК-137 является онкосупрессорной, уровень её экспрессии снижен не только в олигодендроглиальных опухолях grade II - III, но также и в тканях глиом grade III – IV [43, 116, 174]. Аналогичные результаты были получены Visani M. et al., но достоверная разница фиксировалась только между глиомами I и IV степеней злокачественности [195]. В исследовании Li et al. показано, что монотонное снижение уровня экспрессии микроРНК вызывает активацию процессов пролиферации и инвазии по мере нарастания злокачественности глиом (данный фактор наиболее ярко проявлялся в глиобластомах) [116].

В работе Xu J. et al. было установлено, что уровень экспрессии **микроРНК-153-3p** достоверно снижен во всех группах с глиальными опухолями по сравнению с контрольной группой [210]. Мишенями данной микроРНК служат антиапоптозные белки Bcl-2 и Mcl-1. Отличительной особенностью глиом всех степеней злокачественности является присущая им активация антиапоптозных механизмов и сигнальных путей, приводящая к усилению выживаемости клеток. Данная микроРНК также подавляет экспрессию IRS-2-активатора PI3K/АКТ-зависимого сигнального пути, равным

образом отвечающего за выживаемость клеток глиом. Указанные факторы позволяют утверждать, что микроРНК-153-3р в онкогенезе глиом играет противоопухолевую роль [209].

Онкосупрессивные **микроРНК-181a** и **микроРНК-181b**, мишенью которых служит ген BCL2 [170], являются онкосупрессорными, а дерегуляция их экспрессии вносит заметный вклад в проявление злокачественности глиом [49]. Shi L. et al. [170] отметили отрицательную корреляцию уровня их экспрессии со степенью злокачественности глиом (наиболее низкие значения экспрессии достигаются в глиомах grade II – IV), а так же снижение уровня экспрессии в тканях мультиформных глиобластом [59, 108].

Мишенями кластера онкогенных **микроРНК-221/222** являются белки p27, p57, и гены PTEN, TIMP3, PUMA, Cx43, ответственные за регулирование клеточного цикла и процессов выживаемости клеток [50, 76, 86, 100]. В ряде публикаций [59, 80, 154] были отмечены повышенные уровни экспрессии обеих микроРНК в глиомах, способствующие миграции клеток путем понижения регуляции экспрессии РТР μ и увеличению чувствительности к темозоломиду. вызванному снижением уровня экспрессии MGMT [155].

МикроРНК-128, проявляя себя как онкосупрессор [53, 83, 148] и, будучи нейрон-специфической, участвует в дифференцировке нервной ткани злокачественных глиом, таких как глиобластома. Её мишенью выступает фактор транскрипции E2F3a, а снижение уровня экспрессии ингибирует как пролиферацию клеток опухоли, так и клеточный цикл [225]. В опубликованных исследованиях [83, 225]. Zhang Y. et al. показали, что уровень экспрессии данной микроРНК в глиомах ниже, чем в паратуморозной ткани [173].

МикроРНК-124 является онкосупрессивной и участвует в дифференцировании нейронов. Рядом исследований [58, 731, 137] было установлено, что уровень ее экспрессии снижен, по сравнению с паратуморозной тканью, не только в глиобластомах и олигодендроглиомах, но и в медуллобластомах, а также достоверно снижается в глиомах (grade III) и в

глиобластомах [174, 180]. Данная микроРНК регулирует клеточный цикл в фазе G0/G1, а также является ингибитором киназы CDK6, стимулирующей ангиогенез [102, 174], ведущий к образованию новых кровеносных сосудов и играющий ключевую роль в росте опухолей и их метастатическом потенциале [122]. Кроме того, её трансфекция в клеточные линии глиом снижает миграции клеток [77].

При исследовании уровня экспрессии **микроРНК-31** в тканях глиом высоких степеней злокачественности (grade III - IV) [180] зарегистрировано низкое его значение в опухолевой ткани по сравнению с условно нормальными прилежащими тканями мозга. Данная микроРНК ингибирует миграцию клеток глиомы в культуре и опосредованно регулирует активацию транскрипционного фактора NF- κ B, ангиогенез и уровень E-кадгерина, связанного с эпителиально-мезенхимальным переходом [138, 156]. Она также выступает в качестве онкосупрессора, и может служить коррелятором предрасположенности опухоли к инвазии и метастазированию [90].

Мишенью онкосупрессивной **микроРНК-125b** является онкоген ETS1 [211]. Повышенная её экспрессия снижает инвазию в клетках рака молочной железы, ингибирует их рост и уменьшает миграцию посредством подавления рецептора эпидермального фактора роста HER2 (ERBB2) [168]. Так же в исследовании Xia H. et al. сказано, что одной из мишеней микроРНК-125b является микроРНК проапоптозного фактора Bmf [208]. При низкой экспрессии данной микроРНК увеличивается уровень экспрессии белка Bmf, который, связываясь с Vcl-2 посредством ВНЗ-домена, блокирует его антиапоптозную активность [151]. В работе Wu M. et al. показали, что при воздействии рассматриваемой микроРНК, на E2F2 усиливаются процессы пролиферации в первичной культуре CD133 позитивных опухолевых стволовых клеток глиомы. Отмечено, что уровень экспрессии данной микроРНК в опухолевых стволовых клетках, в сравнении с нестволовыми клетками глиомы, снижен. Ингибирование пролиферации стволовых клеток

происходило при повышенном уровне экспрессии микроРНК-125 [207]. Smits M. et al. в своей работе зафиксировали сниженный уровень её экспрессии, стимулирующий процессы ангиогенеза [176]. Shi L. et al. сообщают о сниженном уровне экспрессии микроРНК-125b, которая ингибирует пролиферацию ОСК, останавливая клеточный цикл при переходе из фазы G1 в фазу S, и подавляет регуляторы клеточного цикла CDC25A и CDK6 [171].

Мишенью **микроРНК-16** в клеточных линиях глиом является NF-κB1 [212]. Этот сигнальный путь играет важную роль в росте, пролиферации, инвазии и метастазировании опухоли. Исследователи показали, что данная микроРНК ограничивает экспрессию Ki-67, замедляет рост глиомы и процессы инвазии её клеток путем подавления сигнального пути NF-κB/MMP 9 *in vitro* и *in vivo* [212]. Кроме того, в исследовании Chaudhry M.A. et al. сообщается о повышении уровня экспрессии рассматриваемой микроРНК и микроРНК-15a после однократного облучения клеток линии M059K (с нормальным функционированием DNA-РК) дозой в 3 Гр [48].

Так же мишенью **микроРНК-16** является микроРНК гена BCL2, которая отрицательно коррелирует с уровнем её экспрессии при хроническом лимфолейкозе [54]. Li et al. показали, что незначительное повышение экспрессии рассматриваемой микроРНК относительно контрольной группы было зарегистрировано только в глиобластомах. Низкий уровень её экспрессии по сравнению с нормальной мозговой тканью зарегистрирован в клеточных линиях глиомы U251 и U87 [118]. Полученные результаты согласуются с ролью микроРНК-16 в качестве онкосупрессора при хроническом лейкозе [54]. Ингибируя CCND1 и WNT3A, данная микроРНК уменьшает миграционную способность клеток глиомы [118]. Уровень экспрессии микроРНК-16 и NF-κB1 и MMP9 отрицательно коррелирует между друг другом, подчеркивая ее онкосупрессирующее воздействие на глиомы [212].

Jakub et al. говорит, что уровень **микроРНК-451** снижается вследствие депривации глюкозы, а избыточная её экспрессия повышает чувствительность

клеток к низкому уровню глюкозы, это необходимо для активации LKB1 и нижестоящих путей, включая AMPK. При достаточном уровне глюкозы данная микроРНК действует как онкоген, подавляя передачу сигналов LKB1/AMPK и является компонентом пути LKB1/AMPK, который может функционировать в глиоме, чтобы позволить клеткам пережить метаболический стресс и искать благоприятные условия для роста опухоли [82]. Так же автор в исследовании отмечает, что у пациентов с глиобластомой повышенный уровень экспрессии микроРНК-451 связан с более короткой выживаемостью. Принудительная экспрессия микроРНК-451 повышает чувствительность клеток GBM к традиционной радио- и/или химиотерапии. Напротив, низкие уровни глюкозы приводят к подавлению уровней микроРНК-451 [34, 82, 83]. В исследовании Gal et al. говорится, что уровни микроРНК-451 были снижены в клетках глиомы CD133⁺ [79]. CD133 является предполагаемым маркером стволовых клеток глиом [175]. Vandres et al. в своей работе описали снижение уровня микроРНК-451 в образцах желудочной и колоректальной опухоли по сравнению с нормальными тканями, а подавление её экспрессии коррелировало с плохим прогнозом при этом типе рака [38]. В исследовании Zhao et al. сообщает, что экспрессия микроРНК-451 в тканях глиом была ниже, чем в тканях головного мозга. В клеточных линиях глиомы было отмечено, что снижение экспрессии микроРНК-451 подавляло пролиферацию опухолевых клеток, но усиливало миграцию с сопутствующим низким уровнем активации пути SAv39/AMPK/mTOR и высоким уровнем активации пути Rac1/cofilin, соответственно [226].

1.3 Перспективы использования микроРНК в диагностике глиальных опухолей и нейроонкологической практике

Результаты разработки и клинического применения современных методов химиотерапии и радиохирургии глиом головного мозга, равно как и фундаментальных исследований, направленных на изучение их биологии,

довольно скромны: продолжительность жизни пациентов со злокачественными глиомами после прохождения курсов лечения по-прежнему остаются низкой.

Современные методы нейрорентгоскопии головного мозга (МСКТ- и МРТ-исследования) позволяют диагностировать глиомы в большей части случаев при их клиническом проявлении. Они являются основными при постановке диагноза данного заболевания. Связано это в первую очередь с тем, что выявление глиом на ранней доклинической стадии заболевания является крайне сложной задачей из-за отсутствия надежных и чувствительных методов их диагностики. Во-вторых, в клинике прогнозировать развитие данного заболевания, его течение и прогноз крайне затруднительно из-за гетерогенной разнородности глиом [201].

--Для более объективного анализа течения заболевания и его прогноза необходимы не только клинические, но также иммунологические и молекулярно-генетические данные новообразований. Свидетельство тому - новая гистологическая классификация ВОЗ опухолей центральной нервной системы, принятая в 2016 году, которая наряду с гистологическими характеристиками глиом обязывает проводить исследования наиболее их значимых молекулярно-генетических характеристик [125]. Рекомендуемые молекулярно-генетические характеристики глиом позволяют выделить подтипы данных новообразований, позволяющие проводить назначение адекватного адъювантного лечения и его коррекцию. Это направление в настоящее время является одним из векторов развития персонализированной медицины в лечении больных с глиомами головного мозга [194].

В связи с этим, новые литературные данные о роли микроРНК в онкогенезе глиом головного мозга свидетельствуют о том, что их показатели можно использовать на практике для диагностики данного вида опухолей и прогнозирования развития их у человека на ранних стадиях заболевания.

Установлено, что показатели ряда микроРНК коррелируют с клинической картиной развития и прогрессирования нейроэпителиальных опухолей мозга.

Так уровни экспрессии микроРНК-30е, -21 и -486 в тканях глиом отражают прогноз нейроонкологического процесса и продолжительности [85, 95, 178, 198].

МикроРНК сохраняет стабильность своих характеристик в периферической крови больного и поэтому может явиться надежным диагностическим или прогностическим биомаркером [35]. Опухоль-ассоциированные микроРНК, находящиеся в крови и спинномозговой жидкости, могут быть обнаружены раньше, чем в опухолевой строме головного мозга [144, 145, 146, 186, 187]. Для этого и быстрой оценки эффективности химиотерапии проводятся исследования разных микроРНК в сыворотке крови [41, 104, 188, 217]. Авторами установлена четкая корреляция между уровнем экспрессии микроРНК и степенью анаплазии глиом, характером течения заболевания в послеоперационном периоде или после курса химиотерапии. Выявлена высокая чувствительность и специфичность метода при дифференциальной диагностике глиом различной степени злокачественности [188, 218, 219, 223].

Эти данные являются основанием для предположения, что циркулирующие микроРНК, возможно, являются дополнительными предикторами в ранней диагностике развития глиом головного мозга. Наряду с этим они могут помочь в диагностике подтипов эпителиально-клеточных опухолей мозга, например в диагностике олигодендроглиом и глиобластом [107]. Но использование микроРНК как неинвазивных диагностических и прогностических маркеров диктует проведение дальнейших лабораторных исследований и клинической их оценки.

Множество микроРНК и изменение их экспрессии связаны с глиомами и их ростом. Отдельные микроРНК, такие как -21, -30е* и -486 отвечают за функцию сигнальных путей, которые являются ключевыми в патогенезе развития глиом головного мозга. Именно эти микроРНК, воздействующие на различные участки сигнальных путей, могут представлять собой потенциально

эффективные терапевтические мишени пациентов [185]. Ряд авторов отмечает стабильность микроРНК в периферической крови и это может играть важную роль в применении микроРНК в качестве диагностических маркеров определения типа опухоли, а также для определения прогноза заболевания [35, 95, 178, 198].

Для повышения эффективности адъювантных терапевтических методов может быть полезно - в качестве дополнения к традиционным лучевой и химиотерапии - воздействие, основанное на использовании микроРНК. Ведь отдельные микроРНК, такие как -21 и -181a, способствуют возникновению химиорезистентности опухолей, что делает их потенциальными терапевтическими мишенями [49, 160, 172, 196]. В перспективе адъювантные методы, основанные на сочетании методов воздействия на микроРНК, химио- и лучевой терапии, способны повысить эффективность комплексного лечения. Наряду с этим, повышению эффективности комплексного воздействия на глиомы поможет не только ингибирование микроРНК, стимулирующих развитие опухолевых стволовых клеток, но и активация экспрессии тех микроРНК, которые угнетают их развитие.

Следует отметить наличие препятствий, ограничивающих применение описанных выше подходов при использовании микроРНК в клинической диагностике и лечении глиом. Во-первых, значительная часть исследований была выполнена с привлечением небольших групп больных, причём опухоли различались по гистологической структуре. Во-вторых, интерпретация полученных данных зачастую бывает затруднена из-за гетерогенности глиом головного мозга, что, в свою очередь, осложняет и подбор микроРНК, подходящих для использования в качестве диагностических маркеров.

Имеющиеся методы количественного определения микроРНК должны обладать достаточной воспроизводимостью и чувствительностью. В связи с этим, важной задачей является стандартизация методов определения уровней экспрессии микроРНК не только в тканях опухоли, но и в крови, ликворе и

подбора оптимальных референсных генов на этапе доклинического проявления симптомов опухоли. Для получения достоверных данных требуется выполнить масштабные исследования с целью уточнения роли микроРНК в онкогенезе глиом и подтверждения эффективности их использования в качестве биомаркеров при диагностике нейроэпителиальных опухолей мозга. Не менее важно выявление пороговых значений экспрессий исследуемых микроРНК, пригодных для определения степеней злокачественности и типов глиом, избегая при этом как ложноположительных так и ложноотрицательных реакций.

В связи с выраженной агрессивностью течения заболевания головного мозга, пораженного злокачественной глиомой, и их труднодоступностью в мозге из-за наличия гемато-энцефалического барьера разработка терапии глиом на основе микроРНК представляет крайне трудную задачу. Для ее решения необходимо, в первую очередь, разработать эффективные способы доставки микроРНК- и анти-микроРНК-препаратов в саму опухоль, преодолевая гематоэнцефалический барьера и создать методики подавления неспецифических и побочных эффектов микроРНК или анти-микроРНК-терапии.

Так, Wu C. et al. разработали на основе бакуловируса генетический биологический комплекс, содержащий суицидальный ген и глиофибрилярный кислый белок, включающий нуклеотидные последовательности для связывания трех микроРНК, экспрессия которых значительно различается в клетках глиобластомы (низкий уровень) и в нормальных астроцитах мозга (высокий уровень). Этот биологический комплекс вводился мышам, которым ранее были пересажены клетки человеческой глиомы. В результате трансплантированные клетки глиомы погибли, а нормальные астроциты мышей не пострадали, оказались интактными. Эффект объяснен авторами супрессией вирусной тимидинкиназы всех трех микроРНК (-31, -127, -143) [205].

Недавно было успешно проведено первое клиническое испытание по системному введению малых интерферирующих РНК пациентам с солидными опухолями, используя направленный транспорт при помощи наночастиц. В состав системы входили следующие компоненты: линейный полимер циклодекстрина (CDP); трансферрин человека (НТФ), находящийся на внешней стороне наночастиц для взаимодействия с рецепторами hTfR, расположенными на поверхности опухолевых клеток; полиэтиленгликоль для увеличения стабильности наночастиц в биологических жидкостях и малые интерферирующие РНК, снижающие экспрессии M2 субъединиц рибонуклеотидредуктазы [62, 63].

Несомненно, что дальнейшее исследование роли микроРНК в онкогенезе и углубленное изучение молекулярно-генетических характеристик глиом имеют серьёзную перспективу для разработки методик доклинической неинвазивной визуализации глиом и уяснения молекулярных механизмов опухолевого роста, что позволит сформулировать прогноз течения онкозаболевания и обеспечить назначение своевременной и адекватной адъювантной терапии в его комплексном лечении [91, 100].

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Общая характеристика больных

Материалом для клинико-генетических исследований, положенных в основу настоящей работы, послужили образцы патологической и прилегающей здоровой ткани головного мозга. Отбор образцов выполнялся интраоперационно у 118 человек, прооперированных в период с 2014 по 2017 г. по поводу супратенториальных глиом. Хирургическое и послеоперационное лечение проводилось в отделении нейрохирургии Федерального государственного бюджетного учреждения «Новосибирский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

В серии, состоящей из 118 больных с супратенториальными глиомами, были представлены пациенты всех возрастных групп - от 6 до 83 лет, с приблизительно равным количеством мужчин - 62 чел. (52,5 %) и женщин – 56 чел. (47,4 %), 66 человек (55,9 %) были старше 48 лет, остальные 52 человека (44,1 %) не достигли этого возраста. Средний возраст пациентов составил $48,8 \pm 4$ лет. У 110 пациентов диагностировали опухоль впервые, а у 8 пациентов имел место продолженный рост опухолевого процесса.

Следуя Международной Классификации Болезней МКБ-10, все пациенты (класс: новообразования, блок: злокачественные новообразования глаза, головного мозга и других отделов ЦНС) были распределены по подгруппам в соответствии с локализацией опухоли:

- злокачественные новообразования (ЗНО) большого мозга, за исключением долей и желудочков (C71.0), в данном случае опухоли, исходящие из мозолистого тела;

- ЗНО лобной доли головного мозга (C71.1);

- ЗНО височной доли головного мозга (C71.2);

- ЗНО теменной доли головного мозга (С71.3);
- ЗНО затылочной доли головного мозга (С71.4);
- поражения головного мозга, выходящие за пределы вышеуказанных локализаций (С71.8), - в данную подгруппу мы включили опухоли, располагающиеся преимущественно в области подкорковых структур, таких как таламус, базальные ядра, внутренняя капсула.

Распределение всех 118 больных по подгруппам в соответствии с локализацией опухолей (таблица 1).

Таблица 1 – Общая характеристика больных с супратенториальными глиомами

Локализация глиальной опухоли	Количество, чел (%)	Средний возраст, лет	Мужчин, чел (%)	Женщин чел (%)
Лобная доля	18 (15 %)	42,5±4	12 (10 %)	6 (5,1 %)
Височная доля	18 (15 %)	51±4	16 (13,7 %)	2 (1,7 %)
Теменная доля	23 (19 %)	50±3,5	17 (14 %)	6 (5,1 %)
Затылочная доля	3 (3 %)	51,5±2,5	0	3 (2,5 %)
Несколько долей	43 (36 %)	53,8±5	14 (11,8 %)	29 (24,6 %)
Мозолистое тело	8 (7 %)	48,6±4,5	1 (0,8 %)	7 (5,9 %)
Подкорковые структуры	5 (4 %)	39,4±4,5	2 (1,7 %)	3 (2,5 %)
Всего	118 (100 %)	48±4	62 (53 %)	56 (47 %)

Примечание: в скобках указано процентное количество от общего числа случаев (n=118)

Дополнительно глиомы астроцитарного подтипа подразделялись на 4 группы (grade) в соответствии со степенью их злокачественности: 1) астроцитомы первой степени злокачественности (grade I) была диагностирована у одного пациента (n=1), 2) астроцитомы второй степени (grade II) - у 17-и больных (n=17), 3) астроцитомы третьей степени (grade III), - у 35-и человек (n=35) и 4) в 65-и случаях были выявлены глиобластомы четвертой степени злокачественности (grade IV, n=65).

Качество жизни пациентов до оперативного лечения и на момент выписки из стационара оценивали по модифицированной шкале Карновского (Karnofsky Performance Index) [141] (таблица 2).

Таблица 2 – Шкала Карновского оценки качества жизни

Баллы	Характеристика состояния
90	Нормальная активность, минимальная симптоматика; периодически головная боль, метеолабильность
80	Нормальная активность с усилием, некоторые симптомы; стойкий церебростенический синдром
70	Заботится о себе, не способен вести нормальную жизнь; рефлекторные парезы, негрубые расстройства ВНД, негрубая афазия, редкие Джексоновские эпилептические приступы по типу petit mal
60	Нуждается в периодической помощи; генерализованные эпилептические приступы, существенные расстройства ВНД, парезы в конечностях с сохраненной возможностью передвигаться без посторонней помощи
50	Нуждается в значительной помощи и уходе; грубая очаговая симптоматика, негрубые расстройства сознания. Субкомпенсация
40	Беспомощен, нуждается в специальной помощи и уходе; преобладание общемозговой симптоматики над очаговой, грубые расстройства сознания. Декомпенсация
30	Серьезно недееспособен, нуждается в госпитализации; декомпенсация неврологического статуса. Субкомпенсация витальных функций (нуждаются в зондовом кормлении, трахеостомии). Стабильная гемодинамика и самостоятельное дыхание
20	Очень болен, необходим активный поддерживающий уход; глубокая кома, нарушение витальных функций, их поддержание (ИВЛ)
10	Умирающие; полиорганная недостаточность. Терминальные состояния, отказ от активной реанимации

Средний уровень качества жизни пациентов перед операцией составлял $76,1 \pm 1,0$ баллов, а на момент выписки из стационара - $66,9 \pm 1,9$ баллов.

Степень радикальности удаления опухолей оценивалась по результатам контрольного томографического исследования с контрастом, проводившегося спустя сутки после операции. Больным, у которых предоперационная диагностика проводилась с помощью МСКТ, послеоперационное обследование - для обеспечения сравнимости результатов лечения с исходными, также выполнялось с применением компьютерной томографии с контрастом.

Результаты достигнутой радикальности резекции опухолей представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Радикальность удаления супратенториальных глиом

Характеристика радикальности удаления опухолей	Количество, чел. (%)	Средний возраст, лет	Мужчин, чел. (%)	Женщин, чел. (%)
Тотальное	74 (63 %)	45,7±3,3	38 (32 %)	36 (30 %)
Субтотальное	38 (32 %)	48,3±3,7	21 (17 %)	17 (14 %)
Пункционная биопсия под нейронавигационным контролем	6 (5 %)	50±5	3 (2 %)	3 (2 %)
Всего	118 (100 %)	48±4	62 (53 %)	56 (47 %)

Примечание: процентное количество, указанное в скобках, взято от общего числа случаев (n=118)

Гистологическая характеристика супратенториальных глиом выполнялась в соответствии с гистопатологической классификацией [124] (таблица 4).

Таблица 4 – Гистопатологическая классификация глиом (ВОЗ, 2007 г.)

Гистологические варианты глиом	Степень злокачественности (grade)
Астроцитарные опухоли:	
- субэпендимальная гигантоклеточная астроцитома	I
- пилоцитарная астроцитома	I
- пиломиксоидная астроцитома	II
- диффузная астроцитома	II
- плеоморфная ксантоастроцитома	II
- анапластическая астроцитома	III
- глиобластома	IV
- гагантоклеточная глиобластома	IV
- глиосаркома	IV
Олигодендроглиальные опухоли:	
- олигодендроглиома	II
- анапластическая олигодендроглиома	III
Олигоастроцитарные опухоли:	
- олигоастроцитома	II
- анапластическая олигоастроцитома	III

Морфологическая структура опухолей представлена в таблице 5.

Таблица 5 – Морфологическая структура удалённых опухолей

Морфология опухолей	Степень злокачественности (grade)	Количество больных, чел.
Пилоцитарная астроцитома	I	1
Олигодендроглиома	II	4
Анапластическая олигоастроцитома	III	3
Диффузная астроцитома	II	13
Анапластическая астроцитома	III	32
Глиобластома	IV	65
Всего		118

В большинстве случаев (100 наблюдений) имели место опухоли с высокой степенью злокачественности (HGG), а на долю опухолей низкой степени злокачественности (LGG) пришлось лишь 18 случаев. Соответственно, соотношение LGG:HGG составило 1:6.

Помимо хирургического лечения большинство больных проходило курсы лучевой и/или химиотерапии (таблица 6 и рисунок 1).

Таблица 6 – Распределение больных в зависимости от проведённого адьювантного лечения

Вид лечения	Количество больных, чел. (%)	Распределение больных по степеням злокачественности опухоли (grade), чел.			
		I	II	III	IV
Химио- и лучевая терапия	58 (49 %)	0	3	25	30
Только лучевая терапия	14 (12 %)	0	4	2	8
Только химиотерапия	7 (6 %)	0	2	2	3
Не получили адьювантного лечения	39 (33 %)	1	8	6	24
Итого, чел. (%)	118 (100 %)	1 (0,8 %)	17 (14,4 %)	35 (29,7 %)	65 (55,1 %)

Примечание: процентное количество, указанное в скобках, взято от общего числа случаев (n=118)

Адьювантную терапию в виде химио- и лучевого лечения в послеоперационном периоде удалось провести в полном объёме лишь для половины (58 человек или 49 %) общего числа пациентов. 7 (6 %) прооперированных получили только химиотерапию с использованием

темозоломида. Химиотерапевтическое лечение темодалом для этих 65-и человек (55 %) проводилось по стандартной схеме.

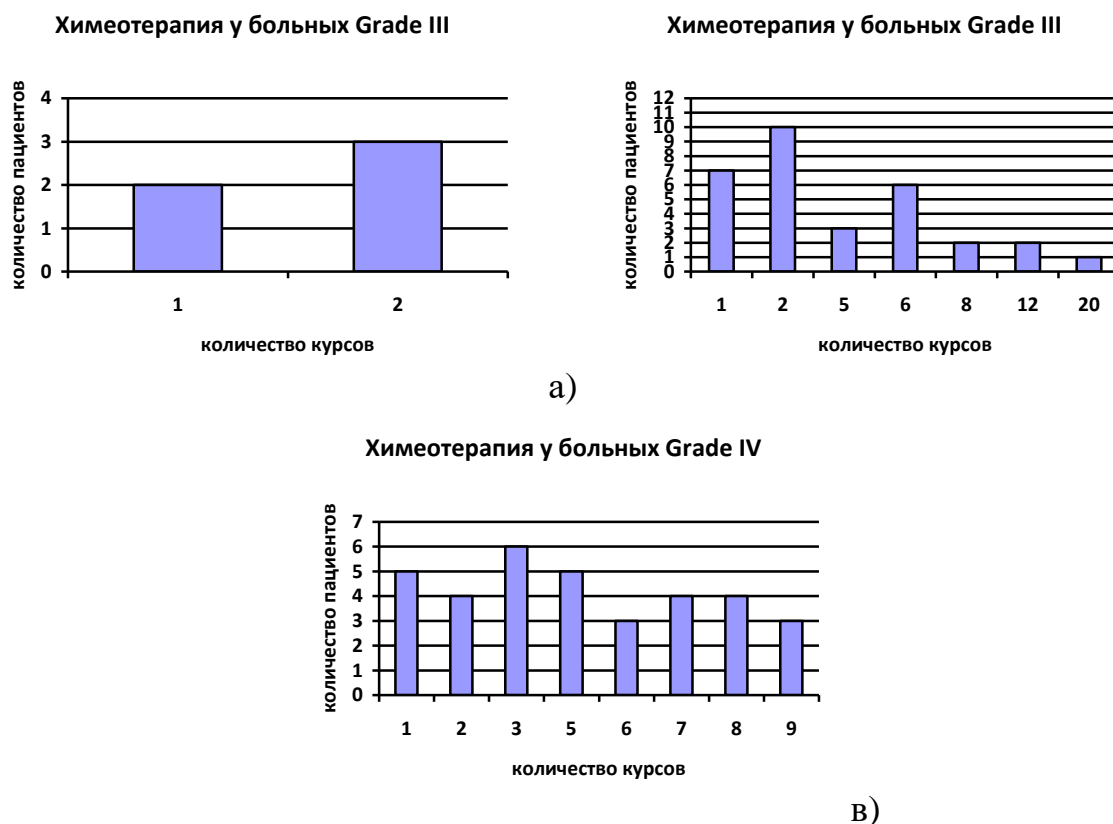


Рисунок 1 – Зависимость числа больных от количества курсов химиотерапии для различных степеней злокачественности опухолей: а – grade II; б – grade III; в – grade IV

На рисунке 1 показано распределение больных в зависимости от количества проведенных курсов химиотерапии и степени злокачественности опухолей. 14 пациентов (12 %) получили только лучевое лечение в дозе 56 - 60 Гр. Для оставшихся 39 (33 %) больных причиной отказа от проведения дополнительного лечения в послеоперационном периоде послужили следующие клинические особенности. 24 пациента с глиобластомой и 6 с астроцитомой 3 степени анаплазии находились в тяжелом, субкомпенсированном состоянии: медианное значение ИКЖ по шкале Карновского у них составило 58 баллов. 8 человек с астроцитомой второй

степени анаплазии и 1 больной с пилоцитарной астроцитомой (grade I) ограничились только хирургическим лечением.

Сроки наблюдения за пациентами (n=118) с момента постановки гистологического диагноза колебались от 1 до 84 месяцев, для умерших (n=85) они составляли от 1 до 83, для выживших (n=33) - от 15 до 84 месяцев.

2.2 Методика молекулярно-генетических исследований

Клинико-генетические исследования были выполнены у всех 118-и оперированных больных с супратенториальными глиомами разной степени злокачественности. Исследования проводились в полном соответствии с этическими стандартами, разработанными на основе Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2000 г., и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ от 1.04.2016 г. № 200н.

Исследование одобрено комитетом по биомедицинской этике ФГБУ «Новосибирский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна» Минздрава России.

Все больные были индивидуально проинформированы о целях исследований и перед их началом от каждого пациента было получено соответствующее добровольное согласие, все личные данные были деперсонализированы.

Биоптаты ткани опухолей головного мозга и прилежащих морфологически неизмененных тканей, расположенных на расстоянии более 2 см от новообразования, забирались в объеме 1 мм³ во время удаления опухоли под нейронавигационным контролем. При хранении и транспортировке отобранных образцов использовался раствор для стабилизации RNAlater, позволяющий выделять РНК из тканей и клеток, не прибегая к замораживанию в жидком азоте.

Нами было проанализировано при помощи ПЦР в реальном времени 10 микроРНК (-124, -125b, -16, -181b, -191, -21, -221, -223, -31 и 451), относящихся, по литературным данным, к онкогенным микроРНК, сверхэкспрессия которых в раковых клетках нарушает работу генов - супрессоров опухоли, и онкосупрессорным микроРНК, понижение уровня экспрессии которых ведет к активации онкогенов, а так же микроРНК, участвующим в ангиогенезе.

Дополнительно у 6 оперированных с глиомами головного мозга был определен уровень экспрессии 800 микроРНК на высокопропускной платформе Nanostring.

С целью валидации полученных результатов у 37-и больных исследуемой группы было проведено исследование методом ПЦР реальном времени еще 9 микроРНК: - 128, -143, -144, -182, -183, -199b, -204, -7 и -99a.

Данный раздел работы выполнен в лаборатории молекулярной генетике на базе Института молекулярной и клеточной биологии СО РАН

2.2.1 Выделение нуклеиновых кислот из операционных образцов

Для выделения нуклеиновых кислот из отобранных клинических образцов использовался набор реагентов «Реал Бест экстракция 100» («АО Вектор-Бест», Россия). К 50 мг ткани добавляли 500 мкл лизирующего гуанидинового буфера. Ткань в растворе интенсивно перемешивали в термошейкере TS-20 (Biosan, Латвия) в течение 15 минут при температуре 65°C. Взвесь обрабатывалась 2 минуты в центрифуге (ротор угловой F-45-12-11 MiniSpinEppendorf, Германия) при скорости вращения ротора 10000 об/мин. Полученный супернатант переносили в новые пробирки и после добавления равного объема изопропанола и 10 мкл сорбента (суспензия магнитных частиц) перемешивали и оставляли при комнатной температуре на 5 минут. После этого проводили повторную обработку на центрифуге в течение 10 минут со скоростью вращения ротора 13000 об/мин, полученный супернатант сливали, а осадок промывали сначала в 500 мкл 70 % водного раствора этанола, затем в

300 мкл ацетона. Осадок высушивали и растворяли в 200 мкл элюирующего раствора. Полученные подобным методом пробы использовались для постановки ОТ-ПЦР анализа. Оценка концентрации выделенных РНК выполнялась по результатам обмеров проб на спектрофотометре NanoDrop 2000С (ThermoScientific, США). Концентрация суммарного пула РНК варьировалась в диапазоне от 54 до 480 нг/мкл.

2.2.2 Обратная транскрипция

Для получения кДНК путем реакции обратной транскрипции использовались готовые реакционные смеси «Реал Бест Мастер микс ОТ» (АО «Вектор-Бест», Россия). Смесь объемом 30 мкл содержала: 3 мкл выделенной РНК, 16.2 мкл 40 % раствора трегалозы, 3 мкл 10х буфера для обратной транскрипции, 3 мкл 4 мМ раствора дезоксинуклеозидтрифосфатов, 3 мкл 10 % раствора бычьего сывороточного альбумина (BSA), 0,32 мкл обратной транскриптазы (АО «Вектор-Бест», Россия) и 1.5 мкл 10 мкМ раствора соответствующего праймера для обратной транскрипции. Использованные праймеры приведены в таблице 7.

Таблица 7 – Праймеры и зонды для проведения ОТ-ПЦР

мишень	название	Последовательность (5' → 3')
U58A	RT-U58	GTCGTGTCTGAGGCTGACTGAGACCTATTCGCACCTGACACG ACGGTGTCCCT
	F-U58	ACGTCGAGTGATGACTTTCTT
	Pb-U58	(R6G)-ATTCGCACCTGACACGACGGTGTCCCT-(BHQ1)
	R-U58	CTGAGGCTGACTGAGACCT
Микро-РНК-221	RT-221	GTCGTGTCTGAGGCTCACTGAGACCTATTCGCACCTCGACACG ACGAAACCCA
	Pb-221	(R6G)-ATTCGCACCTCGACACGACGAAACCCAG-(BHQ1)
	F-221	CAGCAGCTACATTGTCTGC
	URev-3	CTGAGGCTCACTGAGACCT

Продолжение таблицы 7

мишень	название	Последовательность (5' → 3')
Микро-РНК-21	RT-21	GTCGTGTCTGAGGCTCACTGAGACCTATTCGCACCTGACACG ACTCAACATC
	Pb-21	(R6G)-ATTCGCA(C-LNA)CTGACACGACTCAACATCAG-(BHQ1)
	F-21	ACGCAGCTAGCTTATCAGACT
	URev-3	CTGAGGCTCACTGAGACCT
Микро-РНК-31	RT-31	GTCGTGTCTGAGGCTCACTGAGACCTATTCGCACCTCGACACG ACAGCTATGC
	Pb-31	(R6G)-ATTCGCACCTCGACACGACAGCTATGC-(BHQ1)
	F-31	CAAGCAGGCAAGATGCTG
	URev-3	CTGAGGCTCACTGAGACCT
Микро-РНК-181b	RT-181b	GTCGTGTCTGAGGCTCACTGAGACCTATTCGCACCTCGACACG ACACCCACCG
	Pb-181b	(R6G)-ATTCGCACCTCGACACGACACCCACCG-(BHQ1)
	F-181b	CCAGCAACATTCATTGCTGT
	URev-3	CTGAGGCTCACTGAGACCT
Микро-РНК-191	RT-191	GTCGTGTCTGAGGCTCACTGAGACCTATTCGCACCTCGACACG ACCAGCTGCT
	Pb-191	(R6G)-ATTCGCACCTCGACACGACCAGCTGCT-(BHQ1)
	F-191	CAGCCAACGGAATCCCAA
	URev-3	CTGAGGCTCACTGAGACCT
Микро-РНК-16	RT-16	GTCGTGTCTGAGGCTCACTGAGACCTATTCGCACCTCGACACG ACCGCCAATA
	Pb-16	(R6G)-ATTCGCACCTCGACACGACCGCCAATA-(BHQ1)
	F-16	CCAGCTAGCAGCACGTA
	URev-3	CTGAGGCTCACTGAGACCT
Микро-РНК-451	RT-451	GTCGTGTCTGAGGCTCACTGAGACCTATTCGCACCTCGACACG ACAACCTCAGT
	Pb-451	(R6G)-ATTCGCACCTCGACACGACAACCTCAGTA-(BHQ1)
	F-451	CCAGCAAACCGTTACCATT
	URev-3	CTGAGGCTCACTGAGACCT

Окончание таблицы 7

мишень	название	Последовательность (5' → 3')
Микро-РНК-223	RT-223	GTCAGAGCGTCTTCTAGCACGACTTCATCCTCACCTCGCTCTGACTGGGGTAT
	Pb-223	(R6G)-TCCTCACCTCGCTCTGACTGGGGTAT-(BHQ1)
	F-223	CACTCATCTGTCAGTTTGTCAA
	R-223	GTCTTCTAGCACGACTTCA
Микро-РНК-125b	RT-125b	GTCGTGTCTGAGGCTCACTGAGACCTATTCGCACCCTCGACACGACTCACAAGT
	Pb-125b	(R6G)-ATTCGCACCCTCGACACGACTCACAAGT-(BHQ1)
	F-125b	TAAGCTCCCTGAGACCCTA
	URev-3	CTGAGGCTCACTGAGACCT
Микро-РНК-124	RT-124	GTCGTGTCTGAGGCTCACTGAGACCTATTCGCACCCTCGACACGACGGCATTCA
	Pb-124	(R6G)-ATTCGCACCCTCGACACGACGGCATTCA-(BHQ1)
	F-124	ACATTCTAAGGCACGCGG
	URev-3	CTGAGGCTCACTGAGACCT

Протокол проведения ОТ приведен на рисунке 2.

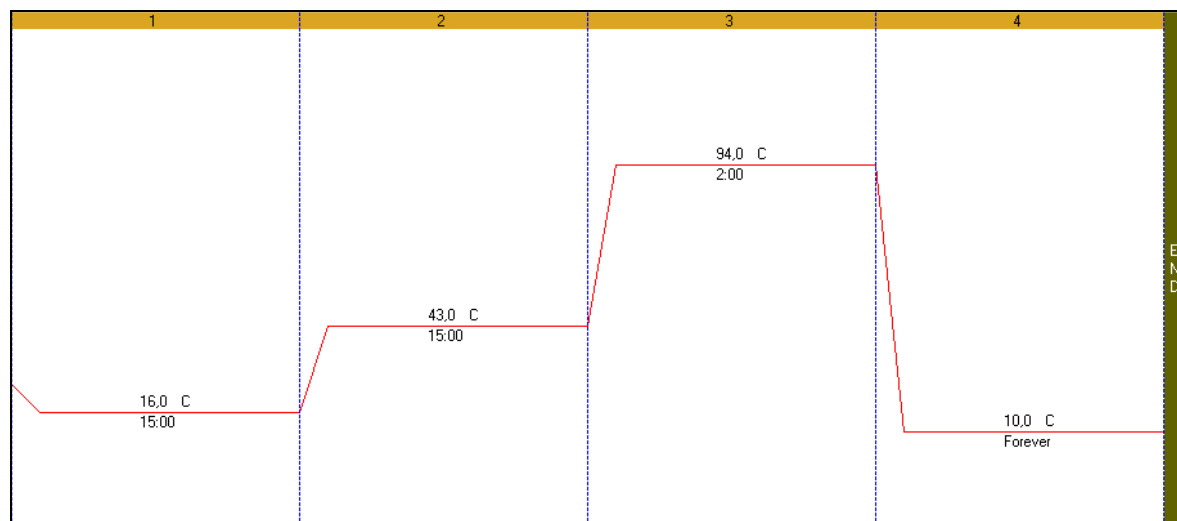


Рисунок 2 – Протокол проведения обратной транскрипции для микроРНК и референсного гена U58

Полученную реакционную смесь, содержащую кДНК, в объеме 3 мкл сразу использовали в качестве матрицы для проведения ПЦР на приборе CFX 96 (Bio-Rad, США).

2.2.3 ПЦР в реальном времени

Измерение уровней экспрессии микроРНК проводили с помощью амплификатора CFX96 (Bio-Rad Laboratories, США) методом ПЦР в реальном времени, используя малую РНК U58 в качестве референсного гена. Последовательности праймеров и зондов приведены в таблице 7. Реакционная смесь суммарным объемом 30 мкл состояла из 3 мкл полученной кДНК, 14 мкл H₂O, 3 мкл 10x буфера для ПЦР (АО «Вектор-Бест», Россия), 3 мкл 4 мМ раствора дезоксинуклеозидтрифосфатов, 3 мкл 10 % раствора BSA, 1 мкл Taq-полимеразы (АО «Вектор-Бест», Россия) в комплексе с моноклональными антителами к ее активному центру (Clontech, США), 3 мкл раствора прямого и обратного праймеров (5 мкМ) и зонда (2.5 мкМ). Мы использовали системы праймеров и зондов, разработанные компанией АО «Вектор-Бест», эффективность реакции составляла 85 - 100 %. Протокол реакции ПЦР на приборе CFX 96 (Bio-Rad, США) представлен на рисунке 3. Анализ полученных данных пороговых циклов ПЦР в реальном времени выполнен $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ методом [121].

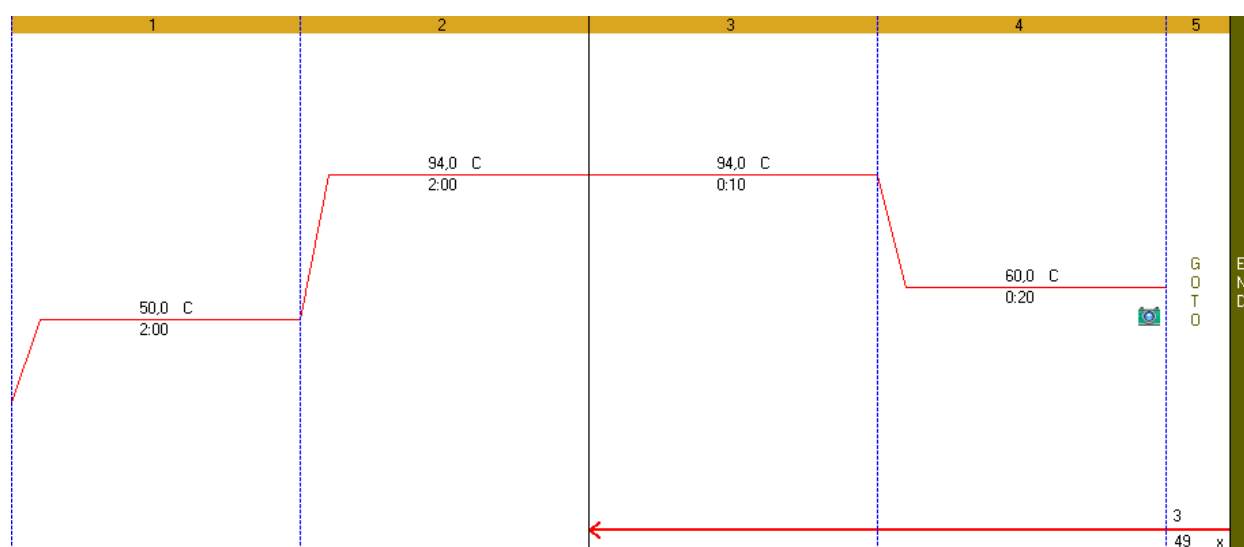


Рисунок 3 – Протокол проведения ПЦР в реальном времени для измерения экспрессии микроРНК и референсного гена U58

1. Анализ изменения относительного уровня экспрессии микроРНК, измеренного методом ПЦР в реальном времени между образцами опухолевой и морфологически неизменной условно нормальной ткани:

Расчет относительного изменения уровня экспрессии микроРНК в опухолевой ткани:

$$\Delta Ct_0 = 2^{-(Ct_{\text{микроРНК в опухоли}} - Ct_{U58 \text{ в опухоли}})}$$

где $Ct_{\text{микроРНК в опухоли}}$ – пороговый цикл исследуемой микроРНК при проведении ПЦР в реальном времени в опухолевом образце, $Ct_{U58 \text{ в опухоли}}$ – пороговый цикл референсного гена *U58* в опухолевом образце.

Расчет относительного изменения уровня экспрессии микроРНК в морфологически неизменной (условно нормальной) ткани:

$$\Delta Ct_H = 2^{-(Ct_{\text{микроРНК в норме}} - Ct_{U58 \text{ в норме}})}$$

где $Ct_{\text{микроРНК в норме}}$ – пороговый цикл исследуемой микроРНК при проведении ПЦР в реальном времени в условно нормальной ткани, $Ct_{U58 \text{ в норме}}$ – пороговый цикл референсного гена *U58* в условно нормальной ткани.

Изменение уровня экспрессии микроРНК между опухолевой и морфологически неизменной тканями оценивалось путем сравнительного анализа медианных значений в исследуемых подгруппах.

2. Анализ изменения относительного уровня экспрессии микроРНК, измеренного методом ПЦР в реальном времени между различными молекулярно-генетическими подтипами опухолей:

Расчет относительного изменения уровня экспрессии микроРНК у пациента с определенным молекулярно-генетическим подтипом опухоли:

$$\Delta \Delta Ct = 2^{-((Ct_{\text{микроРНК в опухоли}} - Ct_{U58 \text{ в опухоли}}) - (Ct_{\text{микроРНК в норме}} - Ct_{U58 \text{ в норме}}))}$$

где $Ct_{\text{микроРНК в опухоли}}$ – пороговый цикл исследуемой микроРНК при проведении ПЦР в реальном времени в опухолевом образце, $Ct_{U58 \text{ в опухоли}}$ – пороговый цикл референсного гена *U58* в опухолевом образце; где $Ct_{\text{микроРНК в норме}}$ – пороговый цикл исследуемой микроРНК при проведении ПЦР в реальном времени в

условно нормальной ткани, St_{U58} в норме – пороговый цикл референсного гена *U58* в условно нормальной ткани.

Изменение уровня экспрессии микроРНК между различными молекулярно-генетическими подтипами опухоли оценивалось путем сравнительного анализа медианных значений в исследуемых подгруппах пациентов.

2.2.4. Детекция микроРНК с помощью технологии NanoString

Экспрессию 800 микроРНК определяли с помощью набора nCounter Human v2 miRNA Expression Assayzer (NanoString Technologies, США) в соответствии с инструкциями производителя. Для анализа брали 100 нг тотальной РНК, гибридизацию проводили 20 часов при температуре 65°C. После гибридизации образцы помещали в автоматическую станцию nCounter Prep Station для очистки и связывания репортерных зондов. Далее каждый образец был просканирован в 550 полях зрения в nCounter Digital Analyzer. Данные были проанализированы с помощью программного обеспечения nSolverv2 (NanoString Technologies, США). Результаты нормировали на 100 наиболее представленных микроРНК.

2.3. Используемая аппаратура

Верификация диагноза опухоли головного мозга выполнялась с помощью МР-томографов: ExcelartVantage «Toshiba» (Япония) с напряженностью магнитного поля 1,5 Тл, в ряде случаев использовался мультиспиральный компьютерный томограф Aquilion 64 «Toshiba» (Япония). Для контрастирования при проведении МРТ применялся «Омнискан», а при МСКТ - «Омнипак».

Объективизация оперативного вмешательства у всех 118 больных обеспечивалась навигационной станцией Stealth Station Treon Plus «Medtronic», США (рисунок 4).



Рисунок 4 – Навигационная система Stealth Station Treon Plus

Применение данной навигационной системы обеспечивало высокую точность дооперационной разметки, что позволяло свести к минимуму размеры кожных разрезов и краниотомии, а также визуализировать крупные интракраниальные сосуды, расположенные в непосредственной близости к зоне манипуляции. В ряде случаев (16 пациентов) навигационная станция использовалась для проведения пункционной биопсии.

При оперативных вмешательствах использовались наборы микронеурохирургического инструментария отечественного (г. Казань) и

зарубежного («Aescular», «Codman», «Syntes», «Stryker») производства. Для трепанации применялся краниотом ElanE фирмы «Aescular» или пневмокраниотом «Syntes».

При удалении опухолей применялись ультразвуковые аспираторы Sonaca фирмы Soring и CUSA, а также биполярные коагуляторы «ERBE», «Codman», «Aescular», причем, последние использовались и для гемостаза. Все манипуляции проводились с применением операционного микроскопа «Carl Zeiss OPMIVario 33» (Германия) с увеличением $6^x - 10^x$. Для пластики твердой мозговой оболочки использовался синтетический рассасывающийся материал этисорб производства Johnson&Johnson, (регистрационное удостоверение ФС № 2005/1663), либо аллопланты, разрешенные к применению в медицинской практике на территории Российской Федерации.

Для гемостаза применялись гемостатические материалы «Surgicel», «Surgicel-Fibrillar» (Jonson&Jonson), регистрационное удостоверение ФС 2006/256 и «Тахокомб» (Nycomed), регистрационное удостоверение № ПН012888/01 от 19.12.2007.

2.4 Техника оперативных вмешательств при удалении супратенториальных глиом головного мозга

Оперативные вмешательства проводились в соответствии с зарегистрированной в институте технологией «Микрохирургическое удаление глиальных опухолей головного мозга супратенториальной локализации» ФС № 2011/312 (В.В. Ступак, С.В. Мишинов, 2010) [27].

При операциях использовалась тотальная внутривенная анестезия с эндотрахеальным наркозом. Положение больного на операционном столе и оперативный доступ выбирались, исходя из локализации опухоли. Энцефалотомия выполнялась с использованием нейронавигации в наименее функционально значимых участках коры головного мозга. На первом этапе, чередуя УЗА и/или вакуумный отсос с биполярной коагуляцией, выполнялась

внутренняя декомпрессия опухоли и последующее её удаление по периферии. Такая последовательность обеспечивала меньшую тракцию мозгового вещества, по сравнению с обратным порядком удаления: от периферии опухоли к её центру. При вмешательствах всегда ставилась цель - достичь максимально возможной циторедукции опухоли. Однако в тех случаях, когда опухоль распространялась в функционально важные участки мозга, проводилось субтотальное или парциальное её удаление для минимизации нарастания неврологического дефицита. В 16 случаях, принимая во внимание объём новообразования, его распространённость в глубинные отделы мозга и возраст оперируемых, была выполнена пункционная биопсия под навигационным контролем.

После удаления необходимого объёма опухолевой массы выполнялся тщательный гемостаз с использованием материалов «Surgicel», «Surgicel-Fibrillar», «Тахокомб». На заключительном этапе операции проводилась герметичная пластика твёрдой мозговой оболочки аллотрансплантатом или имплантатом. Костный лоскут, как правило, возвращали на место, но при необходимости эффективной декомпрессии его удаляли, - пластика ТМО в подобных случаях проводилась «парусом».

Стереотаксическая безрамочная биопсия проводилась под навигационным контролем (в соответствии с зарегистрированной технологией ФС №2011/279, В.В. Ступак, С.В. Мишинов), использовался набор для биопсии фирмы «Medtronic» (США) [27].

2.5 Методы исследования в клинике

2.5.1 Современные методы нейровизуализации в диагностике супратенториальных глиом головного мозга

У всех привлеченных к исследованию пациентов подтверждение диагноза выполнялось с использованием нейровизуализационных методов. Большая

часть больных перед госпитализацией прошла МРТ- и КТ-обследование по месту жительства, вследствие чего качество снимков, а также количество и пространственная ориентировка срезов были достаточно переменными. Кроме того, далеко не во всех случаях обследования применялось контрастное усиление. В связи с этим, все больные в предоперационном периоде прошли повторное обследование - на базе отделения лучевой диагностики ФГБУ "ННИИТО им. Я.Л. Цивьяна" Минздрава России. Учитывая международные рекомендации, приоритет в диагностике внутримозговых опухолей при повторном обследовании отдавался МРТ с контрастированием («Омнискан»). При наличии противопоказаний к проведению МРТ и/или избыточной массы тела - свыше 100 кг (предельно допустимая масса на МР-томографах ФГБУ "ННИИТО им. Я.Л. Цивьяна" Минздрава России) - проводилась МСКТ головного мозга также с контрастным усилением («Омнипак»). МСКТ-обследование с контрастированием также назначалось в тех случаях, когда предполагалось использование навигационной станции, - вне зависимости от наличия или отсутствия результатов МРТ. Данные МРТ и МСКТ на этапе предоперационного планирования совмещались в навигационной станции, что позволяло максимально нивелировать эффект пространственного искажения изображения, возможный при проведении исследований на томографах с высокой напряженностью магнитного поля.

2.5.2 Магнитно-резонансная томография головного мозга

МРТ-обследования головного мозга проводились на томографах Aperto «Hitachi» и ExcelartVantage «Toshiba». У томографа Aperto с напряженностью магнитного поля 0,4 Тл стандартный протокол включал T1- (TR 400 мс, TE 26 мс), T2-взвешенные изображения (TR 3940 мс, TE 126 мс) с использованием импульсной последовательности (SE) и FLAIR в сагиттальной, фронтальной и аксиальной плоскостях с толщиной срезов 5 мм до контрастирования и

получение T1-взвешенных изображений с толщиной срезов 5 мм в нескольких плоскостях после введения контрастирующего вещества.

При выполнении диагностических исследований на томографе ExcelartVantage с напряженностью магнитного поля 1,5 Тл стандартный протокол включал T1-, T2- взвешенные изображения с использованием импульсных последовательностей спиновое эхо (SE) значениями TR 630 мс, TE 17 мс для T1-ВИ и TR 4950 мс, TE 105 мс для T2-ВИ, так же получали изображения с подавлением сигнала от жидкости (FLAIR) со значениями TR 10000 мс, TE 105 мс (рисунок 5).

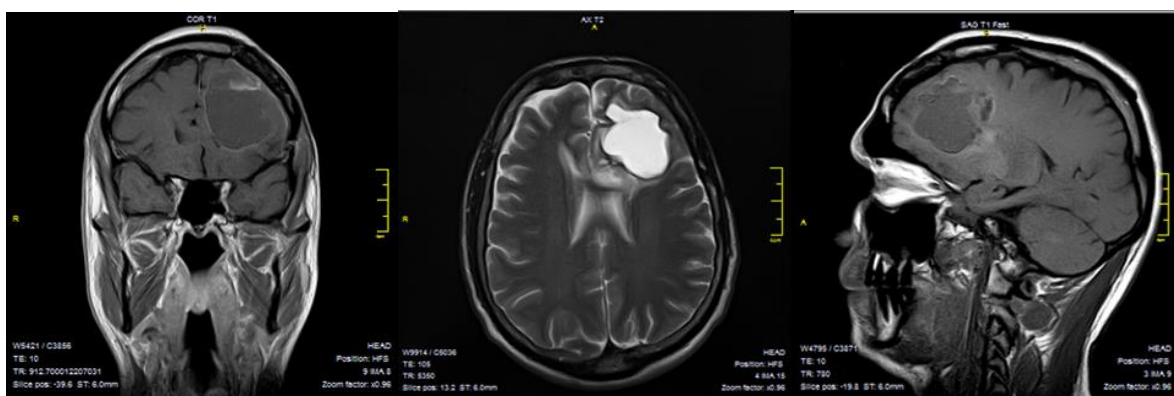


Рисунок 5 – МРТ-изображение (без контрастирования) головного мозга больного с глиомой кистозного характера левой лобной доли

До введения контрастирующего вещества изображения регистрировали в аксиальной, сагиттальной и фронтальной плоскостях с толщиной срезов 5 - 6 мм. После введения контраста получали T1- взвешенные изображения в тех же плоскостях, так же с толщиной срезов 5 - 6 мм. Среднее время исследования составляло приблизительно 15 минут. При выполнении обследования у части пациентов использовался протокол нейронавигации, включающий, как до, так и после контрастирования, получение изображений в режиме FFE_3D с квадратной матрицей 256x256, количеством срезов 120, толщиной срезов 1,3 мм без перекрытия, значениями TR 15 мс и TE 5 мс.

Во всех случаях в качестве контрастного вещества использовался препарат «Омнискан» (GE Healthcare Ireland) в дозировке 0,1 ммоль/кг или 0,2 мл/кг массы тела больного. Ниже представлены МРТ-снимки больного с глиомой левой височной доли (рисунок 6).

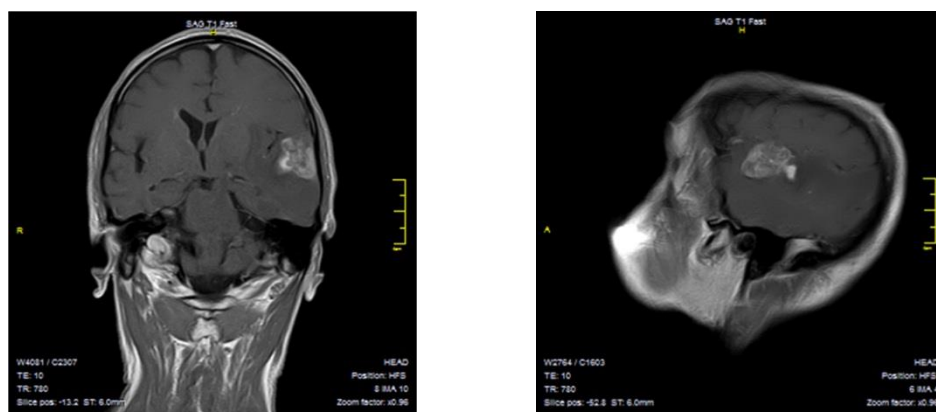


Рисунок 6 – МРТ-изображение головного мозга больного с глиомой височной доли, полученное с использованием контрастирующего вещества

2.5.3 Мультиспиральная компьютерная томография головного мозга

МКСТ-обследование было выполнено у 46 оперированных - либо в качестве дополнения к проведённой ранее МРТ, либо как самостоятельный метод в тех случаях, когда проведение магнитно-резонансного обследования не представлялось возможным. Обследования с внутривенным болюсным введением контрастного препарата «Омнипак 300» или «Омнипак 350» (GE Healthcare Ireland) в объёме 70 мл проводилось на аппарате Aquilion 64 «Toshiba», толщина срезов при сканировании составляла 0,5 мм. Пример обследования представлен на рисунке 7. Изображения обрабатывались на рабочей станции Vitreas построением MPR (Multiplanar reformation), MIP (Maximum Intensity Projection) и VRT (Volume rendering technique) реконструкций.

Из представленных на рисунке 7 изображений видно, что наиболее информативными визуализационными качествами обладают МСКТ головного мозга, при получении которых использовались контрастирующие вещества.

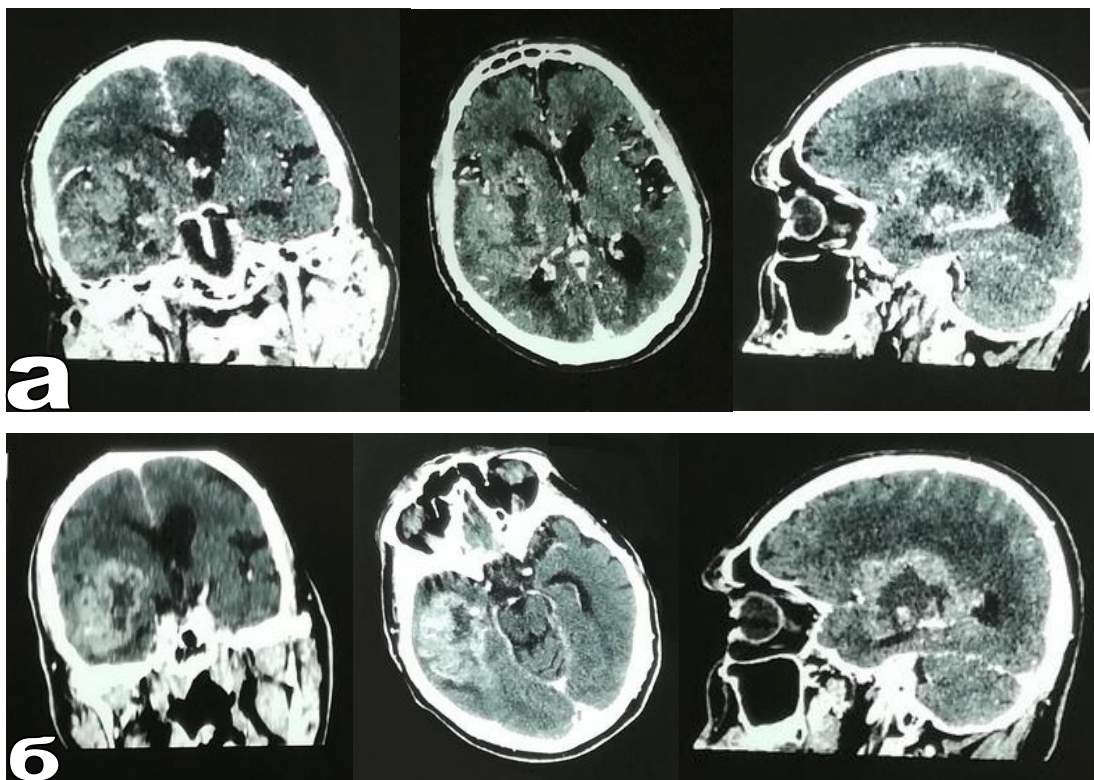


Рисунок – 7 МСКТ головного мозга больного с глиобластомой левой височной доли. а – с «Омнипаком», б - без контрастирования

2.5.4 Навигационные технологии в хирургии супратенториальных глиом головного мозга

В клинике нейрохирургии ФГБУ "ННИИТО им. Я.Л. Цивьяна" Минздрава России при хирургическом лечении опухолей головного мозга используется оптическая навигационная станция Stealth Station Treon Plus фирмы «Medtronic» (США). Станция обеспечивает в реальном времени сопоставление данных визуализационных методов исследования (МРТ, МСКТ) с интраоперационной картиной, придавая тем самым контролю выполнения операции объективность. Принцип работы основан на анализе полученных

данных МРТ или МСКТ головного мозга (а, в случае необходимости, и их комбинации), и интерактивном сопоставлении их с окружающим пространством.

Процесс навигации состоит из трех последовательных блоков.

На первом этапе производится загрузка полученных данных в систему. Обязательными требованиями, без соблюдения которых выполнение навигации невозможно, являются: 1) регистрация во время МРТ/МСКТ-исследования пространственных координат всех анатомических образований - от макушки до кончика носа, служащего основным анатомическим ориентиром; 2) обеспечение толщины срезов не менее 5 мм (желательно 1 - 2 мм для более точной постройки трехмерной модели); 3) выставление угла гентри в положение 0°. После введения в навигационную систему полученных данных осуществляется построение трехмерной модели опухоли и других представляющих интерес анатомических образований (рисунок 8).

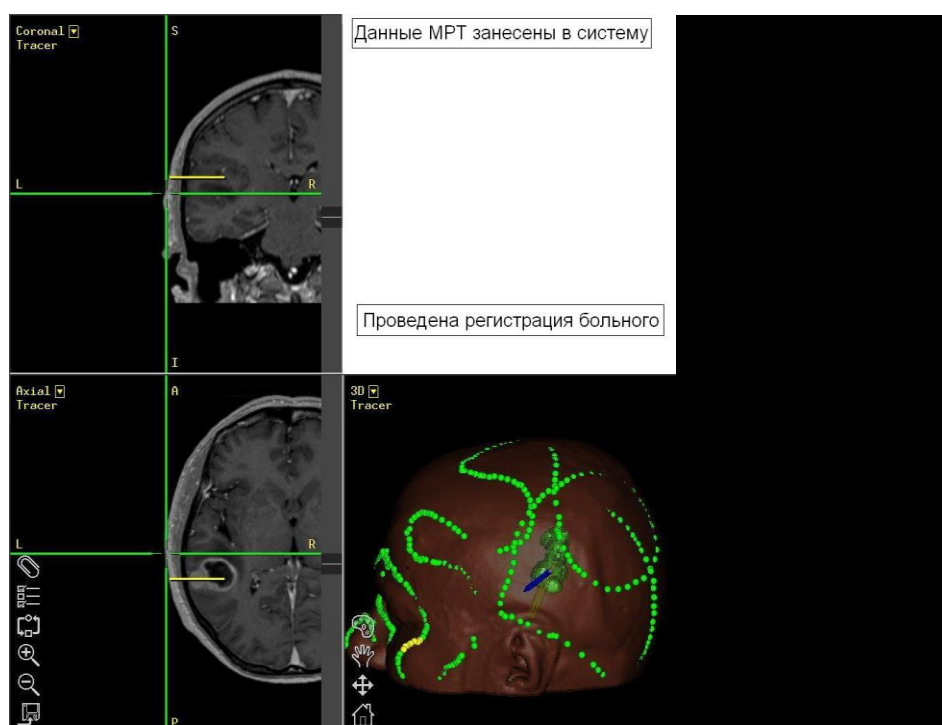


Рисунок 8 – Построение трехмерной модели новообразования на основании МРТ-изображений головного мозга больного

При наличии на всех срезах четких границ между опухолевой тканью и окружающим мозгом данная процедура может быть выполнена в автоматическом режиме, однако в случаях отсутствия чётких границ, что характерно для глиом, предпочтительней использовать ручной метод. В этом случае хирург, руководствуясь данными МСКТ и/или МРТ, определяет границы самостоятельно. При необходимости отметить важные анатомические образования (сосуды, нервы) возможно отдельное их выделение.

Второй этап - нестерильная навигация. Необходимым условием её выполнения является жесткая фиксация головы пациента с помощью скобы типа Mayfield (или её аналогов), обеспечивающей полную её неподвижность относительно навигационной рамки, которая, в свою очередь, служит ориентиром для навигационной системы.

После укладки пациента на стол и закреплении его головы в требуемом положении выполняется предварительная регистрация, заключающаяся в наведении инфракрасной камеры на навигационную рамку с исследуемым объектом, фиксации сигнала камеры навигационной системой и сборе данных об исследуемом объекте путем определения трёхмерных координат анатомических ориентиров (кончик носа, переносица, надбровная дуга на 3 см влево от переносицы и дополнительные точки в количестве не менее 260) (рисунок 9).

По завершении сбора контрольных точек формируется динамическая - в реальном времени - трехмерная модель головы пациента относительно навигационной рамки (рисунок 10). После этого становится доступной визуализация всех анатомических образований, определение мест разреза мягких тканей и краниотомии.

Третий этап навигации – собственно стерильная навигация. После выполнения трепанации уточняется путь операционного доступа к опухоли с помощью активного или пассивного зондов (рисунок 11).

После завершения навигации на всех этапах удаления опухолей визуализировалось местоположение хирургического инструментария и близость важных анатомических образований к зоне манипуляций (рисунок 12).



Рисунок 9 – Система «голова – рамка Майнфильда - штатив», остающаяся в неподвижном состоянии до конца операции

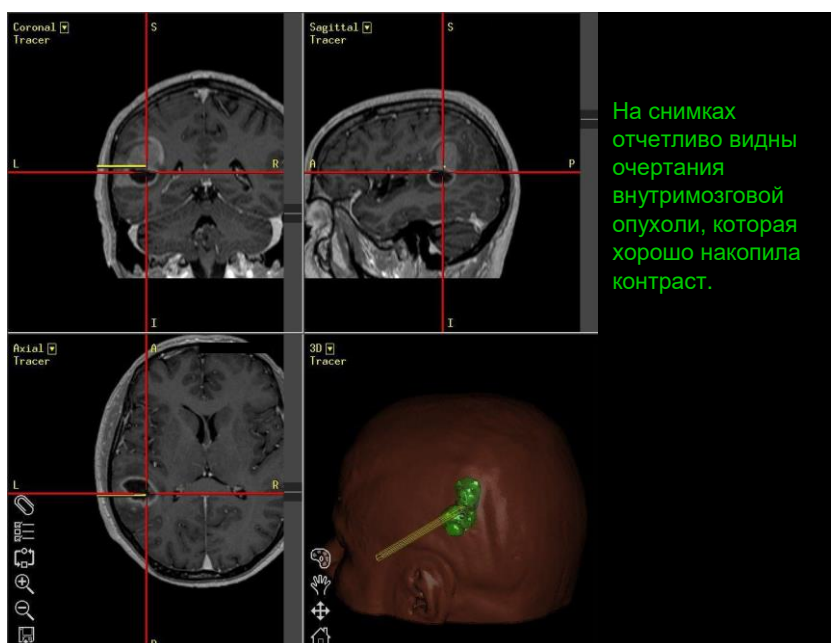


Рисунок 10 – Станция построила трёхмерные модели головы больного и опухоли (выделена зелёным цветом)



Рисунок 11 – Интраоперационная «стерильная» навигация: произведена замена регистрирующего инструмента стерильным (PassiveBlunt) и установлена стерильная рамка (PassiveCranialFrame)

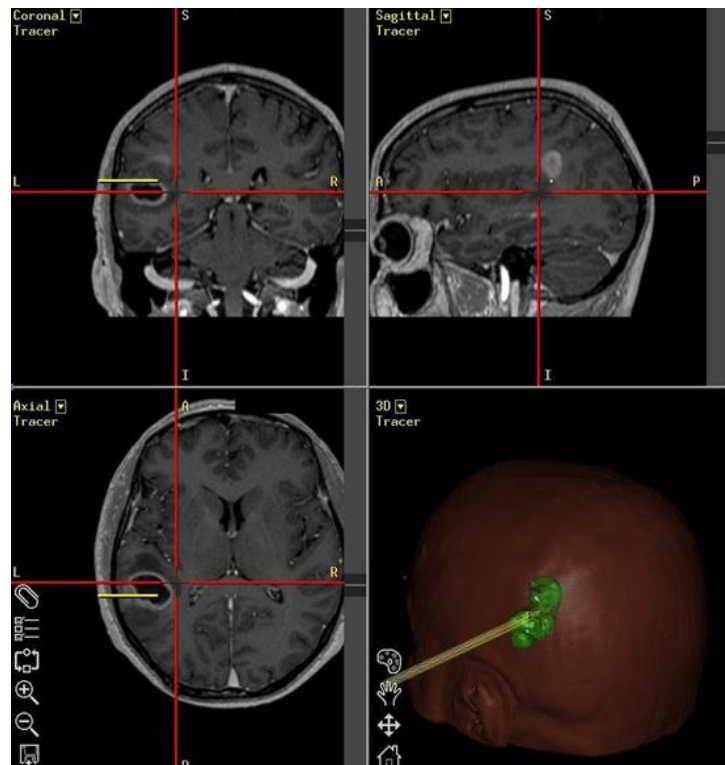


Рисунок 12 – Один из этапов интраоперационной навигации: зонд располагается на медиальной поверхности опухоли

Результаты интраоперационной нейронавигации после удаления опухоли служили дополнительными объективными данными этапов хирургического вмешательства. Навигатор не использовался для оценки степени радикальности проведенной операции из-за развития эффекта «смещения изображения» во время удаления внутримозговых объёмных образований, обусловленного расправлением подвергавшегося компрессии мозгового вещества. Соответственно, навигационный контроль тотальности резекции опухоли не мог трактоваться, как достоверный.

Стереотаксическая биопсия также выполнялась под навигационным контролем (безрамочным способом). При проведении процедуры использовался набор для пункционной биопсии «Medtronic» (рисунок 13), рекомендованный для применения с одноимённой навигационной станцией. Первые два этапа навигации (загрузка данных и нестерильная навигация) были идентичны описанным выше. На первом этапе строился виртуальный план с определением траектории предполагаемой биопсии.

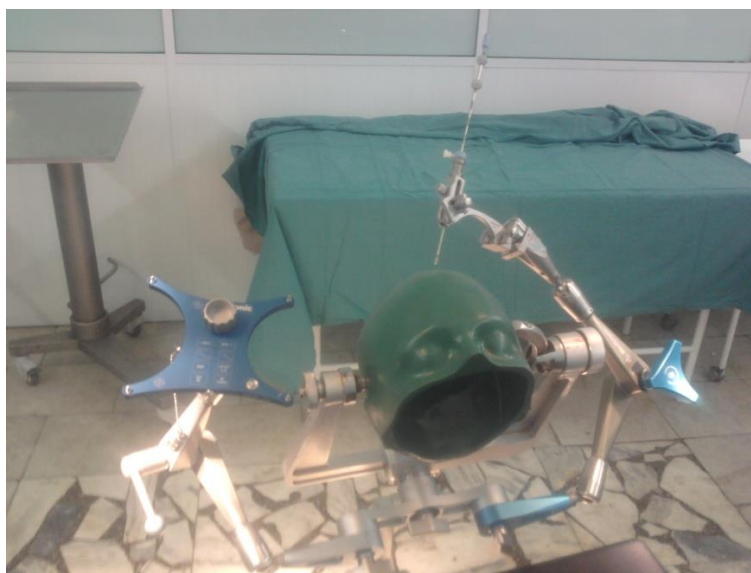


Рисунок 13 – Система для безрамочной стереотаксической биопсии фирмы «Medtronic»

При выполнении третьего этапа проводилась установка направляющей системы в соответствии с запланированной траекторией и осуществлялся непосредственный забор материала с помощью биопсийной иглы. При этом

хирург отслеживал по монитору навигатора глубину продвижения иглы и следование траектории. Заборы опухолевого вещества осуществлялись в 3-х точках: наружная граница опухоли, ее середина и медиальные ее отделы (рисунок 14).

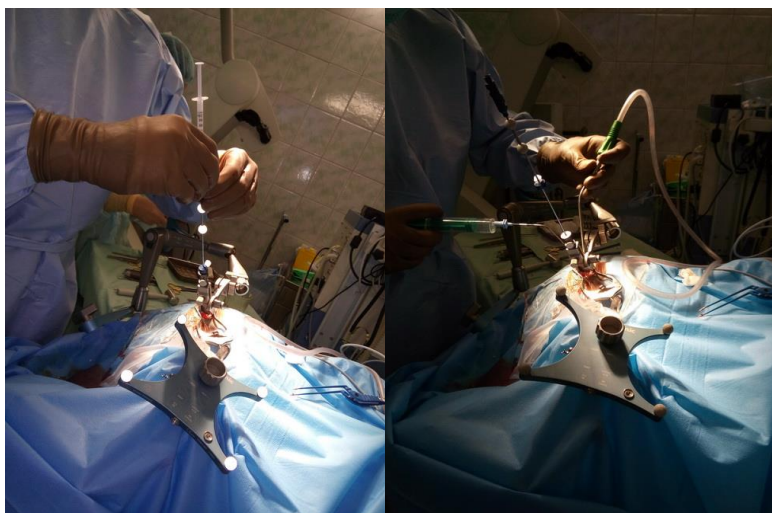


Рисунок 14 – Этап забора опухолевого материала при проведении пункционной биопсии под нейронавигационным контролем

Далее в иглу вводился 1 мл воздуха с целью контроля биопсии, заключающегося в проведении МСКТ головного мозга спустя 1,5 – 2 часа, но не позднее 4-х часов после окончания операции. По изображению пузырька воздуха визуализировалось место забора материала. На рисунке 15 приведён пример дооперационного (МРТ), а на рисунке 16 - послеоперационного (КТ) изображений головного мозга одного и того же больного.

Как было продемонстрировано ранее и видно МСКТ головного мозга позволяла достоверно визуализировать воздушный пузырёк в области забора материала, однако информацию границах опухоли и её точной локализации в общем случае не являлась удовлетворительной. В связи с этим, больным перед биопсией проводились оба вида томографических обследований (МРТ и МСКТ) с контрастированием. МРТ позволяло чётко визуализировать опухоль, а предоперационное МСКТ требовалось по двум причинам: для надежного сравнения с контрольным исследованием, а также для минимизации возможной

пространственной погрешности, которая зачастую проявляется во время навигации при использовании только данных МРТ. Для исключения подобных случаев изображения МРТ и МСКТ перед операцией совмещались в навигационной станции.

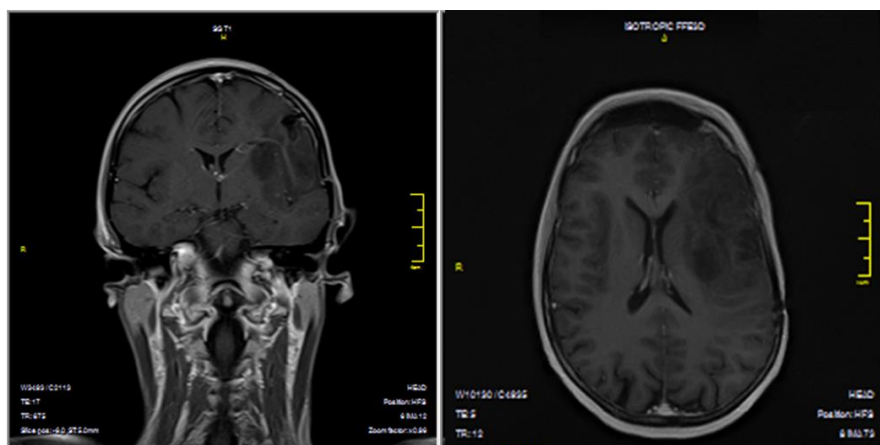


Рисунок 15 – МРТ-изображение головного мозга больного с глубинной глиомой левого полушария, полученное до проведения биопсии

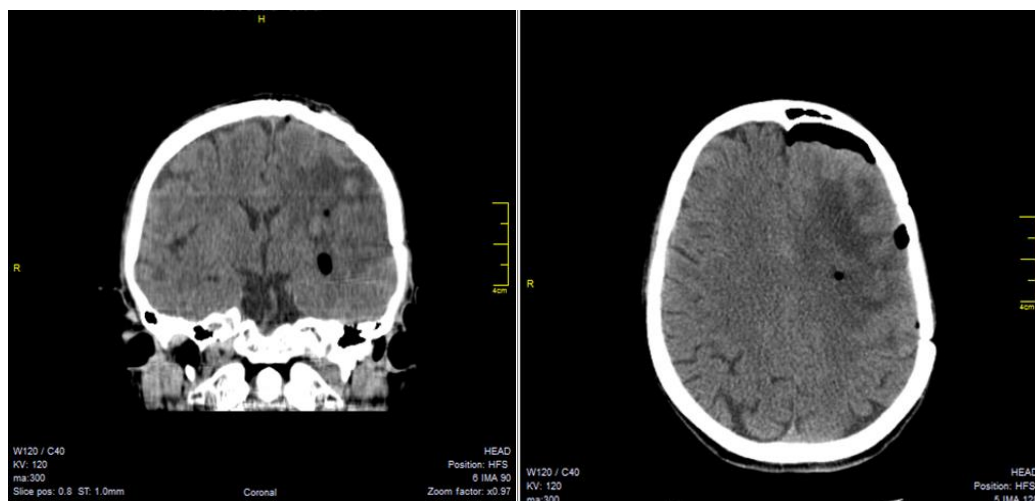


Рисунок 16 – КТ-изображение головного мозга того же больного с глубинной глиомой левого полушария, полученное после пункционной биопсии

2.5.5 Морфологические методы верификации глиом и их гистологическая характеристика

Перед проведением гистологического исследования ткань опухоли фиксировали в 10 % растворе нейтрального формалина в течение 24 часов.

Затем образцы подвергали стандартной обработке: производили обезвоживание в нескольких растворах этилового спирта с возрастающей концентрацией, просветляли в ксилоле и заключали в парафин. Парафиновые срезы окрашивали гематоксилином и эозином. Изучение препаратов проводили с помощью оптического микроскопа AxioimagerA1 («ZEISS», Германия).

При необходимости проводились дополнительные окрашивания:

По методу Ван-Гизона - для окраски соединительной ткани, особенно с целью выявления коллагеновых волокон. Срез помещался в дистиллированную воду, на него наносился реактив А (железный гематоксилин по Вейгерту 1) и реактив В (железный гематоксилин по Вейгерту 2), после чего образец промывался проточной водой и на него наносился реактив С (пикрофуксин по Ван-Гизону) с последующей промывкой в воде, далее образец подвергался дегидрированию в водных растворах спирта возрастающей концентрации с оставлением на 1 минуту в абсолютном этаноле, просветлялся в ксилоле и помещался под покровное стекло. Препараты изучали на оптическом микроскопе Axioimager A1 («ZEISS», Германия).

По Гомори (импрегнация серебром) - метод рекомендован для выявления аргирофильных ретикулярных волокон в соединительной ткани. Срезы помещали в дистиллят, затем на них наносили раствор перманганата калия и активирующий кислотный буфер, промывали и наносили раствор щавелевой кислоты, и далее - раствор ферроаммоний сульфата, промывали и наносили раствор аммиачного серебра, снова промывали и наносили раствор нейтрального формалина, промывали, наносили фиксирующий раствор гипосульфита натрия, и далее, после промывки и дегидрирования в растворах спирта с возрастающей концентрацией, просветляли в ксилоле и помещали под покровное стекло. Препараты, как и в предыдущем варианте, исследовали с помощью оптического микроскопа AxioimagerA1 («ZEISS», Германия).

В случаях, требующих углублённой дифференциальной диагностики, применялось иммуноморфологическое исследование (ИГХ), которое проводили

в соответствии с методическими рекомендациями фирмы-разработчика («DakoCytomation» Дания). Перед реакцией иммунного окрашивания производили демаскировку антигенов тканей посредством нагревания на водяной бане в 10 мМ цитратном буфере (рН 6,0) и блокировали эндогенную пероксидазу 3 % раствором перекиси водорода. Срезы инкубировали с первичными антителами к GFAP (Z 0334 GlialFibrillaryAcidicProtein «DakoCytomation» Дания) по стандартной методике с разбавлением 1:500, с первичными антителами к Ki 67 (MIB1 маркер пролиферации «DakoCytomation» Дания) по стандартной методике с разбавлением 1:100, с первичными антителами к S100 («Novocastra» Великобритания) по стандартной методике с разбавлением 1:300 и с первичными антителами к NSE (5E2 нейрон специфическая энолаза «Novocastra» Великобритания) по стандартной методике с разбавлением 1:100. Для иммунного окрашивания использовали полимерную систему детекции EnVisionFlex («DakoCytomation» Дания). Ядра клеток докрашивали гематоксилином.

2.6 Методика интраоперационного забора биоптата глиомы и морфологически неизменённой ткани головного мозга для молекулярно-генетических исследований

Нами разработан оригинальный способ интраоперационного забора опухолевой и морфологически неизменной ткани головного мозга у одного и того же пациента, что существенно повышает достоверность проводимых исследований.

В своей диссертационной работе Кошкин Ф.А. описывает способ забора биологического материала для исследования микроРНК [15]. В данном способе забор образцов неизменной мозговой ткани в качестве контрольного материала осуществляют спустя 7 - 10 часов после наступления смерти от пациентов, не имеющих заболеваний центральной нервной системы. Образцы забирают из обоих полушарий головного мозга. Полученные параметры

микроРНК в контрольном материале сравнивают с показателями опухолевой ткани, которую во время операции забирают у больных с глиомами головного мозга.

Данный способ предназначен для определения профиля микроРНК, имеет свои существенные недостатки: Забор нормальной трупной мозговой спустя 7-10 часов после наступления смерти, является не совсем корректным для сравнения показателей аналогичных микроРНК глиомы у другого больного. Методика забора тканей по данному способу является крайне громоздкой, многоступенчатой, занимающей большое количество времени, что значительно затягивает получение результатов исследования. Это обусловлено тем, что забор контрольного материала осуществляют у трупа человека, не страдающего онкологической патологией, что требует времени для подбора соответствующего трупа, согласования с другими учреждениями и выезда специалиста для забора материала.

Наиболее близким к предлагаемому является способ забора биоптата глиомы и неизменной ткани головного мозга для молекулярно-генетических исследований во время операции [29]. В данном способе осуществляют забор опухолевой ткани и прилежащей к ней морфологически неизменной ткани, забранной на расстоянии более 2 см от новообразования. Забор тканей осуществляют в процессе проведения операции.

Преимуществом данного способа по сравнению с описанным выше является то, что опухолевую и морфологически неизменную ткани забирают у одного и того же пациента, что существенно повышает достоверность проводимых исследований.

К недостаткам данного способа следует отнести возможность забора биоптата внешне не измененного мозга из функционально важных зон мозга, что может привести не только к увеличению его отека и нарушению кровообращения в нем, но и углублению очаговой неврологической симптоматики и утяжелению состояния оперированного. Кроме того, объем

забираемой морфологически неизменной ткани может быть достаточно большим, что является дополнительной нежелательной травмой для мозга.

Технический результат предлагаемого изобретения заключается в создании способа интраоперационного забора биоптата глиомы и морфологически неизменной ткани головного мозга для молекулярно-генетических исследований, свободного от вышеуказанных недостатков.

Поставленная задача решается тем, что способ интраоперационного забора биоптата глиомы и морфологически неизменной ткани головного мозга для молекулярно-генетических исследований включает оперативный доступ к опухоли, забор морфологически неизменной ткани головного мозга на расстоянии 2 см от опухоли и забор ткани мозгового новообразования.

Забор биоптата внешне неизменного мозга на расстоянии не менее 2 см был обусловлен тем, что по данным (Robins V, Weinfeld F.D., 1997) на расстоянии в 2 - 4 см от края опухоли опухолевые клетки встречаются в 1,8 % случаев, а в прилежащей части мозга к новообразованию в 6 %. То есть забор биоптата в этой зоне сводит к минимуму попадания опухолевых клеток и не сможет исказить полученные результаты [40].

Согласно изобретению, для осуществления оперативного доступа к опухоли под нейронавигационным контролем проводят трепанацию и вскрывают твердую мозговую оболочку. Затем в функционально незначимой области головного мозга под контролем нейронавигации намечают место и траекторию доступа к опухоли и при расстоянии от поверхности мозга до новообразования более 2 см выполняют энцефалотомию на глубину 0,3 см. Из этой области осуществляют забор биоптата мозга в объеме 1 мм³. Затем из зоны энцефалотомии, формируя раневой канал в мозге, осуществляют доступ к глиоме до ее границы и производят забор ткани опухоли в объеме 1 мм³. Если расстояние от поверхности мозга до глиомы меньше 2 см, то сначала под нейронавигационным контролем в функционально незначимой зоне мозга формируют раневой канал до границы опухоли и осуществляют забор ткани

мозгового новообразования в объеме 1 мм³, а затем в пределах трепанационного окна с поверхности мозга в месте внешне неизмененного мозга в функционально незначимой зоне на расстоянии от новообразования более 2 см осуществляют забор биоптата мозга в объеме 1 мм³.

Использование нейронавигационного контроля для осуществления оперативного доступа к опухоли, формирования размера и траектории раневого канала позволяет осуществлять забор морфологически неизменной ткани в функционально незначимой области головного мозга. Это существенно снижает вероятность возникновения неврологических осложнений.

Экспериментально установлено, что забор биоптата глиомы и морфологически неизменной ткани в объеме 1 мм³ обеспечивает достаточную достоверность проводимых исследований при минимальном травмировании мозга.

Предлагаемая последовательность операций позволяет осуществлять забор исследуемых тканей быстро, с высокой точностью и с минимальным травмированием головного мозга. При этом обеспечивается возможность быстрого (в течение 4 - 5 часов) получения результатов исследования, поскольку опухолевая ткань и контрольный образец забирают одновременно и одновременно доставляют в лабораторию для исследования.

Пример щадящего интраоперационного забора биоптата глиомы и морфологически неизменной ткани головного мозга для молекулярно-генетических исследований при расстоянии до новообразования менее 2 см.

Клинический пример № 1.

Больная У.О.А. 61 года, поступила в клинику нейрохирургии № 1 ФГБУ «ННИИТО им. Я.Л. Цивьяна» Минздрава России 17.05.2017 года с диагнозом – внутримозговая кистозная опухоль правой височной доли головного мозга.

Жалобы на головную боль, головокружение, нарушение памяти, слабость в левых конечностях.

В неврологическом статусе имеется умеренный левосторонний центрального типа гемипарез.

МРТ до операции 2017: На МРТ-изображениях определяется внутримозговое кистозное образование, накапливающее контрастное вещество по периферии (53,8x40,8x32,7 мм). Образование подвергает сжатию височный рог правого бокового желудочка. Умеренно выраженная наружная гидроцефалия. Симптом «пустого» турецкого седла. В белом веществе обоих полушарий головного мозга и подкорковых ядер определяются множественные очаги, возможно, хронической ишемии (рисунок 17).

18.05.2017 г. проведено оперативное вмешательство - краниотомия в височной области справа, микрохирургическое удаление объемного образования правой височной доли с применением нейронавигационного контроля. Пластика твердой мозговой оболочки.

Положение больной лежа на левом боку. Голова фиксирована скобой Mayfield. После проведения нейронавигационного контроля с использованием нейронавигационной системы «Medtronic Stealth Station Treon Plus» намечен оптимальный кожный разрез и трепанационное окно для удаления новообразования (рисунок 18).

После этого выполнен полулунный разрез мягких тканей в правой теменно-височной области, кожно-мышечно-апоневротический лоскут откинут на держалке к основанию.

После скелетирования височной кости справа наложено два фрезевых отверстия, из которых при помощи пневмотрепана выпилен костный лоскут размером 6x7 см, последний удален. Визуализируется твердая мозговая оболочка (ТМО), она напряжена, не передает пульсацию головного мозга. Выполнен линейный разрез ТМО, она откинута на держалках к основанию и верхнему сагиттальному синусу. Визуализируется головной мозг, он отечен, вяло передает пульсацию.

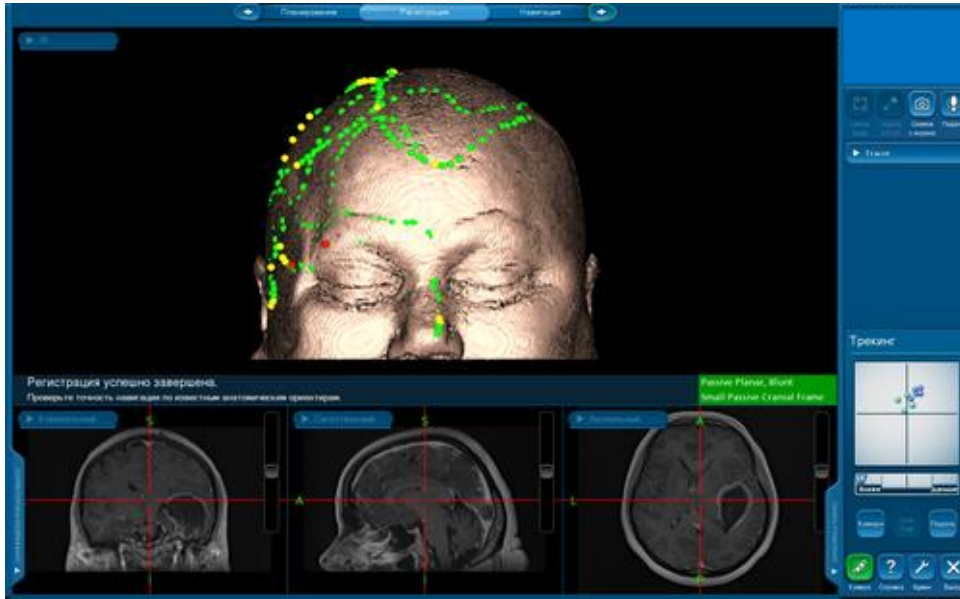


Рисунок 17 – Изображение МРТ головного мозга больного с кистозной глиомой правой височной доли, полученное на нейронавигаторе. На основании клинической картины заболевания и данных МРТ-изображений головного мозга больной выставлен клинический диагноз – внутримозговая опухоль кистозного характера правой височной доли. Предложено оперативное вмешательство, направленное на удаление опухоли



Рисунок 18 – Изображение МРТ головного мозга больной с кистозной глиомой правой височной доли, полученное на нейронавигаторе в момент разметки кожного разреза и оптимального трепанационного окна

Под нейронавигационным контролем в функционально незначимой области головного мозга наметили место и траекторию доступа к опухоли. По нейронавигационным данным (рисунок 19) расстояние от поверхности мозга до новообразования оказалось 11,5 - 11,9 мм, то есть менее 2 см.

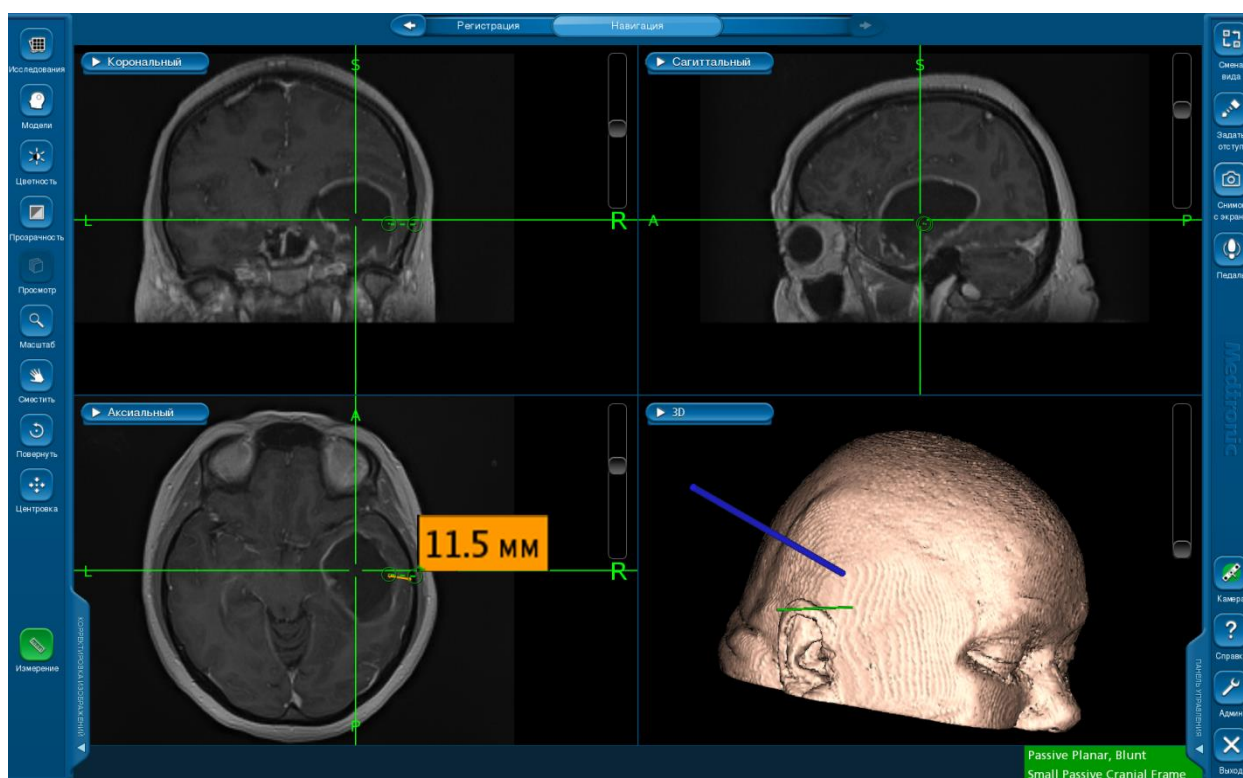


Рисунок 19 – Изображение МРТ головного мозга больной с кистозной глиомой правой височной доли, полученное на нейронавигаторе. Момент определения оптимального доступа к опухоли. По нейронавигационным данным расстояние от поверхности мозга до новообразования 11,5 - 11,9 мм, то есть менее 2 см

При помощи микрохирургической техники, под увеличением микроскопа 10^x в условиях нейронавигационного контроля в функционально незначимой зоне выполнена энцефалотомия протяженностью 2 см в нижней височной извилине мозга. Мозговая ткань раздвинута и на глубине $\sim 0,5$ см визуализируется серого цвета мягко-эластическая патологическая опухолевая ткань. Начато ее поэтапное удаление, при этом для изучения генетического профиля новообразования (определения микроРНК) осуществлен забор

опухолевой ткани микропинцетом Ройса в объеме 1 мм³. На глубине 1,0 см. была вскрыта кистозная часть опухоли, откуда струей высвободилась зеленовато-желтая кистозная жидкость. После ее опорожнения продолжено удаление солидной части опухоли с помощью ультразвукового аспиратора. Обращает на себя внимание обильное кровоснабжение патологической ткани и наличие небольшого количества тромбированных венозных сосудов, что при удалении вызвало обильное профузное кровотечение. Опухоль удалена в пределах видимых границ, при этом был вскрыт височный рог правого бокового желудочка, высвободился прозрачный и чистый ликвор. Фрагменты опухолевой ткани были взяты на гистологическое исследование, после удаления опухоли образовалась полость размерами 7х6х6 см. Гемостаз Sergecell Fibrillar+Original, признаков продолжающегося кровотечения нет, в ложе опухоли установлен силиконовый дренаж, выведенный через контрапертуру в правой теменной области.

В конце операции в пределах трепанационного окна в месте внешне неизмененного мозга в функционально незначимой зоне на расстоянии от новообразования больше 2 см с поверхности мозга микропинцетом Ройса осуществили забор биоптата ткани мозга в объеме 1 мм³.

Пластика твердой мозговой оболочки + пластины тахокомба, Дополнительно сверху уложена пластина спонгостана. Кость уложена на место, фиксирована двумя средними и одним малым краниофиксами. Мышца подшита к кости. Послойное ушивание раны. На кожу наложены швы (титановые скобы). Обработка спиртовым раствором, асептическая повязка.

Гистология: Морфологическая картина опухоли соответствует анапластической астроцитоме, NOS, grade III. ICD-O код 9401/3 с тенденцией в grade IV.

Послеоперационное течение: В послеоперационном периоде у пациентки была диагностирована внутригоспитальная двухсторонняя полисегментарная пневмония. Назначена антибактериальная терапия, на фоне которой по

результатам мультисрезовой компьютерной томографии органов грудной клетки отмечена положительная динамика. Параклинические анализы пришли к норме, температура тела нормализовалась. Больная осмотрена терапевтом, рекомендовано выписать для долечивания у терапевта. Рана зажила первичным натяжением. Локально послеоперационный рубец на голове без признаков воспаления, состоятельный. Пациентка выписана 16.06.2017 г. в удовлетворительном состоянии, признаки очаговой и менингеальной неврологической симптоматики отсутствуют. Рекомендовано наблюдение невролога, онколога и терапевта по месту жительства.

Пример щадящего интраоперационного забора биоптата ткани глиомы и морфологически неизменной ткани головного мозга на расстоянии до новообразования более 2 см для молекулярно-генетических исследований

Клинический пример № 2.

Больная З.Н.А. 37 лет, поступила в клинику нейрохирургии № 1 ФГБУ «ННИИТО им. Я.Л. Цивьяна» Минздрава России 13.06.2017 г. с диагнозом – Продолженный рост внутримозговой опухоли правой затылочной доли головного мозга. Состояние после комбинированного лечения: микрохирургического удаления опухоли в правой теменной доли (от 11.2005 г.), с последующим проведением курса ТГТ СОД 60 Гр., 6 курсов монокимиотерапии темозоломидом; повторного оперативного лечения по поводу рецидива внутримозговой опухоли правой теменной доли (от 08.2015 г.), с последующим проведением курса консолидирующий паллиативной химиотерапии (темодал) и 2-х курсов химиотерапии (драметем).

Жалобы на головную боль, общую слабость, нарушение памяти, слабость в левых конечностях. В неврологическом статусе имеется грубый левосторонний центрального типа гемипарез.

МРТ до операции от 13.06.2017 г.: Внутримозговая мультифокальная опухоль с инфильтративным ростом задних отделов теменной, затылочной и

височной долей правого полушария мозга с выраженным перифокальным отёком, с некрозом центральных отделов крупного узла, с ростом в затылочный рог бокового желудочка - 36 мм x 55 мм x 35 мм (рецидив атроцитомы, гистологическое подтверждение). Двухсторонняя локализация опухолевых узлов: в задне-базальном отделе правой височной доли – 19 мм x 7 мм x 7 мм, в базальном отделе правой затылочной доли – 11 мм x 6 мм x 5,5 мм, 3 x 3мм и 2,5 мм x 3,2 мм, в медиальных отделах левой затылочной доли - 12 x 9 x 7мм, 10 x 5 x 5мм, 7мм x 3мм x 3мм и несколько узелков до 4,0 мм в диаметре. Послеоперационная порэнцефалическая киста задних отделов правой теменной доли (53 мм x 26 мм x 40 мм). Асимметричная необтурационная внутренняя гидроцефалия (рисунок 20).

На основании клинической картины заболевания, данных МРТ-изображений головного мозга, больной выставлен клинический диагноз – продолженный рост внутримозговой опухоли правой теменно-височно-затылочной областей. Ей было предложено оперативное вмешательство, направленное на удаление опухоли.

14.06.2017 г. проведена реоперация в правой теменно-височно-затылочной области, микрохирургическое удаление продолженного роста внутримозговой опухоли правой височной, затылочной и теменной долей под нейронавигационным контролем. Пластика твердой мозговой оболочки.

Положение больной лежа на левом боку с повернутой книзу головой. Последняя фиксирована скобой Mayfield. После проведения нейронавигационного контроля с использованием нейронавигационной системы «Medtronic Stealth Station Treon Plus» с учетом имеющихся послеоперационных кожных рубцов, намечен оптимальный кожный разрез и трепанационное окно для удаления новообразования (рисунок 21).

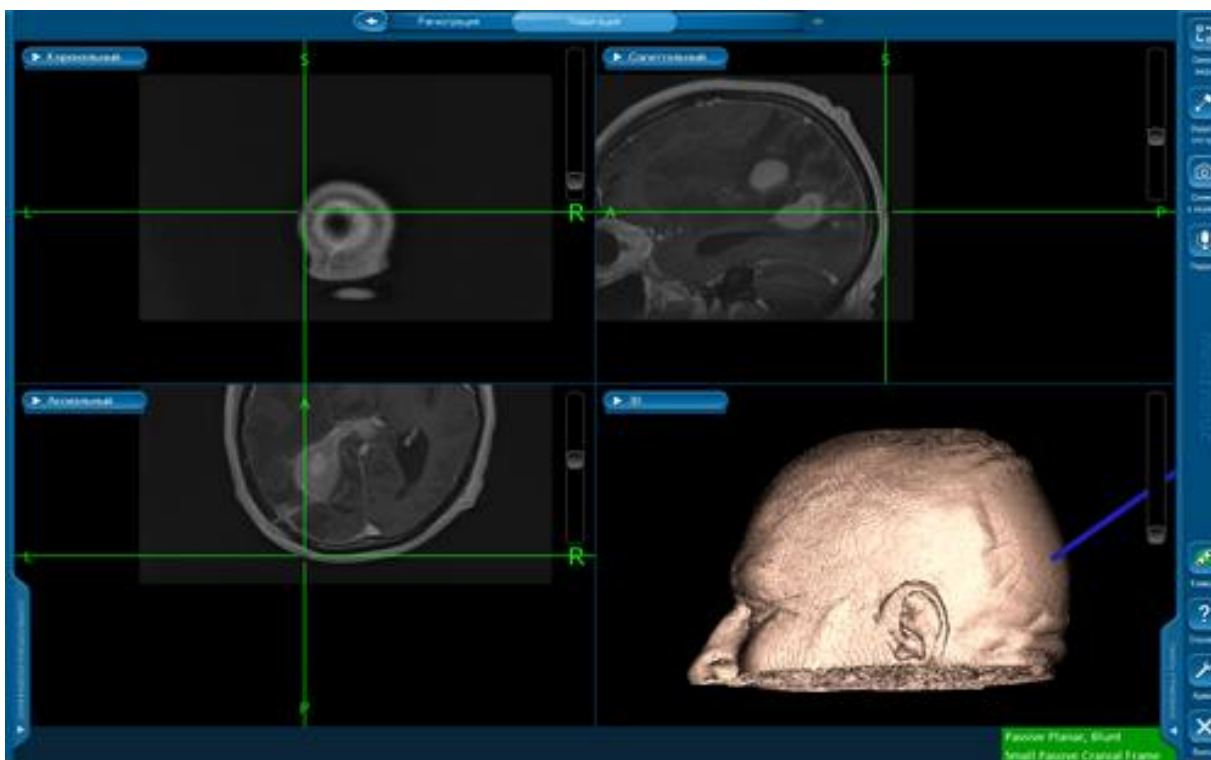


Рисунок 20 – МРТ-изображение головного мозга больного с продолженным ростом глиомы задних отделов теменной, затылочной и височной долей правого полушария мозга

После разметки выполнен подковообразный разрез мягких тканей в правой височно-теменно-затылочной области с последующим отбрасыванием кожно-апоневротического лоскута в сторону ушной раковины и основания. Обращает внимание рубцово-изменённый кожно-апоневротический лоскут, имеется истончение последнего. Он отсепарован от твердой мозговой оболочки (ТМО). Последняя рубцово изменена, умеренно напряжена, передаточная пульсация мозга на грани отсутствия. Визуализируется трансплантат ТМО (ранее установленный) и швы на ТМО, в проекции доступа.



Рисунок 21 – МРТ-изображение головного мозга больной с продолженным ростом глиомы задних отделов теменной, затылочной и височной долей правого полушария мозга, полученное на нейронавигаторе в момент разметки кожного разреза и формирования оптимального трепанационного окна

С целью обеспечения оптимального угла хирургической атаки и адекватного хирургического доступа на основании данных нейронавигации произведена дополнительная резекция кости в задних и передних отделах имеющегося старого костного дефекта черепа при помощи краниотома. При этом размер костного дефекта составил 8x9 см. Гемостаз эпидуральных пространств при помощи surgicell fibrillar. ТМО дополнительно подшита к кости. Произведено вскрытие ТМО подковообразным разрезом, она отброшена в сторону средней линии.

В функционально незначимой области головного мозга под контролем нейронавигации наметили место и траекторию доступа к опухоли. По нейронавигационным данным (рисунок 22) расстояние от поверхности мозга до новообразования оказалось 43,4 – 50,0 мм, то есть более 2 см.

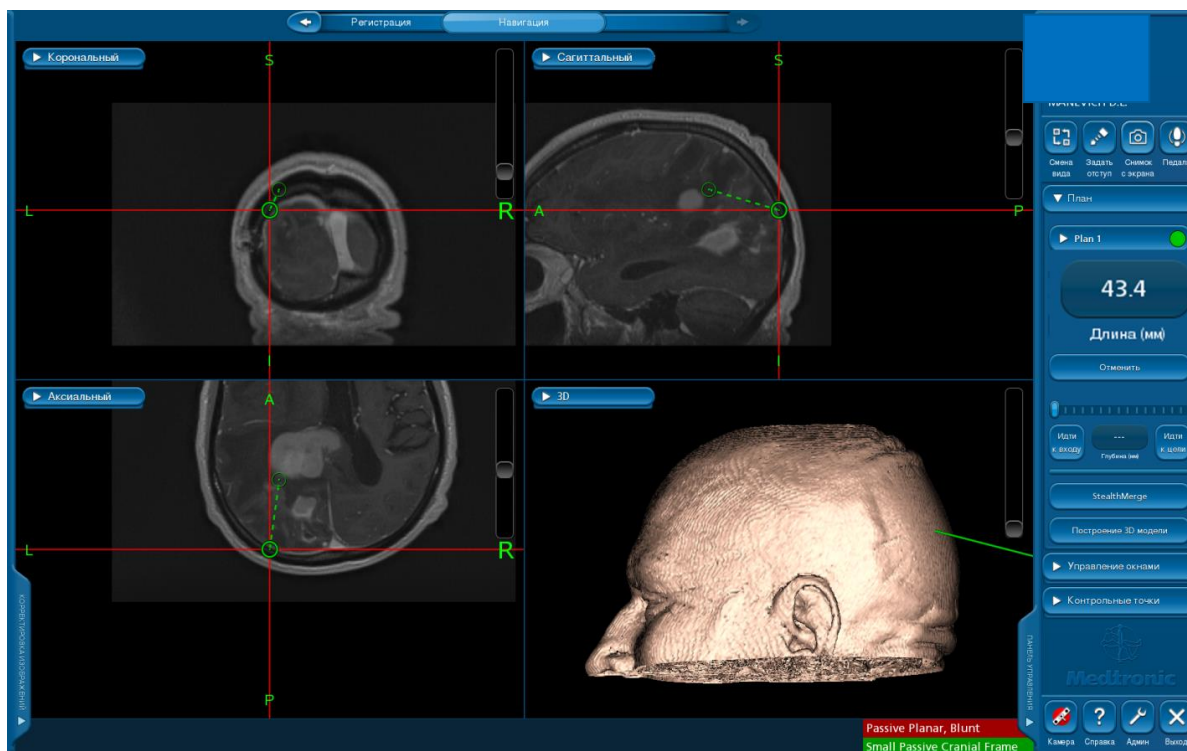


Рисунок 22 – МРТ-изображение головного мозга больной с продолженным ростом глиомы задних отделов теменной, затылочной и височной долей правого полушария мозга, полученное на нейронавигаторе. Момент определения оптимального доступа к опухоли. По нейронавигационным данным расстояние от поверхности мозга до новообразования 4,3 см, то есть более 2 см

Во-первых, для определения генетического профиля опухоли (определения микроРНК) в этой области мозга под увеличением до $20\times$, с применением микрохирургической техники и инструментария, в зоне внешне неизменного мозга выполнили энцефалотомию на глубину 0,3 см и из этой зоны микропинцетом Ройса осуществили забор морфологически неизменной ткани головного мозга в объеме 1 мм^3 . Во-вторых, из зоны энцефалотомии был сформирован раневой канал в мозге, осуществлен доступ к опухоли до ее границы и с помощью микропинцета Ройса произведен забор ткани биоптата глиомы в объеме 1 мм^3 .

В последующем, используя ультразвуковой дезинтегратор, начато удаление опухоли, которая располагается на глубине ~ 4.5 см. Опухоль поверхностно серо-жёлтого цвета, плотной консистенции, без чётких границ с окружающим мозгом, более глубинно серо-вишнёвого цвета, обильно кровоточащая. Опухоль удалялась поэтапно, чередуя этапы удаления с промежуточным гемостазом. После удаления опухоли в пределах видимых границ сформировалась полость размером ~ 5х6х5 см. Мозг запал, появилась его отчётливая пульсация. После удаления опухоли ещё больше и обширнее открылся задний рог правого бокового желудочка. Гемостаз при помощи *surgicell fibrillar*. Контроль гемостаза - признаков продолжающегося кровотечения нет. В ложе удалённой опухоли (фактически в область заднего рога правого бокового желудочка) установлена силиконовая дренажная трубка, выведенная на кожу через контрапертуру в теменной области справа и фиксирована к коже 1 лигатурой. Трубка соединена со стерильной дренирующей системой - гемаконом. Пластика ТМО - непрерывный шов на ТМО. Дополнительная герметизация шва ТМО при помощи Тахокомб. Послойно швы на рану. Асептическая повязка.

Дренирующая система установлена на фильтрационное давление 100 мм водного столба.

Гистология: Морфологическая картина опухоли соответствует анапластической эпендимоме grade III.

Послеоперационное течение неосложненное: Рана зажила первичным натяжением. Локально послеоперационный рубец на голове без признаков воспаления, состоятельный.

Пациентка выписана 16.06.2017 г. в удовлетворительном состоянии, в клинической картине имеет место умеренный центрального типа гемипарез слева, рекомендовано наблюдение невролога и онколога по месту жительства.

2.7 Методы статистического анализа

2.7.1 Непараметрический коэффициент Манна – Уитни

Расчет непараметрического коэффициента Манна-Уитни проводился с использованием ПО Statistica 10.0. Данный критерий применяется при оценке различий между двумя независимыми выборками по уровню какого-либо признака, измеренного количественно, и подходит для сравнения групп с малыми выборками ($n \geq 3$). В представленной работе анализируемыми группами служили: выборки опухолевой и морфологически неизменной мозговой ткани и группы опухолей разной степени злокачественности. Вероятность достоверности различий выше для меньших областей перекрещивающихся значений.

2.7.2 Построение дерева принятия решений

С помощью алгоритма C&RT (Classification and Regression Tree) было построено дерево решений, использующее данные экспрессии исследуемых микроРНК для определения степени злокачественности. Этот алгоритм строит бинарные деревья решений, где каждый узел дерева при разбиении имеет только двух потомков.

2.7.3 Метод ROC-анализа

ROC-кривая показывает взаимосвязь количества верно классифицированных положительных примеров с количеством классифицированных неверно. ROC-кривая строилась при помощи ПО GraphPadPrism 5. Вводятся два определения: чувствительность и специфичность модели. Они определяют объективную ценность любого классификатора: чувствительность – доля истинно положительных случаев, а

специфичность – доля истинно отрицательных случаев, правильно идентифицированных моделью.

Для идеального классификатора график ROC-кривой проходит через верхний левый угол, где доля истинно положительных случаев составляет 100 % или 1.0 (идеальная чувствительность), а доля ложно положительных примеров равна нулю. Наоборот, чем меньше изгиб кривой и чем ближе она расположена к диагональной прямой, тем менее эффективна модель. Пример ROC-кривой представлен ниже (рисунок 23).

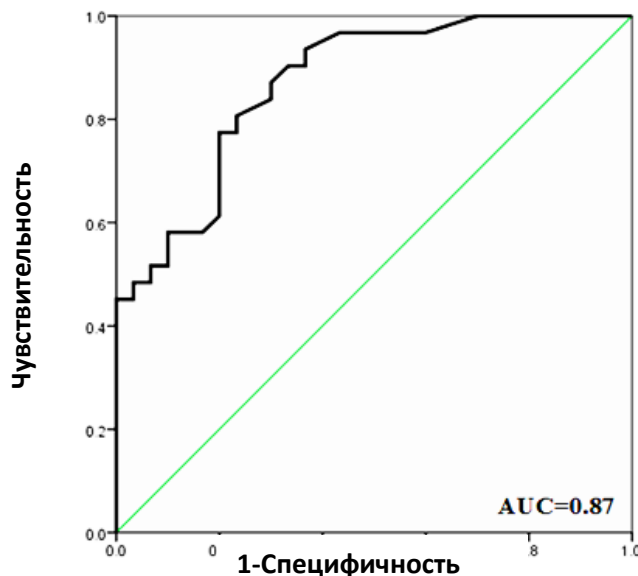


Рисунок 23 – Пример представления ROC-кривой. $AUC = 0.87$, что говорит о высокой статистической значимости исследуемого классификатора

Численное значение площади под кривой называется AUC (Area Under Curve). Чем выше показатель AUC, тем качественнее классификатор. Качество выбранного классификатора оценивается по таблице значений AUC (таблица 8).

Таблица 8 – Шкала оценки качества анализируемого классификатора

Площадь под кривой (AUC)	Качество классификатора
0,8 - 1,0	Отличное
0,7 - 0,8	Хорошее
0,6 - 0,7	Среднее
0,5 - 0,6	Неудовлетворительное

2.7.4 Регрессионный анализа выживаемости пациентов с глиомами головного мозга

Для оценки прогностической значимости изучаемых микроРНК как потенциальных предикторов выживания больных на первом этапе была проведена оценка взаимосвязи выживаемости пациентов и экспрессии исследуемых микроРНК при помощи однофакторного и многофакторного регрессионного анализов Кокса [60]. При помощи ROC-анализа были определены пороговые значения относительных уровней экспрессии значимых микроРНК, после чего для микроРНК, влияющих на выживание, были построены кривые выживаемости Каплана-Мейера.

ГЛАВА 3. АНАЛИЗ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ ИССЛЕДУЕМЫХ СУПРАТЕНТОРИАЛЬНЫХ ГЛИОМ ГОЛОВНОГО МОЗГА

3.1 МикроРНК-маркеры для дифференциальной диагностики глиом головного мозга различных степеней злокачественности

Глиомы принадлежат к гетерогенным опухолям и являются одними из самых распространенных первичных опухолей головного мозга. Они имеют нейроэктодермальное происхождение и характеризуются степенями злокачественности, гистологическими признаками, способностью к инвазии и прогрессированию.

В настоящей главе описан сравнительный анализ молекулярно-генетических характеристик глиом разной степени злокачественности и внешне нормальных тканей головного мозга, выполненный с целью поиска возможности использования микроРНК в качестве маркеров злокачественности патологических тканей.

Нами было выполнено измерение уровней экспрессии 10-и микроРНК (-124, -125b, -16, -181b, -191, -21, -221, -223, -31 и -451) опухолевых тканей и образцов прилежащей морфологически неизменной ткани, забранных интродуционно у 118 больных с супратенториальными глиомами разной степени злокачественности. Измерения были выполнены на амплификаторе CFX96 (Bio-Rad Laboratories, США) методом ОТ-ПЦР в реальном времени.

МикроРНК, выбранные нами для анализа, представляли всё многообразие гистотипов: три из них (микроРНК-21, микроРНК-221, микроРНК-223) являлись онкогенными, одна - микроРНК-451 - онкосупрессорной, некоторые, как, например, микроРНК-31, имели непосредственное отношение к процессу метастазирования, (по эпителиально-мезенхимной трансформации и способности стимулировать или подавлять образование метастазов), либо

различались по степени участия в процессах апоптоза, ангиогенеза и инвазивности.

На первом этапе работы по определению профиля микроРНК мы провели анализ тканей всех глиом разной степени злокачественности - от grade I до grade IV и сопоставили результаты с аналогичными данными, полученными от внешне неизмененных тканей головного мозга, причём пары образцов «нормальная/патологическая ткань» брались у одного и того же пациента с помощью разработанной нами оригинальной методики (таблица 9 и рисунок 24) На диаграммах графически представлены различия уровней экспрессии между образцами опухолевой и морфологически неизменённой ткани головного мозга.

Таблица 9 – Медианные значения уровней экспрессии микроРНК для всех пар образцов глиом различной степени злокачественности и соответствующих образцов прилежащей морфологически неизменной ткани мозга

микроРНК	Опухоль/Норма (n=118 / n=118)		
	Опухоль/Норма	<i>p</i>	<i>AUC</i>
микроРНК-31	0,58	0,105235	0,5719
микроРНК-125b	1,85	0,429326	0,5354
микроРНК-16	1,27	0,178294	0,5607
микроРНК-451	0,64	0,972783	0,5019
микроРНК-191	0,79	0,809246	0,5107
микроРНК-124	0,54	0,044237	0,5912
микроРНК-21	2,51	0,000411	0,659
микроРНК-181b	1,22	0,665813	0,519
микроРНК-221	0,85	0,338156	0,5424
микроРНК-223	2,58	0,013701	0,6083

Примечания: $p < 0.05$ – различия уровней экспрессии микроРНК, оцененные методом Манна-Уитни, статистически значимы - данные различия выделены жирным шрифтом

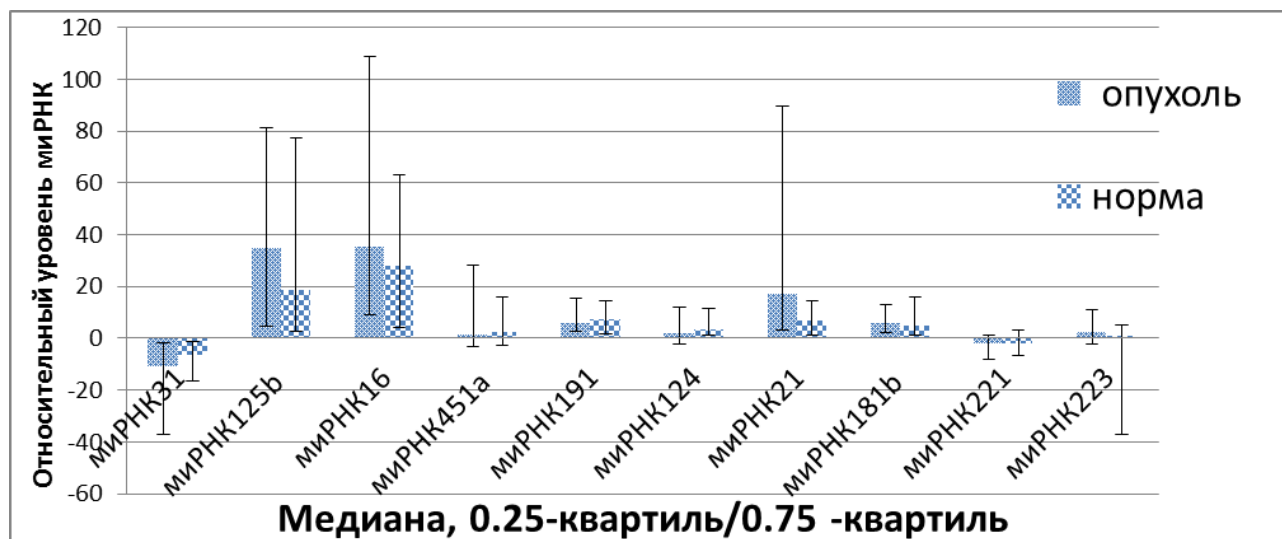


Рисунок 24 – Сравнение относительных значений уровней экспрессии микроРНК в образцах глиом (n=118) и прилежащих морфологически неизменённых тканей мозга (n=118). Указаны медианные значения, 0,25 и 0,75 квантили

Показатели уровней экспрессии выбранных 10-и микроРНК в тканях глиом головного мозга по отношению к прилежащей морфологически неизменной ткани свидетельствовали о разнонаправленных процессах. Увеличение уровня экспрессии отмечено у пяти микроРНК (-125, -16, -21, -181 и -223), снижение - также у пяти микроРНК (-31, -451, -191, -124, -221). При этом статистически достоверные результаты были получены только для трех из них - для микроРНК -124, -21 и -223 ($p < 0.05$) (таблица 9).

Для того чтобы оценить, с какой чувствительностью и специфичностью мы можем различать два состояния, для статистически значимых микроРНК была построена ROC-кривая (рисунок 25). Полученные значения AUC находятся в интервале 0,6 - 0,7, что свидетельствует о значимости данных показателей в понимании различий между опухолью и внешне неизменной тканью головного мозга.

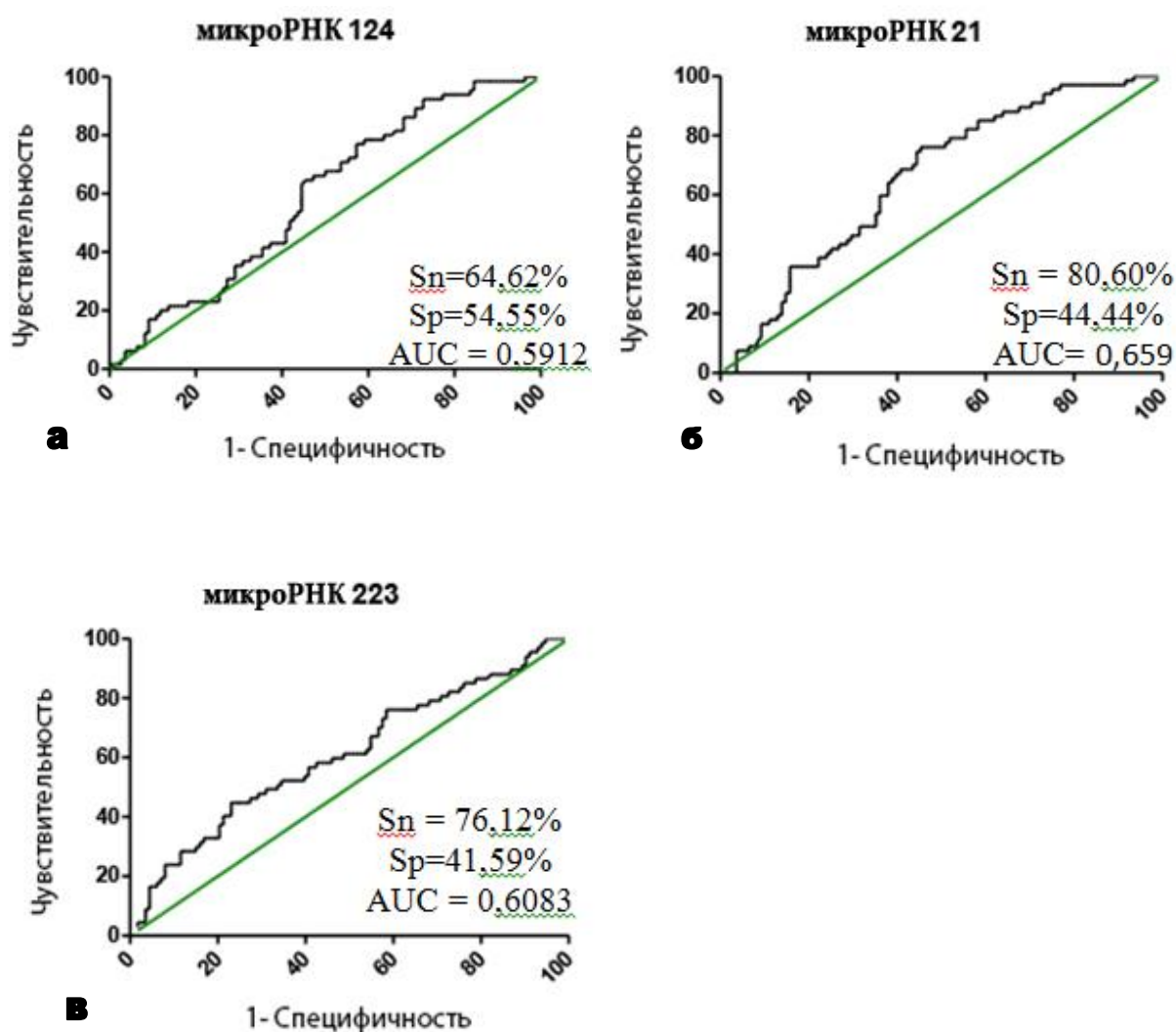


Рисунок – 25 ROC-анализ: а - микроРНК-124, б - микроРНК-21, в - микроРНК-223 (все опухоли/норма)

На рисунке 25 указана наилучшая комбинация чувствительности (S_n) и специфичности (S_p).

В дальнейшем был выполнен детальный анализ уровней экспрессии 10-и микроРНК в зависимости от степени злокачественности глиом и сравнение их показателями внешне неизмененных тканей головного мозга. Результаты профилирования уровней экспрессии 10-и исследуемых микроРНК в тканях глиом разной степени злокачественности представлены в таблице 10, где каждый, подтип характеризуется своим специфическим профилем экспрессии у пациентов с глиомами grade II – IV.

Таблица 10 – Сравнение медианных значений уровней экспрессии микроРНК между образцами опухолевой и прилежащей морфологически неизменной ткани

микроРНК	grade II (n=17)			grade III (n=35)			grade IV (n=65)		
	grade /норма	<i>P</i>	<i>AUC</i>	grade /норма	<i>P</i>	<i>AUC</i>	grade /норма	<i>P</i>	<i>AUC</i>
микроРНК – 31	1,35	0,821	0,51	0,38	0,023	0,67	0,46	0,319	0,56
микроРНК – 125b	0,99	0,597	0,55	0,63	0,266	0,58	3,78	0,052	0,63
микроРНК – 16	1,54	0,722	0,54	0,73	0,717	0,52	1,43	0,170	0,59
миРНК – 451	0,70	0,843	0,51	1,10	0,589	0,54	0,20	0,307	0,57
миРНК – 191	0,64	0,734	0,53	0,63	0,440	0,55	1,02	0,712	0,52
миРНК – 124	0,88	0,968	0,50	0,55	0,214	0,59	0,24	0,028	0,64
миРНК – 21	0,67	0,782	0,52	1,73	0,244	0,58	5,58	0,000	0,73
миРНК - 181b	1,56	0,969	0,51	0,85	0,615	0,53	1,64	0,487	0,54
миРНК – 221	0,72	0,597	0,55	0,25	0,035	0,65	1,87	0,787	0,51

Примечание: $p < 0.05$ – различия уровней экспрессии микроРНК, оцененные методом Манна-Уитни, статистически значимы – данные различия выделены жирным шрифтом.

Астроцитома первой степени злокачественности (grade I, n=1) относится к медленно растущим доброкачественным опухолям, образующимся из астроцитов. В связи с тем, что данный гистологический тип встретился у 1 больного в виде пилоцитарной астроцитомы, анализ полученных показателей в сравнении с нормальными тканями головного мозга и глиомами различной степени злокачественности не проводился.

При сравнении показателей экспрессии 10-и микроРНК у астроцитом grade II (n=17) с прилежащей морфологически неизменной тканью головного мозга было установлено, что наряду с увеличением уровней экспрессии для четырех микроРНК (-31, -16, -181b, -223), у шести микроРНК (-124, -125b, -191,

-21, -221, и -451) отмечено их снижение, однако статистически значимых различий ни по одной из исследуемых микроРНК не было выявлено (таблица 10 и рисунок 26).

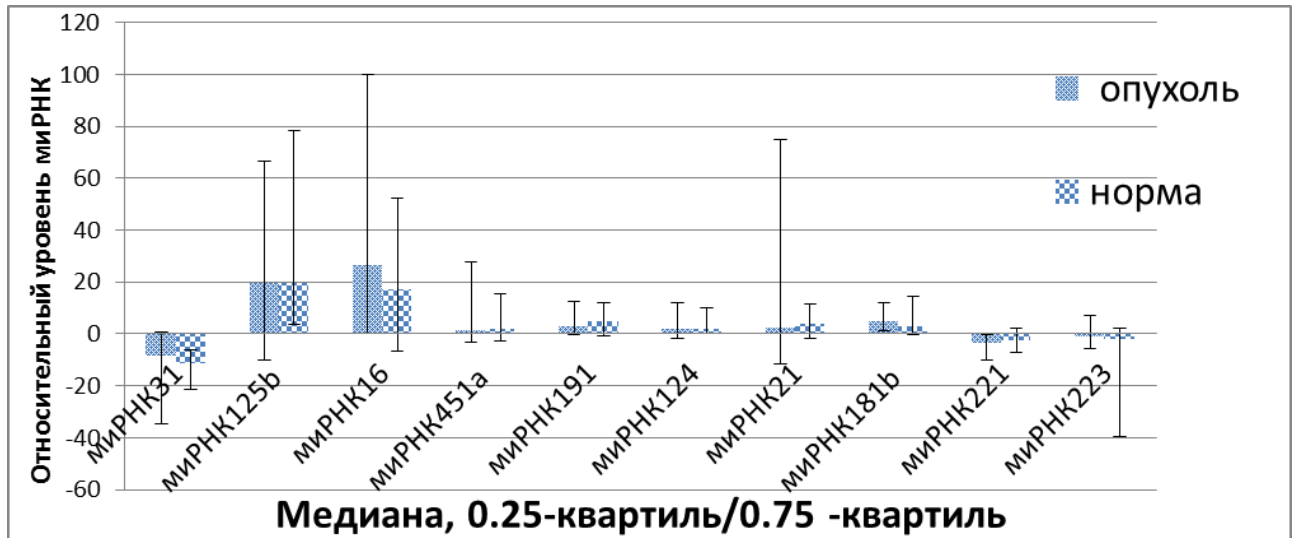


Рисунок 26 – Сравнение относительных значений уровней экспрессии микроРНК в образцах глиом grade II (n=17) и прилежащих морфологически неизменённых тканей мозга (n=17). На диаграмме указаны медианные значения, 0,25 и 0,75 квантили

В группе супратенториальных глиом третьей степени анаплазии (grade III), состоящей из 35 больных, отмечено снижение уровня экспрессии в опухоли по отношению к прилежащей морфологически неизменной ткани у большинства исследуемых микроРНК (-124, -125b, -16, -181b, -191, -221, -223 и -31), а для микроРНК -21 и -451, напротив, имело место увеличение этих показателей. При этом снижения уровней экспрессии для микроРНК -31 и -221 были статистически значимые ($p < 0.05$), (таблица 10 и рисунок 27).

Из ROC-кривой для микроРНК -31 и -221 видно, что значения AUC находятся в интервале (0,6 - 0,7), что свидетельствует о значимости данных показателей в понимании различий между опухолью и внешне неизменной тканью головного мозга (рисунок 28).

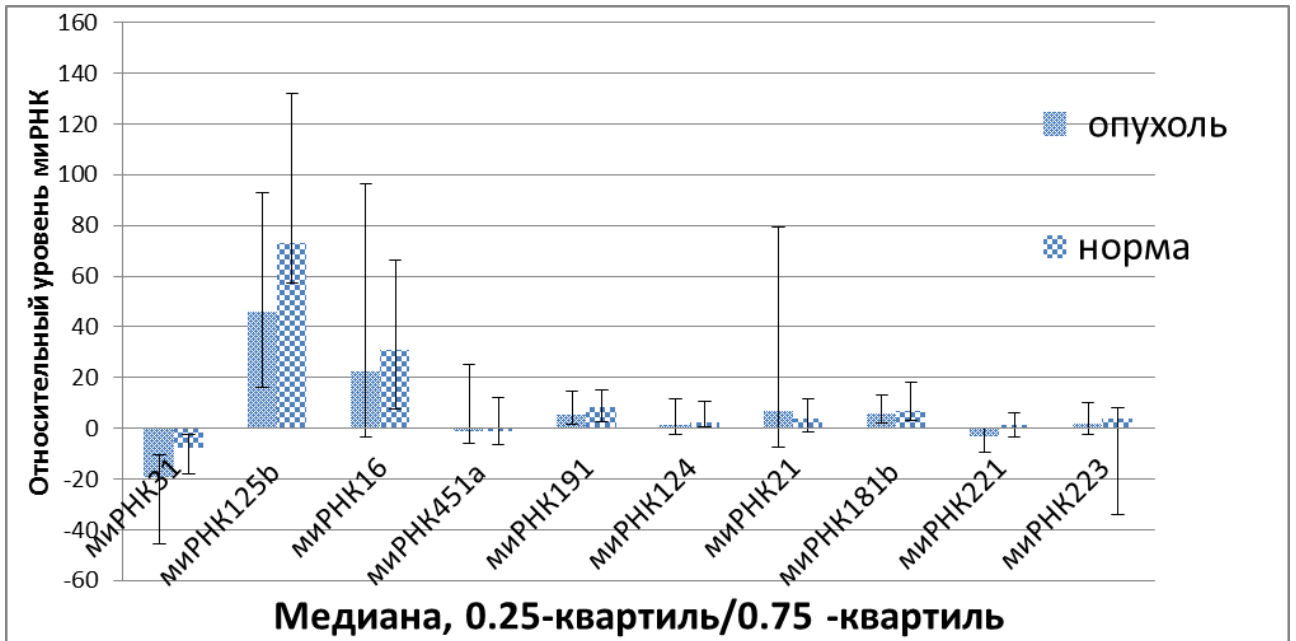


Рисунок 27 – Сравнение относительных значений уровней экспрессии микроРНК в образцах глиом grade III (n=35) и прилежащих морфологически неизменённых тканей мозга (n=35). На диаграмме указаны медианные значения, 0,25 и 0,75 квантили

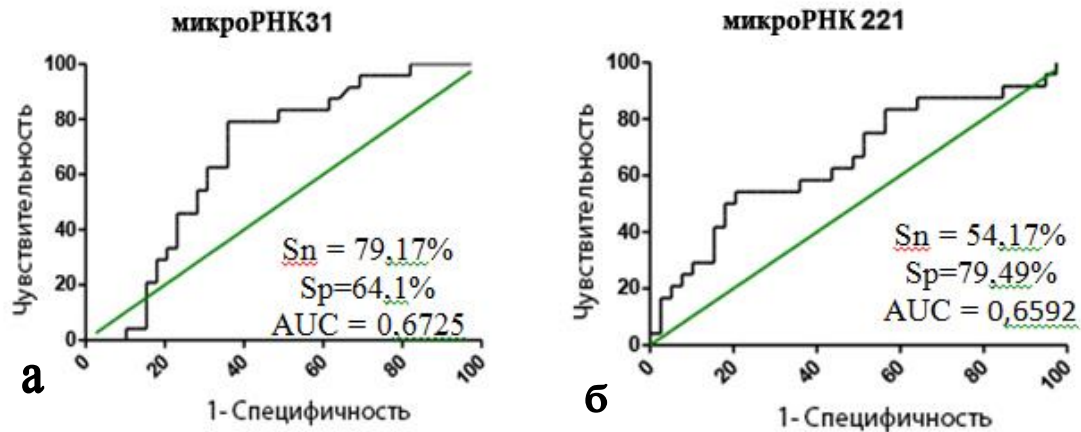


Рисунок 28 – ROC-анализ: а - микроРНК-31, б - микроРНК-221 (grade III/норма)

На рисунке 28 указана наилучшая комбинация чувствительности (S_n) и специфичности (S_p).

При анализе самой многочисленной группы новообразований - глиобластомы (grade IV), (n=65), нами было отмечено статистически значимое увеличение уровней экспрессии для микроРНК -21, -223 ($p<0.05$) в опухолевой ткани по отношению к морфологически нормальному мозгу. Уровни экспрессии микроРНК-21 в опухоли превышали более чем в 5 раз, а микроРНК -223 в 70 раз по сравнению с нормальным мозгом. Так же было отмечено достоверное снижение уровня экспрессии для микроРНК -124 ($p<0.05$) в тканях глиобластом по отношению с условной нормой (таблица 10 и рисунок 29).

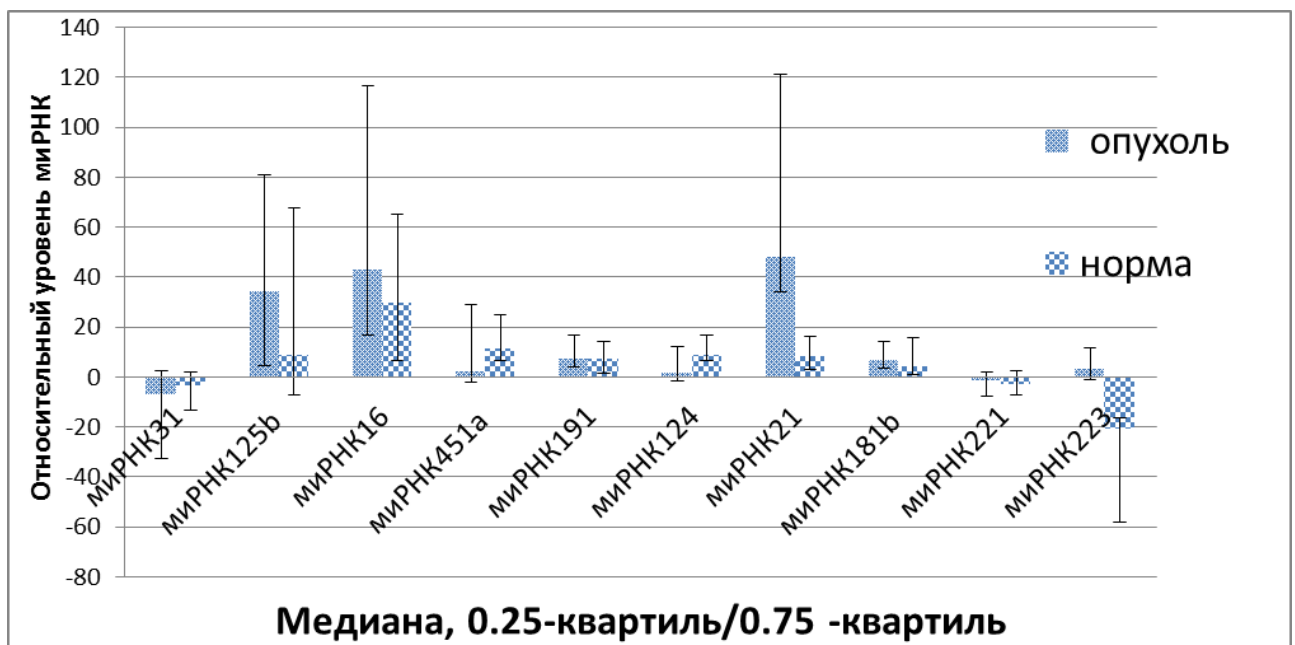


Рисунок 29 – Сравнение относительных значений уровней экспрессии микроРНК в образцах глиом grade IV (n=65) и прилежащих морфологически неизменённых тканей мозга (n=65). На диаграмме указаны медианные значения, 0,25 и 0,75 квантили

Для оценки был выполнен ROC-анализ, который позволил установить, что значения AUC для микроРНК-124, микроРНК-21 и микроРНК-223 находятся в интервале 0,6 - 0,8, что говорит о хорошей значимости данных показателей в понимании различий между опухолью grade IV и прилежащей морфологически неизменной тканью (рисунок 30).

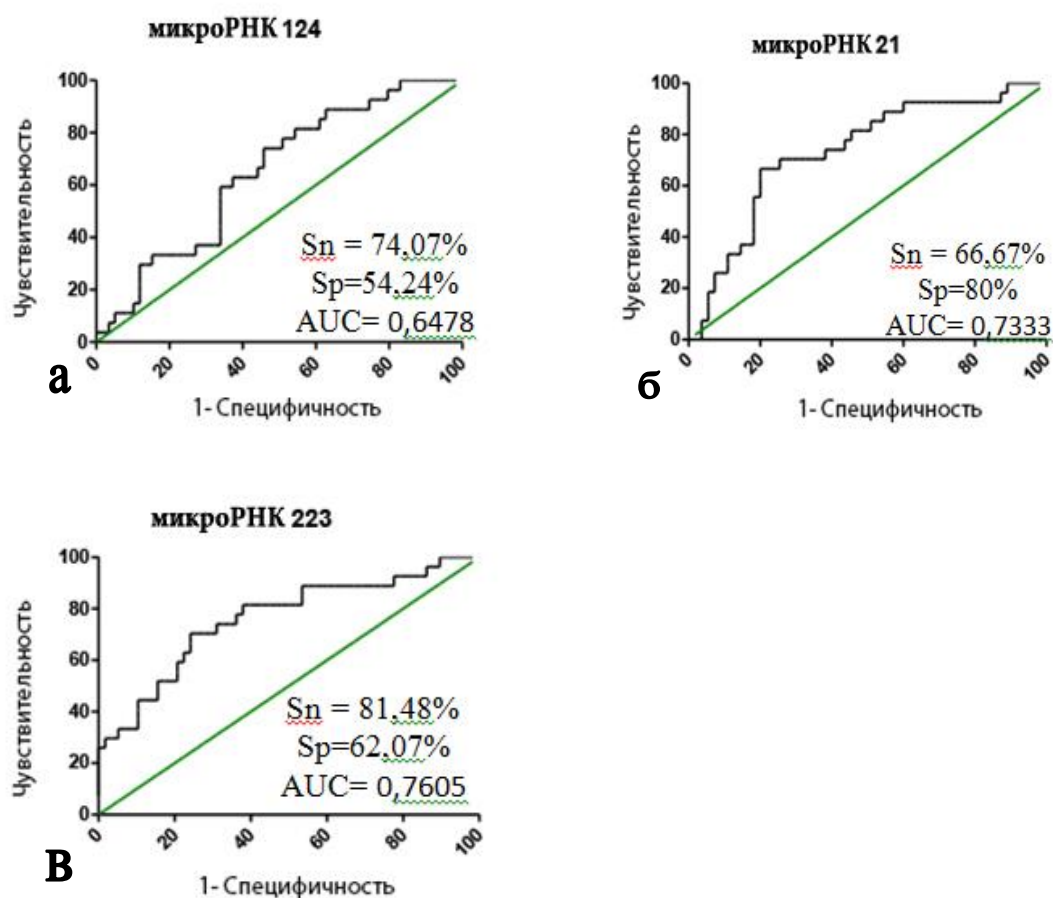


Рисунок 30 – ROC-анализ: а - микроРНК-124, б - микроРНК-21, в - микроРНК-223 (grade IV/норма)

На рисунке 30 указана наилучшая комбинация чувствительности (Sn) и специфичности (Sp).

Следующим шагом в изучении различий в профиле микроРНК явилось проведение сравнений уровней экспрессии 10-и микроРНК (-124, -125b, -16, -181b, -191, -21, -221, -223, -31 и -451) в тканях глиом с разными степенями злокачественности. Анализ проведен между глиомами grade II и grade III, grade II и grade IV, grade III и grade IV.

При сравнении показателей между глиомами grade II и grade III статистически значимых различий в уровнях экспрессии исследуемых микроРНК получено не было. Но в тканях глиом grade III по отношению к опухолям grade II отмечено повышение уровней экспрессии микроРНК-125b, -

16, -181b, -191, -21, -221, -223, наряду со снижением показателей микроРНК - 31, -16, -124 и -451, (таблица 11 и рисунок 31).

Таблица 11 – Данные медианных значений уровней экспрессии микроРНК между образцами опухолевой ткани глиом grade II - IV степеней злокачественности

микроРНК	grade II/ grade III			grade II/ grade IV			grade III/ grade IV		
	grade II / grade III	<i>P</i>	<i>AUC</i>	grade II / grade IV	<i>P</i>	<i>AUC</i>	grade III / grade IV	<i>P</i>	<i>AUC</i>
Микро-РНК- 31	0,42	0,487	0,5195	2,95	0,505	0,6725	1,25	0,063	0,5669
Микро-РНК-125b	2,34	0,933	0,5586	0,74	0,841	0,5844	1,73	0,668	0,6309
Микро-РНК- 16	0,86	0,882	0,5417	1,90	0,178	0,528	1,62	0,128	0,5939
Микро-РНК-451	0,57	0,430	0,5167	2,67	0,647	0,5417	1,52	0,079	0,5707
Микро-РНК-191	1,59	0,690	0,5352	1,43	0,257	0,5588	2,28	0,077	0,5248
Микро-РНК-124	0,73	0,501	0,5083	1,47	0,787	0,5985	1,07	0,212	0,6478
Микро-РНК-21	2,70	0,264	0,5292	6,94	0,000	0,5883	18,75	0,000	0,7333
Микро-РНК-181b	1,17	0,262	0,5117	1,24	0,125	0,5385	1,44	0,716	0,5466
Микро-РНК-221	1,09	0,860	0,5508	2,37	0,164	0,6592	2,58	0,019	0,5185
Микро-РНК-223	2,15	0,126	0,543	1,72	0,126	0,5497	3,69	0,909	0,7605

Примечание: $p < 0,05$ – различия уровней экспрессии микроРНК, оцененные методом Манна-Уитни, статистически значимы. Значимые различия выделены жирным шрифтом

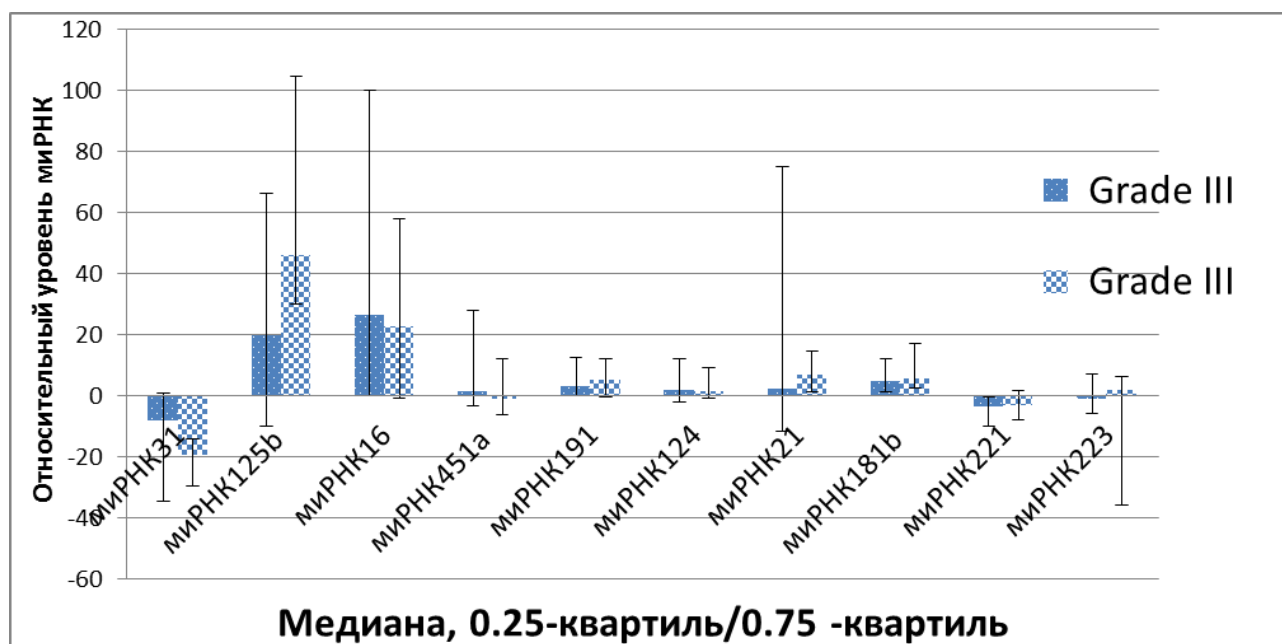


Рисунок 31 – Сравнение относительных значений уровней экспрессии микроРНК в образцах глиом grade II и образцах глиом grade III. На диаграмме указаны медианные значения, 0,25 и 0,75 квантили

Исследованиями по определению уровня экспрессии между глиомами grade IV и grade II показано, что из 10-и исследуемых микроРНК только для микроРНК-125b было отмечено снижение этих показателей. У остальных 9-и микроРНК (-124, -16, -181b, -191, -21, -221, -223, -31 и -451) они были повышены, а для микроРНК-21 статистически значимо в 7 раз в опухолях grade IV, по отношению к grade II (таблица 11 и рисунок 32).

При построении ROC-кривой для микроРНК-21 значения AUC находятся в интервале 0,8 - 0,9, что говорит об отличной значимости данных критериев в понимании различий между опухолями разной степени злокачественности (рисунок 33).

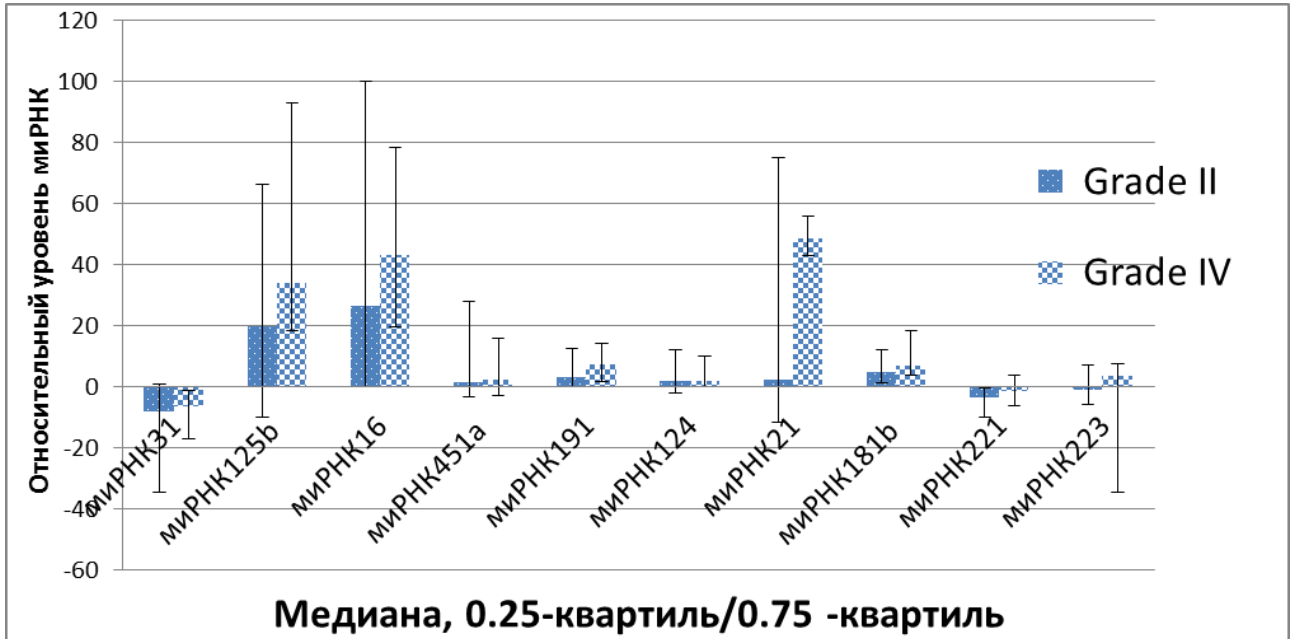


Рисунок 32 – Сравнение относительных значений уровней экспрессии микроРНК в образцах глиом grade II и образцах глиом grade IV. На диаграмме указаны медианные значения, 0,25 и 0,75 квантили

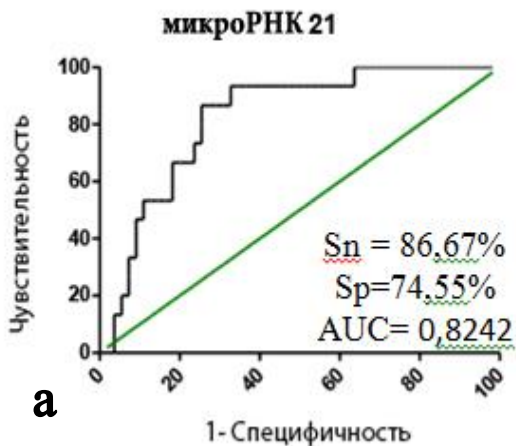


Рисунок 33 – ROC-анализ: а - микроРНК-21 (grade II/grade IV)

На рисунке 33 указана наилучшая комбинация чувствительности (S_n) и специфичности (S_p).

Сравнение уровней экспрессии между глиомами grade III и grade IV установило повышение экспрессии по всем 10-и микроРНК. Статистически достоверные различия наблюдались только для микроРНК-21 и -221, их

уровень экспрессии в тканях глиобластом был повышен в 2,5 раза по сравнению с новообразованиями grade III (таблица 11 и рисунок 34).

ROC-анализ для статистически значимых микроРНК-21 и -221 представлен на рисунке 35.

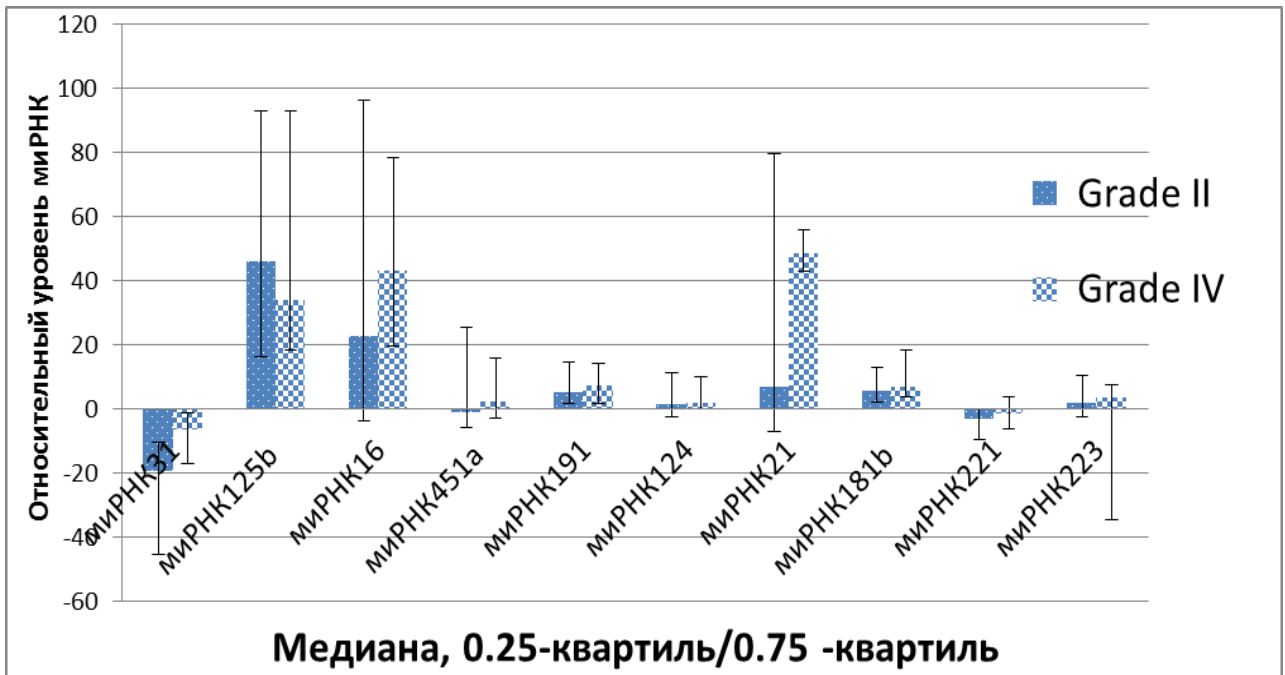


Рисунок 34 – Сравнение относительных значений уровней экспрессии микроРНК в образцах глиом grade III и образцах глиом grade IV. На диаграмме указаны медианные значения, 0,25 и 0,75 квантили

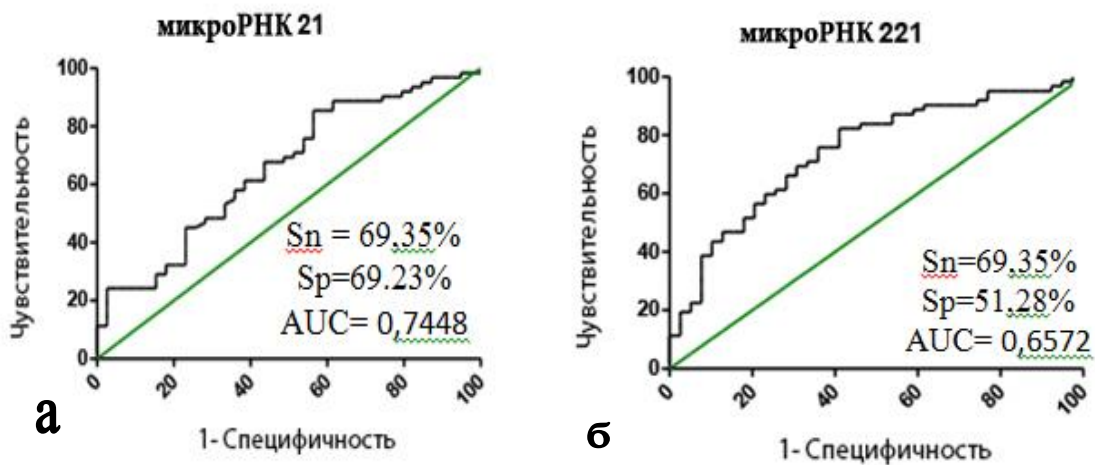


Рисунок 35 – ROC-анализ а -микроРНК-21, б - микроРНК-221 (grade III/grade IV)

На рисунке 35 указаны наилучшая комбинация чувствительности (Sn) и специфичности (Sp).

Поскольку использование отдельных микроРНК для определения степени злокачественности образца не позволило устанавливать ее с достаточной точностью, мы решили проверить, увеличивается ли точность анализа при использовании данных экспрессии сразу 10 -и микроРНК. Для этого с помощью алгоритма C&RT было построено дерево принятия решений. В конечно счете в дерево решений вошли микроРНК-21, -221, -223, -125b, -191, -124. Для опухолей grade II диагностические характеристики составляли: специфичность 90 %, чувствительность 76,5 %, общая точность 87,8 %, AUC 83,2. Для grade III диагностические характеристики составляли: специфичность 93,4 %, чувствительность 74,2 %, общая точность 87,8 %, AUC 83,8. Для grade IV диагностические характеристики составляли: специфичность 89,6 %, чувствительность 88,1 %, общая точность 87,8 %, AUC 88,8.

3.2 Способ дифференциальной диагностики глиом головного мозга человека

На основании выявленной специфичности профилей экспрессии микроРНК, характерных для глиом разной степени злокачественности головного мозга человека нами разработан оригинальный «Способ дифференциальной диагностики глиом головного мозга человека», на который получен патент Российской Федерации № 2583871.

При проведении сравнительного анализа уровней экспрессии 10-и онкогенных и онкосупрессорных микроРНК в разных типах глиом человека, различающихся степенью злокачественности, были определены характерные для каждого вида новообразования специфические изменения экспрессии микроРНК. По изменению уровней экспрессии для каждой микроРНК были подсчитаны слагаемые (таблица 12), суммирование которых позволило определить значение комплексного критерия (K), что отражено в

классификаторе (таблица 13). Комплексный критерий заключается в том, что для каждого типа глиальных опухолей по 10-и диагностируемым микроРНК экспериментально установлено специфическое изменение экспрессии этих микроРНК, которое характеризует именно конкретный тип глиальной опухоли головного мозга. При этом каждый тип глиальной опухоли характеризуется специфическим профилем из 10-и микроРНК, что соответствует определенному значению критерия К.

Таблица 12 – Таблица слагаемых

МикроРНК	Оценка уровней экспрессии	Слагаемое
микроРНК-124	Уровень экспрессии меньше -3	-1
микроРНК-125b	Уровень экспрессии больше 74	+1
микроРНК-16	Уровень экспрессии лежит в пределах 35 - 45	-1
	Уровень экспрессии больше 45	+1
микроРНК-181b	Уровень экспрессии больше 19	+1
микроРНК-191	Уровень экспрессии больше 11	+1
микроРНК-21	Уровень экспрессии лежит в пределах 5 - 24	+5
	Уровень экспрессии больше 24	+10
микроРНК-221	Уровень экспрессии меньше -23	-3
	Уровень экспрессии больше 1,5	+1
микроРНК-223	Уровень экспрессии меньше 0	-5
	Уровень экспрессии лежит в пределах 5 - 9	-1
	Уровень экспрессии больше 9	+1
микроРНК-31	Уровень экспрессии меньше -80	-3
	Уровень экспрессии лежит в пределах от -40 до -80	-2
микроРНК-451	Уровень экспрессии меньше -7	-2
	Уровень экспрессии больше 2	+1

Таблица 13 – Классификатор

Значение критерия (К)	Тип глиальной опухоли головного мозга	grade
≥ 1	Глиобластома	IV
от -3 до 0	Диффузная астроцитома	II
≤ -4	Анапластическая астроцитома	III

Заключение о типе глиальной опухоли у пациента составляют на основании комплексного критерия (К), рассчитанного из значений уровней экспрессии микроРНК в глиальных опухолях разной степени злокачественности, характеризующихся специфическим профилем экспрессии микроРНК, и при значении К, равного или больше 1, делают заключение о наличии глиобластомы, при значении К, лежащего в интервале от 0 до -3, делают заключение о наличии диффузной астроцитомы, а при значении К, равного или ниже -4, делают заключение о наличии анапластической астроцитомы.

Клинический пример №1

Пациент № 110 (мужчина, 52 года), на фоне полного здоровья заболел 2 февраля 2014 года, когда появился первый приступ с потерей сознания и судорожным синдромом. МРТ головного мозга с контрастным усилением выявила картину кистозно-солидного образования правой лобной доли. Проведена костно-пластическая трепанация черепа в правой лобно-теменной области, микрохирургическое удаление внутримозговой кистозно-солидной опухоли под нейронавигационным контролем. Гистологическое заключение: диффузная астроцитома, grade II.

Результаты, полученные при измерении уровней экспрессии микроРНК пациента № 110, представленные в таблице 14. показали, что значение К равно 12 (сумма слагаемых), поэтому в соответствии с классификатором (таблица 13) можно сделать заключение о наличии у пациента глиобластомы.

После уточнения диагноза заявляемым способом, а именно выявления более злокачественной опухоли – глиобластомы, для пациента проведена индивидуальная дополнительная коррекция дальнейшего лечения.

Таблица 14 – Оценка уровней экспрессии микроРНК пациента № 110

	Уровень экспрессии (разы)	Слагаемые
микроРНК-124	13	0
микроРНК-125b	302,33	1
микроРНК-16	184,82	1
микроРНК-181b	31,56	1
микроРНК-191	39,39	1
микроРНК-21	15,03	5
микроРНК-221	10,05	1
микроРНК-223	19,83	1
микроРНК-31	-1,06	0
микроРНК-451	5,77	1
Критерий (K)		12

Клинический пример №2.

Пациент № 93 (мужчина, 55 лет), в 2011 году поставлен диагноз: внутримозговое объемное образование лобных долей головного мозга с распространением на валик мозолистого тела и передние рога боковых желудочков. В 2012 году для определения типа опухоли проведена пункционная стереотаксическая биопсия внутримозгового образования под навигационным контролем.

Гистологическое заключение: диффузная астроцитоза (grade II), нельзя исключить анапластическую астроцитозу (grade III). Результаты, полученные при измерении уровней экспрессии микроРНК образца пациента № 93, представлены в таблице 15. Из таблицы видно, что изменение уровней экспрессии микроРНК пациента № 93 соответствует значению K, равному 8 (сумма слагаемых), поэтому в соответствии с классификатором (таблица 13)

можно сделать заключение о наличии у пациента анапластической астроцитомы (grade III).

Таблица 15 – Оценка уровней экспрессии микроРНК пациента № 93

	Уровень экспрессии (разы)	Слагаемые
микроРНК-124	4,75	0
микроРНК-125b	8,81	0
микроРНК-16	6,68	0
микроРНК-181b	6,63	0
микроРНК-191	1,35	0
микроРНК-21	1,86	0
микроРНК-221	-170,07	-3
микроРНК-223	-2,01	-5
микроРНК-31	-15,4	0
микроРНК-451	-2,11	0
Критерий (К)		-8

Клинический пример №3

Пациент № 88 (мужчина, 52 года), в 2012 году поставлен диагноз: анапластическая астроцитома головного мозга (grade III) левой лобно-височной локализации с элементами моторной афазии, правосторонний гемипарез. В 2012 году проведена пункционная стереотаксическая биопсия объемного образования головного мозга лобно-височной локализации с применением нейронавигации. Гистологическое заключение: анапластическая астроцитома (grade III). Взятые во время биопсии образцы ткани опухоли были исследованы заявляемым способом аналогично примеру 1. Представленные в таблице 16, результаты, полученные при измерении уровней экспрессии микроРНК у пациента № 88 показали, что значение К равно 13 (сумма слагаемых), поэтому в соответствии с классификатором (таблица 13) можно сделать заключение о наличии у пациента глиобластомы (grade IV).

Таблица 16 – Оценка уровней экспрессии микроРНК пациента № 88

	Уровень экспрессии (разы)	Слагаемые
микроРНК-124	7,01	0
микроРНК-125b	48,84	0
микроРНК-16	100,42	1
микроРНК-181b	12,46	0
микроРНК-191	9,38	0
микроРНК-21	27,28	10
микроРНК-221	-1,39	0
микроРНК-223	17,75	1
микроРНК-31	-18,13	0
микроРНК-451	6,02	1
Критерий (К)		13

Клинический пример №4.

Пациент № 45 (женщина, 64 года), в 2012 году выявлено объемное кистозно-солидное образование в левой теменной области, сенсорно-моторная афазия. В 2013 году проведена костно-пластическая трепанация черепа в левой теменной области, удалена внутримозговая опухоль с использованием микрохирургической техники под нейронавигационным контролем. Гистологическое заключение: глиобластома (grade IV).

Взятые во время операции 2 образца ткани из разных отделов опухоли были исследованы заявляемым способом, аналогично примеру 1. Результаты, полученные при измерении уровней экспрессии микроРНК пациента № 45, представленные в таблице 17, показали, что в первом образце значение К равно 3, что согласно классификатору (таблица 13) соответствует глиобластоме. Во втором образце значение К равно 8, что также соответствует глиобластоме.

Таблица 17 – Оценка уровней экспрессии микроРНК пациента № 45

	Уровень экспрессии (разы)	Слагаемые	Уровень экспрессии (разы)	Слагаемые
микроРНК-124	1,34	0	2,25	0
микроРНК-125b	-5,9	0	-2,64	0
микроРНК-16	5,2	0	11,08	0
микроРНК-181b	2,17	0	1,29	0
микроРНК-191	2,58	0	2,34	0
микроРНК-21	17,51	5	27,86	10
микроРНК-221	-7,41	0	-6,02	0
микроРНК-223	1,59	0	22,63	1
микроРНК-31	-6,45	0	-245,57	-3
микроРНК-451	-18,25	-2	-1,01	0
Критерий (К)		3		8

3.3 Платформа NanoString в поиске новых микроРНК-маркеров для дифференциальной диагностики глиом головного мозга

Для поиска микроРНК-кандидатов, которые можно было бы использовать для дифференцировки глиом в зависимости от степени их злокачественности, мы использовали высокопропускную платформу NanoString, которая позволяет одновременно оценить экспрессию 800 микроРНК в 12-и образцах [105]. Для анализа были взяты 6 парных образцов объемом 1 мм³ каждый (ткань глиомы и ткань внешне неизмененного головного мозга на расстоянии не менее 2 см от опухоли в функционально незначимой зоне). В соответствии с классификацией ВОЗ от 2007 г. [124]. 1 образец глиомы отнесли к grade I, по 2 образца - соответственно, к grade II, grade III и 1 - к grade IV.

Для 261 микроРНК была показана достоверная экспрессия (выше, чем в отрицательных контролях) в тех или иных пробах. Мы отобрали 68 микроРНК, для которых отношение в паре опухоль/норма по модулю было больше пяти. Из них мы убрали низко представленные, с количеством копий в образце меньше 50, и те, которые уже были описаны нами раньше – микроРНК-124, -181b, -21, -

221 и -451a. В конечном счете, на рассмотрение осталось 9: микроРНК: -143, -144, -7, -128, -182, -183, -99a, -204 и -199b.

Поскольку с практической точки зрения использовать прилежащую к опухоли неизмененную ткань проблематично, дальнейшие сравнения проводились на нормированное количество микроРНК в опухолевой ткани. Данные приведены в таблице 18.

Таблица 18 – Нормированное количество копий, отобранных нами микроРНК в глиомах головного мозга

микроРНК	Первый образец глиомы grade I	Первый образец глиомы grade II	Второй образец глиомы grade II	Первый образец глиомы grade III	Второй образец глиомы grade III	Первый образец глиомы grade IV
143	1,4	124,3	3,4	156,4	314,4	771,3
144	154,5	210,9	160,0	2119,6	97,6	296,1
7	37,9	75,3	85,1	88,6	223,7	158,1
128	148,9	1054,0	684,4	370,0	773,6	719,4
182	25,3	203,1	602,7	80,8	65,4	8,4
183	36,5	144,2	262,2	51,2	54,7	7,5
99a	21403,4	11492,4	12264,3	3727,5	10792,7	2349,1
204	17042,4	274,2	57,9	514,2	498,9	2656,1
199b	39,3	17,0	34,0	22,6	12,3	140,5

Как следует из таблицы 18, существуют тенденции в изменении уровней микроРНК между различными степенями злокачественности опухолей, но есть и отдельные выпадения. На тех же образцах для сравнения результатов была поставлена ОТ-ПЦР на выбранные микроРНК. Напрямую сравнивать NanoString и ПЦР нельзя – в первом случае мы получаем количество копий в образце, во втором случае – количество, относительно нормализатора (U58). Однако сравнению подлежит соотношение количества микроРНК между разными степенями злокачественности (рисунок 36).

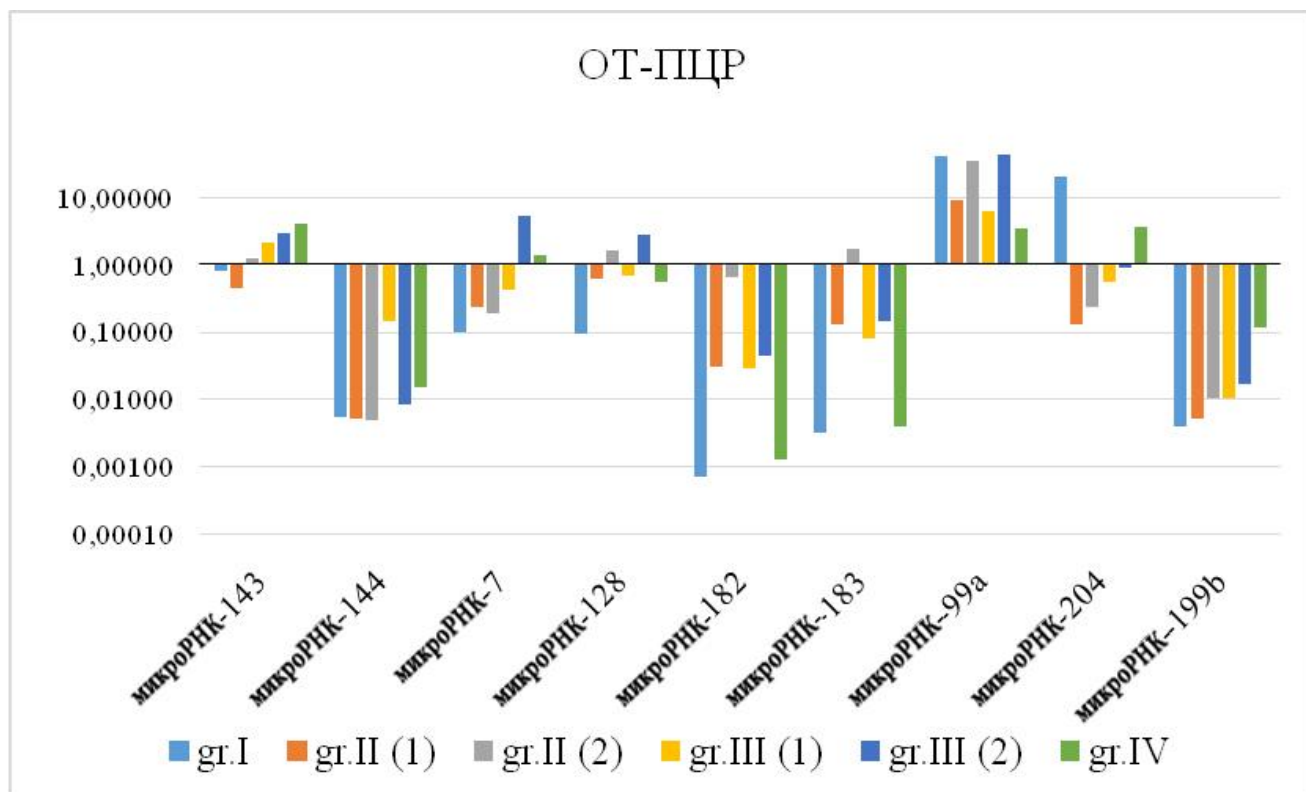


Рисунок 36 – Соотношение выбранных микроРНК между глиомами различной степени злокачественности, полученное с помощью Nanostring и ОТ-ПЦР. Логарифмическая шкала

Хотя результаты NanoString и ОТ-ПЦР совпали не полностью, соотношения между различными степенями злокачественности для разных микроРНК оказались похожи, кроме микроРНК-99а, для которой такого совпадения не было. По этой причине мы исключили микроРНК-99а из анализа, равно, как и микроРНК-204, поскольку и по данным NanoString и ОТ-ПЦР ее экспрессия менялась парадоксальным образом – была повышена в образцах grade I и IV и снижена в образцах grade II и III, т.е. повышена в глиомах наименьшей и наибольшей степени злокачественности и снижена в промежуточных степенях.

Для валидации полученных результатов была привлечена расширенная выборка глиом: grade II – 12, grade III – 14 и grade IV – 11 образцов; дополнительные опухоли первой степени злокачественности в выборке отсутствовали. На рисунке 37 представлены определённые методом ОТ-ПЦР

относительные уровни экспрессии микроРНК всей выборки и соответствующие медианные значения.

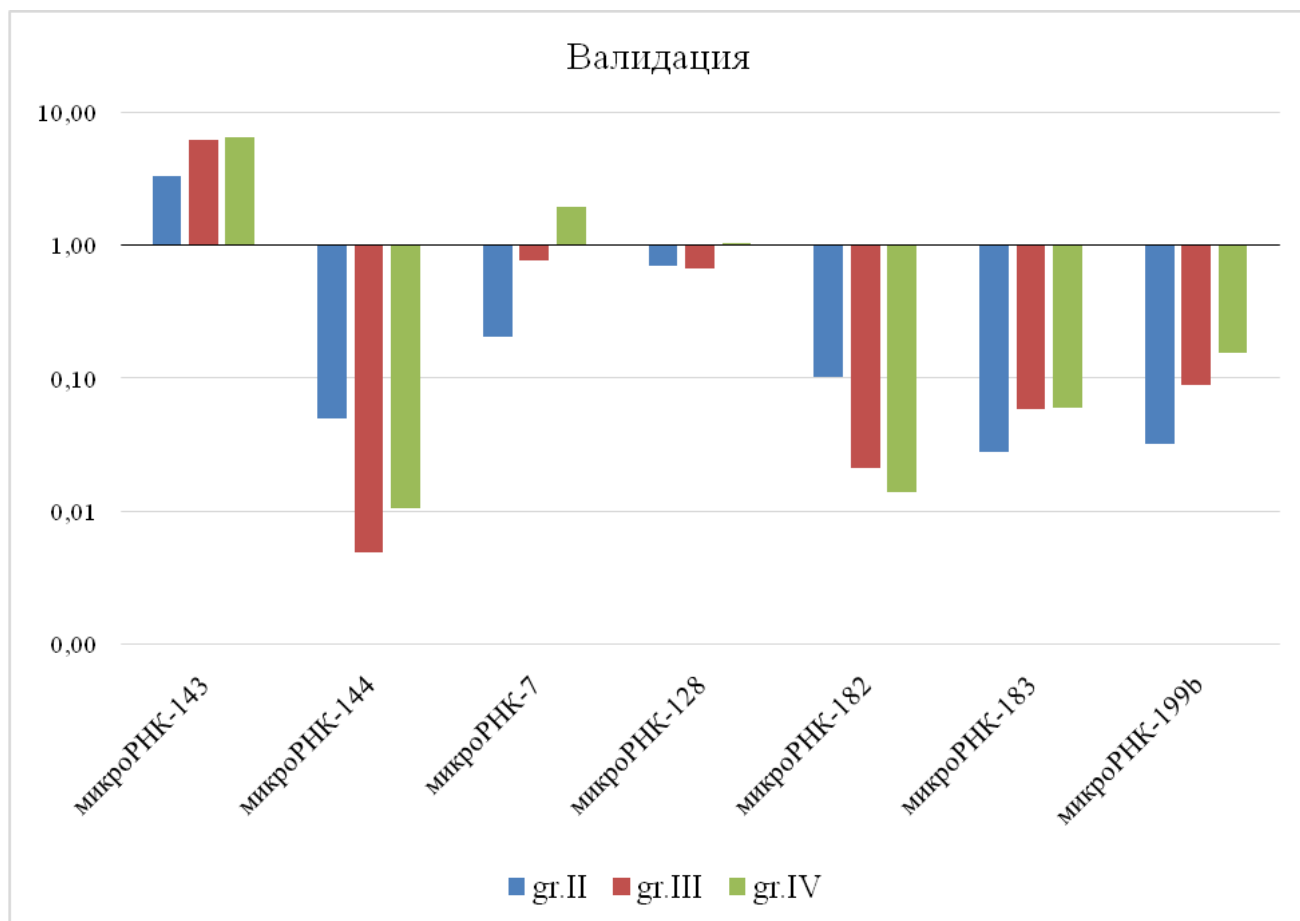


Рисунок 37 – Относительные уровни экспрессии микроРНК в образцах, принадлежащих к разным степеням злокачественности глиом. Представлены медианные значения, логарифмическая шкала

Сравнение этих данных с показателями, полученными на отдельных образцах как с помощью ОТ-ПЦР, так и NanoString, позволяет говорить о том, что результаты по микроРНК-143 имеют схожую тенденцию, по микроРНК-144, -128 и -183 – совпали плохо, по микроРНК-7, -182 и -199b – совпали хорошо.

Таким образом, видно, что результаты, полученные на группе образцов и на отдельных образцах, совпали только примерно для половины микроРНК. Это является одной из главных проблем использования высокопропускных

методов для поиска новых маркеров, поскольку их можно применить только для небольшого количества образцов (в силу высокой цены и сложности), и полученные данные не всегда подтверждаются на расширенных выборках.

Чтобы определить, насколько значимыми являются различия в экспрессии отобранных нами микроРНК между разными степенями злокачественности глиом, мы использовали критерий Манна-Уитни (таблица 19).

Таблица 19 – Значимость различий в экспрессии микроРНК между образцами глиом различной степени злокачественности

микроРНК	Уровень значимости (P)		
	grade II/ grade III	grade II/ grade IV	grade III/ grade IV
143	0,109008	0,094167	0,598091
144	0,037798	0,012764	0,594033
7	0,059664	0,045456	0,921212
128	0,934973	0,558760	0,324663
182	0,049142	0,029490	0,531046
183	0,431033	0,531668	0,918456
199b	0,007699	0,000252	0,340779

Примечание. Различия статистически значимы при $p < 0,05$. Жирным шрифтом выделены значимые различия

Результаты, приведенные в таблице 19, свидетельствуют, что разница в экспрессии микроРНК между образцами глиом, относящимся к степеням злокачественности II и III статистически значима для микроРНК-144, -182 и -199b. Для глиом степеней злокачественности II и IV статистически значима разница в экспрессии микроРНК-144, -7, -182 и -199b. Для глиом III и IV степеней злокачественности статистически значимой разницы в экспрессии каких-либо микроРНК обнаружено не было.

Экспрессия микроРНК всегда изменяется в опухолях по сравнению со здоровыми тканями, а также отличается между разными типами опухолей и на разных стадиях развития опухоли. Поскольку микроРНК в биологических тканях высокостабильны, это делает их перспективными диагностическими маркерами. Однако у человека известно уже более 1800 микроРНК, и чтобы определить, какие из них могут оказаться полезными в том или ином приложении, требуется использовать высокопропускные методы, такие как массовое параллельное секвенирование или системы, позволяющие проводить мультиплексное измерение транскрипционной активности сотен генов или микроРНК, таких как NanoString.

Использование последней системы позволило нам выделить 14 микроРНК (из 800), которые отличались уровнем экспрессии и разной экспрессией между глиомами grade I - IV. Поскольку 5 из них уже исследуются в нашей работе (микроРНК-124, -181b, -21, -221 и -451), то в итоге их осталось 9: микроРНК-143, -144, -7, -128, -182, -183, -99a, -204, -199b. Дальнейшая валидация этих микроРНК с помощью ОТ-ПЦР, в том числе на расширенной выборке, показала, что не все результаты NanoString подтвердились. Это связано с тем, что, хотя высокопропускные методы позволяют определять уровень экспрессии сразу сотен микроРНК, это происходит лишь в небольшом количестве образцов (в нашем случае 6 пар опухоль-норма) и большее значение приобретает вариация экспрессии микроРНК, связанная с конкретным образцом, а не с группой, к которой он принадлежит. По-видимому, именно этим обстоятельством можно объяснить, что данные NanoString хорошо совпали с данными ОТ-ПЦР на тех же образцах, но только примерно в половине случаев совпали с результатами ОТ-ПЦР на расширенной выборке.

В итоге нашего исследования мы отобрали 7 новых микроРНК, которые относятся как к онкосупрессивным – микроРНК-7, -128, -143 и -199b, так и к онкогенным - это микроРНК -144, -182 и -183. Из 7-и отображенных у 4-х микроРНК (-7, -144, -182 и -199b) были зафиксированы статистически

значимые различия уровней экспрессии между глиомами различной степени злокачественности.

Полученные результаты представляют большой интерес с точки зрения практической нейрохирургии случаи различия между глиомами grade II и III, grade II и IV. Для их дифференцировки подошли только четыре микроРНК: -144 (AUC=0,767), -182 (AUC=0,771), -199b (AUC=0,852) и -7 (AUC=0,612). Полученные четкие различия показателей экспрессии этих четырех микроРНК в глиомах различной степени злокачественности могут являться дополнительными маркерами, позволяющими отличить быстро растущие злокачественные глиомы (grade III и IV) от медленно растущих опухолей (grade II) и своевременно назначить адекватное лечение.

Заключение

Нашими исследованиями установлено, что между тканью глиомы и внешне неизменным мозговым веществом, находящимся на расстоянии не менее 2 см от нее, значимые различия для пяти микроРНК: двух онкогенных (-221 и -21) и двух онкосупрессорных (-31, -124 и -223). При определении уровней экспрессии исследуемых микроРНК выявлены их специфические профили, характерные для глиом разной степени злокачественности головного мозга человека и установлена зависимость этих показателей от степени злокачественности. Данные микроРНК могут использоваться в качестве маркеров в оценке степени злокачественности новообразований.

Диагностические характеристики по определению степени злокачественности глиом на основе измерения уровней экспрессии 6-и микроРНК (-124, -125b, -191, -21, -221, -223) для глиом grade II составляют: специфичность 90 %, чувствительность 76,5 %, общая точность 87,8 %, AUC 83,2. Для глиом grade III: специфичность 93,4 %, чувствительность 74,2 %, общая точность 87,8 %, AUC 83,8. Для глиобластом (grade IV) диагностические характеристики составляют: специфичность 89,6 %, чувствительность 88,1 %, общая точность 87,8 %, AUC 88,8.

На основании выявленной специфичности профилей экспрессии микроРНК, характерных для глиом разной степени злокачественности головного мозга человека был разработан новый «Способ дифференциальной диагностики глиом головного мозга человека», на который получен патент Российской Федерации №2583871.

Детекцией микроРНК с помощью технологии NanoString установлено, что в тканях глиом различной степени злокачественности (grade II и grade III, grade II и grade IV) отмечается статистически достоверное увеличение уровня экспрессии микроРНК-199b. Напротив, уровень экспрессии микроРНК-144 и микроРНК-182 являлся сниженным. Также выявлено достоверное 10-кратное повышение показателей экспрессии микроРНК-7 между опухолями grade II и grade IV.

С точки зрения практической нейрохирургии интерес представляют случаи различия между II и III, II и IV степенями анаплазии глиом. Для их дифференцирования подошли только четыре микроРНК: для grade II и III: -144 (AUC=0,767), -182 (AUC=0,771) и -199b (AUC=0,852); для grade II и IV микроРНК -7 (AUC=0,612).

Полученные четкие различия показателей экспрессии этих четырех микроРНК в данных типах глиом могут являться дополнительными маркерами, позволяющими отличить быстро растущие злокачественные глиомы (III, IV степени) от медленно растущих опухолей (II степени) и своевременно назначить адекватное комплексное лечение.

На сегодняшний день в России не зарегистрировано готовых диагностических панелей, в основе которых лежит анализ экспрессии микроРНК, позволяющих различать молекулярно-генетические подтипы глиом головного мозга и способствующих улучшению методов персонализированной терапии. В связи с этим, разработка методических подходов и анализ изменений уровней экспрессии микроРНК в глиомах головного мозга является актуальной задачей и на сегодняшний день.

Проведя сравнительный анализ полученных данных, можно сделать вывод, что супратенториальные глиомы головного мозга характеризуются уникальным профилем микроРНК, который как отличает их от нормальной ткани мозга, так и позволяет дифференцировать между собой. Очевидно, что в дополнение к молекулярным маркерам, получившим признание в нейроонкологии, глиомы различной степени анаплазии могут быть дополнительно подразделены на основании профилирования микроРНК. Это обосновывает необходимость дальнейших исследований, направленных на формирование профилей экспрессии микроРНК в молекулярно-генетических подтипах глиом одной гистологической структуры. Результаты этих исследований будут способствовать развитию персонализированного комплексного лечения.

ГЛАВА 4. ПРОГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ ПРОФИЛЕЙ ЭКСПРЕССИИ МИКРОРНК И ДРУГИХ ФАКТОРОВ В ВЫЖИВАЕМОСТИ ПАЦИЕНТОВ

На основании клинических данных лечения больных с супратенториальными глиомами головного мозга (морфологическая принадлежность опухоли, степень ее злокачественности, вида комплексного лечения, продолжительность жизни - сроков выживаемости пациентов после операции и установления гистологического диагноза) и определения профилей экспрессии 10-и микроРНК была определена прогностическая значимость последних как предикторов выживаемости. В изучаемую группу вошли 107 пациентов из 118, так как у 11 больных не удалось получить необходимую информацию об их состоянии на момент проводимого исследования.

Возраст пациентов варьировал от 6 до 83 лет, составляя в среднем $48,8 \pm 4$ лет. При этом количество оперированных до 48 лет включительно составило 39 человек (36,4 %), после 48 лет – 68 (63,6 %), мужчин было 62 (57,9 %), женщин – 45 (42,1 %). В зависимости от степени злокачественности глиом были сформированы три группы: I - 17 пациентов (16 %), у которых диагностированы глиомы второй степени злокачественности (grade II), II - 30 пациентов (28 %) с третьей степенью злокачественности (grade III) и III - 60 больных (56 %) с глиобластомами (grade IV).

Функциональное состояние оперированных на период обследования оценивалось по шкале Карновского и составляло в среднем $70 \pm 1,0$ баллов. 56 (52 %) пациентов в послеоперационном периоде получили адъювантную терапию в виде химио- и лучевого лечения. 10-и оперированным (9 %) проведено только лучевое лечение в дозе 56 – 60 Гр. 6 (5 %) получали монокимиотерапию темодалом. 35 (34 %) больных в послеоперационном периоде вообще не получали дополнительного лечения.

Медиана выживаемости больных с супратенториальными глиомами различной степени злокачественности (grade II - IV) равнялась 15 месяцам с момента проведения операции и установления гистологического диагноза. Медиана выживания для пациентов с диагнозом grade II составляла 47 месяцев, для пациентов grade III - 42 месяца, grade IV - 8 месяцев. На рисунке 38 изображены кривые Каплана-Мейера по трем исследуемым группам пациентов - grade II, grade III и grade IV. Средняя продолжительность жизни пациентов с глиомами grade II равнялась 43 месяцам, grade III - 42 месяцам и grade IV – 10 месяцам.

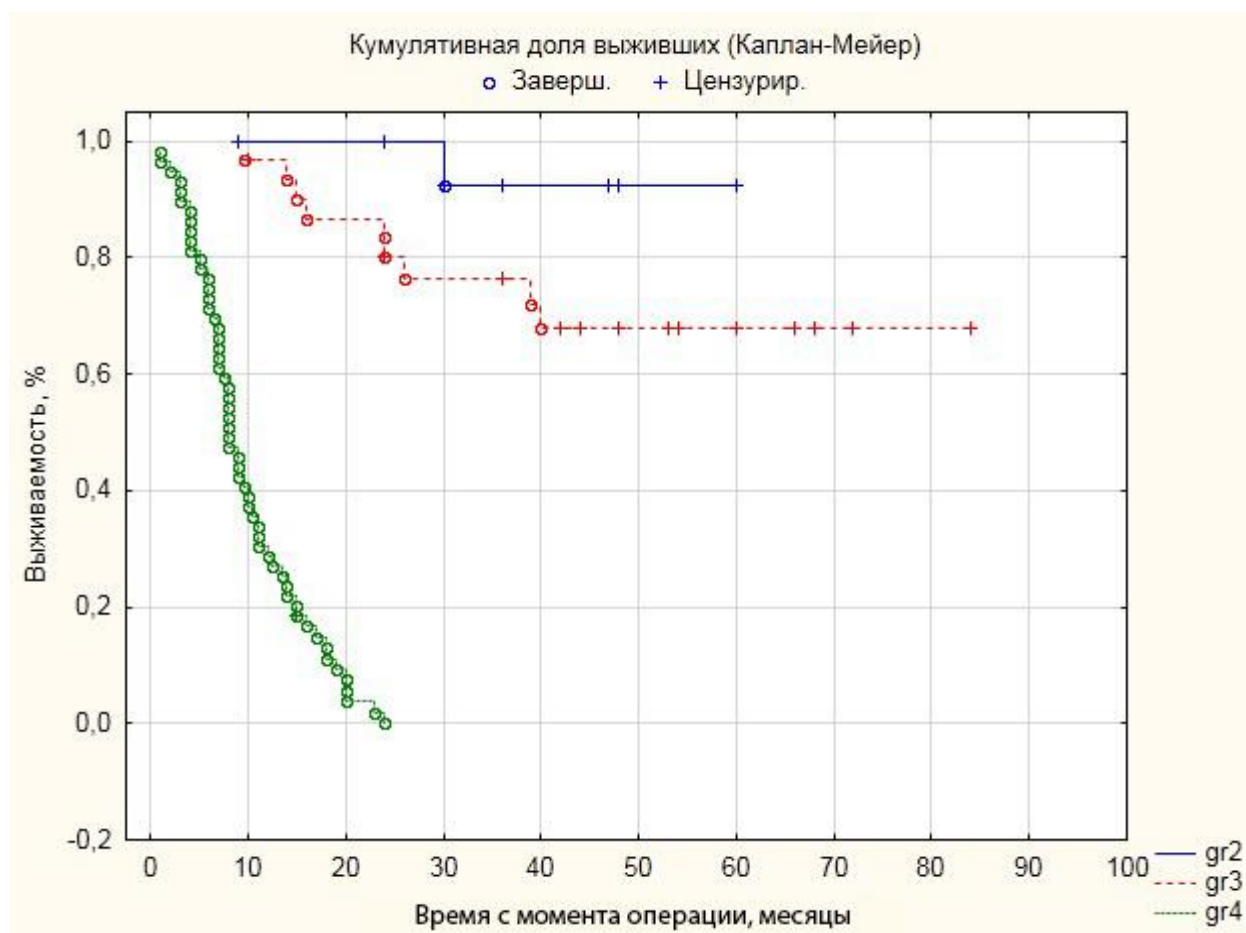


Рисунок 38 – Кривые Каплана-Мейера, построенные по трем группам пациентов (n=107)

Однофакторный регрессионный анализ Кокса (модель пропорциональных рисков) выявил только три микроРНК, уровень

экспрессии которых достоверно связан со сроками выживаемости пациентов. Это микроРНК-31, -21 и -223 (таблица 20).

Таблица 20 – Уровень значимости влияния экспрессии микроРНК на время выживания

микроРНК	Тест Вальда, р
микроРНК-31	0,006337
микроРНК-125b	0,323163
микроРНК-16	0,453054
микроРНК-451	0,488504
микроРНК-191	0,565604
микроРНК-124	0,249550
микроРНК-21	0,000002
микроРНК-181b	0,945773
микроРНК-221	0,178465
микроРНК-223	0,031145

Примечание. Достоверные показатели ($p < 0,05$) выделены жирным шрифтом

На следующем этапе был проведен многофакторный регрессионный анализ Кокса влияния на время выживания: микроРНК (потенциальных прогностических маркеров), возраста, вида адъювантной терапии, степени злокачественности (таблица 21).

Таблица 21 – Результаты регрессионного анализа Кокса у больных в зависимости от возраста, вида адъювантной терапии и степени злокачественности новообразования

Факторы		Оценка параметров	р	Отношение рисков
микроРНК	микроРНК-31 ↑	0,19945	0,033485	1,220734
микроРНК	микроРНК-125b ↑	0,02694	0,801048	1,027302
микроРНК	миРНК-16 ↑	0,05648	0,625022	1,058101
микроРНК	микроРНК-451 ↓	-0,00740	0,863310	0,992623
микроРНК	микроРНК-191 ↓	-0,16995	0,297634	0,843710
микроРНК	микроРНК-124 ↑	0,01376	0,804964	1,013859
микроРНК	микроРНК-21 ↑	0,20576	0,002963	1,228460

Окончание таблицы 21

Факторы		Оценка параметров	p	Отношение рисков
микроРНК	микроРНК-181b ↓	-0,08392	0,331712	0,919508
микроРНК	микроРНК-221 ↓	-0,20562	0,021628	0,814144
микроРНК	микроРНК-223 ↑	0,10095	0,045976	1,106217
Лучевая терапия	Без лучевой терапии	0,37484	0,046721	2,116337
Химиотерапия	Без химиотерапии	0,45023	0,014088	2,460735
До 48 лет/после 48 лет	До 48 лет	-0,617615	0,000130	0,290768
grade II - IV	grade II	-2,09450	0,000017	0,011696

Так как микроРНК-31, -21, -221 и -223 обладали наибольшим влиянием на время выживания пациентов из всех исследованных микроРНК, мы решили сравнить группы с высоким и низким уровнем микроРНК-31, -21, -221 и -223 между собой. Для каждой микроРНК была построена ROC-кривая и определены пороговые значения относительных уровней экспрессии. Для микроРНК-31 этот уровень соответствовал -0,09804, для микроРНК-21 4,443, для микроРНК-221 -0.5312, для микроРНК-223 1,315. Затем были построены кривые Каплана-Мейера (рисунок 39 - 42).

Так как по результатам регрессионного анализа возраст обладал наибольшим вкладом в увеличении продолжительности жизни пациентов, мы решили сравнить группы с возрастом пациентов больше и меньше 48 лет (среднее значение в нашей выборке). Была построена кривая Каплана-Мейера (рисунок 43).

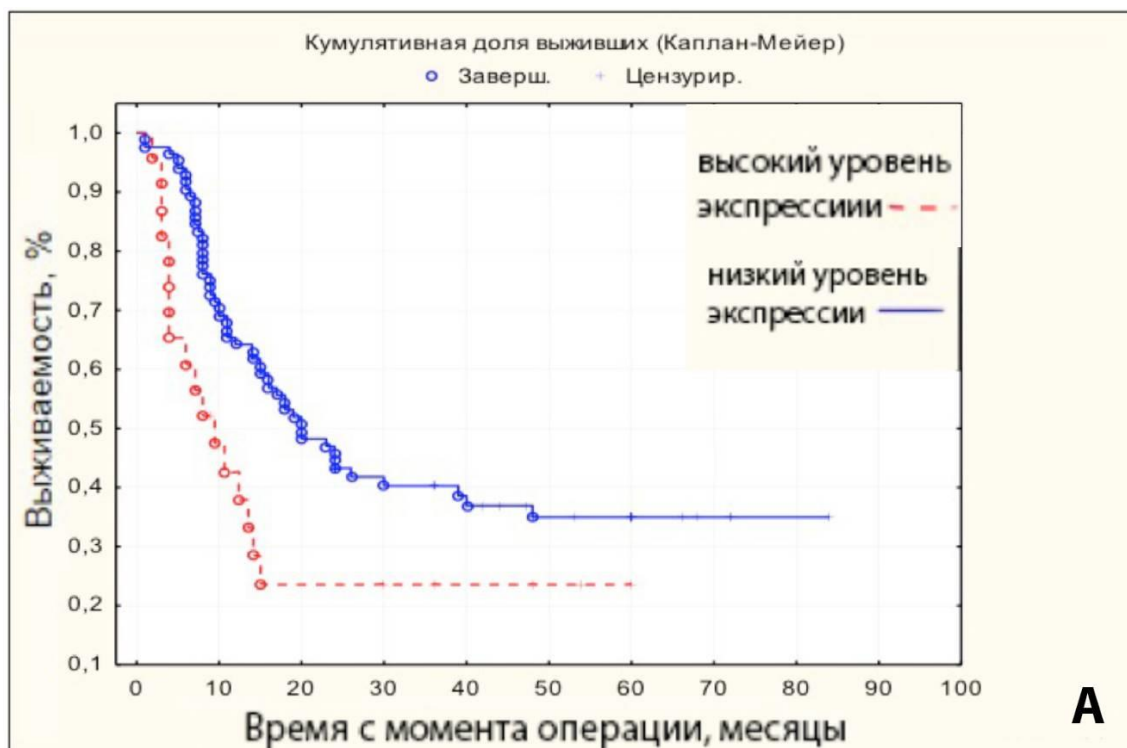


Рисунок 39 – Кривые Каплана-Мейера пациентов с высоким и низким уровнем экспрессии микроРНК-31 в глиомах grade II – IV

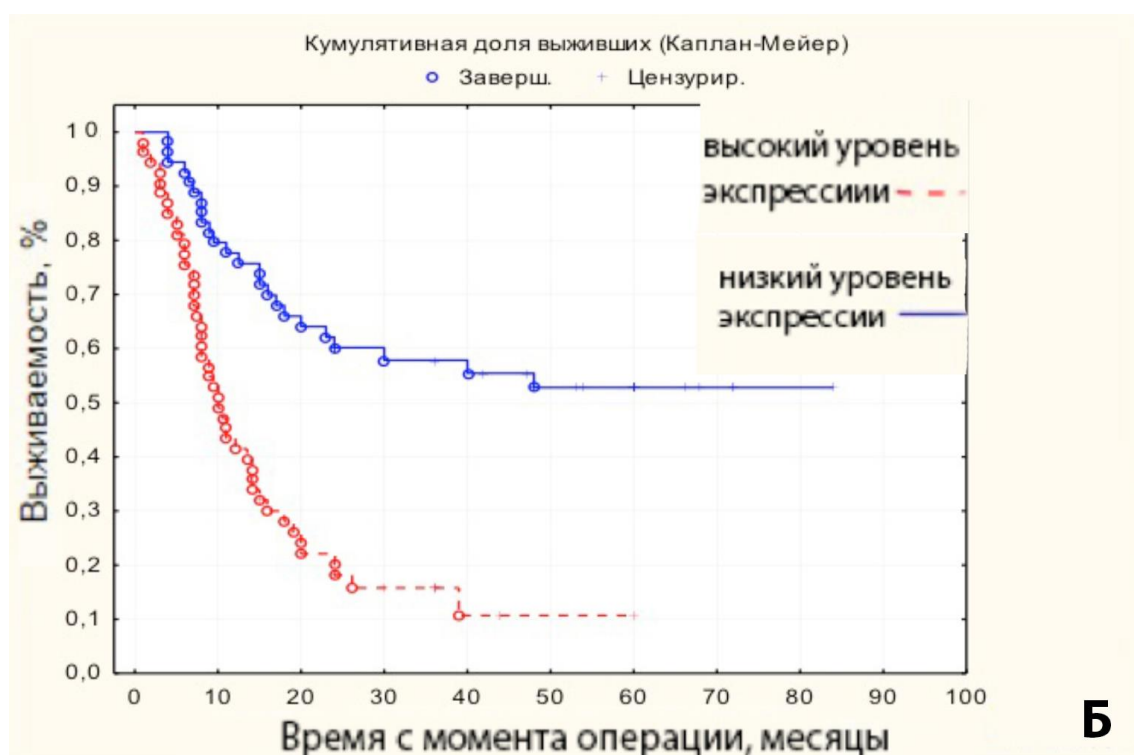


Рисунок 40 – Кривые Каплана-Мейера пациентов с высоким и низким уровнем экспрессии микроРНК-21 в глиомах grade II – IV



Рисунок 41 – Кривые Каплана-Мейера пациентов с высоким и низким уровнем экспрессии микроРНК-221 в глиомах grade II – IV

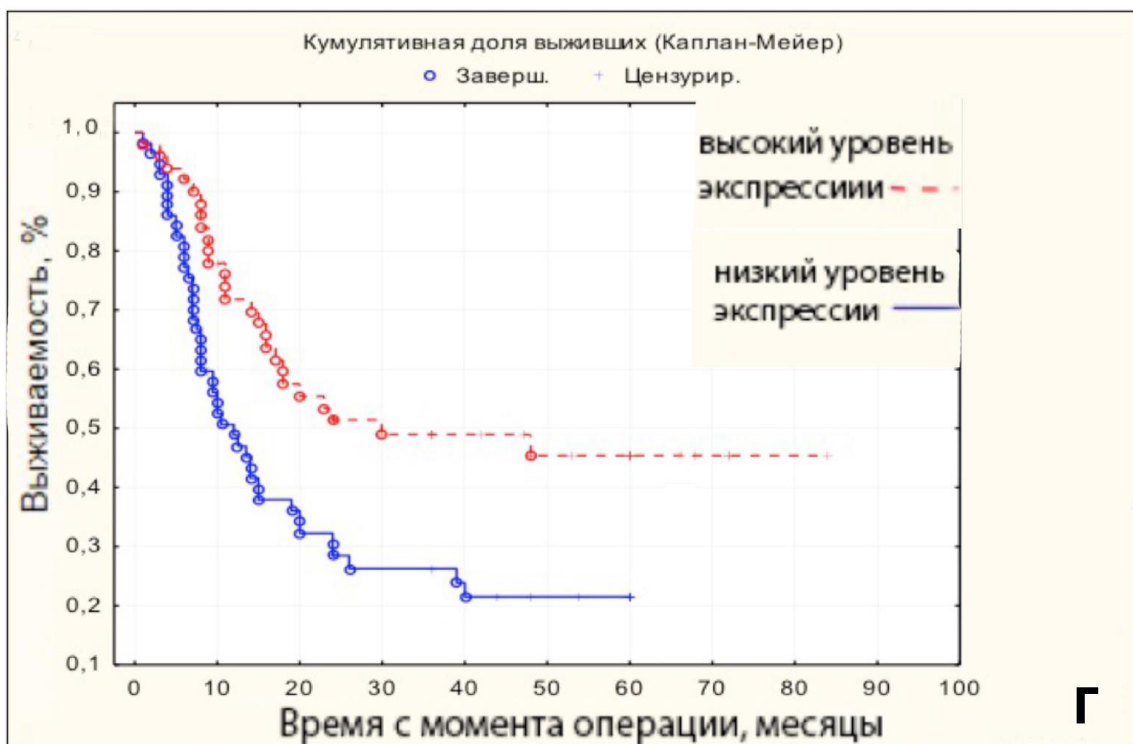


Рисунок 42 – Кривые Каплана-Мейера пациентов с высоким и низким уровнем экспрессии микроРНК-223 в глиомах grade II – IV

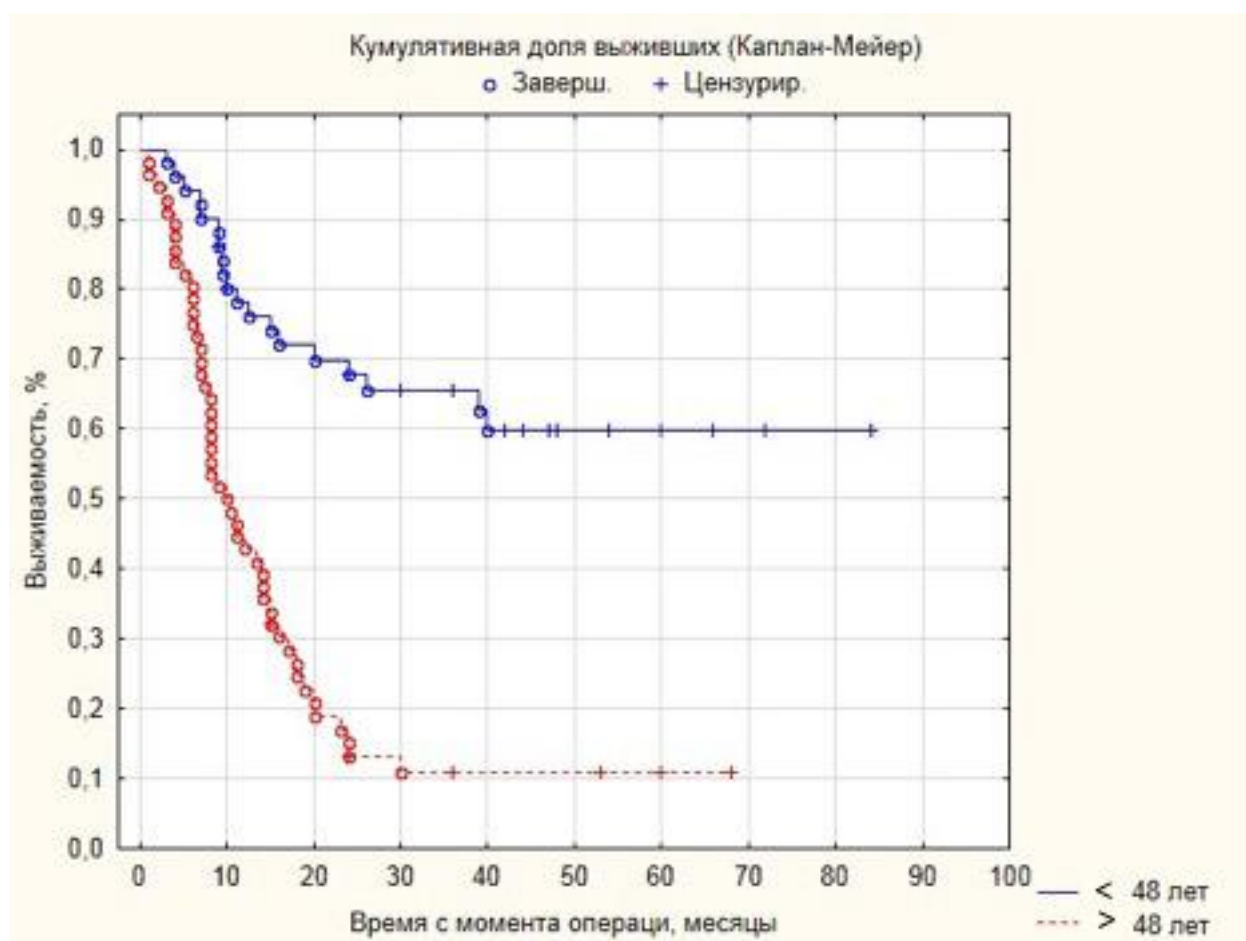


Рисунок 43 – Кривая Каплана-Мейера у больных в зависимости от возраста

Медиана выживаемости для групп с высоким и низким уровнем экспрессии микроРНК-31, -21, -221 и -223, а также для пациентов с проведенными адъювантными методами лечения, в зависимости от возраста (таблица 22).

Повышенная экспрессия всех четырех микроРНК: микроРНК-31 (КР=1,221; ДИ 95 % 1,016 - 1,467; $p < 0,0335$), микроРНК-21 (КР=1,228; ДИ 95 % 1,073 - 1,407; $p < 0,0030$), микроРНК-223 (КР=1,106; ДИ 95% 1,002 - 1,221; $p < 0,0460$) и микроРНК-221 (КР= 0,814; ДИ 95 % 0,683 - 0,970; $p < 0,0216$), отсутствие в комплексном лечении таких адъювантных методов терапии как химио- (КР=2,461; ДИ 95 % 1,199 - 5,050; $p < 0,0141$) и лучевая (КР=2,116; ДИ 95 % 1,011 - 4,430; $p < 0,0467$), возраст после 48 лет (КР=0,291; ДИ 95 % 0,154 - 0,547; $p < 0,0001$), достоверно коррелировали с резким снижением

выживаемости пациентов, что позволяет их использовать в качестве предикторов выживания больных с супратенториальными глиомами головного мозга.

Таблица 22 – Показатели медиан выживаемости с указанием достоверности различий у больных в зависимости от выбранных критериев прогноза

Факторы	Медиана выживаемости	
	МикроРНК-31	Низкий уровень экспрессии (Ме 19,5 мес.)
МикроРНК-21	Низкий уровень экспрессии (Ме 24 мес.)	Высокий уровень экспрессии (Ме 10 мес.)
МикроРНК-221	Низкий уровень экспрессии (Ме 24 мес.)	Высокий уровень экспрессии (Ме 12,5 мес.)
МикроРНК-223	Низкий уровень экспрессии (Ме 24 мес.)	Высокий уровень экспрессии (Ме 10,5 мес.)
Возраст до 48 лет/после 48 лет	Возраст до 48 лет (Ме 36 мес.)	Возраст после 48 лет (Ме 10,2 мес.)
Проведение химиотерапии	Проведение химиотерапии (Ме 20 мес.)	Без проведения химиотерапии (Ме 8 мес.)
Проведение лучевой терапии	Проведение лучевой терапии (Ме 20 мес.)	Без проведения лучевой терапии (Ме 8,5 мес.)

В качестве иллюстрации использования исследуемых микроРНК у больных с глиомами головного мозга как предикторов выживаемости приводим клинические наблюдения оперированных нами больных.

Клинический пример № 1.

Пациентка И., 31 г., считает себя больной с ноября 2014 года, когда впервые появилась острая стреляющая головная боль в затылочной области при наклонах головы, обратилась к неврологу по месту жительства. В декабре 2014 года была выполнена МРТ головного мозга, по результатам которой было обнаружено в правой лобной доле объёмное образование (рисунок 44).

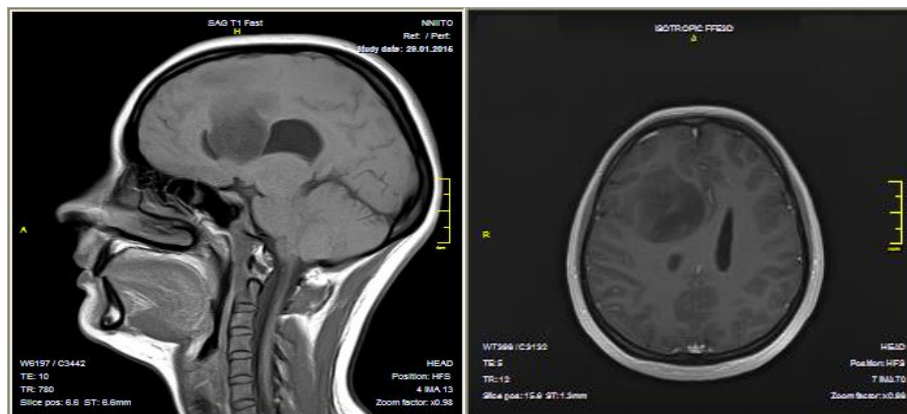


Рисунок 44 – МР-томограмма головного мозга пациентки И., 31 год, с контрастированием. В правой лобной доле имеется внутримозговое объемное образование

Консультирована нейрохирургом ФГБУ "ННИИТО им. Я.Л. Цивьяна", рекомендовано оперативное лечение. При поступлении жалобы на периодически возникающую головную боль стреляющего характера, преимущественно в затылочной области при наклонах головы и натуживании.

Функциональное состояние больной по шкале Карновского 70 баллов. В неврологическом статусе очаговой патологии не было.

29.01.2015г. проведено плановое оперативное лечение: микрохирургическое удаление объемного образования правой лобной доли головного мозга под нейронавигационным контролем.

Интраоперационно, для изучения показателей экспрессии микроРНК у данной больной, используя разработанный нами оригинальный способ, взяты биоптаты опухоли и внешне неизмененного мозга для молекулярно-генетических исследований.

Послеоперационный период протекал без осложнений. В неврологическом статусе без появления дополнительного неврологического дефицита. Функциональный статус больного по шкале Карновского 60 баллов. Рана зажила первичным натяжением.

Иммуногистохимическим методом выявлена диффузная астроцитома grade II.

В таблице 23 представлен уровень экспрессии 4-х значимых микроРНК в опухолевом образце. Из представленных результатов следует, что у данной больной в опухолевой ткани имеется сниженная экспрессия микроРНК-31, микроРНК-21, микроРНК-221, микроРНК-223, что свидетельствовало по нашим данным о благоприятном течении заболевания

Таблица 23 – Результаты уровня экспрессии микроРНК у пациентки И., 31 год

микроРНК-31	микроРНК-21	микроРНК-221	микроРНК-223
-6,6750529	0,8412338	-6,5003727	-0,9943654

Для четырех значимых микроРНК-31, -21, -221 и -223, которые обладали влиянием на время выживания пациентов из всех исследованных микроРНК, мы провели сравнение групп с высоким и низким уровнем микроРНК-31, -21, -221 и -223 между собой. Для каждой микроРНК была построена ROC-кривая и определены пороговые значения относительных уровней экспрессии. Для микроРНК-31 этот уровень соответствовал -0,09804, для микроРНК-21 4,443, для микроРНК-221 -0,5312 и для микроРНК-223 1,315.

После выписки из клиники проведен курс лучевой терапии СОД 60 Гр и 3 курса адъювантной химиотерапии темодалом по стандартной схеме, назначенной химиотерапевтом.

В настоящий момент (с момента постановки диагноза прошло 5 лет) состояние больной удовлетворительное, беспокоят небольшие периодические головные боли. Функциональное состояние по шкале Карновского 80 баллов. В неврологическом статусе по-прежнему очаговых симптомов нет. Клинически и по данным МРТ головного мозга с контрастом данных за продолженный рост новообразования нет. Наблюдается у невролога по месту жительства. С целью

контроля течения заболевания 1 раз в год проводится МРТ головного мозга с контрастированием.

Клинический пример № 2.

Пациентка С., 46 лет, считает себя больной с декабря 2014 года, когда после черепно-мозговой травмы появилась головная боль. Получала консервативное лечение, несмотря на проводимое лечение, головная боль усиливалась. Поэтому 14.01.15 г. выполнено МРТ головы с контрастным усилением, на изображениях которой обнаружено объёмное образование правой теменной доли кистозно-солидного характера. МР-томограммы головного мозга больной представлены на рисунке 45. Консультирована нейрохирургом ФГБУ "ННИИТО им. Я.Л. Цивьяна", рекомендовано плановое оперативное лечение.

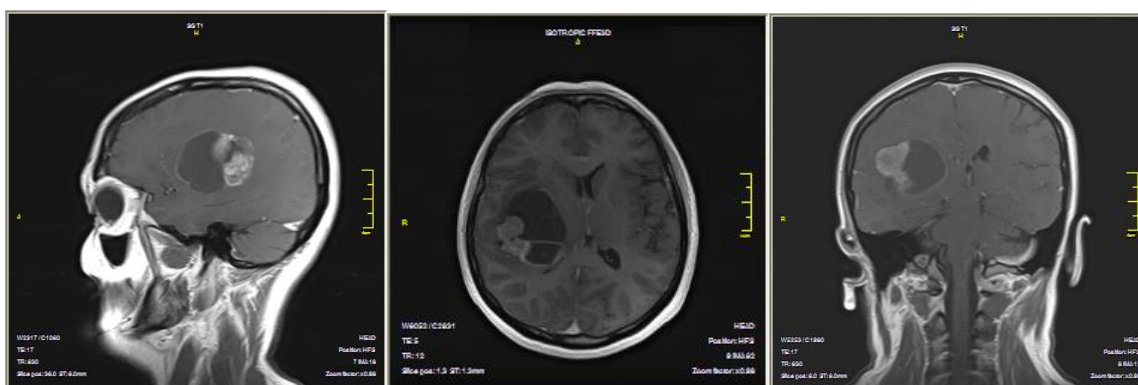


Рисунок 45 – МР-томограмма головного мозга больной С., 46 лет с контрастированием. В теменной области справа имеется кистозно-солидная внутримозговая опухоль

При поступлении жалобы на головную боль, головокружение. Левосторонний центрального типа гемипарез со снижением силы в левых конечностях до 4-х баллов. Функциональное состояние больной по шкале Карновского 60 баллов.

02.03.2015 г. проведено плановое оперативное вмешательство: микрохирургическое удаление кистозно-солидного объемного образования правой теменной доли под нейронавигационным контролем.

Интраоперационно, для изучения показателей экспрессии микроРНК у данной больной, используя разработанный нами оригинальный способ, взяты биоптаты опухоли и неизмененного мозга для молекулярно-генетических исследований.

Иммуногистохимическим методом выявлена анапластическая астроцитома grade III.

Послеоперационный период протекал без осложнений. В неврологическом статусе без дополнительного дефицита. Индекс по шкале Карновского 60 баллов. Рана зажила первичным натяжением.

В таблице 24 представлен уровень экспрессии 4-х значимых микроРНК в опухолевом образце.

Таблица 24 – Результаты уровня экспрессии микроРНК для пациентки С., 46 лет

микроРНК-31	микроРНК-21	микроРНК-221	микроРНК-223
2,41	6,88	0,07	1,54

У данного больного в опухолевой ткани имелась повышенная экспрессия всех четырех микроРНК: -31, -21, -223 и -221, что свидетельствовало по нашим данным о неблагоприятном течении заболевания. После выписки из клиники проведен курс лучевой терапии СОД 60 Гр и 4 курса адьювантной химиотерапии темодалом по стандартной схеме, назначенной химиотерапевтом.

Спустя 6 месяцев с момента постановки гистологического диагноза по данным клиники и МРТ головного мозга диагностирован продолженный рост объемного образования правой теменно-височной области с ростом в подкорковые структуры. Пациентке предложено оперативное вмешательство, от которого она отказалась. В декабре 2015г. со слов родственников, спустя 7

месяцев после установки диагноза, скончалась от прогрессирования заболевания.

Клинический пример № 3.

Пациент К., 40 лет, считает себя больным с ноября 2013 года, когда на фоне полного здоровья развился генерализованный эпилептический приступ с потерей сознания. После чего был доставлен в больницу, где было проведено томографическое обследование, выявившее кистозно-солидное объемное образование в лобной доле слева (рисунок 46). Консультирован нейрохирургом ФГБУ "ННИИТО им. Я.Л. Цивьяна", рекомендовано оперативное вмешательство.

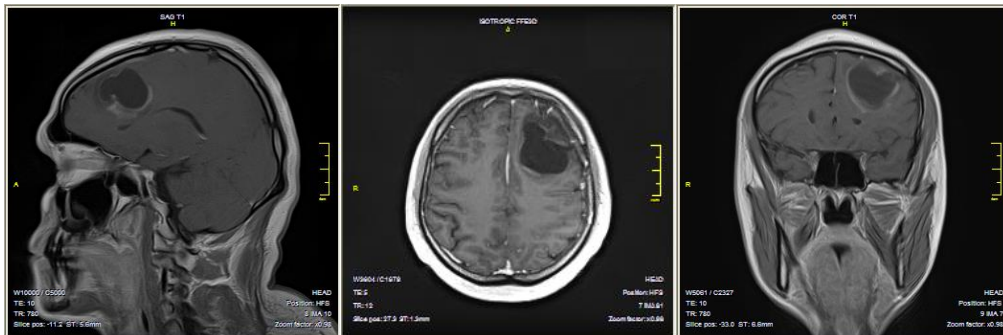


Рисунок 46 – МР-томограмма головного мозга больного К., 40 лет с контрастированием. В лобной области слева имеется кистозно-солидная внутримозговая опухоль

При поступлении жалобы на умеренную головную боль, головокружение, общую слабость. Функциональное состояние больного по шкале Карновского 60 баллов. Неврологически – элементы моторной афазии.

05.04.2014 г. проведено оперативное вмешательство: микрохирургическое удаление кистозно-солидного объемного образования правой теменной доли под нейронавигационным контролем. Интраоперационно, для изучения показателей экспрессии микроРНК у данного больного, используя разработанный нами оригинальный способ, взяты биоптаты опухоли и неизмененного мозга для молекулярно-генетических исследований.

Иммуногистохимическим методом диагностирована анапластическая астроцитома grade III.

В таблице 25 представлен уровень экспрессии значимых микроРНК в опухолевом образце. Из нее следует, что в опухолевой ткани данного больного определялся пониженный уровень экспрессии четырех микроРНК (-31, -21, -221 и -223). Полученные молекулярно-генетические данные свидетельствуют о благоприятном прогнозе течения заболевания.

Таблица 25 – Результаты уровня экспрессии микроРНК у пациента К., 40 лет

микроРНК-31	микроРНК-21	микроРНК-221	микроРНК-223
-1,55	-5,98	-1,89	-2,66

После выписки из клиники проведен курс лучевой терапии СОД 60 Гр и 5 курсов химиотерапии темозоломидом. В настоящий момент (с момента постановки диагноза прошло 5 лет) состояние удовлетворительное, беспокоят небольшие периодические головные боли. Функциональное состояние по шкале Карновского 80 баллов. Наблюдается у невролога по месту жительства. С целью контроля течения заболевания 1 раз в год проводится МРТ головного мозга с контрастированием.

Клинический пример №4.

Пациент Т., 43 года, считает себя больным с января 2014 года, когда стали беспокоить интенсивные головные боли особенно в затылочной области слева, с трудом купируемые анальгетиками. Обратился за медицинской помощью к терапевту по месту жительства. При осмотре отмечалось повышенное АД до 180/90 мм рт. ст., назначено лечение (гипотензивная терапия). Состояние не улучшалось. Возник приступ потери сознания, без судорог. Пациент был госпитализирован в центральную районную больницу, с диагнозом острое нарушение мозгового кровообращения по ишемическому типу. На фоне проводимой консервативной терапии отрицательная динамика в

виде появления правостороннего гемипареза, элементов сенсорно-моторной афазии. Переведен в отделение нейрохирургии ФГБУ "ННИИТО им. Я.Л. Цивьяна", где выполнено МРТ головного мозга, на изображениях которого выявлено внутримозговое объемное образование затылочной доли слева. МР-томограммы головного мозга больного представлены на рисунке 47. Консультирован нейрохирургом ФГБУ "ННИИТО им. Я.Л. Цивьяна" ФГБУ "ННИИТО им. Я.Л. Цивьяна", рекомендовано оперативное лечение.

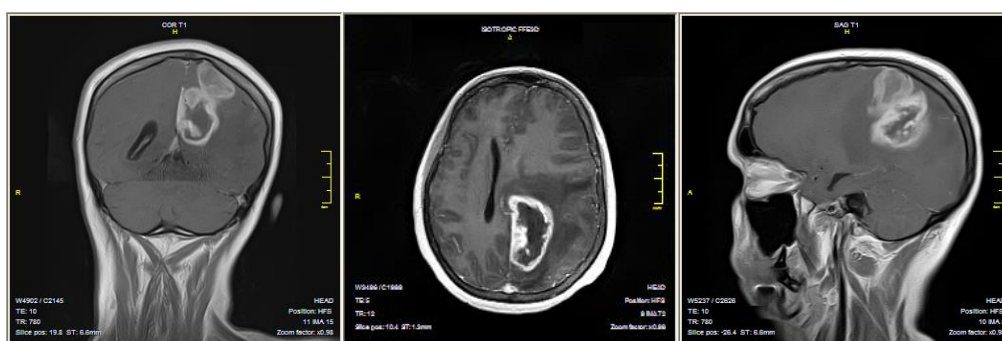


Рисунок 47 – МР-томограмма головного мозга больного Т., 43 года с контрастированием. В левой затылочной доле имеется внутримозговое объемное образование

При поступлении жалобы на головную боль в затылочной области, двоение при взгляде перед собой. Легкий центрального типа до 4-х баллов гемипарез в правых конечностях. Функциональное состояние больного по шкале Карновского 60 баллов.

07.04.2014 года оперирован: Краниоэктомия в левой теменно-затылочной области. Микрохирургическое удаление внутримозгового объемного образования левой теменно-затылочной области под нейронавигационным контролем. Интраоперационно, для изучения показателей экспрессии микроРНК, используя разработанный нами оригинальный способ, взяты биоптаты опухоли и неизмененного мозга для молекулярно-генетических исследований. Иммуногистохимическим методом выявлена глиобластома (grade IV).

Послеоперационный период протекал без осложнений. В неврологическом статусе гемипарез усугубился до 3-х баллов, со снижением функционального состояния оперированного до 60 баллов по шкале Карновского. Рана зажила первичным натяжением.

В таблице 26 представлен уровень экспрессии 4-х значимых микроРНК в опухолевом образце. Из показателей следует, что у данного больного в опухолевой ткани имеется повышенная экспрессия микроРНК-31, микроРНК-21, микроРНК-221 и микроРНК-223, что свидетельствовало по нашим данным о неблагоприятном прогнозе течения заболевания.

Таблица 26 – Результаты уровня экспрессии микроРНК у пациента Т., 43 года

микроРНК-31	микроРНК-21	микроРНК-221	микроРНК-223
1,33	6,99	0,89	6,7

После выписки из клиники проведен курс лучевой терапии СОД 60 Гр и 3 курса адъювантной химиотерапии темодалом по стандартной схеме, назначенной химиотерапевтом. В октябре 2014 года, спустя 5 месяцев после оперативного вмешательства и постановки диагноза, скончался от прогрессирования заболевания.

Клинический пример №5.

Пациентка Ч., 61 год, считает себя больной с сентября 2015 года, когда возник эпизод резкого подъема артериального давления, появился шум в ушах, головокружение и головные боли диффузного характера. Через неделю приступ повторился. В связи с этим была госпитализирована в неврологическое отделение одной из больниц города с подозрением на острое нарушение мозгового кровообращения. При проведении МРТ головного мозга было выявлено внутримозговое объемное образование левой височной доли (рисунок 48). После консультации нейрохирурга ФГБУ "ННИИТО им. Я.Л. Цивьяна" для оперативного лечения госпитализирована в клинику.

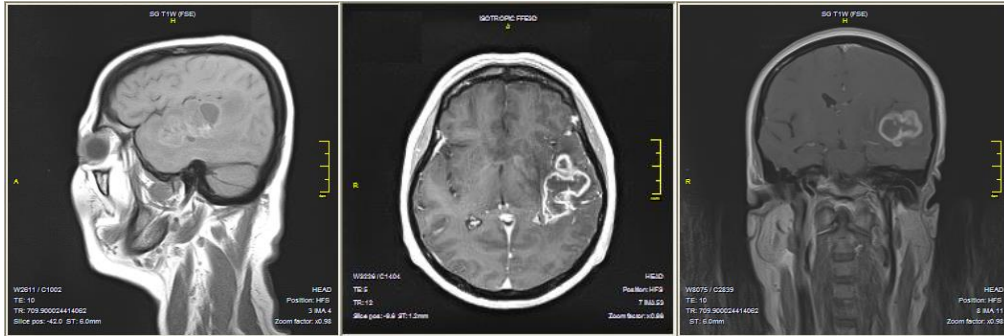


Рисунок 48 – МР-томограмма головного мозга больной Ч., 61 год с контрастированием. В левой височной доле имеется внутримозговая опухоль

При поступлении жалобы на снижение памяти, нарушение речи и письма, шум в ушах, головокружение. Функциональное состояние больной по шкале Карновского 60 баллов.

28.09.2015 года оперирована: Краниотомия в левой теменно-височной области. Микрохирургическое удаление объемного образования левой височной доли под нейронавигационным контролем. Интраоперационно, для изучения показателей экспрессии микроРНК, используя разработанный нами оригинальный способ, взяты биоптаты опухоли и неизмененного мозга для молекулярно-генетических исследований. Иммуногистохимическим методом выявлена глиобластома grade IV. Послеоперационный период протекал без осложнений. В неврологическом статусе без усугубления неврологического дефицита. Шкала Карновского 60 баллов. Рана зажила первичным натяжением.

В таблице 27 представлен уровень экспрессии 4-х значимых микроРНК в опухолевой образце. Из нее следует, что у оперированной больной в опухолевой ткани имеется сниженная экспрессия всех четырех микроРНК (-31, -21, -221 и -223), что свидетельствовало по нашим данным о благоприятном течении заболевания.

После выписки из клиники проведен стандартный курс лучевого лечения и 15 курсов адьювантной химиотерапии темодалом, назначенных химиотерапевтом. Наблюдалась у невропатолога, но в июне 2017 года, спустя

23 месяца после установления диагноза и операции, скончалась от прогрессирования заболевания.

Таблица 27 – Результаты уровня экспрессии микроРНК у пациентки Ч., 61 год

микроРНК-31	микроРНК-21	микроРНК-221	микроРНК-223
-0,8591946	2,01793299	2,62479109	0,90962031

Данные клинические наблюдения наглядно иллюстрируют выявленные нами результаты молекулярно-генетических исследований глиом головного мозга. Полученные повышенные показатели экспрессии в тканях глиом головного мозга четырех микроРНК (-31, -21, -221 и -223) могут свидетельствовать, несмотря на проведение комплексного лечения, о неблагоприятном прогнозе течения заболевания.

Для наглядности данные представленных клинических примеров резюмированы в таблице 28.

Таблица 28 – Сводная таблица клинических примеров

Номер примера	grade	Методы послеоперационного лечения	Продолжительность жизни (месяцы)
1. Хороший прогноза течения заболевания - высокие сроки продолжительности жизни			
1	II	Стандартная адъювантная терапия	60
3	III	Стандартная адъювантная терапия	60
5	IV	Стандартная адъювантная терапия	23
2. Неблагоприятный прогноз течения заболевания – низкие сроки продолжительности жизни			
2	III	Стандартная адъювантная терапия	7
4	IV	Стандартная адъювантная терапия	5

Резюме

Полученные в нашей работе молекулярно-генетические данные экспрессии 10-и микроРНК у больных с глиомами головного мозга различной степени злокачественности сопоставлены с клиническими результатами данных

больных (степень злокачественности глиомы, продолжительность жизни больных, возраст, функциональное состояние больных по шкале Карновского, локализация опухоли, вид адъювантных методов лечения, степени радикальности выполненной операции). После проведения регрессионного анализа Кокса установлено, что повышенная экспрессия четырех микроРНК: -31 (КР=1,221; ДИ 95 % 1,016 - 1,467; $p<0,0335$), -21 (КР=1,228; ДИ 95 % 1,073 - 1,407; $p<0,0030$), -221 (КР= 0,814; ДИ 95 % 0,683 - 0,970; $p< 0,0216$) и -223 (КР=1,106; ДИ 95 % 1,002 - 1,002; $p<0,0460$), отсутствие в комплексном лечении таких адъювантных методов терапии как химио- и лучевая, возраст свыше 48 лет, достоверно коррелировали с резким снижением выживаемости пациентов.

Полученные нами результаты говорят о том, что возраст, степень злокачественности, химио- и лучевая терапия - это параметры с хорошо известной прогностической значимостью и они влияют на выживание пациентов, что соответствует с данными литературы. Помимо вышеперечисленного, нами выявлены 4 микроРНК, которые также достоверно влияют на выживание пациентов с супратенториальными глиомами головного мозга, а именно повышенная экспрессия 4-х микроРНК (-31, -21, -221, -223) достоверно коррелировали с резким снижением выживаемости пациентов и плохим прогнозом заболевания. Это позволяет использовать их в качестве предикторов выживания больных с супратенториальными глиомами головного мозга. На основании полученных результатов оформлена заявка на предполагаемое изобретение «Способ определения прогноза выживаемости больных с глиомами головного мозга Grade 2 – Grade 4», на которое получена приоритетная справка № 2019121528 от 10.07. 2019 год.

Изучение экспрессии микроРНК в глиомах головного мозга является объективным методом диагностики. Полученные данные, по сравнению с гистологическими методами, не зависят от квалификации врача-исследователя. Результаты основаны на современных молекулярно-генетических методах

(ПЦР в реальном времени), значительно сокращают время диагностики, точны и обладают высокой чувствительностью в определении прогноза заболевания.

В научной литературе, касающейся изучения патогенеза и комплексного лечения больных с глиомами головного мозга, сообщается о постоянном поиске и разработке не только различных методов лечения, но и определении новых маркеров, отличающихся информативностью и влияющих на выживание больных. Это поступательный и закономерный процесс, ведущий к накоплению новых клинических, биологических и молекулярно-генетических факторов, которые могут являться потенциальными предикторами выживания больных с глиомами головного мозга. Все это способствует переходу от одной стадии к другой – от количественного накопления научных данных к качественному их осмыслению. В итоге, обобщая полученные результаты, будут выявлены наиболее информативные и значимые показатели, которые можно будет использовать как предикторы прогноза заболевания при данных новообразованиях.

Полученные нами результаты исследования могут быть использованы в клинической практике, так как в настоящее время большое значение имеет индивидуальный подход к лечению пациентов как с общей онкологической патологией так и с нейроонкологией. В связи с развитием персонализированного подхода к лечению глиом головного мозга, полученные нами данные экспрессии четырех микроРНК могут помочь клиницистам выявить пациентов, относящихся к группе высокого риска, с целью разработки и проведения более эффективной адъювантной терапии в дополнение к стандартному протоколу лечения.

Одной из таких групп риска, по нашему мнению, являются больные с диффузными глиомами grade II. Согласно «Клиническим рекомендациям по диагностике и лечению больных с первичными опухолями головного мозга», утвержденным на заседании правления Ассоциации онкологов России (Москва, 2014) [8], оперированным пациентам с глиомами grade II из-за

доброкачественного характера опухоли, компенсированного состояния больного и при отсутствии в клинической картине неблагоприятных факторов прогноза, не всегда назначают адъювантную терапию в виде химио- и лучевого лечения. Полученные нами новые молекулярно-генетические данные повышенной экспрессии профилей четырех микроРНК у больных с глиомами grade II, говорящих о плохом прогнозе течения заболевания, позволяют нам с целью улучшения качества жизни, увеличения сроков появления продолженного роста и рецидива новообразований рекомендовать этим больным после тотального, субтотального удаления опухоли или пункционной биопсии, в послеоперационном периоде проведение адъювантных методов лечения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Среди всех первичных опухолей головного мозга наибольший удельный вес составляют глиомы, которые встречаются в 50 - 55 % случаев, из них более половины (до 60 %) являются злокачественными [3, 4, 20, 24, 45, 127]. Среди всех эпителиально-клеточных внутримозговых опухолей наиболее агрессивным новообразованием является глиобластома. У больных с глиобластомами жизненный прогноз в абсолютном большинстве случаев неблагоприятный.

Современные методы микронейрохирургии в силу анатомических особенностей глиом (инвазивность роста, глубинная локализация в функционально значимых зонах мозга), особенно злокачественных, не позволяет радикально удалить данные новообразования и значительно продлить жизнь больным. Поэтому в мире сформирован единый комплексный подход к лечению злокачественных глиальных внутримозговых опухолей, включающий в себя оперативное вмешательство, направленное на максимальную опухолевую циторедукцию, лучевую и химиотерапию [0, 2, 9, 13, 26, 31, 44, 52, 55, 65, 67, 68, 71, 97, 126, 128, 158, 193]. Несмотря на комплексный подход в лечении, пациентам не только не удается сохранить жизнь, но и значительно продлить ее [18, 20, 24, 29, 56, 94, 103, 142, 143, 166, 191, 202].

В настоящее время наряду с совершенствованием комбинированного подхода к лечению пациентов со злокачественными опухолями головного мозга и методов персонализированной терапии, возникает проблема прогнозирования течения заболевания.

Гистологический диагноз для большинства опухолей является основным фактором, определяющим выбор тактики комплексного лечения больных и отдаленный прогноз заболевания. Однако результаты лечения, основанные только на гистологической характеристике, неоднозначны. Вероятно, требуется более детальная оценка других морфофункциональных факторов в том числе

оценивающих прогноз для персонифицированной тактики ведения этой категории больных. В этом плане молекулярно-генетические характеристики опухоли занимают важное место в классификации опухолей, поскольку гораздо лучше коррелируют с прогнозом, чем существующая гистологическая характеристика глиом. Одним из этих направлений в совершенствовании и, соответственно, в оптимизации комбинированного лечения больных со злокачественными глиомами головного мозга, как нам представляется, является изучение роли микроРНК. Последние исследования показали, что микроРНК не только ассоциированы с различными типами опухолей, но могут сами выступать в роли онкогенов и супрессоров новообразований наряду с соматическими мутациями в генах, то есть быть первопричиной злокачественных превращений [47]. В связи с этим, большой интерес представляет дальнейшее изучение значения микроРНК в процессах онкогенеза головного мозга человека.

Исследования в этом направлении интенсивно развиваются. Появляется все больше публикаций, связанных со сравнительным анализом экспрессии микроРНК в тканях глиом головного мозга. Несмотря на это количество таких работ не велико. Окончательно не определен спектр микроРНК, которые могли бы выступать в роли маркеров типа опухоли и степени ее злокачественности, их роли в прогнозе течения заболевания и продолжительности жизни.

В представленной работе на основании комплексной оценки клинических, гистологических и молекулярно-генетических показателей у 118 больных супратенториальными глиомами предпринята попытка оценить диагностическую и прогностическую значимость микроРНК как биомаркеров степени злокачественности опухолей и предикторов выживания.

При изучении уровней экспрессии 10-и исследуемых микроРНК субтенториальных глиом всех степеней злокачественности и внешне неизменной ткани головного мозга нами установлено, что эти новообразования отличаются по своему профилю от нормальной ткани мозга.

Показатели уровней экспрессии выбранных 10-и микроРНК в тканях глиом головного мозга по отношению к прилежащей морфологически неизменной ткани свидетельствовали о разнонаправленных процессах. Увеличение их уровня экспрессии отмечено у пяти микроРНК (-125, -16, -21, -181 и -223), снижение - также у пяти микроРНК (-31, -451, -191, -124, -221). При этом статистически достоверные различия были получены для трех микроРНК: микроРНК-124, микроРНК-21, микроРНК-223 ($p < 0.05$).

В дальнейшем был выполнен детальный анализ уровней экспрессии исследуемых 10-и микроРНК в зависимости от степени злокачественности глиом и сравнение их с аналогичными показателями внешне неизмененных тканей головного мозга, каждая группа исследования характеризовалась своим специфическим профилем экспрессии.

При анализе уровней экспрессии между глиомами grade I - II ($n = 18$) и морфологически неизменной тканью головного мозга статистически значимых различий не было выявлено.

В группе супратенториальных глиом третьей степени анаплазии (grade III), ($n=35$) отмечено статистически значимое снижение уровня экспрессии для микроРНК-31 и микроРНК-221 ($p < 0.05$).

Наиболее выраженные изменения отмечены при сравнении показателей глиобластомы (grade IV), ($n=65$) с данными внешне неизмененного мозга, нами было отмечено статистически значимое увеличение уровней экспрессии для микроРНК-21 (AUC = 0,7333, Sn = 66,67 %, Sp = 80 %), микроРНК-223 (AUC = 0,7605, Sn = 81,48 %, Sp = 62,07 %), ($p < 0.05$) в опухолевой ткани по отношению к морфологически нормальному мозгу. Уровни экспрессии для микроРНК-21 в опухоли превышали более чем в 5 раз, а для микроРНК -223 в 70 раз аналогичные значения в тканях нормального мозга. Так же было отмечено достоверное снижение уровня экспрессии для микроРНК-124, ($p < 0.05$) в тканях глиобластом по отношению с условной нормой.

Следующим шагом в изучении различий в профиле микроРНК явилось проведение сравнений уровней экспрессии 10-и микроРНК (-124, -125b, -16, -181b, -191, -21, -221, -223, -31 и -451) в тканях глиом с разными степенями злокачественности. Анализ проведен между глиомами grade II и grade III, grade II и grade IV, grade III и grade IV.

Углубленными исследованиями уровней экспрессии данных микроРНК между глиомами различной степени анаплазии также показано, что с увеличением злокачественности новообразования эти различия все более нарастают.

При сравнении показателей между глиомами grade II и grade III статистически значимых различий в уровнях экспрессии исследуемых микроРНК получено не было. Но в тканях глиом grade III по отношению к опухолям grade II отмечено повышение уровней экспрессии микроРНК-125b, -16, -181b, -191, -21, -221, -223, наряду со снижением показателей микроРНК-31, -16, -124 и -451.

Исследованиями по определению уровня экспрессии между глиомами grade IV и grade II показано семикратное увеличение уровня экспрессии микроРНК-21 (AUC = 0,8242, Sn = 86,67 %, Sp = 74,55 %), ($p < 0.05$) в опухолях grade IV, по отношению к тканям опухолей grade II.

Сравнение уровней экспрессии между глиомами grade III и grade IV установило повышение экспрессии по всем 10-и микроРНК. Статистически достоверные различия наблюдались только для микроРНК-21 (AUC = 0,7448, Sn = 69,35 %, Sp = 69,23 %) и микроРНК-221 (AUC = 0,6572, Sn=69,35 %, Sp = 51,28 %), ($p < 0.05$), их уровень в тканях глиобластом был повышен в 2,5 раза по сравнению с новообразованиями grade III.

Таким образом, выявлены специфические профили экспрессии микроРНК, характерные для глиом разной степени злокачественности опухолей головного мозга человека и установлена зависимость этих показателей от степени злокачественности исследуемых новообразований.

Между тканью опухоли и внешне неизменным мозговым веществом, находящимся на расстоянии не менее 2 см от нее, имеются значимые различия для четырех микроРНК: для двух онкогенных (-221 и -21) и трех онкосупрессорных микроРНК (-31, -124 и -223). Уровни экспрессии данных микроРНК могут использоваться в качестве маркеров в оценке степени злокачественности новообразования.

Диагностические характеристики по определению степени злокачественности глиом на основе измерения уровней экспрессии 6-и микроРНК (-124, -125b, -191, -21, -221, -223) для глиом grade II составляют: специфичность 90 %, чувствительность 76,5 %, общая точность 87,8 %, AUC 83,2. Для глиом grade III: специфичность 93,4 %, чувствительность 74,2 %, общая точность 87,8 %, AUC 83,8. Для глиобластом (grade IV) диагностические характеристики составляют: специфичность 89,6 %, чувствительность 88,1 %, общая точность 87,8 %, AUC 88,8.

МикроРНК-21 является одной из наиболее высокоэкспрессируемых микроРНК в клетках человека, однако ее уровень экспрессии еще больше повышается в тканях глиом [51, 59, 113, 163, 230, 231]. Результаты множества исследований микроРНК-21 свидетельствуют об увеличении примерно в 5 ~ 15 раз уровня экспрессии в тканях глиом по сравнению с нормой [59, 195], что подтверждается и в наших исследованиях: уровень экспрессии микроРНК-21 статистически достоверно был повышен в тканях глиобластом в 5 раз, по сравнению с морфологически неизменной мозговой тканью. Так же было отмечено повышение уровня экспрессии микроРНК-21 в тканях глиобластомы по сравнению тканям глиом grade II и grade III в 7 раз и 2,5 раза соответственно. Онкогенный эффект микроРНК-21 в клетках глиомы человека осуществляется через подавление экспрессии генов-супрессоров опухолей, таких как HNRPK, TAr63, JMY, RECK, TOPORS, TP53BP2, DAXX, TGFBR2/3, PDCD4 и TIMP3 [140, 102, 177]. Повышение экспрессии микроРНК ведет к усилению пролиферации, инвазии и снижению апоптоза клеток опухоли. Кроме того,

низкий уровень ее экспрессии, по данным атласа ракового генома (TCGA), слабо ассоциирован с повышенной выживаемостью. Ингибирование микроРНК-21 приводит наряду со снижением экспрессии EGFR, к остановке клеточного цикла в фазе G1/S, и, в конечном итоге, к торможению роста опухоли [229].

МикроРНК-221 является онкогенной, её мишенями являются белки p27, p57, а также гены PTEN, TIMP3, PUMA, Cx43, регулирующие клеточный цикл и процессы выживаемости клеток [50, 76, 86, 100]. В ряде работ была отмечена повышенная экспрессия микроРНК-221 в глиомах [59, 80, 154], способствующая миграции клеток путем понижения регуляции экспрессии РТРμ, а также повышению чувствительности к химиопрепаратам за счет снижения уровня экспрессии MGMT [155]. В нашем исследовании было отмечено статистически достоверное снижение уровня экспрессии микроРНК в глиомах третьей степени анаплазии, по сравнению с условно нормальными прилежащими тканями мозга, так же отмечен повышенный уровень экспрессии микроРНК-221 в тканях глиом grade IV по сравнению с тканями глиом grade II.

МикроРНК-124 является онкосупрессивной, она участвует в дифференцировании нейронов. Установлено, что уровень ее экспрессии снижен не только в глиобластомах и олигодендроглиомах, но и в медуллобластомах [58, 73, 137]. В нашей работе установлено, что уровень экспрессии микроРНК-124 статистически достоверно снижается в глиомах, в том числе и в глиобластомах, по сравнению с паратуморозной тканью [174, 180]. Она регулирует клеточный цикл в фазе G0/G1, а также ингибирует киназу CDK6, которая стимулирует ангиогенез [102, 174], ведущий к возникновению новообразованных сосудов. Последние играют ведущую роль в дальнейшем росте новообразований и их метастазировании [122]. Трансфекция микроРНК-124 в клеточные линии глиом приводит к уменьшению миграции клеток [77].

МикроРНК-31 выступает в качестве онкосупрессора, и ее уровень экспрессии может коррелировать с предрасположенностью опухоли к инвазии

и метастазированию [180]. В нашей работе при исследовании уровней экспрессии микроРНК-31 в тканях глиом высокой степени злокачественности (grade III) было установлено статистически достоверное снижение уровня экспрессии данной микроРНК в опухолевой ткани, по сравнению с условно нормальными прилежащими мозговыми тканями [180]. В культуре клеток глиомы данная микроРНК ингибирует не только миграцию клеток и опосредованно влияет на активацию транскрипционного фактора NF- κ B и ангиогенез но также и уровень E-кадгерина, связанного с эпителиально-мезенхимальным переходом [138, 156].

Из работ Bai-Sheng Huang et al. следует, что микроРНК-223 может играть различную роль в разных типах раковых или опухолевых клеточных линий путем нацеливания на множество функциональных генов. Проведенные исследования показали, что уровень экспрессии микроРНК-223 в клетках глиобластомы человека A172, U251, U373 и U138 был выше, чем в глиальных клетках HFGC плода человека, что указывает на повышенную ее экспрессию в глиобластоме [37]. Результаты других исследований Qiuping Ding et al. свидетельствуют о том, что ее показатели снижены в тканях глиобластом [152]. Из данного сообщения следует, что она может играть роль супрессора и являться потенциальной целью терапии глиобластом. Однако в настоящее время остается неясным, является ли данная микроРНК супрессором или онкогеном при глиобластоме [152]. В нашем исследовании отмечено повышение уровня экспрессии микроРНК-223 в тканях глиобластом более чем в 70 раз по сравнению с морфологически неизменной тканью головного мозга человека, что говорит о крайне высоком уровне экспрессии данной микроРНК тканях глиобластомы.

На основании выявленной специфичности профилей экспрессии микроРНК, характерных для глиом разной степени злокачественности головного мозга человека, нами разработан оригинальный «Способ

дифференциальной диагностики глиом головного мозга человека», на который получен патент Российской Федерации № 2583871.

Экспрессия микроРНК всегда изменяется в опухолях по сравнению со здоровыми тканями, а также отличается между разными типами новообразований на разных стадиях их развития. Поскольку микроРНК в биологических тканях высокостабильны, это делает их перспективными диагностическими маркерами. Однако у человека известно уже более 1800 микроРНК, и чтобы определить какие из них могут оказаться полезными в том или ином приложении, требуется использовать высокопропускные методы, такие как массовое параллельное секвенирование или системы, позволяющие проводить мультиплексное измерение транскрипционной активности сотен генов или микроРНК, таких как NanoString.

Использование последней системы позволило нам выделить 14 микроРНК (из 800), которые отличались достаточным уровнем экспрессии и разной экспрессией между глиомами grade I - IV. Поскольку 5 из них уже исследуются в нашей работе (микроРНК-124, -181b, -21, -221 и -451), то в итоге их осталось 9: микроРНК-143, -144, -7, -128, -182, -183, -99a, -204, -199b. Дальнейшая валидация этих микроРНК с помощью ПЦР-РВ, в том числе на расширенной выборке, показала, что не все результаты NanoString подтвердились. Это связано с тем, что, хотя высокопропускные методы позволяют определять уровень экспрессии сразу сотен микроРНК, это происходит лишь в небольшом количестве образцов (в нашем случае 6 пар опухоль-норма) и большее значение приобретает вариация экспрессии микроРНК, связанная с конкретным образцом, а не с группой, к которой он принадлежит. По-видимому, именно это объясняет то, что данные NanoString хорошо совпали с данными ПЦР-РВ на тех же образцах, но только примерно в половине случаев совпали с результатами ПЦР-РВ на расширенной выборке.

В итоге нашего исследования мы отобрали 7 новых микроРНК, которые относятся как к онкосупрессивным – микроРНК-7, -128, -143 и -199b, так и к

онкогенным - это микроРНК -144, -182 и -183. Однако, после валидации на расширенной выборке, статистически значимые различия в экспрессии обнаружались только для 4-х микроРНК: -144, -7, -182 и -199b. Причем между III и IV степенями таких различий вообще не было, а наблюдались они преимущественно для II и IV степеней злокачественности и, в меньшей степени, для II и III.

Онкосупрессорная микроРНК-7 задействована в регуляции PI3K/Akt-зависимого и Ras/Raf/MEK/ERK-зависимого сигнальных путей, контролируя процессы, отвечающие за рост и малигнизацию опухоли: инвазию, пролиферацию, миграцию, апоптоз. Visani M., et al. описывают снижение ее экспрессии в глиомах, по сравнению с паратуморозной тканью [195]. В нашем исследовании отмечено достоверное ее повышение в 10 раз в опухолях grade IV, по сравнению с grade II.

МикроРНК-128 – это нейрон-специфическая микроРНК, которая участвует в дифференцировке нервной ткани, в глиобластомах она выступает в качестве онкосупрессора [53, 83]. Ее мишенью выступает фактор транскрипции E2F3a, снижение её уровня экспрессии ингибирует клеточный цикл и пролиферацию клеток опухоли [225]. Zhang Y., et al. своими исследованиями установили, что в глиомах показатели этой микроРНК снижены, по сравнению с паратуморозной тканью [53, 83]. В нашей работе мы также зафиксировали небольшое снижение уровня экспрессии микроРНК-128 между глиомами grade II и IV - в среднем в 1,5 раза.

МикроРНК-143 является супрессором, непосредственно регулирует RAS-онкогенный гомолог нейробластомы (N-RAS). При повышении экспрессии микроРНК-143 снижается экспрессия N-RAS, происходит ингибирование передачи сигналов фосфоинозитид-3-киназы (PI3K)/АКТ, а также митоген-активированной протеинкиназы (МАРК)/внеклеточной сигнальной киназы (ERK), снижается как накопление p65 в ядрах клеток глиомы, так и миграция, инвазия, ослабляется рост опухоли и ангиогенез [197]. МикроРНК-143

задействована в деградации микроРНК NUAК2, что ингибирует пролиферацию, миграцию и инвазию клеток глиобластомы [78]. По данным Fu et al. уровень ее экспрессии в злокачественных глиомах был ниже, по сравнению с паратуморозной тканью мозга. Но между опухолями с разной степенью анаплазии достоверных различий ими не отмечено [78]. Нами также получены аналогичные данные по экспрессии этой микроРНК между глиомами grade II, III и IV, хотя имелся общий тренд к ее повышению от низкой степени злокачественности к высокой (в среднем в 1,9 раза между grade II и IV).

Установлено, что уровень экспрессии микроРНК-144 снижен не только в тканях глиом вообще, по сравнению с паратуморозной тканью, но и особенно в глиомах высокой степени анаплазии по отношению к опухолям низкой степени злокачественности. Кроме того, пациенты с глиомой с низкими уровнями ее экспрессии имели более низкие показатели выживаемости [197]. Наши данные свидетельствуют о том, что показатели экспрессии действительно достоверно отличались в глиомах grade II от опухолей grade III и IV, причем в последних двух случаях они снижались в среднем в 5 - 10 раз.

МикроРНК-182. Исследования показывают, что она участвует в нескольких важных стадиях опухолевого генеза, таких как эпителиально-мезенхимальный переход, пролиферация, инвазия, регуляция клеточного цикла, способность к клеточной миграции *in vitro* и метастазирование путем регуляции генов FOXO3, BRCA1, MTSS1, NRN1 и MITF [72, 120, 153, 169, 210]. В тканях первичных глиом установлено пятикратное, а в образцах глиобластом 32-х кратное увеличение уровня ее экспрессии, по сравнению с паратуморозной тканью [95]. Тем не менее, нами было показано достоверное снижение показателей данной микроРНК между grade II и grade III; grade II и grade IV, приблизительно в 5 и 7 раз соответственно.

Аналогичные данные получены при изучении уровня экспрессии микроРНК 183, они были выше в опухолевой ткани, по сравнению с внешне неизменным мозгом, при этом в глиомах высокой степени злокачественности

они доходили до максимальных значений. Повышенные показатели данной микроРНК в глиомах, особенно с высокой степенью анаплазии, может включать канцерогенез и прогрессирование опухоли путем воздействия на гены, которые регулируют выживание клеток, пролиферацию, миграцию и инвазию, таких как PDCD4, EGR1/PTEN, FOXO1, IDH-2/HIF-1 α и ROS-опосредованного гена, в конечном счете опосредуя степень злокачественности, а также плохой прогноз выживания пациентов [214]. Наши данные совпадают с литературными – уровень экспрессии микроРНК 183 в глиомах имеет тенденцию к повышению по мере увеличения степени их анаплазии (примерно в 2 раза).

МикроРНК-199b является ингибитором SET, который также участвует в приобретенной химиорезистентности при хроническом миелоидном лейкозе или раке яичников. Кроме того, она также функционирует как супрессор опухоли в медуллобластоме, гепатоцеллюлярной карциноме и раке молочной железы, воздействуя на такие мишени, как HEIS1, HIF1 α или HER2 [61]. Впервые (в литературных источниках таких данных нет) нами зафиксировано достоверное увеличение показателей уровня экспрессии данной микроРНК между глиомами grade II и grade III, grade II и grade IV – в среднем в 2,8 и 4,8 раза соответственно.

Детекцией микроРНК с помощью технологии NanoString также установлено, что в тканях глиом различной степени злокачественности (grade II и grade III, grade II и grade IV) имеется достоверное увеличение уровня экспрессии микроРНК-199b. Напротив, уровень экспрессии микроРНК-182 является достоверно сниженным. Для микроРНК-144 показатели экспрессии достоверно отличались в глиомах grade II от опухолей grade III и IV, причем в последних двух случаях они снижались в среднем в 5 - 10 раз. Также выявлено достоверное 10-кратное повышение показателей экспрессии микроРНК-7 между опухолями grade II и grade IV.

С точки зрения практической нейрохирургии интерес представляют случаи различия между II и III, II и IV степенями анаплазии глиом. Для их дифференцировки подошли четыре микроРНК: -144, -182, -199b и -7. Для дифференцировки grade II и III микроРНК -144 (AUC=0,767), -182 (AUC=0,771) и -199b (AUC=0,852); для grade II и IV микроРНК -7 (AUC=0,612).

Полученные четкие различия показателей экспрессии этих четырех микроРНК в данных типах глиом могут являться дополнительными маркерами, позволяющими отличить быстро растущие злокачественные глиомы (III и IV степени) от медленно растущих опухолей (II степень) и своевременно назначить адекватное лечение.

С точки зрения практической значимости полученных результатов работы данные, характеризующие молекулярно-генетический профиль глиом головного мозга, могут быть использованы в качестве дополнительных маркеров, позволяющих повысить точность и информативность цитологических и гистологических заключений.

На сегодняшний день в России не зарегистрировано готовых диагностических панелей, в основе которых лежит анализ экспрессии микроРНК, позволяющих различать молекулярно-генетические подтипы глиом головного мозга и способствующих улучшению методов персонализированной терапии. В связи с этим, разработка методических подходов и анализ изменений уровней экспрессии микроРНК в глиомах головного мозга сохраняет свою актуальность.

Проведя сравнительный анализ полученных данных, можно сделать вывод, что супратенториальные глиомы головного мозга характеризуются уникальным профилем микроРНК, который отличает их как от нормальной ткани мозга, так и от глиом различной степени злокачественности. Очевидно, что в дополнение к молекулярным маркерам, получившим признание в нейроонкологии, глиомы различной степени анаплазии могут быть дополнительно подразделены, на основании профилирования микроРНК, на

группы различной степени злокачественности. Это обосновывает необходимость дальнейших исследований, направленных на формирование профилей экспрессии микроРНК в молекулярно-генетических подтипах глиом одной гистологической структуры. Результаты этих исследований будут способствовать развитию персонализированного комплексного лечения.

Современные научные публикации свидетельствуют о том, что отдельные микроРНК в зависимости от их уровней экспрессии могут выступать в качестве маркеров выживания пациентов. Так, например, в работе Srinivasan S. et al. проведен анализ уровней экспрессии 10-и микроРНК у выборки, состоящей из 222 человек с диагнозом глиобластома головного мозга. В результате исследования было определено, что семь микроРНК (-31, -222,-148а, -221, -146b, -200b и -193а) были связаны с плохим прогнозом выживания пациентов, а три микроРНК (-20а, -106а и -17-5p) говорили о хорошем прогнозе выживания [179]. В обширной литературе молекулярно-генетического направления имеются также ряд публикаций, авторы которых считают, что показатели экспрессии отдельных микроРНК в глиомах головного мозга могут являться достоверными предикторами выживания больных с данной патологией. Так, например, работами Lan F. et al. показано, что микроРНК-144 является антионкогеном в глиоме, и ее пониженная экспрессия положительно связана с плохой общей выживаемостью больных. Установлено, что уровень экспрессии микроРНК-144 снижен не только в тканях глиом вообще, по сравнению с паратуморозной тканью, но и особенно в глиомах высокой степени анаплазии по отношению к опухолям низкой степени злокачественности. Кроме того, пациенты с глиомой, с низкими уровнями ее экспрессии имели более низкие показатели выживаемости [109].

В исследовании Jiang L. et al., было выявлено, что в тканях первичных глиом происходит пятикратное, а в образцах глиобластом 32-х кратное увеличение уровня экспрессии микроРНК-182, по сравнению с паратуморозной тканью. Концентрация циркулирующей микроРНК-182 у этих больных была

выше, чем у здоровых людей ($p < 0,001$). Уровни экспрессии зависели от степени злокачественности опухоли. На основании этого авторы заключают, что микроРНК-182 может быть перспективным биомаркером для ранней диагностики и прогноза выживаемости больных с данными новообразованиями [96].

При изучении уровня экспрессии микроРНК 183 Ye Z. et al. было установлено, что он был выше в опухолевой ткани, по сравнению с внешне неизменным мозгом, при этом в глиомах высокой степени злокачественности уровень экспрессии достигал максимальных значений. В подобных исследованиях показано, что и уровни экспрессии микроРНК-183 достоверно коррелируют с выживаемостью данных пациентов. Больные с высокими уровнями экспрессии микроРНК-183 имели значительно более короткую не только общую выживаемость, но и выживаемость без прогрессирования, чем пациенты с низкой ее экспрессией. Кроме того, одномерный и многомерный анализ показали, что уровень экспрессии микроРНК-183 является независимым прогностическим параметром выживаемости больных с данными видами новообразований [215].

Анализ выживаемости пациентов с глиобластомами показал, что низкий уровень микроРНК-485-3p в сыворотке связан с плохой выживаемостью без прогрессирования заболевания (PFS) ($p < 0,004$) и общей выживаемостью (OS) ($p < 0,023$). Кроме того, анализ Кокса продемонстрировал, что экспрессия микроРНК-485-3p в сыворотке является значимым независимым прогностическим фактором для PFS и OS у пациентов с глиобластомами [199].

В настоящей работе, основанной на проспективном когортном исследовании, мы попытались на основании полученных клинических результатов комплексного лечения больных с глиомами различной степени злокачественности и их молекулярно-генетических характеристик в виде экспрессии 10-и микроРНК определить их прогностическую значимость, как потенциальных предикторов выживания больных и выявить среди них

микроРНК с наибольшей прогностической ценностью. Анализ базы данных 107-и пациентов с клиническими результатами комплексного лечения и показатели экспрессии 10-и микроРНК удаленных опухолей выявил только четыре микроРНК уровень экспрессии которых достоверно связан со сроками выживаемости пациентов. Это микроРНК-31, -21, -221 и -223.

Полученные в нашей работе молекулярно-генетические данные экспрессии 10-и микроРНК у больных с глиомами головного мозга различной степени злокачественности сопоставлены с клиническими результатами данных больных (продолжительность жизни больных, возраста, функционального состояния больных по шкале Карновского, вида адъювантных методов лечения, степени радикальности выполненной операции). Нами проведен однофакторный и многофакторный регрессионные анализы Кокса исследуемых микроРНК у 107-и больных с супратенториальными глиомами. Установлено, что повышенная экспрессия четырех микроРНК: микроРНК-31 (КР = 1,221, ДИ 95 % 1,016 - 1,467, $p < 0,0335$), микроРНК-21 (КР = 1,228, ДИ 95 % 1,073 - 1,407, $p < 0,0030$), микроРНК-221 (КР = 0,814, ДИ 95 % 0,683 - 0,970, $p < 0,0216$) и микроРНК-223 (КР = 1,106, ДИ 95 % 1,002 - 1,002, $p < 0,0460$), отсутствие в комплексном лечении таких адъювантных методов терапии как химио- и лучевая, возраст свыше 48 лет, достоверно коррелировали с резким снижением выживаемости пациентов, что позволяет их использовать в качестве предикторов выживания больных с супратенториальными глиомами головного мозга. На основании полученных результатов оформлена заявка на предполагаемое изобретение «Способ определения прогноза выживаемости больных с глиомами головного мозга Grade 2 – Grade 4», на которое получена приоритетная справка № 2019121528 от 10.07. 2019 года.

В научной литературе, касающейся изучения патогенеза и комплексного лечения больных с глиомами головного мозга, идет постоянный поиск и разработка не только различных методов лечения, но и определения новых факторов, влияющих на выживание больных. Это поступательный и

закономерный процесс, ведущий к накоплению новых клинических, биологических и молекулярно-генетических факторов, которые могут являться потенциальными предикторами выживания больных с глиомами головного мозга. Все это способствует переходу от одной стадии к другой – от количественного накопления научных данных к качественному их осмыслению. В итоге, обобщая полученные результаты, будут выявлены наиболее информативные и значимые показатели, которые можно будет использовать как предикторы прогноза заболевания при данных новообразованиях.

Так как в настоящее время большое значение имеет индивидуальный подход к лечению пациентов, как с общей онкологической патологией, так и нейроонкологией, полученные нами результаты исследования могут быть использованы в клинической практике. В связи с развитием персонализированного подхода к лечению глиом головного мозга, полученные данные об экспрессии пяти отдельных микроРНК (-31, -124, -21, -221 и -223) могут использоваться в качестве маркеров в оценке степени злокачественности новообразования. Наряду с этим, уровень экспрессии сразу нескольких микроРНК (-21, -221, -223, -125b, -191, -124) может также быть применим при установлении степени злокачественности глиом головного мозга. Все это может помочь клиницистам выявить пациентов, относящихся к группе высокого риска, с целью разработки и проведения более эффективной адъювантной терапии в дополнение к стандартному протоколу лечения.

Одной из таких групп риска, по нашему мнению, являются больные с диффузными глиомами grade II. Согласно «Клиническим рекомендациям по диагностике и лечению больных с первичными опухолями головного мозга» утвержденным на заседании правления Ассоциации онкологов России (Москва, 2014) [8], оперированным пациентам с глиомами grade II из-за доброкачественного характера опухоли, компенсированного состояния больного и при отсутствии в клинической картине неблагоприятных факторов

прогноза, не всегда назначают адъювантную терапию в виде химио- и лучевого лечения. Полученные нами новые молекулярно-генетические данные повышенной экспрессии профилей четырех микроРНК у больных с глиомами grade II, говорящих о плохом прогнозе течения заболевания, позволяют нам с целью улучшения качества жизни, увеличения сроков продолженного роста и рецидива новообразований рекомендовать этим больным после тотального, субтотального удаления опухоли или пункционной биопсии, в послеоперационном периоде проведение адъювантных методов лечения.

ВЫВОДЫ

1. Разработан оригинальный малотравматичный «Способ интраоперационного забора биоптата глиомы и морфологически неизменной ткани головного мозга для молекулярно-генетических исследований» у больных с супратенториальными глиомами.
2. Установлены специфические профили экспрессии микроРНК, характерные для исследуемых глиом головного мозга разной степени злокачественности. Значимые результаты наблюдали для двух онкогенных: микроРНК-221 и микроРНК-21 и трех онкосупрессорных микроРНК: микроРНК-31, микроРНК-124 и микроРНК-223. Уровни экспрессии данных микроРНК могут служить маркерами, позволяющими повысить точность и информативность в оценке, степени злокачественности глиомы и способствовать своевременному назначению оптимального патогенетического лечения.
3. Диагностические характеристики по определению степени злокачественности глиом на основе измерения уровней экспрессии 6-и микроРНК (-124, -125b, -191, -21, -221, -223) для глиом grade II составляют: специфичность 90 %, чувствительность 76,5 %, общая точность 87,8 %, AUC 83,2. Для глиом grade III: специфичность 93,4 %, чувствительность 74,2 %, общая точность 87,8 %, AUC 83,8. Для глиобластом (grade IV) диагностические характеристики составляют: специфичность 89,6 %, чувствительность 88,1 %, общая точность 87,8 %, AUC 88,8.
4. На основе изучаемых 10-и микроРНК (-124, -125b, -16, -181b, -191, -21, -221, -223, -31 и -451) создана диагностическая панель, которая позволила дифференцировать доброкачественные опухоли от злокачественных новообразований и разработать новый «Способ дифференциальной диагностики глиом головного мозга человека».

5. Технология NanoString позволила нам выделить 14 микроРНК (из 800), микроРНК: -124, -181b, -21, -221, -451,-128, -143, -144, -182, -183, -199b, -204, -7 и -99a, которые отличались достаточным уровнем экспрессии и разной экспрессией между глиомами grade I - IV. Дополнительными маркерами, позволяющими отличить быстро растущие злокачественные глиомы от медленно растущих опухолей являются четыре микроРНК (-144, -182, -199b и -7).
6. Повышенная экспрессия четырех микроРНК: микроРНК-31, микроРНК-21, микроРНК-223 и микроРНК-221 в глиомах головного мозга достоверно коррелирует с резким снижением выживаемости пациентов и свидетельствует о плохом прогнозе течения заболевания, что может служить основанием оптимизации послеоперационного лечения этих больных с целью увеличения продолжительности их жизни.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Наряду с клиническими гистологическими предикторами злокачественности супратенториальных глиом выявлены специфические профили экспрессии микроРНК, что позволяет быстро и точно установить тип опухоли и, соответственно, своевременно и адекватно назначить дальнейшее лечение. В нейрохирургической практике в ситуациях с неясной патоморфологической картиной опухоли наличие уровня экспрессии пяти отдельных микроРНК (-221, -21, -31, -124 и -223) и данных уровней экспрессии сразу нескольких микроРНК (-21, -221, -223, -125b, -191, -124) могут использоваться в качестве маркеров в оценке степени злокачественности новообразования.
2. Кроме этого, для дифференцировки между II и III, II и IV степенями анаплазии глиом можно использовать еще четыре микроРНК: -144, -182, -199b и -7. Они могут являться дополнительными маркерами, позволяющими отличить быстро растущие злокачественные глиомы от медленно растущих опухолей.
3. Вышеперечисленные микроРНК-маркеры оптимизируют и упрощают диагностику глиом головного мозга, а так же дополняют молекулярно-генетическую классификацию глиальных опухолей.
4. Повышенная экспрессия четырех микроРНК (-31, -21, -223 и -221) в тканях глиом головного мозга позволяет прогнозировать течение опухолевого процесса у больных с супратенториальными глиомами головного мозга и свидетельствует о его неблагоприятном прогнозе. Данные о показателях экспрессии этих четырех микроРНК позволяют выявлять пациентов, относящихся к группе высокого риска, и назначить им курс более эффективной адъювантной терапии в дополнение к стандартному протоколу лечения.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения

ДИ – доверительный интервал

ЗНО – злокачественные новообразования

ИГХ – иммуногистохимия

ИКЖ – индекс качества жизни

кДНК – комплементарная ДНК

КР – коэффициент риска

миРНК – микроРНК

МКБ – Международная классификация болезней

мРНК – матричная РНК

МРТ – магнитно-резонансная томография

МСКТ – мультиспиральная компьютерная томография

ОТ – обратная транскрипция

ПЦР – полимеразная цепная реакция

СОД – общая суммарная доза облучения

ТМО – твёрдая мозговая оболочка

ХТ – химиотерапия

ЦНС – центральная нервная система

ICD-O – International Classification of Diseases for Oncology

U58 – не кодирующая малая РНК

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Горбунова, В.А. Темодал – новые возможности и перспективы лечения опухолей головного мозга / В.А. Горбунова // Фарматека. – 2004. – № 18. – С. 15–20.
2. Захарова, Н.С. Дифференцированное лечение и адаптация больных с глиомами головного мозга труднодоступной локализации: автореф. дис ... канд. мед. наук / Захарова Наталья Станиславовна – Новосибирск, 2001. – 21 с.
3. Земская, А.Г. Опухоли головного мозга астроцитарного ряда / А.Г. Земская, Б.И. Лещинский. – Л.: Медицина, 1985. – 216 с.
4. Зозуля, Ю.А. Глиомы головного мозга / Ю.А. Зозуля. – Киев, 2007. – 636 с.
5. Зозуля, Ю.А. Проблемы современной нейроонкологии / Ю.А. Зозуля, В.Д. Розуменко, Н.И. Лисяный // Журнал АМН Украины. – 1999. – Т. 5, № 3. – С. 426–441.
6. Ионова, Т.И. Качество жизни онкологических больных / Т.И. Ионова, А.А. Новик, Ю.А. Сухонос // Вопросы онкологии. – 1998. – № 6. – С.749–752.
7. Ионова, Т.К. Понятие качества онкологического профиля жизни больных / Т.К. Ионова, А.А. Новик, Ю.А. Сухонос // Онкология. – 2000. – Т. 2, № 1–2. – С. 25 – 28.
8. Клинические рекомендации по диагностике и лечению больных с первичными опухолями головного мозга. – М.: Ассоциация онкологов России, 2014. – <http://www.oncology.ru/association/clinical-guidelines/2014/32.pdf>.
9. Кобяков, Г.Л. Химиотерапия в лечении злокачественных внутримозговых опухолей / Г.Л. Кобяков // Новое в химиотерапии. – 2002. – Т. 4, № 1. – С. 29–35.

10. Колесников, Н.Н. Сравнительная организация и происхождение некодирующих регуляторных РНК генов центра инактивации X-хромосомы человека и мыши / Н.Н. Колесников, Е.А. Елисафенко // Генетика. – 2010. – Т. 46. – С. 1386–1391.
11. Колотов, К.А. Иммуногистохимические особенности глиальных опухолей головного мозга / К.А. Колотов, О.В. Машковцев, Б.Н. Бейн // Медицинский альманах. – 2012. – № 4 (23). – С. 66–69.
12. Коновалов, А.Н. Магнитно-резонансная томография в нейрохирургии / А.Н. Коновалов, В.Н. Корниенко, К.Н. Кронин. – М.: Видар, 1997. – 472 с.
13. Константинова, М.М. Современное состояние и перспективы химиотерапии злокачественных опухолей головного мозга / М.М. Константинова // Современная онкология. – 2003. – Т. 4, № 3. – С. 1–13.
14. Коршунов, А.Г. Прогностическое значение онкоассоциированных белков и апоптоза в глиобластомах больших полушарий головного мозга / А.Г. Коршунов, А.В. Голанов, Р.В. Сычева, И.В. Пронин, Л.М. Фадеева // Архив патологии. – 2000. – № 1. – С. 7–11.
15. Кошкин, Ф.А. Экспрессия микроРНК и генов внутриклеточных сигнальных белков в глиомах различной степени злокачественности: автореф. дис. ... канд. биол. наук / Кошкин Филипп Александрович. – М., 2016. – 25 с.
16. Никифоров, Б.М. Опухоли головного мозга / Б.М. Никифоров, Д.Е. Мацко. – СПб.: Питер, 2003. – 320 с.
17. Новик, А.А. Концепция исследования качества жизни в медицине / А.А. Новик, Т.И. Ионова, П. Кайнд. – СПб., 1999. – 232 с.
18. Олюшин, В.Е. Глиальные опухоли. Распространенность в Санкт-Петербурге, результаты лечения / В.Е. Олюшин, А.Ю. Улитин // М-лы II съезда нейрохирургов России в Нижнем Новгороде 16–19 июня 1998. – СПб., 1998. – С. 148–149.

19. Олюшин, В.Е. Комбинированная специфическая противоопухолевая иммунотерапия лечения больных с продолженным ростом глиобластом: результаты пилотного исследования / В.Е. Олюшин, Г.С. Тиглиев, О.В. Острейко, М.В. Филатов // М-лы III съезда нейрохирургов России. – СПб., 2002.– С. 135–136.
20. Олюшин, В.Е. Специфическая противоопухолевая иммунотерапия на основе дендритных клеток в комплексном лечении больных злокачественными церебральными глиомами / В.Е. Олюшин, М.В. Филатов, А.Ю. Улитин, С.П. Бажанов. – СПб.: Знакъ, 2012. – 212 с.
21. Острейко, О.В. Продолженный рост злокачественных глиом супратенториальной локализации: повторные операции, катамнез и некоторые вопросы комбинированного лечения: автореф. дис. ... канд. мед. наук / Острейко Олег Викентьевич – СПб., 2001. – 23 с.
22. Пронин, И.К. Возможности компьютерной и магнитно-резонансной томографии в изучении перитуморального отека и внутримозговых опухолей супратенториального расположения / И.К. Пронин, А.В. Талонов, А.В. Петрайкин, К.В. Родионов // Вопросы нейрохирургии им. Н.Н. Бурденко. – 1996. – № 1. – С. 10–11.
23. Розуменко, В.Д. Характеристика перифокальных реакций в патогенезе клинических проявлений опухолей головного мозга / В.Д. Розуменко, С.А. Усатов // Украинский нейрохирургический журнал. – 2001. – № 4.– С. 92–98.
24. Розуменко, В.Д. Эпидемиология опухолей головного мозга: статистические факторы / В.Д. Розуменко // Украинский нейрохирургический журнал. – 2002. – № 3. – С. 47–48.
25. Савченко, А.Ю. Глиомы головного мозга / А.Ю. Савченко – Омск, 1997. – 312 с.

26. Савченко, А.Ю. Принципы лечения больных с глиомами головного мозга / А.Ю. Савченко, Н.С. Захарова // М-лы II съезда нейрохирургов России в Нижнем Новгороде 16–19 июня 1998. – СПб., 1998. – С. 110–111.
27. Ступак, В.В. Способ диагностики глиобластомы головного мозга: пат. 244473 РФ: МПК G01N 33/49 / Ступак В.В., Мишинов С.В., Леплина О.Ю., Тыринова Т.В., Останин А.А., Черных Е.Р.; заявитель и патентообладатель Федеральное государственное учреждение Новосибирский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии Федерального агентства по высокотехнологичной медицинской помощи, Учреждение Российской академии медицинских наук Научно-исследовательский институт клинической иммунологии Сибирского отделения. – № 2010126490; заявл. 28.06.2010; опубл. 10.03.2012, Бюл. № 7. – 7с.
28. Ступак, Е.В. Значение профиля мРНК в диагностике злокачественных глиом головного мозга / Е.В.Ступак, Ю.А.Веряскина, С.Е.Титов, Л.Г.Ахмерова, В.В.Ступак, С.В.Мишинов, Н.А.Копорушко, Ю.В.Петрова, В.В.Пустаханов, М.К.Иванов, И.Ф.Жумулёв, Н.Н. Колесников // Российский нейрохирургический журнал им. профессора А.Л. Поленова. – 2016. – Т. 8, № 2. – С. 48–52.
29. Ступак, Е.В. Способ интраоперационного забора биоптата глиомы и морфологически неизменной ткани головного мозга для молекулярно-генетических исследований: пат. 2651749 РФ: МПК G01N 33/574, G01N 1/28, A61B 1/05 / Ступак Е.В., Рабинович С.С., Ступак В.В., Колесников Н.Н., Титов С.Е., Ахмерова Л.Г., Веряскина Ю.А., Жимулев И.Ф.; заявитель и патентообладатель ФГБУ "ННИИТО им. Я.Л. Цивьяна" Минздрава России, ИМКБ СО РАН, ФГБУ АО "Вектор-Бест" – 2017115002; заявл. 27.04.2017; опубл. 23.04.2018, Бюл. № 12. – 4 с.
30. Улитин, А.Ю. Эпидемиология первичных опухолей головного мозга среди населения крупного города и пути совершенствования организации

- медицинской помощи больным с данной патологией: автореф. дис. ... канд. мед. наук / Улитин Алексей Юрьевич – СПб., 1997. – 23 с.
31. Чехун, В.Ф. Современные взгляды на механизмы формирования лекарственной устойчивости опухолей / В.Ф. Чехун, Ю.В. Шишова // Онкология. – 2000. – Т. 2, № 1. – С. 11–15.
 32. Ambros, V. The functions of animal microRNAs / V Ambros // Nature. – 2004. – Vol. 431, N 7006. – P. 350–355.
 33. Andorfer, CA. MicroRNA signatures: clinical biomarkers for the diagnosis and treatment of breast cancer // Trends Mol Med. – 2011. Vol. 17, N 6. – P. 313–319.
 34. Ansari, KI. Glucose-based regulation of miR-451/AMPK signaling depends on the OCT1 transcription factor / KI Ansari, D Ogawa, AK Rooj, SE Lawler, AM Krichevsky, MD Johnson, EA Chiocca, A Bronisz, J Godlewski // Cell Rep. – 2015. – N 11. – P. 902–909, doi: 10.1016/j.celrep.2015.04.016.
 35. Arroyo, JD. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma / JD Arroyo, JR Chevillet, EM Kroh, IK Ruf, CC Pritchard, DF Gibson, PS Mitchell, CF Bennett, EL Pogosova-Agadjanyan, DL Stirewalt, JF Tait, M Tewari // Proc Natl Acad Sci USA. – 2011 – Vol. 108, N 12. – P. 5003–5008.
 36. Babu, R. Glioblastoma in the elderly: the effect of aggressive and modern therapies on survival / R Babu, JM Komisarow, VJ Agarwal, S Rahimpour, A Iyer, D Britt, IO Karikari, PM Grossi, S Thomas, AH Friedman, C Adamson // J Neurosurg. – 2015. – Vol. 124 – P. 998-1007.
 37. Bai-Sheng, Huang. MicroRNA-223 promotes the growth and invasion of glioblastoma cells by targeting tumor suppressor PAX6 / Huang Bai-Sheng, Luo Qi-Zhi, Han Yang, Li Xiao-Bo, Cao Li-Jun, Wu Li-Xiang // Oncol Rep. – 2013. – N 30. – P. 2263–2269.
 38. Bandres, E. MicroRNA-451 regulates macrophage migration inhibitory factor production and proliferation of gastrointestinal cancer cells / E Bandres, N

- Bitarte, F Arias, J Agorreta, P Fortes, X Agirre, R Zarate, JA Diaz–Gonzalez, N Ramirez, JJ Sola, P Jimenez, J Rodriguez, J Garcia–Foncillas // *Clin Cancer Res.* – 2009. – N 15. – P. 2281–2290.
39. Berger, MS. Functional mapping-guided resection of low-grade gliomas / MS Berger // *Clin. Neurosurg.* –1995.–Vol. 42.–P. 437–452.
40. Bernstein, M. Neuro–oncology The Essentials / M Bernstein, MS Berger (Ed.) // Thieme Medical Publishers, Inc.– New York, 2000. – P. 508.
41. Best, MG. Liquid biopsies in patients with diffuse glioma / MG Best, N Sol, S Zijl, JC Reijneveld, P Wesseling, T Wurdinger // *Acta Neuropathol.* – 2015. – Vol. 129, N 6. – P. 849–865, doi: 10.1007/s00401-015-1399-y.
42. Bhattacharjee A.K., Nagashima T., Kondoh T., Tamaki N. Quantification of early blood-brain barrier disruption by in situ brain perfusion technique // *Brain Res. Brain Res. Protoc.* -2001. -V.2.-P.126-131.
43. Bier, A. MicroRNA-137 is downregulated in glioblastoma and inhibits the stemness of glioma stem cells by targeting RTVP-1 / A Bier, N Giladi, N Kronfeld, HK Lee, S Cazacu, S Finniss, C Xiang, L Poisson, AC de Carvalho, S Slavin, E Jacoby, M Yalon, A Toren, T Mikkelsen, C Brodie // *Oncotarget.* – 2013. – Vol. 4, N 5. – P. 665–676.
44. Bradly, LW. A new treatment for high grade gliomas of brain / LW Bradly // *Cancer J. Fuag.* – 1999. – Vol. 162.– P. 28–33.
45. Brock, CB. Current perspectives in gliomas (Review) / CB Brock // *Medical Oncology.* – 1997. – Vol. 14, N 2. – P. 103–120.
46. Calin, GA. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers / GA Calin, C Sevignani, CD Dumitru, T Hyslop, E Noch, S Yendamuri, M Shimizu, S Rattan, F Bullrich, M Negrini, CM Croce // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2004. – Vol. 101, N 9. – P. 2999–3004.
47. Calin, GA. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers / GA Calin, C Sevignani, CD Dumitru, T

- Hyslop, E Noch, S Yendamuri, M Shimizu, S Rattan, F Bullrich, M Negrini, CM Croce // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 2004. – Vol. 101, N 9. – P. 2999–3004.
48. Chaudhry, MA. Radiation-induced micro-RNA modulation in glioblastoma cells differing in DNA-repair pathways / MA Chaudhry, H Sachdeva, RA Omaruddin // *DNA Cell Biol*. – 2010. – Vol. 29, N 9. – P. 553–561.
 49. Chen, G. MicroRNA-181a sensitizes human malignant glioma U87MG cells to radiation by targeting Bcl-2 / G Chen, W Zhu, D Shi, L Lv, C Zhang, P Liu, W Hu // *Oncol Rep*. – 2010. – Vol. 23, N 4. – P. 997–1003.
 50. Chen, L. Downregulation of miR-221/222 sensitizes glioma cells to temozolomide by regulating apoptosis independently of p53 status / L Chen, J Zhang, L Han, A Zhang, C Zhang, Y Zheng, T Jiang, P Pu, C Jiang, C Kang // *Oncol Rep*. – 2012. – Vol. 27, N 3. – P. 854–860.
 51. Chen, Y. MicroRNA-21 down-regulates the expression of tumor suppressor PDCD4 in human glioblastoma cell T98G / Y Chen, W Liu, T Chao, Y Zhang, X Yan, Y Gong, B Qiang, J Yuan, M Sun, X Peng // *Cancer Lett*. – 2008. – Vol. 272, N 2. – P. 197–205.
 52. Choucair, AK. Development of multiple lesions during radiation therapy and chemotherapy in patients with gliomas / AK Choucair, VA Levin, PH Gutih, RL Davis, P Silver, MS Edwards, CB Wilson. // *J. Neurosurg*. – 1986. – Vol. 65. – P. 654–658.
 53. Ciafre, SA. Extensivemodulation of a set ofmicroRNAs in primary glioblastoma / SA Ciafre, S Galardi, A Mangiola, M Ferracin, CG Liu, G Sabatino, M Negrini, G Maira, CM Croce, MG Farace // *Biochem. Biophys. Res. Commun*. – 2005. – N 334. – P. 1351–1358.
 54. Cimmino, A. MiR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2 / A Cimmino, GA Calin, M Fabbri, MV Iorio, M Ferracin, M Shimizu, SE Wojcik, RI Aqeilan, S Zupo, M Dono, L Rassenti, H Alder, S Volinia, CG Liu, TJ

- Kipps, M Negrini, CM Croce // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2005. – Vol. 102, N 39. – P. 13944–13949.
55. Clarke, J. Recent advances in therapy for glioblastoma / J Clarke, N Butowski, S Chang // *Arch Neurol.* – 2010. – Vol. 67, N 3.– P. 279–283.
56. Claus, EB. Survival rates in patients with low-grade glioma after intraoperative magnetic resonance image guidance / EB Claus, A Horlacher, L Hsu, RB Schwartz, D Dello-Iacono, F Talos, FA Jolesz, PM Black // *Cancer.* – 2005. – Vol. 103, N 6. – P. 1227–1233.
57. Coakley, KJ. Pilocytic astrocytomas: well-demarcated magnetic resonance appearance despite frequent infiltration histologically / KJ Coakley, J Huston, BW Scheithauer, G Forbes, PJ Kelly // *Mayo Clinical Proceeding.* – 1995. – Vol. 70, N 8. – P. 747–751.
58. Conaco, C, Otto, S., Han, J.J., Mandel, G. Reciprocal actions of REST and a microRNA promote neuronal identity / C Conaco, S Otto, JJ Han, G Mandel // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2006. – N 103. – P. 2422–2427.
59. Conti, A. MiR-21 and 221 upregulation and miR-181b downregulation in human grade II–IV astrocytic tumors / A Conti, M Aguenouz, D La Torre, C Tomasello, S Cardali, FF Angileri, F Maio, A Cama, A Germano, G Vita, F Tomasello // *J Neurooncol.* – 2009. – Vol. 93, N 3. – P. 325–332.
60. Cox, DR. Regression models and life tables / DR Cox // *Journal of the Royal Statistical Society.* – 1972. – Vol. 34, N 2. – P. 187–220.
61. Cristóbal, I. Downregulation of microRNA-199b predicts unfavorable prognosis and emerges as a novel therapeutic target which contributes to PP2A inhibition in metastatic colorectal cancer / I Cristóbal, C Caramés, R Rincón, R Manso, J Madoz–Gúrpide, B Torrejón, P González–Alonso, F Rojo, J García–Foncillas // *Oncotarget.* – 2017. – N 8. – P. 40169–40180.
62. Davis, ME. Evidence of RNAi in humans from systemically administered siRNA via targeted nanoparticles / ME Davis, JE Zuckerman, CH Choi, D

- Seligson, A Tolcher, CA Alabi, Y Yen, JD Heidel, A Ribas // *Nature*. – 2010. – Vol. 464, N 7291. – P. 1067–1070.
63. Davis, ME. The first targeted delivery of siRNA in humans via a self-assembling, cyclodextrin polymer-based nanoparticle: from concept to clinic / ME Davis // *Mol Pharm*. – 2009. – Vol. 6, N 3. – P. 659–668.
64. DeAngelis, LM. Brain tumors / LM DeAngelis // *N. Engl. J. Med*. – 2001. – Vol. 344. – P. 114–123.
65. DeVita, VT. The relationship between tumor mass and resistance to chemotherapy. Implications to surgical adjuvant treatment of cancer / VT DeVita // *Cancer*. – 1983. – Vol. 51, N 4. – P. 1209–1220.
66. Eernest, E. Cerebral astrocytomas: histopathologic correlation of MRI and CT contrast enhancement with stereotaxic biopsy / E Eernest, PJ Kelly, BW Sheithauer, BA Kall, TL Cascino, RL Ehman, GS Forbes, PL Axley // *Radiology*. – 1998. – Vol. 166. – P. 823–827.
67. Kreklau, EL. Comparison of single- versus double-bolus treatments of O6-benzylguanine for depletion of O6-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT) activity in vivo: development of a novel fluorometric oligonucleotide assay for measurement of MGMT activity / EL Kreklau, N Liu, Z Li, K Cornetta, LC Erickson // *J. Pharm. Exper. Therapeutics*. – 2001. – Vol. 297. – P. 524 – 530.
68. Fadul, CE. Immune modulation effects of concomitant temozolomide and radiation therapy on peripheral blood mononuclear cells in patients with glioblastoma multiforme / CE Fadul, JL Fisher, J Gui, TH Hampton, AL Côté, MS Ernstoff // *Neuro Oncol*. – 2011. – Vol. 13, N 4. – P. 393–400.
69. Fan, MQ. Decrease expression of microRNA-20a promotes cancer cell proliferation and predicts poor survival of hepatocellular carcinoma / MQ Fan, CB Huang, Y Gu, Y Xiao, JX Sheng, L Zhong // *J Exp Clin Cancer Res*. – 2013. – Vol. 32, N 1. – P. 21.

70. Fasano V.A., Zeme S., Frego L., Gunetti R. Ultrasonic aspiration in the surgical treatment of intracranial tumours // *J. Neurosurg. Sci.* -1981. -V.25, №1. - P.35-40.
71. Fei, P. P53 and radiation responses / P Fei, WS El-Deiry // *Oncogene.* – 2003. – Vol. 22. – P. 5774–5783.
72. Feng, YA. MicroRNA 182 inhibits the proliferation and migration of glioma cells through the induction of neuritin expression / YA Feng, T Liu, Y Wu // *Oncol Lett.* – 2015. – Vol. 10, N 2. – P. 1197–1203.
73. Ferretti, E. MicroRNA profiling in human medulloblastoma / E Ferretti, E De Smaele, A Po, L Di Marcotullio, E Tosi, MS Espinola, C Di Rocco, R Riccardi, F Giangaspero, A Farcomeni, I Nofroni, P Laneve, U Gioia, E Caffarelli, I Bozzoni, I Screpanti, A Gulino // *Int. J. Cancer.* – 2009. – N 124. – P. 568–577.
74. Finley J.L., Silverman J.F., Dickens M.A. Immunocytochemical evaluation of central nervous system tumors obtained by the Cavitations ultrasonic surgical aspirator // *Diagn. Cytopathol.* -1990. - V.6, №5. -P.308-312.
75. Fire, A. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* / A Fire, S Xu, MK Montgomery, SA Kostas, SE Driver, CC Mello // *Nature.* – 1998. – Vol. 391, N 6669. – P. 806–811.
76. Fornari, F. MiR-221 controls CDKN1C/p57 and CDKN1B/p27 expression in human hepatocellular carcinoma / F Fornari, L Gramantieri, M Ferracin, A Veronese, S Sabbioni, GA Calin, GL Grazi, C Giovannini, CM Croce, L Bolondi, M Negrini // *Oncogene.* – 2008. – Vol. 27.– P. 5651–5661.
77. Fowler, A. MiR-124a is frequently down-regulated in glioblastoma and is involved in migration and invasion / A Fowler, D Thomson, K Giles, S Maleki, E Mreich, H Wheeler, P Leedman, M Biggs, R Cook, N Little, B Robinson, K McDonald // *Eur J Cancer.* – 2011. – Vol. 47, N 6. – P. 953-963, doi: 10.1016/j.ejca.2010.11.026.

78. Fu, TG. MiR-143 inhibits oncogenic traits by degrading NUA2 in glioblastoma / TG Fu, L Wang, W Li, JZ Li, J Li // *Int J Mol Med.* – 2016. – Vol. 37, N 6. – P. 1627–1635.
79. Gal, H. MIR-451 and Imatinib mesylate inhibit tumor growth of Glioblastoma stem cells / H Gal, G Pandi, AA Kanner, Z Ram, G Lithwick–Yanai, N Amariglio, G Rechavi, D Givol // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2008. – N 376. – P. 86–90.
80. Galardi, S. NF- κ B and c-Jun induce the expression of the oncogenic miR-221 and miR-222 in prostate carcinoma and glioblastoma cells / S Galardi, N Mercatelli, MG Farace, SA Ciafre // *Nucleic Acids Res.* – 2011. – Vol. 39, N 9. – P. 3892–3902.
81. Gammeltoft, S. Insulin-like growth factors in the nervous system: evolution, fetal development, maintenance and tumor formation in: *The insulin-like growth factors and their regulatory proteins* / S Gammeltoft // LeRoith D. ed. N Y: Elsevier Science. – 1994. – P. 295–305.
82. Godlewski, J. MicroRNA-451 regulates LKB1/AMPK signaling and allows adaptation to metabolic stress in glioma cells / J Godlewski, MO Nowicki, A Bronisz, G Nuovo, J Palatini, M De Lay, J Van Brocklyn, MC Ostrowski, EA Chiocca, SE Lawler // *Mol Cell.* – 2010. – Vol. 37, N 5. – P. 620–632.
83. Godlewski, J. Targeting of the Bmi-1 oncogene/stem cell renewal factor by microRNA-128 inhibits glioma proliferation and self-renewal / J Godlewski, MO Nowicki, A Bronisz, S Williams, A Otsuki, G Nuovo, A Raychaudhury, HB Newton, EA Chiocca, S Lawler // *Cancer Res.* – 2008. – Vol. 68, N 22. – P. 9125–9130.
84. Gomez, GG. Suppression of microRNA-9 by mutant EGFR signaling upregulates FOXP1 to enhance glioblastoma tumorigenicity / GG Gomez, S Volinia, CM Croce, C Zanca, M Li, R Emmett, DH Gutmann, CW Brennan, FB Furnari, WK Cavenee // *Cancer Res.* – 2014. – Vol. 74, N 5. – P. 1429–1439.

85. Han, L. MicroRNA-21 expression is regulated by beta-catenin/STAT3 pathway and promotes glioma cell invasion by direct targeting RECK / L Han, X Yue, X Zhou, FM Lan, G You, W Zhang, KL Zhang, CZ Zhang, JQ Cheng, SZ Yu, PY Pu, T Jiang, CS Kang // *CNS Neurosci* – 2012 - Vol. 18. - N 7. – P. 573-583.
86. Hao, J. MiR-221/222 is the regulator of Cx43 expression in human glioblastoma cells / J Hao, C Zhang, A Zhang, K Wang, Z Jia, G Wang, L Han, C Kang, P Pu // *Oncol Rep.* – 2012. – Vol. 27.– P. 1504–1510.
87. Harsh, GR. Reoperation for recurrent glioblastoma and anaplastic astrocytoma / GR Harsh, VA Levin, PH Gutin, M Seager, P Silver, CB Wilson // *Neurosurgery* – 1987 – Vol. 21. – N 5. – P. 615–621.
88. Hill, C. Genetic markers in glioblastoma: prognostic significance and future therapeutic implications / C Hill, SB Hunter, DJ Brat // *Adv. Anat. Pathol.* – 2003. – Vol. 10. – P. 212–217.
89. Hu, X. Targeting microRNA-23a to inhibit glioma cell invasion via HOXD10 / X Hu, D Chen, Y Cui, Z Li, J Huang // *Sci Rep.* – 2013.–Vol. 3. – P. 3423.
90. Hua, D. Human miR-31 targets radixin and inhibits migration and invasion of glioma cells / D Hua, D Ding, X Han, W Zhang, N Zhao, G Foltz, Q Lan, Q Huang, B Lin // *Oncol Rep.* – 2012. – N 3. –P. 700–706.
91. Hwang, do W. Smart magnetic fluorescent nanoparticle imaging probes to monitor microRNAs / W Hwang do, IC Song, DS Lee, S Kim // *Small.* – 2010. – Vol. 6, N 1. – P. 81–88.
92. Iwama, T. Correlation between magnetic resonance imaging and histopatology of intracranial glioma / T Iwama, K Yamada, N Sakai, T Andoh, T Nakashima, T Hirata, T Funakoshi. // *Neurol Res.* – 1991. – Vol. 13, N 1. – P. 49–54.
93. Jan Jacob A. Mooij. The implementation of fluorescent guided surgery for high-grade gliomas // *Perspectives in central nervous system malignancies.* - Warsaw, 2007. -P.137-143.

94. Jansen, M. Molecular pathology in adult gliomas: diagnostic, prognostic, and predictive markers / M Jansen, S Yip, DH Louis // *Lancet Neurol* – 2010. – Vol. 9. – P. 717–726.
95. Jiang, L. MicroRNA-30e* promotes human glioma cell invasiveness in an orthotopic xenotransplantation model by disrupting the NF-kappaB/IkappaBalpha negative feedback loop / L Jiang, C Lin, L Song, J Wu, B Chen, Z Ying, L Fang, X Yan, M He, J Li, M Li // *J Clin Invest.* – 2012. – Vol. 122, N 1. – P. 33–47.
96. Jiang, L. MiR-182 as a prognostic marker for glioma progression and patient survival / L Jiang, P Mao, L Song, J Wu, J Huang, C Lin, J Yuan, L Qu, SY Cheng, J Li // *Am. J. Pathol.* – 2010. – Vol. 177, N 1. – P. 29–38.
97. Kanaly, WC. Clinical applications of a peptide-based vaccine for glioblastoma / WC Kanaly, D Ding, AB Heimberger, JH Sampson // *Neurosurg Clin N Am.* – 2010. – Vol. 21, N 1. – P. 95–109.
98. Kavsan, V. Characterization of genes with increased expression in human glioblastomas / V Kavsan, K Shostak, V Dmitrenko, Y Zozulya, V Rozumenko, J Demotes-Mainard // *Цитологияи генетика.* – 2005. – Т. 39, N 6. – С. 37–49.
99. Keles, GE. Low-grade hemispheric gliomas in adults: a critical review of extent of resection as a factor influencing outcome / GE Keles, K Lamborn, MS Berger // *Neurosurgery.* – 2001. – Vol. 95. – P. 735–745.
100. Kim, JK. Molecular imaging of a cancer-targeting theragnostics probe using a nucleolin aptamer-and microRNA-221 molecular beacon-conjugated nanoparticle / JK Kim, KJ Choi, M Lee, MH Jo, S Kim // *Biomaterials.* – 2012. – Vol. 33, N 1. – P. 207–217.
101. Kolesnikov, NN. Micro-rna-diagnostic and typing of brain tumours / NN Kolesnikov, SE Titov, MK Ivanov, Yu A Veryaskina, LG Akhmerova, IF Zhimulev, VV Stupak, A Lekhner, EV Stupak // *10 th Asian Congress of Neurological Surgeons: Abstract Book.* – 2014. – P. 43.

102. Kollmann, K. Kinase-Independent Function of CDK6 Links the Cell Cycle to Tumor Angiogenesis / K Kollmann, G Heller, C Schneckenleithner, W Warsch, R Scheicher, RG Ott, M Schäfer, S Fajmann, M Schlederer, AI Schiefer, U Reichart, M Mayerhofer, C Hoeller, S Zöchbauer-Müller, D Kerjaschki, C Bock, L Kenner, G Hoefler, M Freissmuth, AR Green, R Moriggl, M Busslinger, M Malumbres, V Sexl // *Cancer Cell*. – 2013. – Vol. 24, N 2. – P. 167–181, doi: 10.1016/j.ccr.2013.07.012.
103. Krex, D. Long-term survival with glioblastoma multiforme / D Krex, B Klink, C Hartmann, A von Deimling, T Pietsch, M Simon, M Sabel, JP Steinbach, O Heese, G Reifenberger, M Weller, G Schackert // *Brain*. – 2011. – Vol. 134, N 8. – P. 2596–2606.
104. Kros, JM. Circulating glioma biomarkers./ JM Kros, DM Mustafa, LJ Dekker, PA Sillevs Smitt, TM Luider, PP Zheng // *Neuro Oncol.* – 2015. – Vol. 17, N 3. – P. 343–360, doi: 10.1093/neuonc/nou207.
105. Kulkarni, MM. Digital multiplexed gene expression analysis using the NanoStringCounter system / MM Kulkarni // *CurrProtocMol Biol*. – 2011. – Vol. 25. – P. 25B.10.
106. Labussiere, M. Prognostic markers in gliomas / M Labussiere, XW Wang, A Idbaih, F Ducray, M Sanson // *Future Oncology*. – 2010. – Vol. 6, N 5. – P. 733–739.
107. Lages, E. MicroRNA and target protein patterns reveal physiopathological features of glioma subtypes / E Lages, A Guttin, M El Atifi, C Ramus, H Ipas, I Dupre, D Rolland, C Salon, C Godfraind, F deFraipont, M Dhobb, L Pelletier, D Wion, E Gay, F Berger, JP Issartel // *PLoS One*. – 2011. – Vol. 6, N 5. – P. e20600.
108. Lakomy, R. MiR-195, miR-196b, miR-181c, miR-21 expression levels and O-6-methylguanine-DNA methyltransferase methylation status are associated with clinical outcome in glioblastoma patients / R Lakomy, J Sana, S Hankeova, P Fadrus, L Kren, E Lzicarova, M Svoboda, H Dolezelova, M

- Smrcka, R Vyzula, J Michalek, M Hajduch, O Slaby // *Cancer Sci.* – 2011. – Vol. 102, N 12. – C. 2186–2190.
109. Lan, F. MiR-144-3p exerts anti-tumor effects in glioblastoma by targeting c-Met. / F Lan, H Yu, M Hu, T Xia, X Yue // *J Neurochem.* – 2015. – Vol. 135, N 2. – P. 274–286, doi: 10.1111/jnc.13272.
110. Lau Lau, NC. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans* / NC Lau, LP Lim, EG Weinstein, DP Bartel // *Science.* – 2001. – Vol. 294, – N 5543. - P. 858–86.
111. Laws, ER. Radical resection for the treatment of glioma / ER Laws // *Clinic. Neurosurg.* – 1995. – Vol. 42. – P. 480–487.
112. Laws, ER. Survival following surgery and prognostic factors for recently diagnosed malignant glioma: data from the glioma outcomes project / ER Laws, IF Parney, W Huang, F Anderson, AM Morris, A Asher, KO Lillehei, M Bernstein, H Brem, A Sloan, MS Berger, S Chang // *J. Neurosurg.* – 2003. – Vol. 99. – P.467–473.
113. Lebok, P. Partial PTEN deletion is linked to poor prognosis in breast cancer / P Lebok, V Kopperschmidt, M Kluth, C Hube-Magg, C Özden, K Hussein, A Mittenzwei, A Lebeau, I Witzel, L Wölber, S Mahner, F Jänicke, S Geist, P Paluchowski, C Wilke, U Heilenkötter, R Simon, G Sauter, L Terracciano, R Krech, A von d Assen, V Müller, E Burandt // *BMC Cancer.* – 2015. – Vol. 15. – P.963.
114. Lee Y.S., Dutta A. MicroRNAs in cancer // *Annu Rev Pathol.* 2009. T. 4. C. 199-227.
115. Lee, KM. MicroRNA-7 increases radiosensitivity of human cancer cells with activated EGFR-associated signaling / KM Lee, EJ Choi, IA Kim // *Radiother Oncol.* – 2011. – Vol. 101, N 1. – P. 171–176.
116. Li, KK. MiR-137 suppresses growth and invasion, is downregulated in oligodendroglial tumors and targets CSE1L / KK Li, L Yang, JC Pang, AK

- Chan, L Zhou, Y Mao, Y Wang, KM Lau, WS Poon, Z Shi, HK Ng // *Brain Pathol.* – 2013. – Vol. 23, N 4. – P. 426–439.
117. Li, M. MicroRNA in Human Glioma / M Li, J Li, L Liu, W Li, Y Yang, J Yuan // *Cancers (Basel).* – 2013. – Vol. 5, N 4. – P. 1306–1331.
118. Li, X. MiR-16-1 plays a role in reducing migration and invasion of glioma cells / X Li, N Ling, Y Bai, W Dong, GZ Hui, D Liu, J Zhao, J Hu // *Anat Rec (Hoboken).* – 2013. – Vol. 296, N 3. – P. 427–432.
119. Lian, S. Anti-miRNA-23a Oligonucleotide Suppresses Glioma Cells Growth by Targeting Apoptotic Protease Activating Factor-1 / S Lian, R Shi, T Bai, Y Liu, W Miao, H Wang, X Liu, Y Fan // *Curr Pharm Des.* – 2013. – Vol. 19, N 35. – P. 6382–6389.
120. Liu, Z. MiR-7 inhibits glioblastoma growth by simultaneously interfering with the PI3K/ATK and Raf/MEK/ERK pathways / Z Liu, Z Jiang, J Huang, S Huang, Y Li, S Yu, S Yu, X Liu // *Int J Oncol.* – 2014. – Vol. 44, N 5. – P. 1571–1580.
121. Livak, KJ. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method / KJ Livak, TD Schmittgen // *Methods.* – 2001. – Vol. 25, N 4. – P. 402–408.
122. Louis, DN Molecular pathology of malignant gliomas / DN Louis // *Annu Rev Pathol.* – 2006. – Vol. 1. – P. 97–117.
123. Louis, DN. A molecular genetic model of astrocytoma histopathology / DN Louis // *Brain Pathol.* – 1997. – Vol. 7.– P.755–764.
124. Louis, DN. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system / DN Louis, H Ohgaki, OD Wiestler, WK Cavenee, PC Burger, A Jouvett, BW Scheithauer, P Kleihues // *ActaNeuropathol.* – 2007. – Vol.114, N 2. – P. 97–109.
125. Louis, DN. WHO Classification of tumours of the central nervous system. / DNLouis, H Ohgaki, OD Wiestler, WK Cavenee. – Revised 4th ed. – Lyon: IARC, 2016. – 408 p.

126. Maes, W. DC vaccination with anti-CD25 treatment leads to long-term immunity against experimental glioma / W Maes, GG Rosas, B Verbinnen, S De Vleeschouwer, JL Ceuppens, SW Van Gool // *Neuro-Oncology* – 2009. – Vol. 12, N 3. – P. 529–542.
127. Matsucado, Y. The growth of glioblastoma multiform in neurosurgical practice / Y Matsucado, CS MacCarty, JW Kernohan // *J. Neurosurg.* – 1961. – Vol. 18. – P. 636–644.
128. Matsukado, K. Intracarotid low dose bradykinin infusion selectively increases tumor permeability through activation of bradykinin B2 receptors in malignant gliomas / K Matsukado, M Sugita, KL Black // *Brain Res.* – 1998. – Vol. 792. – P. 10–15.
129. Maziere, P. Prediction of microRNA targets / P Maziere, AJ Enright // *Drug Discov Today.* – 2007. – Vol. 12, N 11–12. – P. 452–458.
130. McCormack, BM. Treatment and survival of low-grade astrocytoma in adults / BM McCormack, DC Miller, GN Budzilovich, GJ Voorhees, J Ransohoff // *Neurosurgery.* – 1992. – Vol. 31, N 4. – P. 636–642.
131. Mehdorn, HM. Intraoperative magnetic resonance imaging / HM Mehdorn, A Nadavi, L Dorner // *М-лы IV съезда нейрохирургов России. М., 2006.* – С. 138.
132. Metz, CE. Basic principles of ROC analysis / CE Metz // *Semin Nucl Med.* – 1978. – Vol. 8.– P. 283–298.
133. Mittler, MA. Observer reliability in histological grading of astrocytoma stereotactic biopsies / MA Mittler, BC Walters, EG Stopa // *Journal of Neurosurgery.* – 1996. – Vol. 85, N 6. – P. 1091–1094.
134. Munoz, JL. Temozolomide resistance in glioblastoma occurs by miRNA-9-targeted PTCH1, independent of sonic hedgehog level / JL Munoz, V Rodriguez-Cruz, SH Ramkissoon, KL Ligon, SJ Greco, P Rameshwar // *Oncotarget.* – 2015. – Vol. 6, N 2. – P. 1190–1201.

135. Nass, D. MiR-92b and miR-9/9* are specifically expressed in brain primary tumors and can be used to differentiate primary from metastatic brain tumors / D Nass, S Rosenwald, E Meiri, S Gilad, H Tabibian-Keissar, A Schlosberg, H Kuker, N Sion-Vardy, A Tobar, O Kharenko, E Sitbon, G Lithwick Yanai, E Elyakim, H Cholakh, H Gibori, Y Spector, Z Bentwich, I Barshack, N Rosenfeld // *Brain Pathol.* – 2009. – Vol. 19, N 3. – P. 375–383.
136. Nass, D. MiR-92b and miR-9/9* are specifically expressed in brain primary tumors and can be used to differentiate primary from metastatic brain tumors / D Nass, S Rosenwald, E Meiri, S Gilad, H Tabibian-Keissar, A Schlosberg, H Kuker, N Sion-Vardy, A Tobar, O Kharenko, E Sitbon, G Lithwickyanai, E Elyakim, H Cholakh, H Gibori, Y Spector, Z Bentwich, I Barshack, N Rosenfeld // *Brain Pathol.* – 2009. – Vol. 19, N 3. – P. 375–383.
137. Nelson, PT. RAKE and LNA-ISH reveal microRNA expression and localization in archival human brain / PT Nelson, DA Baldwin, WP Kloosterman, S Kauppinen, RH Plasterk, Z Mourelatos // *RNA (New York, N.Y.)*. – 2006. – Vol. 12. – P. 187–191.
138. Nogueira, L. Blockade of the NF κ B pathway drives differentiating glioblastoma-initiating cells into senescence both in vitro and in vivo / L Nogueira, P Ruiz-Onta \tilde{n} on, A Vazquez-Barquero, M Lafarga, MT Berciano, B Aldaz, L Grande, I Casafont, V Segura, EF Robles, D Suarez, LF Garcia, JA Martinez-Climent, F JL ernandez-Luna // *Oncogene*. – 2011. – Vol. 30, N 32. – P. 3537-48.
139. Nutt, CL. Gene expression-based classification of malignant gliomas correlates better with survival than histological classification / CL Nutt, DR Mani, RA Betensky, P Tamayo, JG Cairncross, C Ladd, U Pohl, C Hartmann, ME McLaughlin, TT Batchelor, PM Black, A von Deimling, SL Pomeroy, TR Golub, DN Louis. // *Cancer Res.* – 2003. – Vol. 63.– P. 1602–1607.
140. O'Day, E. MicroRNAs and their target gene networks in breast cancer / E O'Day, A Lal // *Breast Cancer Res.* – 2010. – Vol. 12. – P. 201.

141. O'Dell, MW. Validity of the Karnofsky Performance Status in an HIV-infected sample / MW O'Dell, DP Lubeck, P O'Driscoll, S Matsuno // *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol.* – 1995. – Vol.10, N 3. – P. 350–357.
142. Ohgaki, H. Epidemiology and etiology of gliomas / H Ohgaki, P Kleihues // *Acta Neuropathol.* – 2005. – Vol. 109. – P. 93–108.
143. Okamoto, Y. Population-based study on incidence, survival rates, and genetic alterations of low-grade diffuse astrocytomas and oligodendrogliomas / Y Okamoto, PL Di Patre, C Burkhard, S Horstmann, B Jourde, M Fahey, D Schüler, NM Probst-Hensch, MG Yasargil, Y Yonekawa, UM Lütolf, P Kleihues, H Ohgaki // *Acta Neuropathol.* – 2004. – Vol. 108. – P. 49–56.
144. Ostrom, QT. CBTRUS statistical report: primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2010–2014 / QT Ostrom, H Gittleman, P Liao, T Vecchione-Koval, Y Wolinsky, C Kruchko, JS Barnholtz-Sloan // *Neuro Oncol.* – 2017. – November, 6. – N 19(suppl_5):v1–v88.
145. Ostrom, QT. Epidemiology of glioblastoma and trends in glioblastoma survivorship / QT Ostrom, P Liao, LC Stetson, JS Barnholtz-Sloan // *Glioblastoma.* – Elsevier Inc., 2016. –P.11–19.
146. Ostrom, QT. The epidemiology of glioma in adults: a “state of the science” review / QT Ostrom, L Bauchet, FG Davis, I Deltour, JL Fisher, CE Langer, JS Barnholtz-Sloan // *Neuro Oncol.* – 2014. – Vol. 16, N 7 – P. 896–913.
147. Palma, L. Trends in surgical management of astrocytomas and other brain gliomas / L Palma // *Forum -Trends in Exp. & Clin. Med.* – 1998. – Vol. 8, N 3. – P. 272–281.
148. Papagiannakopoulos, T. Pro-neural miR-128 is a glioma tumor suppressor that targets mitogenic kinases / T Papagiannakopoulos, D Friedmann-Morvinski, P Neveu, JC Dugas, RM Gill, E Huillard, C Liu, H Zong, DH Rowitch, BA Barres, IM Verma, KS Kosik // *Oncogene.* – 2012. – Vol. 31, N 15. –P. 1884–1895.

149. Petersen, D. Three microarray platforms: an analysis of their concordance in profiling gene expression / D Petersen, GVR Chandramouli, J Geoghegan, J Hilburn, J Paarlberg, CH Kim, D Munroe, L Gangi, J Han, R Puri, L Staudt, J Weinstein, JC Barrett, J Green, ES Kawasaki. // *BMC Genomics*. – 2005. – Vol. 6. – P. 63.
150. Pool, JL. The management of recurrent gliomas / JL Pool // *Clin. Neurosurg*. – 1969. – Vol. 15, N 8. – P. 265–287.
151. Puthalakath, H. Bmf: a proapoptotic BH3-only protein regulated by interaction with the myosin V actin motor complex, activated by anoikis / H Puthalakath, A Villunger, LA O'Reilly, JG Beaumont, L Coultas, RE Cheney, DC Huang, A Strasser // *Science*. – 2001. – Vol. 293, N 5536. – P. 1829–1832.
152. Qiuping, Ding, MiR-223-3p overexpression inhibits cell proliferation and migration by regulating inflammation-associated cytokines in glioblastomas / Ding Qiuping, Shen Liang, Nie Xiaohu, Lu Bin, Pan Xuyan, Su Zhongzhou, Yan Ai, Yan Renfu, Zhou Yue, Li Liqin, Xu Jie // *Pathol Res Pract*. – 2018. – Vol. 214, N 9. – P. 1330–1339, doi: 10.1148/radiol.2018172131.
153. Qu, Y. MiR-182 and miR-203 induce mesenchymal to epithelial transition and self-sufficieny of growth signals via repressing SNAI2 in prostate cells / Y Qu, WC Li, MR Hellem, K Rostad, M Popa, E McCormack, AM Oyan, KH Kalland, XS Ke // *Int J Cancer*. – 2013. – Vol. 133, N 3. – P. 544–555.
154. Quintavalle, C. MiR-221/222 overexpression in human glioblastoma increases invasiveness by targeting the protein phosphate PTPmu / C Quintavalle, M Garofalo, C Zanca, G Romano, M Iaboni, M del Basso De Caro, JC Martinez-Montero, M Incoronato, G Nuovo, CM Croce, G Condorelli // *Oncogene*. – 2012. – Vol. 31, N7. – P. 858–868.
155. Quintavalle, C. MiR-221/222 target the DNA methyltransferase MGMT in glioma cells / C Quintavalle, D Mangani, G Roscigno, G Romano, A Diaz-Lagares, M Iaboni, E Donnarumma, D Fiore, P De Marinis, Y Soini, M. Esteller, G. Condorelli // *PLoS One*. – 2013. – Vol. 8, N 9. – P. e74466.

156. Rajbhandari, R. Loss of tumor suppressive microRNA-31 enhances TRADD/NF- κ B signaling in glioblastoma / R Rajbhandari, BC McFarland, A Patel, M Gerigk, GK Gray, SC Fehling, M Bredel, NF Barbari, H Kim, MP Marks, GP Meares, T Sinha, J Chuang, EN Benveniste, SE Nozell // *Oncotarget*. – 2015 – Vol. 19, N 6. – P. 17805–17816.
157. Ramasanov, R. Ultrasound microneurosurgery / R Ramazanov, ON Dreval, OV Akatov, AA Zaretsky // *Neurol/Res*. – 1999. – V. 21. – P. 73–76.
158. Rampling, R. The present and future management of malignant brain tumors: surgery, radiotherapy, chemotherapy / R Rampling, A James, V Papanastassiou // *Neurol Neurosurg Psychiatry*. – 2004. – Vol. 75 (Suppl II). – P. 1124–1130.
159. Rao, SA. Genome-wide expression profiling identifies deregulated miRNAs in malignant astrocytoma / SA Rao, V Santosh, K Somasundaram // *Mod Pathol*. – 2010. – Vol. 23, N 10. – P. 1404–1417.
160. Ray, BS. Surgery of recurrent intracranial tumor / BS Ray // *Clin. Neurosurg*. – 1964. – Vol. 10, N 5. – P. 1–30.
161. Raza, SM. Identification of necrosis-associated genes in glioblastoma by cDNA microarray analysis / SM Raza, GN Fuller, CM Rhee, S Huang, K Hess, W Zhang, R Sawaya // *Clin. Cancer Res*. – 2004. – Vol. 10, Pt. 1. – P. 212–221.
162. Reifenberger, G. Oligodendroglioma: toward molecular definitions in diagnostic neuro-oncology / G Reifenberger, DN Louis // *J. Neuropathol. Exp. Neurol*. – 2003. – Vol. 62. – P.111–126.
163. Ren, Y. MicroRNA-21 inhibitor sensitizes human glioblastoma cells U251 (PTEN-mutant) and LN229 (PTEN-wild type) to taxol / Y Ren, X Zhou, M Mei, XB Yuan, L Han, GX Wang, ZF Jia, P Xu, PY Pu, CS Kang // *BMC Cancer*. – 2010. – Vol. 10. – P. 27.
164. Rodriguez, A. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units / A Rodriguez, S Griffiths-Jones, JL Ashurst, A Bradley // *Genome Res*. – 2004. – Vol. 14, N 10A. – P. 1902–1910.

165. Salcman, M. Effect of age and reoperation and survival in combined multimodality treatment of malignant astrocytomas / M Salcman // *Neurosurgery*. – 1982. – Vol. 10, N 2. – P. 454–463.
166. Salcman, M. Long-term survival in patients with malignant astrocytoma / M Salcman, H Scholtz, RS Kaplan, S Kulik // *Neurosurgery*. – 1994. – Vol. 34, N 2. – P. 213–220.
167. Sasahira, T. Downregulation of miR-126 induces angiogenesis and lymphangiogenesis by activation of VEGF-A in oral cancer / T Sasahira, M Kurihara, UK Bhawal, N Ueda, T Shimomoto, K Yamamoto, T Kirita, H Kuniyasu // *Br J Cancer*. – 2012. – Vol. 107, N 4. – P. 700–706.
168. Scott, LJ. Bevacizumab: in first-line treatment of metastatic breast cancer / LJ Scott // *Drugs*. – 2007. – Vol. 67, N 12. – P. 1793–1799.
169. Segura, MF. Aberrant miR-182 expression promotes melanoma metastasis by repressing FOXO3 and microphthalmia-associated transcription factor / MF Segura, D Hanniford, S Menendez, L Reavie, X Zou, S Alvarez-Diaz, J Zakrzewski, E Blochin, A Rose, D Bogunovic, D Polsky, J Wei, P Lee, I Belitskaya-Levy, N Bhardwaj, I Osman, E Hernando // *Proc Natl AcadSci USA*. – 2009. – Vol. 106, N 6. – P. 1814–1819.
170. Shi, L. Hsa-mir-181a and hsa-mir-181b function as tumor suppressors in human glioma cells / L Shi, Z Cheng, J Zhang, R Li, P Zhao, Z Fu, Y You // *Brain Res*. – 2008. – Vol. 1236. – P. 185–193.
171. Shi, L. MiR-125b is critical for the suppression of human U251 glioma stem cell proliferation / L Shi, J Zhang, T Pan, J Zhou, W Gong, N Liu, Z Fu, Y You // *Brain Res*. – 2010. – Vol. 1312. – P. 120–126.
172. Shi, L. MiR-21 protected human glioblastoma U87MG cells from chemotherapeutic drug temozolomide induced apoptosis by decreasing Bax/Bcl-2 ratio and caspase-3 activity / L Shi, J Chen, J Yang, T Pan, S Zhang, Z Wang // *Brain Res*. – 2010. – Vol. 1352. – P. 255–264.

173. Shi, ZM. MiR-128 inhibits tumor growth and angiogenesis by targeting p70S6K1 / ZM Shi, J Wang, Z Yan, YP You, CY Li, X Qian, Y Yin, P Zhao, YY Wang, XF Wang, MN Li, LZ Liu, N Liu, BH Jiang // PLoS One. – 2012. – Vol. 7, N 3. – P. e32709.
174. Silber, J. MiR-124 and miR-137 inhibit proliferation of glioblastoma multiforme cells and induce differentiation of brain tumor stem cells / J Silber, DA Lim, C Petritsch, AI Persson, AK Maunakea, MYu, SR Vandenberg, DG Ginzinger, CD James, JF Costello, G Bergers, WA Weiss, A Alvarez-Buylla, JG Hodgson // BMC Med. – 2008. – Vol. 6.–P. 14.
175. Singh, SK. Identification of human brain tumour initiating cells / SK Singh, C Hawkins, ID Clarke, JA Squire, J Bayani, T Hide, RM Henkelman, MD Cusimano, PB Dirks // Nature. – 2004. – N 432. – P. 396–401.
176. Smits, M. Myc-associated zinc finger protein (MAZ) is regulated by miR-125b and mediates VEGF-induced angiogenesis in glioblastoma / M Smits, T Wurdinger, B van het Hof, JA Drexhage, D Geerts, P Wesseling, DP Noske, WP Vandertop, HE de Vries, A Reijerkerk // FASEB J. – 2012. – Vol. 26, N 6. – P. 2639–2647.
177. Song, B. MicroRNA-21 regulates breast cancer invasion partly by targeting tissue inhibitor of metalloproteinase 3 expression / B Song, C Wang, J Liu, X Wang, L Lv, L Wei, L Xie, Y Zheng, X Song // J. Exp. Clin. Cancer Res. – 2010. – Vol. 29. – P. 29.
178. Song, L. MiR-486 sustains NF-kappaB activity by disrupting multiple NF-kappaB-negative feedback loops / L Song, C Lin, H Gong, C Wang, L Liu, J Wu, S Tao, B.Hu, SY Cheng, M Li, J Li // Cell Res. – 2013 – Vol.23, N 2. – P. 274–289.
179. Srinivasan, S. A ten-microRNA expression signature predicts survival in glioblastoma / S Srinivasan, IR Patric, K Somasundaram // PLoS One. – 2011. – Vol. 6, N 3. – P. e17438.

180. Stupak, EV. Studying the MicroRNA role as a survival predictor and revealing its part in malignancy level determination in patients with supratentorial gliomas of brain / EV Stupak, YuA Veryaskina, SE Titov, LG Achmerova, VV Stupak, DA Dolzhenko, SS Rabinovich, IF Zhimulev, NN Kolesnikov // AIP Conference Proceedings. – 2017. – Vol. 1882. – 020073.
181. Stupp, R. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial / R Stupp, ME Hegi, WP Mason, MJ van den Bent, MJ Taphoorn, RC Janzer, SK Ludwin, A Allgeier, B Fisher, K Belanger, P Hau, AA Brandes, J Gijtenbeek, C Marosi, CJ Vecht, K Mokhtari, P Wesseling, S Villa, E Eisenhauer, T Gorlia, M Weller, D Lacombe, JG Cairncross, RO Mirimanoff // Lancet Oncol. – 2009 – Vol. 10, N 5. – P. 459–466.
182. Stupp, R. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma / R Stupp, WP Mason, MJ van den Bent, M Weller, B Fisher, MJ Taphoorn, K Belanger, AA Brandes, C Marosi, U Bogdahn, J Curschmann, RC Janzer, SK Ludwin, T Gorlia, A Allgeier, D Lacombe, JG Cairncross, E Eisenhauer, RO Mirimanoff // N Engl J Med. – 2005. – Vol. 352, N 10. – P. 987–996.
183. Tan, X. The CREB-miR-9 negative feedback minicircuitry coordinates the migration and proliferation of glioma cells / X Tan, S Wang, B Yang, L Zhu, B Yin, T Chao, J Zhao, J Yuan, B Qiang, X Peng // PLoS One. – 2012 – Vol. 7, N 11. – P. e49570.
184. Tang, J. The role of microRNAs in breast cancer migration, invasion and metastasis / J Tang, A Ahmad, FH Sarkar // Int J Mol Sci. – 2012. – Vol. 13, N 10. – P. 13414–13437.
185. Taniguchi, CM. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action / CM Taniguchi, B Emanuelli, CR Kahn // Nat Rev Mol Cell Biol. – 2006. – Vol. 7, N 2. – P. 85–96.

186. Thakkar, JP. Epidemiologic and Molecular Prognostic Review of Glioblastoma / JP Thakkar, TA Dolecek, C Horbinski, QT Ostrom, DD Lightner, JS Barnholtz-Sloan, JL Villano // *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention: a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology.* – 2014. – Vol. 23, N 10. – P. 1985–1996.
187. Tini, P. Clinical, pathological, and molecular prognostic parameters in glioblastoma patients undergoing chemo-and radiotherapy / P Tini, C Miracco, M Toscano, S Palumbo, S Comincini, GL Gravina, L Pirtoli // *Radiobiology of Glioblastoma.* – Springer International Publishing, 2016. – P.101–120.
188. Tumilson, CA. Circulating microRNA biomarkers for glioma and predicting response to therapy / CA Tumilson, RW Lea, JE Alder, L Shaw // *Mol Neurobiol.* – 2014. – Vol. 50, N 2. – P. 545–558, doi: 10.1007/s12035-014-8679-8.
189. Turner, JD. The many roles of microRNAs in brain tumor biology / JD Turner, R Williamson, KK Almefty, P Nakaji, R Porter, V Tse, MY Kalani // *Neurosurg Focus.* – 2010. – Vol. 28, N 1. – P. E3.
190. Tusch, T. RNA Interference and Small Interfering RNAs / TTusch // *Chembiochem.* – 2001. – Vol. 2. – P. 239–245.
191. Ueda, R. Spontaneous immune responses against glioma-associated antigens in a long term survivor with malignant glioma / R Ueda, KL Low, X Zhu, M Fujita, K Sasaki, TL Whiteside, LH Butterfield, H Okada // *Journal of Translational Medicine* – 2007. – Vol. 68. – P. 1479–1486.
192. Van den Bent, MJ. Adjuvant procarbazine, lomustine, and vincristine improves progression-free survival but not overall survival in newly diagnosed anaplastic oligodendrogliomas and oligoastrocytomas: a randomized European Organisation for Research and Treatment of Cancer phase III trial / MJ van den Bent, AF Carpentier, AA Brandes, M Sanson, MJ Taphoorn, HJ Bernsen, M Frenay, CC Tjissen, W Grisold, L Sipos, H Haaxma-Reiche, JM Kros, MC van

- Kouwenhoven, CJ Vecht, A Allgeier, D Lacombe, T Gorlia // *J Clin Oncol.* – 2006. – Vol. 24, N 18. – P. 2715–2722.
193. Van Meir, EG. Exciting new advances in neuro-oncology: the avenue to a cure for malignant glioma / EG Van Meir, CG Hadjipanayis, AD Norden, HK Shu, PY Wen, JJ Olson // *A Cancer Journal for Clinicians.* – 2010. – Vol. 60. – P. 166–193.
194. Verhaak, RG. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1 / RG Verhaak, KA Hoadley, E Purdom, V Wang, Y Qi, MD Wilkerson, CR Miller, L Ding, T Golub, JP Mesirov, G Alexe, M Lawrence, M O'Kelly, P Tamayo, BA Weir, S Gabriel, W Winckler, S Gupta, L Jakkula, HS Feiler, JG Hodgson, CD James, JN Sarkaria, C Brennan, A Kahn, PT Spellman, RK Wilson, TP Speed, JW Gray, M Meyerson, G Getz, CM Perou, DN Hayes // *Cancer Cell.* – 2010. – Vol. 17, N 1– P. 98–110.
195. Visani, M. Precision Definition of miRNAs expression profile in glioblastoma samples: the relevance of non-neoplastic brain reference / M Visani, D de Biase, G Marucci, C Taccioli, A Baruzzi // *PLoS One.* – 2013. – Vol. 8, N 1. – P. E55314.
196. Wang, J. MiR-181b modulates glioma cell sensitivity to temozolomide by targeting MEK1 / J Wang, K Sai, FR Chen, ZP Chen // *Cancer Chemother Pharmacol.* – 2013. – Vol. 72, N1. – P. 147–158.
197. Wang, L. MiR-143 acts as a tumor suppressor by targeting N-RAS and enhances temozolomide-induced apoptosis in glioma / L Wang, ZM Shi, CF Jiang, X Liu, QD Chen, X Qian, Li, DM Ge X., XF Wang, LZ Liu, YP You, N Liu, BH Jiang // *Oncotarget.* – 2014. – N 5. – P. 5416–5427.
198. Wang, YY. MiR-21 modulates hTERT through a STAT3-dependent manner on glioblastoma cell growth / YY Wang, G Sun, H Luo, XF Wang, FM Lan, X Yue, LS Fu, PY Pu, CS Kang, N Liu, YP You // *CNS Neurosci Ther.* – 2012. – Vol. 18, N 9. – P. 722–728.

199. Wang, ZQ. Low serum level of miR-485-3p predicts poor survival in patients with glioblastoma./ ZQ Wang, MY Zhang, ML Deng, NQ Weng, HY Wang, SX Wu // PLoS One. – 2017. – Vol. 20, N 12(9). – P. e0184969. doi: 10.1371/journal.pone.0184969.
200. Weitzner, MA. Psychosocial functioning and quality of life in patients with primary brain tumors / MA Weitzner, CA Meyers, K Byrne // J. Neurosurgery. – 1996. – Vol. 84. – P. 29–34.
201. Wen, PY. Malignant gliomas in adults / PY Wen, S Kesari // N Engl J Med. – 2008. – Vol. 359, N 5. – P. 492–507.
202. Wheeler, CJ. Thymic CD8⁺ T-cell production strongly influences tumor antigen recognition and age-dependent glioma mortality / CJ Wheeler, KL Black, G Liu, H Ying, JS Yu, W Zhang, PK Lee. // The Journal of Immunology – 2003. – Vol. 171. – P. 4927–4933.
203. Wilson, CB. Reoperation for primary tumors / CB Wilson // Semin. Oncol. – 1975. – Vol. 2. – P. 19–20.
204. Wirtz, CR. Intraoperative magnetic resonance imaging to update interactive navigation in neurosurgery: metod and preliminary experience / CR Wirtz, MM Bonsanto, M Knauth, VM Tronnier, FK Albert, A Staubert, S Kunze // Comput. Aided. Surg. –1997. –Vol.2, N 3–4. – P.172–179.
205. Wu, C. Combinatorial control of suicide gene expression by tissue-specific promoter and microRNA regulation for cancer therapy / C Wu, J Lin, M Hong, Y Choudhury, P Balani, D Leung, LH Dang, Y Zhao, J Zeng, S Wang // Mol Ther. – 2009. – Vol. 17, N 12. – P. 2058–2066.
206. Wu, DG. MicroRNA-7 regulates glioblastoma cell invasion via targeting focal adhesion kinase expression / DG Wu, YY Wang, LG Fan, H Luo, B Han, LH Sun, XF Wang, JX Zhang, L Cao, XR Wang, YP You, N Liu // Chin Med J (Engl). – 2011. – Vol. 124, N 17. – P. 2616–2621.

207. Wu, N. miR-125b regulates the proliferation of glioblastoma stem cells by targeting E2F2 / N. Wu, L. Xiao, X. Zhao, J. Zhao, J. Wang, F. Wang, S. Cao, X. Lin // *FEBS Lett.* – 2012. – T. 586, N 21. – P. 3831–3839.
208. Xia, HF. MiR-125b expression affects the proliferation and apoptosis of human glioma cells by targeting Bmf / HF Xia, TZ He, CM Liu, Y Cui, PP Song, XH Jin, X Ma // *Cell Physiol Biochem.* – 2009. – Vol. 23, N 4–6. – P. 347–358.
209. Xu, J. Chromatin-modifying drugs induce miRNA-153 expression to suppress Irs-2 in glioblastoma cell lines / J Xu, X Liao, N Lu, W Liu, CW Wong // *Int J Cancer.* – 2011. – Vol. 129, N 10. – P. 2527–2531.
210. Xu, J. Downregulations of B-cell lymphoma 2 and myeloid cell leukemia sequence 1 by microRNA 153 induce apoptosis in a glioblastoma cell line DBTRG-05MG / J Xu, X Liao, C Wong // *Int J Cancer.* – 2010. – Vol. 126, N 4. – P. 1029–1035.
211. Yang, Q. MiR-125b regulates epithelial-mesenchymal transition via targeting Sema4C in paclitaxel-resistant breast cancer cells / Q Yang, Y Wang, X Lu, Z Zhao, L Zhu, S Chen, Q Wu, C Chen, Z Wang // *Oncotarget.* – 2015. – Vol. 6, N 5. – P.3268–3279.
212. Yang, TQ. MicroRNA-16 inhibits glioma cell growth and invasion through suppression of BCL2 and the nuclear factor-kappaB1/MMP9 signaling pathway / TQ Yang, XJ Lu, TF Wu, DD Ding, ZH Zhao, GL Chen, XS Xie, B Li, YX Wei, LC Guo, Y Zhang, YL Huang, YX Zhou, ZW Du // *Cancer Sci.* – 2014. – Vol. 105, N 3. – P. 265–271.
213. Yasargil, MG. Microsurgery for Malignant Gliomas / MG Yasargil, PAS Kadri, DCH Yasargil // *J. Neurooncol.* –2004. – Vol. 69, N 1. – P. 67–81.
214. Ye, Z. Upregulation of miR-183 expression and its clinical significance in human brain glioma / Z Ye, Z Zhang Z, L Wu, C Liu, Q Chen, J Liu, X Wang, Z Zhuang, W Li, S Xu, C Hang // *Neurol Sci.* – 2016. – Vol. 37, N 8. – P. 1341–1347.

215. Ye, Z. Upregulation of miR-183 expression and its clinical significance in human brain glioma / Z Ye, Z Zhang, L Wu, C Liu, Q Chen, J Liu, X Wang, Z Zhuang, W Li, S Xu, C Hang // *Neurol Sci.* – 2016. – Vol. 37, N 8. – P. 1341–1347.
216. Young, B. Reoperation for glioblastoma / B Young, EH Oldfield, WR Markesbery, D Haack, PA Tibbs, P McCombs, HW Chin, Y Maruyama // *J. Neurosurgery.* – 1981. – Vol. 55, N 5. – P. 917–921.
217. Yue, X. Downregulation of serum microRNA-205 as a potential diagnostic and prognostic biomarker for human glioma / X Yue, F Lan, M Hu, Q Pan, Q Wang, J Wang // *J Neurosurg.* – 2016. – Vol. 124, N 1. – P. 122–128, doi: 10.3171/2015.1.JNS141577.
218. Zhang, C. Co-suppression of miR-221/222 cluster suppresses human glioma cell growth by targeting p27kip1 in vitro and in vivo / C Zhang, C Kang, Y You, P Pu, W Yang, P Zhao, G Wang, A Zhang, Z Jia, L Han, H Jiang // *Int J Oncol.* – 2009. – Vol. 34, N 6. – P. 1653–1660.
219. Zhang, C. High level of miR-221/222 confers increased cell invasion and poor prognosis in glioma / C Zhang, J Zhang, J Hao, Z Shi, Y Wang, L Han, S Yu, Y You, T Jiang, J Wang, M Liu, P Pu, C Kang // *J Transl Med.* – 2012. – Vol. 10. – P. 119.
220. Zhang, CZ. MiR-221 and miR-222 target PUMA to induce cell survival in glioblastoma / CZ Zhang, JX Zhang, AL Zhang, ZD Shi, L Han, ZF Jia, WD Yang, GX Wang, T Jiang, YP You, PY Pu, JQ Cheng, CS Kang // *Mol Cancer.* – 2010. – Vol. 9. – P. 229.
221. Zhang, J. MiR-221/222 promote malignant progression of glioma through activation of the Akt pathway / J Zhang, L Han, Y Ge, X Zhou, A Zhang, C Zhang, Y Zhong, Y You, P Pu, C Kang // *Int J Oncol.* – 2010. – Vol. 36, N 4. – P. 913–920.
222. Zhang, KL. Blockage of a miR-21/EGFR regulatory feedback loop augments anti-EGFR therapy in glioblastomas / KL Zhang, L Han, LY Chen, ZD Shi, M

- Yang, Y Ren, LC Chen, JX Zhang, PY Pu, CS Kang // *Cancer Lett.* – 2014. – Vol. 342, N 1. – P. 139–149.
223. Zhang, R. Plasma miR-221/222 Family as Novel Descriptive and Prognostic Biomarkers for Glioma / R Zhang, B Pang, T Xin, H Guo, Y Xing, X Su, B Feng, B Liu, Q Pang // *Mol Neurobiol.* – 2016. – Vol. 53, N 3. – P. 1452–1460, doi: 10.1007/s12035-014-9079-9.
224. Zhang, S. MicroRNA-21 inhibitor sensitizes human glioblastoma U251 stem cells to chemotherapeutic drug temozolomide / S Zhang, Y Wan, T Pan, X Gu, C Qian, G Sun, L Sun, Y Xiang, Z Wang, L Shi // *J Mol Neurosci.* – 2012. – Vol. 47, N 2. – P. 346–356.
225. Zhang, Y. MicroRNA-128 inhibits glioma cells proliferation by targeting transcription factor E2F3a / Y Zhang, T Chao, R Li, W Liu, Y Chen, X Yan, Y Gong, B Yin, B Qiang, J Zhao, J Yuan, X Peng // *J Mol Med (Berl).* – 2009. – Vol. 87, N 1. – P. 43–51.
226. Zhao, K. The role of miR-451 in the switching between proliferation and migration in malignant glioma cells: AMPK signaling, mTOR modulation and Rac1 activation required./ K Zhao, L Wang, T Li, M Zhu, C Zhang, L Chen, P Zhao, H Zhou, S Yu, X Yang, *J Int // Oncol.* – 2017. – Vol. 50, N 6. – P. 1989–1999. doi: 10.3892/ijo.2017.3973.
227. Zhao, S. MicroRNA-153 is tumor suppressive in glioblastoma stem cells / S Zhao, Y Deng, Y Liu, X Chen, G Yang, Y Mu, D Zhang, J Kang, Z Wu // *Mol Biol Rep.* – 2013. – Vol. 40, N 4. – P. 2789–2798.
228. Zhou, J. MiR-20a inhibits cutaneous squamous cell carcinoma metastasis and proliferation by directly targeting LIMK1 / J Zhou, R Liu, C Luo, X Zhou, K Xia, X Chen, M Zhou, Q Zou, P Cao, K Cao // *Cancer Biol Ther.* – 2014. – Vol. 15, N 10. – P. 1340–1349.
229. Zhou, X. Downregulation of miR-21 inhibits EGFR pathway and suppresses the growth of human glioblastoma cells independent of PTEN status / X Zhou,

- Y Ren, L Moore, M Mei, Y You, P Xu, B Wang, G Wang, Z Jia, P Pu, W Zhang, C Kang // *Lab Invest.* – 2010. – Vol. 90, N 2. – P. 144–155.
230. Zhou, X. Reduction of miR-21 induces glioma cell apoptosis via activating caspase 9 and 3 / X Zhou, J Zhang, Q Jia, Y Ren, Y Wang, L Shi, N Liu, G Wang, P Pu, Y You, C Kang // *Oncol Rep.* – 2010. – Vol. 24, N 1. – P. 195–201.
231. Zhu, S. MicroRNA-21 targets tumor suppressor genes in invasion and metastasis / S Zhu, H Wu, F Wu, D Nie, S Sheng, YY Mo // *Cell. Res.* – 2008. – Vol. 18. – P. 350–359.
232. Zhu, X. miR-137 inhibits the proliferation of lung cancer cells by targeting Cdc42 and Cdk6 / X Zhu, Y Li, H Shen, H Li, L Long, L Hui, W Xu // *FEBS Lett.* – 2013. – Vol. 587, N 1. – P. 73–81.