

На правах рукописи



СТУПАК

Евгений Вячеславович

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

14.01.18 – нейрохирургия

АВТОРЕФЕРАТ ДИССЕРТАЦИИ

на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Новосибирск

2019

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Новосибирский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор

Рабинович Самуил Семенович

Научный консультант:

кандидат биологических наук

Титов Сергей Евгеньевич

Официальные оппоненты:

Данилов Валерий Иванович, доктор медицинских наук, профессор, заслуженный врач РТ и РФ, заведующий кафедрой неврологии и нейрохирургии факультета повышения квалификации и профессиональной переподготовки специалистов федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Кравец Леонид Яковлевич, доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник группы микронеурологии федерального государственного бюджетного учреждения высшего образования «Приволжский исследовательский медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Ведущая организация: федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита диссертации состоится «20» декабря 2019 г. в 10-00 ч. на заседании диссертационного совета Д.208.064.02 при ФГБУ «ННИИТО им. Я.Л. Цивьяна» Минздрава России по адресу: 630091, г. Новосибирск, ул. Фрунзе, 17.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБУ «ННИИТО им. Я.Л. Цивьяна» Минздрава России по адресу: 630091, г. Новосибирск, ул. Фрунзе, 17, и на официальном сайте организации.

Автореферат разослан «_____» _____ 2019 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
Д.208.064.02

д-р мед. наук. Кирилова Ирина Анатольевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. В настоящее время общемировой тенденцией является рост заболеваемости опухолями центральной нервной системы. Среди всех первичных опухолей головного мозга наибольший удельный вес составляют глиомы, которые встречаются в 50 - 55 % случаев, из них более половины являются злокачественными (Данилов В.И., 2017; Кравец Л.Я. 2017; Улитин А.Ю., 2017). Среди всех эпителиально-клеточных внутримозговых опухолей наиболее агрессивным новообразованием является глиобластома. Больные, у которых диагностирована глиобластома, имеют в большинстве случаев фатальный летальный прогноз.

Современные методы микронеурологии с применением интраоперационных МРТ, нейронавигационных и флюоресцентных технологий в силу анатомических особенностей глиом (инвазивность роста, глубинная локализация в функционально значимых зонах мозга), особенно злокачественных, не позволяют 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, помимо оперативного вмешательства, направленного на максимальную опухолевую циторедукцию, также лучевую и химиотерапию (Коновалов А.Н., 1997; Rampling R., 2004; Van Meir E.G., 2010). Несмотря на такой комплексный подход в лечении, пациентам не только не удается сохранить, но и сколько-либо значительно продлить жизнь (Okamoto Y., 2004; Jansen M., 2010; Олюшин В.Е., 2012).

В настоящее время наряду с совершенствованием комбинированного подхода к лечению пациентов со злокачественными опухолями головного мозга и методов персонализированной терапии, назрела проблема прогнозирования течения заболевания. Гистологический диагноз для большинства опухолей является основным фактором, определяющим выбор тактики комплексного лечения больных и отдаленный прогноз развития заболевания. На современном этапе молекулярно-генетические характеристики опухоли занимают важное место в классификации опухолей, поскольку гораздо лучше коррелируют с прогнозом, чем существующая гистологическая характеристика глиом. Об этом свидетельствует принятая ВОЗ и опубликованная в 2016 году новая гистологическая классификация опухолей ЦНС (Louis D.N., 2016), предложенные поправки к 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. В связи с этим, большой интерес представляет дальнейшее изучение значения микроРНК в процессах онкогенеза головного мозга человека. Последние исследования показали, что микроРНК не только ассоциированы с различными типами опухолей, но могут и сами выступать в роли онкогенов и супрессоров новообразований наряду с соматическими мутациями в генах, то есть быть первопричиной злокачественных превращений (Andorfer С.А., 2004; Krutovskikh V.А., 2010).

Отмеченная проблема привлекает внимание многих исследователей, о чем свидетельствует количественный рост 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 (Verhaak R.G., 2010; Кошкин Ф. А., 2016).

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 исследования

– 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 неизменного 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: 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, результаты уровней экспрессии отдельных микроРНК (-31, -124, -21, -221 и -223) могут использоваться в качестве маркеров в оценке степени злокачественности новообразования. Так же уровень экспрессии сразу нескольких микроРНК (-21, -221, -223, -125b, -191, -124) может быть применим при установлении степени злокачественности глиом головного мозга. 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.

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 могут помочь клиницистам выявить пациентов, относящихся к группе высокого риска, и назначить им курс более эффективной адъювантной терапии в дополнение к стандартному протоколу лечения.

Основные 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.

Степень достоверности и апробация материалов диссертации. Достоверность полученных результатов определяется репрезентативным объёмом выборки, использованием современных методов исследования и адекватных методов статистической обработки результатов. Основные положения работы доложены и обсуждены на следующих научных форумах: 1. Всероссийские конференции нейрохирургов «Поленовские чтения», Санкт-Петербург, 2015, 2017, 2018 и 2019 гг.; 2. VII Всероссийский съезд нейрохирургов 2015 г., Казань; VIII Всероссийский съезд нейрохирургов 2018 г., Санкт-Петербург; 3. Всероссийские конференции «Цивьяновские чтения 2015 и 2016 гг.»; 4. Международные конференции «Физика рака: трансдисциплинарные проблемы и клинические применения», Томск, 2016 и 2017 гг.; 5. Европейский съезд нейрохирургов, Италия, Венеция, 2017 г.; 6. X Азиатский конгресс нейрохирургов, Казахстан, Астана, 2014 г.

Публикации результатов исследования 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. Результаты диссертационной работы внедрены в научно-исследовательскую, клиническую и педагогическую практику Федерального государственного бюджетного учреждения «ННИИТО им. Я.Л. Цивьяна» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Личный вклад автора. Автором изучены отечественные и зарубежные статьи и монографии по исследуемой проблеме, опубликованные за последние 20 лет. Автор принимал участие в качестве ассистента в операциях у 80 % от общего числа больных, отобранных в данное исследование, самостоятельно забирал биоптаты опухолевой ткани и морфологически неизмененного мозга у 51 пациента; курировал прооперированных больных, сформировал базу данных оперируемых пациентов; 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 изобретение по теме научной работы; лично контролировал назначенную адъювантную терапию оперированных больных, изучал полученные результаты лечения.

Структура и объём диссертации. 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.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Первая глава (литературный обзор) посвящена актуальности и значимости рассматриваемой работы. Подробно описаны современные аспекты и новые стратегии комбинированного лечения глиом головного мозга. Было проанализировано 232 литературных источников.

Во второй главе подробно охарактеризованы материалы и методы исследования. Материалом для клинико-генетических исследований, положенных в основу настоящей работы, послужили микрообразцы патологической и прилегающей здоровой ткани головного мозга. Отбор образцов выполнялся интраоперационно у 118 человек, прооперированных в период с 2014 по 2017 годы по поводу супратенториальных глиом. Хирургическое и послеоперационное лечение проводилось в отделении нейрохирургии ФГБУ "ННИИТО им. Я.Л. Цивьяна" Минздрава России. В серии, состоящей из 118 больных с супратенториальными глиомами, 110 пациентов оперировали первично, 8 повторно в связи с продолженным ростом опухолей. В выборке были представлены больные 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. Средний возраст пациентов составил $48,8 \pm 4$ лет. Следуя МКБ-10, все пациенты были распределены по подгруппам в соответствии с локализацией опухоли (таблица 1). Глиомы подразделялись на 4 группы (grade) в соответствии со степенью их злокачественности: 1) астроцитомы первой степени злокачественности (grade I) была у одного пациента ($n=1$), 2)

астроцитомы второй степени (grade II) - у 17-и (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).

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).

Качество жизни оперированных до оперативного лечения и на момент выписки из стационара оценивали по модифицированной шкале Карновского (Karnofsky Performance Index) (Karnofsky D.A., 1949; O`Dell M.W., 1995) Средний уровень качества жизни пациентов перед операцией составлял 76,1 ± 1,0 баллов, а на момент выписки из стационара - 66,9 ± 1,9 баллов.

Степень радикальности удаления опухолей оценивалась по результатам контрольного томографического исследования с контрастом, проводившегося спустя сутки после операции. В таблице 2 представлены результаты достигнутой радикальности резекции опухолей.

Таблица 2 – 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, принятой ВОЗ в 2007 г. (Louis D.N., 2007). В таблице 3 представлена морфологическая структура опухолей. В большинстве случаев (100

наблюдений) имели место опухоли с высокой степенью злокачественности, а на долю опухолей низкой степени злокачественности пришлось лишь 18 случаев. Помимо хирургического лечения большинство больных проходило курсы лучевой и/или химиотерапии.

Таблица 3 – 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

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 темодала. Химиотерапевтическое лечение темодалом для этих 65-и человек (55 %) проводилось по стандартной схеме. 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. Верификация диагноза опухоли головного мозга выполнялась с помощью Excelart Vantage «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.

Нами разработан оригинальный способ интраоперационного забора опухолевой и морфологически неизменной ткани головного мозга у одного и того же пациента под нейронавигационным контролем, что существенно повышает достоверность проводимых исследований, на который получен патент № 0002651749 Российской Федерации. 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 (рисунок 1). 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 мм^3 . Если расстояние от поверхности мозга до глиомы меньше 2 см (рисунок 2), 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 мм^3 , 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 мм^3 .



Рисунок 1 – МРТ-изображение головного мозга на нейронавигаторе больной с продолженным ростом глиомы задних отделов теменной, затылочной и височной долей правого полушария мозга. Момент определения оптимального доступа к опухоли. По нейронавигационным данным расстояние от поверхности мозга до новообразования 4,3 см

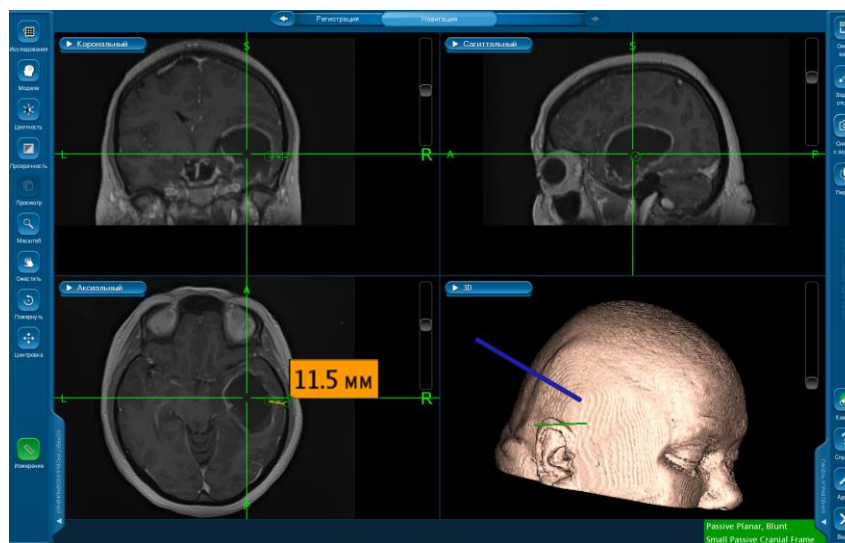


Рисунок 2 – Изображение МРТ головного мозга на нейронавигаторе больной с кистозной глиомой правой височной доли. Момент определения оптимального доступа к опухоли. По нейронавигационным данным расстояние от поверхности мозга до новообразования 11,5 - 11,9 мм

Такая последовательность операций позволяет осуществлять забор исследуемых тканей быстро, с высокой точностью и с минимальным травмированием головного мозга.

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» Министерства здравоохранения Российской Федерации. 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 в реальном времени еще 9 микроРНК: -128, -143, -144, -182, -183, -199b, -204, -7 и -99a. Данный раздел работы был выполнен в лаборатории молекулярной цитогенетики на базе Института молекулярной и клеточной биологии СО РАН.

Выделение нуклеиновых кислот. Выделение нуклеиновых кислот из клинических операционных образцов и образцов, полученных экстракцией

материала, проводилось с использованием набора реагентов «Реал Бест экстракция 100» («АО Вектор-Бест», Россия).

ОТ-ПЦР в реальном времени. Для проведения реакции обратной транскрипции использовали готовые реакционные смеси «Реал Бест Мастер микс ОТ» (АО «Вектор-Бест», Россия). Полученную реакционную смесь, содержащую кДНК, сразу использовали в качестве матрицы для проведения ПЦР в реальном времени на приборе CFX 96 (Bio-Rad, США). В качестве референсного гена использовали малую РНК U58. Системы праймеров и зондов, а также *Taq*-полимеразы разработаны компанией АО «Вектор-Бест», эффективность реакции составляет 85 - 100 %. Анализ полученных данных пороговых циклов ПЦР проводился $2^{-\Delta\Delta Ct}$ методом (Livak K.J., 2001). Изменение уровня экспрессии микроРНК между опухолевой и морфологически неизменной тканями и различными молекулярно-генетическими подтипами опухоли оценивалось путем сравнительного анализа медианных значений $\Delta\Delta Ct$ исследуемых подгрупп пациентов.

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.

Статистическая обработка результатов. Статистическая достоверность полученных данных оценивалась при помощи непараметрического коэффициента Манна-Уитни. Значимость исследуемых классификаторов для дифференциации двух подгрупп оценивалась методом ROC-анализа и значение $AUC \geq 0.8$ принято допустимым и достаточным. 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. Для оценки прогностической значимости изучаемых микроРНК как потенциальных предикторов выживания больных, была проведена оценка взаимосвязи выживаемости пациентов и экспрессии исследуемых микроРНК при помощи однофакторного, многофакторного регрессионного анализов Кокса (Cox D.R., 1972). 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.

В третьей главе описаны результаты анализа молекулярно-генетических особенностей исследуемых супратенториальных глиом головного мозга. При изучении уровней экспрессии 10-и исследуемых микроРНК субтенториальных глиомам всех степеней злокачественности и внешне неизменной ткани головного мозга нами установлено, что статистически достоверные различия были получены для трех микроРНК: микроРНК-124, микроРНК-21, микроРНК-223 ($p < 0.05$) (рисунок 3).

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.

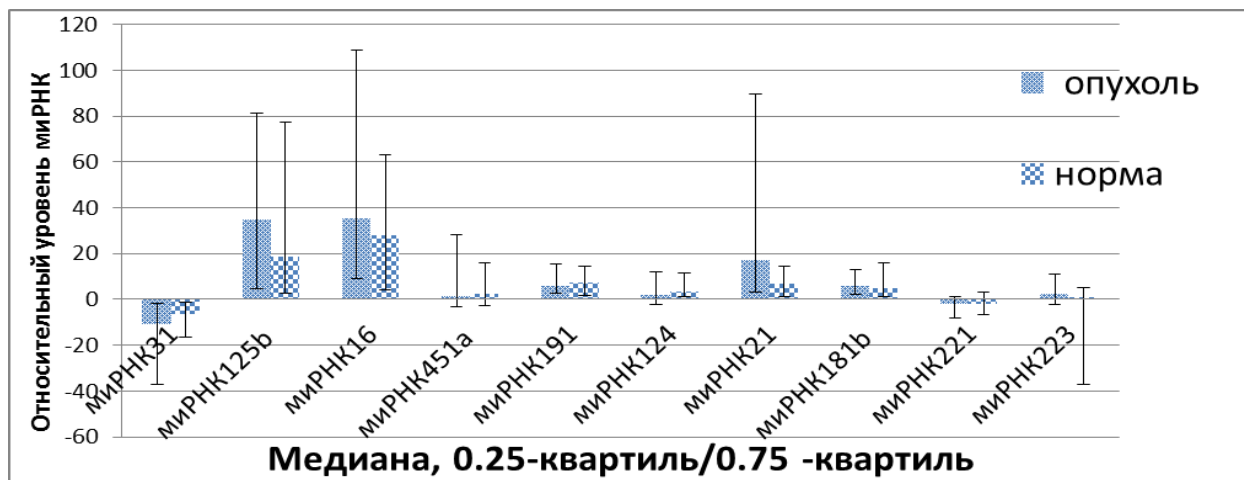


Рисунок 3 – Сравнение относительных значений уровней экспрессии микроРНК в образцах глиом (n=118) и прилежащих морфологически неизменённых тканей мозга (n=118). Указаны медианные значения, 0,25 и 0,75 квантили

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 были выявлены при сравнении показателей глиобластомы (grade IV, n=65) и 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. Так же было отмечено достоверное снижение уровня экспрессии для микроРНК -124 ($p < 0.05$) в тканях глиобластом по отношению с условной нормой.

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 конечном 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.

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 помощи метода NanoString был определен профиль 800 микроРНК в образцах ткани глиом головного мозга различной степени злокачественности и морфологически неизменной ткани мозга, это 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. При дальнейшей валидации этих микроРНК с помощью ПЦР в реальном времени, в том числе на расширенной выборке, 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 статистически значимые различия в экспрессии на расширенной выборке обнаружили только для 4 микроРНК: -144, -7, -182 и -199b (таблица 4).

Таблица 4 – 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

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. 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. По мере нарастания степени анаплазии опухоли показатели микроРНК-183 также имеют тенденцию к росту. Напротив, уровень экспрессии микроРНК-182 является сниженным. Наряду с этим 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, -7 и -199b причем 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. Эти данные, характеризующие молекулярно-генетический профиль глиом головного мозга, могут быть использованы в качестве дополнительных маркеров, позволяющих повысить точность и информативность цитологических и гистологических заключений.

В четвертой главе на основании клинических данных лечения больных с глиомами головного мозга (морфологическая принадлежность опухоли, степень ее злокачественности, вид комплексного лечения, продолжительность жизни - сроков выживаемости пациентов после операции, их возраст, функционального состояния по шкале Карновского, степени радикальности выполненной операций) 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.

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. Далее нами проведен многофакторный регрессионный анализ Кокса влияния на время выживания: микроРНК (потенциальных прогностических маркеров), возраста, вида адьювантной терапии, степени злокачественности.

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 экспрессии 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 4).

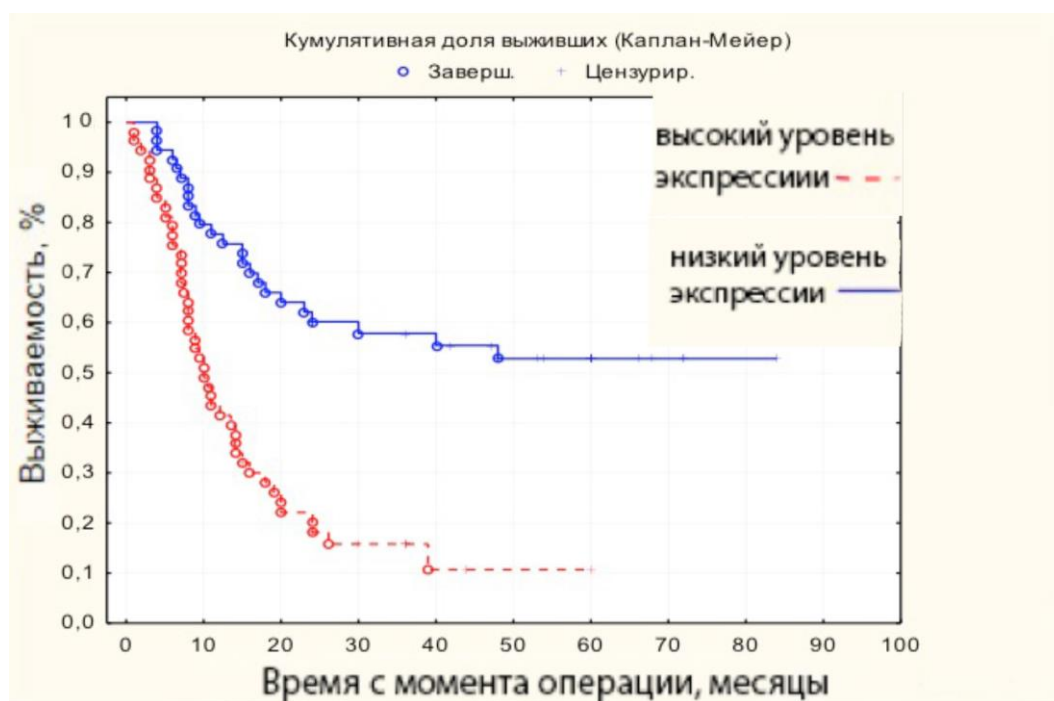


Рисунок 4 – Кривые Каплана-Мейера пациентов с высоким и низким уровнем экспрессии микроРНК-21 в глиомах grade II – IV

При проведении регрессионного анализа Кокса, а так же методом ROC-анализа установлено, что повышенная экспрессия четырех микроРНК: 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, что позволяет использовать их в качестве предикторов выживания больных с супратенториальными глиомами головного мозга.

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.

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

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.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Ступак, Е.В. Значение профиля микроРНК 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.

7. Ступак, Е.В. Мирнк как потенциальные предикторы выживания больных с супратенториальными глиомами головного мозга / Е.В. Ступак., С.Е. Титов, Ю.А. Веряскина, Д.Б. Усмонов, И.К. Кылданов, И.Ф. Жимулев, С.С. Рабинович, В.В. Ступак // **Поленовские чтения: м-лы XVIII науч.-практ. конф.** – СПб., 2019. – С. 210.

8. Способ определения прогноза выживаемости больных с глиомами головного мозга Grade 2 – Grade 4: заявка **2019121528 Российская Федерация**, / Ступак Е.В., Рабинович С.С., Ступак В.В., Титов С.Е., Ахмерова Л.Г., Веряскина Ю.А., Жимулев И.Ф.; заявитель Федеральное государственное бюджетное учреждение "Новосибирский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна" Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ "ННИИТО им. Я.Л. Цивьяна" Минздрава России) (RU), Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения Российской академии наук (ИМКБ СО РАН), Акционерное общество "Вектор-Бест". – № 2019121528/10; заявл. 10.07.2019; 28 с.

9. Ступак, Е.В. МикроРНК как генетические маркеры в диагностике глиом головного мозга / Е.В. Ступак, С.Е. Титов, В.В. Ступак, Ю.А. Веряскина, Л.Г. Ахмерова, М.К. Иванов, И.Ф. Жимулёв, С.С. Рабинович // Поленовские чтения: м-лы XVII науч.-практ. конф. – СПб., 2018. – С. 235.

10. Ступак, Е.В. Детекция микроРНК для диагностики глиом головного мозга человека / Е.В. Ступак, С.Е. Титов, Ю.А. Веряскина, В.В. Ступак, С.С. Рабинович, Д.А. Долженко // Технологические инновации в травматологии, ортопедии и нейрохирургии: интеграция науки и практики: м-лы Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участием. – Саратов, 2018. – С. 218–220.

11. Ступак, Е.В. МикроРНК как генетические маркеры в диагностике глиом головного мозга / Е.В. Ступак, С.Е. Титов, В.В. Ступак, Ю.А. Веряскина, Л.Г. Ахмерова, Е.В. Ступак, М.К. Иванов, И.Ф. Жимулёв, Н.Н. Колесников, С.С. Рабинович // М-лы VIII Всероссийского съезда нейрохирургов. – СПб., 2018. – С. 229.

12. Способ интраоперационного забора биоптата глиомы и морфологически неизменной ткани головного мозга для молекулярно-генетических исследований: пат. **2651749 Российская Федерация, 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.; патентообладатель Федеральное государственное бюджетное учреждение "Новосибирский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна" Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ "ННИИТО им. Я.Л. Цивьяна" Минздрава России) (RU), Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения Российской академии наук (ИМКБ СО РАН) (RU), Акционерное общество "Вектор-Бест" (RU). – 2017115002; заявл. 27.04.2017; опубл. 23.04.2018, Бюл. № 12. – 4 с.

13. Stupak, EV. MicroRNA as a prognostic marker for typing gliomas of human brain and malignancy degree / EV Stupak, VV Stupak, SS Rabinovich, NN Kolesnikov, SE Titov, MK Ivanov, YuA Veryaskina, LG Achmerova, IF Zhimulev // EANS. – October 1–5, 2017. – Venice, Italy (Poster Presentations).

14. Ступак, Е.В. Исследование микроРНК прогностических маркеров типирования глиом головного мозга человека и степени их злокачественности / Е.В. Ступак, С.Е. Титов, В.В. Ступак, С.С. Рабинович, Ю.А. Веряскина, Л.Г. Ахмерова, М.К. Иванов, И.Ф. Жимулёв, В.В. Пустаханов, Ю.В. Петрова, Н.Н. Колесников // Поленовские чтения: м-лы XVI науч.-практ. конф. – СПб., 2017. – С. 236.

15. Ступак, Е.В. Роль профиля микроРНК в диагностике злокачественных глиом головного мозга / Е.В. Ступак, В.В. Ступак, Н.Н. Колесников, С.Е. Титов, М.К. Иванов, Ю.А. Веряскина, Л.Г. Ахмерова, И.Ф. Жимулёв // Цивьяновские чтения: м-лы IX Всерос. науч.-практ. конф. молодых ученых с междунар. участием. – Новосибирск, 2016. – С. 344–348.

16. Способ дифференциальной диагностики глиом головного мозга человека: пат. 2583871 Российская Федерация, МПК C12Q 1/68 / 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.; патентообладатель Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения Российской академии наук (ИМКБ СО РАН) (RU), Федеральное государственное бюджетное учреждение "Новосибирский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна" Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ "ННИИТО им. Я.Л. Цивьяна" Минздрава России) (RU), Закрытое акционерное общество "Вектор-Бест" (RU). – 2015108718/10; заявл. 12.03.2015; опубл. 10.05.2016, Бюл. № 13. – 13 с.

17. Титов, С.Е. Исследование микроРНК как прогностических маркеров типирования опухолей головного мозга и степени их злокачественности / С.Е. Титов, В.В. Ступак, Ю.А. Веряскина, Е.В. Ступак, Л.Г. Ахмерова, М.К. Иванов, И.Ф. Жимулев, Н.Н. Колесников // Поленовские чтения: м-лы XIV науч.-практ. конф. – СПб., 2015. – С. 153.

18. Титов, С.Е. Исследование микроРНК как прогностических маркеров типирования глиом головного мозга человека и степени их злокачественности / С.Е. Титов, В.В. Ступак, Ю.А. Веряскина, Е.В. Ступак, Л.Г. Ахмерова, М.К. Иванов, И.Ф. Жимулев, Н.Н. Колесников // М-лы VII Всероссийского съезда нейрохирургов. – Казань, 2015. – С. 155.

19. Ступак, Е.В. Роль микроРНК в онкогенезе опухолей головного мозга / Е.В. Ступак, В.В. Ступак, Н.Н. Колесников, С.Е. Титов, М.К. Иванов, Ю.А. Веряскина, Л.Г. Ахмерова, И.Ф. Жимулев // Цивьяновские чтения: м-лы VIII Всерос. науч.-практ. конф. молодых ученых с междунар. участием. – Новосибирск, 2015. – С. 219–224.

20. Kolesnikov, NN. Micro-rna-diagnostic and typing of brain tumours / NN Kolesnikov, SE Titov, MK Ivanov, YuA Veryaskina, LG Akhmerova, IF Zhimulev, VV Stupak, A Lekhner, EV Stupak // 10 th Asian Congress of Neurological Surgeons: Abstract Book. – 2014. – P. 43.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения

ДИ – доверительный интервал

кДНК – комплементарная ДНК

КР – коэффициент риска

миРНК – микроРНК

МКБ – Международная классификация болезней

ОТ – обратная транскрипция

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ЦНС – центральная нервная система

U58 – некодирующая малая РНК

Подписано в печать 27.09.2019 г.
Формат 60x90/16. Объем 1,50 п.л., 1,25 авт.л. Бумага офсетная. Гарнитура
Times New Roman
Заказ 16895. Тираж 130 экз.

Отпечатано в полном соответствии с авторским оригиналом
в типографии ФГБУ «ННИИТО им. Я.Л. Цивьяна» Минздрава России
Новосибирск, ул. Фрунзе, 17, телефон: 8-383-373-32-01
E-mail: niito@niito.ru

