

ЖИДКОСТНАЯ БИОПСИЯ ГЛИОМ С ВЫЯВЛЕНИЕМ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ОПУХОЛЕВЫХ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Т.И. Рахматуллин¹, М. Джайн¹, Л.М. Самоходская¹, А.А. Зуев²

¹ ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» обособленное подразделение
Медицинский научно-образовательный центр Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова,
Москва, Россия;

² Национальный медико-хирургический центр имени Н.И. Пирогова, Москва, Россия

АННОТАЦИЯ

Глиомы являются причиной гибели подавляющего числа больных с онкологическими заболеваниями центральной нервной системы. Диагностика таких новообразований требует использования стереотаксической биопсии, которая может быть проведена далеко не у всех пациентов. Кроме того, данное заболевание характеризуется высокой частотой рецидивов, несмотря на успехи в развитии резекционных и химиотерапевтических технологий. Раннее выявление онкологического заболевания центральной нервной системы и дифференциальная диагностика с псевдопрогрессией опухоли, не влияющей на выживаемость пациента, представляет задачу для современной медицины. Жидкостная биопсия является малоинвазивным методом диагностики, основанным на анализе опухолевых дериватов (таких как внеклеточная опухолевая ДНК и РНК), находящихся в биологических жидкостях организма. Для определения опухолевого компонента используют анализ так называемых hot-spot мутаций и паттернов эпигенетической регуляции, присущих определённому типу опухоли. Технология может быть использована для выявления рецидивов опухоли и дифференциальной диагностики объёмных образований у пациентов, которым противопоказана стереотаксическая биопсия. В обзоре обсуждаются современные достижения жидкостной биопсии на основе анализа внеклеточной опухолевой ДНК и РНК в плазме крови и спинномозговой жидкости пациентов с глиомами.

Ключевые слова: циркулирующая опухолевая ДНК; микроРНК; жидкостная биопсия; глиомы; центральная нервная система; злокачественные новообразования ЦНС; скрининг.

Для цитирования:

Рахматуллин Т.И., Джайн М., Самоходская Л.М., Зуев А.А. Жидкостная биопсия глиом с выявлением внеклеточных опухолевых нуклеиновых кислот. *Клиническая практика*. 2024;15(3):In Press. doi: <https://doi.org/10.17816/clinpract629883>

Поступила 03.04.2024

Принята 02.09.2024

Опубликована online ????.2024

ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на то, что глиомы составляют лишь 18–19% всех новообразований головного мозга, они являются причиной гибели подавляющего числа больных с онкологическими заболеваниями центральной нервной системы. Наиболее распространённой их разновидностью является глиобластома, при которой 5-летняя выживаемость не превышает 7% [1]. Глиомы низкой степени злокачественности характеризуются относительной 5-летней выживаемостью более 80%, однако большинство из них всё равно демонстрируют склонность к дальнейшему озлокачествлению [2]. В настоящий момент первым этапом лечения опухолей головного мозга рекомендуется проведение максимально возможной резекции новообразования. К сожалению, инфильтрирующий характер роста глиом препятствует их тотальному удалению. Более того,

ввиду тяжести состояния пациентов и риска возможных осложнений тотальная резекция этих опухолей может заменяться частичной резекцией или вовсе не проводиться, что ещё больше снижает эффективность проводимого лечения [3].

Для увеличения выживаемости больных используется адъювантная терапия, однако, несмотря на её проведение в течение полутора лет после постановки диагноза, примерно у 70% пациентов с глиобластомой и 20% с глиомой низкой степени злокачественности наблюдается возникновение рецидивов, требующих повторного хирургического вмешательства [3–5]. С целью их своевременного выявления каждые 3–6 месяцев пациенты проходят обследование методом магнитно-резонансной томографии (МРТ) [3]. Изменения тканей головного мозга, такие как радиационный некроз, отёк или снижение контрастирования, вызванные проводи-

LIQUID BIOPSY OF GLIOMAS WITH DETECTION OF EXTRACELLULAR TUMOR NUCLEIC ACIDS

T.I. Rakhmatullin¹, M. Jain¹, L.M. Samokhodskaya¹, A.A. Zuev²

¹ Medical Research and Educational Institute — Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia;

² National Medical and Surgical Center named after N.I. Pirogov, Moscow, Russia

ABSTRACT

Gliomas are the reason of fatal outcomes in an overwhelming number of patients with oncology diseases located in the central nervous system. The diagnostics of such neoplasms requires using stereotaxic biopsy, which cannot be performed in a certain percentage of the patients. Besides, this disease is characterized by high recurrence rates, despite the advances in developing resection and chemotherapy — based technologies. The early detection of oncological diseases located in the central nervous system and the differential diagnostics of tumor pseudo progression, not affecting the survival of the patient, represents a challenge for modern Medicine. Liquid biopsy is a minimally invasive diagnostic method based on the analysis of tumor derivatives (such as extracellular tumor DNA and RNA), contained within the biological fluids of the organism. For the purpose of defining the presence of the tumor component, the tests are used to detect the so-called hot-spot mutations and the patterns of epigenetic regulation, found in specific types of tumors. The technology can be used for detecting tumor recurrences and for the differential diagnostics of space-occupying mass lesions in patients, in which stereotaxic biopsy is contraindicated. The review contains a discussion on modern advances of fluid biopsy based on the analysis of the extracellular tumor DNA and RNA levels in blood plasma and in the cerebrospinal fluid of glioma patients.

Keywords: circulating tumor DNA; microRNA; liquid biopsy; glioma; central nervous system malignancies; screening.

For citation:

Rakhmatullin TI, Jain M, Samokhodskaya LM, Zuev AA. Liquid biopsy of gliomas with detection extracellular tumor nucleic acids. *Journal of Clinical Practice*. 2024;15(3):In Press.
doi: <https://doi.org/10.17816/clinpract629883>

Submitted 03.04.2024

Revised 02.09.2024

Published online ???.2024

мой терапией, в 36% случаев глиобластом приводят к картине, схожей с проявлениями рецидива опухоли — псевдопрогрессии [6]. Несмотря на то, что медиана выживаемости без прогрессии для глиом низкой степени злокачественности составляет около 5 лет, в 20% случаев они также характеризуются наличием псевдопрогрессии [7]. Это явление, которое, по всей видимости, не влияет на общую выживаемость пациентов и требует применения отдельной терапии. Использование специфической противорецидивной терапии на данном этапе, напротив, может нанести вред состоянию больного [3, 6, 7]. При помощи классических режимов МРТ (T1-взвешенная МРТ с контрастным усилением и T2-FLAIR) не всегда возможно установить наличие истинной прогрессии опухоли, что приводит к несвоевременному применению терапии и уменьшению выживаемости пациентов. В обоих случаях клиницисты получают искажённые данные о прогнозе и эффективности проводимой терапии.

В данный момент происходит развитие перфузионных и радиоизотопных методов диагностики,

позволяющих более точно определить состояние опухоли, однако их повсеместное использование ограничено [6].

Поскольку гистопатологическое исследование операционного материала до сих пор остаётся основным способом дифференциальной диагностики объёмных новообразований головного мозга, отсутствие хирургического вмешательства препятствует не только борьбе с заболеванием, но и установлению корректного диагноза [3]. В таких случаях решающей диагностической процедурой становится стереотаксическая биопсия новообразования [6]. Несмотря на то, что данный метод демонстрирует высокие чувствительность и специфичность, он также характеризуется относительно высокой частотой осложнений (до 17%), высокими требованиями к квалификации медицинского персонала и качеству визуализационного оборудования [8]. По этой же причине стереотаксическая биопсия, вероятно, не может использоваться для рутинного регулярного выявления рецидивов. Более того, такие факторы, как поражение ствола мозга, наличие у пациентов

серьёзных сопутствующих заболеваний или прогрессирующих нарушений неврологического статуса, могут и вовсе стать причиной отказа от данной манипуляции [9]. Поскольку МРТ-картина некоторых неонкологических заболеваний может совпадать с таковой при глиомах (как, впрочем, и наоборот), отсутствие точного диагноза будет создавать риск применения некорректной терапии и сокращения продолжительности жизни пациента [10, 11].

Для повышения выживаемости и качества жизни больных необходима разработка новых методов диагностики глиом. В настоящее время активно исследуется потенциал жидкостной биопсии — метода анализа клеточных и молекулярных опухолевых дериватов в различных биологических жидкостях организма. Особое место в этой области уделяется анализу внеклеточных опухолевых ДНК и РНК, уровни которых информативны в отношении объёма и мутационной нагрузки исследуемой опухоли [12, 13].

Цель данного обзора — обобщить данные исследований, оценивающих диагностический и прогностический потенциал жидкостной биопсии глиобластомы на основе анализа внеклеточных опухолевых ДНК и РНК.

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ГЛИОМ (ДНК И РНК ОПУХОЛЕВОЙ ТКАНИ)

Впервые анализ молекулярных маркеров в качестве важного компонента диагностики глиом был рекомендован в классификации опухолей центральной нервной системы Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) 2016 года. Согласно этой классификации, ключевыми мутациями глиом, ассоциированными с лучшей выживаемостью пациентов, являются мутации генов *IDH1*, *IDH2*, *TP53*, делеция *ATRX* и коделеция *1p/19q*. В дальнейшем классификация 2021 года, а также клинические рекомендации Европейской ассоциации нейроонкологии и Корейской онкологической ассоциации отметили связь мутаций генов *CIC* и *FUBP1* с лучшей выживаемостью пациентов, а мутаций промотора *TERT* (*pTERT*), генов *NOTCH1*, *EGFR*, делецию *CDKN2A/B*, а также изменение числа 7/10 хромосом — с худшей выживаемостью. Данные мутации наиболее часто встречаются при глиомах и наиболее сильно влияют на клиническую картину. Их наличие служит основанием для отнесения глиом к одному из трёх основных гистотипов, выделенных классификацией ВОЗ 2021 года [3]. В то же время мутации генов *VEGF*, *ARF*, *PTEN*, *NF1*, *RTK/RIS* и других не используются для типологической классификации глиом, но так-

же встречаются у значительной части пациентов с глиомами и являются отрицательным прогностическим маркером [14]. Список часто встречающихся молекулярных изменений, имеющих прогностическое значение, представлен в табл. 1.

На характер глиомы, помимо генетических изменений, влияют нарушения эпигенетической регуляции клетки. В клетках глиобластомы, как правило, гиперметилированы хромосомы 1, 2, 3 и 17 и гипометилированы хромосомы 11, 16, 19 и 20. Наиболее часто гиперметилированные промоторы генов включают в себя *pLRRC4*, *pANKDD1A*, *pGAD1*, *pSIX3*, *pSST*, *pPHOX2B*, *pPCDHA8*, *pHIST1H3E* и *pPCDHA13*, а гипометилированные — *pF10*, *pPOTEN*, *pCPEB1*, *pLMO3*, *pELFN2* и *pPRDM16* [14]. Одним из наиболее изученных маркеров является гиперметилирование промотора *MGMT* (*pMGMT*), которое встречается более чем у половины глиом и связано с лучшей выживаемостью [3]. Дополнительно известно более чем о 160 генах, чья экспрессия в клетках глиом снижена под действием гиперметилирования их промоторов [15]. В то же время существует точка зрения, что на характер течения глиомы влияет не метилирование отдельных генов, а изменение паттерна эпигенетической регуляции генома клетки в целом. Например, хорошо известна связь между характером метилирования глиомы G-CIMP и наличием мутаций *IDH1/IDH2*, связанных с лучшей выживаемостью пациентов [14].

Эпигенетическая регуляция экспрессии генов включает в себя не только изменения метилирования их промоторов, но и взаимодействие с широким набором некодирующих РНК. Среди них наиболее изученными являются микроРНК, состоящие из 20–22 нуклеотидов. При глиомах изменена экспрессия более чем 300 микроРНК, самыми яркими представителями которых являются микроРНК-21, 221, 222, 26-а, 10-б и 182, чья гиперэкспрессия часто наблюдается в тканях глиом, а также микроРНК-181а, 181б и 181с, 34а, экспрессия которых в глиомах уменьшена [14]. Малые РНК также включают в себя кольцевые РНК, чья роль состоит в регуляции активности микроРНК и матричной РНК, что приводит к изменению экспрессии ключевых генов, таких как *PAQR3*, *MKP1*, *GLUT1* и т.д. В тканях глиом обнаружено более 400 аномально экспрессируемых кольцевых РНК [16]. На характер опухоли также влияют длинные некодирующие РНК, состоящие более чем из 200 нуклеотидов. Наиболее детально описанными являются длинные некодирующие РНК *ASLNC22381*, *ASLNC20819*, *CRNDE* и *HOTAIRM1*, которые значительно активируются

Таблица 1

Список молекулярных изменений, оказывающих наибольшее влияние на прогноз пациентов с диффузными глиомами взрослого типа

Молекулярные изменения	Положительный прогноз	Отрицательный прогноз
Нуклеотидные замены	<i>IDH1</i> ^{R132H, R132C} , <i>IDH2</i> ^{R172*} <i>CIC</i> ^{R1124W, R1110W, R1111W} и др. <i>FUBP1</i> ^{X83_splice, I443Rfs*47, X314_splice} и др. <i>ATRX</i> ^{R1426*, R907*} и др.	<i>pTERT</i> ^{C228T, C250T} <i>VEGF</i> <i>p14</i> ^{ARF} / <i>p16</i> ^{INK4A} <i>EGFR</i> ^{G598V, A289V} и др. <i>TP53</i> ^{R273C, R175H, R248Q} и др. <i>PTEN</i> ^{R130*, R233*, R335*, R173H} и др. <i>MUC16</i> ^{T11587M, T11535M, T4653K} и др. <i>PIK3R1</i> ^{G376R, N564D, X583_splice} и др. <i>NF1</i> ^{F1247Iifs*18, R2450*, C167Qifs*10} и др. <i>PIK3CA</i> ^{H1047R, R88Q, G118D} и др. <i>RB1</i> ^{S318Nfs*13, R552*, X445_splice} и др. <i>PDGFRA</i> ^{E229K, N468S, V309F} и др. <i>RTK/RIS</i> <i>NOTCH1</i> ^{F357del, A465T, D338del} и др.
Делеция участков генома	Делеция <i>ATRX</i> Коделеция 1p/19q	Потеря 10-й хромосомы Делеция <i>CDKN2A/B</i> Делеция <i>MTAP</i>
Дупликация и амплификация участков генома	-	Дупликация и амплификация 7-й хромосомы Амплификация <i>MDM2/MDM4</i> Амплификация <i>EGFR</i> Амплификация <i>MYC</i>
Метилирование и проч.	Гиперметилирование <i>pMGMT</i> , <i>CDKN2A</i> , <i>RASSF1A</i> Микросателлитная нестабильность	Гиперметилирование <i>pPARP-1</i> , <i>pSHP-1</i> , <i>pDAPK-1</i> и <i>pTIMP-3</i>
Увеличение количества внеклеточных опухолевых РНК	<i>миРНК-1-3p</i> , <i>26a-1-3p</i> , <i>487b-3p</i> , <i>342-3p</i> и др. <i>кРНК CM21D</i> , <i>circPTK2</i> , <i>circSERPINE2</i> и др. <i>днРНК CASC2</i> , <i>MEG3</i> , <i>PDCD4-AS1</i> , <i>GSCAR</i> , <i>SPRY4-IT1</i> и др.	<i>миРНК-454-3p</i> , <i>21</i> , <i>17-5p</i> , <i>125b</i> , <i>221</i> , <i>128</i> , <i>342-3p</i> и др. <i>кРНК circSKA3</i> , <i>CircXPO1</i> , <i>circENTPD7</i> и др. <i>днРНК HOTAIRM1</i> , <i>STEAP3-AS1</i> , <i>CASC2c</i> , <i>HOXA11-AS</i> , <i>ASLNC22381</i> , <i>ASLNC20819</i> , <i>CRNDE</i> и др.

Примечание. *p* — промотор гена; РНК — рибонуклеиновая кислота; миРНК — микроРНК; кРНК — кольцевая РНК; днРНК — длинная некодирующая РНК.

в тканях глиобластом (высокий уровень которых, соответственно, является отрицательным прогностическим признаком), а также *CASC2*, *PDCD4-AS1*, *GSCAR*, *MEG3* и др., которые препятствуют процессу туморогенеза и чьи уровни в глиомах снижены по сравнению с нормальными тканями [14, 17].

ВНЕКЛЕТОЧНАЯ ОПУХОЛЕВАЯ ДНК

Внеклеточная опухолевая ДНК является компонентом общей внеклеточной ДНК, которая, как правило, состоит из фрагментов ДНК длиной 80–200 пар оснований, что соответствует примерно витку нуклеосомы. Основным её источником считаются погибшие клетки, а также клетки, активно секретирующие внеклеточные ДНК. Помимо иммунных клеток, выделяющих внеклеточные ДНК во время нетоза, к таковым относятся опухолевые клетки, по всей видимости, использующие эти молекулы в качестве межклеточных мессенджеров [18]. При физиологических условиях концентрация внеклеточных ДНК в крови не превышает 40 нг/мл, однако во время

онкологических процессов она может увеличиваться в десятки раз [19]. Увеличение концентрации ДНК связано не только с секрецией опухолевыми клетками или их некрозом, но и с гибелью окружающих опухоль клеток ввиду эффекта Варбурга [20].

При анализе внеклеточных опухолевых ДНК можно получить информацию о мутационном ландшафте и изменениях паттерна эпигенетической регуляции опухолевых клеток. Это может быть важно для неинвазивной диагностики новообразований. Стоит отметить, что внеклеточные опухолевые ДНК имеют период полураспада менее 1,5 часов, что также позволяет использовать их для динамичного наблюдения за эффективностью лечения [18].

Генетические изменения внеклеточных опухолевых ДНК

Наиболее часто при проведении жидкостной биопсии глиом выявляют мутации генов *pTERT* (~65%), *TP53* (40–60%), *H3F3A* (~50%), *IDH1* (30%), *CDKN2A/B* (25%), *NF1* (~24%), *EGFR* (20–25%),

ATRX (10–20%), *MET* (~18%), *APC* (~15%), *PDGFRA* (10–14%), *FAT1* (<10%) (табл. 2, 3) [12–52]. Сообщается также о повышении общего уровня внеклеточных ДНК у пациентов с глиомами в 1,3–30 раз по сравнению с лицами из групп контроля [19, 24]. В то же время у здоровых добровольцев мутационные изменения в плазме и цереброспинальной жидкости ожидаемо не наблюдаются [22, 25]. Чувствительность цифровой капельной полимеразной цепной реакции (ПЦР) внеклеточных опухолевых ДНК из цереброспинальной жидкости в диагностике глиом достигает 87%, специфичность — 100%. Использование секвенирования нового поколения (next generation sequencing, NGS) позволяет увеличить чувствительность до 91,9% [21, 26, 27]. Однако анализ внеклеточных опухолевых ДНК из сыворотки с использованием цифровой капельной ПЦР характеризуется чувствительностью лишь 52,38% [27]. Чувствительность ПЦР в режиме реального времени при анализе внеклеточных опухолевых ДНК из сыворотки составляет всего 11,54% [28]. Результаты диагностической эффективности жидкостной биопсии представлены в табл. 2.

Уровень мутационной нагрузки ассоциирован с объёмом опухолевой ткани, уменьшаясь после проведения резекции опухоли или химиотерапии и увеличиваясь при её рецидиве [27, 29], однако корреляции между уровнем внеклеточных ДНК в плазме и рентгенографическим объёмом опухоли не наблюдается [24]. При рецидивах количество наблюдаемых нарушений в мутировавших генах или связанных с ними сигнальных путях может в 3 раза превышать таковое в исходной опухоли [22, 23]. Вероятно, увеличение генетического разнообразия опухоли обусловлено эффектом посттерапевтической эволюции, при которой под воздействием лечения происходит селекция субклонов, обладающих дисрегуляцией репаративных систем, ответственной за большую склонность к мутагенезу, что в свою очередь может объяснять

их устойчивость к терапии. Данный феномен наблюдается примерно в 78% глиом, имея худший прогноз и риск возникновения отдалённых рецидивов. Как отмечают G. Liu и соавт. [30], после проведённого лечения и последующего рецидивирования опухоли демонстрируют значительно более агрессивный мутационный фенотип.

Пациенты с глиомами высокой степени злокачественности характеризуются наличием более высоких уровней внеклеточных опухолевых ДНК [13]. Соответственно, более высокий уровень внеклеточных опухолевых ДНК (>15 нг/мл) ассоциирован с меньшей выживаемостью без прогрессии ($p < 0,0001$, коэффициент ранговой корреляции Спирмена $\rho = -0,844$) и общей выживаемостью больных (общая выживаемость пациентов с низким уровнем внеклеточных опухолевых ДНК примерно в 2 раза превышает таковую у пациентов с высоким уровнем внеклеточных опухолевых ДНК) [19, 22–24]. Однако в некоторых случаях такая связь не обнаруживается [29]. Разнообразие мутаций, по всей видимости, не коррелирует с выживаемостью без прогрессии [23], но значимо связано с худшей общей выживаемостью (медиана общей выживаемости 15,4 месяца [95% ДИ 11,6–19,2] в группе с низким разнообразием мутаций против 8,3 [95% ДИ 2,3–14,4] в группе с высоким разнообразием мутаций) [31]. Несмотря на это, наличие у пациентов мутаций *IDH1* является положительным прогностическим признаком (в среднем пациенты с мутантным *IDH* имеют как минимум на 3 месяца большую общую выживаемость) [25, 28]. Мутация *pTERT* является отрицательным прогностическим фактором (медиана общей выживаемости 13,8 месяца для пациентов с мутантным *pTERT* против 37,6 для *pTERT* дикого типа; $p < 0,0022$), а пациенты с амплификацией *EGFR* имеют в 2 раза меньшую общую выживаемость по сравнению с пациентами без данных изменений [32]. В табл. 3 представлены результаты исследования прогностической эффективности жидкостной биопсии.

Таблица 2

Исследования, посвящённые анализу внеклеточных опухолевых ДНК и РНК в диагностике диффузных глиом взрослого типа

Иссле-дование	Участники исследования	Субстрат (анализируемый объём); метод анализа (исследуемый маркер)	Исход анализа, %		
			Se	Sp	AUC
Анализ мутаций внеклеточной опухолевой ДНК					
[21]	57, глиома	ЦСЖ (3 мл) + сыворотка (3 мл) + ткань (н/д); NGS (Панель из 68 генов)	91,9	-	-
[22]	85, глиома (46 ГБМ); 7, контроль	Сыворотка (3,5 мл) + ЦСЖ (3,5 мл); NGS (Панель из 410 генов)	49,4	-	-
[26]	34, глиома	ЦСЖ (1–3 мл); цкПЦР (<i>IDH1</i> , <i>pTERT</i> , <i>H3F3A</i>)	87	-	-

Таблица 2

Продолжение

Иссле-дование	Участники исследования	Субстрат (анализируемый объём); метод анализа (исследуемый маркер)	Исход анализа, %		
			Se	Sp	AUC
[27]	42, глиома <i>TERT-mut</i> ; 9, глиома <i>TERT-wt</i> ; 23, контроль	Сыворотка (1 мл); цкПЦР (<i>pTERT</i>)	52,38	90,91	-
[28]	45, глиома	Сыворотка (1 мл) + ткань (н/д); ПЦРрв (<i>IDH1</i>)	11,54	-	-
[32]	395, ГБМ	Сыворотка (н/д) + ткань (н/д); NGS (<i>pTERT</i>)	75	-	-
[34]	4, рецидив ГБМ; 111, глиома; 111, контроль	ЦСЖ (10 мкл) + ткань (н/д); NGS (Панель из 68 генов)	-	-	94,4
Анализ изменений паттернов метилирования внеклеточной опухолевой ДНК					
[35]	149, глиома	Сыворотка (1,2–9,3 мл); бисульфитная конверсия + NGS (Панель из 100 эпигенетических особенностей)	100	97,78	-
[36]	17, глиома	Сыворотка (3 мл) + ткань (н/д); бисульфитная конверсия + ПЦР в агарозном геле (<i>pMGMT</i> , <i>pRASSF1A</i> , <i>p15INK4B</i> , <i>p14ARF</i>)	70,58	-	-
[38]	20, астроцитомы; 20, олигодендроглиома; 10, контроль	Сыворотка (1 мл) + ткань (н/д); бисульфитная конверсия + ПЦР в агарозном геле (<i>pCDKN2A</i>)	75	-	-
[39]	41, астроцитомы; 29, олигодендроглиома	Кровь (5 мл) + сыворотка (200 мкл) + ткань (н/д); бисульфитная конверсия + ПЦРрв (<i>pPTEN</i> , <i>pMGMT</i>); ПЦРрв (Потеря гетерозиготности 10q, 19q, 1p)	Астро- цитомы 59%; олигоден- дроглио- ма 58%	Астро- цитомы 100%; олигоден- дроглио- ма 94%	-
[40]	89, глиома	ЦСЖ (4–5 мл) + ткань (н/д) + сыворотка (н/д); бисульфитная конверсия + ПЦР + хроматография (<i>pMGMT</i>)	65	100	-
Анализ уровня внеклеточной опухолевой РНК					
[12]	7, ГБМ; 4, глиома II стадии	Сыворотка (200 мкл); цкПЦР (<i>миРНК-320e</i> , <i>223</i> , <i>23a</i> , <i>21</i>)	100	97,8	98
[43]	111, ГБМ; 84, контроль (неонкологические заболевания)	ЦСЖ (1 мл); ПЦРрв (<i>миРНК-21</i> , <i>218</i> , <i>193b</i> , <i>331</i> , <i>374a</i> , <i>548c</i> , <i>520f</i> , <i>27b</i> , <i>130b</i>)	80	67	75
[44]	30, глиома II–IV степени; 10, аденома гипофиза; 10, менингиома; 10, контроль	Сыворотка (400 мкл); ПЦРрв (<i>миРНК-21</i> , <i>128</i> , <i>342-3p</i>)	90	100	93
[47]	23, ГБМ; 5, глиома III степени; 10, контроль	Сыворотка (н/д); цкПЦР (<i>circHIPK3</i> , <i>circSMARCA5</i>)	-	-	90,1
[48]	25, ГБМ; 20, контроль	Сыворотка (н/д); ПЦРрв (<i>миРНК-17-5-p</i> , <i>125b</i> , <i>221</i>)	96	95	98,8
[49]	30, EGFRvIII положительных; 10, EGFR дикого типа; 14, контроль	Сыворотка (2 мл) + ткань (н/д); цкПЦР ткани и сыворотки, ПЦРрв ткани (<i>мРНК-EGFRvIII</i> , <i>мРНК-EGFR</i> дикого типа)	72,77	97,67	-

Примечание. Se — чувствительность; Sp — специфичность; AUC (area under the curve) — площадь под ROC-кривой; ГБМ — глиобластома; ЦСЖ — спинномозговая жидкость; NGS (next generation sequencing) — секвенирование нового поколения; ПЦРрв — полимеразная цепная реакция в реальном времени; цкПЦР — цифровая капельная полимеразная цепная реакция; РНК — рибонуклеиновая кислота; мРНК — матричная РНК; миРНК — микроРНК; *p* — промотор гена; н/д — указывается в случаях, когда из текста исследования не удаётся установить деталь методологии.

Таблица 3

Исследования по изучению связи уровней внеклеточных опухолевых ДНК и РНК с течением диффузной глиомы взрослого типа

Иссле-дование	Участники исследования	Субстрат (анализируемый объём); метод анализа (исследуемый маркер)	Исход анализа	
			Положительный прогноз	Отрицательный прогноз
Анализ мутаций внеклеточной опухолевой ДНК				
[13]	370, глиома (222 ГБМ)	Сыворотка (н/д); NGS (панель из >54 генов);	-	<i>TP53</i> ↑ <i>NF1</i> ↑ <i>EGFR</i> ↑ <i>PIK3CA</i> ↑
[19]	122, ГБМ; 55, аденокарцинома; 130, контроль	Сыворотка (н/д); флуориметрия (вкДНК)	-	вкДНК ↑
[23]	30, глиома (TISF); 14, глиома (ЦСЖ)	TISF (н/д) + ЦСЖ (н/д) + сыворотка (н/д); NGS (Панель из 68 генов)	-	воДНК ↑
[24]	42, ГБМ; 42, контроль	Сыворотка (1 мл); ПЦРрв (вкДНК)	-	воДНК ↑
[25]	240, глиома; 25, контроль	Сыворотка (н/д) + ткань (н/д); ПЦРрв (<i>IDH1</i>)	<i>IDH1</i> ↑	-
[28]	45, глиома	Сыворотка (1 мл) + ткань (н/д); ПЦРрв (<i>IDH1</i>)	<i>IDH1</i> ↑	-
[29]	49, ГБМ	Сыворотка (1–5 мл); цкПЦР (<i>pTERT</i>)	Уровень маркера не является прогностическим признаком	
[31]	60, ГБМ	Сыворотка (н/д) + ЦСЖ (н/д) + ткань (н/д); цкПЦР (<i>pTERT</i>)	-	<i>pTERT</i> ↑
[32]	395, ГБМ	Сыворотка (н/д) + ткань (н/д); NGS (<i>pTERT</i>)	-	<i>pTERT</i> ↑
Анализ изменений паттернов метилирования внеклеточной опухолевой ДНК				
[25]	240, глиома; 25, контроль	Сыворотка (н/д) + ткань (н/д); бисульфитная конверсия + ПЦРрв (<i>pPARP-1</i> , <i>pSHP-1</i> , <i>pDAPK-1</i> , <i>pTIMP-3</i> , <i>pMGMT</i>)	<i>pMGMT</i> ↑	<i>pPARP</i> ↑ <i>pSHP</i> ↑ <i>pTIMP</i> ↑
[33]	124, глиома; 58, контроль	Сыворотка (н/д); бисульфитная конверсия + секвенирование по Сэнгеру (<i>Alu</i> , <i>pMGMT</i> , <i>pRASSF1A</i> , <i>pCDKN2A</i>)	-	<i>Alu</i> ↑ <i>pMGMT</i> ↑
[35]	149, глиома	Сыворотка (1,2–9,3 мл); бисульфитная конверсия + NGS (Панель из 100 эпигенетических особенностей)	-	Высокий уровень шкалы оценки метилирования опухоли
[34]	4, рецидив ГБМ; 111, глиома; 111, контроль	ЦСЖ (10 мкл) + ткань (н/д); NGS (Панель из 68 генов)	<i>pFLRT2</i> ↑ <i>pETV1</i> ↑ <i>pNTRK3</i> ↑ <i>pC1orf226</i> ↑	<i>NKD1</i> ↑ <i>GNB5</i> ↑ <i>COMMD1</i> ↑ <i>CHI3L2</i> ↑
[37]	66, глиома; 20, контроль	ЦСЖ (н/д) + сыворотка (н/д) + ткань (н/д); иммунопреципитация метилированной ДНК + ПЦРрв (<i>pMGMT</i> , <i>pTIMP-3</i> , <i>pP16INK4a</i> , <i>pTHBS1</i>)	-	<i>pMGMT</i> ↑ <i>pTIMP-3</i> ↑ <i>pP16INK4a</i> ↑ <i>pTHBS1</i> ↑

Таблица 3

Продолжение

Иссле-дование	Участники исследования	Субстрат (анализируемый объём); метод анализа (исследуемый маркер)	Исход анализа	
			Положительный прогноз	Отрицательный прогноз
[40]	89, глиома	ЦСЖ (4–5 мл) + ткань (н/д) + сыворотка (н/д); бисульфитная конверсия + ПЦР + хроматография (<i>pMGMT</i>)	-	<i>pMGMT</i> ↑
[41]	58, глиома	Сыворотка (н/д) + ткань (3–5 образцов толщиной 10 мкм); бисульфитная конверсия + ПЦР _{рв} (<i>pMGMT</i>)	<i>pMGMT</i> ↑	-
Анализ уровня внеклеточной опухолевой РНК				
[12]	7, ГБМ; 4, глиома II стадии	Сыворотка (200 мкл); цкПЦР (<i>миРНК-320е</i> , 223, 23а, 21)	-	<i>миРНК-320е</i> ↑ <i>миРНК-223</i> ↑ <i>миРНК-21</i> ↑
[43]	111, ГБМ; 84, контроль (неонкологические заболевания)	ЦСЖ (1 мл); ПЦР _{рв} (<i>миРНК-21</i> , 218, 193b, 331, 374а, 548с, 520f, 27b, 130b)	-	<i>миРНК-21</i> ↑
[44]	30, глиома II–IV стадии; 10, аденома гипофиза; 10, менингиома; 10, контроль	Сыворотка (400 мкл); ПЦР _{рв} (<i>миРНК-21</i> , 128, 342-3р)	<i>миРНК-128</i> ↑ <i>миРНК-342-3р</i> ↑	<i>миРНК-21</i> ↑
[45]	15, ГБМ; 4, глиома низкой степени; 7, контроль	Сыворотка (н/д); ПЦР _{рв} (Панель 84 мРНК)	-	<i>мРНК-GZMB</i> <i>мРНК-HLA-A</i>
[46]	25, глиома; 25, контроль	Сыворотка (н/д) + ткань (н/д); ПЦР _{рв} (<i>circMMP1</i> , <i>миРНК-433</i> , <i>HMGB3</i>)	-	<i>circMMP1</i> ↑ <i>миРНК-433</i> ↑ <i>HMGB3</i> ↑
[47]	23, ГБМ; 5, глиома III степени; 10, контроль	Сыворотка (н/д); цкПЦР (<i>circHIPK3</i> , <i>circSMARCA5</i>)	-	<i>circSMARCA5</i> ↓ <i>circHIPK3</i> ↓
[48]	25, ГБМ; 20, контроль	Сыворотка (н/д); ПЦР _{рв} (<i>миРНК-17-5-р</i> , 125b, 221)	-	<i>миРНК-17-5-р</i> ↑ <i>миРНК-125b</i> ↑ <i>миРНК-221</i> ↑
[49]	30, EGFR ^{wt} положительных; 10, EGFR дикого типа; 14, контроль	Сыворотка (2 мл) + ткань (н/д); цкПЦР ткани и сыворотки, ПЦР _{рв} ткани (<i>мРНК-EGFR^{wt}</i> , <i>мРНК-EGFR</i> дикого типа)	-	<i>мРНК-EGFR^{wt}</i> ↑
[50]	50, астроцитомы; 60, контроль	Сыворотка (100 мкл); ПЦР _{рв} (9 <i>миРНК</i>)	-	<i>миРНК-19а-3р</i> ↑ <i>миРНК-106а-5р</i> ↑ <i>миРНК-181b-5р</i> ↑
[51]	15, глиома (8 IDH-wt и 7 IDH-mut); 15, контроль	Сыворотка (200 мкл); цкПЦР (10 <i>миРНК</i>)	-	<i>миРНК-1-3р</i> ↓ <i>миРНК-26а-1-3р</i> ↓ <i>миРНК-487b-3р</i> ↓
[52]	106, ГБМ	Сыворотка (н/д); ПЦР _{рв} (<i>миРНК-222-3р</i> , 20а-5р, 106а-5р, 182, 145-5р)	<i>миРНК-182</i> ↑ <i>миРНК-145-5р</i> ↑	<i>миРНК-222-3р</i> ↑ <i>миРНК-20а-5р</i> ↑ <i>миРНК-106а-5р</i> ↑

Примечание. ГБМ — глиобластома; ЦСЖ — спинномозговая жидкость; NGS (next generation sequencing) — секвенирование нового поколения; ПЦР_{рв} — полимеразная цепная реакция в реальном времени; цкПЦР — цифровая капельная полимеразная цепная реакция; ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота; РНК — рибонуклеиновая кислота; мРНК — матричная РНК; миРНК — микроРНК; *p* — промотор гена; н/д — указывается в случаях, когда из текста исследования не удаётся установить деталь методологии, ↑ или ↓ — отображение повышенного или пониженного содержания маркера в группах пациентов по сравнению с контрольными группами.

Эпигенетические изменения внеклеточных опухолевых ДНК

При оценке эпигенетических изменений наиболее часто с помощью ПЦР в режиме реального времени и цифровой капельной ПЦР изучается изменение метилирования Alu-повторов, а также промоторов генов *MGMT*, *RASSF1A*, *pPARP-1*, *pSHP-1*, *pDAPK-1*, *CDKN2A* и *TIMP-3* (см. табл. 2, 3). М. Gong и соавт. [33] использовали секвенирование по Сэнгеру для оценки метилирования Alu-повторов, *pMGMT*, *pRASSF1A* и *pCDKN2A*. L. Dai и соавт. [34] исследовали метилирование внеклеточных опухолевых ДНК цереброспинальной жидкости с помощью NGS, а затем с помощью базы данных UCSC RefSeq определяли дифференциально метилированные области генома у пациентов с глиомой и здоровых людей. Эти области затем анализировались для поиска наиболее дифференциально экспрессируемых генов и построения диагностической и прогностической моделей. Т. Sabedot и соавт. [35] предложили с помощью NGS исследовать метилирование внеклеточных опухолевых ДНК сыворотки и ткани глиомы. После бисульфитной конверсии и проведения секвенирования с использованием массива Illumina Human EPIC для сыворотки и Illumina Human 450K (HM450K) для ткани опухоли авторы выделили 476 сайтов генома, дифференциально метилированных у пациентов с глиомой и здоровых людей. С помощью данной информации была создана шкала оценки метилирования ДНК, которая позволяла бы различать образцы, полученные от пациентов с глиомами (показатель шкалы, близкий к 100%) и здоровых лиц (близкий к 0%). Увеличение значения шкалы у каждого пациента означает, что в его плазме обнаружена внеклеточная опухолевая ДНК, метилированная схожим образом с набором 476 сайтов, использовавшихся для создания оценки. В результате оценки материала тестовой когорты с помощью машинного обучения пороговый уровень шкалы для дифференцировки лиц с глиомами и без них был выставлен на 49%.

Метилирование Alu-повторов значительно ниже у пациентов с глиобластомой (46–47%) по сравнению с группой контроля (около 60%) [33], при этом средний уровень метилирования *MGMT*, *CDKN2A*, *RASSF1A*, наоборот, значительно выше у пациентов с глиомой, чем у здоровых людей [33, 36, 37]. Частота встречаемости гиперметилирования *p16* различается среди когорт пациентов с глиомами разных гистологических типов: у 9/20 пациентов с астроцитомами и лишь у 1/20 пациентов с олигодендро-

глиомами ($p < 0,05$) [38]. L. Dai и соавт. [34] указали, что *pFLRT2*, *pETV1*, *pNTRK3* и *pC1orf226* гипометилированы в опухолевых клетках, а *pNKD1*, *pGNB5*, *pCOMMD1* и *pCHI3L2* — гиперметилированы.

Т. Sabedot и соавт. [35] отметили снижение показателя шкалы метилирования генома после успешной терапии. При первичной диагностике медиана показателя шкалы среди пациентов составила 78,41%, при ремиссии и псевдопрогрессии уровень шкалы опускался ниже 49%, в то время как при рецидивах — увеличивался (при первом рецидиве медиана составляла 61,1%, при втором — 56,1%). Вероятно также, что в ходе упомянутой ранее посттерапевтической эволюции опухоли в опухолевой массе накапливались субклоны клеток, метилирование ДНК которых отличалось от первоначального набора 476 сайтов, из-за чего уровень шкалы при рецидиве не возвращался к прежним значениям. Тем не менее для всех пациентов с рецидивом глиомы значение шкалы превышало 49%, что позволило достоверно отличить их от пациентов с псевдорезицидивом. Чувствительность анализа составила 100%, специфичность — 97,78% [35].

Чувствительность дифференцировки пациентов с глиомами от здоровых добровольцев по анализу метилирования *pMGMT*, *pRASSF1A*, *p15INK4B*, *p14ARF*, *pPTEN*, *pCDKN2A* с помощью ПЦР составила 58–75%, специфичность — 94–100% (см. табл. 2). Диагностическая модель L. Dai и соавт. [34] позволила дифференцировать пациентов и здоровых добровольцев с AUC 94,4%.

Пациенты с высоким уровнем метилирования Alu, *NKD1*, *GNB5*, *COMMD1*, *CHI3L2* и *pMGMT* имеют большую общую выживаемость, чем пациенты с низким уровнем метилирования (средняя продолжительность жизни после постановки диагноза около 23 месяцев у пациентов с выраженным метилированием Alu против 11 месяцев у пациентов без метилирования; $p < 0,05$) [34, 41], в то же время высокие уровни метилирования внеклеточных опухолевых ДНК *pPARP-1*, *pSHP-1*, *pFLRT2*, *pETV1*, *pNTRK3*, *pC1orf226*, *pP16INK4a*, *pTHBS1* и *pTIMP-3* в сыворотке связаны с меньшей выживаемостью [25, 34, 37]. Кроме того, степень метилирования промоторов *pPARP-1*, *pSHP-1* и *pTIMP-3* в образцах опухоли и сыворотки в значительной степени связана со степенью злокачественности глиомы (средний уровень метилирования указанных генов от 0,18–0,30 у пациентов с глиомами I степени до 0,4–0,6 у пациентов с глиомами IV уровня злокачественности) [25]. В исследовании L. Dai и соавт. [34]

высокий уровень метилирования *pNKD1*, *pGNB5*, *pCOMMD1* и *pCHI3L2* связан с отрицательным прогнозом, а высокий уровень метилирования *pFLRT2*, *pETV1*, *pNTRK3* и *pC1orf226* является положительным прогностическим признаком. Стоит отметить, что в настоящий момент анализ метилирования *pMGMT* уже используется для прогнозирования течения заболевания, хотя исследуемый субстрат ограничен опухолевой тканью [3]. Анализ метилирования других маркеров на сегодняшний день не применяется в широкой практике. Результаты исследования прогностической эффективности жидкостной биопсии по анализу метилирования внеклеточных опухолевых ДНК изложены в табл. 3.

ВНЕКЛЕТОЧНАЯ ОПУХОЛЕВАЯ РНК

Исследования показывают, что как опухолевые, так и нормальные клетки выделяют в окружающую среду большое количество РНК, при этом её выделение может происходить не только при гибели клетки, но и посредством секреторных механизмов, таких как экзосомо-опосредованная передача сигналов живыми клетками. Концентрация общей внеклеточной РНК в плазме крови онкологических больных составляет в среднем 7,9 нг/мл, что сопоставимо с выходом этого вещества у здоровых людей [42]. В то же время концентрации отдельных РНК пациентов могут отличаться от таковых у здоровых людей в десятки раз [43, 44]. Их анализ позволяет судить не только о наличии новообразования, но и о его характеристиках.

В большинстве работ, посвящённых анализу внеклеточных опухолевых РНК, оценивается уровень микроРНК, среди которых наибольшее внимание уделено микроРНК-21 и 221 (см. табл. 2, 3). В некоторых исследованиях оцениваются уровни кольцевых РНК *circHIPK3* и *circSMARCA5*, длинных некодирующих РНК *HOTAIR*, *SOX21-AS1* и *STEAP3-AS1*, а также количество экспрессируемой матричной РНК [45–47]. МикроРНК-21, 218, 198b и другие, а также длинные некодирующие РНК *HOTAIR*, *SOX21-AS1* и *STEAP3-AS1* значительно (в 100–10000 раз; $p < 0,05$) повышены у пациентов с глиобластомой по сравнению с контролем [43, 44]. МикроРНК-17-5p, 125b, 21, 221 и 222, а также *circMMP1* повышены у пациентов с глиомами по сравнению с контролем в 2–10 раз ($p < 0,05$) [46, 48], однако уровень микроРНК-128 и 342-3p и кольцевых РНК *circSMARCA5* и *circHIPK3*, наоборот, ниже у пациентов с глиомами, чем у здоровых людей, в 2–10 раз ($p < 0,05$) [44, 47]. По результатам анализа

циркулирующей матричной РНК пациенты с глиомой характеризуются сверхэкспрессией генов *BCL2L1*, *GZMB*, *HLA-A*, *IRF1*, *MYD88*, *TLR2* и *TP53*, в то время как *BCL2*, *CCR2*, *CXCL9*, *CXCR3*, *GBP1*, *HIF1A* и *IL23A* недостаточно экспрессированы (разница в 2–10 раз; $p < 0,05$) [45].

Чувствительность дифференцирования пациентов с глиомами и здоровых людей с помощью ПЦР в режиме реального времени по наличию таких РНК, как микроРНК-10b, 17-5p, 125b и 221, составляет 30–96%, специфичность доходит до 95% (см. табл. 2).

Уровни выявляемых микроРНК-21, 128, 342-3p и некоторых других снижаются после проведения резекции или химиотерапии, но увеличиваются при рецидиве [43, 44, 49], при этом повышение уровня микроРНК-320e связано с более высоким риском прогрессирования, чем объём опухоли по данным МРТ [12].

Уровень выявляемых микроРНК-21, 17-5p, 125b и 221 выше у пациентов с глиомами более высокой степени злокачественности и более агрессивного гистологического типа (в 2–10 раз больше у глиом высокой степени злокачественности по сравнению с глиомами низкой степени; $p < 0,05$), в то время как уровень микроРНК-128 и 342-3p в 2–3 раза уменьшается при увеличении степени патологии (см. табл. 3) [44, 48]. Высокий уровень экспрессии микроРНК-17-5p, 125b и т.д., а также длинных некодирующих РНК *HOTAIR* и *STEAP3-AS1* связан с худшей общей выживаемостью и выживаемостью без прогрессии [48, 50], тогда как высокая экспрессия микроРНК-1-3p, 26a-1-3p, 487b-3p и 342-3p является положительным прогностическим фактором [44, 51, 52]. Уровни микроРНК-1-3p, 26a-1-3p и 487b-3p снижены в плазме пациентов с IDH-диетического типа, что связано с более низкой выживаемостью этих больных (отношение рисков, ОШ, 0,24; 95% ДИ 0,12–0,47; $p < 0,05$) [51].

ОБСУЖДЕНИЕ

Возможность жидкостной биопсии качественно и количественно анализировать содержание маркеров в различных биологических жидкостях позволяет не только диагностировать наличие глиомы, но и дифференцировать истинный рецидив опухоли от псевдорецидива. Кроме того, жидкостная биопсия демонстрирует способность определять степень злокачественности опухоли и прогнозировать выживаемость пациентов после проведённой терапии (см. табл. 3). Оптимальным маркером для данного инструмента являются внеклеточные

опухолевые нуклеиновые кислоты, такие как ДНК и РНК с наиболее значимыми генетическими и эпигенетическими изменениями, такими как мутации генов *TERT*, *TP53*, *H3F3A*, *IDH1*, *CDKN2A/B* и т.д., aberrantными паттернами метилирования *MGMT*, *RASSF1A*, *pPARP-1*, *pSHP-1*, *pDAPK-1*, *CDKN2A* и *TIMP-3*, а также микроРНК-21 и микроРНК-221, определяемыми в цереброспинальной жидкости с помощью цифровой капельной ПЦР. С введением NGS в широкую клиническую практику, скорее всего, распространение получит анализ крупных панелей генов, способных с большой точностью диагностировать онкологические заболевания при анализе сыворотки. Впрочем, данный список, вероятно, будет расширен в ходе дальнейших исследований жидкостной биопсии.

Наибольшим диагностическим потенциалом в диагностике глиом, вероятно, обладает анализ маркеров в цереброспинальной жидкости с помощью NGS и цифровой капельной ПЦР, которые характеризуются высокими (до 90–100%) чувствительностью и специфичностью [12, 21, 26, 34]. С другой стороны, анализ маркеров в сыворотке с помощью вышеуказанных методов или в цереброспинальной жидкости с помощью ПЦР в режиме реального времени обладает значительно меньшими показателями (до 50–75% до 90%, соответственно) [22, 27, 39]. Во многом это обусловлено свойством гематоэнцефалического барьера затруднять проникновение маркеров в кровь из цереброспинальной жидкости и препятствовать их анализу в сыворотке [40]. Вероятно, в силу того, что внеклеточная опухолевая РНК имеет меньший размер, её способность проходить сквозь гематоэнцефалический барьер значительно выше, чем у внеклеточных опухолевых ДНК. Как следствие, анализ данного маркера в сыворотке с помощью ПЦР в режиме реального времени обладает чувствительностью и специфичностью до 90–100%, в отличие от анализа внеклеточных опухолевых ДНК [44, 48]. Кроме того, низкая чувствительность и специфичность выявления могут быть обусловлены свойствами самих методов анализа. Как известно, ПЦР в режиме реального времени имеет более низкую, в сравнении с цифровой капельной ПЦР, устойчивость к ингибиторам ПЦР, а также ограничения при работе в диапазоне низких концентраций нуклеиновых кислот (характерные для внеклеточных опухолевых ДНК глиом в плазме), что может негативно отражаться на результатах исследования [53]. NGS позволяет одновременно анализировать множество геномных

локусов, выявляя точные изменения последовательности, что может обуславливать её более высокие чувствительность и специфичность [54]. Так, например, в работе Т. Sabedot и соавт. [35] исследование метилирования внеклеточных опухолевых ДНК в сыворотке с помощью NGS обладало чувствительностью 100% и специфичностью 97,78%, что значительно выше, чем у ПЦР в режиме реального времени в аналогичных условиях.

Таким образом, жидкостная биопсия обладает значительным диагностическим и прогностическим потенциалом. Несмотря на это она характеризуется рядом ограничений (одним из главных является отсутствие валидированных подходов к анализу маркеров), препятствующих её рутинному применению. Например, в большинстве работ выделение ДНК производится из 1–4 мл субстрата, а РНК — из 100–400 мкл (см. табл. 2, 3), в то время как использованные авторами наборы реагентов позволяют без потери эффективности экстракции обрабатывать до 5 мл и 900 мкл биологических жидкостей соответственно [55, 56]. В результате происходит потенциальная потеря 20–90% нуклеиновых кислот, что может оказывать негативное влияние на исход анализа. Более того, в большей части работ объём исследуемого материала не раскрывается, что ещё сильнее затрудняет оценку эффективности предложенного подхода к жидкостной биопсии. Данная проблема может быть решена путём проведения крупных многоцентровых исследований, которые позволят однозначно указать набор маркеров и подход к их анализу, которые были бы оптимальны для рутинного клинического применения жидкостной биопсии. Кроме того, анализу эпигенетической регуляции глиом препятствует использование бисульфитной конверсии, которая может приводить к деградации 50–90% нуклеиновых кислот, что снижает чувствительность этого метода. Судя по всему, большая часть фрагментов после неё составляет до 80–90 пар оснований, что порой влияет на возможность их анализа [57]. Вероятно, для выявления aberrаций метилирования генома было бы рационально использовать чувствительные к метилированию рестриктазы, которые существенно в меньшей степени могут приводить к неспецифической деградации ДНК [58]. Впрочем, ограничением данного подхода является то, что далеко не все перспективные для анализа участки ДНК с изменённым метилированием несут подходящие для доступных на сегодняшний день ферментов сайты рестрикции [59].

К перспективным методам анализа метилирования ДНК относится также ферментативная конверсия. Данная процедура, как и бисульфитная конверсия, преобразует неметилированный цитозин в урацил, однако не приводит к массивной деградации генетического материала, что увеличивает чувствительность анализа и даёт возможность анализировать в том числе повреждённую ДНК, например, полученную из парафинированных срезов. К преимуществам ферментативной конверсии можно отнести также возможность работы с низкими уровнями ДНК (от 100 пг), что часто наблюдается в субстратах для жидкостной биопсии. Ввиду своей новизны данная технология ещё не получила широкого распространения, однако в дальнейшем, вероятно, всё больше исследовательских групп будут отдавать предпочтение этому методу, нежели бисульфитной конверсии [60].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящем обзоре рассматривалась роль жидкостной биопсии плазмы и спинномозговой жидкости внеклеточных опухолевых нуклеиновых кислот пациентов с глиомами. Этот перспективный метод продемонстрировал свою эффективность в диагностике и прогнозировании течения данного заболевания, однако нуждается в дальнейшем развитии. При его внедрении в клиническую практику перед медицинским сообществом могут открыться широкие возможности в диагностике, контроле эффективности лечения и выборе терапии при онкологических заболеваниях.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Источник финансирования. Исследование выполнено в рамках государственного задания Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Вклад авторов. *Т.И. Рахматуллин* — поисково-аналитическая работа, написание текста статьи, обсуждение результатов исследования; *М. Джайн, Л.М. Самоходская, А.А. Зувев* — обработка и обсуждение результатов исследования, написание текста статьи. Авторы подтверждают соответствие своего авторства международным критериям ICMJE (все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение поисково-

аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией).

ADDITIONAL INFORMATION

Funding source. The study was carried within the state assignment of Lomonosov Moscow State University.

Competing interests. The authors declare that they have no competing interests.

Author contribution. *T.I. Rakhmatullin* — search and analytical work, writing the text of the article, discussion of the results of the study; *M. Jain, L.M. Samokhodskaya, A.A. Zuev* — processing and discussion of the results of the study, writing the text of the article. The authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published and agree to be accountable for all aspects of the work.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Ostrom QT, Cioffi G, Waite K, et al. CBTRUS statistical report: Primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2014–2018. *Neuro Oncol.* 2021;23(12, Suppl. 2):III1–III105. EDN: LFHEVS doi: 10.1093/neuonc/noab200
- Claus EB, Walsh KM, Wiencke JK, et al. Survival and low grade glioma: The emergence of genetic information. *Neurosurg Focus.* 2015;38(1):E6. EDN: WOMMTF doi: 10.3171/2014.10.FOCUS12367
- Kim YZ, Kim CY, Lim DH. The overview of practical guidelines for gliomas by KSCO, NCCN, and EANO. *Brain Tumor Res Treat.* 2022;10(2):83–93. EDN: KTLVBB doi: 10.14791/btrt.2022.0001
- Schomas DA, Issa Laack NN, Rao RD, et al. Intracranial low-grade gliomas in adults: 30-year experience with long-term follow-up at Mayo Clinic. *Neuro Oncol.* 2009;11(4):437. doi: 10.1215/15228517-2008-102
- Kumar AA, Koshy AA. Regression of recurrent high-grade glioma with temozolomide, dexamethasone, and levetiracetam: Case report and review of the literature. *World Neurosurg.* 2017;108:990.e11–990.e16. EDN: YIAOAT doi: 10.1016/j.wneu.2017.08.136
- Young JS, Al-Adli N, Scotford K, et al. Pseudoprogression versus true progression in glioblastoma: What neurosurgeons need to know. *J Neurosurg.* 2023;139(3):748–759. doi: 10.3171/2022.12.JNS222173
- Van West SE, de Bruin HG, van de Langerijt B, et al. Incidence of pseudoprogression in low-grade gliomas treated with radiotherapy. *Neuro Oncol.* 2017;19(5):719–725. doi: 10.1093/neuonc/now194
- Dhawan S, Venteicher AS, Butler WE, et al. Clinical outcomes as a function of the number of samples taken during stereotactic needle biopsies: A meta-analysis. *J Neurooncol.* 2021;154(1): 1–11. EDN: IEQEAH doi: 10.1007/s11060-021-03785-9
- Climans SA, Ramos RC, Laperriere N, et al. Outcomes of presumed malignant glioma treated without pathological confirmation: A retrospective, single-center analysis. *Neurooncol Pract.* 2020;7(4):446. EDN: UTYRNS doi: 10.1093/nop/npaa009
- Stapińska-Syniec A, Rydzewski M, Aciewicz A, et al. Atypical clinical presentation of glioblastoma mimicking autoimmune meningitis in an adult. *Folia Neuropathol.* 2022;60(2):250–256. EDN: NQZOPD doi: 10.5114/fn.2022.117267

11. Lazzari M, Pronello E, Covelli A, et al. Cerebral nocardiosis mimicking disseminated tumor lesions in a patient with recurrent glioblastoma. *Neurological Sciences*. 2023;44(6):2213–2215. EDN: SGOKXO doi: 10.1007/s10072-023-06678-z
12. Morokoff A, Jones J, Nguyen H, et al. Serum microRNA is a biomarker for post-operative monitoring in glioma. *J Neurooncol*. 2020;149(3):391–400. EDN: CJKNFN doi: 10.1007/s11060-020-03566-w
13. Piccioni DE, Achrol AS, Kiedrowski LA, et al. Analysis of cell-free circulating tumor DNA in 419 patients with glioblastoma and other primary brain tumors. *CNS Oncol*. 2019;8(2):CNS34. doi: 10.2217/cns-2018-0015
14. De Vleeschouwer S. *Glioblastoma*. Codon Publications; 2017. 432 p. doi: 10.15586/codon.glioblastoma.2017
15. Kim TY, Zhong S, Fields CR, et al. Epigenomic profiling reveals novel and frequent targets of aberrant DNA methylation-mediated silencing in malignant glioma. *Cancer Res*. 2006;66(15):7490–7501. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-4552
16. Guo X, Piao H. Research progress of circRNAs in glioblastoma. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9:791892. EDN: ONOIHG doi: 10.3389/fcell.2021.791892
17. Gareev I, de Ramirez MJ, Nurmukhametov R, et al. The role and clinical relevance of long non-coding RNAs in glioma. *Noncoding RNA Res*. 2023;8(4):562–570. EDN: UTRVKO doi: 10.1016/j.ncrna.2023.08.005
18. Pös O, Biró O, Szemes T, Nagy B. Circulating cell-free nucleic acids: Characteristics and applications. *Eur J Human Genetics*. 2018;26(7):937. doi: 10.1038/s41431-018-0132-4
19. Faria G, Silva E, Da Fonseca C, et al. Circulating cell-free DNA as a prognostic and molecular marker for patients with brain tumors under perilyl alcohol-based therapy. *Int J Mol Sci*. 2018;19(6):1610. EDN: VHZWWW doi: 10.3390/ijms19061610
20. Liberti MV, Locasale JW. The warburg effect: How does it benefit cancer cells? *Trends Biochem Sci*. 2016;41(3):211. doi: 10.1016/j.tibs.2015.12.001
21. Pan C, Diplas BH, Chen X, et al. Molecular profiling of tumors of the brainstem by sequencing of CSF-derived circulating tumor DNA. *Acta Neuropathol*. 2019;137(2):297–306. EDN: LDWLGJ doi: 10.1007/s00401-018-1936-6
22. Miller AM, Shah RH, Pentsova EI, et al. Tracking tumour evolution in glioma through liquid biopsies of cerebrospinal fluid. *Nature*. 2019;565(7741):654–658. EDN: NRCYOO doi: 10.1038/s41586-019-0882-3
23. Yu J, Sheng Z, Wu S, et al. Tumor DNA from tumor in situ fluid reveals mutation landscape of minimal residual disease after glioma surgery and risk of early recurrence. *Front Oncol*. 2021;11:742037. doi: 10.3389/fonc.2021.742037
24. Bagley SJ, Nabavizadeh SA, Mays JJ, et al. Clinical utility of plasma cell-free DNA in adult patients with newly diagnosed glioblastoma: A pilot prospective study. *Clin Cancer Res*. 2020;26(2):397–407. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-19-2533
25. Zhang L, Wang M, Wang W, Mo J. Incidence and prognostic value of multiple gene promoter methylations in gliomas. *J Neurooncol*. 2014;116(2):349–356. EDN: SRKETB doi: 10.1007/s11060-013-1301-5
26. Fujioka Y, Hata N, Akagi Y, et al. Molecular diagnosis of diffuse glioma using a chip-based digital PCR system to analyze IDH, TERT, and H3 mutations in the cerebrospinal fluid. *J Neurooncol*. 2021;152(1):47–54. EDN: EMWSRK doi: 10.1007/s11060-020-03682-7
27. Muralidharan K, Yekula A, Small JL, et al. TERT promoter mutation analysis for blood-based diagnosis and monitoring of gliomas. *Clin Cancer Res*. 2021;27(1):169–178. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-20-3083
28. Husain A, Mishra S, Siddiqui MH, Husain N. Detection of IDH1 mutation in cfDNA and tissue of adult diffuse glioma with allele-specific qPCR. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2023;24(3):961–968. EDN: YBNCDQ doi: 10.31557/APJCP.2023.24.3.961
29. Fontanilles M, Marguet F, Beaussire L, et al. Cell-free DNA and circulating TERT promoter mutation for disease monitoring in newly-diagnosed glioblastoma. *Acta Neuropathol Commun*. 2020;8(1):179. EDN: FZDHVP doi: 10.1186/s40478-020-01057-7
30. Liu G, Bu C, Guo G, et al. Molecular and clonal evolution in vivo reveal a common pathway of distant relapse gliomas. *Science*. 2023;26(9):107528. EDN: ONTVUA doi: 10.1016/j.isci.2023.107528
31. Juratli TA, Stasik S, Zolal A, et al. TERT promoter mutation detection in cell-free tumor-derived DNA in patients with IDH wild-type glioblastomas: A pilot prospective study. *Clin Cancer Res*. 2018;24(21):5282–5291. EDN: QVPXJX doi: 10.1158/1078-0432.CCR-17-3717
32. Labussière M, Boisselier B, Mokhtari K, et al. Combined analysis of TERT, EGFR, and IDH status defines distinct prognostic glioblastoma classes. *Neurology*. 2014;83(13):1200–1206. doi: 10.1212/WNL.0000000000000814
33. Gong M, Shi W, Qi J, et al. Alu hypomethylation and MGMT hypermethylation in serum as biomarkers of glioma. *Oncotarget*. 2017;8(44):76797–76806. doi: 10.18632/oncotarget.20012
34. Dai L, Liu Z, Zhu Y, Ma L. Genome-wide methylation analysis of circulating tumor DNA: A new biomarker for recurrent glioblastoma. *Heliyon*. 2023;9(3):e14339. EDN: RHDLGH doi: 10.1016/j.heliyon.2023.e14339
35. Sabedot TS, Malta TM, Snyder J, et al. A serum-based DNA methylation assay provides accurate detection of glioma. *Neuro Oncol*. 2021;23(9):1494–1508. EDN: TOBMEP doi: 10.1093/neuonc/noab023
36. Majchrzak-Celińska A, Paluszczak J, Kleszcz R, et al. Detection of MGMT, RASSF1A, p15INK4B, and p14ARF promoter methylation in circulating tumor-derived DNA of central nervous system cancer patients. *J Appl Genet*. 2013;54(3):335–344. EDN: IEYYGZ doi: 10.1007/s13353-013-0149-x
37. Liu BL, Cheng JX, Zhang W, et al. Quantitative detection of multiple gene promoter hypermethylation in tumor tissue, serum, and cerebrospinal fluid predicts prognosis of malignant gliomas. *Neuro Oncol*. 2010;12(6):540–548. doi: 10.1093/neuonc/nop064
38. Wakabayashi T, Natsume A, Hatano H, et al. p16 Promoter methylation in the serum as a basis for the molecular diagnosis of gliomas. *Neurosurgery*. 2009;64(3):455–461; discussion 461–2. doi: 10.1227/01.NEU.0000340683.19920.E3
39. Lavon I, Refael M, Zelikovitch B, et al. Serum DNA can define tumor-specific genetic and epigenetic markers in gliomas of various grades. *Neuro Oncol*. 2010;12(2):173–180. EDN: NAGGRH doi: 10.1093/neuonc/nop041
40. Wang Z, Jiang W, Wang Y, et al. MGMT promoter methylation in serum and cerebrospinal fluid as a tumor-specific biomarker of glioma. *Biomed Rep*. 2015;3(4):543–548. doi: 10.3892/br.2015.462
41. Fiano V, Trevisan M, Trevisan E, et al. MGMT promoter methylation in plasma of glioma patients receiving temozolomide. *J Neurooncol*. 2014;117(2):347–357. EDN: UUSJCP doi: 10.1007/s11060-014-1395-4
42. Larson MH, Pan W, Kim HJ, et al. A comprehensive characterization of the cell-free transcriptome reveals tissue- and subtype-specific biomarkers for cancer detection. *Nature Communications*. 2021;12(1):2357. EDN: JSOHEV doi: 10.1038/s41467-021-22444-1
43. Akers JC, Hua W, Li H, et al. A cerebrospinal fluid microRNA signature as biomarker for glioblastoma. *Oncotarget*. 2017;8(40):68769. doi: 10.18632/oncotarget.18332
44. Wang Q, Li P, Li A, et al. Plasma specific miRNAs as predictive biomarkers for diagnosis and prognosis of glioma. *J Exp Clin Cancer Res*. 2012;31(1):97. EDN: QZSZWG doi: 10.1186/1756-9966-31-97
45. Ita MI, Wang JH, Toulouse A, et al. The utility of plasma circulating cell-free messenger RNA as a biomarker of glioma: A pilot study. *Acta Neurochir (Wien)*. 2022;164(3):723–735. doi: 10.1007/s00701-021-05014-8
46. Yin K, Liu X. CircMMP1 promotes the progression of glioma through miR-433/HMGB3 axis in vitro and in vivo. *IUBMB Life*. 2020;72(11):2508–2524. doi: 10.1002/iub.2383

47. Stella M, Falzone L, Caponnetto A, et al. Serum extracellular vesicle-derived circHIPK3 and circSMARCA5 Are two novel diagnostic biomarkers for glioblastoma multiforme. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2021;14(7):618. EDN: BEHBAW doi: 10.3390/ph14070618
48. Swellam M, Bakr NM, El Magdoub HM, et al. Emerging role of miRNAs as liquid biopsy markers for prediction of glioblastoma multiforme prognosis. *J Mol Neurosci*. 2021;71(4):836–844. EDN: CTKSSV doi: 10.1007/s12031-020-01706-5
49. Batool SM, Muralidharan K, Hsia T, et al. Highly sensitive EGFRvIII detection in circulating extracellular vesicle RNA of glioma patients. *Clin Cancer Res*. 2022;28(18):4070–4082. EDN: SSJLGI doi: 10.1158/1078-0432.CCR-22-0444
50. Zhi F, Shao N, Wang R, et al. Identification of 9 serum microRNAs as potential noninvasive biomarkers of human astrocytoma. *Neuro Oncol*. 2015;17(3):383–391. doi: 10.1093/neuonc/nou169
51. Díaz Méndez AB, Sacconi A, Tremante E, et al. A diagnostic circulating miRNA signature as orchestrator of cell invasion via TKS4/TKS5/EFHD2 modulation in human gliomas. *J Exp Clin Cancer Res*. 2023;42(1):66. EDN: NUHLI doi: 10.1186/s13046-023-02639-8
52. Zhao H, Shen J, Hodges TR, et al. Serum microRNA profiling in patients with glioblastoma: A survival analysis. *Mol Cancer*. 2017;16(1):59. EDN: SCWKPU doi: 10.1186/s12943-017-0628-5
53. Taylor SC, Laperriere G, Germain H. Droplet digital PCR versus qPCR for gene expression analysis with low abundant targets: From variable nonsense to publication quality data. *Scientific Reports*. 2017;7(1):2409. doi: 10.1038/s41598-017-02217-x
54. Cheng YW, Stefaniuk C, Jakubowski MA. Real-time PCR and targeted next-generation sequencing in the detection of low level EGFR mutations: Instructive case analyses. *Respir Med Case Rep*. 2019;28:100901. doi: 10.1016/j.rmcr.2019.100901
55. QIAGEN [Electronic resource]. *QIAamp circulating nucleic acid handbook* [October, 2019]. Режим доступа: <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=0c4b31ab-f4fb-425f-99bf-10ab9538c061&lang=en>. Дата обращения: 20.07.2024.
56. EXIQON Seek Find Verify [Electronic resource]. *miRCURY™ RNA isolation Kit-biofluids. Instruction manual v1.7 #300112 and #300113* [November, 2015]. Режим доступа: <https://labettor.com/uploads/products/protocols/411.pdf>. Дата обращения: 20.07.2024.
57. Kint S, De Spiegelaere W, De Kesel J, et al. Evaluation of bisulfite kits for DNA methylation profiling in terms of DNA fragmentation and DNA recovery using digital PCR. *PLoS One*. 2018;13(6):e0199091. doi: 10.1371/journal.pone.0199091
58. Martisova A, Holcakova J, Izadi N, et al. DNA methylation in solid tumors: Functions and methods of detection. *Int J Mol Sci*. 2021;22(8):4247. EDN: AGKKRD doi: 10.3390/ijms22084247
59. Takara Bio Inc [Electronic resource]. *Methylation-sensitive restriction enzymes (MSREs)*. Режим доступа: https://www.takarabio.com/us/products/cell_biology_and_epigenetics/epigenetics/dna_preparation/msre_overview. Дата обращения: 20.07.2024.
60. Vaisvila R, Ponnaluri VK, Sun Z, et al. Enzymatic methyl sequencing detects DNA methylation at single-base resolution from picograms of DNA. *Genome Res*. 2021;31(7):1280–1289. EDN: NJJWWN doi: 10.1101/gr.266551.120

ОБ АВТОРАХ

Автор, ответственный за переписку:

Рахматуллин Тагир Ирекович;

адрес: Россия, 119991, Москва, ул. Ленинские горы, д. 1;

ORCID: 0000-0002-4601-3478;

eLibrary SPIN: 7068-1678;

e-mail: Tagir.rakhmatullin@internet.ru

Соавторы:

Джайн Марк;

ORCID: 0000-0002-6594-8113;

eLibrary SPIN: 3783-4441;

e-mail: jain-mark@outlook.com

Самоходская Лариса Михайловна,

канд. мед. наук, доцент;

ORCID: 0000-0001-6734-3989;

eLibrary SPIN: 5404-6202;

e-mail: slm@fbm.msu.ru

Зуев Андрей Александрович, д-р мед. наук, профессор;

ORCID: 0000-0003-2974-1462;

eLibrary SPIN: 9377-4574;

e-mail: mosbrain@gmail.com

AUTHORS' INFO

The author responsible for the correspondence:

Tagir I. Rakhmatullin;

address: 1 Leninskie gory, 119991 Moscow, Russia;

ORCID: 0000-0002-4601-3478;

eLibrary SPIN: 7068-1678;

e-mail: Tagir.rakhmatullin@internet.ru

Co-authors:

Mark Jain;

ORCID: 0000-0002-6594-8113;

eLibrary SPIN: 3783-4441;

e-mail: jain-mark@outlook.com

Larisa M. Samokhodskaya, MD, PhD,

Associate Professor;

ORCID: 0000-0001-6734-3989;

eLibrary SPIN: 5404-6202;

e-mail: slm@fbm.msu.ru

Andrey A. Zuev, MD, PhD, Professor;

ORCID: 0000-0003-2974-1462;

eLibrary SPIN: 9377-4574;

e-mail: mosbrain@gmail.com