

## ПОИСК НОВЫХ микроРНК-МАРКЕРОВ ДЛЯ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ ГЛИОМ ГОЛОВНОГО МОЗГА РАЗЛИЧНОЙ СТЕПЕНИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОСТИ

Евгений Вячеславович СТУПАК<sup>1</sup>, Сергей Евгеньевич ТИТОВ<sup>2,3</sup>,  
Юлия Андреевна ВЕРЯСКИНА<sup>2</sup>, Лариса Григорьевна АХМЕРОВА<sup>2</sup>,  
Вячеслав Владимирович СТУПАК<sup>1</sup>, Самуил Семенович РАБИНОВИЧ<sup>1</sup>,  
Дмитрий Андреевич ДОЛЖЕНКО<sup>1</sup>, Игорь Федорович ЖИМУЛЁВ<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Новосибирский НИИ травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна Минздрава России  
630091, г. Новосибирск, ул. Фрунзе, 17

<sup>2</sup> Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН  
630090, г. Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 8/2

<sup>3</sup> АО «Вектор-Бест»  
630117, г. Новосибирск, ул. Арбузова, 1/1

Цель исследования – поиск новых микроРНК-маркеров для дифференциальной диагностики глиом головного мозга различной степени злокачественности. **Материал и методы.** Операционный материал – опухолевые и внешне неизменные ткани головного мозга – получены от 43 пациентов с глиомами разной степени анаплазии. У шести оперированных с глиомами головного мозга для определения уровня экспрессии 800 микроРНК использовалась высокопропускная платформа NanoString. У 37 больных с аналогичной патологией выявляли микроРНК-128, 143, 144, 182, 183, 199b, 204, 7, 99a с помощью ПЦР в реальном времени. **Результаты и их обсуждение.** С помощью технологии NanoString установлено, что уровень экспрессии микроРНК-199b при глиомах III и IV степени статистически значимо выше, чем при глиомах II степени, в то время как уровень экспрессии микроРНК-144 и микроРНК-182 – ниже. Также выявлено достоверное 10-кратное увеличение экспрессии микроРНК-7 при опухолях IV степени по сравнению с опухолями II степени. 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.

**Ключевые слова:** глиомы головного мозга, микроРНК, глиомы различной степени злокачественности, экспрессия микроРНК, технология NanoString, ПЦР.

Глиомы мозга являются наиболее распространенной первичной опухолью головного мозга человека, на них приходится примерно 60 % всех опухолей центральной нервной системы у взрослых и детей [1, 2]. Полное удаление злокачественных глиом хирургическим путем невозможно, во-первых, в связи с тем, что опухоль часто располагается глубинно, в функционально

значимых зонах головного мозга, манипуляция на которых может привести к грубому неврологическому дефициту. Во-вторых, они обладают высокой степенью инвазии в здоровую мозговую ткань. Несмотря на разработанный комплексный подход в лечении данного вида новообразований, включающий современные высокотехнологические методы хирургии, лучевую и химиотерапию,

**Ступак Е.В.** – младший научный сотрудник отделения нейрохирургии, e-mail: [stupakphoto@mail.ru](mailto:stupakphoto@mail.ru)

**Титов С.Е.** – к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярной генетики, e-mail: [titovse78@gmail.com](mailto:titovse78@gmail.com)

**Веряскина Ю.А.** – к.б.н., научный сотрудник лаборатории молекулярной генетики, e-mail: [ft-31@mail.ru](mailto:ft-31@mail.ru)

**Ахмерова Л.Г.** – к.б.н., ученый секретарь, e-mail: [ahmerova@mcb.nsc.ru](mailto:ahmerova@mcb.nsc.ru)

**Ступак В.В.** – д.м.н., проф., начальник отделения нейрохирургии, e-mail: [VStupak@niito.ru](mailto:VStupak@niito.ru)

**Рабинович С.С.** – д.м.н., проф., преподаватель учебного отдела

**Долженко Д.А.** – д.м.н., проф., e-mail: [hospital@hospital.e4u.ru](mailto:hospital@hospital.e4u.ru)

**Жимулёв И.Ф.** – д.б.н., академик РАН, зав. отделом структуры и функции хромосом, зав. лабораторией молекулярной цитогенетики, e-mail: [zhimulev@mcb.nsc.ru](mailto:zhimulev@mcb.nsc.ru)

они по-прежнему характеризуются низкими показателями 5-летнего выживания [16].

В настоящее время актуальной проблемой является не только улучшение результатов лечения пациентов со злокачественными глиомами, но и возможность прогнозирования течения заболевания. Для этого необходима более надежная и достоверная оценка степени злокачественности опухоли, которая влияет на выбор оптимальной тактики комплексного лечения больных. Несколько лет назад гистологический диагноз для большинства опухолей был основным фактором, определяющим долгосрочный прогноз. Однако при установлении гистологического диагноза и определении степени злокачественности нейроэктодермальных опухолей часто возникают ошибки, достигающие даже в ведущих клиниках от 38 до 64 % [19]. Поэтому в настоящее время молекулярно-генетические характеристики опухолей занимают важное место в их классификации, поскольку гораздо лучше коррелируют с прогнозом, чем существующая гистологическая характеристика глиом. Об этом свидетельствует опубликованная новая гистологическая классификация ВОЗ опухолей центральной нервной системы, принятая в 2016 г. [14]. Предлагаемые поправки касаются, прежде всего, нейроэктодермальных опухолей. Новая классификация основана не только на гистологической структуре опухоли, но и на обязательном исследовании ее наиболее значимых молекулярно-генетических характеристик. 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, соответственно, в оптимизации комбинированного лечения больных со злокачественными глиомами головного мозга, как нам представляется, является изучение роли микроРНК.

МикроРНК представляют собой короткие некодирующие РНК (20–22 нуклеотида), которые контролируют экспрессию генов, кодирующих белки, и играют важную роль в таких биологических процессах, как клеточная пролиферация, дифференцировка и апоптоз [4, 21]. Последние исследования показали, что микроРНК не только ассоциированы с различными типами опухолей, но могут сами выступать в роли онкогенов и супрессоров и таким образом представляют собой диагностические маркеры и мишени потенциального воздействия на опухолевые процессы. Работы по этому направлению интенсивно раз-

виваются. Появляется все больше исследований, связанных со сравнительным анализом экспрессии микроРНК в тканях глиом головного мозга. Уже выявлен ряд микроРНК, которые рекомендуют как в качестве диагностических маркеров глиом головного мозга вообще, так и для определения степени злокачественности данных новообразований.

Известно, что глиомы разной степени злокачественности различаются уровнем экспрессии микроРНК. Так, глиомы высокой степени злокачественности (III и IV) по сравнению с условно нормальными прилежащими тканями головного мозга имеют пониженную экспрессию онкосупрессорных микроРНК-31, 137, 153, 181 и 124 и повышенную экспрессию онкогенных микроРНК-21, 23а и 221/222 [3, 7, 8, 23, 24], при этом наиболее высокий уровень отмечен в глиобластомах [3, 8]. Глиомы низкой степени злокачественности (I и II) характеризуются уменьшением экспрессии онкосупрессорных микроРНК-137, 153 и 181 по сравнению с паратуморозной тканью [8, 24]. Для онкогенных микроРНК-21, 221/222 в глиомах низкой степени злокачественности прослеживается корреляция между уровнем экспрессии и степенью злокачественности [3, 8].

В настоящий момент накоплен большой научный опыт по определению уровня экспрессии микроРНК в глиомах головного мозга человека с применением различных методов. Но существуют серьезные препятствия, ограничивающие использование в клинической диагностике предлагаемых подходов на основе использования микроРНК. Они, во-первых, связаны с тем, что работы выполнялись на малых группах больных с различной гистоструктурой новообразований. Во-вторых, необходимо учитывать, что глиомы головного мозга являются гетерогенной группой. Это осложняет интерпретацию данных и выбор микроРНК, которые могли бы выступать в качестве маркеров для диагностики глиом. В связи с этим важной задачей является стандартизация методов определения уровня экспрессии микроРНК и подбора оптимальных референсных генов. Поэтому изучение роли микроРНК в процессах онкогенеза головного мозга человека и выявление спектра ключевых микроРНК, являющихся потенциальными маркерами злокачественных новообразований для диагностических и прогностических целей, представляет большой интерес.

Цель исследования – поиск новых микроРНК-маркеров для дифференциальной диагностики глиом головного мозга различной степени злокачественности.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

**Клинический материал.** Операционный материал – по два биоптата объемом 1 мм<sup>3</sup> каждый – опухолевой и прилежащей к ней морфологически неизменной ткани головного мозга, забранный на расстоянии более 2 см от новообразования в функционально незначимой зоне, был получен от 43 первично оперированных пациентов с нейроэпителиальными типами опухолей супратенториальной локализации разной степени злокачественности. Пациенты распределились в группы в зависимости от гистологического диагноза по степени злокачественности опухоли: глиомы II степени – 12, глиомы III степени – 14 и глиомы IV степени – 11 человек. У шести пациентов для определения уровня экспрессии 800 микроРНК использовалась высокопропускная платформа NanoString. Для валидации полученных результатов методом ПЦР у 37 больных с аналогичной патологией забор биоптатов проведен в таком же объеме. Операционный материал получен в соответствии с законодательством РФ, работа одобрена этическим комитетом Новосибирского НИИ травматологии и ортопедии. От каждого больного получено информированное согласие на участие в исследовании, все данные деперсонализированы.

**Выделение суммарной РНК.** Биоптат помещали в пробирку и добавляли 600 мкл лизирующего буфера (4 М гуанидинизотиоцианат, 25 мМ цитрат натрия, 0,3%-й саркозил, 3%-й дитиотреитол), расфасованного в бескислородной атмосфере (ЗАО «Вектор-Бест», Новосибирск). Пробирки помещали в термошейкер на 10 мин при 65 °С, затем центрифугировали 2 мин при 10000 g, переносили супернатант в новые пробирки и добавляли к нему равный объем изопропанола, перемешивали и оставляли при комнатной температуре на 5 мин. Центрифугировали 10 мин при 12 000 g, супернатант сливали, осадок промывали: 500 мкл 70%-го этанола, затем 300 мкл ацетона. РНК растворяли в 200 мкл деионизированной воды.

**Детекция микроРНК с помощью технологии NanoString.** Экспрессию 800 микроРНК определяли с помощью набора nCounter Human v2 miRNA Expression Assay (NanoString Technologies, США) в соответствии с инструкциями производителя. Для анализа брали 100 нг тотальной РНК, гибридизацию проводили 20 ч при 65 °С. После гибридизации образцы помещали в автоматическую станцию nCounter Prep Station для очистки и связывания репортерных зондов, затем каждый образец сканировали в 550 полях зрения в nCounter Digital Analyzer. Данные проанализированы с помощью программного обеспечения nSolver v2 (NanoString Technologies). Результаты нормировали на 100 наиболее представленных микроРНК.

**Детекция микроРНК и малой РНК U58 с помощью ПЦР с детекцией результатов в реальном времени (ПЦР-РВ).** Зрелые микроРНК и малую РНК U58 выявляли с помощью метода, включающего в себя обратную транскрипцию зрелой микроРНК с помощью длинного праймера со шпилькой, с последующей детекцией полученной кДНК с использованием ПЦР-РВ [5]. Для каждой микроРНК отдельно проводили реакцию обратной транскрипции с последующей ПЦР-РВ. Для каждого образца реакции обратной транскрипции и ПЦР проводили в одном повторе. Обратную транскрипцию выполняли с использованием лиофилизированной смеси «Мастер-микс ОТ» (АО «Вектор-Бест»). Реакцию проводили в течение 15 мин при 16 °С, 15 мин при 42 °С, затем обратную транскриптазу инактивировали 2 мин при 95 °С и отбирали 3 мкл полученной смеси для ПЦР-РВ, которую выполняли на амплификаторе CFX96 (Bio-Rad Laboratories, США) с использованием лиофилизированной смеси «Мастер-микс ПЦР» (АО «Вектор-Бест»). Протокол ПЦР: предварительный прогрев при 94 °С – 2 мин, 50 основных циклов: денатурация при 94 °С – 10 с, отжиг и элонгация: 60 °С – 20 с.

**Статистическая обработка.** Значимость различий между экспрессией микроРНК в образцах глиом различной степени злокачественности определяли с помощью непараметрического U-критерия Манна – Уитни. Для оценки значимости выявленных различий проводилась дополнительная статистическая обработка методом построения ROC-кривой с вычислением площади под кривой (AUC).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Для поиска микроРНК-кандидатов, которые можно было бы использовать для дифференциальной диагностики глиом в зависимости от степени их злокачественности, мы использовали высокопропускную платформу NanoString, которая позволяет одновременно оценить экспрессию 800 микроРНК в 12 образцах [15]. Для анализа были взяты шесть парных образцов объемом 1 мм<sup>3</sup> каждый (ткань глиомы и ткань внешне неизмененного головного мозга на расстоянии не менее 2 см от опухоли в функционально незначимой зоне). Согласно классификации ВОЗ от 2007 г. [18], к глиоме I, II, III и IV степени относились соответственно 1, 2, 2 и 1 образец. 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

Таблица 1

Нормированное количество копий отобранных микроРНК в глиомах головного мозга

МикроРНК	Первый образец глиомы I степени	Первый образец глиомы II степени	Второй образец глиомы II степени	Первый образец глиомы III степени	Второй образец глиомы III степени	Первый образец глиомы IV степени
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

низко представленные, с количеством копий в образце меньше 50, и те, которые уже были описаны нами раньше – микроРНК-124, 181b, 21, 221 и 451a [25]. В конечном счете на рассмотрении 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. Как следует из приведенных в табл. 1 данных, существуют тенденции в изменении уровня микроРНК в зависимости от степени злокачественности опухоли, но есть и отдельные выпадения. На тех же образцах для сравнения результатов была поставлена ПЦР-РВ на выбранные микроРНК. Напрямую сравнивать NanoString и ПЦР нельзя – в первом случае мы получаем количество копий в образце, во втором – количество копий относительно нормализатора (U58). Однако сравнению подлежит соотношение между количеством микроРНК в глиомах разной степени злокачественности (рис. 1).

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

Чтобы валидировать полученные результаты, мы взяли расширенную выборку глиом II, III и IV степени – соответственно 12, 14 и 11 образцов. Найти дополнительные опухоли первой степени злокачественности нам не удалось. Относительный уровень экспрессии выбранных микроРНК был определен методом ПЦР-РВ, медианные значения для каждой группы представлены на рис. 2. Сравнение этих данных с показателями, полученными на отдельных образцах с помощью как ПЦР-РВ, 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 значимы различия в экспрессии отобранных нами микроРНК между разными степенями злокачественности глиом, мы использовали критерий Манна – Уитни (табл. 2) и обнаружили, что разница в экспрессии микроРНК между образцами глиом, относящимся к II и III степени злокачественности, статистически значима для микроРНК-144, 182 и 199b. Для опухолей II и IV степеней 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 не обнаружено.

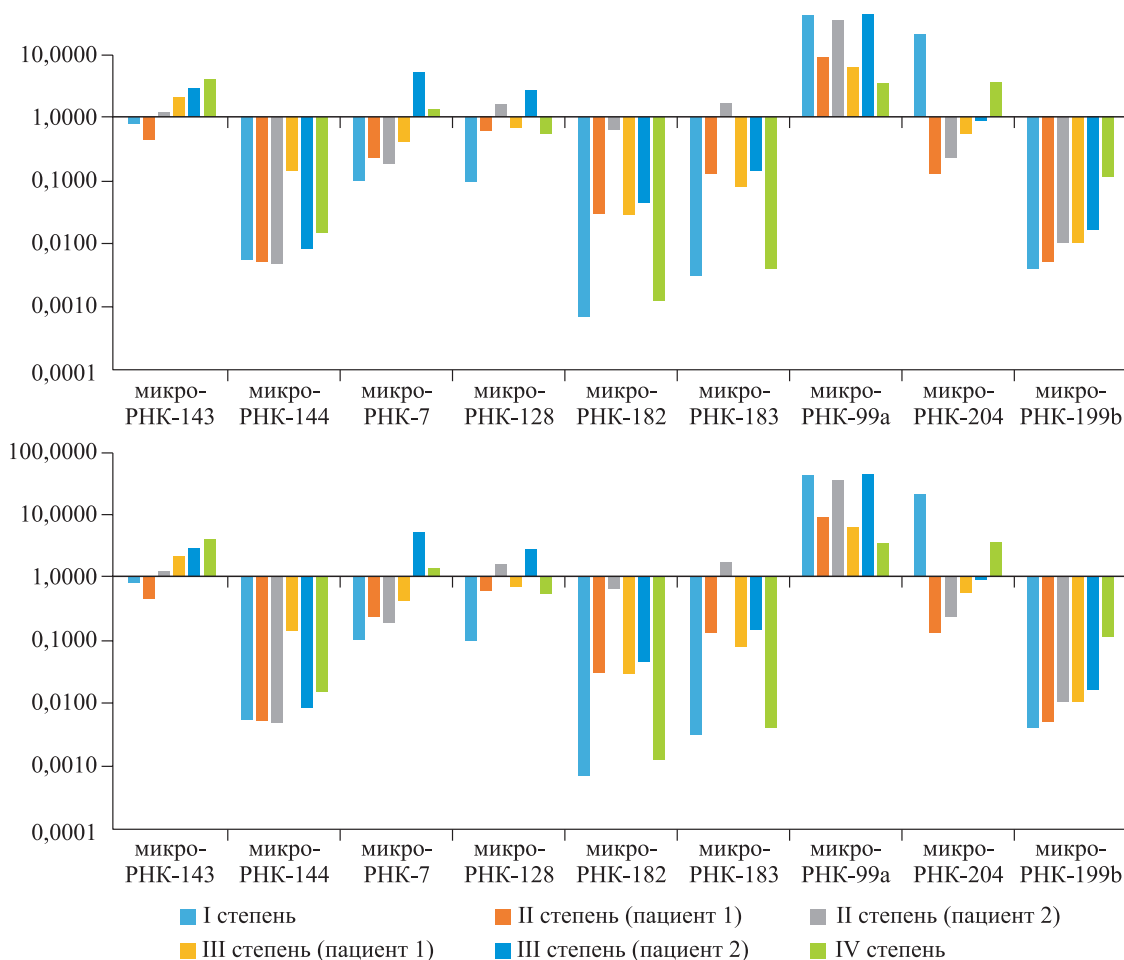


Рис. 1. Соотношение экспрессии выбранных микроРНК в глиомах различной степени злокачественности, измеренной с помощью Nanostring и ОТ-ПЦР. Логарифмическая шкала

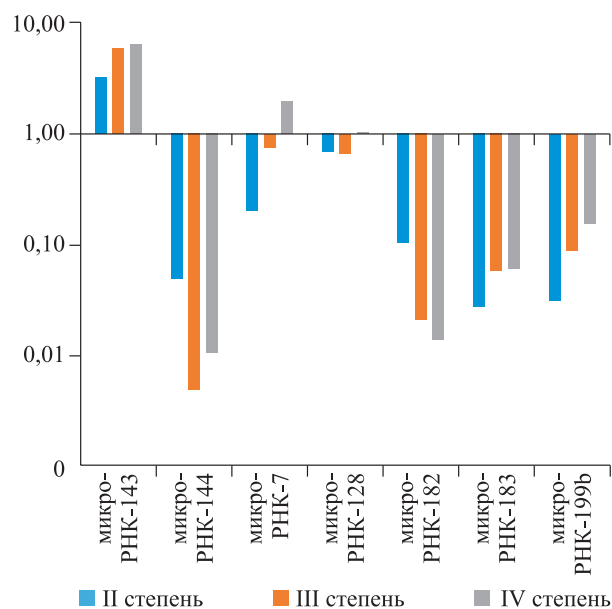


Рис. 2. Относительные уровни экспрессии микроРНК в образцах глиом разной степени злокачественности. Представлены медианные значения, логарифмическая шкала

Таблица 2

Значимость различий между экспрессией микроРНК в образцах глиом различной степени злокачественности

МикроРНК	Уровень значимости (p)		
	$p_1$	$p_2$	$p_3$
143	0,109008	0,094167	0,598091
144	<b>0,037798</b>	<b>0,012764</b>	0,594033
7	0,059664	<b>0,045456</b>	0,921212
128	0,934973	0,558760	0,324663
182	<b>0,049142</b>	<b>0,029490</b>	0,531046
183	0,431033	0,531668	0,918456
199b	<b>0,007699</b>	<b>0,000252</b>	0,340779

Примечание. Жирным шрифтом выделены значимые различия ( $p < 0,05$ ); обозначена значимость различий между экспрессией соответствующей микроРНК в глиомах II и III степени ( $p_1$ ), II и IV степени ( $p_2$ ), III и IV степени ( $p_3$ ).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Экспрессия микроРНК всегда изменяется в опухолях по сравнению со здоровыми тканями, а также зависит от типа и стадии развития новообразования. Поскольку микроРНК высоко стабильны в биологических тканях, 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 в глиомах разных степеней. Поскольку пять из них уже описаны в нашей предыдущей работе (микроРНК-124, 181b, 21, 221 и 451a), в итоге их осталось девять: 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 высокопропускные методы позволяют определять уровень экспрессии хотя и сразу нескольких сотен микроРНК, но лишь в небольшом количестве образцов (в нашем случае шесть 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 – с результатами ПЦР-РВ на расширенной выборке.

В итоге мы отобрали семь новых микроРНК, которые относятся как к онкосупрессивным – микроРНК-7, 128, 143 и 199b, так и к онкогенным – микроРНК-144-3p, 182 и 183. Однако после валидации на расширенной выборке статистически значимые различия в экспрессии обнаружили только для четырех микроРНК: 144, 7, 182 и 199b. Причем между III и IV степенью таких различий вообще не было, а наблюдались они преимущественно для II и IV степени 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 ма-

лигнизацию опухоли: инвазию, пролиферацию, миграцию, апоптоз. M. Visani et. al. описывают снижение ее экспрессии в глиомах по сравнению с паратуморозной тканью [26]. В нашем исследовании отмечено достоверное повышение экспрессии микроРНК-7 в 10 раз в опухолях IV степени по сравнению с глиомами II степени.

Нейронспецифическая микроРНК-128 участвует в дифференцировке нервной ткани, в глиобластомах она выступает в качестве онкосупрессора [6, 12]. Мишенью микроРНК-128 служит фактор транскрипции E2F3a, снижение ее экспрессии сопровождается угнетением клеточного цикла и пролиферации клеток опухоли [30]. Y. Zhang et al. в своих исследованиях установили, что в глиомах содержание микроРНК-128 меньше, чем в паратуморозной ткани [6, 12]. Мы также зафиксировали небольшое (в среднем в 1,5 раза) снижение экспрессии микроРНК-128 в глиомах II степени по сравнению с опухолями IV степени.

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 (MAPK)/внеклеточной сигнальной киназы (ERK), уменьшается как накопление p65 в ядрах клеток глиомы, так и их миграция, инвазия, ослабляется рост опухоли и ангиогенез [27]. МикроРНК-143 задействована в деградации микроРНК NUAК2, что также ингибирует пролиферацию, миграцию и инвазию клеток глиобластомы [11]. По данным T.G. Fu et al., уровень ее экспрессии в злокачественных глиомах меньше, чем в паратуморозной ткани мозга, но одинаков в опухолях с разной степенью анаплазии [11]. Нами получены аналогичные данные, свидетельствующие об отсутствии статистически значимых различий экспрессии микроРНК-143 в глиомах II, III и IV степени, хотя имелся общий тренд к ее повышению от низкой к высокой степени злокачественности (в среднем в 1,9 раза между II и IV степенью).

Установлено, что уровень экспрессии микроРНК-144-3p снижен не только в тканях глиом вообще по сравнению с паратуморозной тканью, но и особенно в глиомах высокой степени анаплазии по отношению к опухолям меньшей степени злокачественности. Кроме того, у пациентов с низким уровнем экспрессии микроРНК-144-3p в глиоме хуже показатели выживаемости [27]. Наши данные свидетельствуют о том, что по экспрессии микроРНК-144-3p глиомы II степени

действительно достоверно отличаются от опухолей III и IV степени, причем в последних двух случаях она снижена в 5–10 раз по сравнению с прилежащей тканью.

МикроРНК-182 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* [10, 17, 20, 22, 28]. В тканях первичных глиом установлено пятикратное, а в образцах глиобластом – 32-кратное увеличение уровня ее экспрессии по сравнению с паратуморозной тканью [13]. Тем не менее нами обнаружено достоверное снижение экспрессии микроРНК-182 при глиоме II степени по сравнению с опухолями III и IV степени приблизительно в 5 и 7 раз соответственно.

Аналогичные данные получены при изучении уровня экспрессии микроРНК-183, который был выше в опухолевой ткани, чем во внешне неизменной ткани мозга, при этом в глиомах высокой степени злокачественности величина показателя доходила до максимальных значений. Увеличение содержания микроРНК-183 в глиомах, особенно с высокой степенью анаплазии, может индуцировать канцерогенез и прогрессирование опухоли путем воздействия на гены, которые влияют на выживание клеток, пролиферацию, миграцию и инвазию, такие как *PDCD4*, *EGR1/PTEN*, *FOXO1*, *IDH-2/HIF-1 $\alpha$* , и гены, регулируемые активными формами кислорода, в конечном счете опосредуя степень злокачественности, а также плохой прогноз выживания пациентов [29]. 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 белка SET, который, угнетая активность опухолевого супрессора протеинфосфатазы A2, также участвует в приобретенной химиорезистентности при хроническом миелоидном лейкозе или раке яичников. Кроме того, микроРНК-199b функционирует как супрессор опухоли в медуллобластоме, гепатоцеллюлярной карциноме и раке молочной железы, воздействуя на такие мишени, как *HEIS1*, *HIF-1 $\alpha$*  или *HER2* [9]. Впервые (в литературных источниках таких данных нет) нами зафиксировано достоверное увеличение уровня экспрессии микроРНК-199b при глиоме II степени по сравнению с опухолями III и IV степени в 2,8 и 4,8 раза соответственно.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С помощью технологии NanoString установлено, что уровень экспрессии микроРНК-199b в тканях глиом высокой степени злокачественности (II и IV) больше, чем в тканях опухолей низкой степени злокачественности (II степень), в то время как уровень экспрессии микроРНК-144 и микроРНК-182 – меньше. Также выявлено достоверное 10-кратное повышение экспрессии микроРНК-7 в опухолях II степени по сравнению с глиомами IV степени. С точки зрения практической нейрохирургии интерес представляют случаи различия между II и III, II и IV степенями анаплазии глиом. Для их дифференциальной диагностики подошли только четыре микроРНК: для II и III степени – микроРНК-144 (AUC = 0,767), микроРНК-182 (AUC = 0,771) и микроРНК-199b (AUC = 0,852), для II и IV степени – 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.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при финансовой поддержке программы фундаментальных научных исследований № 0310-2018-0007 и № 0310-2018-0010.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Зозуля Ю.А., Васильева И.Г., Главацкий А.Я. Глиомы головного мозга. Киев: ЕксОб, 2007. 636 с.
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.
3. Ступак Е.В., Веряскина Ю.А., Титов С.Е., Ахмерова Л.Г., Ступак В.В., Мишинов С.В., Копорушко Н.А., Петрова Ю.В., Пустаханов В.В., Иванов М.К., Жимулёв И.Ф., Колесников Н.Н. Значение профиля микроРНК в диагностике злокачественных глиом головного мозга // Рос. нейрохирург. журн. 2016. 8. (2). 54–58.
4. 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.

5. 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., Liva K.J., Guegler K.J. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR // Nucl. Acids Res. 2005. 20. (33). e179.

6. Ciafre S.A., Galardi S., Mangiola A., Ferracin M., Liu C.G., Sabatino G., Negrini M., Maira G., Croce C.M., Farace M.G. Extensive modulation of a set of microRNAs in primary glioblastoma // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2005. 334. 1351–1358.

7. Conaco C., Otto S., Han J.J., Mandel G. Reciprocal actions of REST and a microRNA promote neuronal identity // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2006. 103. (7). 2422–2427.

8. 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.

9. Cristóbal I., Caramés C., Rincón R., Manso R., Madoz-Gúrpide J., Torrejón B., González-Alonso P., Rojo F., García-Foncillas J. Downregulation of microRNA-199b predicts unfavorable prognosis and emerges as a novel therapeutic target which contributes to PP2A inhibition in metastatic colorectal cancer // Oncotarget. 2017. 8. 40169–40180.

10. Feng Y.A., Liu T., Wu Y. MicroRNA 182 inhibits the proliferation and migration of glioma cells through the induction of neuritin expression // Oncol. Lett. 2015. 10. (2). 1197–1203.

11. Fu T.G., Wang L., Li W., Li J.Z., Li J. miR-143 inhibits oncogenic traits by degrading NUA2 in glioblastoma // Int. J. Mol. Med. 2016. 37. (6). 1627–1635.

12. Godlewski J., Nowicki M.O., Bronisz A., Williams S., Otsuki A., Nuovo G., Raychaudhury A., Newton H.B., Chiocca E.A., Lawler S. Targeting of the Bmi-1 oncogene/stem cell renewal factor by microRNA-128 inhibits glioma proliferation and self-renewal // Cancer Res. 2008. 68. 9125–9130.

13. Jiang L., Mao P., Song L., Wu J., Huang J., Lin C., Yuan J., Qu L., Cheng S.Y., Li J. miR-182 as a prognostic marker for glioma progression and patient survival // Am. J. Pathol. 2010. 177. (1). 29–38.

14. Krutovskikh V.A., Herceg Z. Oncogenic microRNAs (OncomiRs) as a new class of cancer biomarkers // Bioessays. 2010. 32. (10). 894–904.

15. Kulkarni M.M. Digital multiplexed gene expression analysis using the NanoString nCounter system // Curr. Protoc. Mol. Biol. 2011. 25. 25B.10.

16. Law M., Young R.J., Babb J.S., Peccerelli N., Chheang S., Gruber M.L., Miller D.C., Golfinos J.G., Zagzag D., Johnson G. Gliomas: predicting time to progression or survival with cerebral blood volume

measurements at dynamic susceptibility-weighted contrast-enhanced perfusion MR imaging // Radiology. 2008. 247. 490–498.

17. Liu Z., Liu J., Segura M.F., Shao C., Lee P., Gong Y., Hernando E., Wei J.J. miR-182 overexpression in tumorigenesis of high-grade serous ovarian carcinoma // J. Pathol. 2012. 228. (2). 204–215.

18. 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.

19. 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.

20. Qu Y., Li W.C., Hellem M.R., Rostad K., Popa M., McCormack E., Oyan A.M., Kalland K.H., Ke X.S. miR-182 and miR-203 induce mesenchymal to epithelial transition and self-sufficiency of growth signals via repressing SNAI2 in prostate cells // Int. J. Cancer. 2013. 133. (3). 544–555.

21. 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.

22. Segura M.F., Hanniford D., Menendez S., Reavie L., Zou X., Alvarez-Diaz S., Zakrzewski J., Blochin E., Rose A., Bogunovic D., Polsky D., Wei J., Lee P., Belitskaya-Levy I., Bhardwaj N., Osman I., Hernando E. Aberrant miR-182 expression promotes melanoma metastasis by repressing FOXO3 and microphthalmia-associated transcription factor // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2009. 106. (6). 1814–1819.

23. Shi L., Cheng Z., Zhang J., Li R., Zhao P., Fu Z., You Y. hsa-mir-181a and hsa-mir-181b function as tumor suppressors in human glioma cells // Brain Res. 2008. 1236. 185–193.

24. Silber J., Lim D.A., Petritsch C., Persson A.I., Maunakea A.K., Yu M., Vandenberg S.R., Ginzinger D.G., James C.D., Costello J.F., Bergers G., Weiss W.A., Alvarez-Buylla A., Hodgson J.G. miR-124 and miR-137 inhibit proliferation of glioblastoma multiforme cells and induce differentiation of brain tumor stem cells // BMC Med. 2008. 6. 14.

25. Stupak E.V., Veryaskina Yu.A., Titov S.E., Achmerova L.G., Stupak V.V., Dolzhenko D.A., Rabinovich S.S., Zhimulev I.F., Kolesnikov N.N. Studying the MicroRNA role as a survival predictor and revealing its part in malignancy level determination in patients with supratentorial gliomas of brain // AIP Conf. Proc. 2017. 1882. 020073.

26. Visani M., de Biase D., Marucci G., Taccioli C., Baruzzi A. Precision Definition of miRNAs expression profile in glioblastoma samples: the relevance of non-neoplastic brain reference // PLoS One. 2013. 8. (1). e55314.



27. Wang L., Shi Z.M., Jiang C.F., Liu X., Chen Q.D., Qian X., Li D.M., Ge X., Wang X.F., Liu L.Z., You Y.P., Liu N., Jiang B.H. MiR-143 acts as a tumor suppressor by targeting N-RAS and enhances temozolomide-induced apoptosis in glioma // *Oncotarget*. 2014. 5. 5416–5427.
28. Xu X., Lu Z., Qiang W., Vidimar V., Kong B., Kim J.J., Wei J.J. Inactivation of AKT induces cellular senescence in uterine leiomyoma // *Endocrinology*. 2014. 155. (4). 1510–1519.
29. Ye Z., Zhang Z., Wu L., Liu C., Chen Q., Liu J., Wang X., Zhuang Z., Li W., Xu S., Hang C. Upregulation of miR-183 expression and its clinical significance in human brain glioma // *Neurol. Sci*. 2016. 37. (8). 1341–1347.
30. Zhang Y., Chao T., Li R., Liu W., Chen Y., Yan X., Gong Y., Yin B., Liu W., Qiang B., Zhao J., Yuan J., Peng X. MicroRNA-128 inhibits glioma cells proliferation by targeting transcription factor E2F3a // *J. Mol. Med. (Berl)*. 2009. 87. (1). 43–51.

## SEARCH FOR NEW MICRORNA MARKERS FOR DIFFERENTIAL DIAGNOSIS OF DIFFERENT GRADE CEREBRAL GLIOMAS

Evgeniy Vyacheslavovich STUPAK<sup>1</sup>, Sergey Evgenievich TITOV<sup>2,3</sup>,  
Yuliya Andreevna VERYASKINA<sup>2</sup>, Larisa Grigorievna AKHMEROVA<sup>2</sup>,  
Vyacheslav Vladimirovich STUPAK<sup>1</sup>, Samuil Semenovich RABINOVICH<sup>1</sup>,  
Dmitriy Andreevich DOLZHENKO<sup>1</sup>, Igor Fedorovich ZHIMULEV<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Novosibirsk Research Institute of Traumatology and Orthopedics n.a. Ya.L. Tsivyan  
630091, Novosibirsk, Frunze str., 17

<sup>2</sup>Institute of Molecular and Cell Biology of SB RAS  
630090, Novosibirsk, Academician Lavrentiev av., 8/2

<sup>3</sup>Vector-Best  
630117, Novosibirsk, Arbuzov str., 1/1

Purpose of the study – searching of new microRNA markers for differential diagnostics of different grade cerebral gliomas. **Material and methods.** Surgical material is tumor and externally unchanged brain tissue that was obtained from 41 patients with gliomas of different grade anaplasia. In 6 patients with cerebral glioma, a high-throughput Nanostring platform was used to determine the level of expression of 800 microRNAs. 37 patients with a similar pathology were subjected to real-time PCR, microRNA-128, 143, 144, 182, 183, 199b, 204, 7, 99a. **Results and discussion:** It has been established with the NanoString technology that the level of expression of miRNA 199b was significantly higher in gliomas of grade III and IV than in gliomas of grade II. In contrast, the expression level of miRNA-144 and miRNA-182 was reduced. There was also a significant 10-fold increase in the level of expression of microRNA-7 in tumors of grade IV in comparison with grade II. These differences in the expression of four microRNAs in these types of gliomas can be additional markers that distinguish rapidly growing malignant gliomas (grade III, IV) from slowly growing tumors (grade II) and timely assign an adequate comprehensive treatment.

**Key words:** cerebral glioma, microRNA, different grade gliomas, microRNA expression, NanoString technology, PCR.

**Stupak E.V.** – junior researcher, department of neurosurgery, e-mail: EStupak@niito.ru

**Titov S.E.** – candidate of biological sciences, senior researcher of the laboratory of molecular genetics, e-mail: titovse78@gmail.com

**Veryaskina Yu.A.** – candidate of biological sciences, researcher at the laboratory of molecular genetics, e-mail: fl-31@mail.ru

**Akhmerova L.G.** – candidate of biological sciences, scientific secretary, e-mail: ahmerova@mcb.nsc.ru

**Stupak V.V.** – doctor of medical sciences, professor, head of department of neurosurgery, e-mail: VStupak@niito.ru

**Rabinovich S.S.** – doctor of medical sciences, professor, teacher of the training department

**Dolzhenko D.A.** – doctor of medical sciences, professor, e-mail: hospital@hospital.e4u.ru

**Zhimulev I.F.** – doctor of medical sciences, academician of RAS, head of the department of structure and function of chromosomes, head of the laboratory of molecular cytogenetics, e-mail: zhimulev@mcb.nsc.ru