

Значимость микроРНК в прогнозе выживаемости больных с супратенториальными глиомами головного мозга

© Е.В. Ступак¹, С.Е. Титов^{2,3}, Ю.А. Веряскина^{2,3}, Л.Г. Ахмерова², И.Ф. Жимулёв²,
В.В. Ступак¹, С.С. Рабинович^{1,4}, А.Е. Симонович¹, Д.А. Долженко⁵

¹ ФГБУ «Новосибирский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Новосибирск, Российская Федерация

² ФГБУ «Институт молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Российская Федерация

³ АО «Вектор-Бест», Новосибирск, Российская Федерация

⁴ ФГБОУ «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Новосибирск, Российская Федерация

⁵ КГБУЗ «Краевая клиническая больница», Барнаул, Российская Федерация

Для корреспонденции: Евгений Вячеславович Ступак, stupakphoto@mail.ru

Поступила в редакцию 14 мая 2019 г. Исправлена 21 июня 2019 г. Принята к печати 25 июня 2019 г.

Цель

Поиск новых маркеров микроРНК как потенциальных предикторов выживания больных с глиомами головного мозга.

Методы

В работе использованы биоптаты опухоли и морфологически не измененного мозга от 107 пациентов с супратенториальными глиомами головного мозга разной степени анаплазии, получивших комплексное лечение. Для них с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени определены профили экспрессии 10 микроРНК, которые сопоставляли с клиническими результатами лечения (морфологическая принадлежность опухоли, степень ее злокачественности, возраст, функциональное состояние больного по шкале Карновского, вид комплексного лечения, сроки выживаемости пациентов после операции и установления гистологического диагноза). Средний возраст оперируемых составил $48,8 \pm 14,0$ года. Мужчин было 62 (57,9%), женщин — 45 (42,1%). Глиомы второй степени злокачественности (Grade II) диагностированы у 17 пациентов (16%), третьей степени (Grade III) у 30 (28%), глиобластомы (Grade IV) у 60 (56%). Статистическая обработка данных проводилась с помощью программного обеспечения Statistica 10.0 и GraphPadPrism 5.

Результаты

Выявлены четыре микроРНК, относительные уровни экспрессии которых достоверно коррелировали со снижением выживаемости пациентов, что может позволить их использовать в качестве предикторов выживания больных с глиомами головного мозга. Повышенная экспрессия четырех микроРНК в тканях глиомы, отсутствие в комплексном лечении таких адъювантных методов, как химио- и лучевая терапия, возраст после 48 лет достоверно свидетельствовали о плохом прогнозе течения заболевания.

Заключение

Уровни экспрессии микроРНК могут быть использованы как предикторы в оценке выживания больных с супратенториальными глиомами мозга.

Ключевые слова

глиома головного мозга; микроРНК; молекулярно-генетическое исследование; предиктор выживания

Цитировать: Ступак Е.В., Титов С.Е., Веряскина Ю.А., Ахмерова Л.Г., Жимулёв И.Ф., Ступак В.В., Рабинович С.С., Симонович А.Е., Долженко Д.А. Значимость микроРНК в прогнозе выживаемости больных с супратенториальными глиомами головного мозга. *Патология кровообращения и кардиохирургия*. 2019;23(1):61-70. <http://dx.doi.org/10.21688-1681-3472-2019-1-61-70>



Введение

В мире количество онкологических заболеваний, в том числе опухолей центральной нервной системы, с каждым годом увеличивается. Встречаемость опухолей головного мозга составляет от 13 до 18 случаев на 100 тыс. населения в год [1]. Наибольший удельный вес среди опухолей центральной нервной системы составляют глиомы (50–55%), которые в 50–60% случаев являются злокачественными [2].

В связи с тем что результаты хирургического лечения больных с глиальными опухолями мозга, даже с использованием современных хирургических технологий, не позволяют добиться полного удаления новообразования, выработан комплексный подход к их лечению. Подход включает в себя микрохирургическое удаление новообразования, а также проведение лучевой и химиотерапии [3, 4]. К сожалению, с помощью данного подхода не удастся стабилизировать рост опухоли и значительно увеличить срок выживаемости пациентам со злокачественными глиомами. Медиана выживаемости оперированных с глиомами Grade I–II составляет 80 мес., с глиомами Grade III — около 30 мес., с глиобластомой — от 10 до 14 мес. [2].

Возможность прогноза течения заболевания наряду с совершенствованием лечения больных со злокачественными новообразованиями головного мозга также является актуальной проблемой. Гистологический диагноз, по классификации Всемирной организации здравоохранения 2007 г., для большинства опухолей и правильная оценка степени ее злокачественности является «золотым стандартом», имеет решающее значение в назначении адъювантных методов лечения и в прогнозировании течения заболевания [5]. Однако на этом этапе нередко возникают ошибки, достигающие в лучших клиниках от 38 до 64% [6].

Кроме этого, такие клинические показатели, как возраст и оценка функционального состояния оперируемого по шкале Карновского, выступают в качестве прогностических маркеров у пациентов с глиомами головного мозга [7]. Статус метилирования промотора гена MGMT также позволяет прогнозировать течение заболевания у больных с глиобластомами, получавших химиотерапию темозоломидом [8].

Молекулярно-генетические характеристики нейроэпителиальных новообразований занимают важное место в классификации опухолей, поскольку гораздо лучше коррелируют с прогнозом, чем гистологическая характеристика глиом. Об этом свидетельствует гистологическая классификация опухолей центральной нерв-

ной системы, принятая Всемирной организацией здравоохранения в 2016 г. [9]. Новая классификация основана не только на гистологической структуре опухолей, но и на обязательном исследовании их наиболее значимых молекулярно-генетических данных. Изучение молекулярных механизмов глиом и выявление новых молекулярно-прогностических факторов могут способствовать лучшей оценке вероятности выживания и подборе методов лечения для отдельных пациентов.

Конечно, по мере накопления новых данных о биологии и генетическом профиле новообразований центральной нервной системы, имеющих доказанное влияние на прогноз заболевания, классификация будет обязательно пополняться и совершенствоваться. Одним из направлений в ее совершенствовании и оптимизации комбинированного лечения больных со злокачественными глиомами головного мозга, как нам представляется, является изучение роли микрорибонуклеиновой кислоты (РНК).

МикроРНК представляет собой короткую некодирующую РНК (20–22 нуклеотида), контролирующую экспрессию генов, кодирующих белки [10]. Данные показывают, что микроРНК может выступать как в роли супрессора, так и онкогена опухолевого роста, регулируя процессы роста и пролиферации клеток, инвазии опухоли и метастазирования. Кроме того, микроРНК вовлечена в регулирование таких процессов, как апоптоз, ангиогенез и иммунный ответ [11, 12]. В связи с этим дальнейшее изучение влияния микроРНК на процессы онкогенеза, поиск маркеров в глиомах головного мозга человека и выявление спектра ключевых молекул, которые могли бы быть потенциальными предикторами прогноза течения заболевания и выживаемости больных с данной патологией, представляет большой интерес [13, 14]. В исследовании мы предположили, что микроРНК может выступать в качестве предикторов выживания у больных с супратенториальными глиомами головного мозга, что явилось целью настоящего исследования.

Цель исследования — поиск новых микроРНК-маркеров как потенциальных предикторов выживания больных с глиомами головного мозга.

Методы

Клинико-генетические исследования проведены у 107 первично оперированных больных с супратенториальными глиомами разной степени злокачественности с 2014 по 2017 г. Для этого во время удаления опухоли под нейронавигационным контролем забирались

биоптаты опухоли и головного мозга в объеме 1 мм³ на расстоянии более 2 см от новообразования. При хранении и транспортировке операционного материала использовался раствор для стабилизации РНК RNAlater, позволяющий выделять РНК из тканей и клеток без замораживания в жидком азоте. Средний возраст пациентов составил 48,8 ± 14,0 года. Он варьировал от 6 до 83 лет. При этом количество оперированных до 48 лет включительно составило 39 (36,4%), после 48 лет — 68 человек (63,6%). Мужчин было 62 (57,9%), женщин — 45 (42,1%). Среди 107 больных в зависимости от степени злокачественности глиом сформированы три группы: первая — пациенты с глиомами Grade II, n = 17 (16%), вторая — пациенты с Grade III, n = 30 (28%) и третья — пациенты с глиобластомами, Grade IV, n = 60 (56%). Срок наблюдения за пациентами после оперативного лечения составляли от 6 до 70 мес.

Функциональное состояние оперированных оценивалось по шкале Карновского и составляло 70 ± 1 балл. Пятьдесят шесть (52%) больных, оперированных в послеоперационном периоде, получили адъювантную терапию в виде химио- и лучевой терапии. Шести (5%) пациентам проведено только лучевое лечение в дозе 56–60 Гр. Десяти (9%) больным проведена монокимioterapia темодалом. Тридцать пять (34%) пациентов в послеоперационном периоде вообще не получали дополнительного лечения.

Первичной точкой исследования являлся срок выживаемости больных с момента хирургического вмешательства и постановки гистологического диагноза до 12 мес. включительно.

Выделение суммарного пула РНК проводили с помощью набора «Реал Бест экстракция 100» (АО «Вектор-Бест», Новосибирск). Реакцию обратной транскрипции проводили с использованием готовой реакционной смеси «Реал Бест Мастер микс ОТ» (АО «Вектор-Бест», Новосибирск). Проводили измерения уровней экспрессии 10 микроРНК (-124, -125b, -16, -181b, -191, -21, -221, -223, -31 и -451) методом полимеразной цепной реакции в реальном времени на амплификаторе CFX96 (Bio-Rad Laboratories, США) [14]. По данным литературных источников, выбранные микроРНК являются онкогенными: повышенная экспрессия в опухолевых клетках негативным образом влияет на работу генов-супрессоров опухолевого роста. Также выбранные микроРНК являются онкосупрессивными: повышенная экспрессия ведет к снижению активности онкогенов.

Проведенные исследования соответствуют разработанным на основе Хельсинкской декларации Все-

мирной медицинской ассоциации этическим принципам проведения научных медицинских исследований с участием человека с поправками 2000 г., и правилам клинической практики в Российской Федерации, утвержденным Приказом Минздрава РФ от 01.04.2016 г. № 200н. Исследование одобрено комитетом по биоэтической этике Новосибирского научно-исследовательского института травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна Минздрава России (протокол № 094/15 от 28.12.2015). Получено добровольное информированное согласие каждого больного на исследование, все данные были деперсонализированы.

Статистический анализ

На первом этапе мы оценивали взаимосвязь выживаемости пациентов и экспрессии исследуемых микроРНК при помощи однофакторного, многофакторного регрессионного анализов Кокса. Наряду с этим учитывались такие факторы, как пол, проведенная химио- или лучевая терапия, локализация опухоли, степень анаплазии опухоли, возраст до или после 48 лет, функциональное состояние больного по шкале Карновского. Регрессия Кокса, или модель пропорциональных рисков — это прогнозирование риска наступления события для рассматриваемого объекта и оценка влияния заранее определенных независимых переменных (предикторов) на этот риск. Использовали тест Вальда, который является базовым инструментом для проверки ограничений на параметры статистических моделей, оцененных на основе выборочных данных. При помощи ROC-анализа определены пороговые значения относительных уровней экспрессии значимых микроРНК, после чего для микроРНК, влияющих на выживание, построены кривые выживаемости Каплана – Майера. Статистическая обработка производилась с использованием программного обеспечения Statistica 10.0 и GraphPadPrism 5.

Результаты

Всем 107 пациентам проведено оперативное лечение в нейрохирургическом отделении Новосибирского НИИТО им. Я.Л. Цивьяна, им осуществлено микрохирургическое удаление новообразования в объеме максимальной резекции опухоли. В 9 случаях опухоль располагалась в 3 долях, у 27 пациентов — в двух и у 71 человека — в одной доле.

Оперативное вмешательство снижало качество жизни пациентов. Об этом свидетельствовали показатели функционального состояния оперированных с

70 ± 1 балл по Шкале Карновского до 67 ± 2 балла. Перед выпиской происходило восстановление этих показателей до исходного уровня.

Патоморфологический диагноз после выполнения оперативного лечения подтвержден гистологическим и иммуногистохимическим заключениями, согласно международной классификации Всемирной организации здравоохранения 2007 г. [6].

Клинико-демографическая характеристика пациентов представлена ниже.

Мужчины / женщины	62 (57,9%) / 45 (42,1%)
Средний возраст	48,8 ± 14,0
Возраст до 48 лет	39 (36,4%)
Возраст после 48 лет	68 (63,6%)
Химио- и лучевая терапия	56 (52%)
Только лучевая терапия	6 (5%)
Только химиотерапия	10 (9%)
Не получили адъювантного лечения	35 (34%)
Средний уровень качества жизни пациентов до операции по шкале Карновского	70 ± 1 балл
Средний уровень качества жизни пациентов после операции по шкале Карновского	67 ± 2 балла

Для определения потенциальных предикторов выживания больных с глиомами головного мозга первым этапом проведен однофакторный регрессионный анализ Кокса.

Однофакторный регрессионный анализ Кокса (модель пропорциональных рисков) выявил только три микроРНК, уровень экспрессии которых достоверно связан с выживаемостью пациентов. Это микроРНК -31, -21 и -223. Уровень значимости влияния экспрессии микроРНК на время выживания представлен ниже.

микроРНК	Тест Вальда, p
микроРНК -31	0,006337
микроРНК -125b	0,323163
микроРНК -16	0,453054
микроРНК -451a	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

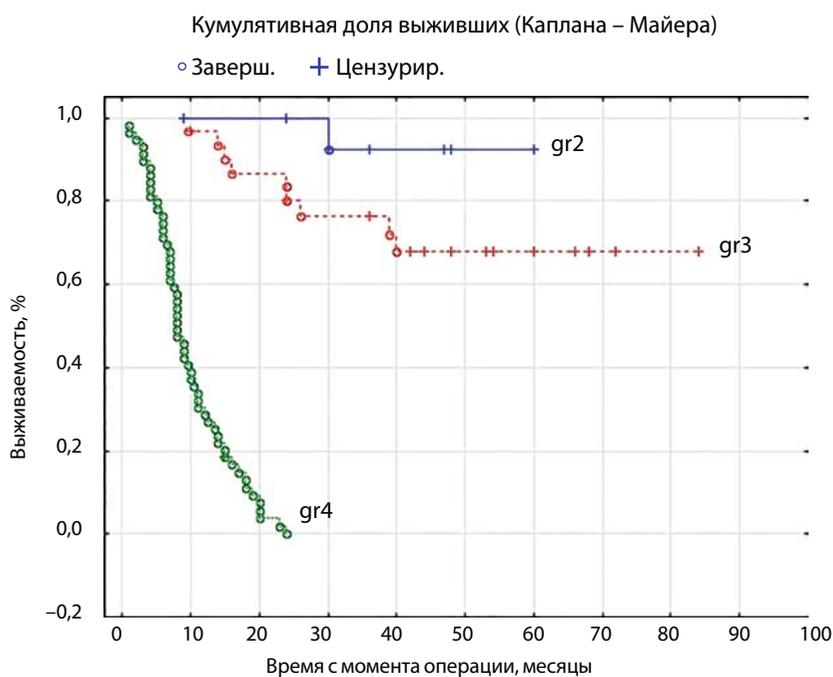


Рис. 1. Кривые Каплана – Майера, построенные для пациентов с глиомами разной степени злокачественности (n = 107)

Таблица 1 Показатели качества жизни пациентов с критической ишемией нижних конечностей до и в отдаленном периоде после имплантации системы спинальной нейростимуляции

Факторы		Оценка параметров	p	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-451a ↓	-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
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

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

Медиана выживаемости больных с супратенториальными глиомами различной степени злокачественности (Grade II–IV) равна 15 мес. с операции и установления гистологического диагноза. Медиана выживания для пациентов с глиомами Grade II составляла 47 мес., для пациентов с Grade III — 42 мес. и Grade IV — 8 мес. На рис. 1. изображены кривые Каплана – Майера пациентов с опухолями разной степени анаплазии — Grade II, Grade III и Grade IV. Средняя продолжительность жизни больных с глиомами Grade II равна 43 мес., Grade III — 42 мес. и Grade IV — 10 мес.

На следующем этапе проведен многофакторный регрессионный анализ Кокса для одновременного определения влияния на время выживания больных: микроРНК (потенциальных прогностических маркеров), возраста, вида адъювантной терапии и степени злокачественности новообразования. В табл. 1 указаны все полученные значения.

Так как профили экспрессии микроРНК-31, -21, -221 и -223 обладали наибольшей связью со временем выживания пациентов из всех исследованных, решено сравнить группы с высоким и низким уровнями данных микроРНК. Для каждой микроРНК 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 — 0,531, для микроРНК-223 — 1,315. После сравнения групп мы построили кривые Каплана – Майера, представленные на рис. 2. Так

как, по результатам регрессионного анализа, возраст обладал значительным вкладом в увеличении сроков выживания оперируемых, сравнили больных старше и младше 48 лет (в нашей серии среднее значение равно 48 лет). Построены кривые Каплана – Майера (рис. 3).

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 представлены в табл. 2.

Таким образом, 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 лечения, как химиотерапия (КР = 2,461; ДИ 95% 1,199–5,050; $p < 0,0141$) и лучевая терапия (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 со снижением выживаемости пациентов.

Обсуждение

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

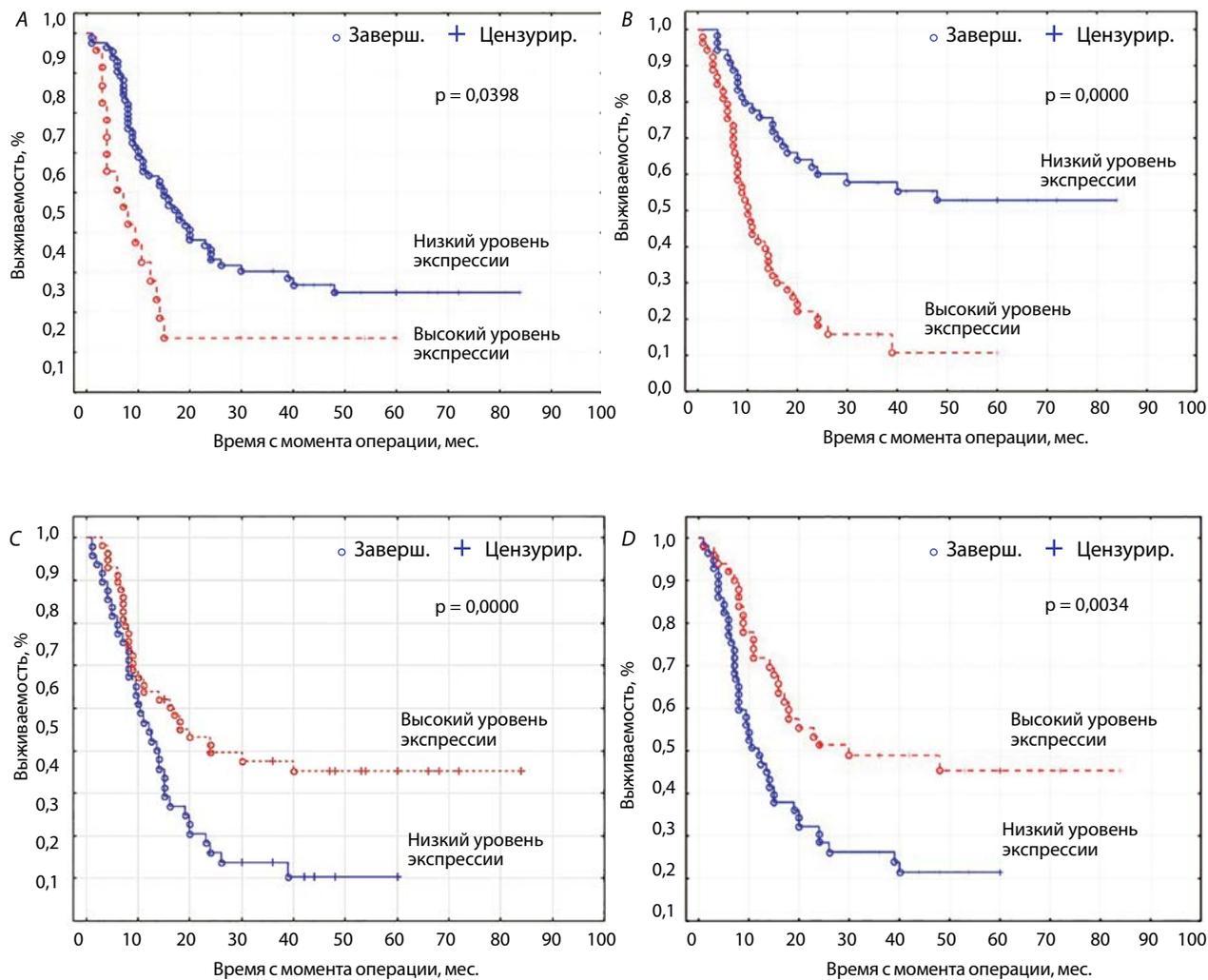


Рис. 2. Кривые Каплана – Майера пациентов с высоким и низким уровнем экспрессии микроРНК-31 (A), микроРНК-21 (B), микроРНК-221 (C) и микроРНК-223 (D) в глиомах Grade II–IV

Таблица 2 Показатели медиан выживаемости у оперированных в зависимости от выбранных факторов прогноза

Фактор	Медиана выживаемости	
МикроРНК-31	Низкий уровень экспрессии (Ме 19,5 мес.)	Высокий уровень экспрессии (Ме 9 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.)
Химиотерапия	Химиотерапия (Ме 20 мес.)	Без химиотерапии (Ме 8 мес.)
Лучевая терапия	Лучевая терапия (Ме 20 мес.)	Без лучевой терапии (Ме 8,5 мес.)

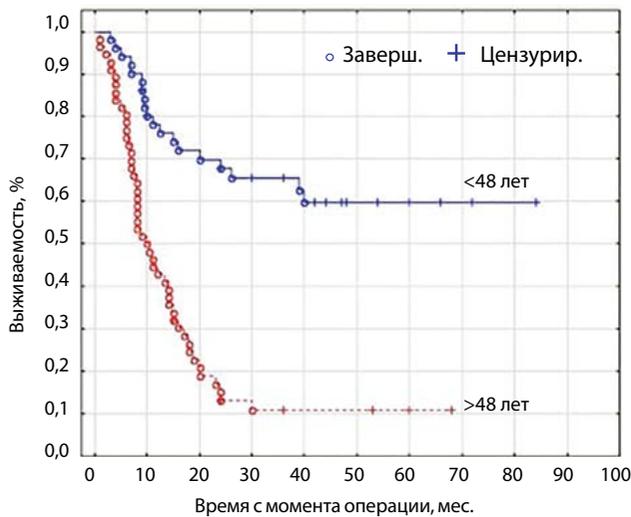


Рис. 3. Кривые Каплана – Майера у больных в зависимости от возраста

характеристик в виде экспрессии 10 микроРНК определить их прогностическую значимость, как потенциальных предикторов выживания больных, и выявить среди них микроРНК с наибольшей прогностической ценностью. Анализ базы данных 107 пациентов с клиническими результатами комплексного лечения и показатели экспрессии 10 микроРНК удаленных опухолей выявил только четыре микроРНК, уровень экспрессии которых достоверно связан со сроками выживаемости пациентов. Это микроРНК-31, -21, -221 и -223.

МикроРНК-21 является онкогенной, она широко представлена в организме человека, уровень данной микроРНК повышен в тканях глиом головного мозга [15]. По данным многочисленных исследований, уровень ее экспрессии повышен в тканях глиом в 5–15 раз, по сравнению с нормальной мозговой тканью [15–18]. В работе L. Wu показано, что больные с глиомами, имеющие высокие уровни экспрессии микроРНК-21, обладали худшими показателями, а оперированные с низким уровнем экспрессии этой микроРНК — более высокие показатели выживаемости [19]. Полученными результатами, изложенными в данной работе также подтверждено, что повышенная экспрессия микроРНК-21 ($KP = 1,228$; ДИ 95% 1,073–1,407; $p < 0,0030$) сопряжена с резким снижением выживаемости пациентов с глиомами головного мозга.

МикроРНК-221 является онкогенной, ее мишенями являются белки p27, p57, а также гены PTEN,

TIMP3, PUMA, Cx43, регулирующие клеточный цикл и процессы выживаемости клеток [20]. Отмечается ее повышенная экспрессия в тканях глиом головного мозга [21, 22]. В нашем исследовании отмечено статистически достоверное повышение уровня экспрессии данной микроРНК в глиомах высокой степени злокачественности (Grade III–IV), по сравнению с условно нормальными прилежащими тканями мозга [18]. В данной работе показано, что повышенный уровень экспрессии микроРНК-221 ($KP = 0,814$; ДИ 95% 0,683–0,970; $p < 0,0216$) достоверно коррелирует со снижением сроков выживаемости оперированных с глиомами головного мозга.

МикроРНК-31 в опухолях центральной нервной системы выступает в качестве онкосупрессора, уровень ее экспрессии может коррелировать с предрасположенностью опухоли к инвазии и метастазированию. В нашем предыдущем исследовании отмечено статистически достоверное снижение уровня экспрессии данной микроРНК в глиомах Grade III–IV, по сравнению с морфологически не измененной мозговой тканью [18]. Известно, что микроРНК-31 в культуре клеток глиомы ингибирует миграцию клеток и опосредовано регулирует активацию транскрипционного фактора NF- κ B, ангиогенез и уровень E-кадгерина, с эпителиально-мезенхимальным переходом [23]. В настоящей работе установлено, что повышенные показатели экспрессии микроРНК-31, достоверно коррелируют с резким снижением выживаемости пациентов ($KP = 1,221$; ДИ 95% 1,016–1,467; $p < 0,0335$).

Из работ B.S. Huang и соавт. следует, что микроРНК-223 может играть различную роль в различных типах раковых или опухолевых клеточных линиях 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 [24]. Результаты исследований Q. Ding и соавт. свидетельствуют о том, что ее показатели снижены в тканях глиобластом [25]. Из данного сообщения следует, что она может играть роль супрессора и являться потенциальной целью терапии глиобластом. Однако остается неясным, является ли данная микроРНК супрессором или онкогеном при глиобластоме [25]. Наши результаты свидетельствуют о повышенной экспрессии микроРНК-223 в глиомах головного мозга ($KP = 1,106$; ДИ

95% 1,002–1,221; $p < 0,0460$), что достоверно коррелирует с резким снижением выживаемости оперированных пациентов.

Итак, полученные в нашей работе молекулярно-генетические данные экспрессии 10 микроРНК у 107 больных с глиомами головного мозга различной степени злокачественности сопоставлены с клиническими результатами данных больных (морфологическая принадлежность опухоли, степень ее злокачественности, возраст, функциональное состояние больного по шкале Карновского, вид комплексного лечения, сроки выживаемости пациентов после операции и постановки гистологического диагноза). Установлено, что из 10 исследуемых микроРНК, повышенная экспрессия четырех микроРНК (-31, -21, -223 и -221), отсутствие в комплексном лечении таких адъювантных методов, как химио- и лучевой терапии, возраст после 48 лет достоверно коррелировали с резким снижением выживаемости пациентов и плохим прогнозом заболевания. Это позволяет их использовать в качестве предикторов выживания больных с супратенториальными глиомами головного мозга. К ограничениям данной работы можно отнести небольшую выборку (107 пациентов), особенно больных с глиомами Grade II и III, поэтому целесообразно провести подобное исследование не только в нашей клинике, но и в других учреждениях, занимающихся данной проблемой, тем самым в перспективе появится возможность оптимизировать комплексное лечение супратенториальных глиальных опухолей.

Так как 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 о 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 прав-

ления Ассоциации онкологов России [26], 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 химиотерапии и лучевого лечения. Полученные нами новые молекулярно-генетические данные повышенной экспрессии профилей четырех микроРНК у больных с глиомами Grade II, свидетельствующие о плохом прогнозе заболевания, позволяют с целью улучшения качества жизни, увеличения сроков продолженного роста и рецидива новообразований рекомендовать адъювантное лечение в послеоперационном периоде этим больным после тотального, субтотального удаления опухоли или пункционной биопсии.

Заключение

Повышенные экспрессии микроРНК-31, -21, -223 и -221 в глиомах головного мозга достоверно коррелируют со снижением выживаемости пациентов и свидетельствуют о плохом прогнозе течения заболевания. Уровни экспрессии данных микроРНК могут быть использованы как предикторы в оценке выживания больных с супратенториальными глиомами мозга. Определение уровня экспрессии микроРНК может служить основанием оптимизации послеоперационного лечения с целью увеличения сроков продолженного роста и рецидива глиом головного мозга.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование

Работа выполнена при финансовой поддержке программы фундаментальных научных исследований по теме 0310-2019-0003.

ORCID ID

С.Е. Титов, <https://orcid.org/0000-0001-9401-5737>

Ю.А. Веряскина, <https://orcid.org/0000-0002-3799-9407>

А.Е. Симонович, <https://orcid.org/0000-0003-2822-3479>

Д.А. Долженко, <https://orcid.org/0000-0001-7369-3096>

Список литературы / References

1. Зозуля Ю.А., Васильева И.Г., Главатский А.Я. Глиомы головного мозга. Киев: УИПК «ЕксОб», 2007. 636 с. [Zozulya Yu.A., Vasilyeva I.G., Glavatsky A.Ya. *Brain gliomas*. Kiev, UIPK «ExOb», 2007. 636 p. (In Russ.).]

2. Олюшин В.Е., Филатов М.В., Улитин А.Ю., Бажанов С.П. Специфическая противоопухолевая иммунотерапия на основе дендритных клеток в комплексном лечении больных злокачественными церебральными глиомами. СПб.: Знак, 2012. 212 с. [Olyushin V.E., Filatov M.V., Ulitin A.Yu., Bazhanov S.P. *Specific antitumor immunotherapy based on dendritic cells in the complex treatment of patients with malignant cerebral gliomas*. Saint Petersburg, Znak, 2012. 212 p. (In Russ.)].
3. Keles G.E., Lamborn K., Berger M.S. Low-grade hemispheric gliomas in adults: a critical review of extent of resection as a factor influencing outcome. *Neurosurgery*. 2001;95:735-745. PMID: 11702861. <http://doi.org/10.3171/jns.2001.95.5.0735>
4. Bhattacharjee A.K., Nagashima T., Kondoh T., Tamaki N. Quantification of early blood-brain barrier disruption by in situ brain perfusion technique. *Brain Res Protoc*. 2001;(2):126-131. PMID: 11673094.
5. Louis D.N., Ohgaki H., Wiestler O.D., Cavenee W.K., Burger P.C., Jouvet A., Scheithauer B.W., Kleihues P. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol*. 2007;114(2):97-109. PMID: PMC1929165, PMID: 17618441. <http://doi.org/10.1007/s00401-007-0243-4>
6. Mittler M.A., Walters B.C., Stopa E.G. Observer reliability in histological grading of astrocytoma stereotactic biopsies. *J Neurosurg*. 1996;85(6):1091-1094. PMID: 8929500. <http://doi.org/10.3171/jns.1996.85.6.1091>
7. Babu R., Komisarow J.M., Agarwal V.J., Rahimpour S., Iyer A., Britt D., Karikari I.O., Grossi P.M., Thomas S., Friedman A.H., Adamson C. Glioblastoma in the elderly: the effect of aggressive and modern therapies on survival. *J Neurosurg*. 2016;124(4):998-1007. PMID: 26452121. <http://doi.org/10.3171/2015.4.JNS142200>
8. Stupp R., Hegi M.E., Mason W.P., Van den Bent M.J., Taphoorn M.J., Janzer R.C., Ludwin S.K., Allgeier A., Fisher B., Belanger K., Hau P., Brandes A.A., Gijtenbeek J., Marosi C., Vecht C.J., Mokhtari K., Wesseling P., Villa S., Eisenhauer E., Gorlia T., Weller M., Lacombe D., Cairncross J.G., Mirimanoff R.O. 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. *Lancet Oncol*. 2009;10(5):459-466. PMID: 19269895. [http://doi.org/10.1016/S1470-2045\(09\)70025-7](http://doi.org/10.1016/S1470-2045(09)70025-7)
9. Louis D.N., Ohgaki H., Wiestler O.D., Cavenee W.K. (ed.) *WHO Classification of tumours of the central nervous system*. Revised 4th ed. Lyon, IARC, 2016. 408 p.
10. Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature*. 2004;431(700):350-355. PMID: 15372042. <http://doi.org/10.1038/nature02871>
11. Rodriguez A., Griffiths-Jones S., Ashurst J.L., Bradley A. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res*. 2004;14(10A):1902-1910. PMID: 15364901, PMID: PMC524413. <http://doi.org/10.1101/gr.2722704>
12. Andorfer C.A., Necela B.M., Thompson E.A., Perez E.A. MicroRNA signatures: clinical biomarkers for the diagnosis and treatment of breast cancer. *Trends Mol Med*. 2011;17(6):313-319. PMID: 21376668. <http://doi.org/10.1016/j.molmed.2011.01.006>
13. Sasahira T., Kurihara M., Bhawal U.K., Ueda N., Shimomoto T., Yamamoto K., Kirita T., Kuniyasu H. Downregulation of miR-126 induces angiogenesis and lymphangiogenesis by activation of VEGF-A in oral cancer. *Br J Cancer*. 2012;107(4):700-706. PMID: PMC3419968, PMID: 22836510. <http://doi.org/10.1038/bjc.2012.330>
14. Chen C., Ridzon D.A., Broomer A.J., Zhou Z., Lee D.H., Nguyen J.T., Barbisin M., Xu N.L., Mahuvakar V.R., Andersen M.R., Lao K.Q., Livak K.J., Guegler K.J. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Research*. 2005;33(20):e179. PMID: 16314309, PMID: PMC1292995. <http://doi.org/10.1093/nar/gni178>
15. Conti A., Aguenouz M., La Torre D., Tomasello C., Cardali S., Angileri F.F., Maio F., Cama A., Germanò A., Vita G., Tomasello F. miR-21 and 221 upregulation and miR-181b downregulation in human grade II-IV astrocytic tumors. *J Neurooncol*. 2009;93(3):325-332. PMID: 19159078. <http://doi.org/10.1007/s11060-009-9797-4>
16. Ступак Е.В., Титов С.Е., Веряскина Ю.А., Ахмерова Л.Г., Ступак В.В., Рабинович С.С., Долженко Д.А., Жимулёв И.Ф. Поиск новых микроРНК-маркеров для дифференциальной диагностики глиом головного мозга различной степени злокачественности. *Сибирский научный медицинский журнал*. 2018;38(6):85-93. <http://doi.org/10.15372/SSMJ20180613> [Stupak E.V., Titov S.E., Veryaskina Yu.A., Akhmerova L.G., Stupak V.V., Rabinovich S.S., Dolzhenko D.A., Zhimulev I.F. Searching new miRNA markers for the differential diagnosis of brain gliomas of malignancy various degrees. *Siberian Scientific Medical Journal*. 2018;38(6):85-93. (In Russ.) <http://doi.org/10.15372/SSMJ20180613>].
17. Visani M., de Biase D., Marucci G., Taccioli C., Baruzzi A., Pession A. Definition of miRNAs expression profile in glioblastoma samples: the relevance of non-neoplastic brain reference. *PLoS One*. 2013;8(1):e55314. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055314>
18. Ступак Е.В., Веряскина Ю.А., Титов С.Е., Ахмерова Л.Г., Ступак В.В., Мишинов С.В., Копорушко Н.А., Петрова Ю.В., Пустыханов В.В., Иванов М.К., Жумулев И.Ф., Колесников Н.Н. Значение профиля микроРНК в диагностике злокачественных глиом головного мозга. *Российский нейрохирургический журнал*. 2016;8(2):54-58. Режим доступа: http://congress-ph.ru/common/htdocs/upload/fm/magazin-polenov/RN_journal_2016_2.pdf [Stupak E.V., Veryaskina Yu.A., Titov S.E., Akhmerova L.G., Stupak V.V., Mishinov S.V., Koporushko N.A., Petrova Yu.V., Pustokhanov V.V., Ivanov M.K., Zhimulev I.F., Kolesnikov N.N. MicroRNA profile at diagnostics of brain malignant gliomas. *Russian Neurosurgical Journal*. 2016;8(2):54-58. (In Russ.) Available from: http://congress-ph.ru/common/htdocs/upload/fm/magazin-polenov/RN_journal_2016_2.pdf].
19. Wu L., Li G., Feng D., Qin H., Gong L., Zhang J., Zhang Z. MicroRNA-21 expression is associated with overall survival in patients with glioma. *Diagn Pathol*. 2013;8:200. PMID: 24326156, PMID: PMC3933412. <https://doi.org/10.1186/1746-1596-8-200>
20. Hao J., Zhang C., Zhang A., Wang K., Jia Z., Wang G., Han L., Kang C., Pu P. miR-221/222 is the regulator of Cx43 expression in human glioblastoma cells. *Oncol Rep*. 2012;27(5):1504-1510. PMID: 22294051. <https://doi.org/10.3892/or.2012.1652>
21. Galardi S., Mercatelli N., Farace M.G., Ciafre S.A. NF-κB and c-Jun induce the expression of the oncogenic miR-221 and miR-222 in prostate carcinoma and glioblastoma. *Nucleic Acids Res*. 2011;39(9):3892-3902. PMID: 21245048, PMID: PMC3089483. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr006>
22. Quintavalle C., Garofalo M., Zanca C., Romano G., Iaboni M., del Basso De Caro M., Martinez-Montero J.C., Incoronato M., Nuovo G., Croce C.M., Condorelli G. miR-221/222 overexpression in human glioblastoma increases invasiveness by targeting the protein phosphate PTPmu. *Oncogene*. 2012;31(7):858-868. PMID: PMC4299860, PMID: 21743492. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.280>
23. Rajbhandari R., McFarland B.C., Patel A., Gerigk M., Gray G.K., Fehling S.C., Bredel M., Berbari N.F., Kim H., Marks M.P., Meares G.P., Sinha T., Chuang J., Benveniste E.N., Nozell S.E. Loss of tumor

- suppressive microRNA-31 enhances TRADD/NF- κ B signaling in glioblastoma. *Oncotarget*. 2015;19(6):17805-17816. PMID: PMC4627347, PMID: 26164206. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4596>
24. Huang B.S., Luo Q.Z., Han Y., Li X.B., Cao L.J., Wu L.X. MicroRNA-223 promotes the growth and invasion of glioblastoma cells by targeting tumor suppressor PAX6. *Oncol Rep*. 2013;30(5):2263-2269. PMID: 23970099. <https://doi.org/10.3892/or.2013.2683>
25. Ding Q., Shen L., Nie X., Lu B., Pan X., Su Z., Yan A., Yan R., Zhou Y., Li L., Xu J. MiR-223-3p overexpression inhibits cell proliferation and migration by regulating inflammation-associated cytokines in glioblastomas. *Pathol Res Pract*. 2018;214(9):1330-1339. <https://doi.org/10.1148/radiol.2018172131>
26. Клинические рекомендации по диагностике и лечению больных с первичными опухолями головного мозга. М.: Ассоциация онкологов России, 2014. Режим доступа: <http://www.oncology.ru/association/clinical-guidelines/2014/32.pdf> [Clinical guidelines for the diagnosis and treatment of patients with primary brain tumors. Moscow, Association of Oncologists of Russia, 2014. (In Russ.) Available from: <http://www.oncology.ru/association/clinical-guidelines/2014/32.pdf> (In Russ.)].

Prognostic significance of microRNAs in survival of patients with supratentorial gliomas

Evgeny V. Stupak¹, Sergey E. Titov^{2,3}, Yuliya A. Versyaskina^{2,3}, Larisa G. Akhmerova², Igor F. Zhimulyov², Vyacheslav V. Stupak¹, Samuil S. Rabinovich^{1,4}, Alexander E. Simonovich¹, Dmitry A. Dolzhenko⁵

¹ Novosibirsk Research Institute of Traumatology and Orthopaedics of the Ministry of Health of Russian Federation, Novosibirsk, Russian Federation

² Institute of Molecular and Cell Biology of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

³ Vector-Best, Novosibirsk, Russian Federation

⁴ Novosibirsk State Medical University of the Ministry of Health of Russian Federation, Novosibirsk, Russian Federation

⁵ Regional Clinical Hospital, Barnaul, Russian Federation

Corresponding author. Evgeny V. Stupak, stupakphoto@mail.ru

Aim. To identify novel microRNA markers as survival predictors in patients with supratentorial gliomas.

Methods. This study involved the analysis of tumour and normal brain tissue biopsy samples obtained from patients undergoing combination treatment for supratentorial gliomas of different World Health Organization (WHO) grades. Real-time polymerase chain reaction was used to determine the expression profiles of ten microRNAs, following comparison with clinical treatment results: tumour morphology, WHO grade, patient age, Karnofsky scale, treatment type, postsurgical survival rate and histological diagnosis. The mean age of surgically treated patients [62 (57.9%) males and 45 (42.1%) females] was 48.8 ± 14 years. There were 17 (16%), 30 (28%) and 60 (56%) patients with grade II, III and IV (glioblastoma) gliomas, respectively. Statistical analysis was performed using Statistica version 10.0 and GraphPad Prism version 5.

Results. Four microRNAs (miRNA-31, miRNA-21, miRNA-223 and miRNA-221) were strongly correlated with worse survival, when over-expressed, indicating their potential utility as survival predictors in glioma patients. Overexpression of these microRNAs in glioma tissue, lack of adjuvant therapy such as chemotherapy or radiotherapy and age > 48 years were identified as factors for worse prognosis.

Keywords: brain glioma; microRNA; molecular genetics; survival predictor

Received 14 May 2019. Revised 21 June 2019. Accepted 25 June 2019.

Funding: This work was supported by the program of fundamental scientific research on the topic 0310-2019-0003.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

ORCID ID

S.E. Titov, <https://orcid.org/0000-0001-9401-5737>

Yu.A. Versyaskina, <https://orcid.org/0000-0002-3799-9407>

A.E. Simonovich, <https://orcid.org/0000-0003-2822-3479>

D.A. Dolzhenko, <https://orcid.org/0000-0001-7369-3096>

Copyright: © 2019 Stupak et al. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 License.

How to cite: Stupak E.V., Titov S.E., Versyaskina Y.A., Akhmerova L.G., Zhimulyov I.F., Stupak V.V., Rabinovich S.S., Simonovich A.E., Dolzhenko D.A. Prognostic significance of microRNAs in survival of patients with supratentorial gliomas. *Patologiya krovoobrashcheniya i kardiokirurgiya = Circulation Pathology and Cardiac Surgery*. 2019; 23(1):61-70. (In Russ.). <http://dx.doi.org/10.21688-1681-3472-2019-1-61-70>