



ЖУРНАЛ ВЫСШЕЙ НЕРВНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ

имени И.П. Павлова



НАУКА

— 1727 —

СОДЕРЖАНИЕ

Том 74, номер 1, 2024

Обзоры и теоретические статьи

Современные нейронаучные концепции и психотерапия: возможности интеграции

О. Р. Добрушина

3

Физиология высшей нервной (когнитивной) деятельности человека

Влияние радиотерапии на коннективность сети управляющих функций фМРТ у пациентов с латерализованным поражением медиобазальных отделов височной доли

Е. В. Шарова, А. Ю. Кулева, Ю. В. Струнина, М. Ю. Ярец, М. В. Галкин, А. С. Смирнов, О. А. Кроткова

14

Спецвыпуск. Проблемы нейроонкологии Редактор выпуска *Г. В. Павлова*

Обзоры и теоретические статьи

Участие субвентрикулярной зоны мозга в развитии глиомы головного мозга

А. В. Ревещин, Г. В. Павлова

26

Проблемы и перспективы восстановления зрительного нерва

А. В. Ревещин, Г. В. Павлова, А. Н. Шкарубо

36

Клинические исследования

Фенотипическая и генетическая гетерогенность глиобластом, сопоставление параметров МРТ и ПЭТ/КТ с молекулярно-генетическими характеристиками опухоли

Н. Б. Вихрова, Д. Б. Калаева, А. И. Баталов, И. Н. Пронин

48

ПЭТ/КТ с ¹¹C-метионином при менингиомах

М. В. Галкин, Н. Б. Вихрова, А. В. Голанов, Г. В. Данилов, Ю. В. Струнина

60

Анализ применения флуоресцентной микроскопии в хирургии новообразований, расположенных вблизи моторных зон головного мозга

А. В. Косырькова, С. А. Горайнов, А. И. Баталов, Р. М. Афандиев, К. С. Семин, Н. Е. Захарова, А. А. Огуцова, Г. В. Данилов, А. А. Аристов, В. А. Охлопков, А. Д. Кравчук, И. Н. Пронин

69

Неинвазивное определение мутации гена IDH-1 глиом головного мозга на основе метода протонной МР-спектроскопии

А. Н. Тюрина, А. И. Баталов, Н. Е. Захарова, Л. М. Фадеева, Д. Б. Калаева, И. Н. Пронин

77

Экспериментальные исследования

Специфичность аптамеров U2 и GOL1 к EGFR — позитивным клеткам глиобластомы человека *in vitro*

Ф. М. Дзариева, Д. В. Шамадыкова, О. В. Случанко, С. А. Павлова, Л. В. Фаб, А. В. Рябова, Д. Ю. Пантелеев, А. М. Копылов, Д. Ю. Усачев, А. В. Головин, Г. В. Павлова

85

Использование анти-EGFR аптамерной конструкции GR20hh для регулируемой доставки доксорубина в клетки глиобластомы

Б. М. Иванов, О. М. Антипова, Я. А. Слиман, Н. С. Самойленкова, И. Н. Пронин, Г. В. Павлова, А. М. Копылов

100

Антипролиферативный эффект L1CAM-специфичных аптамеров в клеточных культурах глиобластомы человека

В. А. Колесникова, А. К. Митина, А. В. Рябова, Л. В. Фаб, И. Н. Пронин, Г. В. Павлова

109

Информация

Авторский указатель, Т. 73, 2023 г.

122

Правила для авторов

126

Contents

Vol. 74, No 1, 2024

Reviews and theoretical articles

- Contemporary neuroscientific concepts and psychotherapy: possibilities for integration
O. R. Dobrushina 3

Physiology of higher nervous (mental) activity in humans

- Influence of radiotherapy on control functions network fMRI connectivity in patients with lateralized mediobasal temporal lesions
E. V. Sharova, A. Yu. Kuleva, Yu. V. Strunina, M. Yu. Yarec, M. Yu. Galkin, A. S. Smirnov, O. A. Krotkova 14

Special issue. Neurooncology Guest Editor *G. V. Pavlova*

Reviews and theoretical articles

- Participation of the subventricular zone of the brain in the development of brain glioma
A. V. Revishchin, G. V. Pavlova 26
- Problems and prospects for restoration of the optic nerve
A. V. Revishchin, G. V. Pavlova, A. N. Shkarubo 36

Clinical studies

- Glioblastoma phenotypic and genetic heterogeneity, comparison of MRI and PET/CT parameters with tumor molecular genetic characteristics
N. B. Vikhrova, D. B. Kalaeva, A. I. Batalov, I. N. Pronin 48
- ¹¹C-methionine PET/CT in meningiomas
M. V. Galkin, N. B. Vikhrova, A. V. Golanov, G. V. Danilov, Yu. V. Strunina 60
- Fluorescence-guided surgery in patients with tumors near motor areas of the brain
A. V. Kosyrkova, S. A. Goryaynov, A. I. Batalov, R. M. Afandiev, K. S. Semin, N. E. Zakharova, A. A. Ogurtsova, G. V. Danilov, A. A. Aristov, V. A. Okhlopkov, A. D. Kravtchuk, I. N. Pronin 69
- Non-invasive detection of IDH-1 mutation in brain gliomas based on proton MR spectroscopy
A. N. Tyurina, A. I. Batalov, N. E. Zakharova, L. M. Fadeeva, D. B. Kalaeva, I. N. Pronin 77

Experimental studies

- Specificity of U2 and GOL1 aptamers to EGFR-positive human glioblastoma cells *in vitro*
F. M. Dzarieva, D. V. Shamadykova, O. V. Sluchanko, S. A. Pavlova, L. V. Fab, A. V. Ryabova, D. Yu. Panteleev, A. M. Kopylov, D. Yu. Usachev, A. V. Golovin, G. V. Pavlova 85
- Anti-EGFR aptameric construct GR20hh for controllable delivery of doxorubicin into glioblastoma cells
B. M. Ivanov, O. M. Antipova, Y. A. Sliman, N. S. Samoylenkova, I. N. Pronin, G. V. Pavlova, A. M. Kopylov 100
- Antiproliferative effect of LICAM-specific aptamers in human glioblastoma cell cultures
V. A. Kolesnikova, A. K. Mitina, A. V. Ryabova, L. V. Fab, I. N. Pronin, G. V. Pavlova 109

Information

- Author Index to Volume 73, 2023 122
- Instruction to Authors 126

УДК 612.821

СОВРЕМЕННЫЕ НЕЙРОНАУЧНЫЕ КОНЦЕПЦИИ И ПСИХОТЕРАПИЯ: ВОЗМОЖНОСТИ ИНТЕГРАЦИИ

© 2024 г. О. Р. Добрушина*

ФГБНУ «Научный центр неврологии», Москва, Россия

*e-mail: dobrushina@neurology.ru

Поступила в редакцию 03.06.2023 г.

После доработки 24.09.2023 г.

Принята к публикации 01.12.2023 г.

Статья содержит обзор литературы и теоретическое исследование, посвященное рассмотрению психотерапии в контексте современных нейронаучных концепций. В качестве мозговых коррелятов психотерапевтических процессов предлагается рассматривать изменения в нейросетях ментализации и эмпатии. Выдвигаются гипотезы о возможных механизмах, приводящих к изменению связности нейросетей после психотерапии: усиление роли префронтальной системы в регуляции уровня возбуждения, окситоциновая модуляция системы привязанности, оптимизация предиктивного кодирования межличностного восприятия, включая путь обработки ошибки предикции. Выдвигаемые положения опираются на исследования социальной, аффективной, когнитивной и поведенческой нейронауки, научные работы в области психотерапии, данные о нейрофизиологических коррелятах эффектов психотерапии.

Ключевые слова: психотерапия, фМРТ, функциональные сети покоя, функциональная связность головного мозга, ментализация, эмпатия, предиктивное кодирование, окситоцин

DOI: 10.31857/S0044467724010016

ВВЕДЕНИЕ

Начиная с зарождения психоанализа в работах З. Фрейда, в течение около века развитие психотерапии и нейробиологии шло параллельными путями. В последние десятилетия наметилась тенденция к интеграции накопленных в этих областях знаний в рамках социальной, аффективной, когнитивной и поведенческой нейронаук — интенсивно развивающихся междисциплинарных направлений, использующих естественнонаучные методы исследования для понимания механизмов психических процессов. Интегративная тенденция отражается в растущем количестве исследований на стыке областей (Goss, 2016), в появлении тематических книг (Cozolino, 2017), специальных выпусков, секций, обзоров в журналах (Gonçalves, Perrone-McGovern, 2014; Beeson, Field, 2017; Javanbakht, Alberini, 2019; Кремлева, 2021), в выделении направления «нейропсихоанализ» (Каплан-Солмз, Солмз, 2017; Эйдемиллер, Тарабанов, 2019).

Статья посвящена современным нейронаучным концепциям, которые представляют интерес с точки зрения понимания механизмов психотерапии. В качестве основы для интеграции между психотерапией и нейронаукой мы опира-

емся на мозговые нейросети покоя, выявляемые с помощью функциональной МРТ покоя и интенсивно исследуемые в последние годы (Пирадов и др., 2015; Гаврон и др., 2019). Тенденцией современной нейронауки является переход от рассмотрения функциональной локализации к функциональной связности с выделением мозговых нейросетей. Такого рода анализ осуществляется за счет изучения временных корреляций в активации различных мозговых зон — предполагается, что корреляция между активностью в разных зонах свидетельствует об их функциональной общности. Нейросетевой анализ релевантен сложным интегративным психическим процессам, необходимым для функционирования человека в социальной среде и являющимся мишенью психотерапии (Князев, 2023).

Ввиду интегративного характера статьи, в ней применяется терминология как из области социальной, аффективной, когнитивной и поведенческой нейронауки, так и из области психотерапии, при этом из-за ограничений формата подробно раскрываются лишь новые термины, но не более базовые понятия. Для получения дополнительной информации заинтересованному читателю рекомендуется обратиться к обзорным

статьям по методам психотерапии (Калмыкова, Кэхеле, 2000; Марченкова, 2012), исследованиям эффективности психотерапии (Пуговкина и др., 2009; Холмогорова и др., 2010; Тукаев, 2022) и функциональных нейросетей покоя (Кремнева и др., 2022), а также к книге Л. Ф. Барретт о мозговых механизмах аффективного процессинга (Барретт, 2018).

Нейросети ментализации и эмпатии: значение для психотерапии

Социальное функционирование индивида опирается на мозговые сети ментализации и эмпатии (Можаева, 2017). Нейросеть ментализации (теории психического, theory of mind) выявляется в задачах, связанных с интеллектуальным пониманием мыслей, эмоций, намерений и в целом внутренних состояний других людей, а также своего собственного внутреннего состояния (Lombardo et al., 2010). Сеть эмпатии задействуется в задачах, связанных с эмоциональным пониманием своих состояний и состояний других людей (Fan et al., 2011; Tholen et al., 2020). Важным аспектом в функционировании сети эмпатии является включение в ее состав передней островковой и передней поясной коры, участвующих как в восприятии эмоций, так и в интероцепции – восприятии, интеграции и интерпретации сигналов, исходящих из внутренней среды организма, таких как ощущения от дыхания и сердцебиения (Zaki et al., 2012; Добрушина и др., 2020). Согласно классическим (Cannon, 1927; James et al., 1981) и современным теориям эмоций (Barrett, 2017) восприятие эмоций опирается на интерпретацию интероцептивных сигналов в контексте ситуации. Таким образом, функциональное отличие сети эмпатии от сети ментализации связано с непосредственно-эмоциональным, телесно-опосредованным (Тхостов, 2002; Николаева, Арина, 2003), а не интеллектуальным восприятием состояний других людей.

На рис. 1 и 2 представлены сети ментализации и эмпатии, визуализированные с помощью сервиса автоматического метаанализа данных фМРТ-исследований NeuroSynth (<https://neurosynth.org>), разработанного Т. Yarkoni et al. (2011). Сети были выделены по тегам “mentalizing” и “empathy”. Сеть ментализации включает ассоциативную кору внутренней поверхности головного мозга – медиальную префронтальную кору, заднюю поясную кору и предклинье, а также вентральную часть теменно-височного соединения, височный полюс и зоны мозжечка (Schurz et al., 2014; Иосифян и др., 2020; Князев и др., 2020; Tholen et al., 2020). Сеть эмпатии включает переднюю поясную кору, передние островковые зоны, нижнелобную извилину и, по данным части исследований, дорзальную часть теменно-височного соединения (Singer, 2006; Fan et al., 2011; Tholen et al., 2020).

Нейросети ментализации и эмпатии могут рассматриваться в качестве мозговых основ социальных процессов, являющихся мишенью психотерапии. Установлено, что связность данных сетей формируется постепенно от младенчества к взрослому возрасту, наиболее активно в течение первых двух лет жизни (Gao et al., 2015), и ключевую роль в этом процессе играют отношения со значимыми взрослыми (Atzil et al., 2018). Процессы символической организации первичного аффективного опыта с параллельной надстройкой высокоуровневых нейросетей протекают с опорой на систему привязанности (Fonagy et al., 2018). Следовательно, психотерапевтические отношения могут рассматриваться как создание условий для компенсаторного развития связности нейросетей ментализации и эмпатии. Придание новых значений первичным аффектам в условиях психотерапевтических отношений следует по естественному пути развития высокоуровневых нейросетей (Jurist, 2018).

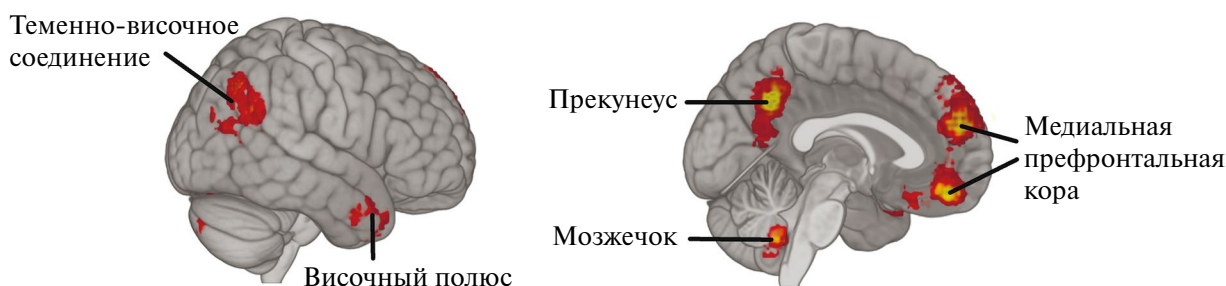


Рис. 1. Нейросеть ментализации.
Fig. 1. Mentalizing Network.

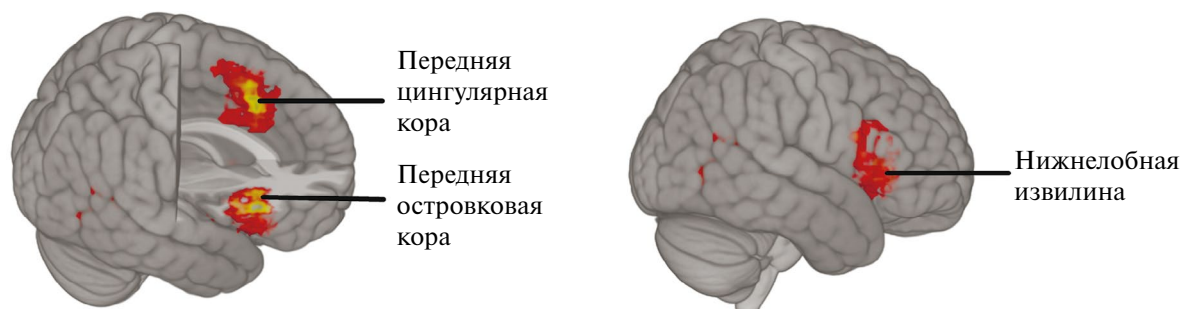


Рис. 2. Нейросеть эмпатии.

Fig. 2. Empathy Network.

Ряд работ, обобщенных в метаанализах, подтверждает наличие функциональных изменений в зонах, входящих в сети ментализации и эмпатии (рис. 1, 2), после психотерапии (Messina et al., 2013; Kalsi et al., 2017; Cera et al., 2022; Schrammen et al., 2022; Yuan et al., 2022). Существенная часть исследований основана на регистрации фМРТ-активации в когнитивных и эмоциональных задачах. В ряде работ продемонстрированы изменения активации задней поясной и парапоясной коры, входящих в сеть ментализации, что может быть ассоциировано с более эффективным задействованием внутренних моделей, на которых основывается межличностное восприятие (Kalsi et al., 2017; Messina et al., 2013). Примечательно, что в ходе лечения депрессии активность правой парапоясной области повышается после психотерапии и понижается после фармакотерапии, что свидетельствует о наличии у психотерапии специфических нейросетевых коррелятов (Kalsi et al., 2017). Для сети эмпатии наиболее типичной тенденцией является снижение активации островковой и передней поясной коры в ответ на негативные эмоциональные стимулы после психотерапии, что отражает снижение эмоциональной реактивности (Cera et al., 2022; Schrammen et al., 2022; Yuan et al., 2022).

В исследованиях, использующих метод функциональной МРТ покоя для оценки нейросетевой связности, продемонстрировано усиление взаимодействия между зонами, входящими в сети ментализации и эмпатии, после психотерапии. Так, у пациентов с пограничным расстройством личности после психодинамической терапии наблюдаются изменения в паттерне связности средней и задней поясной и парапоясной коры, входящих в сеть ментализации, и данные изменения коррелируют с улучшением способностей к идентификации эмоций (Amiri et al., 2023). У пациентов с шизофренией

после групповой когнитивно-поведенческой терапии отмечается усиление связности в сети ментализации (Gallos et al., 2021). В недавнем крупном (131 участник) исследовании показано, что когнитивно-поведенческая психотерапия депрессии приводит к распространенным изменениям функциональной связности в виде ее усиления, в то время как после лечения антидепрессантами связность преимущественно снижается (Dunlop et al., 2023). В частности, наблюдается повышение связности между передней поясной и островковой корой, входящими в сеть эмпатии.

Две системы регуляции уровня возбуждения и психотерапия

Возможность высокоуровневой регуляции поведения с задействованием нейросети ментализации зависит от уровня физиологического возбуждения (arousal). L. Mayes сформулировала концепцию двух систем регуляции уровня возбуждения (рис. 3) (Mayes, 2000). На низком и умеренном уровне возбуждения в регуляции социального поведения доминирует префронтальная система, ассоциированная с произвольной саморегуляцией на основании процессов ментализации. По мере повышения уровня возбуждения активность префронтальной системы убывает и одновременно нарастает активность непроизвольной подкорковой регуляторной системы, связанной с базовыми автоматическими реакциями по типу «бей или беги». Как видно на рис. 3, зависимость активности каждой из двух систем от уровня возбуждения имеет форму купола, что соответствует универсальному закону Йеркса – Додсона, в соответствии с которым существует оптимум уровня возбуждения для выполнения разных задач (Yerkes, Dodson, 1908). При этом типично, что для более простых, автоматизированных задач оптимум возбуждения является меньшим, по сравнению с более комплексными и произвольными задачами.

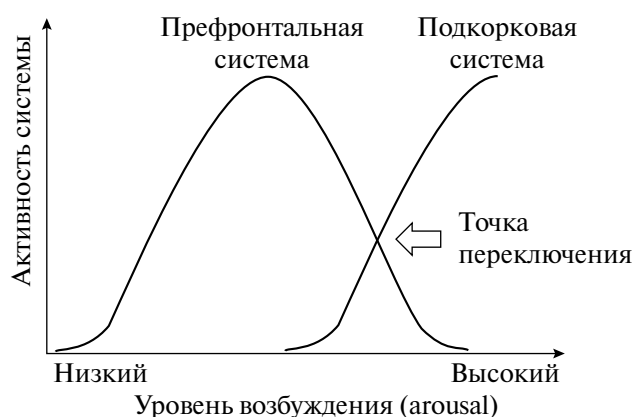


Рис. 3. Две системы регуляции социального поведения.

Fig. 3. Two Systems of Arousal Regulation.

Роль префронтальной системы в регуляции уровня возбуждения подтверждена с использованием функциональной МРТ. Young et al. проанализировали корреляции функциональной связности нейросетей с частотой сердечных сокращений (ЧСС) во время просмотра эмоционально насыщенных видеосюжетов (Young et al., 2017). Они выявили, что ЧСС коррелирует с функциональной связностью нейросети, включающей переднюю поясную и билатеральную островковую кору (данные зоны входят в сети эмпатии). Также они выявили, что сила связей между двумя указанными зонами и лобно-теменной сетью контроля имеет характерную куполообразную зависимость от уровня возбуждения. Данный эксперимент подтверждает гипотезу о наличии критического уровня возбуждения, после которого роль префронтальной регуляции начинает снижаться.

В контексте психотерапии важно, что возбуждение, связанное со стрессом через систему привязанности, обладает особым угнетающим воздействием на нейросеть ментализации (Nolte et al., 2013). В эксперименте Nolte et al. использовали классический тест — «Чтение психического по глазам» (Reading the Mind in the Eyes Test), для выявления фМРТ-активации, связанной с ментализацией. Тест проводили до и после двух видов стрессоров: вспоминание стрессовой ситуации, связанной с отношениями со значимым другим (стресс через систему привязанности), и вспоминание стрессовой ситуации, не имеющей межличностного характера (неспецифический стресс). Стресс через систему привязанности, по сравнению с неспецифическим стрессом,

приводил к снижению активации в нижнелобной извилине, задневисочной области и теменно-височном соединении слева — в зонах из нейросети ментализации. Полученные данные указывают на важность направленной работы над сохранением высокоуровневой регуляции (префронтальной, опосредованной процессами ментализации) в особых условиях — в ходе эмоционально насыщенного взаимодействия со значимыми другими, сопровождающегося активацией системы привязанности. Такого рода работа возможна в рамках психотерапевтических отношений.

Другие данные указывают на то, что не только префронтальная регуляция, но и нейробиологические процессы, лежащие в основе научения, оптимально функционируют при умеренном уровне возбуждения, поскольку чрезмерно высокий уровень катехоламинов препятствует реконсолидации памяти (Baldi, Bucherelli, 2005). Следовательно, неконтролируемое повышение уровня возбуждения в ходе эмоционально заряженных взаимодействий может не сопровождаться усвоением получаемого опыта. Эти данные обосновывают неоднократно сформулированный в психотерапии тезис о необходимости регуляции уровня возбуждения в ходе сессии с целью удержания его в «окне толерантности» (Fonagy, Target, 2006; Рёдигер и др., 2021). Согласно Р. Fonagy, в качестве результата психотерапии возможно рассматривать смещение вправо точки переключения, в которой происходит передача контроля от префронтальной системы к подкорковой (см. рис. 3). Иначе говоря, задача состоит в расширении переносимой зоны возбуждения (Fonagy, Target, 2006).

Данные исследований, в которых эффекты психотерапии регистрировались с использованием фМРТ, подтверждают гипотезу об усилении роли префронтальной регуляции аффекта, связанной с ментализацией. В ряде исследований продемонстрировано усиление лобно-лимбических связей и ослабление активации лимбических структур после индивидуальной и групповой психотерапии (чаще всего когнитивно-поведенческой либо психодинамической) при депрессии, тревожных расстройствах, пограничных личностных расстройствах (Messina et al., 2013; Straub et al., 2017; Herpertz et al., 2018; Marwood et al., 2018). Данные эффекты зарегистрированы как с помощью фМРТ покоя, так и в ходе выполнения фМРТ-задач, связанных с регуляцией эмоций.

Нейрогормональные основы системы привязанности и психотерапия

Как обсуждалось выше, нейросети ментализации и эмпатии онтогенетически формируются в ходе взаимодействия ребенка со значимыми взрослыми, через опосредование системой привязанности. Важным аспектом системы привязанности является биобихевиоральная синхрония – координация биологических и поведенческих процессов между ребенком и значимым взрослым с внешней регуляцией незрелого мозга ребенка зрелым мозгом взрослого (Feldman, 2015). Согласно психоаналитическим теориям, родитель постепенно интернализуется как внутренний объект, выполняющий роль саморегуляции (Holmes, Nolte, 2019). На мозговом уровне этому процессу может соответствовать созревание сетей ментализации и эмпатии (Atzil et al., 2018). Многочисленные исследования показали, что сходные с биобихевиоральной синхронией процессы наблюдаются в ходе взаимодействия психотерапевтов и клиентов, включая синхронизацию движений (Ramseyer, Tschacher, 2011), сердечного ритма и дыхания (Tschacher, Meier, 2019), кожно-гальванической реакции (Marcic et al., 2007). Метрики, характеризующие выраженность синхронизации, коррелируют с качеством терапевтического альянса и удовлетворенностью сессиями (Koole, Tschacher, 2016).

На гормональном уровне медиатором системы привязанности является нейропептид окситоцин (Sue, Carter, 1998; Buchheim et al., 2009; Spengler et al., 2017; Терещенко, Смольникова, 2019; Zilcha-Mano et al., 2019). Окситоцин выделяется у матери и ребенка в процессе грудного вскармливания, а также у отцов, берущих на руки младенцев; выделение окситоцина способствует формированию диадных связей, необходимых для физического и психического выживания младенца (Scatliffe et al., 2019). У взрослых уровень окситоцина повышается в процессе романтических отношений и в целом в ходе близких отношений, задействующих систему привязанности (Sue, Carter, 1998; Schneiderman et al., 2012).

Согласно данным нейрофизиологических исследований, окситоцин является мощным ингибитором активности миндалины (амигдалы) (Domes et al., 2007a; Spengler et al., 2017). Активация миндалины ассоциирована с повышенной бдительностью, настороженностью, страхом (LeDoux, 2007). Повышенная реактивность миндалины и гипербдительность наблюдаются при

депрессии и личностных расстройствах (Arntz et al., 2000; Georgiadi et al., 2011; Koole, Tschacher, 2016; Grogans et al., 2022), причем гипербдительность связана с нарушениями процессов ментализации (Fonagy et al., 2017). Экспериментальное введение окситоцина приводит к улучшению понимания ментальных состояний других (Domes et al., 2007b). Люди с небезопасной привязанностью после введения окситоцина начинают реалистичнее воспринимать межличностные ситуации, внося меньше искажений, связанных с доминированием ригидных представлений, основанных на раннем травматическом опыте (Buchheim et al., 2009).

В исследовании S. Zilcha-Mano и соавт. было показано, что в ходе психотерапевтических сессий происходит синхронизация между терапевтом и клиентом по уровню окситоцина и что окситоциновая синхронизация выступает фактором успешного психотерапевтического лечения депрессии (Zilcha-Mano et al., 2021). Окситоциновый ответ терапевта служит медиатором в ассоциации между выраженностью негативных эмоций у пациента и исходами терапии: более сильные негативные эмоции у пациента являются предиктором большего повышения уровня окситоцина у терапевта в ходе сессии, а повышение уровня окситоцина у терапевта, в свою очередь, является предиктором снижения депрессивных симптомов (Fisher et al., 2023).

Концепция предиктивного кодирования и психотерапия

В последнее десятилетие функциональную роль нейросетей ментализации и эмпатии объясняют в рамках концепции предиктивного кодирования, согласно которой головной мозг представляется сложной нейросетевой системой, обеспечивающей точное прогнозирование следующего во времени внешнего и внутреннего состояния (Friston, 2010; Clark, 2013), включая положение тела (Brown et al., 2011), внутреннее состояние организма (Apps, Tsakiris, 2014), ментальные состояния (Fotopoulou, Tsakiris, 2017). В рамках теории конструируемых эмоций L. F. Barrett, эмоции связаны с межличностными предикциями: эмоциональная «реакция» возникает вследствие ожидания того или иного действия от партнера, еще до того, как это действие будет или не будет совершено (Barrett, 2017; Барретт, 2018). Межличностное предиктивное кодирование опирается на сети ментализации и эмпатии (Barrett, Satpute, 2019).



Рис. 4. Предиктивная модель межличностных психических процессов.

Fig. 4. Predictive Model of Interpersonal Processes.

На рис. 4 приведена схема генерации межличностных предикций в режиме «замедленного кадра». В каждый момент времени существует *интегральная оценка состояния* системы (ментальных состояний, характера взаимодействия, контекста и т.д.). На основании *внутренних моделей*, выстроенных в ходе предшествующего опыта, субъект предсказывает, к каким последствиям может привести то или иное действие, выбирает действие и совершает его. В следующий момент времени действие приводит к последствиям, переводя систему в *следующее (реальное) состояние*. Через каналы восприятия субъект получает обратную связь о результатах действия. Поскольку ни одно предсказание не является абсолютно точным, в момент сопоставления полученной *сенсорной информации* и предсказания возникает неизбежный конфликт оценок — *ошибка предикции*. Данный конфликт является центральной темой предиктивных моделей (Friston, 2010). Принципиально возможно выделить два пути обработки ошибки предикции: усовершенствование внутренних моделей (восходящий путь встраивания нового опыта) и фильтрация входящей сенсорной информации (нисходящий путь ориентации в восприятии на внутренние модели).

Яркой иллюстрацией систематического задерживания нисходящего пути обработки ошибки предикции являются личностные расстройства: ригидные модели (схемы), закрепив-

шиеся в ходе раннего опыта, определяют дальнейшее межличностное восприятие, системно искажая его (Bach et al., 2018; Herzog et al., 2022). В этом контексте интересно обратиться к данным исследований предиктивного кодирования моторных актов. Научной группой К. Friston было продемонстрировано, что действие не является реакцией на внешнюю ситуацию — оно исходит из предсказанного будущего и направлено на то, чтобы привести реальность в соответствие с предсказанием (Brown et al., 2011). В случае моторного акта движение направлено на то, чтобы путем сокращения мышц создать следующий предсказанный паттерн проприоцептивных ощущений. По аналогии, в случае общения коммуникативное действие может выстраиваться так, чтобы создать предсказанные чувства у себя и партнера.

Связь нарушений предиктивного кодирования с психопатологией была подтверждена рядом нейрофизиологических исследований, преимущественно с использованием метода вызванных потенциалов. Так, при депрессии и при пограничном расстройстве личности наблюдается снижение вызванного потенциала негативности результата действия (*feedback-related negativity*), что может отражать трудности обработки получаемой из внешней среды обратной связи (Vega et al., 2013; Keren et al., 2018). При депрессии также наблюдается снижение амплитуды связан-

ной с наградой позитивности (reward positivity) (Proudfit et al., 2015) и негативности рассогласования при предъявлении девиантных стимулов в виде счастливых лиц на фоне стандартных стимулов в виде нейтральных лиц (Wu et al., 2017). Феномен негативности рассогласования отражает детекцию ошибки предикции, и его снижение в ответ на счастливые лица может соответствовать типичной для депрессии нисходящей фильтрации позитивной информации. В ходе клинических исследований было показано, что психотерапия может приводить к коррекции типичных для депрессии нарушений в механизмах предиктивного кодирования, что отражается в появлении негативности рассогласования в ответ на предъявление девиантных стимулов в виде счастливых лиц (Vanhatalo, 2009), а также в усилении связанной с наградой позитивности (Burkhouse et al., 2018). В то же время имеются и менее обнадеживающие данные, указывающие на то, что нарушения в системе предиктивного кодирования в виде невосприимчивости к обратной связи являются предиктором неэффективности когнитивно-поведенческой терапии (Burkhouse et al., 2016; Queirazza et al., 2019).

В связи с трудностями преодоления дисфункциональных предиктивных моделей представляет интерес поиск механизмов, влияющих на задействование восходящего либо нисходящего пути обработки ошибки предикции. С этой целью уместно обратиться к функциональным нейровизуализационным исследованиям. Недавнее исследование N. Dijkstra и S. Fleming посвящено механизмам различения образов, сгенерированных в воображении (нисходящий путь) и представленных в реальном стимульном материале (восходящий путь) в ходе восприятия высокозашумленных изображений (Dijkstra, Fleming, 2023). Функциональная нейровизуализация показала, что четкость воображаемого и реального изображений коррелирует с активацией одних и тех же мозговых зон, однако критической отличительной чертой образов, исходящих из реальности, является более выраженная активация первичной зрительной коры. Сходный эффект эмпирически используется в психотерапии: клиентам рекомендуют фокусировать внимание на элементарных сенсорных характеристиках стимулов из текущей реальности (grounding), а также использовать сильные сенсорные стимулы, такие как расплавляемый на ладони лед, для того чтобы противостоять негативным эмоциональным переживаниям, связанным с реактивацией прошлого травматического опыта на фоне триг-

герных событий (Линехан, 2020; Williston et al., 2021).

Другие нейровизуализационные исследования указывают на роль миндалины в обработке ошибки предикции. На модели соматоперцепции было показано, что нисходящий путь обработки ошибки предикции ассоциирован с функциональной связностью миндалины с роstralной префронтальной корой (Dobrushina et al., 2021). При исследовании матерей с дисфункциональным, излишне вторгающимся стилем родительства было обнаружено, что просмотр видео с собственным младенцем сопровождается у них избыточной активацией миндалины, причем миндалина оказывается функционально связана с зонами мозга, обеспечивающими направленные вовне действия (Atzil et al., 2011). Такого рода стремление корректировать поведение младенца может соответствовать динамике приведения реальности в соответствие с ожиданиями, т.е. нисходящему пути обработки ошибки предикции. У матерей, демонстрирующих адаптивную биобиохевиоральную синхронию с младенцем, в отличие от излишне вторгающихся матерей, активация миндалины в ходе просмотра видео с собственным младенцем коррелирует с уровнем окситоцина (Atzil et al., 2011, 2012). Учитывая, что окситоцин является ингибитором амигдаларной активности (Domes et al., 2007a; Spengler et al., 2017), его выделение может способствовать более принимающему, открытому стилю межличностного восприятия, соответствующему восходящему пути обработки ошибки предикции.

Приведенные исследования указывают на возможный механизм переключения пути обработки ошибки предикции. Мы предполагаем, что формирование терапевтических отношений, задействующих систему привязанности и окситоцин, может сопровождаться снижением амигдаларной активации и возникновением на нейросетевом уровне условий для перестройки предиктивных моделей, лежащих в основе регуляции восприятия и поведения. Это предположение согласуется с клиническими данными, свидетельствующими об эффективности видов психотерапии, уделяющих особое внимание терапевтическим отношениям (психодинамическая терапия, схема-терапия, диалектическая поведенческая терапия), в лечении личностных расстройств (Jacob, Arntz, 2013; Stoffers-Winterling et al., 2022). Более того, в ходе успешной психотерапии личностных расстройств

наблюдается снижение гипербдительности (Sieswerda et al., 2007) и амигдаллярной активности (Iskric, Barkley-Levenson, 2021), что косвенно указывает на возможность задействования восходящего пути обработки ошибки предикции.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В статье представлено нейронаучное видение психотерапевтических процессов, основанное на междисциплинарной интеграции концепций. В качестве мозговых коррелятов терапевтических изменений предлагается рассматривать функциональную перестройку нейросетей ментализации и эмпатии. Возможными механизмами этой перестройки являются усиление роли высокоуровневой регуляции возбуждения, модуляция системы окситоцина и оптимизация механизмов предиктивного кодирования в условиях психотерапевтических отношений. Выполненная интеграция нейронаучных и психотерапевтических концепций призвана способствовать развитию исследований на стыке областей, что может привести как к обогащению представлений о мозговых основах межличностных процессов, так и к разработке новых психотерапевтических методов с опорой на нейронаучные данные.

ЛИТЕРАТУРА

- Барретт Л. Ф. Как рождаются эмоции. М.: Манн, Иванов и Фербер, 2018.
- Гаврон А. А., Araujo Y. I. D., Шарова Е. В., Смирнов А. С., Князев Г. Г., Челябинна М. В., Фадеева Л. М., Абдулаев А. А., Куликов М. А., Жаворонкова Л. А., Болдырева Г. Н., Верхлютов В. М., Пронин И. Н. Групповой и индивидуальный фМРТ-анализ основных сетей покоя здоровых испытуемых. Журнал высшей нервной деятельности им. И. П. Павлова. 2019. 69 (2): 150–163.
- Добрушина О. Р., Добрынина Л. А., Арина Г. А., Кремнева Е. И., Суслина А. Д., Губанова М. В., Белопасова А. В., Солодчик П. О., Уразильдеева Г. Р., Кротенкова М. В. Взаимосвязь interoцептивного восприятия и эмоционального интеллекта: функциональное нейровизуализационное исследование. Журнал высшей нервной деятельности им. И. П. Павлова. 2020. 70 (2): 206–216.
- Иосифян М. А., Мершина Е. А., Баженова Д. А., Синицын В. Е., Ларина О. М., Печенкова Е. В. Мозговые механизмы нарушения модели психического при расстройствах аутистического спектра и шизофрении: обзор данных фМРТ. Клиническая и специальная психология. 2020. 9 (1): 17–46.
- Калмыкова Е. С., Кэхеле Х. Психотерапия за рубежом: история и современное состояние (краткий обзор). Психологический журнал. 2000. 21 (2): 88–99.
- Каплан-Солмз К., Солмз М. Клинические исследования в нейропсихоанализе. Введение в глубинную нейропсихологию. М.: Академический проект, 2017.
- Князев Г. Г. Смена парадигмы в когнитивных науках? Журнал высшей нервной деятельности им. И. П. Павлова. 2023. 73 (1): 102–123.
- Князев Г. Г., Бочаров А. В., Савостьянов А. Н., Левин Е. А., Рудыч П. Д. Анализ активности мозга по данным функциональной мрт при эмоциональной оценке себя и других людей. Журнал высшей нервной деятельности им. И. П. Павлова. 2020. 70 (1): 31–39.
- Кремлева О. В. Нейронауки и эпигенетика в обосновании биологических механизмов и эффектов психотерапии: краткий обзор. Вестник УГМУ. 2021. 52 (1): 83–6.
- Кремнева Е. И., Синицын Д. О., Добрынина Л. А., Суслина А. Д., Кротенкова М. В. Функциональная МРТ покоя в неврологии и психиатрии. Журнал неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова. 2022. 122 (2): 5.
- Линехан М. Когнитивно-поведенческая терапия пограничного расстройства личности. М.: Вильямс, 2020.
- Линехан М. Диалектическая поведенческая терапия: руководство по тренингу навыков. М.: Диалектика (Вильямс); 2020.
- Марченкова М. В. Очерк о развитии психотерапии в России. Консультативная психология и психотерапия. 2012. 72 (1): 169–182.
- Можасева Е. В фокусе — эмпатия. Консультативная психология и психотерапия. 2017. 25 (2): 175–87.
- Николаева В. В., Арина Г. А. Клинико-психологические проблемы психологии телесности. Психологический журнал. 2003. 24 (1): 119–126.
- Пирадов М. А., Танащян М. М., Кротенкова М. В., Брюхов В. В., Кремнева Е. И., Коновалов Р. Н. Передовые технологии нейровизуализации. Анналы клинической и экспериментальной неврологии. 2015. 9 (4): 11–18.
- Пуговкина О. Д., Никитина И. В., Холмогорова А. Б., Гараян Н. Г. Научные исследования процесса психотерапии и ее эффективности: история проблемы. Московский психотерапевтический журнал. 2009. 60 (1): 35–68.
- Рёдигер Э., Стивенс Б. А., Брокман Р. Контекстуальная схематерапия. Интегративный подход к расстройствам личности, межличностных отношений и эмоциональной регуляции. М.: Научный мир, 2021.
- Терещенко С. Ю., Смольникова М. В. Окситоцин — нейрогормон доверия и эмоциональной привязанности: влияние на поведение у детей и подростков. Журнал неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова. 2019. 119 (12): 148.
- Тукаев Р. Д. Доказательные исследования эффективности психотерапии: тренды и результаты. Психиатрия, психотерапия и клиническая психология. 2022. Nov 21. 13 (3): 332–343.
- Тхостов А. Ш. Психология телесности. М.: Смысл, 2002.
- Хейс С. С., Уилсон К. Г., Штроталь К. Д. Терапия принятия и ответственности. Процессы и практика осознанных изменений. М.: Вильямс, 2021.
- Холмогорова А. Б., Гараян Н. Г., Никитина И. В., Пуговкина О. Д. Научные исследования процесса психотерапии и ее эффективности: современное состояние проблемы. Часть 2. Социальная и клиниче-

- ская психиатрия. 2010. 20 (1): 70–79.
- Эйдемиллер Э. Г., Тарабанов А. Э. Современный нейропсихоанализ как интегративная научная и терапевтическая практика. Консультативная психология и психотерапия. 2019. 27 (1): 64–78.
- Amiri S., Mirfazeli F. S., Grafman J., Mohammadsadeghi H., Eftekhar M., Karimzad N., Mohebbi M., Nohesara S. Alternation in functional connectivity within default mode network after psychodynamic psychotherapy in borderline personality disorder. *Ann Gen Psychiatry*. 2023. 22 (1): 1–12.
- Apps M. A. J., Tsakiris M. The free-energy self: A predictive coding account of self-recognition. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 2014. 41: 85–97.
- Arntz A., Appels C., Sieswerda S. Hypervigilance in Borderline Disorder: A Test with the Emotional Stroop Paradigm. *J Pers Disord*. 2000. 14 (4): 366–373.
- Atzil S., Gao W., Fradkin I., Barrett L. F. Growing a social brain. *Nat Hum Behav*. 2018. 2 (9): 624–636.
- Atzil S., Hendler T., Feldman R. Specifying the Neurobiological Basis of Human Attachment: Brain, Hormones, and Behavior in Synchronous and Intrusive Mothers. *Neuropsychopharmacology*. 2011. 36(13): 2603–2615.
- Atzil S., Hendler T., Zagoory-Sharon O., Winetraub Y., Feldman R. Synchrony and Specificity in the Maternal and the Paternal Brain: Relations to Oxytocin and Vasopressin. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2012. 51(8): 798–811.
- Bach B., Lockwood G., Young J. E. A new look at the schema therapy model: organization and role of early maladaptive schemas. *Cogn Behav Ther*. 2018. 47 (4): 328–349.
- Baldi E., Bucherelli C. The Inverted “U-Shaped” Dose-Effect Relationships in Learning and Memory: Modulation of Arousal and Consolidation. *Nonlinearity Biol Toxicol Med*. 2005. 3(1): 9.
- Barrett L. F. The theory of constructed emotion: an active inference account of interoception and categorization. *Soc Cogn Affect Neurosci*. 2017. 12 (1): 1–23.
- Barrett L. F., Satpute A. B. Historical pitfalls and new directions in the neuroscience of emotion. *Neuroscience Letters*. 2019. 693: 9–18.
- Beeson E. T., Field T. A. Neurocounseling: A New Section of the Journal of Mental Health Counseling. *J Ment Heal Couns*. 2017. 39 (1): 71–83.
- Brown H., Friston K., Bestmann S. Active Inference, Attention, and Motor Preparation. *Front Psychol*. 2011. 2.
- Buchheim A., Heinrichs M., George C., Pokorny D., Koops E., Henningsen P., O’Conno, M., Gündel H. Oxytocin enhances the experience of attachment security. *Psycho neuro-endocrinology*. 2009. 34 (9): 1417–1422.
- Burkhouse K. L., Gorka S. M., Klumpp H., Kennedy A. E., Karich S., Francis J., Ajilore O., Craske M. G., Langenecker S. A., Shankman S. A., Hajcak G., Phan K. L. Neural Responsiveness to Reward as an Index of Depressive Symptom Change Following Cognitive-Behavioral Therapy and SSRI Treatment. *J Clin Psychiatry*. 2018. 79(4): 17m11836.
- Burkhouse K. L., Kujawa A., Kennedy A. E., Shankman S. A., Langenecker S. A., Phan K. L., Klumpp H. Neural reactivity to reward as a predictor of cognitive behavioral therapy response in anxiety and depression. *Depress Anxiety*. 2016. 33(4): 281–288.
- Cannon W. B. The James-Lange Theory of Emotions: A Critical Examination and an Alternative Theory. *Am J Psychol*. 1927. 39 (1/4): 106.
- Cera N., Monteiro J., Esposito R., Di Francesco G., Cordes D., Caldwell J., Cieri F. Neural correlates of psychodynamic and non-psychodynamic therapies in different clinical populations through fMRI: A meta-analysis and systematic review. *Front Hum Neurosci*. 2022. 16: 848.
- Clark A. Whatever next? Predictive brains, situated agents, and the future of cognitive science. *Behav Brain Sci*. 2013. 36 (3): 181–204.
- Cozolino L. The neuroscience of psychotherapy: Healing the social brain. New York: WW Norton & Co. 2017.
- Dijkstra N., Fleming S. M. Subjective signal strength distinguishes reality from imagination. *Nat Commun*. 2023. 14(1): 1–11.
- Dobrushina O. R., Arina G. A., Dobrynina L. A., Novikova E. S., Gubanova M. V., Belopasova A. V., Vorobeva V. P., Suslina A. D., Pechenkova E. V., Perepelkina O. S., Kremneva E. I., Krotchenkova M. V. Sensory integration in interoception: Interplay between top-down and bottom-up processing. *Cortex*. 2021. 144: 185–197.
- Domes G., Heinrichs M., Gläscher J., Büchel C., Braus D. F., Herpertz S. C. Oxytocin Attenuates Amygdala Responses to Emotional Faces Regardless of Valence. *Biol Psychiatry*. 2007a. 62 (10): 1187–90.
- Domes G., Heinrichs M., Michel A., Berger C., Herpertz S. C. Oxytocin Improves “Mind-Reading” in Humans. *Biol Psychiatry*. 2007b. 61 (6): 731–733.
- Dunlop B. W., Cha J., Choi K. S., Rajendra J. K., Nemiroff C. B., Craighead W. E., Mayberg H. S. Shared and Unique Changes in Brain Connectivity Among Depressed Patients After Remission With Pharmacotherapy Versus Psychotherapy. 2023. 180 (3): 218–229.
- Fan Y., Duncan N. W., de Greck M., Northoff G. Is there a core neural network in empathy? An fMRI based quantitative meta-analysis. Vol. 35, *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. Pergamon. 2011. p. 903–911.
- Feldman R. The adaptive human parental brain: implications for children’s social development. *Trends Neurosci*. 2015. 38 (6): 387–399.
- Fisher H., Solomonov N., Falkenström F., Shahar B., Shamay-Tsoory S., Zilcha-Mano S. Therapists’ oxytocin response mediates the association between patients’ negative emotions and psychotherapy outcomes. *J Affect Disord*. 2023. 338: 163–170.
- Fonagy P., Gergely G., Jurist E. L., Target M. Affect Regulation, Mentalization, and the Development of the Self. Fonagy P, Gergely G, Jurist EL, editors. Routledge, 2018.
- Fonagy P., Luyten P., Allison E., Campbell C. What we have changed our minds about: Part 2. Borderline personality disorder, epistemic trust and the developmental significance of social communication. *Borderline Personal Disord Emot Dysregulation*. 2017. 4(1): 1–12.
- Fonagy P., Target M. The Mentalization-Focused Approach to Self Pathology. *J Pers Disord*. 2006. 20 (6): 544–576.
- Fotopoulou A., Tsakiris M. Mentalizing homeostasis: The social origins of interoceptive inference. *Neuropsychology*. 2017. 19 (1): 3–28.

- Friston K. The free-energy principle: a unified brain theory? *Nat Rev Neurosci.* 2010. 11 (2): 127–138.
- Gallos I. K., Mantonakis L., Spilioti E., Kattoulas E., Savvidou E., Anyfandi E., Karavasilis E., Kelekis N., Smyrnis N., Siettos C. I. The relation of integrated psychological therapy to resting state functional brain connectivity networks in patients with schizophrenia. *Psychiatry Res.* 2021. 306: 114270.
- Gao W., Alcauter S., Smith J. K., Gilmore J. H., Lin W. Development of human brain cortical network architecture during infancy. *Brain Struct Funct.* 2015. 220 (2): 1173–86.
- Georgiadi E., Liotti M., Nixon N. L., Liddle P. F. Electrophysiological evidence for abnormal error monitoring in recurrent major depressive disorder. *Psychophysiology.* 2011. 48(9): 1192–1202.
- Gonçalves Ó. F., Perrone-McGovern K. M. A neuroscience agenda for counseling psychology research. *J Couns Psychol.* 2014. 61 (4): 507–512.
- Goss D. Integrating neuroscience into counseling psychology: A systematic review of current literature. *Couns Psychol.* 2016. 44 (6): 895–920.
- Grogans S. E., Fox A. S., Shackman A. J. The Amygdala and Depression: A Sober Reconsideration. *Am J Psychiatry.* 2022. 179(7): 454–457.
- Herpertz S. C., Schneider I., Schmahl C., Bertsch K. Neurobiological Mechanisms Mediating Emotion Dysregulation as Targets of Change in Borderline Personality Disorder. *Psychopathology.* 2018. 51 (2): 96–104.
- Herzog P., Kube T., Fassbinder E. How childhood maltreatment alters perception and cognition – the predictive processing account of borderline personality disorder. *Psychol Med.* 2022. 52(14): 2899–2916.
- Hohwy J., Roepstorff A., Friston K. Predictive coding explains binocular rivalry: An epistemological review. *Cognition.* 2008. 108 (3): 687–701.
- Holmes J., Nolte T. “Surprise” and the Bayesian brain: Implications for psychotherapy theory and practice. *Front Psychol.* 2019. 10.
- Iskric A., Barkley-Levenson E. Neural Changes in Borderline Personality Disorder After Dialectical Behavior Therapy—A Review. *Front Psychiatry.* 2021. 12.
- Jacob G. A., Arntz A. Schema Therapy for Personality Disorders – A Review. *Int J Cogn Ther.* 2013. 6 (2): 171–85.
- James W., Burkhardt F., Bowers F., Skrupskelis I. K. The principles of psychology. Harvard University Press. 1981.
- Javanbakht A., Alberini C. M. Editorial: Neurobiological Models of Psychotherapy. *Front Behav Neurosci.* 2019. 13: 144.
- Jurist E. L. Minding emotions: cultivating mentalization in psychotherapy. New York: The Guilford Press. 2018.
- Kalsi N., Altavilla D., Tambelli R., Aceto P., Trentini C., Di Giorgio C., Lai C. Neural Correlates of Outcome of the Psychotherapy Compared to Antidepressant Therapy in Anxiety and Depression Disorders: A Meta-Analysis. *Front Psychol.* 2017. 13: 1988.
- Keren H., O’Callaghan G., Vidal-Ribas P., Buzzell G. A., Brotman M. A., Leibenluft E., Pan P. M., Meffert L. K., Ariela W. S., Pine D. S., Stringaris A. Reward Processing in Depression: A Conceptual and Meta-Analytic Review Across fMRI and EEG Studies. *Am J Psychiatry.* 2018. 175(11): 1111–1120.
- Koole S. L., Tschacher W. Synchrony in psychotherapy: A review and an integrative framework for the therapeutic alliance. *Front Psychol.* 2016 Jun 14; 7:862.
- LeDoux J. The amygdala. *Curr Biol.* 2007 Oct. 17 (20): R868–74.
- Lombardo M. V., Chakrabarti B., Bullmore E. T., Wheelwright S. J., Sadek S. A., Suckling J., Baron-Cohen S. Shared Neural Circuits for Mentalizing about the Self and Others. *J Cogn Neurosci.* 2010. 22 (7): 1623–1635.
- Marci C. D., Ham J., Moran E., Orr S. P. Physiologic Correlates of Perceived Therapist Empathy and Social-Emotional Process During Psychotherapy. *J Nerv Ment Dis.* 2007. 195(2): 103–111.
- Marwood L., Wise T., Perkins A. M., Cleare A. J. Meta-analyses of the neural mechanisms and predictors of response to psychotherapy in depression and anxiety. *Neurosci Biobehav Rev.* 2018. 95: 61–72.
- Mayer L. C. A developmental perspective on the regulation of arousal states. *Semin Perinatol.* 2000. 24 (4): 267–279.
- Messina I., Sambin M., Palmieri A., Viviani R. Neural Correlates of Psychotherapy in Anxiety and Depression: A Meta-Analysis. *PLoS One.* 2013. 8 (9): e74657.
- Nolte T., Bolling D. Z., Hudac C. M., Fonagy P., Mayes L., Pélphrey K. A. Brain mechanisms underlying the impact of attachment-related stress on social cognition. *Front Hum Neurosci.* 2013. 7.
- Proudfit G. H., Bress J. N., Foti D., Kujawa A., Klein D. N. Depression and event-related potentials: emotional disengagement and reward insensitivity. *Curr Opin Psychol.* 2015. 4: 110–113.
- Queirazza F., Fouragnan E., Steele J. D., Cavanagh J., Philia-stides M. G. Neural correlates of weighted reward prediction error during reinforcement learning classify response to cognitive behavioral therapy in depression. *Sci Adv.* 2019. 5(7).
- Ramseyer F., Tschacher W. Nonverbal synchrony in psychotherapy: Coordinated body movement reflects relationship quality and outcome. *J Consult Clin Psychol.* 2011. 79(3): 284–295.
- Rao R. P. N., Ballard D. H. Predictive coding in the visual cortex: a functional interpretation of some extra-classical receptive-field effects. *Nat Neurosci.* 1999. (1): 79–87.
- Scatliffe N., Casavant S., Vittner D., Cong X. Oxytocin and early parent-infant interactions: A systematic review. *Int J Nurs Sci.* 2019. 6 (4): 445–453.
- Schneiderman I., Zagoory-Sharon O., Leckman J. F., Feldman R. Oxytocin during the initial stages of romantic attachment: Relations to couples’ interactive reciprocity. *Psychoneuroendocrinology.* 2012. 37 (8): 1277–1285.
- Schrammen E., Roesmann K., Rosenbaum D., Redlich R., Harenbrock J., Dannlowski U., Leehr E. J. Functional neural changes associated with psychotherapy in anxiety disorders—A meta-analysis of longitudinal fMRI studies. *Neurosci Biobehav Rev.* 2022. 142.
- Schurz M., Radua J., Aichhorn M., Richlan F., Perner J. Fractionating theory of mind: A meta-analysis of functional brain imaging studies. Vol. 42, *Neuroscience and Biobehavioral Reviews.* Elsevier Ltd. 2014. p. 9–34.

- Sieswerda S., Arntz A., Kindt M. Successful Psychotherapy Reduces Hypervigilance in Borderline Personality Disorder. *Behav Cogn Psychother*. 2007. 35 (4): 387–402.
- Spengler F. B., Schultz J., Scheele D., Essel M., Maier W., Heinrichs M., Hurlmann R. Kinetics and Dose Dependency of Intranasal Oxytocin Effects on Amygdala Reactivity. *Biol Psychiatry*. 2017. 82 (12): 885–894.
- Stoffers-Winterling J. M., Storebø O. J., Kongerslev M. T., Faltinsen E., Todorovac A., Sedoc J. M., Sales C. P., Edemann C. H., Pereira R. J., Völlm B. A., Lieb K., Simonsen E. Psychotherapies for borderline personality disorder: a focused systematic review and meta-analysis. *Br J Psychiatry*. 2022. 221 (3): 538–552.
- Straub J., Metzger C. D., Plener P. L., Koelch M. G., Groen G., Abler B. Successful group psychotherapy of depression in adolescents alters fronto-limbic resting-state connectivity. *J Affect Disord*. 2017. 209: 135–139.
- Sue C. C. Neuroendocrine perspectives on social attachment and love. *Psychoneuroendocrinology*. 1998. 23 (8): 779–818.
- Tholen M. G., Trautwein F., Böckler A., Singer T., Kanske P. Functional magnetic resonance imaging (fMRI) item analysis of empathy and theory of mind. *Hum Brain Mapp*. 2020. 41 (10): 2611–2628.
- Tschacher W., Meier D. Physiological synchrony in psychotherapy sessions. *Psychotherapy Research*. 2019. 30(5): 558–573.
- Vanhatalo H. Brief psychological intervention for depression: an ERP study. University of Jyväskylä; 2009.
- Vega D., Soto A., Amengual J. L., Ribas J., Torrubia R., Rodríguez-Fornells A., Josep Marco-Pallarés. Negative reward expectations in Borderline Personality Disorder patients: Neurophysiological evidence. *Biol Psychol*. 2013. 94(2): 388–396.
- Williston S. K., Grossman D., Mori D. L., Niles B. L. Mindfulness interventions in the treatment of posttraumatic stress disorder. *Prof Psychol Res Pract*. 2021. 52(1): 46–57.
- Wu Z., Zhong X., Peng Q., Chen B., Mai N., Ning Y. Negative bias in expression-related mismatch negativity (MMN) in remitted late-life depression: An event-related potential study. *J Psychiatr Res*. 2017. 95: 224–230.
- Yarkoni T., Poldrack R. A., Nichols T. E., Essen D. C. V., Wager T. D. NeuroSynth: a new platform for large-scale automated synthesis of human functional neuroimaging data. *Front Neuroinform*. 2011. 5.
- Yerkes R. M., Dodson J. D. The relation of strength of stimulus to rapidity of habit-formation. *J Comp Neurol Psychol*. 1908. 18(5): 459–482.
- Young C. B., Raz G., Everaerd D., Beckmann C. F., Tendolkar I., Hendler T., Fernández G. H., Erno J. Dynamic Shifts in Large-Scale Brain Network Balance as a Function of Arousal. *J Neurosci*. 2017. 37(2): 281–290.
- Yuan S., Wu H., Wu Y., Xu H., Yu J., Zhong Y., Zhang N., Li J., Xu Q., Wang C. Neural Effects of Cognitive Behavioral Therapy in Psychiatric Disorders: A Systematic Review and Activation Likelihood Estimation Meta-Analysis. *Front Psychol*. 2022. 13: 1988.
- Zaki J., Davis J. I., Ochsner K. N. Overlapping activity in anterior insula during interoception and emotional experience. *Neuroimage*. 2012. 62 (1): 493–499.
- Zilcha-Mano S., Goldstein P., Dolev-Amit T., Shamay-Tsoory S. Oxytocin synchrony between patients and therapists as a mechanism underlying effective psychotherapy for depression. *J Consult Clin Psychol*. 2021. 89(1): 49–57.
- Zilcha-Mano S., Roose S. P., Brown P. J., Rutherford B. R. Not Just Nonspecific Factors: The Roles of Alliance and Expectancy in Treatment, and Their Neurobiological Underpinnings. *Front Behav Neurosci*. 2019. 12.

CONTEMPORARY NEUROSCIENTIFIC CONCEPTS AND PSYCHOTHERAPY: POSSIBILITIES FOR INTEGRATION

O. R. Dobrushina[#]

Research Center of Neurology, Moscow, Russia

[#]e-mail: dobrushina@neurology.ru

The article presents a review and analysis of literature aimed at grounding psychotherapy within the context of contemporary neuroscientific concepts. It is suggested that on the neural level psychotherapy is associated with changes in the mentalizing and empathy networks' connectivity. Several mechanisms underlying these changes are proposed: enhancement of the prefrontal system's role in arousal regulation, oxytocin-related modulation of the attachment system, and optimization of predictive coding of interpersonal perception, including the prediction error processing pathway. The hypotheses are supported by studies in social, cognitive, affective and behavioral neuroscience, research in the field of psychotherapy, and neuroimaging data on the effects of psychotherapy.

Keywords: psychotherapy, fMRI, resting-state networks, brain functional connectivity, mentalizing, empathy, predictive coding, oxytocin

ВЛИЯНИЕ РАДИОТЕРАПИИ НА КОННЕКТИВНОСТЬ СЕТИ УПРАВЛЯЮЩИХ ФУНКЦИЙ ФМРТ У ПАЦИЕНТОВ С ЛАТЕРАЛИЗОВАННЫМ ПОРАЖЕНИЕМ МЕДИОБАЗАЛЬНЫХ ОТДЕЛОВ ВИСОЧНОЙ ДОЛИ

© 2024 г. Е. В. Шарова^{1,*}, А. Ю. Кулева¹, Ю. В. Струнина², М. Ю. Ярец¹, М. В. Галкин²,
А. С. Смирнов², О. А. Кроткова²

¹ФГБУН «Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН», Москва, Россия

²ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр нейрохирургии имени академика Н. Н. Бурденко»
Минздрава России, Москва, Россия

*e-mail: esharova@nsi.ru

Поступила в редакцию 02.08.2023 г.

После доработки 12.08.2023 г.

Принята к публикации 31.08.2023 г.

Аннотация. Согласно литературе, радиотерапия (РТ), применяемая при опухолевом поражении головного мозга, наряду с позитивным эффектом, может сопровождаться негативными последствиями в форме развития нейрокогнитивного дефицита вследствие побочного воздействия облучения на критические структуры мозга. Вместе с тем есть указания на возможную модуляцию нейрогенеза гиппокампа с последующей активацией ряда когнитивных функций.

Важным компонентом когнитивной активности человека являются так называемые управляющие функции (УФ; executive functions), включающие инициацию, планирование, регуляцию и контроль любой целенаправленной деятельности. Их структурно-функциональное обеспечение связывают в настоящее время с префронтальными и теменными отделами полушарий, а также образованиями нижней височной коры и гиппокампа. Работа направлена на динамическую оценку состояния сети УФ по данным анализа коннективности фМРТ покоя до и через 6 мес после РТ.

В динамике обследованы 14 пациентов с латерализованным опухолевым поражением медиобазальных отделов височной доли: 7 – с левосторонним, 7 – с правосторонним. Контрольную группу составили 9 здоровых испытуемых. У каждого проводили фМРТ в состоянии покоя – с дальнейшим анализом функциональной коннективности между заданными областями интереса, соответствующими по топографии сети УФ. Результаты сопоставляли с данными МРТ-морфометрии опухоли. Показано, что у пациентов через 6 месяцев после проведенной РТ, на фоне уменьшения объема или стабилизации роста опухоли, функциональные эффекты неоднозначны и зависят от латерализации поражения: при правостороннем имеют тенденцию к нормализации, тогда как при левостороннем повреждении нарастают.

Ключевые слова: фМРТ, коннективность, состояние покоя, радиотерапия, управляющие функции, медиобазальные отделы височной доли.

DOI: 10.31857/S0044467724010021

В настоящее время эффективным способом лечения церебральных опухолей, при невозможности хирургической резекции, является радиотерапия (РТ). Показано, что РТ и тотальное удаление опухоли обеспечивают сопоставимый контроль роста новообразования – порядка 80–90% (Day et al., 2017; Apra et al., 2018).

Наряду с лечебным эффектом РТ, значительный интерес представляет оценка влияния этого воздействия на системную деятельность головного мозга. С одной стороны, имеются данные литературы о возможной модуляции нейрогенеза гиппокампа, как одной из веро-

ятных косвенных мишеней подобного воздействия облучения, с последующей активацией некоторых когнитивных функций (показано на животных моделях (Полетаева и др., 2019; Чичёва и др., 2020)). С другой стороны, вероятным эффектом РТ может быть развитие нейрокогнитивного дефицита у больных после лечения (Kazda et al., 2014; Rogers et al., 2015). Имеются также данные о том, что изменения памяти, внимания, различных видов сенсомоторной деятельности человека в результате чрезмерного ионизирующего облучения могут отражать быструю истощаемость нервной системы и свидетельствовать о снижении резервных возмож-

ностей больных (Metlyeva et al., 2016). Согласно литературе, выявляемый при облучении когнитивный дефицит и прогрессирующий психоорганический синдром могут быть следствием наибольшей “чувствительности” к ионизирующему излучению филогенетически молодых структур головного мозга: коры лобных и височных долей, а также лимбико-ретикулярного комплекса, в том числе структур гиппокампового круга (Holodova et al., 2005).

В качестве информативного показателя когнитивной активности головного мозга в норме и при церебральной патологии может выступать оценка состояния так называемых управляющих функций (УФ), под которыми понимается совокупность процессов формирования и удержания программы деятельности, регуляции поведения, формирования мотивации, серийная организация движений и действий, переключаемость, а также рабочая память (Miyake et al., 2000; Diamond, 2013; Elliott, 2003; Голдберг, 2003; Ахутина, Меликян, 2012). Иными словами – инициация, планирование, регуляция и контроль любой целенаправ-

ленной деятельности. Традиционно реализацию УФ связывали с активностью префронтальных отделов мозга (Лурия, 1969; 1970; Pribram, 1973). Позднее было выявлено участие в их реализации теменных корковых областей (Petersen, Posner, 2012; Мачинская, 2015; Ярец и др., 2018). Кроме того, в ряде работ обосновывается причастность к системе УФ нижней височной коры (Mishkin et al., 1983; Tonegawa et al., 2018) и гиппокампа (Иваницкий, 1997; Kovner et al., 2019). Значимость последних из указанных структур и их латерализационные особенности в обеспечении УФ требуют уточнения.

В нашей предыдущей работе была исследована структурно-функциональная организация сети УФ у пациентов с латерализованным опухолевым повреждением медиальных отделов височной доли (в сравнении со здоровыми людьми) до курса терапевтической радиотерапии. Оценка ее состояния была основана на анализе пространственной организации, а также количественных характеристик функциональных связей фМРТ и ЭЭГ между заданными локусами

Таблица 1. Индивидуальные и групповые показатели морфометрии
Table 1. Individual and group morphometric indicators

Пациент	Латерализация опухоли	Объем опухоли (в см ³)		Групповые показатели (М ± σ)	
		до РТ	через 6 мес. после РТ	до РТ	через 6 мес. после РТ
№1	справа	22.7	21.5	21.6 ± 9.1	20.6 ± 9.1
№2	справа	42.7	42.5		
№3	справа	20.3	18.1		
№4	справа	25.2	24.4		
№5	справа	13.6	13.2		
№6	справа	13.4	13.3		
№7	справа	19.1	18.5		
№8	справа	13.9	13.7		
№9	справа	23.2	20.0		
№11	слева	26.0	25.1	23.2 ± 12.3	22.6 ± 12.2
№12	слева	18.2	16.8		
№13	слева	16.8	16.7		
№14	слева	22.3	22.1		
№15	слева	26.4	25.4		
№16	слева	13.6	13.1		
№17	слева	19.8	19.4		
№18	слева	53.8	52.9		
№19	слева	8.2	7.6		
№20	слева	27.1	26.8		

Примечание. М – среднее арифметическое, σ – стандартное отклонение
Note: M – average σ – standard deviation

системы УФ в состоянии покоя (Кулева и др., 2022). Выявлены общие для всех пациентов нарушения коннективностей сети УФ: ослабление межполушарных связей и уменьшение числа значимых межструктурных взаимодействий по сравнению с группой нормы. Наряду с этим был отмечен ряд топографических особенностей сетевой организации функциональных связей, сопряженных с латерализацией височного повреждения. Они согласовывались с данными нейropsychологического тестирования (опросника Resting State Questionnaire (Delamillieure et al., 2010) и методики зрительного запоминания (Кроткова и др., 2018)), преобладая при левосторонней локализации опухоли.

Задача данной работы заключалась в оценке динамики состояния сети УФ по данным анализа коннективности фМРТ покоя у пациентов с опухолевым поражением медиобазальных отделов правого и левого полушарий до и через 6 мес после РТ.

МЕТОДИКА

Основную группу наблюдения составили пациенты с односторонней менингиомой области кавернозного синуса, расположенной в медиобазальных отделах мозга в непосредственной близости к височной доле правого или левого полушария. Менингиома — это внутримозговая опухоль, произрастающая из мозговых оболочек; заключение о ее доброкачественности в группе пациентов было обосновано особенностями клинической картины и данными нейровизуализации. До РТ исследования были выполнены у 14 пациентов: 7 с левосторонним (возраст от 34 до 63 лет), 7 — с правосторонним (возраст от 37 до 61 года) расположением опухоли. Через 6 мес после РТ группа пациентов аналогично включала 14 человек: 7 — с левосторонней и 7 — с правосторонней опухолью (табл. 1). Все пациенты были в ясном сознании, понимали и выполняли инструкции.

Группа контроля состояла из 9 здоровых испытуемых (4 женщины, 5 мужчин) в возрасте от 23 до 48 лет. По результатам опросника Аннет (Бизюк, 2005), у всех испытуемых ведущей была правая рука.

Стереотаксическая радиотерапия проводилась при помощи фотонного пучка по стандартной методике на аппарате Novalis (Brainlab) — линейном ускорителе электронов (6 МэВ), оснащен-

ном микроноголепестковым коллиматором. Лечение проходило в отделении радиотерапии Национального медицинского исследовательского центра нейрохирургии им. академика Н. Н. Бурденко. Индивидуальная программа лучевого лечения предполагала нахождение оптимального соотношения лечебной дозы облучения для опухоли и лучевой нагрузки на близлежащие критические структуры. Курс лечения состоял из 30 ежедневных сеансов облучения в режиме стандартного фракционирования с разовой очаговой дозой 1.8 Гр, суммарной — 54.0 Гр. Дозовая нагрузка на нормальные ткани (15 см³) составляла в среднем 47.0±4.0 Гр. Дозовые нагрузки на 10, 30 и 50% объема ипсилатерального гиппокампа составляли соответственно 40.0±8.0, 29.0±8.0 и 21.0±8.0 Гр.

ФМРТ-исследование проводилось до и через 6 мес после РТ, на магнитно-резонансном томографе General Electric Signa HDxt (США) с напряженностью магнитного поля 3.0 Тл. Длительность регистрации в состоянии покоя составляла 10.2 мин. Каждому испытуемому давалась инструкция спокойно лежать с закрытыми глазами и стараться ни о чем специально не думать.

Для получения структурных данных в объеме всего мозга использовалась импульсная последовательность 3D FSPGR (BRAVO): TR8.8 мс, TE3.5 мс, толщина среза 1 мм, FOV 250 мм, матрица изображения 256 × 256, размер вокселя 0.97 × 0.97 × 1.0 мм. Для получения функциональных данных использовалась эхопланарная последовательность «спиновое эхо» (BOLD T2). TR2500 мс, TE30 мс, толщина среза 3 мм, FOV 250 мм, матрица изображения 128 × 128, размер вокселя 1.95 × 1.95 × 3 мм. В каждой временной серии было получено 300 наборов функциональных объемов, каждый из которых содержал 24–40 аксиальных срезов, захватывающих весь головной мозг. Время сканирования одного функционального объема — 2 сек. Общее число срезов в функциональной серии составляло 7000–12000. Во время регистрации фМРТ проводились первичный контроль качества гемодинамических сигналов, автоматическая коррекция уровня шума, а также оценка записей по присутствию двигательных артефактов.

Обработка и статистическая оценка данных фМРТ покоя выполнялась с помощью программного пакета CONN v.18b (Functional connectivity toolbox, <https://web.conn-toolbox.org/>), работающего на базе MATLAB®. Использовали стандарт-

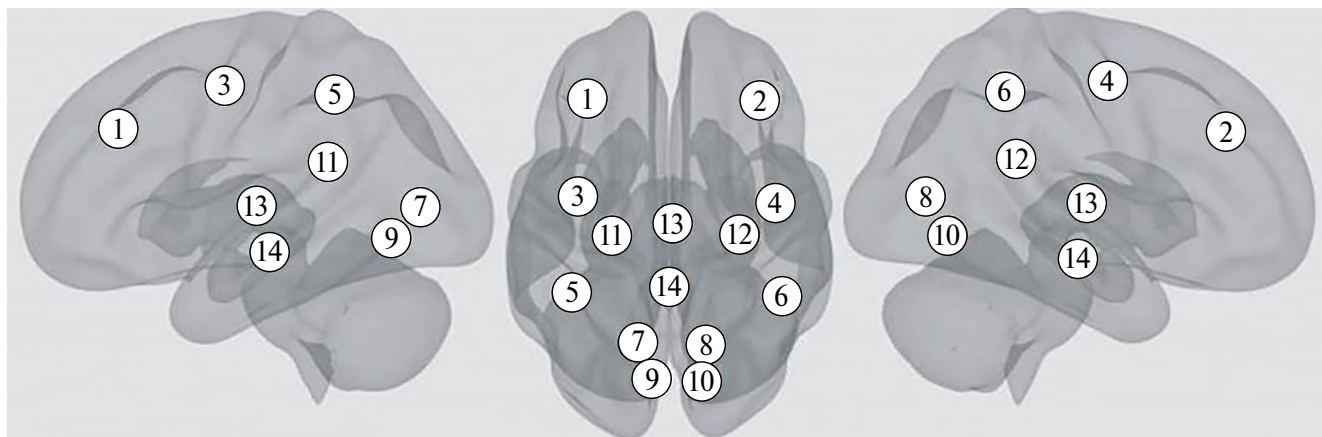


Рис. 1. «Маска» для оценки коннективности фМРТ состояния покоя.

«Зоны интереса», согласно координатам атласа AAL: 1 – Middle frontal gyrus_L; 2 – Middle frontal gyrus_R; 3 – Precentral gyrus_L; 4 – Precentral gyrus_R; 5 – Inferior parietal gyrus_L; 6 – Inferior parietal gyrus_R; 7 – Lingual gyrus_L; 8 – Lingual gyrus_R; 9 – Calcarine fissure_L; 10 – Calcarine fissure_R; 11 – Hippocampus_L; 12 – Hippocampus_R; 13 – Thalamus_LR; 14 – Cingulate gyrus_LR.

Fig. 1. «Mask» for assessing the connectivity of resting state fMRI.

«Regions of interest» (ROI), according to the coordinates of the AAL atlas: 1 – Middle frontal gyrus_L; 2 – Middle frontal gyrus_R; 3 – Precentral gyrus_L; 4 – Precentral gyrus_R; 5 – Inferior parietal gyrus_L; 6 – Inferior parietal gyrus_R; 7 – Lingual gyrus_L; 8 – Lingual gyrus_R; 9 – Calcarine fissure_L; 10 – Calcarine fissure_R; 11 – Hippocampus_L; 12 – Hippocampus_R; 13 – Thalamus_LR; 14 – Cingulate gyrus_LR.

ный шаблон обработки, включенный в пакет: коррекцию временного и пространственного сдвига функциональных изображений, корегистрацию со структурным изображением, нормализацию в стандартное MNI-пространство, сглаживание с Гауссовым ядром (FWHM – 8 мм), применение фильтра для BOLD-сигнала (0.008–0.09 Hz). Зонами интереса выступили области, соответствующие по топографии сети УФ, – с дополнениями, касающимися зрительной коры больших полушарий: Middle frontal gyrus, Inferior parietal gyrus, Precentral gyrus, Hippocampus, Lingual gyrus, Calcarine fissure правого и левого полушарий, а также Thalamus и Cingulum, согласно координатам атласа AAL (Automated Anatomical Labeling; см. рис. 1). При выборе этих ROI мы руководствовались довольно вариативными данными литературы о наиболее стабильных компонентах сети УФ (лобные и теменные корковые зоны) (Krpotic et al., 2013; Zhang et al., 2017; McIntosh et al., 2020), дополнив их структурами таламуса (Niendam et al., 2012; Мачинская, 2015) и гиппокампа (Zidda et al., 2019), а также рядом зрительных корковых зон.

Функциональная связанность между областями интереса оценивалась с использованием ROI-to-ROI-анализа (отношение выбранной области интереса к другой области интереса).

Для определения уровня функционального взаимодействия использовался корреляционный анализ Пирсона, проведенный для каждой пары ROI из всех возможных сочетаний, с последующим применением двумерного преобразования Фишера. Для межгруппового анализа применялся двухвыборочный критерий Стьюдента (two-sample t-test), для сравнения показателей до и после облучения использовался критерий Стьюдента для парных сравнений (Paired t-test). Порогом статистической значимости было принято значение $p < 0.05$, с поправкой на множественность сравнений (FDR-false discovery rate).

Для точной оценки объема опухоли и ее пространственного расположения осуществлялось оконтуривание опухоли в системе дозиметрического планирования iPlan (BrainLab, Германия) по данным структурной МРТ.

Статистический анализ полученных морфометрических данных проводился на базе пакета программы IBM SPSS Statistics Ver.21, с использованием непараметрического критерия Вилкоксона – Манна – Уитни. Различия в распределениях значений категориальных переменных оценивали с помощью критерия Хи-квадрат и точного критерия Фишера. Они признавались статистически значимыми при $p < 0.05$.

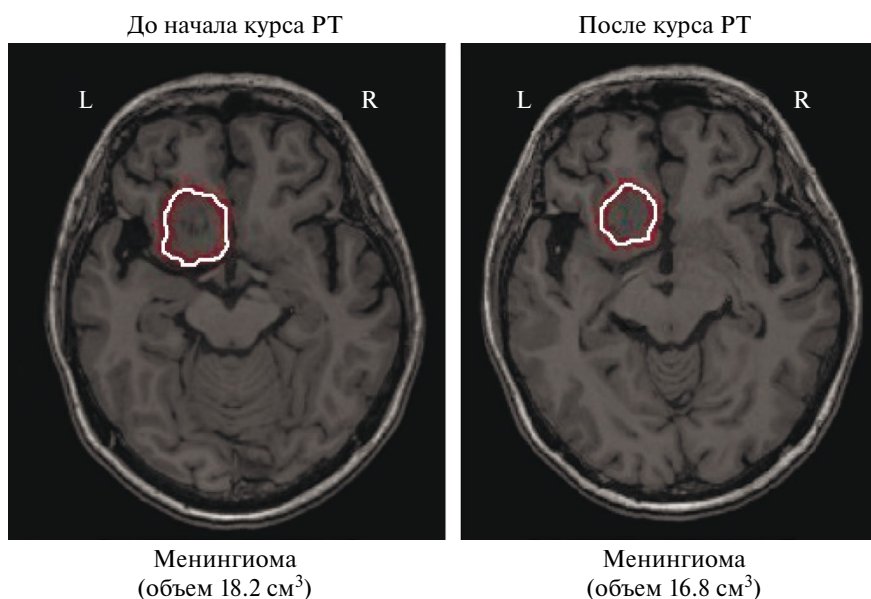


Рис. 2. Пример динамики снижения размеров опухоли после курса РТ. Структурное МРТ одного и того же пациента: до начала лечения (слева) и через 6 мес после РТ (справа). Опухоль на снимках обозначена белым контуром.
Fig. 2. An example of the tumor size reduction dynamics after a course of RT. Structural MRI of the same patient: before treatment (left) and 6 months after RT (right). The tumor is marked with a white outline on the images.

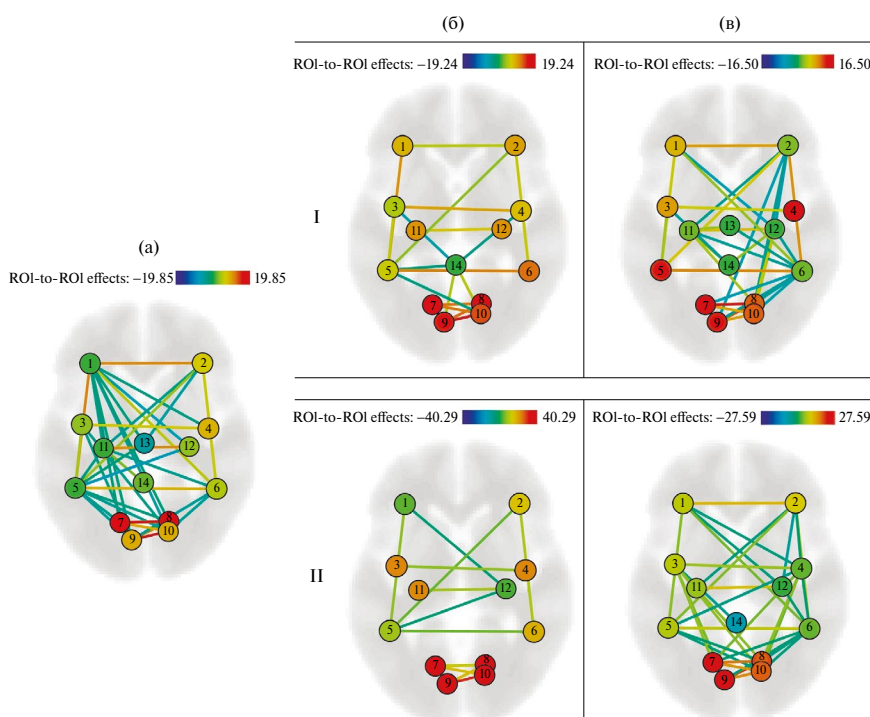


Рис. 3. Функциональные связи сети УФ по данным фМРТ покоя в выборках наблюдений. Линиями отображены функционально значимые связи ($p\text{-FDR corr} < 0.05$). Цветовая шкала соответствует величине эффекта (T-value). Зоны интереса для расчета коннективностей представлены на рис. 1. (a) – здоровые испытуемые ($n = 9$); (б) – пациенты с левосторонним поражением ($n = 7$); (в) – пациенты с правосторонним поражением ($n = 7$). I – до РТ, II – через 6 мес после РТ.

Fig. 3. Functional connections of the executive network according to resting state fMRI data in the observation samples. The figure shows functionally significant relationships ($p\text{-FDR corr} < 0.05$). The color scale corresponds to the size of the effect (T-value). Regions of interest for calculating connectivity are shown in Fig. 1. (a) – healthy subjects ($n = 9$); (б) – patients with lesions of the left temporal lobe ($n = 7$); (в) – patients with lesions of the right temporal lobe ($n = 7$). I – before RT; II – 6 months after RT.

Данное исследование проведено в соответствии с принципами Хельсинкской декларации, после получения информированного согласия и одобрения этическими комитетами ФГБУН ИВНД и НФ РАН, а также ФГАУ НМИЦ нейрохирургии.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Данные структурной МРТ. Через 6 мес после проведенного курса РТ у всех пациентов, согласно данным морфометрии, отмечалась определенная положительная динамика в виде снижения объема опухоли ($p = 0.008$) или стабилизации ее роста. В группе с левосторонней локализацией средний объем опухоли уменьшился от 20.83 см³ до 20.18 см³ ($p = 0.068$) (пример на рис. 2); при правосторонней – от 24.9 см³ до 23.94 см³ ($p = 0.043$), т.е. эффект был более выраженным и значимым (табл. 1).

Коннективность сети УФ фМРТ. Статистически значимые связи сети УФ фМРТ в клинических группах пациентов с лево- и правосторонней локализацией опухоли (до и после РТ), а также в группе контроля представлены на рис. 3.

Структура коннективности сети УФ фМРТ покоя у *здоровых испытуемых* (рис. 3 (а)) характеризуется наличием высоко достоверных функциональных связей практически между всеми заданными областями. В передних отделах полушарий наиболее сильными (по коэффициенту корреляции) являются связи между ROI в симметричных лобных регионах, лобной и центральной зонами левого полушария, а также межгиппокампальные. В задних отделах полушарий отмечается повышенная коннективность симметричных зрительных зон, при том, что, согласно инструкции, фМРТ-исследование проводилось при закрытых глазах. Важно отметить наличие большого числа диагональных межполушарных связей, образуемых чаще «зонами интереса» левого полушария – с максимумом концентрации в левой лобной области.

У пациентов с опухолевым поражением медиобазальных отделов височной доли *до РТ* (рис. 3 I) наблюдаются качественные изменения пространственной организации сети УФ. Общим для обеих групп является редукция протяженных межструктурных связей (внутриполушарных и особенно диагональных межполушарных), касающаяся прежде всего лобной, а также прецен-

тральной и теменной зон левой гемисферы, по сравнению с нормой. При этом отмечается ряд особенностей сетевых нарушений, связанных с латерализацией опухоли.

Наибольшие качественные и количественные отличия от нормы выражены при *левосторонней* локализации опухоли (рис. 3 I (б)): уменьшается число значимых протяженных межструктурных связей, особенно для симметричных лобных и затылочных областей, между левой и правой лингвальной извилиной; отсутствуют достоверные коннективности таламуса; редуцированы связи правого и левого гиппокампа. При *правостороннем* височном повреждении (рис. 3 I (в)) редукция протяженных функциональных связей не столь отчетлива. В то же время появляются нехарактерные для нормы коннективности правой теменной области, а также между правым гиппокампом и поясной извилиной.

Результат статистического сопоставления коннективностей в группах патологии по сравнению с нормой, подтверждающий более характерные для левостороннего повреждения изменения диагональных межполушарных связей, но односторонних внутривисочных – для правостороннего, представлены в нашей предыдущей публикации (Кулева и др., 2022).

Сравнивая структуру *связей УФ фМРТ до и после РТ* (рис. 3 I, II), можно видеть, что, хотя значимость демонстрируемых достоверных коннективностей в динамике не изменилась ($p\text{-FDR corr} < 0.05$), величина T-value, отображенная в цветовых шкалах, возросла у пациентов через 6 мес после РТ по сравнению с долечebным этапом, особенно в группе с левосторонней опухолью, превышая даже уровень нормы. Эти изменения свидетельствуют о том, что сила взаимосвязи (коннективности) гемодинамических сигналов в ряде областей мозга после РТ имеет тенденцию к повышению. Вместе с тем количество достоверных связей, как и до РТ, уменьшено по сравнению с контрольной группой. Кроме того, в обеих выборках пациентов обращает на себя внимание отсутствие значимых межструктурных взаимодействий таламуса.

При этом топография *связей сети УФ после РТ* (рис. 3 II) имеет свои особенности в группах с лево- и правосторонней локализацией повреждения.

У пациентов с *левосторонней опухолью* после РТ (рис. 3 II б) число значимых коннективностей

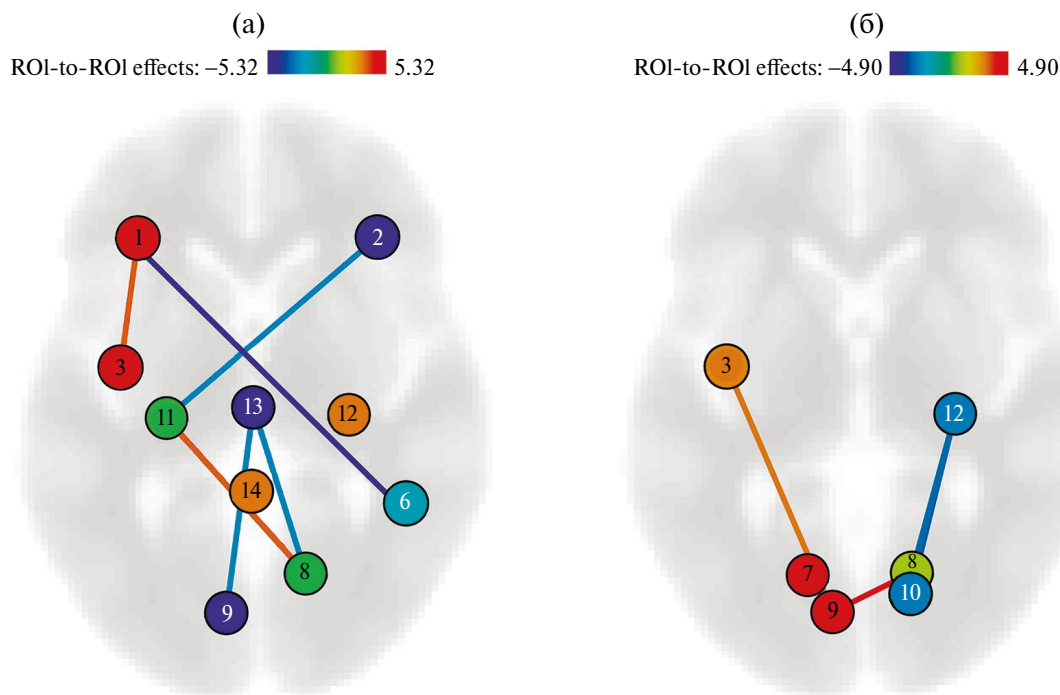


Рис. 4. Значимые изменения коннективности сети управляющих функций фМРТ покоя у пациентов с опухолевым поражением медиобазальных отделов височной доли после РТ по сравнению с состоянием до лечения.

(а) – левополушарное поражение, (б) – правополушарное. Красные линии – усиление коннективности, синие – снижение после РТ при $p < 0.05$. Зоны интереса для расчета коннективностей представлены на рис. 1.

Fig. 4. Significant changes in the connectivity of the executive functions resting fMRI network in patients with tumor lesions of the mediobasal parts of the temporal lobe after RT compared with the state before treatment.

(а) – left hemisphere lesion, (б) – right hemisphere lesion. Red lines – increased connectivity, blue – decreased after RT at $p < 0.05$. Regions of interest for calculating connectivity are shown in Fig. 1.

не только не восстановилось, но даже несколько уменьшилось по сравнению с состоянием до лечения. По-прежнему не выражены протяженные межполушарные диагональные связи. К числу отсутствующих добавились межполушарная коннективность между симметричными лобными областями, а также функциональные взаимодействия цингулярной коры. По сравнению и с нормой, и с состоянием до лечения редуцированы связи затылочных и теменных корковых областей, особенно левосторонние. Вместе с тем в данной группе наблюдений следует отметить повышение после РТ показателя T-value для связей зрительных областей (Calcarine – Lingual), соответствующего крайним (пороговым) значениям цветовых шкал. Этот факт может быть следствием небольшого объема выборки и являться предметом дальнейшего изучения.

В то же время в группе пациентов с *правосторонней опухолью* спустя 6 мес после РТ (рис. 3 II (в)) в структуре связей сети УФ фМРТ отчетливо проявляется положительная динамика относительно состояния до лечения и тенденция к нормализа-

ции. Увеличивается число значимых протяженных меж- и внутриволушарных взаимодействий центральных и теменных регионов левого полушария наряду с редукцией фокуса усиленной активности в правой теменной зоне, выраженного до лечения. Восстановился ряд коннективностей зрительных корковых областей, присущих норме.

Результаты статистической проверки этих изменений по критерию Стьюдента для парных сравнений представлены на рис. 4. Видно, что в группе с левополушарной опухолью (рис. 4 (а)) подтверждается отмеченное на рис. 3 дальнейшее ослабление протяженных межполушарных функциональных связей лобных областей обоих полушарий, а также взаимодействий таламуса со зрительной корой. Вместе с тем коннективности между левой лобной и премоторной корой, а также левым гиппокампом и зрительной корой справа усиливаются. При правостороннем повреждении (рис. 4 (б)) достоверны односторонние изменения: ослабление патологической (отсутствовавшей в норме) связи гиппокампа и зрительной коры справа, моторной

и зрительной коры слева. Подтверждается также тенденция к нормализации (усиление) связей симметричных зрительных областей коры. Следует отметить, что после применения поправки на множественные сравнения при сопоставлении показателей коннективности до и после РТ значимых изменений не обнаружено, что, по нашему мнению, связано с малым размером выборки.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

У пациентов с поражением медиобазальных отделов височной доли через 6 мес после проведенной РТ были выявлены положительные нейровизуализационные эффекты в виде уменьшения объема или стабилизации роста опухоли. При этом отмечаемые у них функциональные изменения, согласно данным фМРТ покоя, не столь однозначны и проявляются по-разному в зависимости от латерализации поражения. Данные оценки функциональных связей сети УФ фМРТ покоя показывают, что у пациентов с левосторонней опухолью через 6 мес после РТ выявляется отрицательная динамика пространственной организации сети УФ. В группе пациентов с правосторонним повреждением, напротив, по данным коннективности сети УФ фМРТ, изменения скорее позитивны — с тенденцией к нормализации структуры функциональных взаимодействий. Представленные факты могут отражать асимметрию влияния лучевого воздействия на гемисферы мозга.

Полученные в текущем исследовании результаты, хотя и ограничены сравнительно небольшой выборкой пациентов, затрагивают в этом контексте сформулированные В.Ф. Фокиным представления о стационарных и динамических свойствах функциональной межполушарной асимметрии (ФМА) (Фокин и др., 2009). Определяющим центральным механизмом стационарных свойств межполушарной асимметрии, помимо стабильности структурных различий в симметричных зонах правого и левого полушарий мозга (Geschwind, Levitsky, 1968; Игнатова и др., 2016), являются различия биохимической (Jayasundar, 2002) и биофизической природы. ФМА имеет также свои онтогенетические предпосылки: правополушарные функции формируются раньше, чем левополушарные; функции, которые обеспечиваются задними отделами (особенно правого полушария), формируются раньше, чем функции, обеспечиваемые передними лобными отделами (Геодакян, 2005).

К факторам, определяющим динамические характеристики латерализации и вызывающим изменение межполушарных отношений, относятся связанные с адаптационными процессами изменения окружающей среды, влияющие на динамику функционального состояния, факторы эндокринной и биоритмической природы (Боравова, 2023). Важным дополнением этих положений являются представления Т.А. Доброхотовой и Н.Н. Брагиной о неидентичности функциональных связей левого и правого полушария со срединными регуляторными структурами: правого больше с диэнцефальными, левого — со стволовыми (Доброхотова, Брагина, 1977). Получив дальнейшее подтверждение и развитие в ЭЭГ-исследованиях (Болдырева и др., 2000; Жаворонкова и др., 2012; Шарова и др., 2009), эта неидентичность срединно-полушарных взаимоотношений может быть отнесена к числу как стационарных, так и динамических факторов ФМА.

Представления о двух свойствах ФМА реализуются в конкретных формах ее проявления. Так, выделяется асимметрия глобальной стратегии функционирования полушарий — более диффузная в правом полушарии и преимущественно фокальная в левом (Лурия, 1969; Корсакова, Московичюте, 2003; Хомская, 2005). Согласно (Gordon, 1980), левое полушарие осуществляет последовательный анализ информации, в то время как в правом происходит ее целостное, одномоментное «схватывание». По данным (Филиппова, 2012), независимо от модальности передаваемой информации (вербальной или невербальной), восприятие и анализ дискретной информации будут связаны с левым полушарием, континуальной — с правым. Во многих исследованиях показана неравнозначность полушарий в проявлении высших психических функций. Известно, что лобная и левополушарная системы внимания доминируют в организации произвольных процессов, а теменная и правополушарная — непроизвольных (Posner, Petersen, 1990). В последнее время появились данные о том, что активированные структуры дорсального потока переработки информации («где?» или «как?») локализуются скорее в правом полушарии мозга, а вентрального потока («что?») — преимущественно в левом (Velichkovsky et al., 2019). Еще одним вариантом межполушарного разделения функций является вектор «вовнутрь» — «наружу». Правое полушарие отвечает за внутренний гомеостаз, поэтому обеспечивает биологическую адаптацию, а левое отвечает за социальную внешнюю адаптацию. Такое представле-

ние частично подтверждается исследованиями (Ushakov et al., 2016; Velichkovsky et al., 2017; Velichkovsky et al., 2018) фМРТ покоя здоровых людей: о более эффективных связях левого гиппокампа со структурами, передающими потоки информации из внешней среды, а правого — с маркировкой информации из внутренней среды организма, включая процессы самосознания. Отчасти эти данные созвучны с особенностями организации сети УФ фМРТ в группах пациентов до РТ (рис. 3 I) (Кулева и др., 2022).

Можно полагать, что указанные стационарные свойства ФМА в значительной степени определяют и ее динамические проявления. К числу последних можно отнести выявленную ранее большую чувствительность левой гемисферы к внешним воздействиям, таким как ионизирующее облучение (Жаворонкова и др., 2012) или лечебная транскраниальная электромагнитная стимуляция (Шарова и др., 2006). Показано также, что поток сознания, зависящий от стимулов внешней среды, в большей степени связан с функциональной активностью левой височной доли и левого гиппокампа, тогда как переживание независимых от внешних стимулов мыслей обнаруживало связь с правой нижней височной извиной (Van Calster et al., 2017). Эту линию продолжает работа (Бычкова, 2021), в которой выявлено, что компрессия медиальных отделов височных долей приводит к специфическому проявлению межполушарной асимметрии во время фМРТ-исследования: увеличению доли слуховых образов при левостороннем повреждении, а соматических, ориентированных «вовнутрь себя» — при правостороннем. Различия способов функционирования двух полушарий наблюдалось также при патологическом воздействии на височные структуры (вне мозговое новообразование) — в виде усиления полушарно-специфических факторов работы мозга: сукцессивного (последовательного) при компрессии левого полушария мозга и симультанного (одновременного) — при компрессии правого (Кроткова и др., 2018).

Полагаем, что полученные нами результаты анализа коннективности сети УФ фМРТ покоя до и после радиотерапии согласуются с данными литературы и могут способствовать уточнению механизмов динамической ФМА. Выявленная неравнозначность ответа правой и левой гемисферы на лучевое воздействие ставит вопрос о возможной необходимости дополнительной премедикации более «уязвимой» группы паци-

ентов с запланированным левосторонним облучением в качестве профилактических мер перед началом терапевтической лучевой терапии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в данной работе показано, что через 6 месяцев после проведенной радиотерапии у пациентов с опухолью медиобазальных отделов височной доли мозга, на фоне стабилизации роста опухоли, функциональные эффекты не столь однозначны и могут проявляться по-разному в зависимости от латерализации поражения: при правостороннем имеют тенденцию к нормализации, тогда как при левостороннем повреждении нарастают.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ 23–15–00018.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ахутин Т. В., Меликян З. А. Нейропсихологическое тестирование: обзор современных тенденций. К 110-летию со дня рождения А. Р. Лурия [Электронный ресурс https://psyjournals.ru/journals/cpse/archive/2012_n2/52599]. Клиническая и специальная психология. 2012.
- Бизюк А. П. Компендиум методов нейропсихологического исследования. СПб.: Речь. 2005. 400 с.
- Болдырева Г. Н., Шарова Е. В., Добронравова И. С. Роль регуляторных структур в формировании ЭЭГ человека. Физиология человека. 2000. 26 (5): 19–34.
- Боравова А. И. Проблемы функциональной асимметрии мозга в работах отечественных авторов. Журнал «Асимметрия». 2023. 17 (2): 5–15.
- Бычкова А. С., Каверина М. Ю., Ениколопова Е. В., Кроткова О. А. Содержание спонтанного потока сознания в состоянии покоя при мягкой компрессии одного из полушарий мозга. Вопросы психологии. 2021. 67 (3): 162–170.
- Геодакян В. А. Эволюционные теории асимметризации организмов, мозга и тела. Успехи физиологических наук. 2005. 36 (1): 24–53.
- Голдберг Э. Управляющий мозг: Лобные доли, лидерство и цивилизация. Пер. с англ. Д. Бугакова. М.: Смысл, 2003. 335 с.
- Доброхотова Т. А., Брагина Н. Н. Функциональная асимметрия и психопатология очаговых поражений мозга. М.: Медицина, 1977. 359 с.
- Жаворонкова Л. А., Белостоцкий А. П., Холодова Н. Б., Купцова С. В., Снегирева И. П., Куликов М. А., Окнина Л. Б. Нарушения высших психических функций и когнитивных слуховых вызванных потенциалов у ликвидаторов Чернобыльской

- аварии. Журнал неврологии и психиатрии, 2012. 5.
- Иваницкий А. М. Синтез информации в ключевых отделах коры как основа субъективных переживаний. Журн. высш. нервн. деят. им. И. П. Павлова. 1997. 47 (2): 209–225.
- Игнатова Ю. П., Макарова И. И., Зенина О. Ю., Аксенова А. В. Современные аспекты изучения функциональной межполушарной асимметрии мозга (обзор литературы). Экология человека. 2016. № 9. С. 30–39.
- Корсакова Н. К., Московичюте Л. И. Клиническая нейропсихология: Учеб. пособие М.: Академия, 2003.
- Кроткова О. А., Каверина М. Ю., Данилов Г. В. Движение глаз и межполушарное взаимодействие при распределении внимания в пространстве. Физиология человека. 2018. 44 (2): 66–74. DOI: 10.7868/S0131164618020108
- Кулева А. Ю., Шарова Е. В., Болдырева Г. Н., Струнина Ю. В., Ярец М. Ю., Галкин М. В., Бычкова А. С., Смирнов А. С., Кроткова О. А. Особенности функциональной коннективности головного мозга в состоянии покоя у пациентов с латерализованным поражением медиобазальных отделов височной доли (данные фМРТ и ЭЭГ). Журнал высшей нервной деятельности им. И. П. Павлова. 2022. 72 (2): 187–200. DOI: 10.31857/S0044467722020083
- Лурия А. Р. Высшие корковые функции человека и их нарушения при локальных поражениях мозга. 2-е изд. доп. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1969.
- Лурия А. Р. Мозг человека и психические процессы. Т. 2. М.: Педагогика, 1970. 496 с.
- Мачинская Р. И. Управляющие системы мозга. Журнал высшей нервной деятельности им. И. П. Павлова. 2015. 65 (1): 33–60.
- Полетаева И. И., Перепелкина О. В., Огиенко Н. А., Тарасова А. Ю., Лиль И. Г., Кошлань И. В., Павлова Г. В., Ревущин А. В. Влияние облучения протонами на решение мышами когнитивного теста на поиск входа в укрытие и нейрогенез взрослого мозга. Радиационная биология. Радиоэкология. 2019. 59 (5): 527–531.
- Филиппова Е. Б. Обинформационных процессах левого и правого полушария мозга человека. Функциональная межполушарная асимметрия и пластичность мозга. М.: 2012. 191–194.
- Фокин В. Ф., Боровова А. И., Галкина Н. С., Пономарева Н. В., Шимко И. А. Стационарная и динамическая организация функциональной межполушарной асимметрии. Руководство по функциональной межполушарной асимметрии. Глава 14 — М. Научный мир. 2009. 389–428.
- Хомская Е. Д. Нейропсихология: 4-е издание. СПб 2005. 496 с.
- Чичёва М. М., Мальцев А. В., Кохан В. С. Влияние ионизирующего излучения на когнитивные функции мышей в *in vivo* моделях болезни Альцгеймера. Доклады Российской академии наук. Науки о жизни. 2020. Т. 494. с. 468–471.
- Шарова Е. В., Мельников А. В., Новикова М. Р., Куликов М. А., Греченко Т. Н., Шехтер Е. Д., Заславский А. Ю. Изменения спонтанной биоэлектрической активности головного мозга при транскраниальной электрической и электромагнитной стимуляции. Журнал высшей нервной деятельности им. И. П. Павлова. 2006. 56 (3): 363–370.
- Шарова Е. В., Новикова М. Р., Куликов М. А. Компенсаторные реакции головного мозга при остром стволовом повреждении. Москва, Синтег, 2009, 220 с.
- Ярец М. Ю., Шарова Е. В., Смирнов А. С., Погосбекян Э. Л., Болдырева Г. Н., Зайцев О. С., Ениколопова Е. В. Анализ структурно-функциональной организации задачи счета в контексте исследования управляющих функций. Журнал высшей нервной деятельности им. И. П. Павлова. 2018. 68 (2): 176–189.
- Apra C., Peyre M., Kalamarides M. Current treatment options for meningioma. Expert Review of Neurotherapeutics. 2018. 18 (3): 241–249.
- Day S., Halasz L. Radiation therapy for WHO grade I meningioma. Chinese Clinical Oncology. 2017. 6(Suppl 1): S4.
- Delamillieure P., Doucet G., Mazoyer B., Turbelin M. R., Delcroix N., Mellet E., Zago L., Crivello F., Petit L., Tzourio-Mazoyer N., Joliot M. The resting state questionnaire: An introspective questionnaire for evaluation of inner experience during the conscious resting state. Brain research bulletin. 2010. 81 (6): 565–573.
- Diamond A. Executive functions. Annual Review of Psychology. 2013 (64): 135–168. doi: 10.1126/sciadv.aat7603
- Elliott R. Executive functions and their disorders. Br. Med. Bull. 2003. 65: 49–59.
- Geschwind N., Levitsky W. Human brain — left — right asymmetries in temporal speech region. Science 1968; 161: 186–187.
- Gordon H. Cerebral organization in bilinguals: I. Lateralization. Brain and Language. 1980. Volume 9, Issue 2, Pp 255–268, ISSN0093–934X.
- Holodova N. B., Ryzhov B. N., Zhavoronkova L. A. Sostoyanie visshich psichicheskikh funkzii u uchastnikov likvidazii posledstvii avarii na Chernobil'skoy AES. Zhurnal nevropatologii i psikiatrii im. S. S. Korsakova 2005. 105 (10): 57–58.
- Jayasundar R. Human brain: biochemical lateralization in normal subjects. Neurol India. 2002 Sep; 50(3): 267–271.
- Kazda T., Jancalek R., Pospisil P., Sevela O., Prochazka T., Vrzal M., Burkon P., Slavik M., Hynkova L., Slampa P.,

- Laack N.* Why and how to spare the hippocampus during brain radiotherapy: the developing role of hippocampal avoidance in cranial radiotherapy. *Radiation Oncology*. 2014. Vol. 9 (139).
- Kovner R., Oler J.A., Kalin N.H.* Cortico-Limbic Interactions Mediate Adaptive and Maladaptive Responses Relevant to Psychopathology. *Am J Psychiatry*. 2019 (12): 987–999.
- Krmpotich T.D., Tregellas J.R., Thompson L.L., Banich M.T., Klenka A.M., Tanabe J.L.* Resting-state activity in the left executive control network is associated with behavioral approach and is increased in substance dependence. *Drug and Alcohol Dependence*. 2013. V.129. № 1–2. p.1–7.
- McIntosh R.C., Hoshi R., Jason S. Nomi, Di Bello M., Goodman Z. T., Kornfel Z. T., Uddin L. Q., Ottaviani C.* Neurovisceral integration in the executive control network: A resting state analysis. *Biological Psychology*. 2020. V.157, 107986.
- Methyeva N.A., Sherbatih O. V.* Remote medical consequences of radiation accidents among veterans of nuclear submarines. *Medical radiology and radiation safety* 2016; 61(1): 29–33.
- Mishkin M., Ungerleider L. G., Macko K.A.* Object vision and spatial vision: two cortical pathways. *Trends in neurosciences*. 1983(6): 414–417.
- Miyake A., Friedman N., Emerson M., Witzki A., Howerter A., Wager T.* The unity and diversity of executive functions and their contributions to complex “frontal lobe” tasks: A latent variable analysis. *Cognitive Psychology*. 2000(41): 49–100.
- Niendam T.A., Laird A.R., Ray K.L., Dean Y.M., Glahn D. C., Carter C. S.* Meta-analytic evidence for a superordinate cognitive control network subserving diverse executive functions. *Cogn Affect Behav Neurosci*. 2012. 12(2): 241–268.
- Petersen S.E., Posner M.I.* The Attention System of the Human Brain: 20 Years After. *Annu Rev Neurosci*. 2012(35): 73–89. doi:10.1146/annurev-neuro-062111–150525.
- Posner M.I., Petersen S.E.* The attention system of the human brain. *Ann Rev Neurosci* 1990. 13: 25–42.
- Pribram K. H.* The primate frontal cortex – executive of the brain. *Psychophysiology of the frontal lobes*. N.Y., London: Academic Press, 1973. 314 p.
- Rogers L., Barani I., Chamberlain M., Kaley T.J., McDermott M., Raizer J., Schiff D., Weber D.C., Wen P. Y., Vogelbaum M.A.* Meningiomas: knowledge base, treatment outcomes, and uncertainties. A RANO review. *J Neurosurg*. 2015. 122(1): 4–23. DOI: 10.3171/2014.7.JNS131644
- Tonegawa S., Morrissey M.D., Kitamura T.* The role of engram cells in the systems consolidation of memory. *Nature Review*. 2018. 19: 485–498.
- Ushakov V. L., Sharaev M. G., Kartashov S. I., Zavyalova V. V., Verkhlyutov V. M., Velichkovsky B. M.* Dynamic Causal Modeling of Hippocampal Links within the Human Default Mode Network: Lateralization and Computational Stability of Effective Connections. *Front. Hum. Neurosci*. 2016 (10).
- Van Calster L., D’Argembeau A., Salmon E., Peters F., Majerus S.* Fluctuations of attentional networks and default mode network during the resting state reflect variations in cognitive states: Evidence from a novel resting-state experience sampling method. *J Cogn Neurosci*. 2017. 29: 95–113.
- Velichkovsky B. M., Korosteleva A. N., Pannasch S., Helmert J. R., Orlov V.A., Sharaev M. G., Velichkovsky B. B., Ushakov V. L.* Two Visual Systems and Their Eye Movements: a Fixation-Based Event-Related Experiment with Ultrafast fMRI Reconciles Competing Views. *Modern Technologies in Medicine*. 2019. Vol. 11, No. 4. P. 7–18. DOI: 10.17691/stm2019.11.4.01.
- Velichkovsky B. M., Krotkova O.A., Kotov A.A., Orlov V.A., Verkhlyutov V. M., Ushakov V. L., Sharaev M. G.* Consciousness in a multilevel architecture: Evidence from the right side of the brain. *Consciousness and Cognition*. 2018. Vol. 64. P. 227–239. <https://doi.org/10.1016/j.concog.2018.06.004>
- Velichkovsky B. M., Krotkova O.A., Sharaev M. G., Ushakov V. L.* In search of the “I”: Neuropsychology of lateralized thinking meets Dynamic Causal Modeling. *Psychol. in Russia*. 2017. V. 10. N3. P. 7–27.
- Velichkovsky B. M., Nedoluzhko A. V., Goldberg E., Efimova O. I., Sharko F. S., Rastorguev S. M., Krasivskaya A.A., Sharaev M. G., Korosteleva A. N., Ushakov V. L.* New insights into the human brain’s cognitive organization: Views from the top, from the bottom, from the left and, particularly, from the right. *Procedia Computer Sci*. 2020. V. 169. P. 547–557.
- Zhang C., Yang H., Qin W., Liu C., Qi Z., Chen N. Li K.* Characteristics of Resting-State Functional Connectivity in Intractable Unilateral Temporal Lobe Epilepsy Patients with Impaired Executive Control Function. *Front. Hum. Neurosci*. 2017. 11: 609.
- Zidda F., Griebel M., Ebert A., Ruttorf M., Roßmanith C., Gass A., Andoha J., Neesa F., Szabo K.* Resting-state connectivity alterations during transient global amnesia. *NeuroImage: Clinical*. 2019. V.23. 101869.

INFLUENCE OF RADIOTHERAPY ON CONTROL FUNCTIONS NETWORK FMRI CONNECTIVITY IN PATIENTS WITH LATERALIZED MEDIOBASAL TEMPORAL LESIONS

E. V. Sharova^{a,*}, A. Yu. Kuleva^a, Yu. V. Strunina^b, M. Yu. Yarec^a, M. V. Galkin^b, A. S. Smirnov^b, O. A. Krotkova^b

^a*Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia;*

^b*Federal State Autonomous Institution «N. N. Burdenko National Medical Research Center of Neurosurgery» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia*

^{*}*e-mail: esharova@nsi.ru*

According to the literature, radiotherapy (RT) used for brain tumors, along with a positive effect, can be accompanied by negative consequences in the form of the development of neurocognitive deficit due to the side effects of radiation on critical brain structures. At the same time, there are indications of a possible modulation of hippocampal neurogenesis with subsequent activation of a number of cognitive functions.

An important component of human cognitive activity is the so-called executive functions (EF), which include the initiation, planning, regulation and control of any purposeful activity. Their structural and functional support is currently associated with the prefrontal and parietal sections of the hemispheres, as well as with the formations of the lower temporal cortex and the hippocampus. The work is aimed at dynamic assessment of the state of the EF-network according to the analysis of resting fMRI connectivity before and after 6 months after RT.

In dynamics, 14 patients with lateralized tumor lesions of the mediobasal temporal lobe were examined: 7 with the left side, 7 with the right side. The control group consisted of 9 healthy subjects. Each participant underwent fMRI at rest – with further analysis of the functional connectivity between the given regions of interest, corresponding to the topography of the EF-network. The results were compared with the MRI morphometry tumor data. It has been shown that in patients 6 months after RT, against the background of a decrease in volume or stabilization of tumor growth, the functional effects are ambiguous and depend on the lateralization of the lesion: with a right-sided lesion they tend to normalize, while with a left-sided lesion they increase.

Keywords: fMRI, connectivity, resting state, radiotherapy, executive functions, mediobasal parts of the temporal lobe.

УДК 616–006.484.04

УЧАСТИЕ СУБВЕНТРИКУЛЯРНОЙ ЗОНЫ МОЗГА В РАЗВИТИИ ГЛИОМЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА

© 2024 г. А. В. Ревущин^{1, *}, Г. В. Павлова^{1, 2, 3}

¹ФГБУН “Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии Российской Академии Наук”, Москва, Россия

²ФГАУ “НМИЦ нейрохирургии им. академика Н. Н. Бурденко” Минздрава России, Москва, Россия

³Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова, Москва, Россия

*e-mail: revishchin@mail.ru

Поступила в редакцию 03.09.2023 г.

После доработки 05.10.2023 г.

Принята к публикации 01.12.2023 г.

Глиобластома (ГБМ) — злокачественная опухоль со средней выживаемостью 15–16 месяцев при стандартном лечении; однако случаи успешного лечения дают надежду на то, что более глубокое понимание патологии улучшит прогноз. Глиальные опухоли содержат клоногенные клетки (клетки, способные образовывать колонии в культуральной среде) с высоким пролиферативным потенциалом, а их потомки обладают широким спектром возможной дифференцировки; данные клоногенные клетки в настоящее время рассматриваются как стволовые клетки глиомы (ГСК). В норме и патологии во взрослом мозге существуют зоны, которые содержат пролиферирующие нейральные стволовые клетки (НСК) и их потомки — начавшие дифференцировку прогениторные клетки. Одна из таких зон, лежащая на латеральной стенке бокового желудочка, называемая субвентрикулярной зоной бокового желудочка (СВЗ), привлекает большое внимание в связи с ее значением для глиомогенеза. Многочисленные исследования показали, что интенсивный обмен сигнальными молекулами и клетками между ГБМ и СВЗ приводит к ускорению роста опухоли и повышению риска рецидивов. Результаты исследований указывают на возможности разработки новых, более действенных стратегий борьбы с этим опасным заболеванием с учетом знаний о роли СВЗ в развитии этой патологии.

Ключевые слова: глиома, глиобластома, субвентрикулярная зона, стволовая клетка, нейрогенез, субвентрикулярная зона

DOI: 10.31857/S0044467724010037

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

2D-DIGE	— техника двумерного (2D) гель-электрофореза
CD133	— проминин-1
CDK6	— циклинзависимая киназа 6 — Cyclin-dependent kinase 6
CXCL12	— хемокин подсемейства CXC, синоним SDF-1
CXCR4	— рецептор хемокина CXCL12
DCX	— даблкортин
DOT1L	— гистонлизинметилтрансфераза, регулирует теломерные гены, метилирует гистон H3K79
GFAP	— глиальный кислый фибриллярный белок
GFP	— зеленый флуоресцентный белок
IDH1	— ген, кодирующий фермент изоцитратдегидрогеназу
PSA-NCAM	— полисиалилированная молекула адгезии нейрональных клеток
SDF-1	— фактор 1 стромальных клеток
SOCS3	— супрессор передачи сигналов цитокинов 3
SOX2	— транскрипционный фактор, необходимый для поддержания стволовых клеток
SQLE	— сквален-монооксигеназа, участвует в регуляции биосинтеза стерола
БП	— выживание без прогрессирования
ГБМ	— глиобластома
ГСК	— стволовая клетка глиомы
MPT	— магниторезонансная томография
НСК	— нейральная стволовая клетка
ОВ	— общее выживание
СВЗ	— субвентрикулярная зона

ВВЕДЕНИЕ

Открытие пролиферативных зон взрослого мозга млекопитающих позволяет по-новому интерпретировать функционирование мозговой ткани в норме и при патологии (Корочкин и др., 2005). Во взрослом мозге млекопитающих, и в том числе человека, были обнаружены пролиферирующие нейральные стволовые клетки (НСК), которые в результате асимметричного деления дают начало прогениторным клеткам — незрелым клеткам, начавшим дифференцировку в том или ином направлении. При определенных условиях эти прогениторные клетки способны участвовать в восстановлении после травм и замещать стареющие и погибающие клетки мозга (Revishchin et al., 2008). Были идентифицированы многочисленные геномные механизмы, контролирующие пролиферацию стволовых клеток и дифференцировку прогениторных клеток (Павлова и др., 2008). В то же время показано участие стволовых клеток в генезе злокачественных опухолей. Гипотеза о существовании стволовых клеток опухоли была основана на ранних экспериментах по трансплантации лейкозных клеток, в которых было показано, что одна клетка может инициировать раковый трансплантат (Furth et al., 1937). Существование опухолевых стволовых клеток как родоначальников опухоли предлагает новые направления исследований функционирования, развития и патологии мозга (Sanai et al., 2005).

СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ ГЛИОМЫ

Мультиформная глиобластома (ГБМ) — опухоль головного мозга, которая является, по классификации ВОЗ, самой злокачественной формой глиомы (4 степень злокачественности). ГБМ характеризуется гетерогенностью, резистентностью к терапии и рецидивирующим ростом. Это наиболее агрессивная из всех известных глиом, при которой период выживаемости у пациентов с момента постановки диагноза в большинстве случаев составляет менее одного года (Ichimura et al., 2004). Для разработки методов лечения этой опухоли решающее значение имеет идентификация наиболее результативных мишеней терапевтических воздействий. В этом отношении большие надежды дает концепция стволовых клеток опухоли (Sanai et al., 2005). Культивирование клеток мультиформной глиобластомы человека в 3D-системе меноклональной культуры нейросфер показало наличие в этих культурах клеток со свойствами стволовых (Ignatova et al., 2002). Подобно клет-

кам пролиферативных зон здорового мозга, глиальные опухоли содержат клоногенные клетки, которые описаны как НСК-подобные клетки, потомки которых экспрессируют отдельные признаки нейрональной или глиальных программ (Yip et al., 2003). Эти клоногенные клетки, как и НСК, обладают высоким пролиферативным потенциалом и способностью производить прогениторные клетки, обладающие широким спектром возможной дифференцировки. В настоящее время эти клетки рассматриваются как стволовые клетки глиомы (ГСК). Именно эти клетки становятся целью для антиопухолевой терапии (Mattei et al., 2021).

Накопленные знания о физиологии и функционированию нейральных стволовых клеток имеют большое практическое значение для разработки новых подходов к лечению злокачественных опухолей, и в частности опухолей головного мозга. Одним из направлений может стать адресная терапия, нацеленная на торможение пролиферации ГСК, посредством стимуляции их дифференцировки и потери стволового статуса (Pavlova et al., 2022).

Наличие во взрослом мозге пролиферативных зон, содержащих стволовые клетки, поднимает вопрос об их взаимоотношениях со злокачественными опухолями, и в частности с глиомами. Этот вопрос важен как в отношении выяснения инициализирующих клеток глиом, так и в отношении влияния пролиферативных зон на рост опухоли. Этим вопросам посвящено много работ, основные результаты которых изложены в настоящем обзоре.

Многочисленные исследования показали, что ГСК во многом схожи с НСК в СВЗ. И те и другие экспрессируют нестин, имеют способность к пролиферации, высокую подвижность, разнообразное потомство, связь с сосудистой сетью и другими компонентами микроокружения (Matarredona et al., 2019).

Полногеномные скрининги НСК и ГСК с помощью CRISPR-Cas9 выявили несколько генетических сходств стволовых клеток GBM (ГСК) и НСК (MacLeod et al., 2019). SOCS3 — модуляторный белок, который отвечает за поддержание статуса НСК как стволовых клеток (Cao et al., 2006). Ген этого белка (*SOCS3*) был идентифицирован как ключевой (fitness gene), специфичный для GBM (MacLeod et al., 2019). Потеря

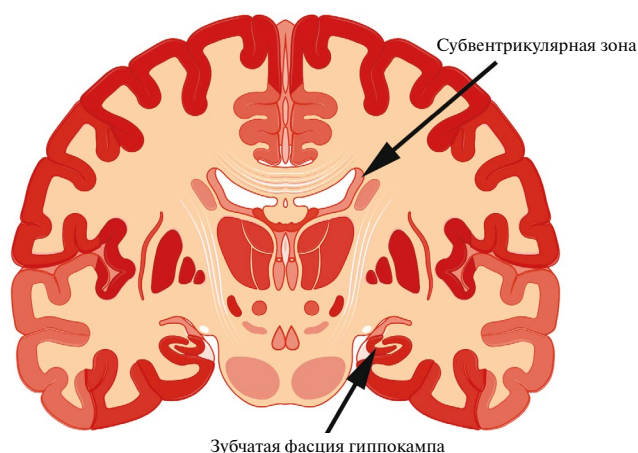


Рис. 1. Схема расположения субвентрикулярной зоны (SVZ) и зубчатой фасции гиппокампа на фронтальном срезе мозга человека. Рисунок выполнен с использованием ресурса BioRender <https://ikt-masterilki.ru/biorender/>

Fig. 1. Diagram of the location of the subventricular zone (SVZ) and fascia dentata of the hippocampus on a frontal section of the human brain. The drawing was made using the BioRender resource <https://ikt-masterilki.ru/biorender/>

функции SOCS3 приводит к подавлению множества ключевых генов ГСК, усилению маркеров нейральных предшественников и в конечном счете — к потере пролиферативного потенциала и стволового статуса. SOX2 — еще один важный транскрипционный фактор НСК, который является высокоэффективным ключевым геном как для НСК, так и для ГБК (Zhang et al., 2014). Обнаружены и другие гены с аналогичными показателями экспрессии в НСК и ГСК: SQLE, CDK6 и DOT1L (MacLeod et al., 2019).

ПРОЛИФЕРАТИВНЫЕ ЗОНЫ ВЗРОСЛОГО МОЗГА

С точки зрения онкогенеза наибольший интерес представляет субвентрикулярная пролиферативная зона латеральных желудочков (SVZ). Эта область основательно изучена в мозге грызунов. В исследовании на мышах клональный анализ *in vivo* показал, что НСК составляют 0.2–0.4% клеток SVZ (Morshead et al., 1998). Было показано, что постнатально НСК в SVZ продолжают делиться с образованием дочерних прогениторных клеток (клеток-предшественников), которые впоследствии превращаются либо в нейроны, либо в астроциты, либо в олигодендроциты (Gage et al., 1995; Levison et al., 1993).

SVZ отделена от просвета желудочка эпендимой — монослоем выстилающих желудоч-

ки эпендимоцитов, несущих микровилярные выросты, направленные в полость желудочка. Субэпендимальный слой грызунов содержит 3 класса клеток (Doetsch et al., 1999). Клетки класса В содержат глиальный маркер — глиальный кислый фибриллярный белок (glial fibrillary acidic protein — GFAP). Они окружают каналы (так называемые роstralные миграционные потоки), по которым клетки класса А, являющиеся молодыми нейробластами, мигрируют в обонятельную луковицу. Клетки В делятся редко (и это деление асимметрично), давая начало интенсивно пролиферирующим «мультипликативным» клеткам С (прогениторные клетки или клетки-предшественники), которые в дальнейшем превращаются в клетки класса А, большинство которых мигрирует в обонятельную луковицу (Doetsch et al., 1999; Gleeson et al., 1999; Rousselot et al., 1995). Геминативная зона существует и в субвентрикулярной зоне мозга человека (рис. 1), однако она сильно отличается от SVZ грызунов (Eriksson et al., 1998; Kam et al., 2009; Sanai et al., 2004). Она содержит 4 слоя (рис. 2). Эпендимальный слой (слой I) выстилает границу желудочков и паренхимы мозга. С эпендимальным граничит отсутствующий у грызунов гиподулярный слой (слой II), который состоит из базальных отростков эпендимальных клеток, отростков астроцитов и редких тел астроцитов. Глубже находится «астроцитарная лента» (слой III) — слой клеток, несущих маркеры астроцитов. Это пролиферативная область, где расположены астроцитоподобные клетки. Некоторые из этих астроцитов обладают свойствами НСК, но небольшое количество прогениторных клеток и мигрирующих нейробластов позволяет предположить, что большинство этих предполагаемых НСК в головном мозге взрослого человека находятся в состоянии покоя (Eriksson et al., 1998; Kam et al., 2009; Sanai et al., 2004). Слой IV является переходной зоной к паренхиме головного мозга. В этой области много миелинизированных нейронных отростков и тел нейронов (Quinones-Hinojosa et al., 2006). Количество пролиферирующих клеток и клеток с морфологией и экспрессией маркеров мигрирующих молодых нейронов, таких как даблкортин (DCX), в SVZ человека намного ниже, чем у грызунов (клетки типа А) (Quinones-Hinojosa et al., 2006; Sanai et al., 2007; Sanai et al., 2004). В SVZ человека роstralный миграционный поток слабо выражен, и его существование остается весьма спорным (Wang et al., 2011). Немногочисленные клетки, содер-

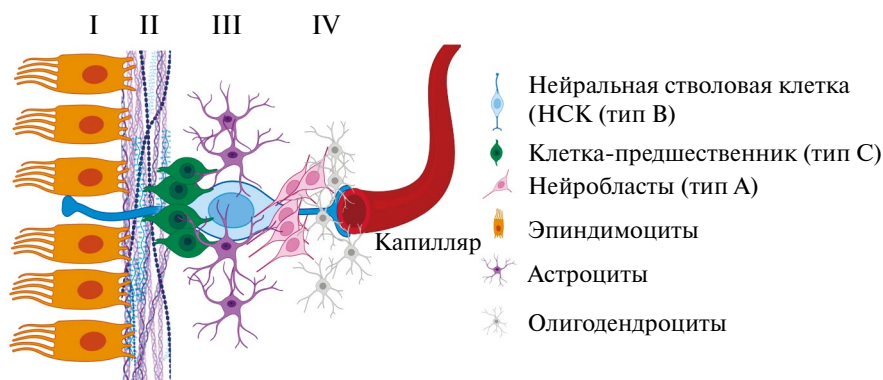


Рис. 2. Схема расположения клеток субвентрикулярной зоны мозга взрослого человека. Вверху указаны положения слоев: I – монослой эндимальных клеток, II – промежуточный гиподендральный слой, III – полоска тел астроцитов IV – переходная зона. Рисунок выполнен с использованием ресурса BioRender <https://ikt-masterilki.ru/biorender/>

Fig. 2. Diagram of the arrangement of cells in the subventricular zone of the adult human brain. The positions of the layers are indicated at the top: I – monolayer of ependymal cells, II – intermediate hypodendritic layer, III – strip of astrocyte bodies IV – transition zone. The drawing was made using the BioRender resource <https://ikt-masterilki.ru/biorender/>

жащие маркеры нейробластов, не мигрируют в обонятельную луковицу, являющуюся основным местом назначения нейробластов у грызунов и обезьян (Kornack et al., 2001). Анализ клеток обонятельной луковицы человека с помощью углерода- ^{14}C подтверждает незначительную пролиферацию нейронов в этой области взрослого мозга ((Bergmann et al., 2012).

Ernst с соавт. (Ernst et al., 2014), используя гистологический подход и методы датирования углеродом-14, показали, что у взрослых людей новые нейроны мигрируют в примыкающее к СВЗ полосатое тело, где интегрирующиеся нейробласты, по-видимому, становятся интернейронами. Действительно, в стриатуме рядом с СВЗ были обнаружены клетки, меченные ^{14}C , коэкспрессирующие маркеры нейробластов DCX и PSA-NCAM, а также кальренин и нейропептид Y. Размер обновляющейся популяции нейронов во взрослом возрасте по результатам математического моделирования этого процесса составил 25% при средней скорости обновления нейронов в пределах этой популяции, составлявшей 2.7% в год (Ernst et al., 2014). Однако потенциал нейрогенеза в полосатом теле взрослого человека подвергается сомнению. Так, Wang с соавт. (Wang et al., 2014) подсчитывали количество интрастриарных нейронов, содержащих транскрипционный фактор Sp8, экспрессирующийся в обонятельной луковице и в идентифицированном ими переднем миграционном потоке. На основании очень малого количества Sp8-иммунопозитивных нейронов авторы делают вывод о чрезвычайно малом количестве обновляющихся нейронов в стриатуме взрослого человека (Wang et al., 2014).

ВЛИЯНИЕ БЛИЗОСТИ СВЗ НА РОСТ ГЛИОМЫ

Взаимное расположение СВЗ и глиальных опухолей давно вызывает интерес в связи с предположением, что глиомы возникают из трансформированных эндогенных стволовых клеток, которые во взрослом мозге локализованы в пролиферативных зонах СВЗ и субгранулярного слоя зубчатой фасции гиппокампа (Sanai et al., 2005). Ellingson с соавт. (Ellingson et al., 2013) проводили ретроспективный анализ данных 507 пациентов с гистологически подтвержденной глиобластомой (глиомой 4 степени злокачественности). МРТ-исследование сочетали с данными по возрасту, степени резекции и несколькими молекулярными показателями. По результатам этого исследования оказалось, что большинство глиобластом прорастали в перивентрикулярные области белого вещества, прилегающие к СВЗ. Интенсивность роста глиом, а также молекулярные особенности и прогноз выживаемости пациентов варьировали в связи с локализацией опухоли (Ellingson et al., 2013).

По данным Jafri с соавт. (Jafri et al., 2013), обследование первичной локализации опухоли относительно СВЗ и новой коры у 91 пациента с помощью МРТ показало снижение продолжительности общего выживания после постановки диагноза (ОВ) у больных с опухолью, контактировавшей с СВЗ (Jafri et al., 2013). Kimura с соавт. в исследовании на 49 пациентах не подтвердили наличие связи течения рецидивов с первичным положением опухоли относительно СВЗ (Kimura et al., 2013). Однако Adeberg с соавт. на основании обследования 607 пациентов с ГБМ под-

твердили связь контакта СВЗ с опухолью с более короткой ОВ (Adeberg et al., 2014). Liu с соавт. (Liu et al., 2016) уточнили определение вовлечения СВЗ в зону опухоли. Используя параметр кратчайшего расстояния от центра опухоли до края боковых желудочков, они показали, что для глиом низкой степени злокачественности прогноз ухудшается с уменьшением расстояния до желудочков (Liu et al., 2016). Исследование Ahmadipour с соавт., которые проанализировали данные 207 пациентов с диагнозом «глиобластома», также показало, что вовлечение СВЗ в зону опухоли сокращало ОВ до 7.8 ± 7.0 месяцев с 13.9 ± 10.1 в контроле (Ahmadipour et al., 2020). При этом наличие мутации гена IDH1, ассоциированной с диффузными глиомами II и III степени, и отсутствие вовлечения СВЗ в опухоль улучшают прогноз, тогда как «дикий тип» гена IDH1 с вовлечением СВЗ значительно ухудшает его у всех пациентов. Более того, у пациентов с глиобластомой, не контактирующей с СВЗ, мутация гена белка IDH1, сочетающаяся с расстоянием между опухолью и СВЗ > 10 мм, имеет лучшие показатели ОВ и выживание без прогрессирования (ВБП). Аллель «дикого типа» IDH1 и расстояние от опухоли до СВЗ от 0 до 10 мм указывают на более низкую ОВ и ВБП (Zhang et al., 2021). Недавнее исследование Kim с соавт. (Kim et al., 2023) показало, что расстояние СВЗ от края опухоли является независимым неблагоприятным прогностическим фактором у пациентов с IDH-глиобластомой «дикого типа».

Таким образом, МРТ-обследование пациентов до и после хирургической операции с оценкой расстояния от края или центра опухоли до пролиферативных зон мозга (СВЗ и субгранулярного слоя зубчатой фасции гиппокампа) может быть использовано для прогноза выживания и перспектив рецидивов.

Влияние близости глиомы к СВЗ проявляется на молекулярном уровне. Близкие к СВЗ глиомы (ГБМ+СВЗ) отличаются от далеко расположенных (ГБМ–СВЗ) экспрессией нескольких белков, важных для патологического процесса. Gollapalli с соавт. (Gollapalli et al., 2017) провели сравнительное протеомное исследование сыворотки крови и фрагментов ткани опухоли у пациентов ГБМ+СВЗ и ГБМ–СВЗ. Анализ сыворотки крови пациентов с ГБМ с использованием 2D-DIGE выявил дифференциальную экспрессию четырех белков: гемопексина (HPX), аполипопротеина А1 (APOA1), альфа-1-антихимотрипсина (SERPINA3) и сывороточного

альбумина (ALB). Гемопексин защищает клетки от гем-опосредованного окисления и играет важную роль в дифференцировке олигодендроцитов и формировании миелиновой оболочки. Выявленные различия предположительно связаны с большей агрессивностью и большей защищенностью от апоптоза ГБМ+СВЗ, по сравнению с опухолями ГБМ–СВЗ (Gollapalli et al., 2017).

Анализ протеома ткани ГБМ+/-СВЗ выявил значительные различия в экспрессии белков во многих важных метаболических путях. Многие белки, связанные с системой свертывания крови, оказались повышены в ГБМ+СВЗ, по сравнению с ГБМ–СВЗ. Ингибиторы протеазы, такие как альфа-2-макроглобулин (A2M), альфа-1-антитрипсин (SERPINA1) и антитромбин-III (SERPINC1), связанные с системой свертывания крови, повышены в опухолях ГБМ+СВЗ, по сравнению с ГБМ–СВЗ. Показаны повышенные уровни альфа-3 (VI) цепи коллагена и фибронектина в опухолях ГБМ+СВЗ, что коррелирует с их повышенной инвазивностью, по сравнению с опухолями ГБМ–СВЗ. Уровни тенасцина-С были повышены как в опухолях ГБМ+СВЗ, так и в опухолях ГБМ–СВЗ, по сравнению с перитуморальной тканью, но в ГБМ+СВЗ он все же был выше, чем в опухолях ГБМ–СВЗ. Показан также повышенный уровень регуляции тимозин бета-4-подобного белка 3 у пациентов с ГБМ+СВЗ, по сравнению с ГБМ–СВЗ (Gollapalli et al., 2017).

ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ СВЗ И ГЛИОМЫ

Исследования на экспериментальных моделях глиом на животных подтвердили влияние близости глиом к СВЗ как фактор, ускоряющий рост опухоли. Кроме того, эти эксперименты показали также и наличие обратного влияния опухоли на СВЗ.

Ripari с соавт. (Ripari et al., 2021) получали клетки из опухолевой ткани ГБМ пациентов, маркировали их геном зеленого флуоресцентного белка (GFP) либо люциферазы и имплантировали в проксимальные, промежуточные и дистальные относительно СВЗ области головного мозга мышей с подавленным иммунитетом. Опухоли ГБМ, расположенные проксимально к СВЗ, демонстрировали более высокий уровень пролиферации и роста, чем опухоли, удаленные от СВЗ, что сопровождалось снижением медианы выживаемости. Эта модель, таким образом, воспроизводит клинические аспекты влияния близости ГБМ

к СВЗ в отношении повышенного роста опухоли и снижения выживаемости. Кроме того, в экспериментах показано, что наличие и близость опухолевой массы негативно влияет на пролиферацию и нейрогенез в СВЗ (Ripari et al., 2021).

В других экспериментах также было показано обратное влияние глиомы на близлежащую СВЗ. Vexell с соавт. имплантировали в стриатум крыс клетки линии глиомы крыс N32, помеченные с помощью вирусной конструкции флуоресцентным белком DsRed2. По мере роста опухоли в СВЗ наблюдали падение числа пролиферирующих клеток, которому сопутствовало увеличение числа клеток, иммунореактивных по двум маркерам мигрирующих нейробластов — даблкортину (DCX) и полисиалилированных молекул адгезии нервных клеток (PSA-NCAM). Большое количество нейробластов наблюдали в зоне между опухолью и СВЗ, которая, как считают авторы, является источником этих клеток (Vexell et al., 2007). Ripari с соавт. (Ripari et al., 2021) в упомянутой выше работе подтвердили это влияние: количество пролиферирующих, прогениторных и мигрирующих клеток в СВЗ мышей-реципиентов снижалось в случае проксимальных имплантаций. В случае проксимального расположения опухоли в СВЗ снижалось также количество SOX2- и GFAP-иммунопозитивных клеток (Ripari et al., 2021).

Перекрестные влияния глиом и СВЗ на поведение незрелых мигрирующих клеток осуществляется с участием сигнальных молекул и экзосом, однако показано также явление миграции клеток между ними. Давно известно, что стволовые клетки, включая НСК, обладают тропизмом к локальным патологиям, и в частности к злокачественным опухолям мозга (Yip et al., 2003). Было показано, что НСК крысы и человека, инъецированные в экспериментально инициированную в мозге крыс глиому, экстенсивно распределяются в теле опухоли, а также «преследуют» агрессивно мигрирующие в окружающую паренхиму мозга опухолевые клетки. Будучи инъецированы поодаль (в том числе и в противоположное полушарие), НСК мигрируют по направлению к телу опухоли. Более того, НСК, введенные в кровь, также накапливались в глиоме. В этой работе также было показано, что НСК, экспрессирующие терапевтический трансгенный белок цитозиндеаминазу, сохраняют свою способность к преследованию опухолевых клеток и, таким образом, могут быть использованы в противоопухолевой терапии как средство до-

ставки антиопухолевых препаратов к терапевтическим мишеням (Aboody et al., 2000). Позднее это свойство НСК было подтверждено по отношению к спонтанно возникающим опухолям (Burns et al., 2003).

Опухолевым тропизмом обладают не только экзогенные, но и эндогенные НСК. Проводили исследование с использованием мышей, трансгенных по GFP, где ген GFP был поставлен под контроль промотора нестина, что позволяло сфокусировать его экспрессию только в нейральных стволовых клетках. Спустя 14 дней после имплантации клеток глиобластомы линии G261, меченных красным флуоресцентным белком (RFP), в полосатое тело таких трансгенных мышей, нестин-GFP-клетки окружали индуцированную RFP-опухоль в несколько слоев. Источником клеток была СВЗ (Glass et al., 2005). Интересно, что накопление эндогенных НСК и прогениторов в опухоли увеличивало продолжительность выживания подопытных животных, а кокультивирование клеток линии G261 с нейральными прогениторами замедляло размножение опухолевых клеток и вызывало их апоптоз (Glass et al., 2005). Интересно отметить, что эти результаты в совокупности с более ранними экспериментами *in vivo* (Staflin et al., 2004) и *in vitro* (Weinstein et al., 1990) противоречат упомянутым выше результатам более поздних работ, показавших ускорение роста опухолей, инокулированных ближе к СВЗ (Ripari et al., 2021).

В настоящее время известно несколько возможных механизмов, ответственных за миграцию НСК в опухоль. Одним из важнейших является хемокиновая ось SDF-1—CXCR4 (Allport et al., 2004; Ehtesham et al., 2004). Было показано, что клетки астроцитомы экспрессируют Grade-зависимое количество хемокина SDF-1 (CXCL12) и рецептора CXCR4 (Rempel et al., 2000), а клетки глиомы экспрессируют рецептор CXCR4 (Ehtesham et al., 2006). Интересно, что сами опухолевые клетки используют такой же механизм миграции при инвазии (Goffart et al., 2015; Kucia et al., 2005; Zhang et al., 2005).

В ряде работ показана также миграция ГСК в обратном направлении из опухоли в СВЗ. Kroonen с соавт. (Kroonen et al., 2011) показал, что некоторые клетки глиобластомы человека, инъецированные в полосатое тело мышей с иммунодефицитом, проявляют тропизм к СВЗ. Там, подобно собственным НСК мышей, эти

ГСК человека затем мигрировали в сторону обонятельных луковиц. В свою очередь, клетки глиобластомы, выделенные из СВЗ и обонятельных луковиц мышей-реципиентов, проявляют высокую онкогенность при вторичной инъекции в мозг другой мыши. Авторы делают вывод, что СВЗ может служить резервуаром для мигрировавших туда клеток, которые могут инициировать рак (Kroonen et al., 2011).

При иммуногистохимическом исследовании мозга семи пациентов с глиобластомой было показано, что у шести из них ГСК присутствуют в СВЗ на расстоянии от тела опухоли (Hira et al., 2021). ГСК при этом идентифицировали по экспрессии CD133, SOX2 и CD9. В отличие от них, НСК окрашивались только на CD133 и SOX2. Эти данные позволили авторам предположить, что ГСК в нише СВЗ из-за их локализации вдали от тела опухоли могут быть защищены от лучевой терапии и химиотерапии, а также от хирургической резекции и, таким образом, могут способствовать рецидиву опухоли после лечения (Hira et al., 2021).

В экспериментах *in vivo* Goffart с соавт. (Goffart et al., 2017) показали, что ГСК (клетки линии GB138), после имплантации в стриатум мыши мигрировавшие в СВЗ, были более радиорезистентны, чем ГСК, расположенные в теле опухоли. В экспериментах *in vitro* было показано, что культивирование в среде, кондиционированной клетками СВЗ, приводит к повышению радиорезистентности ГСК. Авторам удалось показать как *in vitro*, так и *in vivo*, что радиорезистентность опосредуется выделяемым НСК СВЗ хемокином CXCL12 (SDF1). Таким образом, было показано, что CXCL12 может действовать как радиозащитный хемокин для клеток GBM (Goffart et al., 2017).

Понимание роли взаимодействия СВЗ с ГБМ имеет большое клиническое значение. Представляется логичным для повышения эффективности терапии ГБМ применять облучение СВЗ для снижения вероятности рецидива опухоли. В метаанализе четырех исследований, в которых наблюдалось влияние высокой дозы облучения на прогноз, увеличение дозы облучения ипсилатеральной СВЗ значительно увеличивало выживание без прогрессирования (ВБП), но не приводило к значительному улучшению общей выживаемости (ОВ) (Susman et al., 2019). Доза облучения контралатеральной СВЗ существенно не улучшала ВБП. Gupta T. с соавт. (Gupta et

al., 2012) обнаружили повышенную ОВ с повышением дозы облучения ипсилатеральной СВЗ, но снижение ОВ с понижением дозы облучения в контралатеральной СВЗ. Rizzo с соавт. (Rizzo et al., 2014) показали, что увеличение дозы двустороннего облучения СВЗ прямо коррелирует с увеличением ВБП и ОВ.

Chen с соавт. (Chen et al., 2013) проводили метаанализ результатов лечения 116 пациентов с диагнозом ГБМ, которые после хирургического лечения подвергались адъювантной лучевой терапии с дозами до 60 Гр и сопутствующим назначением темозоломида. Анализ показал, что более высокая доза облучения ипсилатеральной СВЗ была связана с улучшением ВБП и ОВ у пациентов с ГБМ, перенесших тотальную резекцию опухоли, без негативного влияния на общий статус онкологического больного (Karnofsky Performance Status) (Chen et al., 2013).

Эти данные указывают на потенциальные возможности для применения облучения областей СВЗ с повышением показателей выживания и подчеркивают важность дальнейшего изучения взаимосвязей ГБМ и СВЗ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящем далеко не полном обзоре изложены литературные данные, которые позволяют получить представление об интенсивном молекулярном и клеточном взаимодействии ГБМ с СВЗ, существенно влияющем на процесс развития глиомы. Исследователи предполагают различные механизмы терапевтически значимых взаимодействий. Например, возможно, что миграция НСК из субвентрикулярной области дает начало глиоме, а рост опухоли «притягивает» к ней дополнительные НСК из СВЗ, увеличивая тем самым ее агрессивность. Возможно, также существуют и другие еще неизвестные виды взаимодействия, которые еще предстоит изучить и выявить их значение для роста, терапевтической устойчивости и интенсивности диссеминации (диффузно-проникающего роста) глиомы. В этих исследованиях особое внимание заслуживают стволовые клетки глиомы и СВЗ (НСК и ГСК). Также важно развивать поиск новых средств подавления пролиферативного потенциала, которые должны быть нацелены не только на ГСК тела опухоли, но и на опухолевые клетки, проникающие в СВЗ, при этом данные подходы терапии не должны затрагивать собственно НСК.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России, грант № 075–15–2021–1343.

ЛИТЕРАТУРА

- Корочкин Л. И., Ревущин А. В., Охотин В. Е. Нейральные стволовые клетки, их значение в восстановительных процессах в нервной системе. Морфология. 2005. 127 (3): 7–16.
- Павлова Г. В., Охотин В. Е., Корочкин Л. И., Ревущин А. В. Геномная регуляция судьбы нейральных стволовых клеток млекопитающих. Генетика. 2008. 44 (3): 293–299.
- Aboody K. S., Brown A., Rainov N. G., Bower K. A., Liu S., Yang W., Small J. E., Herrlinger U., Ourednik V., Black P. M., Breakefield X. O., and Snyder E. Y. Neural stem cells display extensive tropism for pathology in adult brain: evidence from intracranial gliomas. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000. 97(23): 12846–12851.
- Adeberg S., Bostel T., Konig L., Welzel T., Debus J., and Combs S. E. A comparison of long-term survivors and short-term survivors with glioblastoma, subventricular zone involvement: a predictive factor for survival? Radiat Oncol. 2014. 9 (95).
- Ahmadipour Y., Krings J. I., Rauschenbach L., Gembruch O., Chihi M., Darkwah Oppong M., Pierścianek D., Jabbarli R., Sure U., and El Hindy N. The influence of subventricular zone involvement in extent of resection and tumor growth pattern of glioblastoma. Innov Surg Sci. 2020. 5 (3–4): 127–132.
- Allport J. R., Shinde Patil V. R., and Weissleder R. Murine neuronal progenitor cells are preferentially recruited to tumor vasculature via alpha4-integrin and SDF-1alpha-dependent mechanisms. Cancer Biol Ther. 2004. 3 (9): 838–844.
- Bergmann O., Liebl J., Bernard S., Alkass K., Yeung M. S., Steier P., Kutschera W., Johnson L., Landen M., Druid H., Spalding K. L., and Frisen J. The age of olfactory bulb neurons in humans. Neuron. 2012. 74 (4): 634–639.
- Bexell D., Gunnarsson S., Nordquist J., and Bengzon J. Characterization of the subventricular zone neurogenic response to rat malignant brain tumors. Neuroscience, 2007. 147 (3): 824–832.
- Burns M. J., and Weiss W. Targeted therapy of brain tumors utilizing neural stem and progenitor cells. Front Biosci. 2003. 8: 228–234.
- Cao F., Hata R., Zhu P., Ma Y. J., Tanaka J., Hanakawa Y., Hashimoto K., Niinobe M., Yoshikawa K., and Sakanaka M. Overexpression of SOCS3 inhibits astroglialogenesis and promotes maintenance of neural stem cells. J Neurochem. 2006. 98 (2): 459–470.
- Chen L., Guerrero-Cazares H., Ye X., Ford E., McNutt T., Kleinberg L., Lim M., Chaichana K., Quinones-Hojosa A., and Redmond K. Increased subventricular zone radiation dose correlates with survival in glioblastoma patients after gross total resection. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2013. 86 (4): 616–622.
- Doetsch F., Caille I., Lim D. A., Garcia-Verdugo J. M., and Alvarez-Buylla A. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. Cell. 1999. 97 (6): 703–716.
- Ehteshami M., Winston J. A., Kabos P., and Thompson R. C. CXCR4 expression mediates glioma cell invasiveness. Oncogene. 2006. 25 (19): 2801–2806.
- Ehteshami M., Yuan X., Kabos P., Chung N. H., Liu G., Akasaki Y., Black K. L., and Yu J. S. Glioma tropic neural stem cells consist of astrocytic precursors and their migratory capacity is mediated by CXCR4. Neoplasia. 2004. 6 (3): 287–293.
- Ellingson B. M., Lai A., Harris R. J., Selfridge J. M., Yong W. H., Das K., Pope W. B., Nghiemphu P. L., Vinters H. V., Liao L. M., Mischel P. S., and Cloughesy T. F. Probabilistic radiographic atlas of glioblastoma phenotypes. AJNR Am J Neuroradiol. 2013. 34 (3): 533–540.
- Eriksson P. S., Perfilieva E., Bjork-Eriksson T., Alborn A. M., Nordborg C., Peterson D. A., and Gage F. H. Neurogenesis in the adult human hippocampus. Nat Med. 1998. 4 (11): 1313–1317.
- Ernst A., Alkass K., Bernard S., Salehpour M., Perl S., Tisdale J., Possnert G., Druid H., and Frisen J. Neurogenesis in the striatum of the adult human brain. Cell. 2014. 156 (5): 1072–1083.
- Furth J., Kahn M. C., and Breedis C. The Transmission of Leukemia of Mice with a Single Cell. Am J Cancer. 1937. 31: (276–282).
- Gage F. H., Ray J., and Fisher L. J. Isolation, characterization, and use of stem cells from the CNS. Annu Rev Neurosci. 1995. 18: 159–192.
- Glass R., Synowitz M., Kronenberg G., Walzlein J. H., Markovic D. S., Wang L. P., Gast D., Kiwit J., Kempermann G., and Kettenmann H. Glioblastoma-induced attraction of endogenous neural precursor cells is associated with improved survival. J Neurosci. 2005. 25 (10): 2637–2646.
- Gleeson J. G., Lin P. T., Flanagan L. A., and Walsh C. A. Doublecortin is a microtubule-associated protein and is expressed widely by migrating neurons. Neuron. 1999. 23 (2): 257–271.
- Goffart N., Kroonen J., Di Valentin E., Dedobbeleer M., Denne A., Martinive P., and Rogister B. Adult mouse subventricular zones stimulate glioblastoma stem cells specific invasion through CXCL12/CXCR4 signaling. Neuro Oncol. 2015. 17 (1): 81–94.
- Goffart N., Lombard A., Lallemand F., Kroonen J., Nassen J., Di Valentin E., Berendsen S., Dedobbeleer M., Willems E., Robe P., Bours V., Martin D., Martinive P., Maquet P., and Rogister B. CXCL12 mediates glioblastoma resistance to radiotherapy in the subventricular zone. Neuro Oncol. 2017. 19 (1): 66–77.
- Gollapalli K., Ghantasala S., Kumar S., Srivastava R.,

- Rapole S., Moiyadi A., Epari S., and Srivastava S. Subventricular zone involvement in Glioblastoma – A proteomic evaluation and clinicoradiological correlation. *Sci Rep*. 2017. 7 (1): 1449.
- Gupta T., Nair V., Paul S.N., Kannan S., Moiyadi A., Epari S., and Jalali R. Can irradiation of potential cancer stem-cell niche in the subventricular zone influence survival in patients with newly diagnosed glioblastoma? *J Neurooncol*. 2012. 109 (1): 195–203.
- Hira V.V.V., Molenaar R.J., Breznik B., Lah T., Aronica E., and Van Noorden C.J.F. Immunohistochemical Detection of Neural Stem Cells and Glioblastoma Stem Cells in the Subventricular Zone of Glioblastoma Patients. *J Histochem Cytochem*. 2021. 69 (5): 349–364.
- Ichimura K., Ohgaki H., Kleihues P., and Collins V.P. Molecular pathogenesis of astrocytic tumours. *J Neurooncol*. 2004. 70 (2): 137–160.
- Ignatova T.N., Kukekov V.G., Laywell E.D., Suslov O.N., Vrionis F.D., and Steindler D.A. Human cortical glial tumors contain neural stem-like cells expressing astroglial and neuronal markers in vitro. *Glia*. 2002. 39 (3): 193–206.
- Jafri N.F., Clarke J.L., Weinberg V., Barani I.J., and Cha S. Relationship of glioblastoma multiforme to the subventricular zone is associated with survival. *Neuro Oncol*. 2013. 15 (1): 91–96.
- Kam M., Curtis M.A., McGlashan S.R., Connor B., Nannmark U., and Faull R.L. The cellular composition and morphological organization of the rostral migratory stream in the adult human brain. *J Chem Neuroanat*. 2009. 37 (3): 196–205.
- Kim J.E., Park J.E., Park S.Y., Kim Y.H., Hong C.K., Kim J.H., and Kim H.S. Defining subventricular zone involvement to predict the survival of patients in isocitrate dehydrogenase-wild type glioblastoma: validation in a prospective registry. *Eur Radiol*. 2023. 33 (9): 6448–6458.
- Kimura M., Lee Y., Miller R., and Castillo M. Glioblastoma multiforme: relationship to subventricular zone and recurrence. *Neuroradiol J*. 2013. 26 (5): 542–547.
- Kornack D.R., and Rakic P. The generation, migration, and differentiation of olfactory neurons in the adult primate brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001. 98 (8): 4752–4757.
- Kroonen J., Nassen J., Boulanger Y.G., Provenzano F., Capraro V., Bours V., Martin D., Deprez M., Robe P., and Rogister B. Human glioblastoma-initiating cells invade specifically the subventricular zones and olfactory bulbs of mice after striatal injection. *Int J Cancer*. 2011. 129 (3): 574–585.
- Kucia M., Reca R., Miekus K., Wanzeck J., Wojakowski W., Janowska-Wieczorek A., Ratajczak J., and Ratajczak M.Z. Trafficking of normal stem cells and metastasis of cancer stem cells involve similar mechanisms: pivotal role of the SDF-1-CXCR4 axis. *Stem Cells*. 2005. 23 (7): 879–894.
- Levison S.W., and Goldman J.E. Both oligodendrocytes and astrocytes develop from progenitors in the subventricular zone of postnatal rat forebrain. *Neuron*. 1993. 10 (2): 201–212.
- Liu Q., Sanai N., Jin W.N., La Cava A., Van Kaer L., and Shi F.D. Neural stem cells sustain natural killer cells that dictate recovery from brain inflammation. *Nat Neurosci*. 2016. 19 (2): 243–252.
- MacLeod G., Bozek D.A., Rajakulendran N., Monteiro V., Ahmadi M., Steinhart Z., Kushida M.M., Yu H., Coutinho F.J., Cavalli F.M.G., Restall I., Hao X., Hart T., Luchman H.A., Weiss S., Dirks P.B., and Angers S. Genome-Wide CRISPR-Cas9 Screens Expose Genetic Vulnerabilities and Mechanisms of Temozolomide Sensitivity in Glioblastoma Stem Cells. *Cell Rep*. 2019. 27 (3): 971–986 e979.
- Matarredona E.R., and Pastor A.M. Neural Stem Cells of the Subventricular Zone as the Origin of Human Glioblastoma Stem Cells. Therapeutic Implications. *Front Oncol*. 2019. 9: 779.
- Mattei V., Santilli F., Martellucci S., Delle Monache S., Fabrizi J., Colapietro A., Angelucci A., Festuccia C. The Importance of Tumor Stem Cells in Glioblastoma Resistance to Therapy. *Int J Mol Sci*. 2021. 22 (8): 3863. doi: 10.3390/ijms22083863.
- Morshead C.M., Craig C.G., and van der Kooy D. In vivo clonal analyses reveal the properties of endogenous neural stem cell proliferation in the adult mammalian forebrain. *Development*. 1998. 125 (12): 2251–2261.
- Pavlova G., Kolesnikova V., Samoylenkova N., Drozd S., Revishchin A., Shamadykova D., Usachev D.Y., and Kopylov A. A Combined Effect of G-Quadruplex and Neuro-Inducers as an Alternative Approach to Human Glioblastoma Therapy. *Front Oncol*. 2022. 12: 880740.
- Quinones-Hinojosa A., Sanai N., Soriano-Navarro M., Gonzalez-Perez O., Mirzadeh Z., Gil-Perotin S., Romero-Rodriguez R., Berger M.S., Garcia-Verdugo J.M., and Alvarez-Buylla A. Cellular composition and cytoarchitecture of the adult human subventricular zone: a niche of neural stem cells. *J Comp Neurol*. 2006. 494 (3): 415–434.
- Rempel S.A., Dudas S., Ge S., and Gutierrez J.A. Identification and localization of the cytokine SDF1 and its receptor, CXCR4 chemokine receptor 4, to regions of necrosis and angiogenesis in human glioblastoma. *Clin Cancer Res*. 2000. 6 (1): 102–111.
- Revishchin A.V., Korochkin L.I., Okhotin V.E., Pavlova G.V. Neural stem cells in the mammalian brain. *Int Rev Cytol*. 2008. 265: 55–109.
- Ripari L.B., Norton E.S., Bodoque-Villar R., Jeanneret S., Lara-Velazquez M., Carrano A., Zarco N., Vazquez-Ramos C.A., Quinones-Hinojosa A., de la Rosa-Prieto C., and Guerrero-Cazares H. Glioblastoma Proximity to the Lateral Ventricle Alters Neurogenic Cell Populations of the Subventricular Zone. *Front Oncol*. 2021. 11: 650316.
- Rizzo A.E., Yu J., Suh J., Emch T., Murphy E., Ahlu-

- walia M., Reddy C., and S. Chao. Investigating the Relationship Between Radiation Dose to Neural Stem Cell Niches and Survival in GBM. *Int J Radiat Oncol* 2014. 90 (1S): S283–S284.
- Rousselot P., Lois C., and Alvarez-Buylla A. Embryonic (PSA) N-CAM reveals chains of migrating neuroblasts between the lateral ventricle and the olfactory bulb of adult mice. *J Comp Neurol*. 1995. 351(1): 51–61.
- Sanai N., Alvarez-Buylla A., and Berger M.S. Neural stem cells and the origin of gliomas. *N Engl J Med*. 2005. 353 (8): 811–822.
- Sanai N., Berger M.S., Garcia-Verdugo J.M., and Alvarez-Buylla A. Comment on “Human neuroblasts migrate to the olfactory bulb via a lateral ventricular extension”. *Science*. 2007. 318 (5849): 393; author reply 393.
- Sanai N., Tramontin A.D., Quinones-Hinojosa A., Barbaro N.M., Gupta N., Kunwar S., Lawton M.T., McDermott M.W., Parsa A.T., Manuel-Garcia Verdugo J., Berger M.S., and Alvarez-Buylla A. Unique astrocyte ribbon in adult human brain contains neural stem cells but lacks chain migration. *Nature*. 2004. 427 (6976): 740–744.
- Staflin K., Honeth G., Kalliomaki S., Kjellman C., Edvardsen K., and Lindvall M. Neural progenitor cell lines inhibit rat tumor growth in vivo. *Cancer Res*. 2004. 64 (15): 5347–5354.
- Susman S., Leucuta D.C., Kacso G., and Florian S.I. High dose vs low dose irradiation of the subventricular zone in patients with glioblastoma—a systematic review and meta-analysis. *Cancer Manag Res*. 2019. 11: 6741–6753.
- Wang C., Liu F., Liu Y.Y., Zhao C.H., You Y., Wang L., Zhang J., Wei B., Ma T., Zhang Q., Zhang Y., Chen R., Song H., Yang Z. Identification and characterization of neuroblasts in the subventricular zone and rostral migratory stream of the adult human brain. *Cell Res*. 2011. 21 (11): 1534–1550.
- Wang C., You Y., Qi D., Zhou X., Wang L., Wei S., Zhang Z., Huang W., Liu Z., Liu F., Ma L., and Yang Z. Human and monkey striatal interneurons are derived from the medial ganglionic eminence but not from the adult subventricular zone. *J Neurosci*. 2014. 34 (33): 10906–10923.
- Weinstein D.E., Shelanski M.L., and Liem R.K. C17, a retrovirally immortalized neuronal cell line, inhibits the proliferation of astrocytes and astrocytoma cells by a contact-mediated mechanism. *Glia*. 1990. 3 (2): 130–139.
- Yip S., Aboody K.S., Burns M., Imitola J., Boockvar J.A., Allport J., Park K.I., Teng Y.D., Lachyankar M., McIntosh T., O'Rourke D.M., Khoury S., Weissleder R., Black P.M., Weiss W., and Snyder E.Y. Neural stem cell biology may be well suited for improving brain tumor therapies. *Cancer J*. 2003. 9 (3): 189–204.
- Zhang J., Sarkar S., and Yong V.W. The chemokine stromal cell derived factor-1 (CXCL12) promotes glioma invasiveness through MT2-matrix metalloproteinase. *Carcinogenesis*. 2005. 26 (12): 2069–2077.
- Zhang S., and Cui W. Sox2, a key factor in the regulation of pluripotency and neural differentiation. *World J Stem Cells*. 2014. 6 (3): 305–311.
- Zhang S., Zhao F., Zhou T., Liu D., Yao X., Fu W., Liu Z., Lan C., Lai Z., Liu C., Li H., Li Y., Hu S., Yin Y., Tan L., Li W., Li F., Hu R., and Feng H. Combination of the Distance From Tumor Edge to Subventricular Zone and IDH Mutation Predicts Prognosis of Patients With Glioma. *Front Oncol*. 2021. 11: 693693.

PARTICIPATION OF THE SUBVENTRICULAR ZONE OF THE BRAIN IN THE DEVELOPMENT OF BRAIN GLIOMA

A. V. Revishchin^{a, #}, G. V. Pavlova^{a, b, c}

^aInstitute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

^bN.N. Burdenko National Medical Research Center of Neurosurgery, Ministry of Healthcare of Russia, Moscow, Russia

^cSechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

[#]e-mail: revishchin@mail.ru

Glioblastoma (GBM) is a malignant tumor with an average survival rate of 15–16 months with standard treatment; however, cases of successful treatment provide hope that a better understanding of the pathology will improve prognosis. Glial tumors contain clonogenic cells (cells capable of forming colonies in a culture medium) with a high proliferative potential, and their descendants have a wide range of possible differentiation; these clonogenic cells are currently considered as glioma stem cells (GSCs). In normal and pathological conditions, there are zones in the adult brain that contain proliferating neural stem cells (NSCs) and their descendants — progenitor cells that have begun to differentiate. One such zone lying on the lateral wall of the lateral ventricle, called the subventricular zone of the lateral ventricle (SVZ), has attracted much attention due to its importance for gliomagenesis. Numerous studies have shown that the intense exchange of signaling molecules and cells between the GBM and the SVZ leads to accelerated tumor growth and an increased risk of relapse. Research results indicate the possibility of developing new, more effective strategies to combat this dangerous disease, taking into account knowledge about the role of SVZ in the development of this pathology.

Keywords: glioma, glioblastoma, subventricular zone, stem cell, neurogenesis, subventricular zone

УДК 616–006.484.04

ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ЗРИТЕЛЬНОГО НЕРВА

© 2024 г. А. В. Ревущин^{1,*}, Г. В. Павлова^{1,2,3}, А. Н. Шкарубо^{2,4}

¹ФГБУН "Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии Российской академии наук", Москва, Россия

²ФГАУ «НМИЦ нейрохирургии им. академика Н. Н. Бурденко», Москва, Россия

³Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России, Москва, Россия

⁴ФГБОУ ДПО РМАНПО Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

*e-mail: revishchin@mail.ru

Поступила в редакцию 18.10.2023 г.

После доработки 01.12.2023 г.

Принята к публикации 01.12.2023 г.

Восстановление зрительной функции после повреждения или полного разрушения зрительного нерва у взрослых пациентов имеет много естественных барьеров на пути нейрорегенерации. Исследования по восстановлению зрения были сосредоточены на поддержании ганглиозных клеток сетчатки (ГКС), стимулировании роста аксонов по направлению к мозгу и восстановлении их правильных синаптических связей. К сожалению, аксоны ГКС млекопитающих в обычных условиях не регенерируют после повреждения и в конечном итоге отмирают. В обзоре мы резюмируем известные в настоящее время механизмы выживания ГКС и регенерации аксонов у млекопитающих, включая специфические внутренние сигнальные пути, ключевые факторы транскрипции, репрограммирующие гены, факторы регенерации, связанные с воспалением, терапию стволовыми клетками. Мы также рассматриваем современное понимание явлений, препятствующих регенерации зрительного нерва, и возможные пути преодоления этих препятствий. Полученные в последние десятилетия важнейшие результаты исследований могут оказаться информативными для разработки методов лечения поврежденной зрительной системы.

Ключевые слова: регенерация аксонов, повреждение зрительного нерва, ганглиозные клетки сетчатки, жизнеспособность

DOI: 10.31857/S0044467724010044

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВБЧ	– верхние бугорки четверохолмия
ГКС	– ганглиозные клетки сетчатки
ЗН	– зрительный нерв
ООК	– обонятельные оболочечные клетки (olfactory ensheathing cells)
ПН	– периферический нерв
ЦНС	– центральная нервная система
ЭСК	– эмбриональная стволовая клетка
AAV	– аденоассоциированный вирус
Akt	– протеинкиназа В, играет ключевую роль в пути PI3K/Akt
Atoh7	– транскрипционный фактор, маркер ГКС
Bax	– регулятор апоптоза (ускоряет апоптоз)
Bcl-2	– внутриклеточный противоапоптотический фактор
BDNF	– нейротрофический фактор мозга
BH3-only	– белок семейства BCL-2 – эффектор митохондриального апоптоза
BMP	– костный морфогенетический белок
c-Jun	– онкогенный фактор транскрипции
c-Myc	– белок – блокатор апоптоза, опосредованного белком p53
CNTF	– цилиарный нейротрофический фактор, полипептидный гормон
DLK/LZK	– регуляторы дегенерации нейронов и роста аксонов
EGFR	– рецептор эпидермального фактора роста
FasL	– Fas-лиганд – белок семейства факторов некроза опухолей
GDNF	– нейротрофический фактор глиальной клеточной линии
GFRalpha3	– рецептор альфа-3 семейства GDNF

Jak	— янус-киназа — тирозинкиназа
LIF	— фактор ингибирования лейкозных клеток
mTOR	— серин-треониновая киназа, регулятор роста и пролиферации
NGF	— фактор роста нервов
p53	— транскрипционный фактор, супрессор злокачественных опухолей
PI3K	— фосфоинозитид-3-киназа
PirB	— парный иммуноглобулин-подобный рецептор В
PTEN	— фосфатаза и гомолог тензина — регулятор клеточного цикла
REST	— фактор подавления транскрипции
RhoA	— трансформирующий клеточный сигнальный белок
ROCK	— белок серин / треонинкиназа
SOCS3	— супрессор цитокиновой сигнализации 3
VGF	— белок — регулятор энергетического гомеостаза и синаптической пластичности

ВВЕДЕНИЕ

Потеря зрения приводит к тяжелой инвалидности, а также пагубно влияет на качество жизни. По оценкам The lancet global health commission, в 2020 г. во всем мире 43 млн человек были полностью слепы (Burton et al., 2021). В настоящее время не существует лечения потери зрения из-за атрофии зрительного нерва или потери ганглиозных клеток сетчатки, которые могут быть вызваны терминальной стадией глаукомы (Tham et al., 2014), отеком диска зрительного нерва (Ghaffarieh et al., 2012), травматической атрофией зрительного нерва (Ellenberg et al., 2009), опухолью, компрессией, инфекцией (Behbehani, 2007; Ghaffarieh and Levin, 2012; Prasad et al., 2010) и другими заболеваниями.

Восстановление зрительной функции после повреждения или полного разрушения зрительного нерва у взрослых пациентов имеет много естественных барьеров на пути нейрорегенерации. Разработка клинически эффективных методов лечения заболеваний зрительного нерва потребует взаимодополняющих решений по преодолению этих барьеров.

Ганглиозные клетки сетчатки (ГКС) являются нейронами центральной нервной системы (ЦНС) и как таковые в обычных условиях не регенерируют аксоны после повреждения зрительного нерва. У взрослых млекопитающих разрыв аксонов ГКС в зрительном нерве (ЗН) приводит к гибели многих аксотомированных нейронов и неспособности выживших клеток восстановить свои аксоны (Grafstein et al., 1982; Richardson et al., 1982). Через 1–3 дня после внутриглазничной перерезки зрительного нерва мыши количество ГКС уменьшалось примерно на 20%, и менее 10% ГКС выживают через 14 дней (Allcutt et al., 1984; Berkelaar et al., 1994; Fischer et al., 2004; Villegas-Perez et al., 1993). Стратегии, появившиеся после разработки новых методов прослежи-

вания нервных связей и иммуногистохимических методов, выявили способность к регенерации и образованию синапсов в ЦНС взрослых млекопитающих. Например, Aguayo и соавт. использовали экспериментальный подход, основанный на концепции, согласно которой регенерация в периферической нервной системе обусловлена перmissive средой, обеспечиваемой шванновскими клетками, присутствующими в нервной трубке (Aguayo et al., 1991; So et al., 1985; Vidal-Sanz et al., 1987). Аксоны ГКС отрастали до своей нормальной длины (2 см) через 4–18 недель после того, как сегменты аутологичных периферических нервов (ПН) были вставлены в сетчатку взрослых крыс (So and Aguayo, 1985). В следующих экспериментах один конец аутологичного ПН длиной 4 см помещали в оболочку ЗН, прижимая и пришивая к орбитальной культе рассеженного нерва, а второй (дистальный) конец имплантировали в передние бугорки четверохолмия (ВБЧ) (Vidal-Sanz et al., 1987). Аксоны аксотомированных ганглиозных клеток сетчатки прорастали через весь трансплантат, а некоторые из них проникали в ВБЧ, образуя терминальные ответвления на расстоянии до 500 мкм от конца трансплантата (Vidal-Sanz et al., 1987). Индуцированные светом электрические ответы в нейронах ВБЧ вблизи трансплантата указывают на то, что регенерирующие аксоны аксотомированных ганглиозных клеток сетчатки могут устанавливать функциональные связи с нейронами ВБЧ взрослых млекопитающих (Keirstead et al., 1989; Keirstead et al., 1985). Если дистальный конец трансплантата ПН имплантировали в оливарное претектальное ядро, в глазу может возникнуть зрачковый рефлекс, что указывает на регенерацию обоих эфферентов сетчатки на оливарное претектальное ядро, а также проекций от цилиарного ганглия на мышцу сфинктера радужной оболочки глаза (Whiteley et al., 1998). Эксперименты *in vitro* и *in vivo* показывали, что регенерация через сам зрелый зрительный нерв очень ограничена из-за недопустимых условий субстрата в дифференциро-

ванных зрительных нервах (Richardson et al., 1982; Schwab et al., 1985). Однако оказалось, что интенсивный рост аксонов ГКС в ПН обусловлен в первую очередь трофическими факторами, которые экспрессируются в шванновских клетках ПН (Berry et al., 1996). Авторы использовали модель раздавливания зрительного нерва с последующим проследиванием роста аксонов ГКС с помощью ретроградного и антероградного аксонного транспорта. У животных, в стекловидное тело которых была введена ткань ПН, волокна ГКС пересекали очаг поражения и росли дистально. У контрольных ложно оперированных животных прорастания через очаг не наблюдали. Более того, при определенных условиях регенерированные волокна ГКС пересекают хиазму и формируют правильные соединения, избегая целей, несоответствующих их функции (Lim et al., 2016).

Таким образом, ранние эксперименты показали, что ГКС обладают внутренней способностью регенерировать аксоны, если внешняя среда благоприятна (So and Aguayo, 1985), однако для восстановления зрительной функции пациентов до значимого уровня необходимо решить многие проблемы. Разрабатываемые методы должны обеспечить наличие функционально значимого количества ГКС, жизнеспособных в достаточной мере для регенерации разорванных аксонов. Необходимо также найти способы интенсифицировать процесс регенерации аксонов у достаточно большого количества ГКС. В связи с этим предстоит нейтрализовать факторы, тормозящие регенерацию волокон в ЦНС (Silver et al., 2015). Не менее важной задачей является обеспечение ретинопитической упорядоченности повторного подключения к соответствующим целям во время регенерации. В настоящем, далеко не полном обзоре изложены основные результаты исследований по этим вопросам, которые дают надежду на значительное продвижение в решении проблемы восстановления зрения.

ПОДДЕРЖАНИЕ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ АКСОТОМИРОВАННЫХ ГКС

Большая часть изложенных здесь знаний относительно дегенерации и регенерации ГКС и их аксонов получены с помощью экспериментальных моделей, основанных на повреждении ЗН у грызунов, но часть информации получена на других моделях, например травмы спинного мозга. Чаше всего повреждение ЗН включает контролируемое раздавливание позади глазного яблока. Почти все аксоны при этом разрываются, а оболочка ЗН и сосудистая сеть, снабжающая ЗН, не повреждаются (Li et al.,

1999). Комплексный критический обзор моделей и методов *in vitro*, *ex vivo* и *in vivo*, которые использовались для расширения знаний о регенерации аксонов в ретинофугальной системе у грызунов и рыбок *данио* соответственно, дан в работе Bollaerts с соавт. (Bollaerts et al., 2018).

Механизм апоптоза в ГКС может быть связан с прямым разрушением целостности мембраны после механического повреждения аксонов, отсутствием трофических факторов, вызванным прерыванием аксонального транспорта, потерей питательной поддержки после ишемии. Многие гены участвуют в регуляции апоптоза и выживании ГКС после повреждения ЗН, включая *Bcl-2/Bax*, *DLK/LZK*, *c-Jun*, *p53*, *каспазы* и *FasL*. Белки, кодируемые этими генами, образуют сложную сеть переключателей, которые определяют выживание клеток и/или апоптоз. Семейство генов *Bcl-2* включает антиапоптотические гены (*Bcl-2*, *Bcl-xl*), проапоптотические гены (*Bax*) и гены *BH3-only* (Maes et al., 2017). В сетчатке баланс между *Bax* и *Bcl-2* обеспечивает выживание ГКС после травмы. Сверхэкспрессия *Bcl-2* или делеция гена *Bax* укрепляют жизнеспособность ГКС после повреждения зрительного нерва (Bonfanti et al., 1996; Donahue et al., 2020). Эти результаты показывают, что гибель ГКС можно замедлить и таким образом продлить терапевтическое окно для эффективного вмешательства.

Нейротрофические факторы хорошо известны своей ролью в предотвращении апоптоза и поддержке жизнеспособности нейронов (Cui, 2006). Гибель ГКС после повреждения аксона частично может происходить из-за снижения ретроградного транспорта нейротрофических факторов (Harrington et al., 2013). Есть надежда, что обработка сетчатки нейротрофическими факторами позволит повысить жизнеспособность ГКС после повреждения ЗН. Действительно, интравитреальное введение экзогенных NGF и BDNF задерживает острую гибель ГКС после повреждения зрительного нерва у грызунов (Benowitz et al., 2010). Однако после введения BDNF или CNTF не наблюдалось улучшения в регенерации аксонов в трансплантате периферического нерва, по сравнению с контролем (Mansour-Robaey et al., 1994; Weibel et al., 1995).

Интравитреальная инъекция GDNF может значительно ослаблять дегенерацию ГКС дозозависимым образом. Более того, комбинированное лечение GDNF и BDNF показало лучшую защиту, чем использование каждого фактора по отдельности (Lindqvist et al., 2004; Yan et al., 1999).

Интравитреальная инъекция нервных стволовых клеток, трансфицированных вирусными векторами GDNF или CNTF после повреждения зрительного нерва, увеличивала количество выживших ГКС, но только при совместном введении GDNF и CNTF (Flachsbarth et al., 2018).

Кроме перечисленных выше, благотворное влияние на жизнеспособность ГКС после повреждения ЗН при интравитреальном введении оказывали:

1. Пептид VGF (индуцируемый фактором роста нервов полипептид AQEE-30) (Takeuchi et al., 2018).
2. Фактор, ингибирующий лейкоз (LIF) (Yang et al., 2018).
3. Геннотерапевтическая конструкция на основе аденоассоциированного вируса (AAV) AAV2 *TrkB-2A-mBDNF*, увеличивающая экспрессию не только BDNF, но и его рецептора TrkB, что позволяет избежать подавления рецептора, которое наблюдается при лечении только AAV2 BDNF (Osborne et al., 2018).
4. Донор H_2S морфолин-4-ий-метоксифенилморфолинофосфинодитиоата GYY4137 (Liu et al., 2017).
5. Пептид BMP4 (Thompson et al., 2019).
6. Липоксины LXA4 и LXB4 – небольшие липидные медиаторы, выявленные и выделенные из среды, кондиционированной культурой астроцитов сетчатки (Livne-Bar et al., 2017).
7. TAK-242 (ингибитор Toll-подобного рецептора 4) (Nakano et al., 2017).

Идет ряд клинических испытаний для проверки эффективности устойчивых нейротрофических факторов в предотвращении потери ГКС при глаукоме, неартериальной передней ишемической невропатии зрительного нерва и травматической оптической невропатии (Gokoffski et al., 2020).

Ингибирование экспрессии *каспазы-2* с помощью химически модифицированной короткой интерферирующей рибонуклеиновой кислоты (миР-НК) при интравитреальном введении значительно повышало выживаемость ГКС в течение по меньшей мере 30 дней (Ahmed et al., 2011).

Системное и интравитреальное введение давно используемого в клинике противосудорожного пре-

парата вальпроата снижает апоптоз ганглиозных клеток сетчатки у крыс после повреждения зрительного нерва (Pan et al., 2023; Zhang et al., 2023).

ИНТЕНСИФИКАЦИЯ РЕГЕНЕРАЦИИ АКСОНОВ ГКС

Само по себе выживание ГКС не означает обеспечения восстановления зрения при потере нейронных связей. Следовательно, содействие регенерации аксонов ЗН имеет решающее значение для восстановления нейронных связей с мозгом для передачи зрительного сигнала. Однако в отличие от ПНС поврежденные аксоны в ЗН лишены способности к спонтанной регенерации. Выявление способствующих регенерации факторов и лежащих в их основе молекулярных механизмов поможет открытию новых стратегий лечения и восстановления зрения. Понимание того, когда клинически применять стратегию регенерации аксонов, требует понимания прогрессирования дегенерации после повреждений аксонов ГКС.

Сразу после травмы ЗН кальций (Ca^{2+}) попадает в место повреждения через потенциал-зависимые кальциевые каналы (George et al., 1995). Удаление этого внеклеточного Ca^{2+} хелатором задерживает дегенерацию аксонов (George et al., 1995). Повышенное содержание Ca^{2+} активирует кальпаины, цистеиновые протеазы, с последующей аксональной дегенерацией путем деградации цитоскелета (Goll et al., 2003). В спинном мозге процесс фрагментации аксонов можно полностью блокировать ингибиторами кальпаина (Kerschensteiner et al., 2005). Вскоре после травмы в проксимальном (ближайшем к глазу) и дистальном сегментах аксонов начинаются дегенеративные процессы. Дистальные сегменты аксонов фрагментируются в результате процесса, называемого валлеровской дегенерацией, при котором цитоскелет дегенерирует, аксон набухает и фрагментируется, миелин распадается на эллиптические структуры (Beirowski et al., 2010). Проксимальный сегмент аксона образует эллиптическую ретракционную луковицу, которая постепенно увеличивается, и аксон отмирает, сокращаясь по направлению к коме (Blanquie et al., 2018). В первый день после травмы сигналы молекулярного повреждения передаются от места повреждения аксона в тело ГКС (Shin et al., 2012). В сетчатке начинается воспалительная реакция, которая может влиять на неврологический исход как положительно, так и отрицательно (Kreutzberg, 1996). Чтобы активировать прорепаративные каскады, воспалительная реакция должна быть достаточно сильной, но ниже порога, при котором активируются образование рубца и апоптоз. Известно, что внутриглазное

воспаление, вызванное либо инъекцией зимозана в глаз, либо в результате повреждения хрусталика, бывает достаточно для того, чтобы интенсифицировать регенерацию аксонов ГКС и прорастание через поврежденный участок ЗН (Leon et al., 2000; Yin et al., 2003). Влияние внутриглазного воспаления на регенерацию ЗН опосредуется онкомодулином, который накапливается в сетчатке до заметных уровней через 12–24 ч после индукции воспалительной реакции (Kurimoto et al., 2010; Yin et al., 2009; Yin et al., 2006). Yin с соавт. показали, что интравитреальная инъекция онкомодулина и аналога циклического аденозинмонофосфата (цАМФ) усиливала регенерацию зрительного нерва в 5–7 раз больше, чем цАМФ без онкомодулина (Yin et al., 2009; Yin et al., 2006).

Данные Мюллера с соавт. (Muller et al., 2007) показывают, что CNTF, выделяемый из астроцитов после повреждения ЗН, также участвует в нейропротекторном и стимулирующем рост аксонов эффекте повреждения хрусталика или инъекции зимозана. Эти результаты могут привести к разработке терапевтического принципа, способствующего регенерации аксонов в ЦНС в целом (Muller et al., 2007).

Регенеративные способности ГКС различаются для разных стадий развития. В опытах *in vitro* ГКС экплантата эмбриональной сетчатки обильно прорастали в экплантат тектума, в отличие от ГКС постнатальной сетчатки (Chen et al., 1995). Следовательно, после рождения происходит переключение клеточных программ, имеющих отношение к регенерации аксонов. Достижения молекулярной биологии в методах генного манипулирования позволили выявить несколько важных путей реализации внутренней регенеративной способности ГКС, заблокированных у взрослых животных. К ним относится отрицательный регулятор сигнального пути рапамицина (mTOR) – PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome). Сигнальный путь PTEN/PI3K/Akt/mTOR участвует в регуляции апоптоза, роста аксонов и пролиферации клеток и метаболизма (Mendoza et al., 2011). Делеция *PTEN* в ГКС взрослых млекопитающих методом условного нокаута с помощью вирусной конструкции *in vivo* способствует интенсивной регенерации аксонов после повреждения ЗН (Park et al., 2008). Другим примером может служить сигнальный путь *янус-киназа / активатор транскрипции*, участвующий в передаче сигнала 3 / супрессор передачи сигнала цитокина 3 – JAK/STAT3/SOCS3 (Krebs et al., 2001; Smith et al., 2009). SOCS3 активируется постнатально и подавляет способность

ГКС активировать путь Jak/STAT (Park et al., 2009; Qin et al., 2013; Smith et al., 2009). Удаление супрессора SOCS3 во взрослых ганглиозных клетках сетчатки (ГКС) способствует усиленной регенерации поврежденных аксонов зрительного нерва (Smith et al., 2009).

Многие молекулы, ингибирующие рост, облегчают свое действие за счет изменения сигнального пути RhoA/ROCK, который является важным регулятором актинового цитоскелета. Активация этого пути приводит к быстрому коллапсу конуса роста и ингибированию регенерации аксонов (Abbhi et al., 2020). Ингибирование RhoA/ROCK может быть потенциальной терапевтической стратегией, способствующей регенерации ЗН (Abbhi and Piplani, 2020; Cen et al., 2017; Zhang et al., 2020). Tan с соавт. продемонстрировали, что эритропоэтин и ингибитор ROCK Y-27632 значительно улучшают выживаемость ГКС и регенерацию аксонов *in vivo*, и эффекты этих агентов аддитивны (Tan et al., 2012).

Таким образом, модуляция негативных регуляторов передачи сигналов может быть эффективной стратегией стимулирования регенерации аксонов после повреждения ЗН.

Недавние исследования подтвердили показанную ранее эффективность модуляции факторов транскрипции для усиления регенерации аксонов ЦНС и ЗН в частности (Moore et al., 2011). Так, Cheng с соавт. идентифицировали фактор транскрипции RE1-Silencing (REST), также известный как Neuron-Restrictive Silencer Factor (NRSF), как прогнозируемый вышестоящий супрессор про-регенеративной генной программы (Cheng et al., 2022). Взрослые мыши, несущие специфичные для ГКС делеции *REST* или экспрессирующие доминантно-негативный мутантный *REST*, демонстрируют улучшенную регенерацию ЗН после его разрушения. Это сопровождается активацией генов, связанных с регенерацией, в ГКС (Cheng et al., 2022).

Исследование протеома ГКС в норме и после перерезки ЗН выявило сеть молекулярных путей, которые изменены в поврежденных ГКС. В частности, было показано, что транскрипционный фактор с-Мус, который считается ключевым регулятором анаболического метаболизма, подавляется при повреждении ЗН. Принудительная гиперэкспрессия *с-тус* в ГКС до или после травмы способствует значительному повышению жизнеспособности ГКС и регенерации аксонов после повреждения ЗН (Belin et al., 2015).

Как указано выше, некоторые нейротрофические факторы демонстрируют положительное влияние на жизнеспособность ГКС после разрушения ЗН, однако далеко не все из них активируют регенерацию аксонов ЗН. Артемин, специфический лиганд рецептора альфа-3 семейства GDNF (GFRalpha3), оказывает нейропротекторное действие на аксотомированные ГКС *in vivo* и *in vitro* посредством активации внеклеточных сигнальных путей киназы и фосфоинозитид-3-киназы-Akt. Артемин также оказывает существенное влияние на регенерацию аксонов в ГКС как *in vivo*, так и *in vitro*, тогда как другие члены семейства GDNF (Нейртин, GDNF) этого не делают (Omodaka et al., 2014).

Интравитреальное и капельное (на поверхность глаза) введение рекомбинантного человеческого NGF может противодействовать эффектам разрушения ЗН у взрослых крыс. Было показано, что оба метода введения уменьшают потерю ГКС и стимулируют возобновление роста аксонов после раздавливания ЗН (Mesentier-Louro et al., 2019).

Повышенная экспрессия адапторной молекулы протрудина, которая обычно обнаруживается на низких уровнях в нерегенерирующих нейронах, обеспечивает регенерацию центральной нервной системы как *in vitro* в первичной культуре кортикальных нейронов, так и *in vivo* в поврежденном ЗН взрослого животного (Petrova et al., 2020).

Увеличение активности ГКС за счет зрительной стимуляции может способствовать регенерации аксонов после повреждения ЗН (Li et al., 2016; Lim et al., 2016). Если при этом зрительная стимуляция сочетается с экспрессией положительного регулятора передачи сигналов mTOR, полученной с помощью вирусного вектора, аксоны ГКС регенерируют на больших расстояниях, проходят через хиазму, иннервируют мозг и даже частично восстанавливают зрительную функцию (Lim et al., 2016).

ПРОТИВОДЕЙСТВИЕ ИНГИБИТОРАМ РОСТА АКСОНОВ В ЗРИТЕЛЬНОМ НЕРВЕ

В ответ на повреждение ЗН покоящиеся астроциты в сетчатке и зрительном нерве активируются, демонстрируют гипертрофию, активируют пролиферацию, экспрессируют промежуточные филаменты (GFAP) и образуют глиальный рубец (Dezawa et al., 1999). Глиальные рубцы создают механический барьер для роста аксонов ГКС. Менее активное образование глиального рубца у животных с нокаутом по митохондриальной *аргиназе-2* коррелировало с интенсификацией регенерации аксонов ГКС, по срав-

нению с нормальными животными, как *in vitro*, так и *in vivo* (Xu et al., 2018). Ингибирующие молекулы, связанные с миелином и глиальным рубцом, ограничивают регенерацию аксонов взрослой ЦНС. На моделях глиального рубца *in vitro* и после повреждения ЗН (ONC) у взрослых мышей было показано, что арилсульфатаза В снижает ингибирующее действие содержащихся в глиальном рубце гликозаминогликанов и активирует регенерацию аксонов ГКС (Pearson et al., 2018).

После повреждений ЗН в астроцитах происходит активация рецептора эпидермального фактора роста EGFR, способствуя образованию глиального рубца (Liu et al., 2006). Интересно, что ингибирование EGFR предотвращает активацию астроцитов (Liu et al., 2006). Введение в область разрушения ЗН геля, насыщенного ингибиторами киназной функции рецептора эпидермального фактора роста EGFR, позволяет ослабить действие миелиновых ингибиторов регенерации аксонов ГКС (Koprivica et al., 2005). В этих экспериментах использовали селективные ингибиторы тирозинкиназной активности EGFR PD168393, AG1478, и Erlotinib (Tarceva). Последний препарат используется в клинике для лечения немелкоклеточного рака легких и рака поджелудочной железы. Этот препарат имеет потенциал применения и в лечении нейродегенеративных заболеваний (Koprivica et al., 2005; Liu et al., 2006).

Ли с соавт. исследовали влияние микроРНК-21 (miR-21) и ее антагомира (синтетическая молекула, комплементарная miR-21, способная ее инактивировать) на регенерацию аксонов ЗН и зрительные вызванные потенциалы на крысиной модели повреждения ЗН. miR-21 является регулируемым EGFR антиапоптотическим фактором. Инактивация miR-21 посредством интравитреальной инъекции антагомира miR-21 приводила к ослаблению чрезмерной активации астроцитов и ослаблению образования глиальных рубцов, тем самым способствуя регенерации аксонов и облегчая нарушение зрительных вызванных потенциалов в модели повреждения ЗН (Li et al., 2018).

В отличие от периферической нервной системы, где миелинизацию обеспечивают шванновские клетки, в ЦНС миелинизирующими глиальными клетками являются олигодендроциты, которые оказывают ингибирующее действие на регенерацию аксонов. Миелин, происходящий из олигодендроцитов, является одним из основных супрессоров роста аксонов в ЦНС. Ингибирующие эффекты миелина связаны с множеством молекул, включая

изоформы ретикулон-подобного белка Nogo, миелин-ассоциированного гликопротеина, олигодендроцитарно-миелинового гликопротеина и семафорины (Goldberg et al., 2004; Schwab, 2004; Yiu et al., 2006). Хотя эти последние три молекулы структурно не связаны между собой, все они связываются с двумя общими рецепторами, так называемым Nogo-рецептором (NgR) и PirB (Filbin, 2003; Yiu and He, 2006). NgR имеет три различные изоформы, и генетическая делеция всех трех достаточна, чтобы обеспечить весьма умеренный уровень регенерации зрительного нерва (Zheng et al., 2005). Этот эффект может усиливаться внутриглазным воспалением (Dickendesher et al., 2012).

КЛЕТОЧНАЯ ТЕРАПИЯ ДЛЯ РЕГЕНЕРАЦИИ ЗН

Для решения задачи восстановления зрительной функции при разрушении зрительного нерва необходимы комбинированные подходы, сочетающие воздействия, ограничивающие гибель ГКС и обеспечивающие благоприятную среду роста для регенерирующих аксонов (Benowitz et al., 2017; Plant et al., 2011). Было показано, что клеточная терапия с трансплантацией мезенхимальных стволовых клеток может быть эффективна в этом отношении (Chen et al., 2013; Mesentier-Louro et al., 2014; Yang et al., 2014; Zaverucha-do-Valle et al., 2014). В отношении комплексного терапевтического воздействия представляют особый интерес обонятельные оболочечные клетки (olfactory ensheathing cells, ООК) (Shkarubo et al., 2020; Yang et al., 2015; Шкарубо et al., 2023). ООК располагаются в обонятельной слизистой оболочке по ходу волокон обонятельного нерва к обонятельной луковице, обеспечивая постоянное обновление волокон обонятельных нервов на протяжении всей жизни (Mackay-Sim et al., 2011). ООК секретируют различные виды нейротрофических факторов (Lipson et al., 2003; Woodhall et al., 2001). Вместе со шванновскими клетками ООК создают трехмерную матрицу, которая обеспечивает благоприятную микросреду для успешной регенерации аксонов в центральной нервной системе взрослых млекопитающих (Boyd et al., 2005). Результаты исследований указывают на потенциальную результативность клеточной терапии посредством трансплантации ООК либо отдельно, либо в сочетании с нейротрофическим фактором или другими типами клеток при повреждении ЗН (Leaver et al., 2006; Liu et al., 2010).

Терапевтическое окно для применения средств, повышающих жизнеспособность и интенсивность регенерации аксонов ГКС, ограничено коротким

промежутком времени, пока ГКС все еще живы. Это сильно затрудняет применение аутологичных ООК, так как выращивание их *in vitro* занимает много времени. Применение гетерологичной трансплантации заранее выращенных ООК может вызвать проблему иммунного отторжения. Для решения этой проблемы была показана перспективность применения аутоотрансплантации обонятельного эпителия, который возможно получить у пациента с помощью назальной эндоскопии. Этот материал можно применять на острых стадиях повреждения ЦНС (Lu et al., 2001) и ЗН в частности (Gong et al., 2018).

С точки зрения терапии острой фазы повреждения ЗН было бы очень полезно в случае задержки в начале лечения иметь возможность пополнить контингент клеток, потенциально для этого пригодных. В тканях и органах человека и животных содержатся стволовые клетки, способные к длительной пролиферации и многонаправленной дифференцировке. Сетчатка млекопитающих, по данным Тропепе с соавт., может содержать популяцию стволовых клеток на периферии (Тропепе et al., 2000), однако пока нет доказательств того, что они могут заменить погибшие ГКС. По этой причине постоянно предпринимаются попытки разработать методические подходы к применению заместительной клеточной терапии для замещения погибших ГКС. В рамках этих работ исследуются плюрипотентные клетки, включая эмбриональные стволовые клетки и индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, на предмет их дифференцировки в различные клетки сетчатки. С этой целью Cho с соавт. разработали модель, в которой ГКС генетически удаляются у взрослых мышей с последующей дегенерацией зрительного нерва с последующей трансплантацией донорских прогениторных клеток из эмбриональной сетчатки, меченных трансгенным зеленым флуоресцентным белком, которые максимально экспрессируют Atoh7, необходимый для идентификации ГКС (Cho et al., 2012). Было показано, что донорские клетки способны дифференцироваться в ГКС, интегрироваться в слой нервных волокон реципиентной сетчатки и экспрессировать гены, связанные с дифференцировкой ГКС (Cho et al., 2012).

Для заместительной терапии могут быть использованы также эмбриональные стволовые клетки (ЭСК). Chao с соавт. дифференцировали ЭСК человека в нейроны сетчатки с использованием специальной методики и культивировали в течение 60–70 дней, после чего вводили их в глаз беличьих обезьян. Аксоны некоторых трансплантированных клеток располагались в слое нервных волокон реципиент-

ной сетчатки и посылали аксоны к зрительному диску, а затем проецировались в мозг (Chao et al., 2017).

Многочисленные исследования по применению клеточной терапии для лечения оптической нейропатии в качестве источников клеточного материала использовали стволовые клетки сетчатки плода человека, аллогенные трупные клетки человека, нервные стволовые клетки гиппокампа взрослого человека, стволовые клетки ЦНС человека, цилиарные пигментированные эпителиальные клетки, лимбальные стволовые клетки, клетки-предшественники сетчатки, плюрипотентные стволовые клетки человека (включая ЭСК), индуцированные плюрипотентные стволовые клетки и мезенхимальные стволовые клетки. Основные результаты этих исследований изложены в обстоятельном обзоре Коко-Мартен с соавт. (Coco-Martin et al., 2021).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проблема регенерации зрительного нерва является частью более крупной проблемы регенерации проводящих путей в центральной нервной системе. Это удобная модель для исследования и испытания методов преодоления препятствий на пути лечения многих патологических явлений в ЦНС. За последние два десятилетия получено так много полезной информации, что восстановление зрительного нерва вышло из разряда нерешаемых проблем и превратилось в реалистичную цель на ближайшие 5–10 лет. На животных моделях показана возможность восстановления поврежденных связей между глазом и мозгом. Выявлены пути решения основных проблем – продления выживания ГКС и интенсификации регенерации их аксонов. Эти пути – генная терапия, терапия нейротрофическими факторами, трансплантация клеток и хирургические приемы протезирования – клинически осуществимы. Конечно, многие из перечисленных выше проблем остаются нерешенными. Количество регенерирующих аксонов, достигающих правильных мишеней в мозге, еще слишком мало для восстановления зрения до клинически значимого уровня. Тем не менее дальнейшее движение по намеченным направлениям исследований и разработка новых направлений с использованием комбинаций терапевтических методов и новых материалов позволят разработать методы, которые в будущем улучшат жизнь пациентов с нарушениями зрения.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России, грант № 075–15–2021–1343.

ЛИТЕРАТУРА

- Шкарубо А. Н., Николенко В. Н., Огуцова А. А., Якупова З. Ф., Сотников В. В., Седько В. А., Чернов И. В., Шкарубо М. А., Шишкина Л. В., Синельников М. Е., Величко А. Я. (2023). Способ пластики зрительного нерва (Российская Федерация), Патент № 2802384: pp. 1.
- Abbhi V., Piplani P. Rho-kinase (ROCK) Inhibitors – A Neuroprotective Therapeutic Paradigm with a Focus on Ocular Utility. *Curr Med Chem.* 2020. 27 (14): 2222–2256.
- Aguayo A. J., Rasminsky M., Bray G. M., Carbonetto S., McKerracher L., Villegas-Perez M. P., Vidal-Sanz M., Carter D. A. (1991). Degenerative and regenerative responses of injured neurons in the central nervous system of adult mammals. In *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 1991. 331 (1261): 337–343.
- Ahmed Z., Kalinski H., Berry M., Almasieh M., Ashush H., Slager N., Brafman A., Spivak I., Prasad N., Mett I., Shalom E., Alpert E., Di Polo A., Feinstein E., Logan A. Ocular neuroprotection by siRNA targeting caspase-2. *Cell Death Dis.* 2011. 2 (6): e173.
- Allcutt D., Berry M., Sievers J. A quantitative comparison of the reactions of retinal ganglion cells to optic nerve crush in neonatal and adult mice. *Brain Res.* 1984. 318 (2): 219–230.
- Behbehani R. Clinical approach to optic neuropathies. *Clin Ophthalmol.* 2007. 1 (3): 233–246.
- Beirowski B., Nogradi A., Babetto E., Garcia-alias G., Coleman M. P. Mechanisms of axonal spheroid formation in central nervous system Wallerian degeneration. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2010. 69 (5): 455–472.
- Belin S., Nawabi H., Wang C., Tang S., Latremoliere A., Warren P., Schorle H., Uncu C., Woolf C. J., He Z., Steen J. A. Injury-induced decline of intrinsic regenerative ability revealed by quantitative proteomics. *Neuron.* 2015. 86 (4): 1000–1014.
- Benowitz L. I., He Z., Goldberg J. L. Reaching the brain: Advances in optic nerve regeneration. *Exp Neurol.* 2017. 287 (Pt 3): 365–373.
- Benowitz L. I., Yin Y. Optic nerve regeneration. *Arch Ophthalmol.* 2010. 128 (8): 1059–1064.
- Berkelaar M., Clarke D. B., Wang Y. C., Bray G. M., Aguayo A. J. Axotomy results in delayed death and apoptosis of retinal ganglion cells in adult rats. *J Neurosci.* 1994. 14 (7): 4368–4374.
- Berry M., Carlile J., Hunter A. Peripheral nerve explants grafted into the vitreous body of the eye promote the regeneration of retinal ganglion cell axons severed in the optic nerve. *J Neurocytol.* 1996. 25 (2): 147–170.
- Blanquie O., Bradke F. Cytoskeleton dynamics in axon regeneration. *Curr Opin Neurobiol.* 2018. 51: 60–69.
- Bollaerts I., Veys L., Geeraerts E., Andries L., De Groef L., Buyens T., Salinas-Navarro M., Moons L., Van Hove I. Complementary research models and methods to study axonal regeneration in the vertebrate retinofugal system. *Brain Struct Funct.* 2018. 223 (2): 545–567.
- Bonfanti L., Strettoi E., Chierzi S., Cenni M. C., Liu X. H., Martinou J. C., Maffei L., Rabacchi S. A. Protection of retinal ganglion cells from natural and axotomy-in-

- duced cell death in neonatal transgenic mice overexpressing bcl-2. *J Neurosci*. 1996. 16 (13): 4186–4194.
- Boyd J. G., Doucette R., Kawaja M. D. Defining the role of olfactory ensheathing cells in facilitating axon remyelination following damage to the spinal cord. *Faseb J*. 2005. 19 (7): 694–703.
- Burton M. J., Ramke J., Marques A. P., Bourne R. R. A., Congdon N., Jones I., Ah Tong B. A. M., Arunga S., Bachani D., Bascaran C., Bastawrous A., Blanchet K., Braithwaite T., Buchan J. C., Cairns J., Cama A., Chagunda M., Chuluunkhuu C., Cooper A., Crofts-Lawrence J., Dean W. H., Denniston A. K., Ehrlich J. R., Emerson P. M., Evans J. R., Frick K. D., Friedman D. S., Furtado J. M., Gichangi M. M., Gichuhi S., Gilbert S. S., Gurung R., Habtamu E., Holland P., Jonas J. B., Keane P. A., Keay L., Khanna R. C., Khaw P. T., Kuper H., Kyari F., Lansingh V. C., Mactaggart I., Mafwiri M. M., Mathenge W., McCormick I., Morjaria P., Mowatt L., Muirhead D., Murthy G. V. S., Mwangi N., Patel D. B., Peto T., Qureshi B. M., Salomao S. R., Sarah V., Shilio B. R., Solomon A. W., Swenor B. K., Taylor H. R., Wang N., Webson A., West S. K., Wong T. Y., Wormald R., Yasmin S., Yusufu M., Silva J. C., Resnikoff S., Ravilla T., Gilbert C. E., Foster A., Faal H. B. The Lancet Global Health Commission on Global Eye Health: vision beyond 2020. *Lancet Glob Health*. 2021. 9 (4): e489–e551.
- Cen L. P., Liang J. J., Chen J. H., Harvey A. R., Ng T. K., Zhang M., Pang C. P., Cui Q., Fan Y. M. AAV-mediated transfer of RhoA shRNA and CNTF promotes retinal ganglion cell survival and axon regeneration. *Neuroscience*. 2017. 343: 472–482.
- Chao J. R., Lamba D. A., Klesert T. R., Torre A., Hoshino A., Taylor R. J., Jayabalu A., Engel A. L., Khuu T. H., Wang R. K., Neitz M., Neitz J., Reh T. A. Transplantation of Human Embryonic Stem Cell-Derived Retinal Cells into the Subretinal Space of a Non-Human Primate. *Transl Vis Sci Technol*. 2017. 6 (3): 4.
- Chen D. F., Jhaveri S., Schneider G. E. Intrinsic changes in developing retinal neurons result in regenerative failure of their axons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995. 92 (16): 7287–7291.
- Chen M., Xiang Z., Cai J. The anti-apoptotic and neuroprotective effects of human umbilical cord blood mesenchymal stem cells (hUCB-MSCs) on acute optic nerve injury is transient. *Brain Res*. 2013. 1532: 63–75.
- Cheng Y., Yin Y., Zhang A., Bernstein A. M., Kawaguchi R., Gao K., Potter K., Gilbert H. Y., Ao Y., Ou J., Fricano-Kugler C. J., Goldberg J. L., He Z., Woolf C. J., Sofroniew M. V., Benowitz L. I., Geschwind D. H. Transcription factor network analysis identifies REST/NRSF as an intrinsic regulator of CNS regeneration in mice. *Nat Commun*. 2022. 13 (1): 4418.
- Cho J. H., Mao C. A., Klein W. H. Adult mice transplanted with embryonic retinal progenitor cells: new approach for repairing damaged optic nerves. *Mol Vis*. 2012. 18: 2658–2672.
- Coco-Martin R. M., Pastor-Idoate S., Pastor J. C. Cell Replacement Therapy for Retinal and Optic Nerve Diseases: Cell Sources, Clinical Trials and Challenges. *Pharmaceutics*. 2021. 13 (6): 865.
- Cui Q. Actions of neurotrophic factors and their signaling pathways in neuronal survival and axonal regeneration. *Mol Neurobiol*. 2006. 33 (2): 155–179.
- Dezawa M., Kawana K., Negishi H., Adachi-Usami E. Glial cells in degenerating and regenerating optic nerve of the adult rat. *Brain Res Bull*. 1999. 48 (6): 573–579.
- Dickendesher T. L., Baldwin K. T., Mironova Y. A., Koriyama Y., Raiker S. J., Askew K. L., Wood A., Geoffroy C. G., Zheng B., Liepmann C. D., Katagiri Y., Benowitz L. I., Geller H. M., Giger R. J. NgR1 and NgR3 are receptors for chondroitin sulfate proteoglycans. *Nat Neurosci*. 2012. 15 (5): 703–712.
- Donahue R. J., Maes M. E., Grosser J. A., and Nickells R. W. BAX-Depleted Retinal Ganglion Cells Survive and Become Quiescent Following Optic Nerve Damage. *Mol Neurobiol*. 2020. 57 (2): 1070–1084.
- Ellenberg D., Shi J., Jain S., Chang J. H., Ripps H., Brady S., Melhem E. R., Lakkis F., Adamis A., Chen D. F., Ellis-Behnke R., Langer R. S., Strittmatter S. M., Azar D. T. Impediments to eye transplantation: ocular viability following optic-nerve transection or enucleation. *Br J Ophthalmol*. 2009. 93 (9): 1134–1140.
- Filbin M. T. Myelin-associated inhibitors of axonal regeneration in the adult mammalian CNS. *Nat Rev Neurosci*. 2003. 4(9): 703–713.
- Fischer D., Petkova V., Thanos S., Benowitz L. I. Switching mature retinal ganglion cells to a robust growth state in vivo: gene expression and synergy with RhoA inactivation. *J Neurosci*. 2004. 24 (40): 8726–8740.
- Flachsbarth K., Jankowiak W., Kruszewski K., Helbing S., Bartsch S., Bartsch U. Pronounced synergistic neuroprotective effect of GDNF and CNTF on axotomized retinal ganglion cells in the adult mouse. *Exp Eye Res*. 2018. 176: 258–265.
- George E. B., Glass J. D., Griffin J. W. Axotomy-induced axonal degeneration is mediated by calcium influx through ion-specific channels. *J Neurosci*. 1995. 15 (10): 6445–6452.
- Ghaffarieh A., Levin L. A. Optic nerve disease and axon pathophysiology. *Int Rev Neurobiol*. 2012. 105: 1–17.
- Gokoffski K. K., Peng M., Alas B., Lam P. Neuro-protection and neuro-regeneration of the optic nerve: recent advances and future directions. *Curr Opin Neurol*. 2020. 33 (1): 93–105.
- Goldberg J. L., Vargas M. E., Wang J. T., Mandemakers W., Oster S. F., Sretavan D. W., Barres B. A. An oligodendrocyte lineage-specific semaphorin, Sema5A, inhibits axon growth by retinal ganglion cells. *J Neurosci*. 2004. 24 (21): 4989–4999.
- Goll D. E., Thompson V. F., Li H., Wei W., Cong J. The calpain system. *Physiol Rev*. 2003. 83 (3): 731–801.
- Gong S., Jin H., Zhang D., Zou W., Wang C., Li Z., Chen R., Dong Y., Hou L. The Therapeutic Effects after Transplantation of Whole-Layer Olfactory Mucosa in Rats with Optic Nerve Injury. *Biomed Res Int*. 2018. 2018: 6069756.
- Grafstein B., Ingoglia N. A. Intracranial transection of the optic nerve in adult mice: preliminary observations. *Exp Neurol*. 1982. 76 (2): 318–330.

- Harrington A. W., Ginty D. D. Long-distance retrograde neurotrophic factor signalling in neurons. *Nat Rev Neurosci.* 2013. 14 (3): 177–187.
- Keirstead S. A., Rasminsky M., Fukuda Y., Carter D. A., Aguayo A. J., Vidal-Sanz M. Electrophysiologic responses in hamster superior colliculus evoked by regenerating retinal axons. *Science.* 1989. 246 (4927): 255–257.
- Keirstead S. A., Vidal-Sanz M., Rasminsky M., Aguayo A. J., Levesque M., So K. F. Responses to light of retinal neurons regenerating axons into peripheral nerve grafts in the rat. *Brain Res.* 1985. 359 (1–2): 402–406.
- Kerschensteiner M., Schwab M. E., Lichtman J. W., Misgeld T. In vivo imaging of axonal degeneration and regeneration in the injured spinal cord. *Nat Med.* 2005. 11 (5): 572–577.
- Koprivica V., Cho K. S., Park J. B., Yiu G., Atwal J., Gore B., Kim J. A., Lin E., Tessier-Lavigne M., Chen D. F., He Z. EGFR activation mediates inhibition of axon regeneration by myelin and chondroitin sulfate proteoglycans. *Science.* 2005. 310 (5745): 106–110.
- Krebs D. L., Hilton D. J. SOCS proteins: negative regulators of cytokine signaling. *Stem Cells.* 2001. 19 (5): 378–387.
- Kreutzberg G. W. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci.* 1996. 19 (8): 312–318.
- Kurimoto T., Yin Y., Omura K., Gilbert H. Y., Kim D., Cen L. P., Moko L., Kugler S., Benowitz L. I. Long-distance axon regeneration in the mature optic nerve: contributions of oncomodulin, cAMP, and pten gene deletion. *J Neurosci.* 2010. 30 (46): 15654–15663.
- Leaver S. G., Harvey A. R., Plant G. W. Adult olfactory ensheathing glia promote the long-distance growth of adult retinal ganglion cell neurites in vitro. *Glia.* 2006. 53 (5): 467–476.
- Leon S., Yin Y., Nguyen J., Irwin N., Benowitz L. I. Lens injury stimulates axon regeneration in the mature rat optic nerve. *J Neurosci.* 2000. 20 (12): 4615–4626.
- Li H. J., Pan Y. B., Sun Z. L., Sun Y. Y., Yang X. T., Feng D. F. Inhibition of miR-21 ameliorates excessive astrocyte activation and promotes axon regeneration following optic nerve crush. *Neuropharmacology.* 2018. 137: 33–49.
- Li S., Yang C., Zhang L., Gao X., Wang X., Liu W., Wang Y., Jiang S., Wong Y. H., Zhang Y., Liu K. Promoting axon regeneration in the adult CNS by modulation of the melanopsin/GPCR signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016. 113 (7): 1937–1942.
- Li Y., Schlamp C. L., Nickells R. W. Experimental induction of retinal ganglion cell death in adult mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1999. 40 (5): 1004–1008.
- Lim J. H., Stafford B. K., Nguyen P. L., Lien B. V., Wang C., Zukor K., He Z., Huberman A. D. Neural activity promotes long-distance, target-specific regeneration of adult retinal axons. *Nat Neurosci.* 2016. 19 (8): 1073–1084.
- Lindqvist N., Peinado-Ramonn P., Vidal-Sanz M., Hallbook F. GDNF, Ret, GFR α 1 and 2 in the adult rat retino-tectal system after optic nerve transection. *Exp Neurol.* 2004. 187 (2): 487–499.
- Lipson A. C., Widenfalk J., Lindqvist E., Ebendal T., Olson L. Neurotrophic properties of olfactory ensheathing glia. *Exp Neurol.* 2003. 180 (2): 167–171.
- Liu B., Chen H., Johns T. G., Neufeld A. H. Epidermal growth factor receptor activation: an upstream signal for transition of quiescent astrocytes into reactive astrocytes after neural injury. *J Neurosci.* 2006. 26 (28): 7532–7540.
- Liu H., Anders F., Thanos S., Mann C., Liu A., Grus F. H., Pfeiffer N., and Prokosch-Willing V. Hydrogen Sulfide Protects Retinal Ganglion Cells Against Glaucomatous Injury In Vitro and In Vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2017. 58 (12): 5129–5141.
- Liu Y., Gong Z., Liu L., Sun H. Combined effect of olfactory ensheathing cell (OEC) transplantation and glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) intravitreal injection on optic nerve injury in rats. *Mol Vis.* 2010. 16 (2903–2910).
- Livne-Bar I., Wei J., Liu H. H., Alqawlaq S., Won G. J., Tuccitto A., Gronert K., Flanagan J. G., Sivak J. M. Astrocyte-derived lipoxins A4 and B4 promote neuroprotection from acute and chronic injury. *J Clin Invest.* 2017. 127 (12): 4403–4414.
- Lu J., Feron F., Ho S. M., Mackay-Sim A., Waite P. M. Transplantation of nasal olfactory tissue promotes partial recovery in paraplegic adult rats. *Brain Res.* 2001. 889 (1–2): 344–357.
- Mackay-Sim A., St John J. A. Olfactory ensheathing cells from the nose: clinical application in human spinal cord injuries. *Exp Neurol.* 2011. 229 (1): 174–180.
- Maes M. E., Schlamp C. L., Nickells R. W. BAX to basics: How the BCL2 gene family controls the death of retinal ganglion cells. *Prog Retin Eye Res.* 2017. 57: 1–25.
- Mansour-Robaey S., Clarke D. B., Wang Y. C., Bray G. M., Aguayo A. J. Effects of ocular injury and administration of brain-derived neurotrophic factor on survival and regrowth of axotomized retinal ganglion cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994. 91 (5): 1632–1636.
- Mendoza M. C., Er E. E., Blenis J. The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation. *Trends Biochem Sci.* 2011. 36 (6): 320–328.
- Mesentier-Louro L. A., Rosso P., Carito V., Mendez-Otero R., Santiago M. F., Rama P., Lambiasi A., Tirassa P. Nerve Growth Factor Role on Retinal Ganglion Cell Survival and Axon Regrowth: Effects of Ocular Administration in Experimental Model of Optic Nerve Injury. *Mol Neurobiol.* 2019. 56 (2): 1056–1069.
- Mesentier-Louro L. A., Zaverucha-do-Valle C., da Silva-Junior A. J., Nascimento-Dos-Santos G., Gubert F., de Figueiredo A. B., Torres A. L., Paredes B. D., Teixeira C., Tovar-Moll F., Mendez-Otero R., Santiago M. F. Distribution of mesenchymal stem cells and effects on neuronal survival and axon regeneration after optic nerve crush and cell therapy. *PLoS One.* 2014. 9 (10): e110722.
- Moore D. L., Goldberg J. L. Multiple transcription factor families regulate axon growth and regeneration. *Dev Neurobiol.* 2011. 71 (12): 1186–1211.
- Muller A., Hawk T. G., Fischer D. Astrocyte-derived CNTF switches mature RGCs to a regenerative state following inflammatory stimulation. *Brain.* 2007. 130 (Pt 12): 3308–3320.
- Nakano Y., Shimazawa M., Ojino K., Izawa H., Takeuchi H., Inoue Y., Tsuruma K., Hara H. Toll-like receptor 4 in-

- hibitor protects against retinal ganglion cell damage induced by optic nerve crush in mice. *J Pharmacol Sci.* 2017. 133 (3): 176–183.
- Omodaka K., Kurimoto T., Nakamura O., Sato K., Yasuda M., Tanaka Y., Himori N., Yokoyama Y., Nakazawa T. Artemin augments survival and axon regeneration in axotomized retinal ganglion cells. *J Neurosci Res.* 2014. 92 (12): 1637–1646.
- Osborne A., Khatib T.Z., Songra L., Barber A.C., Hall K., Kong G.Y.X., Widdowson P.S., Martin K.R. Neuroprotection of retinal ganglion cells by a novel gene therapy construct that achieves sustained enhancement of brain-derived neurotrophic factor/tropomyosin-related kinase receptor-B signaling. *Cell Death Dis.* 2018. 9 (10): 1007.
- Pan F., Hu D., Sun L.J., Bai Q., Wang Y.S., Hou X. Valproate reduces retinal ganglion cell apoptosis in rats after optic nerve crush. *Neural Regen Res.* 2023. 18 (7): 1607–1612.
- Park K.K., Liu K., Hu Y., Smith P.D., Wang C., Cai B., Xu B., Connolly L., Kramvis I., Sahin M., He Z. Promoting axon regeneration in the adult CNS by modulation of the PTEN/mTOR pathway. *Science.* 2008. 322 (5903): 963–966.
- Pearson C.S., Mencio C.P., Barber A.C., Martin K.R., Geller H.M. Identification of a critical sulfation in chondroitin that inhibits axonal regeneration. *Elife.* 2018. 7: 37139.
- Petrova V., Pearson C.S., Ching J., Tribble J.R., Solano A.G., Yang Y., Love F.M., Watt R.J., Osborne A., Reid E., Williams P.A., Martin K.R., Geller H.M., Eva R., Fawcett J.W. Protrudin functions from the endoplasmic reticulum to support axon regeneration in the adult CNS. *Nat Commun.* 2020. 11 (1): 5614.
- Plant G.W., Harvey A.R., Leaver S.G., Lee S.V. Olfactory ensheathing glia: repairing injury to the mammalian visual system. *Exp Neurol.* 2011. 229 (1): 99–108.
- Prasad S., Volpe N.J., Balcer L.J. Approach to optic neuropathies: clinical update. *Neurologist.* 2010. 16 (1): 23–34.
- Richardson P.M., Issa V.M., Shemie S. Regeneration and retrograde degeneration of axons in the rat optic nerve. *J Neurocytol.* 1982. 11 (6): 949–966.
- Schwab M.E. Nogo and axon regeneration. *Curr Opin Neurobiol.* 2004. 14 (1): 118–124.
- Schwab M.E., Thoenen H. Dissociated neurons regenerate into sciatic but not optic nerve explants in culture irrespective of neurotrophic factors. *J Neurosci.* 1985. 5 (9): 2415–2423.
- Shin J.E., Cho Y., Beirowski B., Milbrandt J., Cavalli V., DiAntonio A. Dual leucine zipper kinase is required for retrograde injury signaling and axonal regeneration. *Neuron.* 2012. 74 (6): 1015–1022.
- Shkarubo A.N., Nikolenko V.N., Velichko A.Y., Sinelnikov M.Y. Cell therapy assisted autotransplantation of olfactory tract into the optic nerve: A potential treatment for optic neuropathy. *Med Hypotheses.* 2020. 143 (110104).
- Silver J., Schwab M.E., Popovich P.G. Central nervous system regenerative failure: role of oligodendrocytes, astrocytes, and microglia. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2015. 7 (3): a020602.
- Smith P.D., Sun F., Park K.K., Cai B., Wang C., Kuwako K., Martinez-Carrasco I., Connolly L., He Z. SOCS3 deletion promotes optic nerve regeneration in vivo. *Neuron.* 2009. 64 (5): 617–623.
- So K.F., Aguayo A.J. Lengthy regrowth of cut axons from ganglion cells after peripheral nerve transplantation into the retina of adult rats. *Brain Res.* 1985. 328 (2): 349–354.
- Takeuchi H., Inagaki S., Morozumi W., Nakano Y., Inoue Y., Kuse Y., Mizoguchi T., Nakamura S., Funato M., Kaneko H., Hara H., Shimazawa M. VGF nerve growth factor inducible is involved in retinal ganglion cells death induced by optic nerve crush. In *Sci Rep*, 2018. pp. 16443.
- Tan H., Zhong Y., Shen X., Cheng Y., Jiao Q., Deng L. Erythropoietin promotes axonal regeneration after optic nerve crush in vivo by inhibition of RhoA/ROCK signaling pathway. *Neuropharmacology.* 2012. 63 (6): 1182–1190.
- Tham Y.C., Li X., Wong T.Y., Quigley H.A., Aung T., Cheng C.Y. Global prevalence of glaucoma and projections of glaucoma burden through 2040: a systematic review and meta-analysis. *Ophthalmology.* 2014. 121 (11): 2081–2090.
- Thompson A., Berry M., Logan A., Ahmed Z. Activation of the BMP4/Smad1 Pathway Promotes Retinal Ganglion Cell Survival and Axon Regeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2019. 60 (5): 1748–1759.
- Tropepe V., Coles B.L., Chiasson B.J., Horsford D.J., Elia A.J., McInnes R.R., van der Kooy D. Retinal stem cells in the adult mammalian eye. *Science.* 2000. 287 (5460): 2032–2036.
- Vidal-Sanz M., Bray G.M., Villegas-Perez M.P., Thanos S., and Aguayo A.J. Axonal regeneration and synapse formation in the superior colliculus by retinal ganglion cells in the adult rat. *J Neurosci.* 1987. 7 (9): 2894–2909.
- Villegas-Perez M.P., Vidal-Sanz M., Rasminsky M., Bray G.M., Aguayo A.J. Rapid and protracted phases of retinal ganglion cell loss follow axotomy in the optic nerve of adult rats. *J Neurobiol.* 1993. 24 (1): 23–36.
- Weibel D., Kreutzberg G.W., Schwab M.E. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) prevents lesion-induced axonal die-back in young rat optic nerve. *Brain Res.* 1995. 679 (2): 249–254.
- Whiteley S.J., Sauve Y., Aviles-Trigueros M., Vidal-Sanz M., Lund R.D. Extent and duration of recovered pupillary light reflex following retinal ganglion cell axon regeneration through peripheral nerve grafts directed to the pretectum in adult rats. *Exp Neurol.* 1998. 154 (2): 560–572.
- Woodhall E., West A.K., Chuah M.I. Cultured olfactory ensheathing cells express nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor, glia cell line-derived neurotrophic factor and their receptors. *Brain Res Mol Brain Res.* 2001. 88 (1–2): 203–213.
- Xu Z., Fouda A.Y., Lemtalsi T., Shosha E., Rojas M., Liu F., Patel C., Caldwell R.W., Narayanan S.P., Caldwell R.B. Retinal Neuroprotection From Optic Nerve Trauma by Deletion of Arginase 2. *Front Neurosci.* 2018. 12: 970.

- Yan Q., Wang J., Matheson C.R., Ulrich J.L. Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) promotes the survival of axotomized retinal ganglion cells in adult rats: comparison to and combination with brain-derived neurotrophic factor (BDNF). *J Neurobiol.* 1999. 38 (3): 382–390.
- Yang H., He B.R., Hao D.J. Biological roles of olfactory ensheathing cells in facilitating neural regeneration: a systematic review. *Mol Neurobiol.* 2015. 51 (1): 168–179.
- Yang X.F., Huang Y.X., Lan M., Zhang T.R., Zhou J. Protective Effects of Leukemia Inhibitory Factor on Retinal Vasculature and Cells in Streptozotocin-induced Diabetic Mice. *Chin Med J (Engl).* 2018. 131 (1): 75–81.
- Yang X.T., Bi Y.Y., Chen E.T., Feng D.F. Overexpression of Wnt3a facilitates the proliferation and neural differentiation of neural stem cells in vitro and after transplantation into an injured rat retina. *J Neurosci Res.* 2014. 92 (2): 148–161.
- Yin Y., Cui Q., Gilbert H.Y., Yang Y., Yang Z., Berlinicke C., Li Z., Zaverucha-do-Valle C., He H., Petkova V., Zack D.J., Benowitz L.I. Oncomodulin links inflammation to optic nerve regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009. 106 (46): 19587–19592.
- Yin Y., Cui Q., Li Y., Irwin N., Fischer D., Harvey A.R., Benowitz L.I. Macrophage-derived factors stimulate optic nerve regeneration. *J Neurosci.* 2003. 23 (6): 2284–2293.
- Yin Y., Henzl M.T., Lorber B., Nakazawa T., Thomas T.T., Jiang F., Langer R., Benowitz L.I. Oncomodulin is a macrophage-derived signal for axon regeneration in retinal ganglion cells. *Nat Neurosci.* 2006. 9 (6): 843–852.
- Yiu G., and He Z. Glial inhibition of CNS axon regeneration. *Nat Rev Neurosci.* 2006. 7(8): 617–627.
- Zaverucha-do-Valle C., Mesentier-Louro L., Gubert F., Mortari N., Padilha A.B., Paredes B.D., Mencalha A., Abdelhay E., Teixeira C., Ferreira F.G., Tovar-Moll F., deSouza S.A., Gutfilen B., Mendez-Otero R., Santiago M.F. Sustained effect of bone marrow mononuclear cell therapy in axonal regeneration in a model of optic nerve crush. *Brain Res.* 2014. 1587: 54–68.
- Zhang J., Liu W., Zhang X., Lin S., Yan J., Ye J. Sema3A inhibits axonal regeneration of retinal ganglion cells via ROCK2. *Brain Res.* 2020. 1727: 146555.
- Zhang Z.Z., Gong Y.Y., Shi Y.H., Zhang W., Qin X.H., Wu X.W. Valproate promotes survival of retinal ganglion cells in a rat model of optic nerve crush. *Neuroscience.* 2023. 224: 282–293.
- Zheng B., Atwal J., Ho C., Case L., He X.L., Garcia K.C., Steward O., Tessier-Lavigne M. Genetic deletion of the Nogo receptor does not reduce neurite inhibition in vitro or promote corticospinal tract regeneration in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005. 102 (4): 1205–1210.

PROBLEMS AND PROSPECTS FOR RESTORATION OF THE OPTIC NERVE

A. V. Revishchin^{a, #}, G. V. Pavlova^{a, b, c}, A. N. Shkarubo^{b, d}

^a*Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

^b*N.N. Burdenko National Medical Research Center of Neurosurgery, Ministry of Healthcare of Russia, Moscow, Russia*

^c*I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia*

^d*Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Moscow, Russia*

[#]*e-mail: revishchin@mail.ru*

Restoring visual function after damage or complete destruction of the optic nerve in adult patients has many natural barriers to neuroregeneration. Research to restore vision has focused on maintaining retinal ganglion cells (RGCs), stimulating axonal growth toward the brain, and restoring their proper synaptic connections. Unfortunately, mammalian RGC axons under normal conditions do not regenerate after injury and ultimately die. In this review, we summarize the currently known mechanisms of RGC survival and axonal regeneration in mammals, including specific intrinsic signaling pathways, key transcription factors, reprogramming genes, inflammation-related regeneration factors, and stem cell therapy. We also review the current understanding of the phenomena impeding optic nerve regeneration and possible ways to overcome these obstacles. The most important research results obtained in recent decades may be informative for the development of methods for treating the damaged visual system.

Keywords: axonal regeneration, optic nerve damage, retinal ganglion cells, viability

ФЕНОТИПИЧЕСКАЯ И ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ГЕТЕРОГЕННОСТЬ ГЛИОБЛАСТОМ, СОПОСТАВЛЕНИЕ ПАРАМЕТРОВ МРТ И ПЭТ/КТ С МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИМИ ХАРАКТЕРИСТИКАМИ ОПУХОЛИ

© 2024 г. Н. Б. Вихрова*, Д. Б. Калаева, А. И. Баталов, И. Н. Пронин

ФГАУ «НМИЦ нейрохирургии им. академика Н. Н. Бурденко» Минздрава России, Москва, Россия

*e-mail: nvikhrova@nsi.ru

Поступила в редакцию 14.09.2023 г.

После доработки 16.10.2023 г.

Принята к публикации 01.12.2023 г.

Глиобластома (ГБ) отличается высокой степенью неоднородности развития в пространстве и времени, что вызвано геномной нестабильностью, высокой скоростью роста отдельных участков и гетерогенной неоваскуляризацией. Молекулярно-генетические особенности ГБ играют важную роль в прогнозе заболевания, что отражено в новой классификации ВОЗ опухолей ЦНС от 2021 г. Целью данного исследования стало сопоставление параметров кровотока и диффузии по данным МРТ, метаболизма опухолевой ткани по данным ПЭТ/КТ с генетическим профилем ГБ. 40 пациентам (возраст 55 ± 12 лет, пол М/Ж = 31/9) с впервые поставленным диагнозом ГБ проведена оценка параметров МРТ (измеряемого коэффициента диффузии – ADC, скорости кровотока – CBF – по данным ASL-перфузии) и ПЭТ/КТ в виде индекса накопления метионина (MET). Все вышеперечисленные объемные контуры ($VOI - 1 \text{ см}^3$) автоматически с помощью программного обеспечения (PMOD) были перенесены на все имеющиеся карты изображений и сопоставлены друг с другом; итого получено 9 параметров: METmax, METcbf, METadc, ADCmin, ADCmet, ADCcbf, CBFmax, CBFmet, CBFadc. Проведен сравнительный и корреляционный анализ параметров как в общей группе ГБ, так и отдельно в генетически разных подгруппах (MGMT+/- и EGFR+/-) и по уровню Ki67.

Исследование показало, что локализации зон высоких значений кровотока, плотноклеточности и метаболизма аминокислот совпадают только в 45% случаев, доказывая наличие различий в структуре и функциональной активности участков ГБ. Данные о взаимосвязи метилирования промотора гена MGMT и ADC ($ADCmin > 1.01 (10^{-3} \text{ мм}^2/\text{с})$, $Se = 78\%$, $Sp = 74\%$, $AUC = 0.77$) подтверждают результаты других авторов о более низкой потребности данного генетического подтипа ГБ в строительстве новых мембран, обусловленной угнетением механизма системы репарации ДНК. Выявление амплификации гена EGFR в нашей выборке было ассоциировано со значимым повышением метаболизма MET ($METmax > 3.29$, $Se = 88\%$, $Sp = 70\%$, $AUC = 0.82$) и коррелировало с более высоким индексом Ki67 ($Rs = -0.85$), подтверждая факт увеличения потребления аминокислот клетками ГБ для синтеза мембран. Полученные корреляционные связи между ИН MET и ADC, отсутствие таковых с параметрами CBF подтверждают зависимость метаболизма метионина в глиомах от процессов построения новых клеточных мембран, а не от неоваскуляризации. Феномен гетерогенности структуры ГБ был подтвержден на основе выявленных различий в локализации зон максимальных значений изучаемых параметров МРТ и ПЭТ/КТ, а также их значимых отличий в группах ГБ с разным молекулярно-генетическим профилем.

Ключевые слова: ПЭТ/КТ, ^{11}C -метионин, ASL, DWI, MET, глиобластома

DOI: 10.31857/S0044467724010051

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ADC	– apparent diffusion coefficient (измеряемый коэффициент диффузии)
ASL	– arterial spin labeling (артериальная спиновая маркировка)
CBF	– cerebral blood flow (скорость объемного кровотока)
SUV	– standardized uptake value (стандартизованный уровень накопления)
ВИ	– взвешенные исследования
ГБ	– глиобластома
ГЭБ	– гематоэнцефалический барьер
ДВИ	– диффузионно-взвешенные изображения
ИН	– индекс накопления
МРТ	– магнитно-резонансная томография

МЕТ	— ^{11}C -метионин
ПЭТ/КТ	— позитронная эмиссионная томография, совмещенная с компьютерной томографией
РФП	— радиофармпрепарат

ВВЕДЕНИЕ

Глиобластома (ГБ) среди опухолей головного мозга остается одним из самых неблагоприятных диагнозов (Efremov, 2021; Low, 2022), отличаясь высокой степенью неоднородности развития опухолевого процесса как в пространстве, так и во времени, что обусловлено значительной геномной нестабильностью, высокой скоростью пролиферации отдельных участков с формированием некрозов, устойчивостью к апоптозу и патологической неоваскуляризацией (Yabo, 2022; Nikitin, 2020). Гетерогенность структуры и существование различных субпопуляций клеток в рамках одного образования обуславливает быстрый рост и способность адаптироваться к лучевому и лекарственному лечению (Efremov, 2021; Low, 2022; Yabo, 2022; Nikitin, 2020; Wu, 2021). Поиск взаимосвязей между молекулярно-генетическими особенностями глиом и их клинико-диагностической картиной является трендом последних лет (Yabo, 2022; Nikitin, 2020; Wu, 2021; Śledzińska, 2021; Osborn, 2022). Результаты последних двух пересмотров классификации ВОЗ опухолей ЦНС (Louis, 2016; Osborn, 2022) вызвали всплеск работ (Kazerooni, 2020; Overcast, 2021; Nomura, 2018; Suh, 2019; Seow, 2018; Yang, 2019; Danilov, 2023; Saadeh, 2018), в том числе отечественных (Batalov, 2019; Беляев, 2021; Беляев, 2022), посвященных сопоставлению различных геномных характеристик глиом с их фенотипом по данным МРТ и ПЭТ/КТ.

На сегодняшний день к ГБ относят все опухоли астроцитарного ряда (независимо от степени пролиферативной активности — Grade), без мутации гена изоцитратдегидрогеназы (IDH wild type) и генов гистонов H3, с характерной микрососудистой пролиферацией, некрозами и/или специфическими молекулярными особенностями, включающими отсутствие или наличие следующих изменений: метилирования промотора гена MGMT, амплификации гена EGFR, мутации гена TERT и др. (Yabo, 2022; Osborn, 2022). При этом злокачественные опухоли с наличием мутации в гене IDH, ранее называемые «вторичные ГБ» (Louis, 2016), стали относиться к группе IDH-мутантных астроцитом Grade 4, и термин «глиобластома» к ним не применим (Osborn, 2022).

Клинически внутри группы ГБ (ВОЗ 2021), в зависимости от присутствия тех или иных типов гене-

тических нарушений, наблюдается различное биологическое поведение опухоли (Yabo, 2022; Nikitin, 2020; Wu, 2021; Śledzińska, 2021; Osborn, 2022). Так, амплификация гена EGFR (эпидермального фактора роста) или мутация промотора TERT (теломеразная обратная транскриптаза) определяют стремительное прогрессирование опухоли (Yabo, 2022; Osborn, 2022; Chamberlain, 2015), а метилирование промотора гена MGMT является важным прогностическим биомаркером ответа на химиотерапевтическое лечение (Chamberlain, 2015). Последнее особенно важно в старшей группе пациентов ввиду плохой переносимости препаратов (Wu, 2021; Chai, 2021).

Несмотря на современные достижения хирургической техники, стереотаксического облучения и системной лекарственной терапии, общая выживаемость больных остается низкой и составляет от 12 до 17.1 месяцев. Не более 15% пациентов переживают порог 36 месяцев, что обуславливает необходимость дальнейших поисков возможности улучшения диагностики и лечения этой патологии.

Мультимодальный и мультипараметрический подход к изучению ГБ в данной работе призван оценить взаимосвязь фундаментальных процессов роста, неоангиогенеза и метаболизма аминокислот в ткани ГБ и связать их с генетическими особенностями опухоли, а также пролиферативной активностью, с целью сопоставления фенотипической и генетической гетерогенности ГБ.

МЕТОДИКА

В исследование вошли 40 пациентов (возраст 55 ± 12 лет, пол М/Ж = 31/9) с впервые выявленными ГБ (IDH wild type Grade 4, ВОЗ 2021), которые прошли все диагностические и лечебные мероприятия во ФГАУ «НМИЦ нейрохирургии им. академика Н.Н. Бурденко». Всем пациентам на дооперационном этапе проводилась МРТ в стандартных режимах (T2, T2-FLAIR, T1 до и после контрастного усиления (KV)), дополнительно включая диффузионно-взвешенные изображения (ДВИ) с построением карт измеряемого коэффициента диффузии (ИКД) и протокол ASL-перфузии с построением карт объемного церебрального кровотока на аппарате Signa HDxt с напряженностью магнитного поля 3.0 T (General Electric, USA). ПЭТ/КТ-исследование с ^{11}C -метионином (МЕТ) проводилось на

аппарате Siemens Biograph 40 True Point (Siemens Medical Solutions, США) согласно стандартному протоколу сканирования, с проведением реконструкции изображения 3D OSEM (Ordered Subset Expectation Maximization) с 5 итерациями и 8 подмножествами с коррекцией поглощения при помощи низкодозной КТ. После проведения диагностических мероприятий выполнялось хирургическое лечение (удаление опухоли или стереотаксическая биопсия (СТБ)) с последующим иммуногистохимическим исследованием материала (ИГХ).

Работа была одобрена этическим комитетом ФГАУ «НМИЦ нейрохирургии им. академика Н. Н. Бурденко», согласие пациентов на все виды исследований и медицинских манипуляций получено.

В данной работе группы пациентов были разделены в зависимости от наличия метилирования промотора гена MGMT (+/-) и амплификации гена EGFR (+/-). Кроме того, оценивалась степень пролиферативной активности опухоли (Ki67), пороговое значение было выбрано согласно различиям в прогнозе течения злокачественных глиом по литературным данным и составило 20% (Armocida, 2020).

Сопоставление, анализ и интерпретация изображений ПЭТ/КТ и МРТ проводились с помощью

программного обеспечения PMOD (версия 4.0, Цюрих, Швейцария).

Зоны интереса (Volume of Interest – VOI) на МРТ и ПЭТ-сканах выбирались в соответствии с принятым протоколом обработки данных в объеме 1 см³ (рис. 1): 1) VOI наибольшей метаболической активности MET на карте его распределения (METmax); 2) VOI минимальных значений измеряемого коэффициента диффузии на карте ИКД (ADCmin); 3) VOI максимальных значений скорости кровотока на карте ASL-перфузии (CBFmax).

Далее все вышеперечисленные контуры VOI с помощью программного обеспечения автоматически переносились на другие карты и сопоставлялись друг с другом – рис. 1 и 2.

В результате количественно оценивались девять параметров:

– метаболические: METmax – максимальный уровень метаболической активности опухоли в виде ИН MET, METcbf – ИН MET в области максимальных значений кровотока, METadc – ИН MET в области максимального ограничения диффузии, то есть минимальных значений ADC;

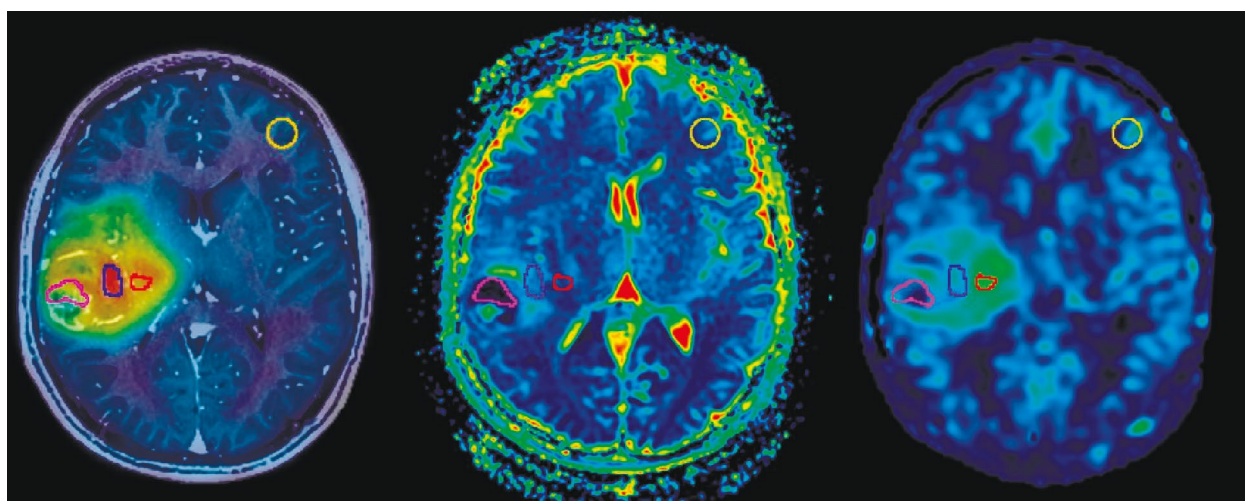


Рис. 1. Глиобластома правого полушария головного мозга. Зоны интереса на ПЭТ и МРТ изображениях: 1) карта распределения метионина (MET), совмещенная с T1ВИ после контрастирования; 2) карта измеряемого коэффициента диффузии (ADC); 3) карта объемного мозгового кровотока (CBF) ASL перфузии. Цветом обозначены зоны интереса (VOI) сопоставленные друг с другом: синий – максимальное накопление метионина (METmax), розовый – минимальные значения измеряемого коэффициента диффузии (ADCmin), красный – максимальные значения кровотока (CBFmax), желтый – измерения в нормальной паренхиме мозга. В данном клиническом примере зоны интереса не пересекаются.

Fig. 1. Right hemisphere glioblastoma. PET and MRI areas of interest: 1) methionine distribution map (MET) combined with contrast enhancement T1W; 2) apparent diffusion coefficient map (ADC); 3) ASL cerebral blood flow map (CBF). Mapping areas of interest (ROI) to each other is indicated by color: blue – methionine maximum accumulation (METmax), pink – diffusion coefficient minimum (ADCmin), red – cerebral blood flow maximum (CBFmax), yellow – normal brain parenchyma measurement. In this clinical case VOI didn't match.

– диффузионные: ADCmin – минимальные значения измеряемого коэффициента диффузии, ADCmet – значения ADC в области максимального метаболизма, ADCcbf – значения ADC в области максимального кровотока;

– перфузионные: CBFmax – максимальные значения кровотока, CBFmet – значения CBF в области

максимального метаболизма, CBFadc – значения CBF в области максимального ограничения диффузии.

Уровень метаболической активности опухоли оценивался в виде индекса накопления (ИН) метионина (MET), далее просто MET, как отношение стандартизованного уровня накопления (SUV – standardized uptake value) аминокислоты в 1 см³ наиболее активной части

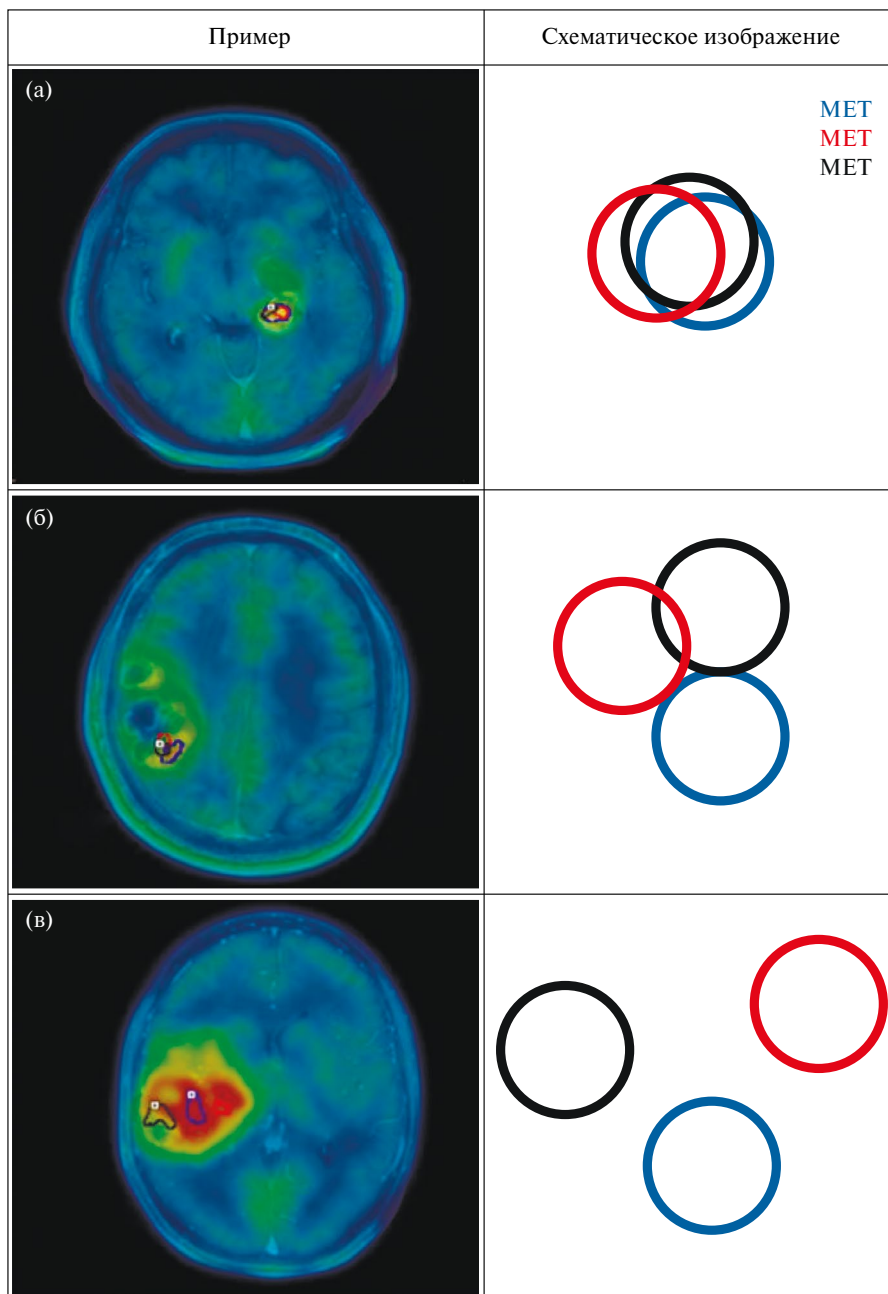


Рис. 2. Совмещенные ПЭТ и МРТ изображений. Схематическое представление сопоставления зон интереса (VOI) максимального кровотока (CBFmax – красный контур), измеряемого коэффициента диффузии (ADCmin – черный контур), метаболической активности метионина в опухоли (METmax – синий контур): (а) совпадение VOI, (б) частичное совпадение VOI, (в) Отсутствие совпадения VOI.

Fig. 2. PET and MRI image combination. Schematic comparison representation of volume of interest (VOI) blood flow maximum (CBFmax – red contour), apparent diffusion coefficient minimum (ADCmin – black contour), tumor maximum methionine metabolic activity (METmax – blue contour): (a) VOI total match (б) VOI partial match (в) VOI mismatch.

Таблица 1. Средние значения изучаемых параметров кровотока, диффузии и метаболизма MET (заглавные – CBF, ADC, MET) в каждой зоне интереса в структуре ГБ
Table 1. Average values of cerebral blood flow, diffusion and MET metabolism parameters (capital – CBF, ADC, MET) in each area of interest in GB structure

Параметры	Общая группа ГБ (N=40)	Сравниваемые параметры	p-value
CBFmax	140.25 ± 59.07	CBFmax vs CBFmet	< 0.001
CBFmet	81.24 ± 35.08	CBFmet vs CBFadc	0.03
CBFadc	61.50 ± 30.85	CBFadc vs CBFmax	< 0.001
ADCmin	937.73 ± 181.05	ADCmax vs ADCmet	0.035
ADCmet	1060.60 ± 223.56	ADCmet vs ADCcbf	0.519
ADCcbf	1084.29 ± 271.75	ADCcbf vs ADCmax	0.004
METmax	3.42 ± 0.88	METmax vs METcbf	< 0.001
METcbf	2.38 ± 0.88	METcbf vs METadc	0.998
METadc	2.4 ± 0.84	METadc vs METmax	< 0.001
Ki-67	27.95 ± 18.81		

опухоли к уровню накопления РФП в неизменной мозговой ткани контралатерального полушария.

Проведен сравнительный и корреляционный анализ всех параметров как в общей группе ГБ, так и отдельно, в зависимости от молекулярно-генетического статуса (MGMT+/- и EGFR+/-) и уровня Ki67.

Количество пациентов в группах с разными генетическими нарушениями было не равнозначно, но достаточно для статистической обработки данных (MGMT+/- n = 9/31, EGFR+/- n = 8/20 соответственно). Статус мутации гена EGFR определялся только у больных старшей возрастной группы (> 50 лет), поэтому количество случаев отличается от общего числа пациентов.

Статистический анализ проводился с использованием программы jamovi 2.3.12 и web-tool for ROC curve analysis (ver. 1.3.1) и easyROC (<http://www.biosoft.hacettepe.edu.tr/easyROC/>). Количественная оценка корреляционной связи между параметрами проводилась с расчетом коэффициента ранговой корреляции Спирмена. Наличие статистически значимых различий между исследуемыми группами оценивалось с помощью непараметрического U-теста Манна – Уитни. Кроме этого, для анализа был проведен ROC-анализ и рассчитаны такие параметры, как чувствительность, специфичность, площадь под кривой (AUC), а также пороговые значения в соответствии со значениями индекса Юдена.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

По результатам исследования при сопоставлении зон интереса (METmax, ADCmin, CBFmax)

анатомически их полное совпадение было выявлено только у 2 пациентов – 7% (рис. 2 (а)), в 48% случаев они пересекались или были расположены в непосредственной близости друг от друга (рис. 2 (б)), в 45% – разбросаны в структуре опухоли без пересечения (рис. 2 (в)).

Сопоставление МРТ- и ПЭТ-параметров проводилось сначала в общей группе ГБ, независимо от мутаций. Средние значения представлены в табл. 1, где видно, что уровень кровотока статистически значимо отличался между всеми контурами (CBFmax vs CBFmet vs CBFadc, *p* < 0.05), а значения коэффициента диффузии и ИН MET значимо отличались только в точке их максимума на своей карте от двух других значений (ADCmin vs ADCmet/ADCcbf и METmax vs METcbf/METadc, *p* < 0.05), при этом в остальных контурах различий выявлено не было.

Сравнение аналогичных показателей изучаемых параметров в подгруппах ГБ с генетическими особенностями представлено в табл. 2.

Как видно в табл. 2, в группе ГБ MGMT+ статистически значимые отличия были получены только для ADC с более высокими значениями в группе (пороговое значение ADCmin = 1.01 * 10⁻³ мм²с, Se = 78%, Sp = 74%, AUC = 0.77).

В группе пациентов с амплификацией гена EGFR значимые отличия выявлены для ИН MET (METmax), при пороговом значении 3.29 и выше чувствительность и специфичность ПЭТ/КТ в выявлении ГБ EGFR+ составляет 88 и 70% соответственно (AUC = 0.82).

Таблица 2. Средние значения изучаемых параметров кровотока, диффузии и метаболизма MET (заглавные – CBF, ADC, MET) в каждой зоне интереса в структуре опухоли в подгруппах ГБ, в зависимости от метилирования гена MGMT и амплификации гена EGFR; а также Ki67

Table 2. Mean values of cerebral blood flow, diffusion and MET metabolism parameters (capital – CBF, ADC, MET) in each area of interest in GB structure and in different genetic GB subgroups with MGMT methylation and EGFR amplification; as well as by Ki67 level

Параметры	MGMT «-»	MGMT «+»	p	EGFRamp «-»	EGFRamp «+»	p	Ki67 >20%	Ki67 < 20%	p
N	31	9		20	8		20	19	
CBFmax	83.02 ± 35.82	72.02 ± 32.93	0.39	136.08 ± 62.59	118.41 ± 55.44	0.76	160.45 ± 46.01	111.83 ± 66.26	0.04
CBFmet	62.57 ± 32.63	55.93 ± 20.88	0.48	82.03 ± 34.03	70.91 ± 30.30	0.44	91.17 ± 33.60	65.97 ± 33.23	0.04
CBFadc	139.36 ± 59.10	144.85 ± 65.63	0.82	64.16 ± 32.68	53.44 ± 24.61	0.54	72.96 ± 29.40	45.32 ± 27.14	0.01
ADCmin	0.90 ± 0.16	1.06 ± 0.15	0.02	0.94 ± 0.18	0.95 ± 0.94	0.94	0.96 ± 0.19	0.92 ± 0.17	0.59
ADCmet	1040.64 ± 233.79	1129.37 ± 178.36	0.17	1088.44 ± 56.13	1003.47 ± 143.57	0.35	1049.91 ± 187.59	1085.72 ± 257.89	0.90
ADCcbf	1073.08 ± 285.10	1142.58 ± 201.92	0.30	1108.36 ± 237.00	1140.83 ± 265.37	0.94	1150.07 ± 248.82	1008.35 ± 297.08	0.28
METmax	3.40 ± 0.92	3.49 ± 0.78	0.82	3.14 ± 0.78	4.07 ± 0.80	0.01	3.35 ± 0.82	3.55 ± 0.94	0.43
METcbf	2.41 ± 0.94	2.24 ± 0.37	0.93	2.32 ± 0.83	2.84 ± 1.06	0.17	2.25 ± 0.82	2.75 ± 1.03	0.23
METadc	2.40 ± 0.83	2.41 ± 0.93	0.97	2.26 ± 0.85	2.92 ± 1.07	0.35	2.49 ± 0.82	2.33 ± 0.88	1.00
Ki-67	26.40 ± 18.22	33.11 ± 20.95	0.18	28.32 ± 0.56	30.00 ± 15.12	0.40	40.25 ± 19.09	15.00 ± 4.16	

Таблица 3. Корреляционные взаимосвязи параметров кровотока, диффузии и метаболизма MET (заглавные – CBF, ADC, MET) в каждой зоне интереса в структуре опухоли в общей группе пациентов и в генетических подгруппах, в зависимости от метилирования гена MGMT и амплификации гена EGFR, а также Ki67

Table 3. Correlations of cerebral blood flow, diffusion and MET metabolism parameters (capital – CBF, ADC, MET) in each area of interest in GB structure in the general patient group and in different genetic GB subgroups with MGMT methylation and EGFR amplification; as well as by Ki67 level

Параметры		Общая группа	MGMT «-»	MGMT «+»	EGFR «-»	EGFR «+»	Ki-67 >20%	Ki-67 <20%
METmax	CBFmet							
METmax	ADCmet	-0.37		-0.72	-0.56	-0.85	-0.65	
ADCmet	CBFmet							0.71
CBFmet	Ki-67	0.38		0.89				
ADCmin	METadc					-0.76	-0.47	
ADCmin	CBFadc							
METadc	CBFadc							
CBFmax	METcbf							
CBFmax	ADCcbf							
METcbf	ADCcbf	-0.5	-0.5		-0.63	-0.93		
CBFmax	Ki-67	0.48	0.41	0.89	0.83		0.58	
METcbf	Ki-67						0.52	

В группе ГБ с уровнем Ki67 > 20% отчетливо проявился более высокий уровень кровотока по данным ASL-перфузии с пороговым значением CBFmax 108.18 мл/100г/мин (Se = 70%, Sp = 94%, AUC = 0.75).

Для оценки взаимосвязей процессов клеточной пролиферации, неоангиогенеза и метаболизма MET в опухолевой ткани были рассчитаны корреляционные взаимосвязи между изучаемыми параметрами, представленные в табл. 3.

Таким образом, в общей группе пациентов были получены значимые отрицательные корреляционные взаимосвязи между MET и ADC, причем как в зоне наибольшего включения аминокислоты (METmax и ADCmet, $k = -0.37$), так и в области максимальных значений кровотока (METcbf и ADCcbf, $k = -0.5$), с усилением взаимосвязей до максимума в группе EGFR+ ($k = -0.85$ и -0.93 соответственно).

В свою очередь, только параметры кровотока в области своего максимума и в контуре максимального метаболизма были взаимосвязаны с Ki67 (CBFmax $k = 0.48$ > CBFmet $k = 0.38$). Усиление взаимосвязи происходило в группе ГБ MGMT+ (как CBFmet $k = 0.89$, так и CBFmax $k = 0.89$), в группе EGFR- (CBFmax $k = 0.83$) и при Ki67 > 20% (CBFmax $k = 0.58$).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Гетерогенность глиобластом как фенотипическая, так и генетическая широко обсуждается в литературе последние несколько десятилетий (Yabo, 2022; Nikitin, 2020). Механизмы роста и агрессивной инфильтрации вещества мозга являются предметом особого интереса морфологов, клиницистов и рентгенологов (Wu, 2021; Śledzińska, 2021) с целью разработки эффективных схем лечения глиом и прогнозирования исхода заболевания.

За последние 10 лет вышло несколько систематических обзоров по визуализации опухолей головного мозга (Suh, 2019; Seow, 2018; Yang, 2019;) обобщающих публикации с 2003 по 2019 г., но работы, выполненные до 2016 г., не учитывают генетические особенности глиом и сосредоточены на выявлении отличий между двумя большими разнородными группами опухолей с высокой и низкой степенью злокачественности (LGG и HGG). После обновления классификации ВОЗ в 2016 г. большинство диагностических работ сосредоточилось на поиске фенотипических отличий ГБ с IDH-мутантным и «диким» статусом на основе стандартной МРТ

(T2-FLAIR mismatch), диффузионных и перфузионных МР-технологий с получением значимых результатов (Batalov, 2019; Беляев, 2021; Choi, 2016). Исследования ПЭТ/КТ с аминокислотами при этом демонстрировали противоречивые данные. Так, некоторые авторы не выявили зависимости параметров накопления ДОФА, в зависимости от статуса IDH (Cicone, 2019), а в исследованиях с ФЭТ отмечалась стойкая взаимосвязь метаболизма аминокислоты, мутации IDH и выживаемости пациентов (Blanc-Durand, 2018; Unterrainer, 2018; Verger, 2018). При этом выборки пациентов были смешанные с присутствием глиом (Grade 2–3), в том числе с олигодендрокластомом, что значительно влияло на показатели прогноза. Интересно, что отличий по уровню метаболизма между ГБ (IDH +/-) и ОДГ выявлено не было (Verger, 2018) и это сильно уменьшает практическую значимость полученных результатов.

Последний пересмотр классификации опухолей ЦНС в 2021 г. еще больше сместил акцент исследований в область взаимосвязи прогноза с генетическим профилем ГБ (Osborn, 2022), добавляя к статусу IDH еще несколько типов молекулярных нарушений, и сделал сравнение новых работ, в том числе и этой, с предыдущими нецелесообразным, ввиду принципиальных отличий в формировании изучаемых групп опухолей.

По данным последних систематических обзоров отмечено, что большинство работ по радиогеномике ГБ сосредоточены на анализе изменений в генах EGFR (41.7%) и MGMT (20.8%) (Seow, 2018; Yang, 2019; Danilov, 2023; Saadeh, 2018; Chamberlain, 2015; Nan, 2018). При этом метаболические характеристики ГБ по данным ПЭТ/КТ в литературе исследуются с использованием различных РФП (MET (Yu, 2019), ФЭТ (Haubold, 2020), ДОФА (Qian, 2020) и ФДГ (Wang, 2019; Dev, 2021)).

Данная работа уникальна тем, что в относительно гомогенной группе глиом, представленных только ГБ, были изучены особенности структурных, функциональных и метаболических процессов в сопоставлении с пролиферативной активностью и генетическим профилем опухоли.

В нашем исследовании в группе ГБ MGMT+ наблюдались значимо более высокие показатели измеряемого коэффициента диффузии, то есть плотноклеточность опухоли была ниже, чем в группе ГБ MGMT-. При этом отмечалась отрицательная корреляционная взаимосвязь диффузионных параметров с уровнем метаболической активности MET

в ткани опухоли (METmax и ADCmet, табл. 1), что косвенно свидетельствует о более низкой потребности данного генетического подтипа ГБ в строительстве новых мембран, обусловленной угнетением механизма пролиферации клеток ферментом системы репарации ДНК – Об-метилгуанин-ДНК-метилтрансферазой.

Хорошо известно, что в норме этот фермент, экспрессируясь на высоком уровне, удаляет метильные и хлорэтильные группы из Об-позиции гуанина, нейтрализуя цитотоксический эффект алкилирующих агентов. Снижение уровня экспрессии фермента за счет метилирования промотора гена MGMT, которое может наблюдаться только в опухолевых клетках, приводит к тому, что именно они избирательно подвергаются цитотоксическому воздействию химиопрепаратов (например, темозоломида) (Dev, 2021), что обуславливает хороший ответ опухоли на лечение и более благоприятный прогноз течения ГБ (Wu, 2021; Śledzińska, 2021; Chai, 2021). Наши данные о взаимосвязи метилирования промотора гена MGMT и ADC подтверждают результаты более ранних работ (Blanc-Durand, 2018; Dadgar, 2023; Kopylov, 2021).

В одной из аналогичных работ по сопоставлению ГБ с различным статусом метилирования гена MGMT (Dadgar, 2023) на основе данных МР-перфузии (3D pCASL) коллектив авторов во главе с Yu Han продемонстрировал статистически значимые отличия показателей rCBF ($p < 0.001$, AUC0.835) в изучаемых группах. В нашей работе не удалось получить пороговые значения CBFmax для разделения этих генетических подгрупп, но ГБ MGMT+ демонстрировали прямую корреляционную зависимость уровня кровотока (CBFmax и CBFmet) с пролиферативной активностью опухоли (Ki67), что косвенно свидетельствует о взаимосвязи процессов неопластического роста со степенью злокачественности опухоли в этой генетической подгруппе ГБ.

Следующий важный генетический маркер прогноза течения ГБ – трансмембранный рецептор тирозинкиназы эпидермального фактора роста (EGFR), активация которого происходит примерно у половины больных ГБ. Причем запуск различных сигнальных каскадов происходит независимо от лиганда (24–67% случаев представлены мутацией гена EGFR, в 40% – амплификацией и 60% – гиперэкспрессией) (Muñoz-Hidalgo, 2020; Oprita, 2021). В результате происходит активация процессов онкогенеза, пролиферации и миграции опухолевых клеток. Таким образом, изменение генетического статуса EGFR является важным фактором неблаго-

приятного прогноза и быстрого прогрессирования ГБ (Wu, 2021; Śledzińska, 2021; Oprita, 2021).

По данным нашего исследования, выявление амплификации гена EGFR было ассоциировано со значимо более высоким ИН MET (cut-off 3.29 AUC = 0.82) и коррелировало с Ki67, что сопоставимо с общеизвестным фактом о повышенном использовании аминокислот при строительстве мембран опухолевых клеток. Кроме того, в каждом изученном контуре (cbf, met, adc) наблюдалась сильная отрицательная взаимосвязь метаболизма и плотноклеточности в структуре опухоли, подтверждающая активацию процессов пролиферации, вероятно, за счет повреждения тирозинкиназных рецепторов (Saadeh, 2018; Muñoz-Hidalgo, 2020; Oprita, 2021). Исследования, аналогичные нашему, представлены в единичных вариантах (Haubold, 2020). На современном этапе большинство авторов сосредоточено на поиске таргетных РФП с целью избирательного выявления EGFR+ ГБ (Dadgar, 2023), однако клинически значимых успехов пока не достигнуто. Трудности связаны с проникновением препаратов через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) и развитием компенсаторных сигнальных путей, но ученые не теряют надежды и продолжают поиски, в том числе и на базе Центра нейрохирургии им. академика Н. Н. Бурденко (Kopylov, 2021).

Межопухолевая и внутриопухолевая гетерогенность ГБ во временном и пространственном аспектах является одной из причин устойчивости опухоли к таргетной терапии и делает ее предметом изучения не только морфологов (Nikitin, 2020), но и ди-агностов (Kazerooni, 2020; Seow, 2018; Oprita, 2021).

Наше исследование показало, что локализация зон высоких значений кровотока, плотноклеточности и метаболизма аминокислот могут не совпадать более чем в 50% случаев, доказывая наличие различий в структуре и функциональной активности различных участков ГБ.

Зону максимальных значений кровотока (CBFmax) условно можно обозначить транспортной, где основным процессом является потребление питательных веществ из сети патологических опухолевых сосудов, независимо от нарушения ГЭБ. При этом процессы метаболизма в данной области могут быть и не ускорены. В нашем исследовании этот факт подтверждается отсутствием взаимосвязей между показателями METcbf и ADCcbf в данной области.

Зона максимального ограничения диффузии в структуре ГБ (ADCmin) также продемонстрирова-

ла отсутствие корреляционных взаимосвязей с уровнем метаболизма и кровотока (METadc и CBFadc), что, в свою очередь, могло бы соответствовать зоне инкубации, где клетки делятся без увеличения их объема и построения новых мембран, что делает их расположение более компактным — плотноклеточным.

Участок максимального метаболизма метионина (METmax), в свою очередь, отражает активное построение мембран с ускоренными процессами пластического метаболизма в клетках, подтверждающееся отрицательной корреляцией METmax с ADCmet.

Следует предполагать, что вышеописанные зоны в структуре опухоли переходят из одной в другую соответственно инвазивному распространению ГБ в веществе мозга (Yabo, 2022; Nikitin, 2020), однако идею зонирования ГБ и трансформации участков пролиферации и роста в структуре опухоли трудно доказать на практике по данным визуализации, так как в этом случае необходимо будет наблюдать за ростом ГБ без лечения, что невозможно по этическим соображениям.

В данном исследовании мы комплексно подошли к задаче оценки фенотипа и генотипа ГБ, объединив диагностические, функциональные и молекулярно-генетические данные. Описание и характеристики основных закономерностей внутриопухолевой гетерогенности ГБ, по нашему мнению, в дальнейшем будут способствовать формированию новых представлений о глиомогенезе и использоваться с практической точки зрения для поиска новых точек таргетного лечебного воздействия.

Ограничения исследования: невозможность проведения регрессионного анализа с учетом малого количества пациентов в генетических подгруппах; но надо учесть, что исследование — проспективное и набор материала продолжается. Кроме того, не удалось оценить прогностическую значимость вышеуказанных параметров в связи с короткими сроками сбора катамнеза.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование показало, что гетерогенность структуры ГБ выражалась отличиями локализации участков максимального кровотока, диффузии и метаболизма метионина в структуре образования. Полученные корреляции между ИН MET и ADC и отсутствие таковых с параметрами кровотока CBF свидетельствуют о том, что повыше-

ние метаболизма аминокислот в опухоли более вероятно зависит от количества клеточных мембран, а не сосудистого компонента. Более выраженные взаимосвязи индекса Ki67 с параметрами перфузии во всех группах определяют эту зону как более злокачественную и целевую при планировании СТБ в случаях несовпадения участков максимального включения MET и CBF на картах ASL-перфузии.

Сопоставление вышеуказанных параметров с результатами молекулярно-генетических исследований позволило наметить особенности фенотипического портрета ГБ, в зависимости от молекулярно-генетического статуса, и показало необходимость проведения более масштабных работ. Метилирование гена MGMT, характерное для более благоприятного течения ГБ, в нашей выборке пациентов сопровождалось низким уровнем плотноклеточности опухолевой ткани, а наличие амплификации гена EGFR как неблагоприятного фактора прогноза сопровождалось более высоким уровнем накопления MET.

Данное исследование является стартовым, и его продолжение в виде дальнейшей оценки фенотипа опухоли по данным МРТ и ПЭТ/КТ, генотипа, а также выживаемости больных представляется перспективным с точки зрения фундаментального изучения процессов глиомогенеза в рамках персонализированного подхода к терапии ГБ и нового представления о классификации опухолей WHO2021.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075–15–2021–1343).

Потенциальный конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Беляев А. Ю., Вихрова Н. Б., Калаева Д. Б., Баталов А. И., Афандиев Р. М., Галстян С. А., Кобяков Г. Л., Пронин И. Н., Усачев Д. Ю. ПЭТ-КТ с 11С-метионином в диагностике анапластических астроцитом и анапластических олигодендроглиом. Медицинская визуализация. 2022. 26 (4): 82–92. [Belyaev A. Y., Vikhrova N. B., Kalaeva D. B., Batalov A. I., Afandiev R. M., Galstyan S. A., Kobyakov G. L., Pronin I. N., Usachev D. Y. 11C-methionine PET-CT in the diagnosis of anaplastic astrocytomas and anaplastic oligodendrogliomas. Medical Visualization. 2022. 26 (4): 82–92. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.24835/1607->

- 0763–1170
- Беляев А. Ю., Усачев Д. Ю., Пронин И. Н., Бата-
лов А. И., Афандиев Р. М., Галстян С. Г. Феномен
“несоответствия” режимов T2 и T2-FLAIR как
нейровизуализационный биомаркер генетического
профиля анапластических астроцитом. Медицин-
ская визуализация. 2021. 25(1): 147–158.
[Belyaev A. Y., Usachev D. Y., Pronin I. N., Batalov A. I.,
Afandiev R. M., Galstyan S. A. T2/T2-FLAIR mismatch
sign as a predictive biomarker for anaplastic astrocytoma
genetic profile. Medical Visualization. 2021. 25(1):
147–158. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.24835/1607-0763-959>
- Armocida D., Frati A., Salvati M., Santoro A., Pesce A. Is
Ki-67 index overexpression in IDH wild type glioblas-
toma a predictor of shorter Progression Free survival? A
clinical and Molecular analytic investigation. Clin
Neurol Neurosurg. 2020. 198: 106126. <https://doi.org/10.1016/j.clineuro.2020.106126>
- Batalov A., Zakharova N., Goryainov S., Pogosbekian E.,
Potapov A., Pronin I. ASL-perfusion in predicting of
brain glioma malignancy and IDH1 status. Neurora-
diology. 2019. 61 (S1): S44. <https://doi.org/10.1007/s00234-019-02263-4>
- Blanc-Durand P., Van Der Gucht A., Verger A., Langen K. J.,
Dunet V., Bloch J., Brouland J. P., Nicod-Lalonde M.,
Schaefer N., Prior J. O. Voxel-based 18F-FET PET seg-
mentation and automatic clustering of tumor vox-
els: A significant association with IDH1 mutation
status and survival in patients with gliomas. PLoS One.
2018. 13 (6): e0199379. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199379>
- Chai R., Li G., Liu Y., Zhang K., Zhao Z., Wu F., Chang Y.,
Pang B., Li J., Li Y., Jiang T., Wang Y. Predictive value
of MGMT promoter methylation on the survival of
TMZ treated IDH-mutant glioblastoma. Cancer Biol
Med. 2021. 18 (1): 271–282. <https://doi.org/10.20892/j.issn.2095-3941.2020.0179>
- Chamberlain M. C., Sanson M. Combined analysis of
TERT, EGFR, and IDH status defines distinct prog-
nostic glioblastoma classes. Neurology. 2015. 84 (19):
2007. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000001625>
- Choi Y. S., Ahn S. S., Kim D. W., Chang J. H., Kang S. G.,
Kim E. H., Kim S. H., Rim T. H., Lee S. K. Incremental
prognostic value of ADC histogram analysis over
MGMT promoter methylation status in patients
with glioblastoma. Radiology. 2016. 281 (1): 175–184.
<https://doi.org/10.1148/radiol.2016151913>
- Cicone F., Carideo L., Scaringi C., Arcella A., Giangaspero F.,
Scopinaro F., Minniti G. 18F-DOPA uptake does not
correlate with IDH mutation status and 1p/19q co-de-
letion in glioma. Ann. Nucl. Med. 2019. 33: 295–302.
<https://doi.org/10.1007/s12149-018-01328-3>
- Dadgar H., Jokar N., Nemati R., Larvie M., Assadi, M. PET
Tracers in Glioblastoma: toward neurotheranostics
as an individualized medicine approach. Front.
Nucl. Med. 2023. 3: 1103262. <https://doi.org/10.3389/fnume.2023.1103262>
- Danilov G. V., Kalaeva D. B., Vikhrova N. B., Konakova T. A.,
Zagorodnova A. I., Popova A. A., Postnov A. A., Shugay S. V.,
Pronin I. N. Radiomics in Determining Tumor-to-Normal
Brain SUV Ratio Based on 11C-Methionine PET/CT
in Glioblastoma. Sovrem Tekhnologii Med. 2023. 15 (1):
5–13. <https://doi.org/10.17691/stm2023.15.1.01>
- Dev I. D., Puranik A. D., Purandare N. C., Gupta T., Sridhar E.,
Shetty P., Moiyadi A., Agrawal A., Shah S., Rang-
arajan V. Prognostic significance of 18F-FDG PET/
CT parameters in IDH-1 wild-type GBM and cor-
relation with molecular markers. Nucl Med Commun.
2021; 42 (11): 1233–1238. <https://doi.org/10.1097/mnm.0000000000001449>
- Efremov L., Abera S. F., Bedir A., Vordermark D., Med-
enwald D. Patterns of glioblastoma treatment and sur-
vival over a 16-years period: pooled data from the German
Cancer Registries. J Cancer Res Clin Oncol. 2021. 147 (11):
3381–3390. <https://doi.org/10.1007/s00432-021-03596-5>
- Han Y., Yan L. F., Wang X. B., Sun Y. Z., Zhang X., Liu Z. C.,
Nan H. Y., Hu Y. C., Yang Y., Zhang J., Yu Y., Sun Q.,
Tian Q., Hu B., Xiao G., Wang W., Cui G. B. Struc-
tural and advanced imaging in predicting MGMT pro-
moter methylation of primary glioblastoma: A region of
interest based analysis. BMC Cancer. 2018. 18 (1):
1–10. <https://doi.org/10.1186/s12885-018-4114-2>
- Haubold J., Demircioglu A., Gratz M., Glas M., Wrede K.,
Sure U., Antoch G., Keyvani K., Nittka M., Kannengiesser S.,
Gulani V., Griswold M., Herrmann K., Forsting M., Nensa F.,
Umutlu L. Non-invasive tumor decoding and phe-
notyping of cerebral gliomas utilizing multiparametric
18F-FET PET-MRI and MR Fingerprinting. Eur
J Nucl Med Mol Imaging. 2020. 47 (6): 1435–1445.
<https://doi.org/10.1007/s00259-019-04602-2>
- Kazerooni A. F., Bakas S., Rad H. S., Davatzikos C. Imag-
ing Signatures of Glioblastoma Molecular Character-
istics: A Radiogenomics Review. Physiol Behav. 2017.
176 (5): 139–148. <https://doi.org/10.1002/jmri.26907>
- Kopylov A. M., Fab L. V., Antipova O., Savchenko E. A.,
Revishchin A. V., Parshina V. V., Pavlova S. V., Kireev I. I.,
Golovin A. V., Usachev D. Y., Pavlova G. V. RNA Aptamers
for Theranostics of Glioblastoma of Human Brain. Bio-
chemistry (Mosc). 2021. 86 (8): 1012–1024. <https://doi.org/10.1134/S0006629721080113>
- Louis D. N., Perry A., Reifenberger G., von Deimling A.,
Figarella-Branger D., Cavenee W. K., Ohgaki H., Wiest-
ler O. D., Kleihues P., Ellison D. W. The 2016 World
Health Organization Classification of Tumors of the
Central Nervous System: a summary. Acta Neuropathol.
2016. 131 (6): 803–820. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1545>
- Low J. T., Ostrom Q. T., Cioffi G., Neff C., Waite K. A.,
Kruchko C., Barnholtz-Sloan J. S. Primary brain and
other central nervous system tumors in the United
States (2014–2018): A summary of the CBTRUS statis-
tical report for clinicians. Neurooncol Pract. 2022.
9 (3): 165–182. <https://doi.org/10.1093/nop/npac015>
- Muñoz-Hidalgo L., San-Miguel T., Megías J., Serna E.,
Calabuig-Fariñas S., Monleón D., Gil-Benso R., Cerdá-
Nicolás M., López-Ginés C. The Status of EGFR Modu-
lates the Effect of miRNA-200c on ZEB1 Expres-

- sion and Cell Migration in Glioblastoma Cells. *Int J Mol Sci.* 2020. 22 (1): 368. <https://doi.org/10.3390/ijms22010368>
- Nikitin P. V., Ryzhova M. V., Potapov A. A., Galstyan S. A., Kim D. S., Panina T. N., Shugai S. V., Starovoitov D. V., Khokhlova E. A., Zubova I. V. Glioblastoma molecular and histological heterogeneity. *Clin Exp Morphol.* 2020. 9 (3): 5–11. <https://doi.org/10.31088/CEM2020.9.3.5–11>
- Nomura Y., Asano Y., Shinoda J., Yano H., Ikegame Y., Kawasaki T., Nakayama N., Maruyama T., Muragaki Y., Iwama T. Characteristics of time-activity curves obtained from dynamic 11C-methionine PET in common primary brain tumors. *J Neurooncol.* 2018. 138 (3): 649–658. <https://doi.org/10.1007/s11060-018-2834-4>
- Oprita A., Baloi S. C., Staicu G. A., Alexandru O., Tache D. E., Danoiu S., Micu E. S., Sevastre A. S. Updated insights on EGFR signaling pathways in glioma. *Int J Mol Sci.* 2021. 22 (2): 1–21. <https://doi.org/10.3390/ijms22020587>
- Osborn A. G., Louis D. N., Poussaint T. Y., Linscott L. L., Salzman K. L. The 2021 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: What Neuroradiologists Need to Know. *AJNR.* 2022. 43 (7): 928–937. <https://doi.org/10.3174/ajnr.A7462>
- Overcast W. B., Davis K. M., Ho C. Y., Hutchins G. D., Green M. A., Graner B. D., Veronesi M. C. Advanced imaging techniques for neuro-oncologic tumor diagnosis, with an emphasis on PET-MRI imaging of malignant brain tumors. *Curr Oncol Rep.* 2021. 23(3): 34. <https://doi.org/10.1007/s11912-021-01020-2>
- Qian J., Herman M. G., Brinkmann D. H., Laack N. N., Kemp B. J., Hunt C. H., Lowe V., Pafundi D. H. Prediction of MGMT Status for Glioblastoma Patients Using Radiomics Feature Extraction From 18F-DOPA-PET Imaging. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2020. 108 (5): 1339–1346. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2020.06.073>
- Saadeh F. S., Mahfouz R., Assi H. I. EGFR as a clinical marker in glioblastomas and other gliomas. *Int J Biol Markers.* 2018. 33 (1): 22–32. <https://doi.org/10.5301/ijbm.5000301>
- Seow P., Wong J. H. D., Ahmad-Annuar A., Mahajan A., Abdullah N. A., Ramli N. Quantitative magnetic resonance imaging and radiogenomic biomarkers for glioma characterisation: A systematic review. *Br J Radiol.* 2018. 91 (1092). <https://doi.org/10.1259/bjr.20170930>
- Śledzińska P., Bebyn M. G., Furtak J., Kowalewski J., Lewandowska M. A. Prognostic and predictive biomarkers in gliomas. *Int J Mol Sci.* 2021. 22 (19): 1–32. <https://doi.org/10.3390/ijms221910373>
- Suh C. H., Kim H. S., Jung S. C., Choi C. G., Kim S. J. Imaging prediction of isocitrate dehydrogenase (IDH) mutation in patients with glioma: a systemic review and meta-analysis. *Eur Radiol.* 2019. 29 (2): 745–758. <https://doi.org/10.1007/s00330-018-5608-7>
- Unterrainer M., Winkelmann I., Suchorska B., Giese A., Wenter V., Kreth F. W., Herms J., Bartenstein P., Tonn J. C., Albert N. L. Biological tumour volumes of gliomas in early and standard 20–40 min 18F-FET PET images differ according to IDH mutation status [published correction appears in *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2018. 45 (7): 1242–1249. <https://doi.org/10.1007/s00259-018-3969-4>
- Verger A., Stoffels G., Bauer E. K., Lohmann P., Blau T., Fink G. R., Neumaier B., Shah N. J., Langen K. J., Gall-diks N. Static and dynamic 18F-FET PET for the characterization of gliomas defined by IDH and 1p/19q status. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* 2018. 45 (3): 443–451. <https://doi.org/10.1007/s00259-017-3846-6>
- Wang Y., Kong Z., Lin Y., Jiang C., Li L., Liu Z., Wang Y., Dai C., Liu D., Qin X., Liu Z., Cheng X., Tian J., Ma W. 18F-FDG-PET-based Radiomics signature predicts MGMT promoter methylation status in primary diffuse glioma. *Cancer Imaging.* 2019. 19 (1): 58. <https://doi.org/10.1186/s40644-019-0246-0>
- Wu W., Klockow J. L., Zhang M., Lafortune F., Chang E., Jin L., Wu Y., Daldrup-Link H. E. Glioblastoma multiforme (GBM): An overview of current therapies and mechanisms of resistance. *Pharmacol Res.* 2021. 171: 105780. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2021.105780>
- Yabo Y. A., Niclou S. P., Golebiewska A. Cancer cell heterogeneity and plasticity: A paradigm shift in glioblastoma. *Neuro Oncol.* 2022. 24 (5): 669–682. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noab269>
- Yang Y., He M. Z., Li T., Yang X. MRI combined with PET-CT of different tracers to improve the accuracy of glioma diagnosis: a systematic review and meta-analysis. *Neurosurg Rev.* 2019. 42 (2): 185–195. <https://doi.org/10.1007/s10143-017-0906-0>
- Yu P., Ning J., Xu B., Liu J., Dang H., Lin M., Feng X., Grimm R., Tian J. Histogram analysis of 11C-methionine integrated PET/MRI may facilitate to determine the O6-methylguanylmethyltransferase methylation status in gliomas. *Nucl Med Commun.* 2019. 40 (8): 850–856. <https://doi.org/10.1097/MNM.0000000000001039>

GLIOBLASTOMA PHENOTYPIC AND GENETIC HETEROGENEITY, COMPARISON OF MRI AND PET/CT PARAMETERS WITH TUMOR MOLECULAR GENETIC CHARACTERISTICS

N. B. Vikhrova[#], D. B. Kalaeva, A. I. Batalov, I. N. Pronin

Burdenko National Medical Research Center of Neurosurgery, Ministry of Healthcare of Russia, Moscow, Russia

[#]*e-mail: nvikhrova@nsi.ru*

Glioblastoma (GB) is an extremely heterogeneous tumor, which is caused by genomic instability, high growth rate, and neovascularization. Molecular and genetic characteristics of GB play a major role in the prognosis of the disease, which is reflected in the new WHO classification of CNS tumors from 2021.

Purpose of this research is comparison MRI parameters (ADC & CBF), metabolic activity on ¹¹C-MET PET/CT with glioblastoma genetic profile. 40 patients (age 55±12 years, sex M/F = 31/9) with newly diagnosed GB were examined by MRI with assessment of diffusion parameters (ADCmin) and ASL perfusion (CBFmax) and ¹¹C-MET PET/CT with the calculation of tumor to normal index (METmax). Since these VOI (1cm³) did not always coincide, it was decided to measure all parameters in each VOI on all image maps (PMOD automatic contour transfer). A total of 9 measurements were obtained for each patient: METmax, METcbf, METadc; ADCmin, ADCmet, ADCcbf; CBFmax, CBFmet, CBFadc. Comparative and correlation analysis was carried out both in the total GB group and separately in the groups MGMT+/- and EGFR+/- and different Ki67 levels (cut-off 20%). In results 45% of patients had CBFmax, ADCmin and METmax mismatch. Significant correlations were found in the METmax VOI between METmax&ADCmet (Rs = -0.37) and METcbf&ADCcbf (Rs = -0.05). CBFmax and CBFmet correlated with Ki67 (Rs = 0.38 and Rs = 0.48, respectively) and increased in Ki67 > 20% GB group. GB genetic subgroup analysis showed: MGMT+ had significantly higher ADCmin>1.01 (10-3 mm²/sec), Se = 78%, Sp = 74%, AUC = 0.77, it means that cells were more tightly packed. In METmax VOI, METmax was negatively correlated with ADCmet (Rs = -0.72) and CBFmet was positively correlated with Ki-67 (Rs = 0.89); EGFR+ tumors had significantly higher METmax > 3.29 (Se = 88%, Sp = 70%, AUC = 0.82), that was negatively correlated with ADCmet (Rs = -0.85). In case when Ki67 > 20% GB demonstrated significantly higher CBFmax >108.177ml/100/min (Se = 70%, Sp = 94%, AUC 0.75) and a strong negative correlation between METmax and ADCmet, (Rs = -0,65) in METmax VOI. Our study shown that CBFmax, ADCmin and METmax localization coincide in 45% of cases, which proves the presence of variety in the structure and functional activity of different areas of GB. The correlation of MGMT methylation and ADC (ADCmin > 1.01 (10-3 mm²/sec), Se = 78%, Sp = 74%, AUC = 0.77) confirms the recent studies results of this tumor subtype lower needs of the new membranes construction, that's due to the inhibition of the mechanism of the DNA repair system. EGFR amplification presence in our patient sample was associated with a significant higher MET metabolism (METmax > 3.29, Se = 88%, Sp = 70%, AUC = 0.82) and correlated with height level of Ki67 (Rs = -0.85), confirming the fact of GB cells amino acids increased consumption for membrane synthesis. The obtained correlations MET with ADC and the absence of those with CBF, confirms the dependence glioma methionine metabolism of the new cell membranes building, rather than on neovascularization.

Revealed mismatch of MRI and PET/CT parameters confirmed GB structure heterogeneity phenomenon, as well as their significant differences in various genetic status GB subgroups.

Keywords: PET/CT, ¹¹C-methionine, ASL, DWI, MET, glioblastoma

Acknowledgments: This work was supported by the Ministry of Science and Higher Education, Agreement 075–15–2021–1343

Authors' contributions. All authors met the ICMJE authorship criteria. Special contribution: INP, NBV, AIB aided in the concept and plan of the study; DBK, NBV provided collection and mathematical analysis of data.

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

ПЭТ/КТ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ^{11}C –МЕТИОНИНА ПРИ МЕНИНГИОМАХ

© 2024 г. М. В. Галкин*, Н. Б. Вихрова, А. В. Голанов, Г. В. Данилов, Ю. В. Струнина

ФГАУ «НМИЦ нейрохирургии им. академика Н. Н. Бурденко» Минздрава России, Москва, Россия

*e-mail: mgalkin@nsi.ru

Поступила в редакцию 05.09.2023 г.

После доработки 30.10.2023 г.

Принята к публикации: 01.12.2023 г.

В настоящее время позитронно-эмиссионная томография, совмещенная с компьютерной томографией (ПЭТ/КТ), – это стандартный метод визуализации в нейроонкологии при глиомах и метастатическом поражении. Опыт применения ПЭТ/КТ при менингиомах – самых частых первичных новообразованиях ЦНС – значительно меньше, а интерпретация результатов исследований имеет ряд отличий. Целью работы стала оценка возможности и особенностей применения ПЭТ/КТ для определения степени злокачественности менингиом, распространенности, ответа на лучевое лечение и диагностики рецидива и/или постлучевых изменений на основании собственного клинического опыта и обзора литературы.

В исследование были включены 70 пациентов с 77 менингиомами, которым была выполнена ПЭТ/КТ с ^{11}C –метионином. Средний возраст на момент обследования составил 57.4 года (19–86 лет).

Основной параметр оценки – индекс накопления (ИН) ^{11}C –метионина (^{11}C –МЕТ) в опухоли – составил в среднем 3.13 (1.00–10.66). Менингиомы характеризовались высоким ИН ^{11}C –МЕТ, в 89.6% случаев ИН превышал 1.5. В гистологически верифицированных менингиомах 1, 2 и 3-й степени злокачественности по шкале ВОЗ медиана ИН составила 4.06 [3.04; 4.57], 2.32 [2.12; 3.69] и 4.29 [2.60; 5.10] и достоверно не различалась между группами. При этом в растущих или медленно растущих гистологически неверифицированных менингиомах – случайных находках – ИН ^{11}C –МЕТ был достоверно ниже, чем в менингиомах 1 и 3-й степени.

Не было выявлено достоверного различия в ИН между облученными менингиомами с контролем роста опухоли (3.81 [2.97; 3.98]) и рецидивом (3.62 [2.60; 4.30]). При сопоставлении облученных и необлученных менингиом 1, 2 и 3-й степеней злокачественности, а также объединенной группы опухолей 1–3-й степеней достоверных различий в ИН ^{11}C –МЕТ выявлено не было.

Применение ПЭТ/КТ при менингиомах имеет ряд важных особенностей. Менингиомы характеризуются высоким ИН ^{11}C –МЕТ. По нашим данным, ПЭТ/КТ с ^{11}C –МЕТ не позволяет различать между собой менингиомы разной степени злокачественности – 1, 2 или 3-й по шкале ВОЗ. При эффективном лучевом лечении и длительном локальном контроле ИН ^{11}C –МЕТ в менингиомах сохраняется стабильно высоким или происходит невыраженное его снижение. При сопоставлении растущих и не растущих менингиом, облученных и необлученных опухолей не выявляется достоверных различий в ИН ^{11}C –МЕТ.

Ключевые слова: менингиома, ПЭТ/КТ, радиофармпрепарат, ^{11}C –метионин, степень злокачественности, продолженный рост опухоли, радиотерапия, постлучевые изменения

DOI: 10.31857/S0044467724010062

ВВЕДЕНИЕ

Позитронно-эмиссионная томография, совмещенная с компьютерной томографией (ПЭТ/КТ), – современный стандарт обследования нейроонкологических пациентов в целом ряде клинических ситуаций (Verger et al., 2022). ПЭТ/КТ является молекулярным методом визуализации, в отличие от привычных структурных методов компьютерной и магнитно-резонансной томографии (КТ и МРТ). ПЭТ/КТ с аминокислотами, к которым относятся ^{11}C –метионин (^{11}C –МЕТ) и ^{18}F –фтортирозин (^{18}F –ФЭТ), на современном этапе рутинно приме-

няется в диагностике глиальных новообразований головного мозга. Эти радиофармпрепараты (РФП) используются для оценки первичной распространенности и определения степени злокачественности опухолей (Verger et al., 2022). В дальнейшем в процессе лечения ПЭТ/КТ позволяет дифференцировать постлучевые изменения от продолженного роста, оценивать ответ опухоли на проводимое лечение, определять метаболически активный объем для оконтуривания мишени лучевого воздействия. Кроме того, на все те же вопросы ПЭТ/КТ может ответить и при метастатическом поражении ЦНС, позволяя получить уникальную клиническую

информацию, не всегда доступную при стандартных анатомических методах визуализации.

Такие возможности метода определяют желание применения ПЭТ/КТ при других нозологических формах, в частности при менингиомах, которые являются самыми частыми первичными интракраниальными опухолями ЦНС и активно лечатся хирургическим и лучевым методами (Rogers et al., 2015). При лечении менингиом также регулярно возникают вопросы, которые потенциально могут быть разрешены с применением ПЭТ/КТ, – неинвазивная оценка злокачественности, уточнение распространенности процесса, различие лечебных и опухолевых изменений, подтверждение продолженного роста и др.

Однако применение ПЭТ/КТ с аминокислотами при менингиомах имеет свои нюансы и демонстрирует результаты, отличные от того, что является рутинной в диагностике глиальных образований. В силу особенностей тканевого строения менингиом, независимо от степени злокачественности опухоли, отмечается крайне высокая степень васкуляризации и повышенный уровень потребления аминокислот и жирных кислот. Это объясняет значительную интенсивность включения в них таких РФП, как ^{11}C –МЕТ и ^{18}F –ФЭТ, и, как следствие, высокое отношение опухоль / фон, обозначаемое в литературе как индекс накопления (ИН). Высокий ИН наблюдается одинаково и в злокачественных, и в обычных доброкачественных менингиомах (Slot et al., 2021).

Высокий уровень соматостатиновых рецепторов подтипа 2 (SSTR2) обуславливает высокую чувствительность ткани менингиом к другим, более специфичным для них РФП, на основе лигандов рецепторов к соматостатину, меченных изотопом галлия-68 (^{68}Ga –DOTATOC, ^{68}Ga –DOTATATE и ^{68}Ga –DOTANOC) (Filippi et al., 2022). Среди основных первичных интракраниальных опухолей эти рецепторы встречаются исключительно в менингиомах.

МЕТОДИКА

В исследование были включены 70 пациентов с 77 интракраниальными менингиомами, которым была выполнена ПЭТ/КТ с ^{11}C –метионином. Средний возраст на момент обследования составил 58.2 года (19.7–86.3 лет). Соотношение мужчин и женщин составило 1 к 4.

В 21 случае ПЭТ/КТ была выполнена на ранних этапах обследования в рамках постановки диагноза до проведения хирургического или лучевого лече-

ния. У 14 пациентов исследование было назначено для помощи в дифференцировке между лучевой реакцией и продолженным ростом опухоли. В 35 случаях ПЭТ/КТ исходно выполнялась по поводу другой опухоли (глиомы – 29, лимфомы – 3, метастатическое поражение – 3), а менингиома являлась сопутствующим заболеванием.

Все ПЭТ/КТ-исследования были выполнены в период с 2011 по 2023 г. Основная масса исследований (82.5%) была выполнена в условиях НМИЦ нейрохирургии им. академика Н. Н. Бурденко.

Из 77 менингиом 28 были верифицированы гистологически. Из них 16 опухолей имели 1-ю степень злокачественности по шкале ВОЗ, 7–2-ю степень и 5–3-ю степень. 49 менингиом не были верифицированы, эти опухоли были, как правило, случайной находкой и характеризовались медленным ростом или его отсутствием, по данным МРТ, на протяжении нескольких месяцев (6 месяцев и более). По клинико-рентгенологическим данным (небольшие размеры, четкие контуры, округлая форма, отсутствие отека) эти опухоли можно было отнести к степени 1 по шкале ВОЗ. В литературе такие опухоли иногда обозначают как степень 0, что и было использовано в данной работе (Kaul et al., 2014).

По расположению опухоли распределились следующим образом: 26 (33.8%) – конвекситально, 16 (20.8%) – в средней черепной ямке, по 11 (14.3%) – парасагиттально и в задней черепной ямке, 8 (10.4%) – в передней черепной ямке, по 2 (2.6%) – в области намета и фалькса, 1 (1.3%) – в области бокового желудочка.

Предшествующее лучевое лечение проводилось в отношении 17 опухолей (22.1%). Соответственно, 60 (77.9%) опухолей ранее не облучались.

На момент проведения ПЭТ/КТ 22 опухоли характеризовались явным ростом на протяжении последних месяцев, по данным МРТ, и появлением или нарастанием клинических проявлений. Девять из этих образований ранее были облучены. «Псевдопрогрессия», которая означает временное увеличение опухоли после проведенного лучевого лечения, у этих пациентов была исключена выполнением нескольких снимков в динамике.

47 необлученных опухолей на момент ПЭТ/КТ характеризовались медленным ростом (минимальные или недостоверные изменения размеров на протяжении 1–3 лет наблюдения) или стабилизацией. Восемь очагов были стабильны или

уменьшались после проведенного ранее лучевого лечения. Динамика или ее отсутствие подтверждались на основании серии МРТ в течение 6 месяцев и более.

Статистический анализ данных был проведен с помощью языка статистического программирования и среды R (версия 3.6.1) в IDE RStudio (версия 1.3.1093). Распределение непрерывных и дискретных количественных переменных в выборке представлено как среднее арифметическое и стандартное отклонение ($M \pm SD$) для нормально распределенных случайных величин, медиана и квартили ($Me [Q1; Q3]$) — для величин, распределение которых отличается от нормального. Категориальные показатели представлены как абсолютное число и процентное соотношение ($n (\%)$). Соответствие выборки нормальному распределению определялось с помощью теста Шапиро — Уилка. Нулевую гипотезу в статистических тестах отклоняли при уровне значимости $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Основной параметр оценки — индекс накопления РФП в опухоли — составил в среднем 3.13 (1.00–10.66). Основная масса менингиом характеризовалась высоким ИН¹¹C–МЕТ. В 89.6% случаев

ИН превышал 1.50, в 70.1% случаев — 2.00 и более и только в одном был равен 1.00.

Медиана индекса накопления ¹¹C–МЕТ в менингиомах степеней 0, 1, 2 и 3 составила 2.24 [1.68; 2.99], 4.06 [3.04; 4.57], 2.32 [2.12; 3.69] и 4.29 [2.60; 5.10] соответственно. Отметим, что даже гистологически верифицированные доброкачественные менингиомы 1-й степени по классификации ВОЗ часто демонстрировали высокий ИН РФП (рис. 1). При попарном сравнении было выявлено, что ИН РФП в менингиомах степени 0 достоверно меньше, чем в менингиомах 1-й степени ($p < 0.001$) и в менингиомах 3-й степени ($p = 0.032$). ИН в гистологически верифицированных менингиомах 1, 2 и 3-й степеней злокачественности по шкале ВОЗ достоверно не отличался. Сопоставление ИН ¹¹C–МЕТ в менингиомах 1-й степени (4.06 [3.04; 4.57]) и менингиомах 0 и 1-й степеней (2.63 [1.81; 3.82]) с менингиомами 2 и 3-й степеней (3.11 [2.28; 4.49]) не выявило статистически значимого отличия. Результаты сопоставления не изменились после исключения из групп сопоставления опухолей, которые ранее подверглись лучевому лечению.

Было выполнено сопоставление ИН ¹¹C–МЕТ в 3 группах: активно растущих клинически значимых менингиомах, стабильных после облучения

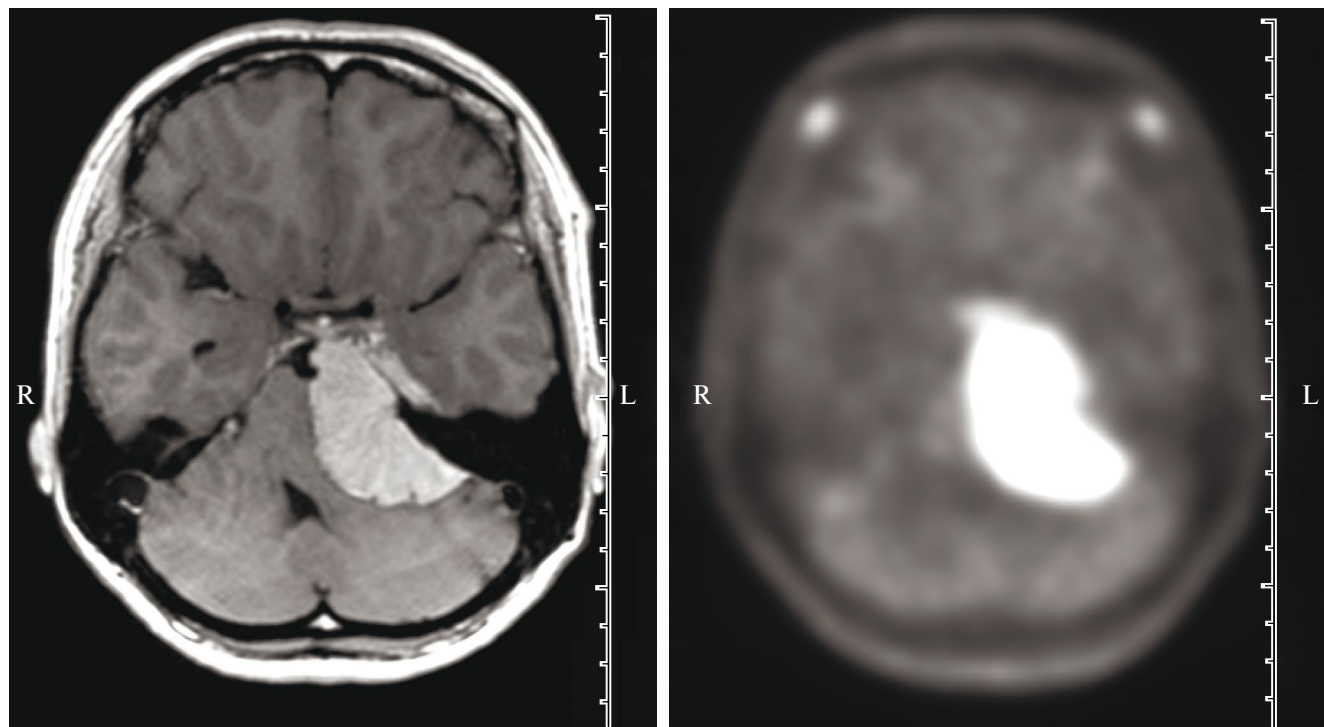


Рис. 1. Петрокливальная менингиома степени 1 по классификации ВОЗ на МРТ (слева) и ПЭТ/КТ с ¹¹C-метионом (справа). При ПЭТ/КТ определяется высокий уровень накопления РФП — 5.5.

Fig. 1. WHO grade 1 petroclival meningioma on MRI (left) and PET/CT with ¹¹C-methionine (right). PET/CT shows a high tumor-to-brain ratio of 5.5.

менингиомах и бессимптомных медленно растущих или нерастущих менингиомах. ИН ^{11}C —МЕТ в группе бессимптомных медленно растущих или нерастущих менингиом был достоверно ниже (2.24 [1.70; 2.95]), чем в группе активно растущих опухолей (4.00 [2.39; 5.11]) ($p < 0.001$) и в группе менингиом, не растущих после лучевого лечения (3.81 [2.97; 3.98]) ($p = 0.018$). При этом группы клинически значимых менингиом с активным ростом и облученных нерастущих менингиом между собой достоверно не отличались по ИН. Медиана ИН составила 4.00 [2.39; 5.11] и 3.81 [2.97; 3.98] соответственно. Такие же результаты сопоставления групп оставались при исключении из сопоставления злокачественных менингиом степеней 2 и 3.

Не было выявлено достоверного различия в ИН между облученными менингиомами с контролем роста опухоли (3.81 [2.97; 3.98]) и рецидивирующими (3.62 [2.60; 4.30]). Также не было выявлено различий в ИН между группами облученных менингиом степеней 0 и 1 при сопоставлении растущих (4.00 [3.34; 4.31]) и нерастущих (3.86 [2.70; 4.06]).

Проводилось сопоставление ИН ^{11}C —МЕТ в облученных и необлученных менингиомах. При этом из анализа были исключены менингиомы степени 0, так как, согласно ранее представленным данным, эти опухоли имели достоверно более низкий ИН и, как правило, являлись случайной находкой, в основном находились под динамическим наблюдением. При сопоставлении облученных и необлученных менингиом степеней 1, 2, 3 и объединенной группы опухолей 1–3-й степеней достоверных отличий выявлено не было. Медиана ИН в облученных менингиомах степеней 1, 2, 3 и 1–3 составила 3.81 [3.00; 4.23], 3.62 [2.97; 3.69], 2.60 [2.60; 3.85] и 3.66 [2.60; 4.13] соответственно, а в необлученных — 4.75 [3.10; 5.99], 2.12 [2.03; 2.95], 6.19 [5.24; 7.14] и 4.34 [2.21; 5.50] соответственно.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

По данным литературы, ПЭТ/КТ при менингиомах в основном выполняется с несколькими радиофармпрепаратами.

Самым частым трассером для ПЭТ-визуализации в онкологии является ^{18}F -фтордезоксиглюкоза (^{18}F -ФДГ), но из-за высокого физиологического включения в коре головного мозга в нейровизуализации применяется нечасто. А при менингиомах, которые в большинстве своем являются доброкачественными медленно растущими опухолями с низким энергетическим метаболизмом, применяется

еще реже из-за низкой контрастности изображений (Slot et al., 2021; Hua et al., 2019; Lee et al., 2009).

С учетом того, что в менингиомах практически в 100% случаев фиксируется повышенная экспрессия рецепторов к соматостатину и эти рецепторы крайне специфичны для менингиом, в последние годы для ПЭТ/КТ активно применяются следующие лиганды: ^{68}Ga -DOTATOC, ^{68}Ga -DOTATATE и ^{68}Ga -DOTANOC (Filippi et al., 2022). Эти РФП обеспечивают высокие чувствительность и контрастность ввиду отсутствия накопления в окружающих менингиому тканях (за исключением гипофиза, который демонстрирует высокое физиологическое накопление) и могут также использоваться для проведения дифференциального диагноза (Kowalski et al., 2021; Filippi et al., 2022). Тем не менее данные ПЭТ/КТ должны оцениваться в совокупности с другими исследованиями, так как экспрессия рецепторов к соматостатину и выявление активности при специфической ПЭТ/КТ иногда может также быть выявлено в метастазах (например, рака молочной железы и др.), очагах гранулематозного воспаления, аденомах и аденокарциномах гипофиза, глиомах, эстезионейробластомах, фиброзной дисплазии (Afshar-Oromieh et al., 2012; Palmisciano et al., 2022). Повышенное накопление аминокислот или их аналогов, таких как ^{11}C —МЕТ и ^{18}F -ФЭТ, отмечается уже в медленно растущих доброкачественных опухолях глиального ряда (Astner et al., 2008). ПЭТ/КТ с аминокислотами имеет высокую контрастность относительно фона, по сравнению с ^{18}F -ФДГ (Mitamura et al., 2018; Arita et al., 2012). На данный момент для оценки менингиом на ПЭТ/КТ в основном применяются РФП на основе лигандов рецепторов к соматостатину и аминокислот (^{11}C —МЕТ и ^{18}F -ФЭТ), при этом последние имеют значительно большую распространенность.

Перед ПЭТ/КТ при менингиомах обычно ставится несколько задач, и представленные РФП имеют различный потенциал и возможности для их выполнения. При ПЭТ/КТ с лигандами соматостатиновых рецепторов, а также с аминокислотами менингиомы имеют высокую контрастность относительно окружающих тканей (Filippi et al., 2022; Mitamura et al., 2018). Это может быть более информативным, по сравнению с МРТ и КТ в выявлении менингиом (Rachinger et al., 2015; Kowalski et al., 2021).

В работе Afshar-Oromieh и соавт. при обследовании 134 пациентов были выявлены 190 менингиом с помощью ^{68}Ga -DOTATOC ПЭТ/КТ и только 171 менингиома — при помощи МРТ с контрастиро-

ванием (Afshar-Oromieh et al., 2012). Авторы заключили, что ПЭТ/КТ с ^{68}Ga -DOTATOC демонстрирует более высокую чувствительность, по сравнению с МРТ, особенно в отношении образований фалкса, основания черепа, а также опухолей, скрытых кальцинацией и артефактами.

Актуальное направление применения ПЭТ/КТ при менингиомах — это определение мишени для проведения лучевой терапии, так как стандартные методы визуализации (КТ и МРТ) имеют ограничения в оценке распространенности опухолей в области синусов, основания черепа и орбиты.

В работе Grosu и соавт. расхождение объемов менингиом в 3 из 10 случаев составило более 20% при оконтуривании разными специалистами (Grosu et al., 2006). Использование ПЭТ/КТ с ^{11}C -MET уменьшило вариабельность определения мишени и ускорило процесс. После добавления ПЭТ корреляция между объемами увеличилась с 0.855 до 0.988. В работе Astner и соавт. использование ПЭТ с ^{11}C -MET при определении мишени позволило в большей части случаев (29 из 32) добавить небольшие фрагменты опухоли (1.6 ± 1.7 см³), которые были не видны на МРТ и КТ (Astner et al., 2008). В среднем это увеличение составило $9.4\% \pm 10.7\%$ объема.

Kessel и соавт. оценивали влияние ПЭТ/КТ на результаты лучевого лечения менингиом (Kessel et al., 2020). В исследование были включены 332 пациента с 339 менингиомами. В 203 случаях при планировании лучевого лечения использовалась ПЭТ/КТ (^{68}Ga -DOTA (104), ^{18}F -FET(26), ^{11}C -MET(73)). При медиане периода наблюдения 5.6 лет было показано достоверное увеличение общей и безрецидивной выживаемости пациентов с доброкачественными менингиомами при добавлении ПЭТ/КТ к процессу планирования. Такого влияния не было выявлено у пациентов со злокачественными менингиомами.

Подобные данные об информативности ПЭТ/КТ были получены и в исследованиях с лигандами рецепторов соматостатина (Perlow et al., 2022; Kriwanek et al., 2022; Kowalski et al., 2021; Acker et al., 2019). В подобных исследованиях с ^{68}Ga -DOTATATE была показана способность ПЭТ исключать из объема облучения послеоперационные и постлучевые изменения (Rachinger et al., 2015; Ivanidze et al., 2019).

В данном исследовании только одна менингиома имела ИН 1.00 и не выделялась на фоне вещества мозга. Большая часть менингиом имела высокий ИН ^{11}C -MET, что выделяло опухоли на фоне окружающих тканей. В 89.6% случаев ИН превышал 1.50,

в 70.1% случаев составил 2.00 и более. Это позволяет использовать ПЭТ/КТ с ^{11}C -MET как для детекции менингиом, так и для точного определения контуров мишени при проведении лучевой терапии.

Большое значение ПЭТ/КТ в нейроонкологии имеет для неинвазивного определения степени злокачественности глиальной опухоли. По аналогии были предприняты попытки применения ПЭТ/КТ для неинвазивного определения этого параметра в менингиомах.

Основная масса исследований возможностей ПЭТ/КТ с ^{18}F -ФДГ демонстрирует способность методики различать доброкачественные (степень 1 по шкале ВОЗ) и злокачественные менингиомы (степени 2–3 по шкале ВОЗ). По разным данным, пороговый ИН в этом случае составляет 1–1.3 (Lee et al., 2009; Cremerius et al., 1997; Hua et al., 2019). В то же время исследования с ^{11}C -MET и ^{68}Ga -DOTATATE говорят о неспособности метода различать доброкачественные и злокачественные менингиомы, как это традиционно делается для различения диффузных глиальных опухолей (Arita et al., 2012; Rachinger et al., 2015).

В 2021 г. Slot и соавт. представили систематический обзор и метаанализ по оценке степени злокачественности менингиом при помощи ПЭТ/КТ (Slot et al., 2021). Работа включила 22 исследования 432 пациентов, основная масса которых была выполнена с ^{18}F -ФДГ. Объединенные данные показали, что средний ИН ^{18}F -ФДГ в менингиомах степеней 2–3 был на 0.42 (0.12–0.73) больше, чем в менингиомах степени 1, средний SUV ^{18}F -ФДГ — на 2.51 (1.36–3.66). Авторы также пересчитали данные по ^{18}F -ФЭТ, ^{11}C -MET и другим РФП и не выявили для них зависимости от степени злокачественности опухоли, отметив малое количество подобных исследований.

В нашем исследовании не было получено достоверного отличия в ИН ^{11}C -MET между гистологически верифицированными менингиомами 1, 2 и 3-й степеней, медиана составила 4.06 [3.04; 4.57], 2.32 [2.12; 3.69] и 4.29 [2.60; 5.10] соответственно. Следует отметить высокий уровень накопления в менингиомах 1-й степени злокачественности по классификации ВОЗ, что демонстрирует неспособность ПЭТ с ^{11}C -MET адекватно оценивать степень злокачественности этих опухолей. При этом достоверно более низкий ИН был получен в группе менингиом степени 0, которую составляли небольшие нерастущие или медленно растущие гистологически неверифицированные менингиомы, часто выявленные

случайным образом. Видимо, такие опухоли имеют более низкий метаболизм аминокислот в отличие от менингиом 1–3-й степеней, которые своим ростом вызывали клинические проявления, требуя в итоге хирургического лечения. Эта группа менингиом степени 0 фактически представляла собой группу «бессимптомных медленно растущих или нерастущих менингиом», в которой ИН ^{11}C —МЕТ был достоверно ниже (2.24 [1.70; 2.95]), чем в группе «активно растущих клинически значимых менингиом» (4.00 [2.39; 5.11]) и группе «стабильных после облучения менингиом» (3.81 [2.97; 3.98]). Полученные данные могут свидетельствовать о метаболической и, вероятно, клинической гетерогенности доброкачественных менингиом, что требует дополнительного исследования.

Большое количество исследований посвящено оценке ответа менингиом на проведенное лучевое лечение. При МРТ-исследовании размеры менингиом могут оставаться без динамики после облучения, а иногда могут демонстрировать признаки «псевдопрогрессии». Применение ПЭТ/КТ может дать дополнительную клиническую информацию в таких случаях (Jung et al., 2022).

В исследовании Jeltema и соавт. проводилось сопоставление данных ПЭТ/КТ с ^{11}C —МЕТ, выполненных перед лучевой терапией, и в катамнезе (медиана — 84 месяцев) у 20 пациентов с менингиомами (Jeltema et al., 2021). Исследователи отметили высокий уровень накопления РФП в менингиомах, которые не прогрессировали, по данным МРТ. ИН находился в диапазоне 2.16–3.17. При этом среди большого количества параметров после облучения было отмечено только достоверное уменьшение медианы пикового ИН с 2.57 до 2.20.

Gudjonsson и соавт. оценивали динамику ПЭТ/КТ с ^{11}C —МЕТ в течение 36 месяцев после протонного облучения менингиом у 19 пациентов (Gudjonsson et al., 2000). В 15 случаях была гистологически подтверждена менингиома 1-й степени по шкале ВОЗ. ИН составил 1.35–5.1 до лучевого лечения и 1.13–4.62 — через 36 месяцев. Среднее уменьшение ИН составило 0.71. В 15 из 19 случаев было отмечено уменьшение ИН в динамике, а в 4 случаях — нарастание без явной прогрессии опухоли, по данным МРТ. В работе Ryttefors и соавт. было продолжено наблюдение до 10 лет за этой группой пациентов с выполнением новой ПЭТ/КТ с ^{11}C —МЕТ (Ryttefors et al., 2016). У 2 пациентов за этот период был выявлен продолженный рост, которому предшествовало нарастание ИН ^{11}C —МЕТ за 2 и 3 года до прогрессии опухоли по МРТ.

Подобные же результаты получены в небольших сериях с использованием лигандов рецепторов соматостатина: у большей части пациентов отмечено некоторое снижение активности, у меньшей части — стабилизация или нарастание показателей при контроле роста опухоли, по данным МРТ (Lütgendorf-Caucig et al., 2023; Kowalski et al., 2021). При этом сопоставление SUV ^{68}Ga -DOTATATE в облученных и необлученных менингиомах не выявило статистически значимых отличий (Campos Neto et al., 2022).

В нашей работе также не удалось получить достоверного отличия в ИН ^{11}C —МЕТ между облученными и необлученными менингиомами. Так, ИН в активно растущих клинически значимых менингиомах (4.00 [2.39; 5.11]) не отличался от ИН в стабильных облученных менингиомах (3.81 [2.97; 3.98]). Не было выявлено различий по уровню активности ^{11}C —МЕТ в облученных менингиомах с контролем роста опухоли (медиана ИН = 3.81 [2.97; 3.98]) и с рецидивом (медиана ИН = 3.62 [2.60; 4.30]). При сопоставлении облученных и необлученных менингиом степеней 1, 2, 3 и объединенной группы опухолей 1–3-й степеней достоверных отличий в ИН ^{11}C —МЕТ также не обнаружено.

Таким образом, однократно проведенное ПЭТ/КТ-исследование с различными РФП не позволяет сделать выводы об эффективности лучевой терапии и подтвердить рецидив, однако проведение ПЭТ/КТ в динамике с наблюдением уровня метаболизма РФП может быть целесообразно для решения поставленных задач.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Использование ПЭТ/КТ при менингиомах имеет ряд особенностей, при этом прямое экстраполирование опыта диагностики глиальных новообразований на ПЭТ/КТ может привести к диагностическим ошибкам.

Основные используемые на сегодняшний день РФП — это группа аминокислот (^{18}F -ФЭТ и ^{11}C —МЕТ) и лиганды рецепторов соматостатина — имеют схожие диагностические возможности (^{68}Ga -DOTATOC, ^{68}Ga -DOTATATE и ^{68}Ga -DOTANOC). ПЭТ/КТ с этими РФП демонстрирует высокий уровень метаболической и рецепторной активности в менингиомах различных степеней злокачественности, что, с одной стороны, не позволяет дифференцировать злокачественные опухоли от доброкачественных, но способствует их более детальной визуализации и достоверной оценке объема опухоли в сравнении со стандартной МРТ. В данном

контексте применение ПЭТ/КТ целесообразно при выявлении менингиом в сложных для МРТ локализациях (основание черепа, область венозных синусов), а также для оконтуривания мишени при планировании лучевой терапии.

Следует отметить, что однократное проведение ПЭТ/КТ с целью диагностики продолженного роста менингиомы после проведенного ранее лучевого лечения может быть неинформативным. Проведение нескольких исследований в динамике может подтвердить рецидив при выявлении нарастания активности накопления аминокислот или увеличения уровня соматостатиновых рецепторов. Эта методика требует проведения дополнительных клинических исследований. Кроме того, ПЭТ/КТ хорошо зарекомендовала себя в дифференциальной диагностике опухолевой ткани и постлучевых изменений.

Таким образом, ПЭТ/КТ может решать разные задачи при диагностике и лечении менингиом. Знание возможностей различных радиофармпрепаратов и правильное определение показаний к исследованию лежит в основе получения клинически значимого результата.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при поддержке гранта Министерства образования и науки № 075–15–2021–1343 «Развитие биоресурсной коллекции опухолей нервной системы человека с молекулярно-генетической паспортизацией для персонифицированного лечения пациентов с нейроонкологическими заболеваниями».

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследование выполнено с соблюдением этических норм. Пациентами подписано информированное согласие.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Acker G., Kluge A., Lukas M., Conti A., Pasemann D., Meinert F., Anh Nguyen P.T., Jelgersma C., Loebel F., Budach V., Vajkoczy P., Furth C., Baur A. D.J., Senger C. Impact of ^{68}Ga -DOTATOC PET/MRI on robotic radiosurgery treatment planning in meningioma patients: first experiences in a single institution. *Neurosurgical focus*. 2019. 46 (6) E9.
- Afshar-Oromieh A., Giesel F.L., Linhart H.G., Haberkorn U., Haufe S., Combs S.E., Podlessek D., Eisenhut M., Krauthwil C. Detection of cranial meningiomas: comparison of ^{68}Ga -DOTATOC PET/CT and contrast-enhanced MRI. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*. 2012. 39 (9):1409–1415.
- Arita H., Kinoshita M., Okita Y., Hirayama R., Watabe T., Ishohashi K., Kijima N., Kagawa N., Fujimoto Y., Kishima H., Shimosegawa E., Hatazawa J., Hashimoto N., Yoshimine T. Clinical characteristics of meningiomas assessed by ^{11}C -methionine and ^{18}F -fluorodeoxyglucose positron-emission tomography. *Journal of neuro-oncology*. 2012. 107 (2):379–386.
- Astner S.T., Dobrei-Ciuchendea M., Essler M., Bundschuh R.A., Sai H., Schwaiger M., Molls M., Weber W.A., Grosu A.-L. Effect of ^{11}C -methionine-positron emission tomography on gross tumor volume delineation in stereotactic radiotherapy of skull base meningiomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2008. 72 (4):1161–1167.
- Campos Neto G.d.C., Amaro Junior E., Weltman E., Malheiros S.M.F., Ferrari B.L., Vitor T., Barboza M.R.F.F. de, Bezerra R.P., Yamaga L.Y.I., Wagner J., Baroni R.H. Comparative analysis of somatostatin analog uptake between successfully irradiated and non-irradiated meningiomas. *Einstein (Sao Paulo, Brazil)*. 2022. 20eAO0104.
- Cremerius U., Bares R., Weis J., Sabri O., Mull M., Schröder J.M., Gilsbach J.M., Buell U. Fasting improves discrimination of grade 1 and atypical or malignant meningioma in FDG-PET. Fasting improves discrimination of grade 1 and atypical or malignant meningioma in FDG-PET. *Journal of nuclear medicine: official publication, Society of Nuclear Medicine*. 1997. 38 (1):26–30.
- Filippi L., Palumbo I., Bagni O., Schillaci O., Aristei C., Palumbo B. Somatostatin receptor targeted PET-imaging for diagnosis, radiotherapy planning and theranostics of meningiomas: a systematic review of the literature. *Diagnostics*. 2022. 12 (7).
- Grosu A.-L., Weber W.A., Astner S.T., Adam M., Krause B.J., Schwaiger M., Molls M., Nieder C. ^{11}C -methionine PET improves the target volume delineation of meningiomas treated with stereotactic fractionated radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2006. 66 (2): 339–344.
- Gudjonsson O., Blomquist E., Lilja A., Ericson H., Bergström M., Nyberg G. Evaluation of the effect of high-energy proton irradiation treatment on meningiomas by means of ^{11}C -L-methionine PET. *Eur J Nucl Med*. 2000. 27 (12):1793–1799.
- Hua L., Hua F., Zhu H., Deng J., Wang D., Luan S., Tang H., Guan Y., Xie Q., Gong Y. The diagnostic value of using ^{18}F -fluorodeoxyglucose positron emission tomography to differentiate between low- and high-grade meningioma. *Cancer management and research*. 2019. 11:9185–9193.
- Ivanidze J., Roytman M., Lin E., Magge R.S., Pisapia D.J., Liechty B., Karakatsanis N., Ramakrishna R., Knisely J., Schwartz T.H., Osborne J.R., Pannullo S.C. Gallium-68 DOTATATE PET in the evaluation of intracranial meningiomas. *Journal of neuroimaging: official journal of the American Society of Neuroimaging*. 2019. 29 (5): 650–656.
- Jeltema H.-R., Jansen M.R., Potgieser A.R.E., van Asseelt A.D.I., Heesters M.A.A.M., van de Hoorn A., Glaudemans A. W.J.M., van Dijk J.M.C. Study on intra-

- cranial meningioma using PET ligand investigation during follow-up over years (SIMPLIFY). *Neuroradiology*. 2021. 63 (11):1791–1799.
- Jung I.-H., Chang K.W., Park S.H., Jung H.H., Chang J.H., Chang J.W., Chang W.S. Pseudoprogression and peritumoral edema due to intratumoral necrosis after Gamma knife radiosurgery for meningioma. *Scientific Reports*. 2022. 12 (1):13663.
- Kaul D., Budach V., Wurm R., Gruen A., Graaf L., Habbel P., Badakhshi H. Linac-based stereotactic radiotherapy and radiosurgery in patients with meningioma. *Radiation oncology* (London, England). 2014. 9:78.
- Kessel K.A., Weber W., Yakushev I., Fischer H., Voglhuber T., Diehl C., Straube C., Zimmer C., Wiestler B., Gempt J., Meyer B., Combs S.E. Integration of PET-imaging into radiotherapy treatment planning for low-grade meningiomas improves outcome. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*. 2020. 47 (6): 1391–1399.
- Kowalski E.S., Khairnar R., Gryaznov A.A., Kesari V., Koroulakis A., Raghavan P., Chen W., Woodworth G., Mishra M. ^{68}Ga -DOTATATE PET-CT as a tool for radiation planning and evaluating treatment responses in the clinical management of meningiomas. *Radiation oncology* (London, England). 2021. 16 (1):151.
- Kriwanek F., Ulbrich L., Lechner W., Lütgendorf-Caucig C., Konrad S., Waldstein C., Herrmann H., Georg D., Widder J., Traub-Weidinger T., Rausch I. Impact of SSTR PET on inter-observer variability of target delineation of meningioma and the possibility of using threshold-based segmentations in radiation oncology. *Cancers*. 2022. 14 (18).
- Lee J.W., Kang K.W., Park S.-H., Lee S.M., Paeng J.C., Chung J.-K., Lee M.C., Lee D.S. ^{18}F -FDG PET in the assessment of tumor grade and prediction of tumor recurrence in intracranial meningioma. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*. 2009. 36(10):1574–1582.
- Lütgendorf-Caucig C., Pelak M., Flechl B., Georg P., Fossati P., Stock M., Traub-Weidinger T., Marosi C., Haberler C., Zechmeister-Machhart G., Hermsmeyer L., Hug E., Staudenherz A. The trends and significance of SSTR PET/CT added to MRI in follow-up imaging of low-grade meningioma treated with fractionated proton therapy. *Strahlentherapie und Onkologie: Organ der Deutschen Röntgengesellschaft ... [et al.]*. 2023. 199 (4): 396–403.
- Mitamura K., Yamamoto Y., Norikane T., Hatakeyama T., Okada M., Nishiyama Y. Correlation of ^{18}F -FDG and ^{11}C -methionine uptake on PET/CT with Ki-67 immunohistochemistry in newly diagnosed intracranial meningiomas. *Annals of nuclear medicine*. 2018. 32 (9): 627–633.
- Palmisciano P., Watanabe G., Conching A., Ogasawara C., Ferini G., Bin-Alamer O., Haider A.S., Sabini M.G., Cuttone G., Cosentino S., Ippolito M., Umana G.E. The role of ^{68}Ga -DOTA-SSTR PET radiotracers in brain tumors: a systematic review of the literature and ongoing clinical trials. *Cancers*. 2022. 14 (12).
- Perlow H.K., Siedow M., Gokun Y., McElroy J., Matsui J., Zoller W., Beyer S., Arnett A., Blakaj D., Boulter D., Fritz J., Miller E., Raval R., Kleefisch C., Bovi J., Palmer J.D. ^{68}Ga -DOTATATE PET-based radiation contouring creates more precise radiation volumes for patients with meningioma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2022. 113 (4):859–865.
- Rachinger W., Stoecklein V.M., Terpolilli N.A., Haug A.R., Ertl L., Pöschl J., Schüller U., Schichor C., Thon N., Tonn J.-C. Increased ^{68}Ga -DOTATATE uptake in PET imaging discriminates meningioma and tumor-free tissue. *Journal of nuclear medicine: official publication, Society of Nuclear Medicine*. 2015. 56 (3):347–353.
- Rogers L., Barani I., Chamberlain M., Kaley T.J., McDermott M., Raizer J., Schiff D., Weber D.C., Wen P.Y., Vogelbaum M.A. Meningiomas: knowledge base, treatment outcomes, and uncertainties. A RANO review. *Journal of neurosurgery*. 2015. 122 (1):4–23.
- Ryttefjors M., Danfors T., Latini F., Montelius A., Blomquist E., Gudjonsson O. Long-term evaluation of the effect of hypofractionated high-energy proton treatment of benign meningiomas by means of (^{11}C) -L-methionine positron emission tomography. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*. 2016. 43 (8):1432–1443.
- Slot K.M., Verbaan D., Buis D.R., Schoonmade L.J., Berckel B.N.M., Vandertop W.P. Prediction of meningioma WHO Grade Using PET findings: a systematic review and meta-analysis. *Journal of neuroimaging: official journal of the American Society of Neuroimaging*. 2021. 31 (1):6–19.
- Verger A., Kas A., Darcourt J., Guedj E. PET imaging in neuro-oncology: an update and overview of a rapidly growing area. *Cancers*. 2022. 14 (5).

¹¹C—METHIONINE PET/CT IN MENINGIOMAS

M. V. Galkin[#], N. B. Vikhrova, A. V. Golanov, G. V. Danilov, Yu. V. Strunina

Burdenko National Medical Research Center of Neurosurgery, Ministry of Healthcare of Russia, Moscow, Russia

[#]e-mail: mgalkin@nsi.ru

Currently, positron emission tomography (PET) is the standard imaging modality in neuro-oncology for gliomas and metastatic lesions. The experience of PET application in meningiomas, the most frequent primary CNS neoplasms, is much less, and the interpretation of the study results has a number of differences. The aim of the study was to evaluate the possibility and peculiarities of PET application in meningiomas based on our own clinical experience and literature review.

The study included 70 patients with 77 meningiomas who underwent PET/CT with ¹¹C-methionine. The mean age at the time of examination was 57.4 years (19–86 years).

The main evaluation parameter, the tumor-to-brain ratio (TBR) of ¹¹C-methionine (¹¹C—MET) averaged 3.13 (1.00–10.66). Meningiomas were characterized by high ¹¹C—MET TBR, with 89.6% of cases having TBR greater than 1.5. In histologically verified WHO grade 1, 2, and 3 meningiomas, the median TBR was 4.06 [3.04, 4.57], 2.32 [2.12, 3.69], and 4.29 [2.60, 5.10] and did not differ significantly between groups. Meanwhile, in histologically unresectable slow-growing or non-growing incidental meningiomas, TBR of ¹¹C—MET was significantly lower than in WHO grade 1 and 3 meningiomas.

There was no significant difference in the accumulation index between irradiated meningiomas with tumor growth control (3.81 [2.97, 3.98]) and recurrence (3.62 [2.60, 4.30]). When irradiated and non-irradiated meningiomas of WHO grade 1, 2 and 3, as well as the combined group of grade 1–3 tumors were compared, no significant differences in ¹¹C—MET TBR were found.

The use of PET/CT in meningiomas has a number of important features. Meningiomas are characterized by high TBR of ¹¹C—MET. According to our data PET/CT with ¹¹C—MET does not allow differentiating between meningiomas of different degrees of malignancy – 1, 2 or 3 according to WHO. With effective radiotherapy, meningiomas show partial reduction of TBR or remain stable. Even with prolonged growth control after radiation treatment, meningiomas may still have high TBR of ¹¹C—MET. When comparing growing and stable meningiomas, irradiated and non-irradiated tumors, no significant differences in TBR of ¹¹C—MET are found.

Keywords: meningioma, PET/CT, radiopharmaceutical, ¹¹C-methionine, grade of malignancy, tumor growth, radiotherapy, post-radiation changes

УДК 616.831–006

АНАЛИЗ ПРИМЕНЕНИЯ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ МИКРОСКОПИИ В ХИРУРГИИ НОВООБРАЗОВАНИЙ, РАСПОЛОЖЕННЫХ ВБЛИЗИ МОТОРНЫХ ЗОН ГОЛОВНОГО МОЗГА

© 2024 г. А. В. Косырькова*, С. А. Горяйнов, А. И. Баталов, Р. М. Афандиев, К. С. Семин,
Н. Е. Захарова, А. А. Огурцова, Г. В. Данилов, А. А. Аристов, В. А. Охлопков, А. Д. Кравчук,
И. Н. Пронин

ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр нейрохирургии им. академика Н. Н. Бурденко»
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

*e-mail: akosyrkova@nsi.ru

Поступила в редакцию 04.09.2023 г.

После доработки 01.12.2023 г.

Принята к публикации 01.12.2023 г.

Актуальность. В настоящее время нет единой концепции относительно эффективности применения флуоресцентной микроскопии (ФМ) у пациентов с новообразованиями, расположенными вблизи функционально значимых зон головного мозга (ФЗЗ), где резекция может быть осознанно остановлена хирургом ввиду высокого риска нарастания неврологического дефицита.

Задача. Оценить эффективность ФМ при удалении глиом вблизи моторной коры (МК) и кортикоспинального тракта (КСТ).

Методика исследования. 108 взрослых пациентов с глиомами вблизи МК и КСТ, оперированных с применением нейрофизиологического мониторинга, разделены на две группы, в зависимости от использования ФМ: контрольную (34 пациента без ФМ) и основную (62 пациента с ФМ).

Результаты. Объем резекции, частота неврологического дефицита в послеоперационном периоде статистически значимо не отличались в исследуемых группах.

Заключение. Несмотря на отсутствие статистически значимой разницы между группами, применение ФМ может быть полезным в составе комплексного интраоперационного мониторинга у данной группы пациентов.

Ключевые слова: флуоресцентная микроскопия, интраоперационная флуоресценция, нейрофизиологический мониторинг, кортикоспинальный тракт, моторная кора, глиомы, 5-аминолевуленовая кислота

DOI: 10.31857/S0044467724010077

ВВЕДЕНИЕ

Соблюдение онкофункционального баланса является краеугольным камнем хирургии опухолей, расположенных вблизи моторной коры (МК) и кортикоспинального тракта (КСТ), поскольку на прогноз заболевания в равной степени оказывают влияние как объем резекции (Sanai et al., 2008), так и неврологический статус в послеоперационном периоде (Rahman et al., 2017).

Однако достигнуть его не всегда удается, и результаты хирургии опухолей функционально значимых зон головного мозга (ФЗЗ) остаются далекими от целевых. Так, при удалении опухолей, расположенных вблизи МК и КСТ, транзиторный моторный дефицит (регрессирующий в течение 3 месяцев) может достигать 96% (Rossi et al., 2019), а стойкий, что более значимо в прогностическом плане, — 47% (González-Darder

et al., 2010). Объем резекции новообразований у пациентов с данной локализацией процесса также недостаточный, в ряде публикаций тотальное удаление глиом не превышает 56–64% (Ren et al., 2018; Shibani et al., 2015).

Золотым стандартом, позволяющим снизить риски нарастания неврологического дефицита в послеоперационном периоде, являются различные методики нейрофизиологического мониторинга (De Witt Hamer et al., 2012); для увеличения объема резекции во многих центрах, наряду с другими опциями, рутинно используют флуоресцентную микроскопию (ФМ) (Li et al., 2014).

Применение ФМ в относительно безопасных в отношении нарастания неврологического дефицита зонах головного мозга безусловно полезно и может использоваться в качестве основно-

го ориентира в ходе удаления новообразования (Li et al., 2014). Однако при хирургии в области МК и КСТ фактором, ограничивающим резекцию опухоли, будут данные нейрофизиологического мониторинга, сообщающие о близости ФЗЗ. Соответственно, возникает вопрос: целесообразно ли использование ФМ в хирургии опухолей ФЗЗ?

ЗАДАЧА ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценить целесообразность применения ФМ в процессе резекции опухоли у пациентов с глиомами головного мозга, расположенными в непосредственной близости от МК и КСТ.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Для решения поставленной задачи было проведено ретроспективное одноцентровое исследование, в которое были включены 108 взрослых пациентов с глиальными опухолями, расположенными не далее 2 см от КСТ или МК, прооперированных с применением нейрофизиологического мониторинга (прямая кортикальная и субкортикальная стимуляция (ПКС и ПСС) и транскраниальные моторные вызванные потенциалы (ТК МВП)) на базе НМИЦ нейрохирургии им. академика Н. Н. Бурденко с 2015 по 2023 г. Ис-

следование проведено после одобрения локального этического комитета. Наличие подписанного добровольного информированного согласия являлось обязательным критерием включения пациентов в исследование. В зависимости от использования ФМ, пациенты были разделены на две группы: контрольную, в которую вошло 34 пациента, оперированных без ФМ, и основную, включившую 62 пациента, которые были оперированы с применением этой методики (табл. 1).

Аласенс (препарат 5-аминолевуленовой кислоты) вводился перорально за 2 ч до разреза ТМО из расчета 20 мг/кг. Из исследования были исключены 12 пациентов, у которых не отмечалось визуальной флуоресценции во время операции. Всем пациентам была проведена оценка мышечной силы до операции, на первые и седьмые сутки после хирургического лечения, выполнена предоперационная МРТ (T1, T2, T2-FLAIR, DWI, T1+C, DTI) с определением расстояния от опухоли до КСТ и типа взаимоотношения между трактом и новообразованием. Было показано, что из 108 пациентов у 21 (19.4%) наблюдался интактный КСТ, у 43 (39.8%) – смещенный, у 34 (31.5%) – смещенный и инфильтрированный, у 8 (7.4%) – инфильтрированный, и только в одном наблюдении опухоль располагалась в структуре тракта, расщепляя его (рис. 1).

Таблица 1. Основные характеристики контрольной и основной групп
Table 1. The main characteristics of the control and main groups

	Контрольная группа	Основная группа
Количество пациентов	34	62
Средний возраст (лет)	48.5	50
Пол (м/ж)	16/18	29/33
Гистология% (grade I–II/III–IV)	25/75	19/81
Объем контрастируемой части опухоли по данным МРТ до операции (см ³)	39.5	52
Объем опухоли в режиме T2-FLAIR по данным МРТ до операции (см ³)	125	119.2
Среднее расстояние от КСТ до зоны накопления контраста (мм)	14.6	13.8
Среднее расстояние от КСТ до зоны отека инфильтрации (мм)	6.2	5.9
Количество инфильтрированных КСТ%	50	34
Средний объем удаления контрастируемой части опухоли (%)	98	92
Средний объем удаления опухоли в режиме T2-FLAIR(%)	53.53	63.6
Интраоперационная визуальная оценка радикальности операций	10 (45.5%) – визуальные остатки	20 (39.2%) – остаточная флуоресценция
Причины остановки резекции	1 – положительные моторные ответы, 1 – снижение ТК МВП, 6 – другие причины	15 – положительные моторные ответы, 2 – снижение ТК МВП, 7 – другие причины
Нарастание пареза после операции	9 (26%)	11 (17.7%)
Стойкий парез	2 (5.8%)	4 (6.5%)

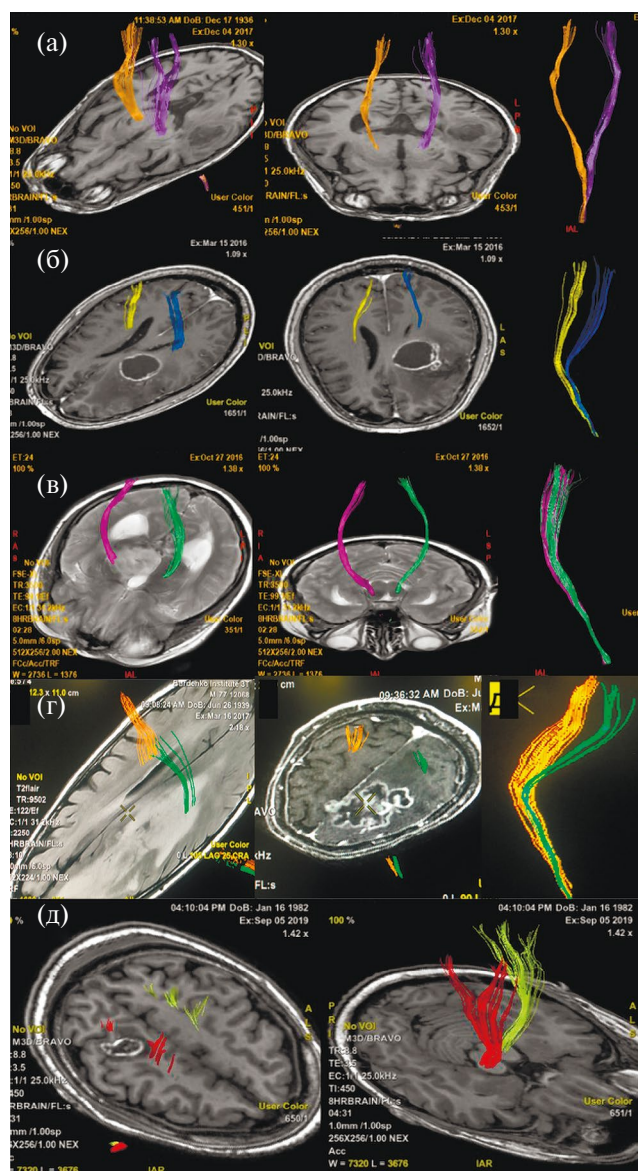


Рис. 1. (а) – пример интактного КСТ по данным ДТ-трактографии у пациента с глиобластомой. Тракты симметрично расположены и не отличаются значимо по объему. (б) – пример смещенного КСТ, по данным ДТ-трактографии у пациента с глиобластомой. Тракты не вовлечены в опухоль, однако положение их отличается. (в) – пример инфильтрированного КСТ, по данным ДТ-трактографии у пациента с глиомой Grade IV. Несмотря на вовлечение КСТ в опухоль, по данным T2-FLAIR отмечается правильное, симметричное положение тракта. (г) – пример смещенного и инфильтрированного КСТ, по данным ДТ-трактографии у пациента с глиобластомой. Тракты расположены асимметрично и вовлечены в зону отека-инфильтрации. (д) – пример расщепленного тракта у пациента с анапластической астроцитомой. Опухоль располагается внутри КСТ, расщепляя его волокна.

Fig. 1. Different types of relationship between the corticospinal tract and the tumor according to MR-tractography (intact, displaced, infiltrated, displaced and infiltrated, split).

77 пациентов (13 из контрольной группы и 44 из основной) прошли МРТ-контроль в раннем послеоперационном периоде, для данных больных посчитан объем резекции в режиме T2-FLAIR и контрастируемой части опухоли. Исследуемые группы были проанализированы в отношении факторов, которые могли бы повлиять на объем резекции и нарастание пареза в послеоперационном периоде. Анализ показал, что объем контрастируемой части опухоли был значимо больше в основной группе (52 против 39.5 см³), в то время как зона изменений в режиме T2-FLAIR, расстояние от КСТ до зоны отека-инфильтрации и зоны накопления контраста абсолютно идентичны в обеих группах пациентов.

Анализ данных проведен с помощью языка статистического программирования R (версия 4.2.2) в среде интегрированной разработки RStudio Server (версия 2022.07.2). Проверку статистических гипотез об отсутствии различий в распределениях количественных непрерывных величин проводили с помощью непараметрического теста Манна – Уитни, категориальных – с помощью критерия Хи-квадрат и точного теста Фишера. Различия признавали статистически значимыми при уровне статистической значимости $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В ходе исследования было выявлено, что применение ФМ достоверно не влияет ни на объем резекции контрастируемой части опухоли ($p = 0.138$), ни на объем резекции в режиме T2-FLAIR ($p = 0.589$).

Тотальной резекции контрастируемой части опухоли в контрольной группе удалось достичь в среднем 98.4 против 92% в основной группе. Однако это можно объяснить двумя причинами. Во-первых, объем контрастируемой части был значимо больше у пациентов из основной группы. Во-вторых, зона накопления контрастного препарата, по данным МРТ, как правило, имеет визуальные интраоперационные отличия в «белом свете», что позволяет удалять патологические ткани без ФМ. Однако в основной группе была показана большая радикальность в отношении резекции зоны отека-инфильтрации (средний объем удаления 63.6 против 53.5% в контрольной группе), что оказалось статистически незначимым. Данные ткани доказанно являются патологическими, содержат опухолевые



Рис. 2. (а) – интраоперационная фотография ложа удаленной опухоли у пациента с глиобластомой левой лобной доли в «белом свете». Визуально определяется неизмененное мозговое вещество, при прямой субкортикальной биполярной и монополярной стимуляции с пороговой силой тока 5 мА в этой области получены моторные ответы с языка. (б) – интраоперационная фотография той же области. В зоне стимуляции определяется яркая розовая флуоресценция, что свидетельствует о наличии опухолевой ткани. У данного пациента резекция была остановлена.

Fig. 2. There are motor responses by direct bipolar with a threshold current of 5 mA stimulation in the bright pink fluorescence area.

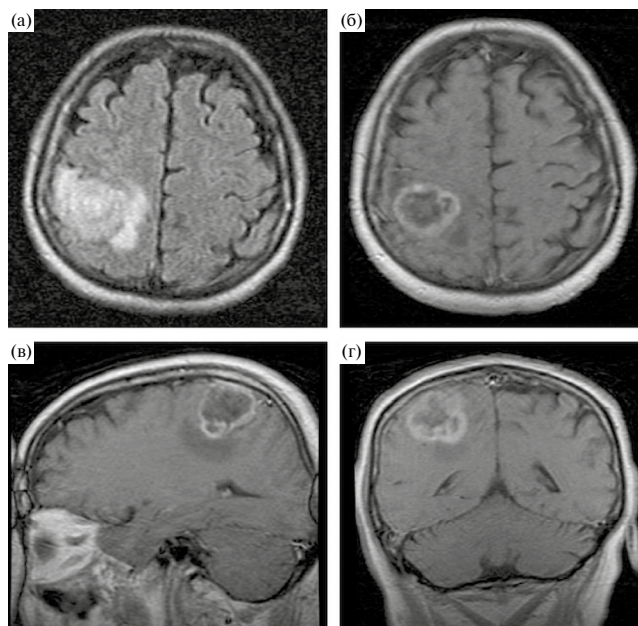


Рис. 3. МРТ до операции. Внутримозговая опухоль правой теменной доли, прилегающая к прецентральной извилине. Опухоль кольцевидно накапливает контрастный препарат и окружена небольшой зоной отека-инфильтрации. (а) – аксиальная проекция, T2-FLAIR, (б) – аксиальная проекция, T1 + C, (в) – сагиттальная проекция, T1 + C; (г) – фронтальная проекция, T1 + C.

Fig. 3. Preoperative MR-images.

клетки, и объем их резекции влияет на прогноз заболевания. При этом в «белом свете» зона отека-инфильтрации практически не отличается от нормальной мозговой ткани, и при резекции данных участков применение ФМ оправдано, несмотря на отсутствие статистически значимой разницы.

Интраоперационная оценка радикальности удаления также значимо не отличалась в контрольной и основной группах ($p = 0.812$). В контрольной группе хирург предполагал наличие остатков опухолевой ткани в 45.5% случаев, в основной – в 39.2%. При этом у 12 пациентов основной группы (19%), по данным протоколов операции, данные ФМ были использованы как основание для расширения резекции. Основными причинами остановки резекции были распространенный характер опухоли с инфильтрацией глубинных структур головного мозга, переходом на противоположное полушарие и фиксация к магистральным кровеносным сосудам (12 пациентов: 7 – в основной группе и 6 – в контрольной) и, что более принципиально в данной выборке, появление моторных ответов при ПКС и ПСС (16 пациентов: 15 – в основной группе и 1 – в контрольной) и снижение ТК МВП (2 пациента из основной группы и 1 – из контрольной). Таким образом, в основной группе в большем количестве случаев резекция была ограничена ввиду объективных лимитирующих причин. Интересным фактом является то, что у трех пациентов из основной группы положительные моторные ответы были получены при стимуляции в участках с интенсивной флуоресценцией при пороговой силе тока в 5 мА, что в очередной раз подтверждает инфильтративный характер роста глиальных опухолей и возможность включения в строю опухоли нормально функционирующей мозговой ткани (рис. 2).

У пациентов, вошедших в исследование, была проанализирована динамика моторного статуса в раннем и отсроченном послеоперационном периоде. В контрольной группе снижение мышечной силы на 1 и более баллов наблюдалось у 9 пациентов (26.4%), в основной – у 11 пациентов (17.7%). Стойкий неврологический дефицит наблюдался всего у 6 пациентов (2 – в контрольной группе, 4 – в основной). Превалирование транзиторного пареза среди пациентов, оперированных без ФМ, интересно и требует дальнейшего изучения.

КЛИНИЧЕСКОЕ НАБЛЮДЕНИЕ

Пациент М., 59 лет, госпитализирован в НМИЦ нейрохирургии им. академика Н. Н. Бурденко с жалобами на слабость, неловкость и онемение в левых конечностях. Данные жалобы возникли около 2 месяцев назад и постепенно нарастали, что послужило поводом для выполнения МРТ головного мозга с в/в контрастированием, которая выявила объемное образование правой теменной доли с умеренным перифокальным отеком, предположительно глиома высокой степени злокачественности, прилежащая к функционально значимым двигательным зонам коры мозга и пирамидного тракта (рис. 3).

При неврологическом осмотре на момент госпитализации у пациента отмечались гипестезия и снижение мышечной силы в левых конечностях до 4 баллов.

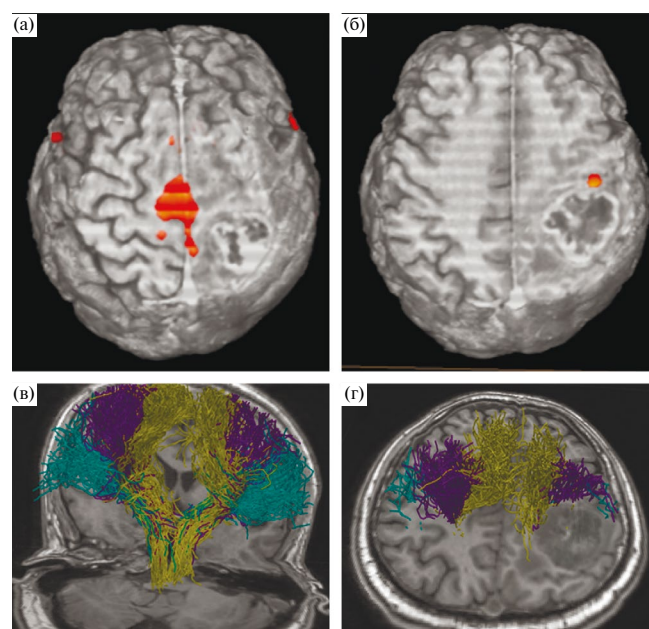


Рис. 4. МРТ у пациента с внутримозговой опухолью правой теменной доли. (а, б) — данные фМРТ; (а) — оранжевым цветом обозначена корковая зона ноги, располагающаяся вовнутрь и на некотором отдалении от медиальной границы опухоли; (б) — представлена зона руки, прилегающая к переднему краю опухоли; (в, г) — данные МР-трактографии (CSD HARDI), использованный алгоритм построения позволил построить и разделить волокна КСТ, иннервирующие ногу (горчичный цвет), руку (фиолетовый), лицо (зеленый). Волокна КСТ прилегают к медиальному и переднему краям опухоли.

Fig. 4. fMRI (leg and arm areas) and MR-tractography (CSD HARDI, yellow — leg, purple — hand, green — facial muscles) before surgery.

Учитывая локализацию процесса и клиническую картину заболевания, в качестве предоперационной подготовки пациенту были проведены фМРТ с визуализацией моторных зон и МР-трактография с построением КСТ (рис. 4).

В связи с непосредственной близостью опухоли к моторным центрам головного мозга запланировано проведение операции с обязательным нейрофизиологическим мониторингом, включающим динамику ТК МВП, прямую кортикальную и субкортикальную моно- и биполярную стимуляцию и использование магнитной интраоперационной навигационной системы FIAGON. Для использования последней данные фМРТ, МР-трактографии и структурной МРТ были корегистрированы в едином файле. Для демаркации границ опухоли также использовалась флуоресцентная навигация (препарат «Аласенс»). Опухолевая ткань светилась ярко-розовым цветом.

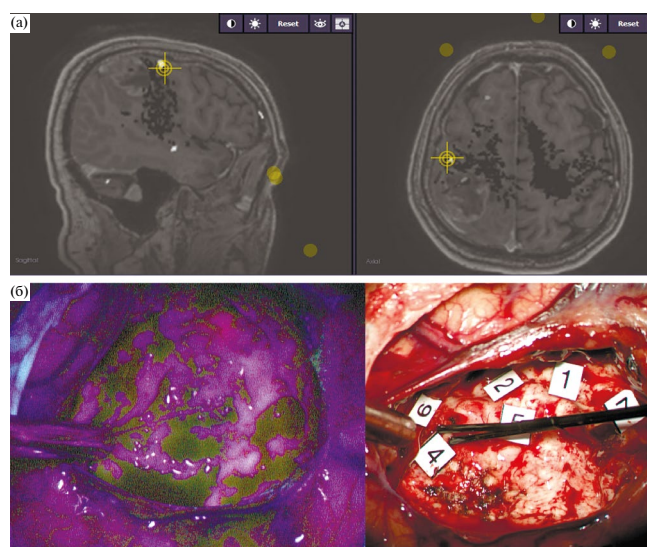


Рис. 5. (а) — интраоперационная фотография монитора навигационной системы FIAGON. Маркером отмечена точка, при стимуляции которой получены положительные моторные ответы с мышц кисти. Данная точка соответствует в данном случае моторной коре. (б) — интраоперационная фотография ложа удаленной опухоли в режиме флуоресценции и в «белом свете». Маркерами отмечены точки, при субкортикальной стимуляции которых получены положительные моторные ответы. Видно, что в «белом свете» ложе опухоли представлено нормальной мозговой тканью. В режиме флуоресценции отмечается фокальное розовое свечение (соответствующее т. 1). Данный участок оставлен во избежание нарастания моторного дефицита.

Fig. 5. Intraoperative photos. The tumor resection cavity with markers of stimulation points (motor response) and residual focus of the fluorescence.

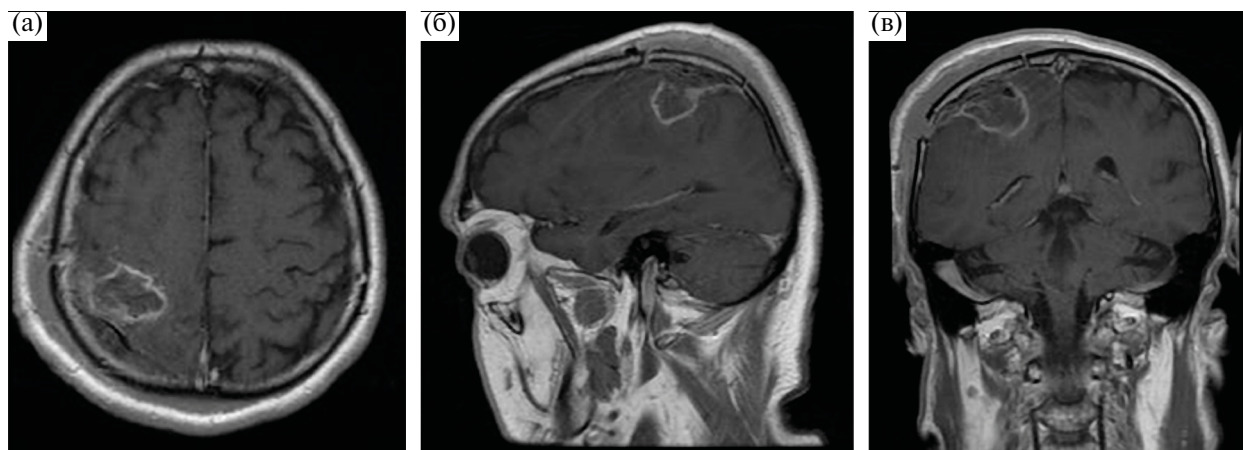


Рис. 6. Контрольная МРТ у пациента после микрохирургического удаления глиобластомы правой теменной доли, режим T1 + C. (а) — аксиальная проекция; (б) — сагиттальная проекция; (в) — фронтальная проекция.
Fig. 6. Postoperative MRI.

Данному пациенту проводилась поточечная сравнительная моно- и биполярная стимуляции, в ходе которых получено 6 точек с моторными ответами в ложе удаленной опухоли (рис. 5). Параметры стимуляции в данных точках следующие: для монополярной стимуляции сила тока составила в т. 1—3—4 мА (кость), т. 7—5—6 мА (кость), т. 6—5 мА (кость), т. 9—3—4 мА (плечо), т. 8—4 мА (кость); для биполярной — в т. 7—6.5 мА (кость), т. 6—14 мА (кость), т. 2—3—4 мА (плечо), т. 5—2—5 мА (кость). Таким образом, ответы были получены во всех точках как при моно-, так и при биполярной стимуляциях, вовлекаемые в ответ мышцы также были идентичны. Пороговая сила тока составила 3 мА для монополярной стимуляции и 2.5 мА — для биполярной. Опухоль удалена в пределах макроскопически неизменной мозговой ткани. В режиме флуоресценции наблюдалось остаточное розовое свечение, соответствующее по локализации т. 1, где были получены положительные моторные ответы от кисти на низком пороговом токе (3 мА). Этот участок был оставлен, несмотря на наличие флуоресценции, с целью снижения риска развития моторного дефицита в послеоперационном периоде.

По данным гистологического исследования — глиобластома, WHO Grade IV. В раннем послеоперационном периоде отмечалось транзитное нарастание мышечной слабости до 2—3 баллов (преимущественно в руке) с практически полным восстановлением до исходного уровня к моменту выписки.

По данным контрольной СКТ сразу после операции, интракраниальных осложнений не

выявлено, по данным контрольной МРТ, выполненной на следующие сутки, — тотальное удаление контрастируемой части опухоли (рис. 6).

ОБСУЖДЕНИЕ

В литературе вопрос эффективности использования ФМ у пациентов с новообразованиями ФЗЗ прицельно рассматривается лишь в немногих публикациях. Так, в 2019 г. Raffa G. с соавт. было проведено исследование, сравнивающее эффективность комбинированного использования навигационной ТМС, флуоресцентной диагностики (флуоресцин натрия) и нейрофизиологического мониторинга у пациентов с глиомами первичной МК и КСТ. Пациенты, включенные в исследование, были разделены на 2 группы: исследуемую (79 пациентов) и контрольную (55 пациентов). В контрольной группе интраоперационно проводился только нейрофизиологический мониторинг. В исследуемой группе были показаны значимо лучшие результаты как в отношении радикальности операций (тотальное удаление 64.5 против 47.2%, $P = 0.04$), так и в отношении нарастания мышечной слабости после операции (11.4 vs. 20%) (Raffa et al., 2019). В нашем исследовании статистически значимой разницы в объеме резекции опухоли (как контрастируемой части, так и в режиме T2-FLAIR) достигнуто не было. Нельзя исключать такие факторы, которые могли повлиять на объем резекции, как больший размер контрастируемой части опухоли в основной группе, наличие объективных причин для остановки резекции в основной группе (24 больных против 8 в контрольной). Возможно, применение ФМ в контрольной группе позволи-

ло бы расширить объем резекции у пациентов без объективных причин для остановки резекции. Кроме того, как было показано на выборке из 108 пациентов с использованием МР-трактографии и реконструкции КСТ, опухоль смещает тракт в одну из сторон, локализация опухоли непосредственно в проводящем пучке наблюдается крайне редко (0.9%) (Косырькова, 2021). Таким образом, ФМ может обеспечить максимально радикальное удаление в других направлениях. Lavrador J. P. в своем клиническом наблюдении пациента с новообразованием вблизи КСТ признает эффективность использования ФМ для прицельного забора гистологического материала в условиях ограниченной возможности резекции (Lavrador et al., 2022).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, локализация глиомы вблизи двигательной коры или пирамидного тракта не является противопоказанием к применению ФМ. В таких случаях необходимо выполнять резекцию с флуоресценцией и нейрофизиологическим контролем, что позволяет уточнить тип соотношения флуоресцирующего остатка опухоли и моторных зон мозга. Это позволяет в ряде случаев продолжить резекцию флуоресцирующей части глиомы.

Использование ФМ при удалении новообразований, расположенных вблизи МК и КСТ, целесообразно несмотря на то, что главным ориентиром для остановки резекции, безусловно, являются данные нейрофизиологического мониторинга. Как было показано в нашем исследовании, даже ярко флуоресцирующие участки могут содержать функционально значимые ткани головного мозга, удаление которых приведет к грубому нарастанию неврологического дефицита.

Использование ФМ у пациентов с новообразованиями вблизи моторных зон оправдано, поскольку КСТ в подавляющем количестве случаев располагается в одной стороне от образования и, значит, ограничивает резекцию только в одном из направлений, позволяя в оставшихся достигнуть максимальной радикальности. В нашей серии только в 0.9% случаев образование располагалась в структуре КСТ, расщепляя волокна последнего в разные стороны.

Принципиальное значение использования ФМ имеет при удалении зон отека-инфильтрации, которые крайне плохо отличаются от

нормальной мозговой ткани, при этом редукция которых напрямую влияет на прогноз заболевания.

Кроме того, использование ФМ позволяет наиболее прицельно взять материал для гистологического исследования, особенно в случаях, когда возможности резекции ограничены близостью функциональных зон.

Таким образом, комбинированное использование различных диагностических методик является оправданным у пациентов с опухолями вблизи МК и КСТ. При разумном подходе к анализу получаемой с их помощью информации о ФЗЗ и опухоли можно как увеличить объем резекции, так и минимизировать неврологический дефицит.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при поддержке гранта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075–15–2021–1343).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Косырькова А. В. Дис. ...к.м.н. «Предоперационное планирование и интраоперационная идентификация пирамидных трактов в хирургии супратенториальных опухолей головного мозга». М., 2021.
- De Witt Hamer P. C., Robles S. G., Zwinderman A. H., Duffau H., Berger M. S. Impact of intraoperative stimulation brain mapping on glioma surgery outcome: a meta-analysis. *J. Clin. Oncol.* 2012. 30 (20): 2559–2565. doi: 10.1200/JCO.2011.38.4818. Epub 2012 Apr 23.
- González-Darder J. M., González-López P., Talamantes F., Quilis V., Cortés V., García-March G., Roldán P. Multimodal navigation in the functional microsurgical resection of intrinsic brain tumors located in eloquent motor areas: role of tractography. *Neurosurg. Focus.* 2010. 28 (2): E5. doi: 10.3171/2009.11.FOCUS09234.
- Lavrador J. P., Oviedova A., Pereira N., Patel S., Rajwani K. M., Sekhon P., Gullan R., Ashkan K., Vergani F., Bhangoo R. Minimally invasive approach to a deep-seated motor eloquent brain tumour: a technical note. *Surg. Case Rep.* 2022. 2022 (1): rjab611. doi: 10.1093/jsr/rjab611. eCollection 2022 Jan.
- Li Y., Rey-Dios R., Roberts D. W., Valdés P. A., Cohen-Gadol A. A. Intraoperative fluorescence-guided resection of high-grade gliomas: a comparison of the present techniques and evolution of future strategies. *World Neurosurg.* 2014. 82(1–2): 175–85. doi: 10.1016/j.wneu.2013.06.014. Epub 2013 Jul 9. PMID: 23851210
- Li Y. M., Suki D., Hess K., Sawaya R. The influence of maximum safe resection of glioblastoma on survival in 1229 patients: Can we do better than gross-

- total resection? *Neurosurg.* 2016. 124 (4): 977–988. doi: 10.3171/2015.5.JNS142087. Epub 2015 Oct 23.
- Raffa G., Picht T., Angileri F.F., Youssef M., Conti A., Esposito F. et al. Surgery of malignant motor-eloquent gliomas guided by sodium-fluorescein and navigated transcranial magnetic stimulation: a novel technique to increase the maximal safe resection. *J. Neurosurg. Sci.* 2019. 63 (6): 670–678. doi: 10.23736/S0390–5616.19.04710–6. Epub 2019 May 6.
- Rahman M., Abbatematteo J., De Leo E. K., Kubilis P. S., Vaziri S., Bova F., Sayour E., Mitchell D., Quinones-Hinojosa A. The effects of new or worsened postoperative neurological deficits on survival of patients with glioblastoma. *J. Neurosurg.* 2017. 127 (1): 123–131. doi: 10.3171/2016.7.JNS16396. Epub 2016 Sep 30. PMID: 27689459
- Ren X. H., Yang X. C., Huang W., Yang K. Y., Liu L., Qiao H., Guo L. J., Cui Y., Lin S. The application of cortical and subcortical stimulation threshold in identifying the motor pathway and guiding the resection of gliomas in the functional areas. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 2018. 98 (9): 653–657. doi: 10.3760/cma.j.issn.0376–2491.2018.09.006.
- Rossi M., Conti Nibali M., Viganò L., Puglisi G., Howells H., Gay L., Sciortino T., Leonetti A., Riva M., Fornia L., Cerri G., Bello L. Resection of tumors within the primary motor cortex using high-frequency stimulation: oncological and functional efficiency of this versatile approach based on clinical conditions. *J. Neurosurg.* 2019. 1–13. doi: 10.3171/2019.5.JNS19453.
- Sanai N., Berger M. S. Glioma extent of resection and its impact on patient outcome. *Neurosurgery.* 2008. 62 (4): 753–764; discussion 264–266. doi: 10.1227/01.neu.0000318159.21731.cf.
- Shiban E., Krieg S. M., Haller B., Buchmann N., Obermüller T., Boeckh-Behrens T., Wostrack M., Meyer B., Ringel F. Intraoperative subcortical motor evoked potential stimulation: how close is the corticospinal tract? *J. Neurosurg.* 2015. 123 (3): 711–720. doi: 10.3171/2014.10.JNS141289. Epub 2015 Jun 5.

FLUORESCENCE-GUIDED SURGERY IN PATIENTS WITH TUMORS NEAR MOTOR AREAS OF THE BRAIN

A. V. Kosyrkova[#], S. A. Goryaynov, A. I. Batalov, R. M. Afandiev, K. S. Semin, N. E. Zakharova, A. A. Ogurtsova, G. V. Danilov, A. A. Aristov, V. A. Okhlopkov, A. D. Kravtchuk, I. N. Pronin

N. N. Burdenko National Medical Research Center of Neurosurgery, Ministry of Healthcare of Russia, Moscow, Russia

[#]*e-mail: akosyrkova@nsi.ru*

There is no common concept regarding the effectiveness of the use of fluorescence-guided surgery in patients with tumors located in eloquent areas of the brain, in which resection can be stopped because the high risk of an increase of neurological deficit.

Objective is to evaluate the effectiveness of fluorescence-guided surgery in patients with tumors located near the motor cortex and corticospinal tract.

Methods. Our research includes 108 adult patients with gliomas near the motor cortex and corticospinal tract divided into two groups depending on the use of fluorescence-guided surgery: control (34 patients without fluorescence) and main (62 patients with fluorescence).

Results. There is no difference between study groups in the radicality of surgery and neurological outcomes.

Conclusion. Fluorescence-guided surgery can be a useful tool as part of complex intraoperative monitoring in patients with tumors located near the motor cortex and corticospinal tract despite the absence of a statistically significant difference.

Keywords: fluorescence-guided surgery, intraoperative fluorescence, neurophysiological monitoring, corticospinal tract, motor cortex, gliomas, 5-aminolevulinic acid

УДК 616.831–006

НЕИНВАЗИВНОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ МУТАЦИИ ГЕНА IDH-1 ГЛИОМ ГОЛОВНОГО МОЗГА НА ОСНОВЕ МЕТОДА ПРОТОННОЙ МР-СПЕКТРОСКОПИИ

© 2024 г. А. Н. Тюрина*, А. И. Баталов, Н. Е. Захарова, Н. Б. Вихрова, Л. М. Фадеева, Д. Б. Калаева, И. Н. Пронин

ФГАУ «НМИЦ нейрохирургии им. академика Н. Н. Бурденко» Минздрава России, Москва, Россия

*e-mail: alfa.net@list.ru

Поступила в редакцию 31.08.2023 г.

После доработки 01.12.2023 г.

Принята к публикации 01.12.2023 г.

Мутации в генах изоцитратдегидрогеназы (IDH) имеют важную прогностическую значимость для пациентов с глиальными новообразованиями головного мозга. Метод протонной МР-спектроскопии позволяет на дооперационном этапе неинвазивно определять метаболические свойства опухолевой ткани.

Целью данной работы явилось изучение возможности определения статуса мутации изоцитратдегидрогеназы (IDH) с помощью магнитно-резонансной спектроскопии (МРС) для обнаружения присутствия 2-гидроксиглутарата (2HG), продукта метаболизма фермента IDH.

Нами были обследованы 33 пациента с глиальными опухолями головного мозга различной степени злокачественности (G1–G4), с последующим выявлением мутации IDH. В 20 случаях выявленная мутация IDH, по данным протонной магнитно-резонансной спектроскопии, была подтверждена с помощью иммуногистохимического исследования. В 13 случаях пик 2HG не определялся на МР-спектре, а анализ на IDH не выявил мутаций.

Использование метода протонной магнитно-резонансной спектроскопии показало высокую чувствительность данной методики в прогнозировании мутационного статуса глиальных опухолей головного мозга, что делает данный метод важным инструментом в дооперационной диагностике.

Ключевые слова: магнитно-резонансная спектроскопия, 2-гидроксиглутарат, изоцитратдегидрогеназа, биомаркер, глиомы низкой степени злокачественности, глиомы высокой степени злокачественности

DOI: 10.31857/S0044467724010088

ВВЕДЕНИЕ

Глиомы являются самыми распространенными первичными опухолями головного мозга. Согласно классификации Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), глиомы головного мозга имеют 4 степени злокачественности: глиомы Grade 1–2 (низкой степени злокачественности) и глиомы Grade 3–4 (высокой степени злокачественности). Предоперационная оценка опухолевой пролиферативной активности или степени злокачественности играет важную роль в определении стратегии лечения пациентов с глиальными опухолями головного мозга. Последние достижения в лечении глиом головного мозга повысили требования к предоперационной лучевой диагностике для планирования терапии и прогнозирования ответов на лечение у таких пациентов. Магнитно-резонансная спектроскопия (МРС) рассматривается сегодня как дополнительная и уточняющая методика, позволяющая определить важную информацию о степени

и характере изменений на микроструктурном уровне на основе анализа концентрации и соотношения метаболитов. Так, эффект лечения может проявляться в выраженном снижении пиков представленных метаболитов (Padelli, 2022). Эта информация может использоваться как для определения точки биопсии, так и для определения целей лучевой терапии, мониторинга пациентов после лечения.

После пересмотра классификации ВОЗ в 2016 г. статус мутации изоцитратдегидрогеназы (IDH) стал одним из наиболее важных биомаркеров в прогнозировании лечения глиальных опухолей головного мозга (Nap, 2020).

Эти мутации являются соматически приобретенными и происходят на различных остатках аргинина IDH1 (R132) и IDH2 (R172 или R140). Мутации IDH1 встречаются гораздо чаще, чем мутации IDH2, в глиомах низкой степени злокачественности.

ственности (Molenaar, 2014). Считается, что в гл-омах низкой степени мутации IDH играют важную роль в раннем онкогенезе и предшествуют другим онкогенным мутациям (Juratli, 2013; Suh, 2020).

Мутации генов IDH изменяют функции изоцитратдегидрогеназы и приводят к аномально высокому накоплению D-2-гидроксиглутарата (D-2HG) (Ward, 2010). Изоцитратдегидрогеназа является ферментом цикла Кребса. При возникновении мутации в гене IDH1 происходит снижение скорости превращения изоцитрата в α -кетоглутарат и аномальное накопление D-2-гидроксиглутарата. Это накопление снижает скорость прохождения реакций в цикле Кребса и уменьшает синтез НАДФН₂, следовательно, снижает скорость биосинтеза нуклеотидов. Недостаток материала для репликации ДНК, в свою очередь, приводит к снижению митотической активности опухолевых клеток.

В рекомендациях Европейской ассоциации нейроонкологии говорится, что отрицательный результат иммуногистохимии на экспрессию IDH1 (R132H) достаточен для классификации глиобластомы IDH дикого типа у пациентов старше 55 лет (Weller, 2020).

Неинвазивная методика МР-спектроскопии для определения 2-гидроксиглутарата может стать важным инструментом для прогнозирования мутации глиальных опухолей головного мозга. По данным ряда работ, магнитно-резонансная спектроскопия (по 2HG) продемонстрировала более высокую диагностическую эффективность (чувствительность 89–100% и специфичность 81–88%), чем рутинная МРТ (чувствительность 71–100% и специфичность 51–100%), диффузионно-взвешенное изображение, а также МР-перфузия (чувствительность 56–100% и специфичность 63–100%) (Chong, 2018). Следовательно, прогнозирование состояния мутации IDH с использованием 2HG МРС может быть ценным методом для принятия клинических решений.

Цель исследования — оценить возможности методики протонной магнитно-резонансной спектроскопии в определении мутации изоцитратдегидрогеназы (IDH) в глиальных новообразованиях головного мозга.

МЕТОДИКА

В анализируемую группу на предоперационном этапе были включены 33 пациента в возрас-

те от 35 до 50 лет с МРТ-признаками первичной супратенториальной глиальной опухоли головного мозга. Всем пациентам в последующем была выполнена операция по удалению опухоли с установлением гистологического диагноза.

Исследование проводилось на магнитно-резонансном томографе (3.0 Т) с использованием 8-канальной головной катушки.

Протокол исследования включал следующие последовательности:

1. T1-ВИ — TR600 мс, TE12.6 мс, с толщиной среза 5 мм и межсрезовым интервалом 1 мм.
2. T2 — TR6714 мс, TE104.16 мс с толщиной среза 5 мм и межсрезовым интервалом 1 мм.
3. T2-FLAIR TR9500 мс TE122.04 мс, с толщиной среза 5 мм и межсрезовым интервалом 1 мм.
4. DWI TR8000 мс, TE71.0 мс, $b = 1000$ с/мм² с толщиной среза 5 мм и межсрезовым интервалом 1 мм, с построением карт измеряемого коэффициента диффузии (ADC).
5. Sag T2 Flair Cube — TR6400 мс, TE148.94 мс, толщина среза 1.40 мм.
6. Assym Mega TE26/80; 2HG-Press-TR/TE1/TE2 = 1500/35/97.
7. Sag T1 Cube с подавлением сигнала от жировой ткани после в/в введения МР-контрастного препарата. TR600 мс, TE12.962 мс, толщина среза 1.2 мм. Введение МР-контрастного препарата проводилось из расчета 0.2 мл на 1 кг массы тела.

В анализ результатов исследования были включены 33 пациента (20 пациентов с IDH-мутантной глиомой и 13 — с IDH-диким типом глиомы). По гистологическому типу было выявлено 10 диффузных астроцитом (Gr. 2), 4 анапластических астроцитомы (Gr. 3), 6 анапластических олигодендроглиом (Gr. 3), 13 глиобластом.

Иммуногистохимические исследования с определением наличия мутации гена IDH проводились в лаборатории нейроморфологии ФГАУ «НМИЦ нейрохирургии им. академика Н. Н. Бурденко» Минздрава России.

Из парафиновых блоков с фиксированными в них образцами опухолей изготавливали срезы толщиной 3 микрометра, депарафинировали с использованием ксилола и повторно гидратировали с помощью различных концентраций этанола, срезы высушивали в термостате при 45 °С. Затем срезы последовательно инкубиро-

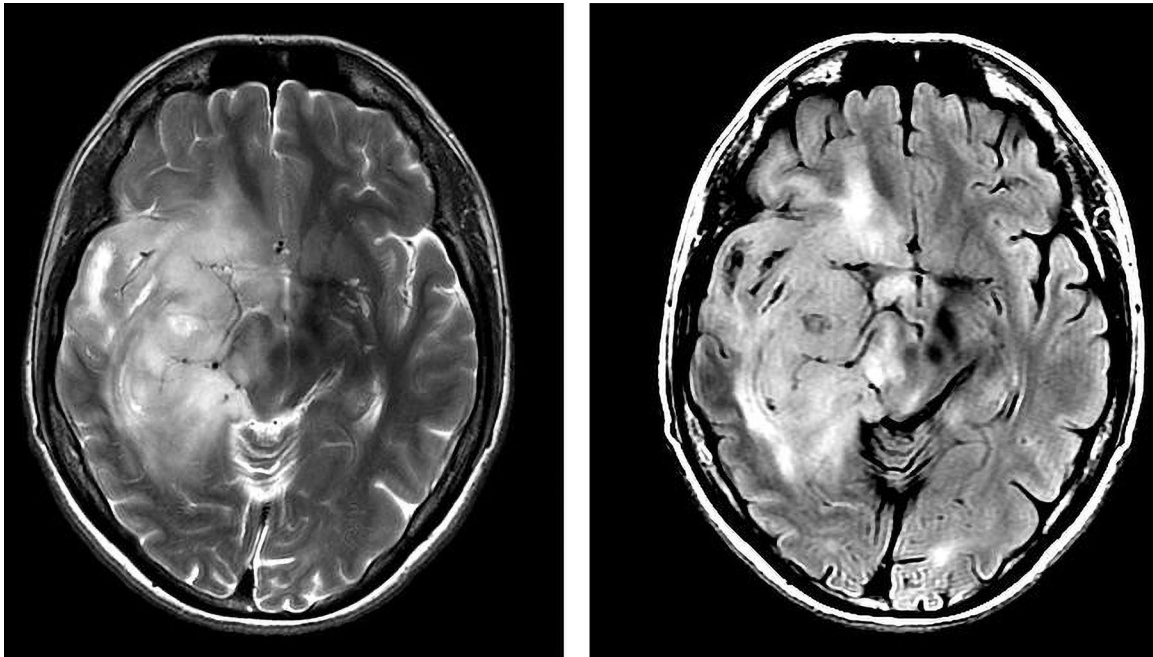


Рис. 1. МР-изображения диффузно-растущей глиомы правой лобно-височной области. В T2-ВИ и T2 Flair опухоль имеет гиперинтенсивный сигнал и нечеткие контуры.

Fig. 1. MR images of a diffuse glioma in the right frontotemporal region. In T2 and T2 Flair, the tumor has a hyperintense signal and fuzzy contours.

вали с моноклональными антителами к продукту мутантного гена IDH-1 2-гидроксиглутарату и после этого конъюгировали с антимышиными IgG-антителами против пероксидазы хрена. Сайты связывания антител визуализировали с использованием тетрагидрохлорида 3,3'-диаминобензидина (Ventana Medical Systems, США), ядра клеток окрашивали гематоксилином. При наличии положительной цитоплазматической

экспрессии делался вывод о наличии мутации R132H в гене IDH-1.

Постобработка данных МР-спектроскопии проводилась с использованием программного пакета LCModel, v6.2, который использует расширенный спектральный базисный набор, включая 2HG, позволяющий определить концентрацию (Ммоль) основных метаболитов.

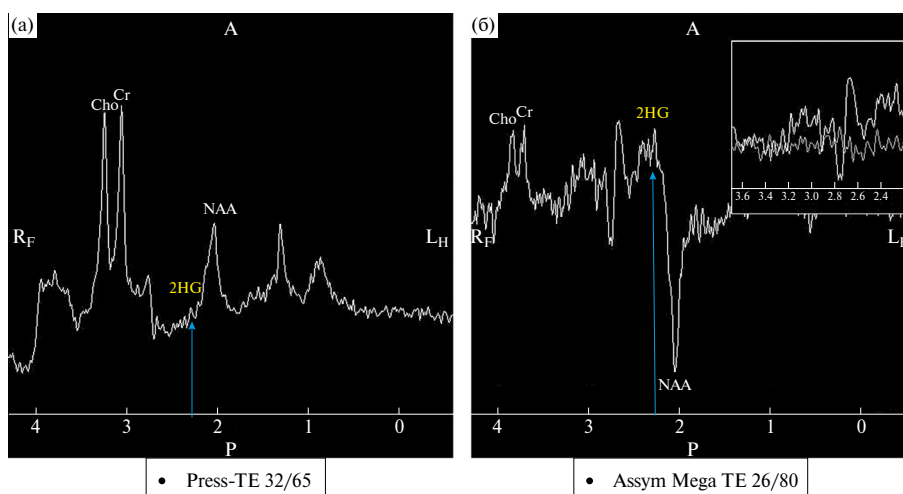


Рис. 2. МР-спектр при последовательностях Press (а) и Mega (б). Синей стрелкой на частоте 2.25 ppm указан пик 2HG, который свидетельствует о наличии мутации IDH в опухолевой ткани.

Fig. 2. MR spectrum for Press (a) and Mega (б) sequences. The blue arrow at a frequency of 2.25 ppm indicates the 2HG peak, which indicates the presence of an IDH mutation in the tumor tissue.

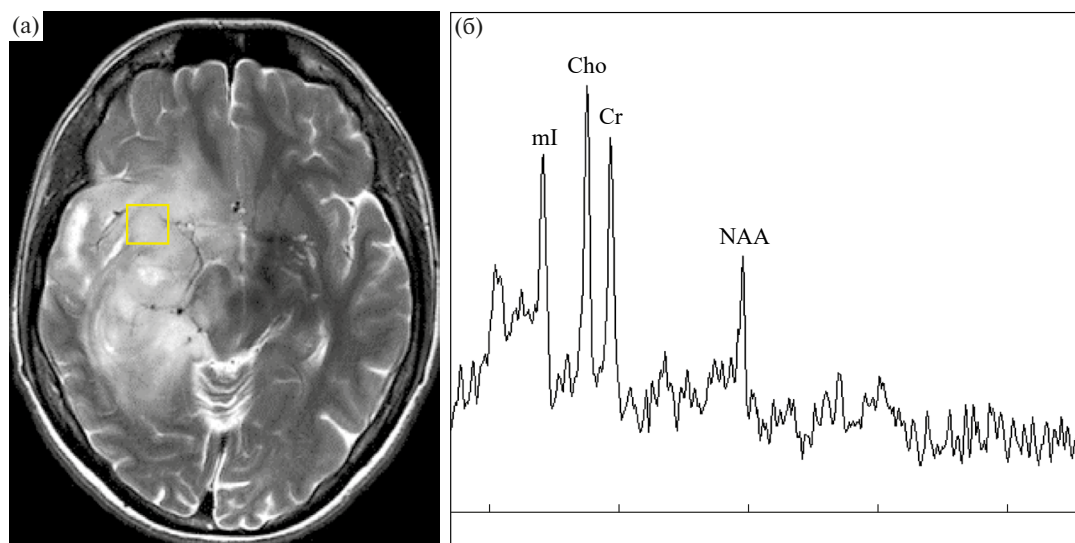


Рис. 3. (а) – T2-взвешенная МР-томограмма в аксиальной проекции. Диффузная опухоль левой лобно-височной области; (б) – спектр, полученный из участка опухоли (обозначен желтым квадратом): отмечается заметное снижение пика NAA, снижение отношения NAA/Cho, NAA/Cr, высокий пик mI, мало изменено отношение Cho/Cr.

Fig. 3. (a) – T2-weighted MRI in axial view. Diffuse tumor of the left frontotemporal region; (b) – The spectrum obtained from the tumor site (indicated by a yellow square): there is a decrease in the NAA peak, a decrease in the NAA/Cho, NAA/Cr ratio, a high mI peak, the Cho/Cr ratio is slightly changed.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программного пакета STATISTICA 10.0. Для групп пациентов с глиальными опухолями вычисляли медианы и использовали U-критерий при их сравнении.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

По данным T2–ВИ, T2-FLAIR определяли сигнальные характеристики диффузно-растущего объемного образования и выбирали зону

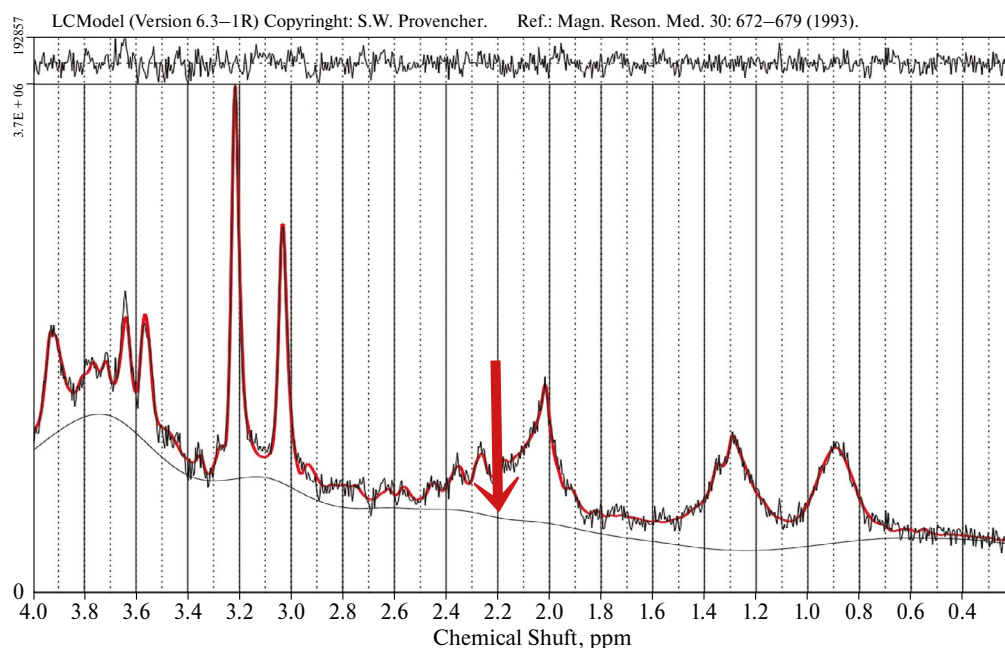


Рис. 4. МР-спектр после обработки с использованием LC Model. На резонансной частоте 2.25 ppm определяется пик 2HG (красная стрелка). Гистологический диагноз «Астроцитомы Gr.2, IDH1-мутантная».

Fig. 4. MR spectrum after processing using the LC Model. At a resonant frequency of 2.25 ppm, a 2HG peak is detected (red arrow). Histological diagnosis – Astrocytoma Gr.2, IDH1-mutant.

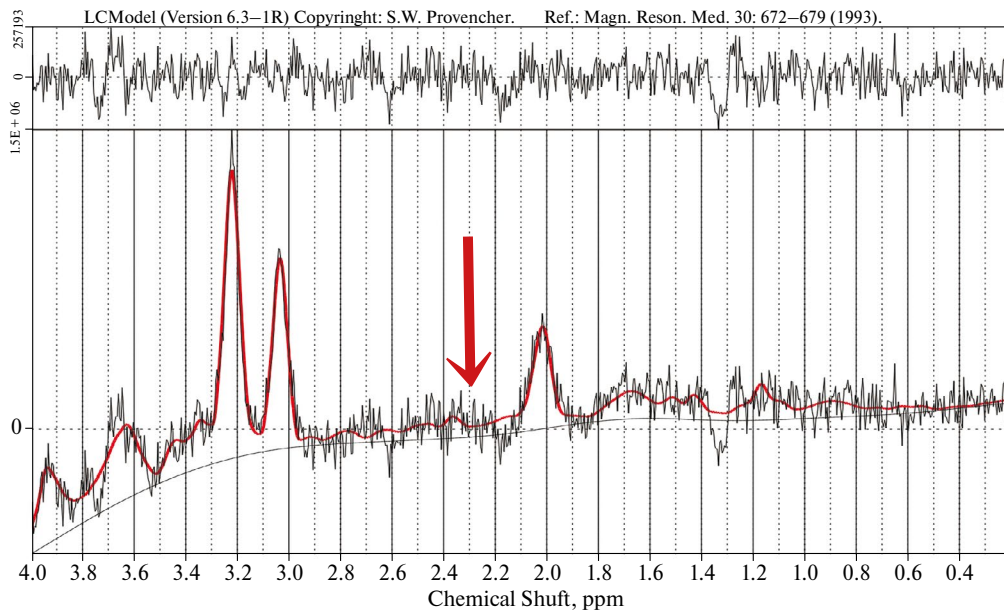


Рис. 5. МР-спектр после обработки на LC-модуле. На резонансной частоте 2.25 ppm пика 2HG не определяется (красная стрелка). Анализ IDH не выявил мутаций. Гистологический диагноз «Глиобластома, дикий тип».

Fig. 5. MR spectrum after processing on the LC module. At a resonant frequency of 2.25 ppm, the 2HG peak is not detected (red arrow). IDH analysis revealed no mutations. The histological diagnosis was Glioblastoma, wild type.

интереса, на которую впоследствии выставлялся воксел для получения спектральных характеристик в зоне патологических изменений (рис. 1).

Сигнал, относящийся к 2HG, был различим в спектрах на 2.25 ppm по шкале химического сдвига в глиальных опухолях с идентифицированной мутацией IDH в 92% случаев. В 2 случаях из 20 пик 2-гидроксиглутарата при МР-спектроскопии не определялся, при этом гистологически было выявлено наличие IDH-мутации. При использовании последовательности Mega Press мы добились более четкой визуализации данного пика (рис. 2 (б)) путем инверсии пика NAA ниже базовой линии. По данным одновоксельной протонной МР-спектроскопии (TE = 35 мс), в спектре опухолевой ткани была получена ожидаемая картина с изменениями соотношений основных метаболитов, характерных для глиом низкой степени злокачественности (рис. 3).

2HG-Press-TE35/97; Assym Mega TE26/80 позволял визуально определить наличие пиков 2HG в протонном спектре опухоли (рис. 2).

Данные одновоксельной MPC мы обрабатывали с помощью программного обеспечения — LCModel (<https://lncd.pitt.edu>), используя резонансы 20 метаболитов в качестве базисного набора при количественной оценке

концентрации этих метаболитов в объеме воксела. Концентрация 2HG была оценена при использовании сигнала воды в качестве основы, а эффекты релаксации в сигналах наблюдаемых метаболитов были скорректированы, используя времена релаксации метаболитов мозга для 3.0 Тесла.

LCModel воспроизводит форму и вычисляет интегральную концентрацию пиков метаболитов в спектре *in vivo*. Остаточные значения уровня шума не демонстрировали значительных зависимостей от химического сдвига.

Из 33 исследуемых спектров в 20 случаях был определен пик 2HG с помощью MPC, и в каждом случае была подтверждена мутация IDH1 (рис. 4). В остальных 13 случаях не было обнаружено 2HG с помощью MPC, а иммуногистохимический анализ не выявил мутаций IDH (рис. 5).

В случаях, где не было выявлено концентраций 2-гидроксиглутарата, установили гистологический диагноз «Глиобластома, дикий тип». В табл. 1 представлены выборочные концентрации 2HG, в зависимости от гистологического типа опухоли. Оценки отношений концентрации 2HG в опухоли статистически значимо различались между глиомами с IDH-мутацией и диким типом ($p < 0.001$).

Таблица 1. Концентрации метаболита 2HG в различных типах глиальных опухолей

Table 1. 2HG metabolite concentrations in different types of glial tumors

	Гистологический тип опухоли	IDH-статус	Концентрация 2HG, мМоль
1	Астроцитомы Grade 2	IDH1 mutation	4.5
2	Астроцитомы Grade 2	IDH1 mutation	5.1
3	Астроцитомы Grade 2	IDH2 mutation	3.8
4	Олигодендроглиомы Grade 3	IDH1 mutation	1.3
5	Олигодендроглиомы Grade 3	IDH2 mutation	2.2
6	Глиобластома	Wild type	Не определялся
7	Глиобластома	Wild type	Не определялся
8	Глиобластома	Wild type	Не определялся

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В данной работе мы неинвазивно определили пик 2-гидроксиглутарата с помощью оптимизированного метода протонной магнитно-резонансной спектроскопии у пациентов с глиальными опухолями головного мозга и показали совпадение с наличием мутации IDH1/2.

Последовательность PRESS, используемая для измерения 2HG в настоящем исследовании, обычно доступна на клинических МР-томографах. Поскольку наличие мутации IDH1/2 является важным прогностическим маркером, то возможность обнаружения 2HG с помощью МРС может рассматриваться как ценный диагностический инструмент.

Дополнительное клиническое преимущество этого биомаркера заключается в возможности его динамического измерения в течение курса терапии и последующего наблюдения. Поскольку концентрация 2HG отражает изменения в клеточности опухоли, то пролиферация приведет к увеличению его концентрации, в то время как его концентрация в процессе комбинированного лечения (ЛТ + ХТ) должна снижаться.

В сочетании с ингибиторами IDH, пик 2HG можно использовать в качестве суррогатного маркера целевого ингибирования, тогда как снижение концентрации 2HG будет сигнализировать об адекватном проникновении лекарственного препарата в опухолевую ткань.

Для пациентов без гистологического диагноза использование данной методики дает возможность поставить предположительный молекулярный диагноз мутации IDH на основе уровня концентрации 2HG. Более того, последующее лечение селективным ингибитором IDH1 или IDH2 в сочетании с оценкой 2HG потенциально может сузить молекулярный диагноз до отдельного гена, поскольку снижение 2HG можно ожидать только в том случае, если ингибитор точно соответствует мутации.

Оценка ответа на повторное лечение может быть основана на данных концентрации 2HG, где отсутствие его снижения будет соответствовать резистентности к проводимой терапии.

Используя метод МРС для обнаружения 2HG, наше исследование показало высокую (92%) чувствительность данной методики в прогнозировании мутационного статуса IDH, что согласуется с данными ранее выполненных исследований (Zhou et al., 2018). В 2 случаях пик 2HG не определялся на резонансной частоте 2.25 ppm, но при проведении иммуногистохимического исследования была выявлена мутация IDH1. Более вероятно, данные результаты связаны с гетерогенностью опухолевой ткани, с наличием кальцинатов и участков микрокровоточиваний в строме опухоли, что требует дальнейшего исследования.

Взаимосвязь, наблюдаемая между 2HG и клеточностью опухоли, согласуется с представлением о том, что увеличение плотности опухолевых клеток влияет на повышение концентрации 2HG, о чем свидетельствуют данные ранее выполненных исследований и исследования, в которых ADC использовался в качестве суррогата клеточности.

Учитывая текущие проблемы с мониторингом ответа на лечение в рамках ряда стандартных и экспериментальных методов лечения, несколько многообещающих исследований уже попытались использовать эту методику, фиксируя изменения 2HG, связанные с прогрессированием заболевания и радиохимиотерапией (Choi, 2016; Andronesi, 2016; De la Fuente, 2016). Коллективные достижения в области визуализации метаболита 2HG подтверждают растущую клиническую ценность спектроскопии *in vivo* и ее потенциал для улучшения существующих протоколов МРТ для пациентов с глиомами различной степени злокачественности.

ВЫВОДЫ

Метод протонной МР-спектроскопии в определении IDH-мутации продемонстрировал свою эффективность у пациентов с глиальными новообразованиями головного мозга, и его можно рекомендовать для более широкого клинического применения. На основе этого возможно провести дооперационную оценку IDH-статуса, что позволяет выбрать оптимальную таргетную терапию, а также прогнозировать и оценивать реакцию опухолевой ткани на проведенное лечение посредством качественного и количественного анализа метаболитов головного мозга.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при поддержке гранта Министерства образования и науки № 075-15-2021-1343 «Развитие биоресурсной коллекции и опухолей нервной системы человека с молекулярно-генетической паспортизацией для персонализированного лечения пациентов с нейроонкологическими заболеваниями».

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Работа была одобрена локальным этическим комитетом ФГАУ «НМИЦ нейрохирургии ак. Н.Н. Бурденко» МЗ РФ, получены согласия пациентов на все виды исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Andronesi O. C.* Treatment response assessment in IDH-mutant glioma patients by noninvasive 3D functional spectroscopic mapping of 2-hydroxyglutarate. *Clin. Cancer Res.* 2016. 22: 1632–1641.
- Balss J.* Analysis of the IDH1 codon 132 mutation in brain tumors. *Acta Neuropathol.* 2008. 116 (6): 597–602.
- Choi C. C.* Prospective longitudinal analysis of 2-hydroxyglutarate magnetic resonance spectroscopy identifies broad clinical utility for the management of patients with IDH-mutant glioma. *J. Clin. Oncol.* 2016. 34: 4030–4039.
- De la Fuente M. I.* Integration of 2-hydroxyglutarate-proton magnetic resonance spectroscopy into clinical practice for disease monitoring in isocitrate dehydrogenase-mutant glioma. *Neuro Oncol.* 2016. 18 (2): 283–290.
- Han S.* IDH mutation in glioma: molecular mechanisms and potential therapeutic targets. *British J. Cancer.* 2020. 122: 1580–1589.
- Juratli T. A.* Accumulation of 2-hydroxyglutarate is not a biomarker for malignant progression in IDH-mutated low-grade gliomas. *Neuro Oncol.* 2013. 15 (6): 682–690.
- Molenaar R. J.* The driver and passenger effects of isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations in oncogenesis and survival prolongation. *Biochim. Biophys. Acta.* 2014. 1846 (2): 326–341.
- Padelli F.* In vivo brain MR spectroscopy in gliomas: clinical and preclinical chances. *Clin. Transpl. Imaging.* 2022. 10: 495–515.
- Suh C. H.* 2-hydroxyglutarate MR spectroscopy for prediction of isocitrate dehydrogenase mutant glioma: a systemic review and meta-analysis using individual patient data. *Neuro Oncol.* 2018. 20: 1573–1583.
- Ward P. S.* The common feature of leukemia-associated IDH1 and IDH2 mutations is a neomorphic enzyme activity converting alpha-ketoglutarate to 2-hydroxyglutarate. *Cancer Cell.* 2010. 17 (3): 225–234.
- Weller M.* EANO guidelines on the diagnosis and treatment of diffuse gliomas of adulthood. *Nature Reviews. Clin. Oncol.* 2020. Epub ahead of print. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41571-020-00447-z>
- Zhou M.* Diagnostic accuracy of 2-hydroxyglutarate magnetic resonance spectroscopy in newly diagnosed brain mass and suspected recurrent gliomas. *Neuro Oncol.* 2018. 20: 1262–1271.

NON-INVASIVE DETECTION OF IDH-1 MUTATION IN BRAIN GLIOMAS BASED ON PROTON MR SPECTROSCOPY

A. N. Tyurina[#], A. I. Batalov, N. E. Zakharova, L. M. Fadeeva, D. B. Kalaeva, I. N. Pronin

N. N. Burdenko National Medical Research Center of Neurosurgery, Ministry of Healthcare of Russia, Moscow, Russia

[#]e-mail: alfa.net@list.ru

Mutations of isocitrate dehydrogenase (IDH) have important prognostic significance for patients with glial brain tumor. The method of proton MR spectroscopy makes it possible to non-invasively determine the metabolic properties of the tumor tissue at the preoperative stage.

The aim of this work was to study the possibility of determining the IDH status, by using magnetic resonance spectroscopy (MRS) to detect the 2-hydroxyglutarate (2HG), a metabolic product of the IDH enzyme.

We examined 33 patients with glial tumors varying degrees of malignancy (Gr. 2–4), followed by identification of IDH mutations. IDH mutation identified in 20 cases, according to proton magnetic resonance spectroscopy, was confirmed by immunohistochemistry. Peak of 2HG did not detect in 13 cases on the MR spectrum, and the analysis for IDH did not reveal mutations.

Using of proton magnetic resonance spectroscopy showed a high sensitivity of this technique in predicting the mutational status of glial brain tumors, which makes this method an important in preoperative diagnostics.

Keywords: magnetic resonance spectroscopy, 2-hydroxyglutarate, isocitrate dehydrogenase, biomarker, low-grade gliomas, high-grade gliomas

УДК 577.21

СПЕЦИФИЧНОСТЬ АПТАМЕРОВ U2 И GOL1 К EGFR – ПОЗИТИВНЫМ КЛЕТКАМ ГЛИОБЛАСТОМЫ ЧЕЛОВЕКА *IN VITRO*

© 2024 г. Ф. М. Дзариева^{1,*}, Д. В. Шамадыкова¹, О. В. Случанко², С. А. Павлова¹,
Л. В. Фаб¹, А. В. Рябова³, Д. Ю. Пантелеев¹, А. М. Копылов⁴, Д. Ю. Усачев⁵, А. В. Головин^{4, 6},
Г. В. Павлова^{1, 5, 6, **}

¹ФГБУН «Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии Российской академии наук», Москва, Россия

²ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н. И. Пирогова» Минздрава России, Москва, Россия

³ФГБУН ФИЦ «Институт общей физики им. А. М. Прохорова РАН», Москва, Россия

⁴ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова», Москва, Россия

⁵ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр нейрохирургии им. академика Н. Н. Бурденко» Минздрава России, Москва, Россия

⁶ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова» Минздрава России, Москва, Россия

*e-mail: dz.fatima@mail.ru,

**e-mail: lkorochkin@mail.ru

Поступила в редакцию 04.09.2023 г.

После доработки 13.11.2023 г.

Принята к публикации 01.12.2023 г.

Гиперэкспрессия рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) или его мутации опосредуют сигнальные пути, приводящие к пролиферации, инвазии опухолевых клеток, а также к повышению их выживаемости. Несмотря на успешность клинического применения антител против EGFR у пациентов с колоректальным раком и плоскоклеточным раком головы и шеи, показана их низкая эффективность при глиобластоме. Поэтому для терапии глиом необходим специфичный к EGFR препарат, способный проникнуть в опухолевый очаг в головном мозге и обладающий низкой иммуногенностью. В данной работе в качестве такого препарата представлены аптамеры – одноцепочечные ДНК-олигонуклеотиды, специфичные к EGFR, U2 и Gol1. В этом исследовании мы получили клеточную модель глиомы человека с гиперэкспрессией *EGFR* и *EGFRvIII*, на которой показали специфичность аптамеров U2 и Gol1 к данным рецепторам, используя классические методы, а также метод апта-иммуноцитохимии. Исследование влияния связывания аптамера Gol1 с рецептором *EGFRvIII* на следующие ступени сигнального пути показало изменение уровней экспрессии генов, связанных с пролиферацией и выживаемостью клеток (*JUN*, *FOS*, *CCND1*, *PI3K* и *AKT3*), в то время как аптамер U2 не продемонстрировал значимый эффект на клетках *in vitro*. Эти результаты показали, что аптамер Gol1 обладает терапевтическим потенциалом против опухолевых клеток глиобластомы человека, гиперэкспрессирующих рецептор мутантного типа EGFRvIII.

Ключевые слова: EGFR, EGFRvIII, глиобластома, аптамер, клеточная модель глиомы, апта-иммуноцитохимия

DOI: 10.31857/S0044467724010097

ВВЕДЕНИЕ

Злокачественные новообразования являются одной из острейших проблем современной медицины. В России в 2021 г. они явились второй причиной смерти после патологий сердечно-сосудистой системы (Каприн, 2022). Глиомы же, как наиболее часто встречаемые опухоли головного мозга, остаются серьезной проблемой для человечества, несмотря на развитие технологий и медицины. Их особенности, такие как наличие гематоэнцефалического барьера, иммунное микроокружение и то-

пология, представляют ряд трудностей для терапии. EGFR на сегодняшний день является одной из наиболее перспективных мишеней терапии, поскольку наблюдается его гиперэкспрессия более чем в 60% глиом (Zhou et al., 2017).

Во многих глиомах выявляются разные изменения EGFR, в частности метилирование, амплификации, делеции и однонуклеотидные полиморфизмы (SNP). Эти изменения коррелируют с пролиферацией, инвазией опухоле-

вых клеток и с патологическим ангиогенезом. Также мутации данного гена коррелируют с выживаемостью пациентов и ответом на терапию ингибиторами тирозинкиназ (Wan et al., 2010). Глиобластома (ГБ) — наиболее агрессивная форма глиом (Grade IV), более 60% ГБ гиперэкспрессируют EGFR, и примерно в половине из них гиперэкспрессия EGFR является результатом мутантной формы рецептора, EGFRvIII (Zhou et al., 2017). В EGFRvIII происходит внутрирамочная делеция экзонов 2–7 (NM_001346941.2), что приводит к гиперэкспрессии укороченного рецептора. Этот прототип онкопротеина не связывается с лигандом и конститутивно активен (Zok et al., 2018). По сравнению с EGFRwt, в EGFRvIII отсутствуют аминокислоты 6–273, и удаление этих 268 аминокислот создает сайт соединения с новым остатком глицина между аминокислотами 5 и 274 (Babic et al., 2013).

EGFRvIII увеличивает экспрессию белков, важных для апоптоза, инвазии, стволовости, метаболизма и ангиогенеза, включая BCL-xL, белки внеклеточного матрикса (ECM), аномальный веретенообразный белок, ассоциированный с микроцефалией (ASPM), белок-переносчик глюкозы типа 1 (GLUT1), фактор, ингибирующий лейкемию (LIF) и фактор сплайсинга гетерогенного ядерного рибонуклеопротеина A1 (hnRNPA1) (Feng et al., 2012; Oprita et al., 2021; Reuter, Mathews, 2010; Ward et al., 2012; Xia et al., 2009). Эти факторы способствуют пролиферации и выживанию.

Редкие клетки в ГБ человека совместно экспрессируют EGFR и EGFRvIII, при этом коэкспрессия EGFR и EGFRvIII делает новообразования более злокачественными. Большинство опухолей глиобластомы человека, в которых показана совместная экспрессия EGFR и EGFRvIII, представлены гетерогенными опухолевыми клетками, часть из которых экспрессируют преимущественно один из вариантов рецептора. При этом клетки, экспрессирующие EGFRvIII, могут передавать сигналы клеткам, экспрессирующим только EGFR, паракринным образом. Показана возможная модель, включающая эти функции (Cvrljevic et al., 2011).

Воздействие на столь важную терапевтическую мишень в клетках глиомы, как EGFR, влечет за собой ряд трудностей и неразрешенных вопросов. Препараты моноклональных антител, которые чаще всего используются в ме-

дицине для ингибирования EGFR, показывают крайне низкую эффективность при глиоме. Это связано с трудностями их доставки в опухолевую ткань, находящуюся в головном мозге. Аптамеры, или малые ДНК (или РНК), — аналоги химических антител, за счет уникальных третичных структур обладают высоким сродством и специфичностью к белкам-мишеням. Аптамеры отбирают путем систематической эволюции лигандов при помощи экспоненциального обогащения (SELEX) и разрабатываются в том числе как антагонисты факторов, ассоциированных с различными заболеваниями (Mayer & Arteaga, 2016). Они обладают рядом привлекательных черт в качестве молекулярных зондов, в сравнении с антителами: (1) низкая молекулярная масса; (2) низкая иммуногенность и токсичность; (3) высокая аффинность и специфичность; (4) быстрый, воспроизводимый синтез и модификация (Horvath et al., 2006; Ratushny et al., 2009).

В случае аптамеров, специфичных к маркерам злокачественных образований, один из приоритетных объектов — это маркер EGFR. На сегодняшний день известно более 30 аптамеров нуклеиновых кислот к EGFR (Kopylov et al., 2021). Эти «химические малые нуклеиновые антитела» рассматриваются как крайне перспективные соединения, способные специфически связываться с EGFR и его мутантной формой EGFRvIII и, возможно, даже оказывать на них определенное воздействие, а также осуществлять опосредованную доставку препаратов в клетки. Два аптамера в более ранних исследованиях показали интересные антипролиферативные свойства для глиом человека: аптамер U2 (Mayer & Arteaga, 2016) и полученный в результате укорачивания U2 с сохранением специфичных структур для связывания с EGFR — Goll.

В данной работе была создана клеточная модель глиомы человека с гиперэкспрессией EGFR и EGFRvIII с последующей оценкой специфичности аптамеров U2 и Goll к данным рецепторам. Для сравнения в качестве «золотого» стандарта была принята клеточная линия U87, а также использована клеточная культура глиобластомы человека G01, полученная из опухолевой ткани пациента (Pavlova et al., 2021). В ходе работы необходимо было понять роль U2 и Goll в изменении экспрессии генов молекул сигнальных путей EGFR, приводящих к росту и делению клеток, пролиферации и выживаемости опухолевых клеток глиобластомы человека.

МЕТОДИКА

*Клеточные культуры и клеточные линии
глиобластомы человека*

Линия клеток U87 была получена из Института цитологии РАН (Санкт-Петербург). Первичная культура клеток глиобластомы человека G01 была получена из эксплантата, предоставленного НМИЦ нейрохирургии им. академика Н. Н. Бурденко (Москва).

U87/EGFRwt, G01/EGFRwt и G01/EGFRvIII были получены в результате трансфекции генетическими конструкциями при использовании реагента TurboFect (ThermoFisher Scientific, США). Селекция проводилась с использованием антибиотика гигромицина В (ThermoFisher Scientific, США) в концентрации 200 мкг/мл. Для контроля уровня трансфекции клеток проводили трансфекцию клеток плазмидой pEGFP-N1 (Clontech, США), содержащей ген GFP (зеленый флуоресцентный белок), после которой было подсчитано соотношение клеток с флуоресцентным зеленым свечением к ядрам клеток. Результаты были оценены при помощи флуоресцентного микроскопа KEYENCE BZ-9000.

Трансфицированные и нетрансфицированные клетки U87 и G01 пассировали в культуральной среде DMEM/F12 (ПанЭко, Россия) с добавлением L-глутамина (ПанЭко, Россия) в концентрации 292 мг/л, 10% фетальной бычьей сыворотки (Thermo Fisher Scientific, США) и 100-кратного антибиотика-антимикотика (10000 единиц / мл пенициллина, 10000 мкг / мл стрептомицина и 25 мкг / мл Gibco Amphotericin B) при 37 °C и 5% CO₂. Трансфицированные клетки культивировали до получения трансгенных культур с устойчивой экспрессией EGFR или EGFRvIII.

Аптамеры

Поиск новой последовательности ДНК, способной связываться с EGFR, опирался на предположение об оптимизации вторичной структуры известных аптамеров. В качестве источника данных о вторичной структуре использовали предсказанные состояния для ДНК-аптамера U2, который был отобран командой X. Zhang (Wu et al., 2014). На основании анализа вариантов предсказанных структур двух разных аптамеров U2 и U31, специфичных к EGFR и EGFRvIII, был выбран дизайн новой структуры, содержащий мультипетлю. Предполагалось, что именно мультипетля служит узнающим элементом.

По результатам вычислительной оптимизации последовательности под желаемую вторичную структуру методом многомерного сканирования Больцмана в утилите RNASketch (Hammer et al., 2017, 2019) был предложен аптамер Gol1 с последовательностью: 5'-GCCGGCATTTTGACGCCGCCCCGGCTGCTTATGCTCCGGGGGCATATGGC-3'.

Антитела

В исследовании были использованы антитела против EGFR «дикого типа» EGFR (225) (# MA5-12880 ThermoFisher Scientific, США), антитела против мутантной формы EGFRvIII (L8A4) (MABC1126-100UG Merck, Германия), антитела против бета-тубулина (T7816) (Sigma, США), вторичные ослиные антимышиные антитела, меченые HRP (115-035-003 Jackson ImmunoResearch, Англия), вторичные ослиные антимышиные антитела, конъюгированные с флуоресцентным красителем Cy5 (715-175-151 Jackson ImmunoResearch, Англия).

Клонирование

В результате клонирования была получена генно-инженерная конструкция *EGFRvIII/CMV3*, основанная на экспрессионном векторе *CMV3-untagged* (Sinobiological, США), предназначенном для гиперэкспрессии в клетках млекопитающих. *EGFRvIII* был получен в результате инвертированного ПЦР на основе коммерческого вектора pCMV-EGFR (кат. номер HG10001-UT, Sinobiological, США), который содержит кодирующую последовательность «дикого типа» EGFR, вектор *EGFRwt/CMV3*. Для инвертированного ПЦР дополнительно создали конструкцию на основе вектора *pBluescript II SK(+)* (*pBSK II SK(+)*) (Stratagene, США): *EGFRwt* был вырезан эндонуклеазами рестрикции Kpn1 и Xba1 и лигирован в *pBSK II SK(+)*, обработанный этими же рестриктазами. В результате инвертированного ПЦР была получена делеция в 801 пн, что соответствует делеции 2–7 экзона дикого типа *EGFR*. Параметры ПЦР-реакции для Phusion-полимеразы (ThermoFisher Scientific, США): предварительная денатурация 98°C 4 мин; денатурация 98°C 15 сек, отжиг 60°C 15 сек, элонгация 90 сек, 35 циклов; финальная элонгация 72°C 5 мин. Нуклеотидная последовательность праймеров: EGFRvIII_F0 CGG GCT CTG GAG GAA AAG AA; EGFRvIII_R0 GAG GGA GCG TAA TCC CAA GG; EGFRvIIIinvF GTA ATT ATG TGG TGA CAG A; EGFRvIIIinvR CTT TCT TTT CCT CCA GAG C.

Вестерн-блот-гибридизация

Клетки лизированы в SDS–Лэммли-буфере (62.5 мМ Tris–HCl (pH 6.8), 2% SDS и 10% глицерол, 100 мМ дитиотреитол). Нормализованное количество клеток образцов было разделено в 8.0%-м SDS-полиакриламидном геле, проведен перенос на нитроцеллюлозную мембрану 0.22 мкрн (BioRad, США) при 100 В в течение 1 ч при охлаждении. Для иммуноблоттинга использовали антитела против EGFR (225) (1:750), антитела против EGFRvIII (L8A4) (1:1000), антитела к бета-тубулину (T7816) (1:700), вторичные антитела, меченные HRP (1:20000).

Апта-иммуноцитохимия

Клетки предварительно инкубировали на круглых покровных стеклах, помещенных в лунки 24-луночного планшета, в течение 3 ч в присутствии аптамеров U2 и Goll в концентрации 1 мкМ и полной ростовой среды DMEM/F12. После этого отмытые 3 раза по 5 мин фосфатно-солевым буфером клетки фиксировали 4%-м параформальдегидом в течение 30 мин при +4°C для дальнейшего иммуноцитохимического анализа. Препараты клеток инкубировали в течение часа при комнатной температуре с первичными антителами против EGFR (225) и против EGFRvIII (L8A4) в титре 1:50, затем проводили инкубацию в темноте со вторичными антимышиными мечеными Cy5 антителами (1:50). Ядра клеток окрашивали Hoechst 33342 (1:500) (Sigma).

Препараты исследовали на комплексе лазерного сканирующего конфокального микроскопа Carl Zeiss серии LSM-710 с короткоимпульсным

фемтосекундным инфракрасным лазером с перестраиваемым диапазоном (800–1500 нм) для мультифотонного возбуждения флуоресценции.

Проточная цитометрия

Клетки U87, G01, U87/EGFRwt, G01/EGFRwt и G01/EGFRvIII плотностью 5×10^5 были диссоциированы и осаждены центрифугированием 5 мин при 1000 g. Промытый фосфатно-солевым буфером осадок клеток разделили на 3 пробирки: контроль, клетки с добавлением U2, клетки с добавлением Goll. Инкубацию клеток с аптамерами, мечеными FAM, в концентрации 1000 наномоль проводили в течение 30 мин при +4°C в темноте. Далее клетки трижды промывали фосфатно-солевым буфером путем осаждения в течение 3 мин при 1000 g и последующего ресуспендирования в буферном растворе, ресуспендировали в 200 мкл буферного раствора и проводили измерение на приборе. Интенсивность флуоресценции определяли путем подсчета 10000 событий на проточном цитометре CytoFLEX LX и ПО CytExpert (Beckman Coulter, США).

Оценка уровня экспрессии белков сигнального пути EGFR методом полимеразной цепной реакции в реальном времени

При достижении конfluenceности 70% к клеточным культурам добавляли аптамер U2 или Goll в концентрации 10 мкМ, в качестве отрицательного контроля были приняты клетки без воздействия. Спустя 72 ч из клеток выделяли тотальную РНК с помощью реагента RNazol® RT (Sigma, США), в соответствии с протоко-

Таблица 1. Последовательность олигонуклеотидных праймеров
Table 1. Sequence of oligonucleotide primers

Ген	Прямой праймер 5'-3'	Обратный праймер 5'-3'
<i>Grb2</i>	GGCGTTCTCCTGCTTGACT	ATGACTTCCTCCTCCGCTCT
<i>SOS</i>	GCAGCTGCCCTACGAGTTT	GGCTGAGCTTGGCATAGCA
<i>Ras</i>	AGCAGATCAAACGGGTGAAGG	TCTTGGCCGAGGTCTCGAT
<i>A-RAF</i>	CAAGGGACGAAAGACGGTCA	CAAGGGACGAAAGACGGTCA
<i>MEK</i>	TCTGCAGTTAACGGGACCAG-	GGCTTGTGGGAGACCTTGAA
<i>ERK</i>	CCAGAGAACCCTGAGGGAGA	TGTTGAGCAGCAGGTTGGAA
<i>PI3K</i>	CTGCAGTTCAACAGCCACAC	TGTGCATTCTTGGGCTCCTT
<i>AKT3</i>	CCATTGTGAAAGAAGTTGGGT	TGCCACTGAAAAGTTGTTGAGG
<i>JUN</i>	GGATCAAGGCGGAGAGGAAG	GCTGCGTTAGCATGAGTTGG
<i>c-Fos</i>	CAAGCGGAGACAGACCAACT	TGCTGCTGATGCTCTTGACA
<i>Cyclin D1</i>	GGCGGAGGAGAACAAACAGA	TGTGAGGCGGTAGTAGGACA
<i>CDK4</i>	GCCAGTGGCTGAAATTGGTG	CAGTCGCCTCAGTAAAGCCA
<i>RPL13A</i>	CATAGGAAGCTGGGAGCAAG	GCCCTCCAATCAGTCTTCTG
<i>GAPDH</i>	CAGGGCTGCCTTCTTGTG	GCCTTGACTGTGCCGTTGAA
<i>TBP</i>	GAGCTGTGATGTGAAGTTTCC	TCTGGGTTTGATCATTTCTGTAG

лом производителя. Для получения кДНК использовали обратную транскриптазу MMLV H minus (Thermo Fischer, США) и рандомный N10-праймер (Евроген, Россия). Полученную кДНК использовали для проведения полимеразной цепной реакции. Параметры ПЦР-РВ: предварительная денатурация – 95°C 5 мин; 40 циклов амплификации: 10 сек денатурации при 95°C; 30 сек – отжиг праймеров при 60°C; 30 сек элонгации при 72°C; финальная элонгация – 72°C 3 мин. Анализ проводился при помощи амплификатора LightCycler 96 и программного обеспечения LightCycler 96 Software Version 1.1 (ROCHE, Швейцария).

Праймеры подбирали к генам человека, используя программу Primer-Blast (NCBI). В качестве референсных генов были выбраны GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase),

RPL13A (ribosomal protein L13a). Целевые гены были выбраны из сигнального пути EGFR. Эксперимент проводился в трех повторностях.

Праймеры, которые использовали в исследовании, представлены в табл. 1.

Статистический анализ

Статистический анализ проводили двухфакторным дисперсионным анализом (two-way ANOVA) с последующим апостериорным тестом Тьюки или U-тестом Манна – Уитни с помощью GraphPad Prism 9.0.0 (GraphPad Software, Бостон, Массачусетс, США). Данные выражали как среднее значение $\pm$ стандартная ошибка среднего, р-критерий считался значимым при * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$, **** = $p < 0.0001$. Все эксперименты проводились в трех повторностях.

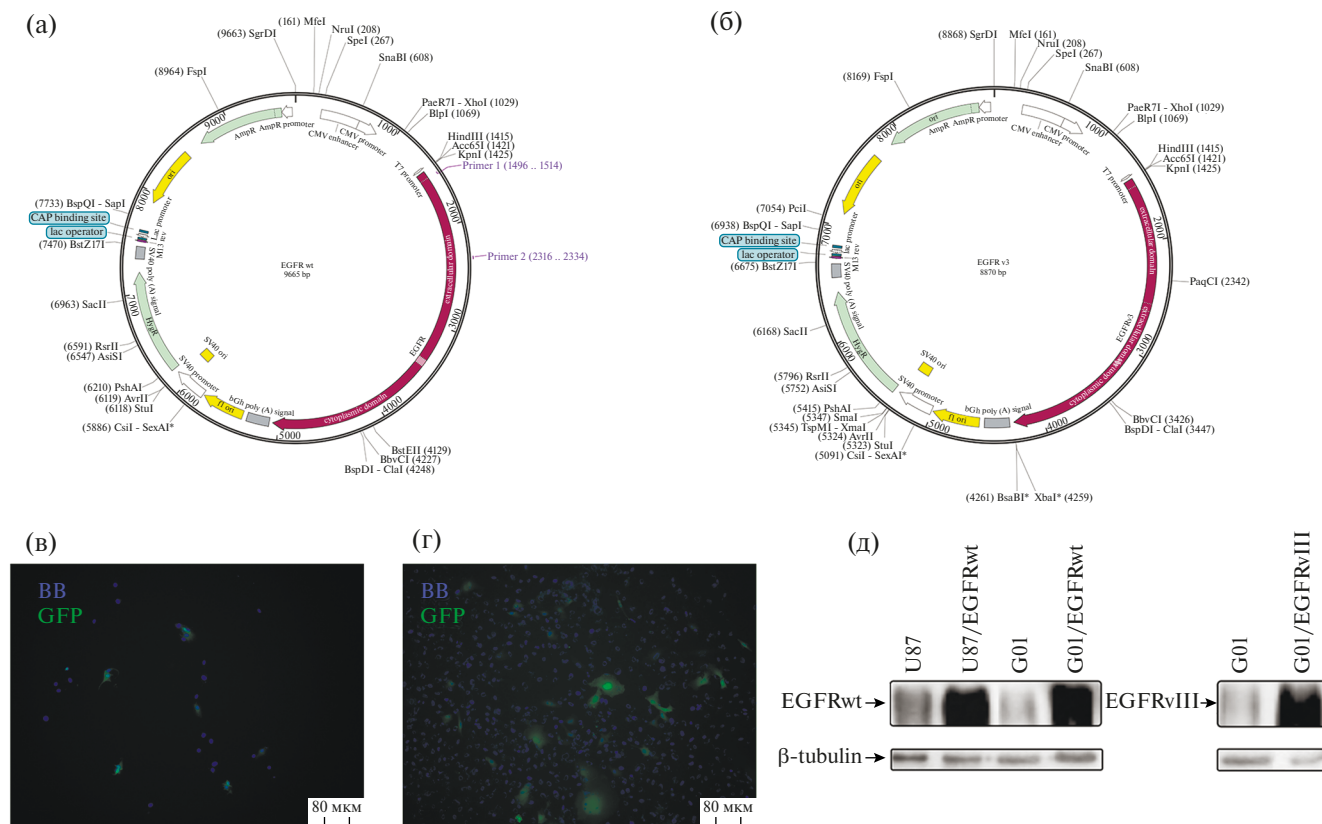


Рис. 1. (а) – карта молекулярно-генетической конструкции *EGFRwt/CMV3*; (б) – карта молекулярно-генетической конструкции *EGFRvIII/CMV3*; оценка эффективности трансфекции клеточной культуры G01 (в) и клеточной линии U87 (г), GFP – зеленое свечение. Ядра клеток окрашивали бисбензимином (Hoechst 33342, Sigma) – синее свечение. (д) – анализ экспрессии EGFR в контрольных и трансгенных клетках линии U87 и в клетках культуры G01, полученной от пациента. Нормализовано по бета-тубулину.

Fig. 1. (а) – Plasmid map of the vector *EGFRwt/CMV3*; (б) – Plasmid map of the vector *EGFRvIII/CMV3*; Evaluation of the efficiency of transfection of G01 (v) cell culture and U87 (r) cell line by human glioblastoma, GFP – green. The cell nuclei were stained with bisbenzimidazole (Hoechst 33342, Sigma) – blue. (д) – Analysis of EGFR expression in control and transgenic cells of the human glioblastoma cell line U87 and in patient-derived human glioblastoma G01 cultured cells. Normalised for beta-tubulin.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Получение трансгенных клеточных культур U87/EGFRwt, G01/EGFRwt и G01/EGFRvIII

Полученные в результате клонирования генно-инженерные конструкции *EGFRvIII/CMV3* и *EGFRwt/CMV3* использовали для трансфекции клеточной линии глиобластомы человека U87 и первично-перевиваемой культуры клеток глиобластомы человека G01 с последующим выведением стабильно-трансгенных культур клеток с гиперэкспрессией EGFRwt или EGFRvIII (рис. 1 (а) и 1 (б)).

Оценка уровня трансфекции клеточных линии и культуры показала, что процент трансфекции у клеток G01 составил 8.125%, у клеток U87 – 21.21% (рис. 1 (в) и 1 (г)). Клетки U87/EGFRvIII после трансфекции продемонстрировали крайне низкую выживаемость, и, так как не было по-

лучено достаточного количества для дальнейших исследований, данная линия исключена из экспериментов. Эксперимент повторялся более трех раз с повторяющимся эффектом – нежизнеспособной трансгенной клеточной линии. Таким образом, для дальнейшего исследования были получены стабильные трансгенные линии культур U87/EGFRwt и культуры G01/EGFRwt и G01/EGFRvIII.

Подтверждение экспрессии EGFRwt или EGFRvIII в трансгенных клеточных культурах глиобластомы человека методом Вестерн-блот-гибридизации

Созданные трансгенные клеточные культуры U87/EGFRwt, G01/EGFRwt и G01/EGFRvIII были проанализированы на наличие трансгенного белкового продукта (рис. 1 Д). Наибольший уровень экспрессии белкового продукта наблюдается в трансгенных клетках U87wt, G01vIII.

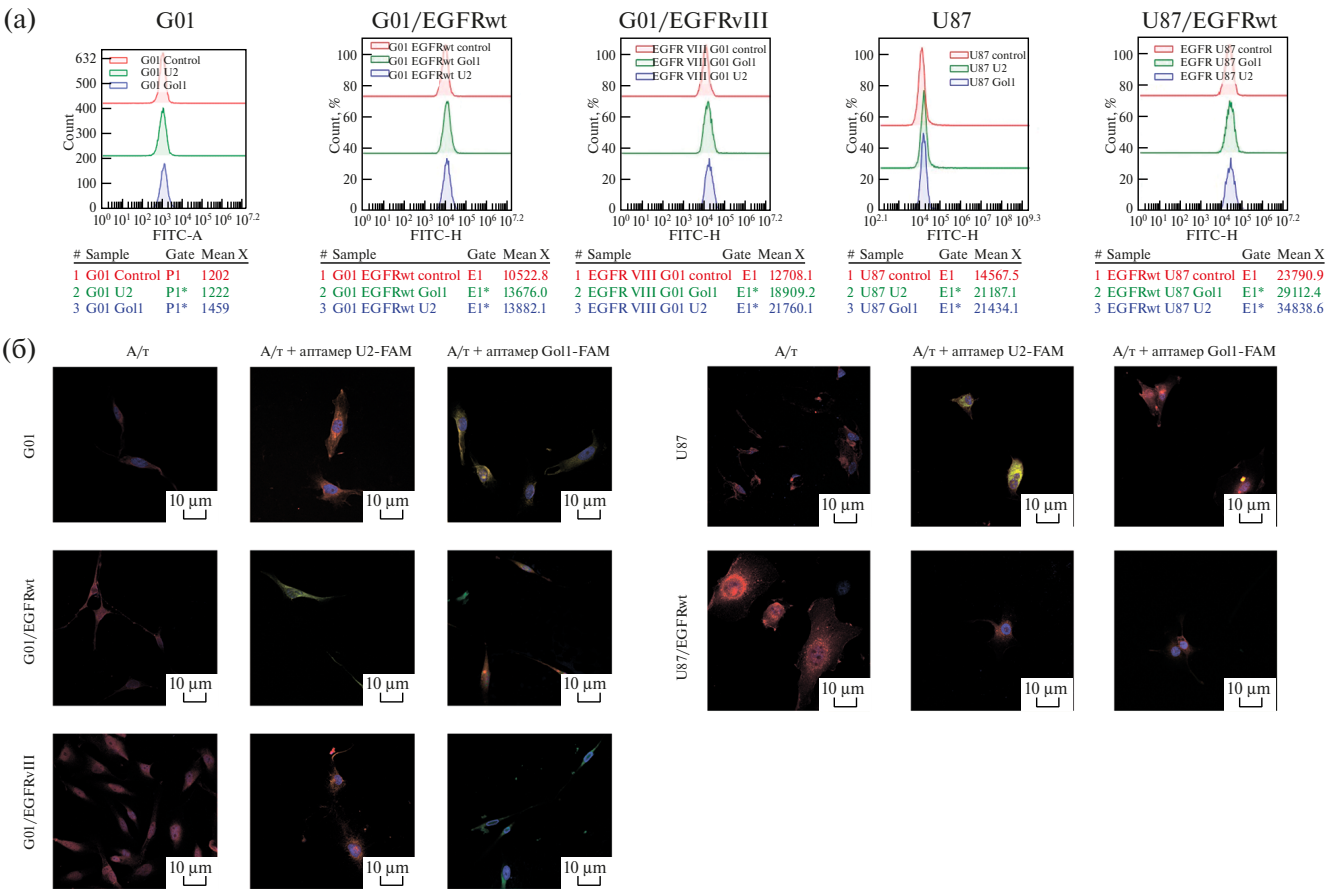


Рис. 2. Анализ связывания клеток глиобластомы человека *in vitro* с мечеными аптамерами U2-FAM и Gol1-FAM, специфичными к EGFR, методом проточной цитофлуориметрии (а) и апта-иммуноцитохимии (б). В качестве контроля взяты интактные клетки. Антитела против EGFR (красный), аптамеры U2 и Gol1 (зеленый), синий – окраска ядер бисбензимином.

Fig. 2. Analysis of binding of human glioblastoma cells *in vitro* with labeled aptamers U2-FAM and Gol1-FAM, specific for EGFR, by flow cytometry (a) and aptaimmunocytochemistry (b). Intact cells were taken as a control. Antibodies against EGFR (red), aptamers U2 and Gol1 (green), blue – staining of nuclei with bisbenzimidide.

Таблица 2. Цифровые показатели проточной цитофлуориметрии взаимодействия аптамеров U2 и Gol1 с клетками глиобластомы человека G01 и U87**Table 2.** Digital indicators of flow cytometry of interaction of U2 and Gol1 aptamers with human glioblastoma cells G01 and U87

	Среднее значение интенсивности флуоресценции клеток (контроль)	Среднее значение интенсивности флуоресценции клеток (связывание с аптамером U2)	Среднее значение интенсивности флуоресценции клеток (связывание с аптамером Gol1)
G01	1202	1222	1459
G01/EGFRwt	10522	13882	13676
G01/EGFRvIII	12708	21760	18909
U87	14567	21187	21434
U87/EGFRwt	23790	34838	29112

U2 и Gol1 специфично связываются с клетками U87/EGFRwt, G01/EGFRwt и G01/EGFRvIII

Оценка уровня интенсивности флуоресценции клеток методом проточной цитофлуориметрии после инкубации с аптамерами U2 и Gol1, меченными FAM (амидитом, содержащим флуоресцеин), показала окрашивание аптамерами целевых клеток (рис. 2 (а)). Клетки U87/EGFRwt, G01/EGFRwt и G-01/EGFRvIII продемонстрировали наилучшее связывание с U2 (рис. 2 (а)). В целом, полученные результаты проточной цитометрии позволяют утверждать, что выбранные нами аптамеры U2 и Gol1 специфичны к высоко экспрессирующим EGFR клеткам (табл. 2).

Если проанализировать взаимодействие аптамеров U2 и Gol1, специфичных к EGFR, с клетками культуры глиобластомы человека G01, то совершенно очевидно, что оба аптамера показывают большее сродство именно с EGFRvIII, что показывает привлекательность данных аптамеров для прогнозирования течения заболевания, а также возможность использовать их для доставки терапевтических агентов. Следует также обратить внимание: в случае взаимодействия с линейными трансгенными клетками U87/EGFRwt мы обнаруживаем высокое сродство к дикой форме. К сожалению, в данном случае мы не можем сравнить с мутантной формой U87/EGFRvIII, так как данную трансгенную линию не удалось вывести для анализа.

Апта-иммуноцитохимический анализ с использованием флуоресцентно-меченых аптамеров U2-FAM и Gol1-FAM, специфично связывающихся с EGFR

Для цитологической оценки экспрессии клетками был проведен иммуноцитохимический анализ в модифицированном варианте — апта-иммуноцитохимия (использовалась конкурентная окраска опухолевых клеток антителами

и аптамерами, специфичными к EGFR). Предварительная инкубация в течение 3 ч трансгенных клеточных культур глиобластомы человека G01 и трансгенной клеточной линии U87 глиобластомы человека с аптамерами U2 и Gol1 с последующим иммуноцитохимическим анализом позволила получить одновременную окраску клеток как аптамерами, так и антителами против EGFRwt и EGFRvIII.

Анализ результатов окрашивания антителами показал, что EGFR в исследуемых препаратах локализуется по всей цитоплазме клеток, в некоторых случаях по ядерной мембране (рис. 2 (б)). Аптамеры имеют ту же локализацию и полностью накладываются на окраску антителами, что подтверждает их специфичность к интересующему рецептору.

Стоит отметить более яркое свечение антител и аптамеров в трансгенных клетках U87/EGFRwt и G01/EGFRvIII, что говорит о большем количестве искомого рецептора, нежели в контрольных клетках (рис. 2 (б)). Результаты совпадают с данными Вестерн-блоттинга.

Кроме того, привлекает внимание тот факт, что воздействие аптамера Gol1 блокировало дальнейшую окраску антителами против EGFRvIII (рис. 2 (б)), что говорит о совпадении специфического эпитопа для связывания антитела и аптамера Gol1 и о конкурентном их связывании.

При наложении зеленого свечения аптамеров на красный свет флуоресцирующих антител против EGFR наблюдается оранжевое свечение. Оранжевое свечение говорит о взаимодействии аптамера и антитела с разными эпитопами EGFR, которое не создает конкуренции. В то же время совпадение распределения свечения антитела и аптамера говорит о совпадении мишени

EGFR. Наличие только зеленого свечения аптамера говорит о полном совпадении специфического эпитопа EGFR, связывание с которым аптамера не позволяет ему уже связаться с антителом.

По результатам апта-иммуноцитохимического анализа можно сказать, что U2 более специфичен к эпитопу EGFR дикого типа (EGFRwt), а Gol1 более специфичен к EGFRvIII.

Изменение уровней экспрессии белков сигнального пути EGFR после воздействия аптамеров U2 и Gol1 в клетках глиобластомы U87 и G01

Воздействие аптамеров U2 и Gol1 на клетки глиобластомы человека, гиперэкспрессирующие EGFRwt или EGFRvIII, оценивали методом полимеразной цепной реакции в реальном времени. Для панели были взяты гены основных молекул сигнальных путей EGFR, приводящих к росту,

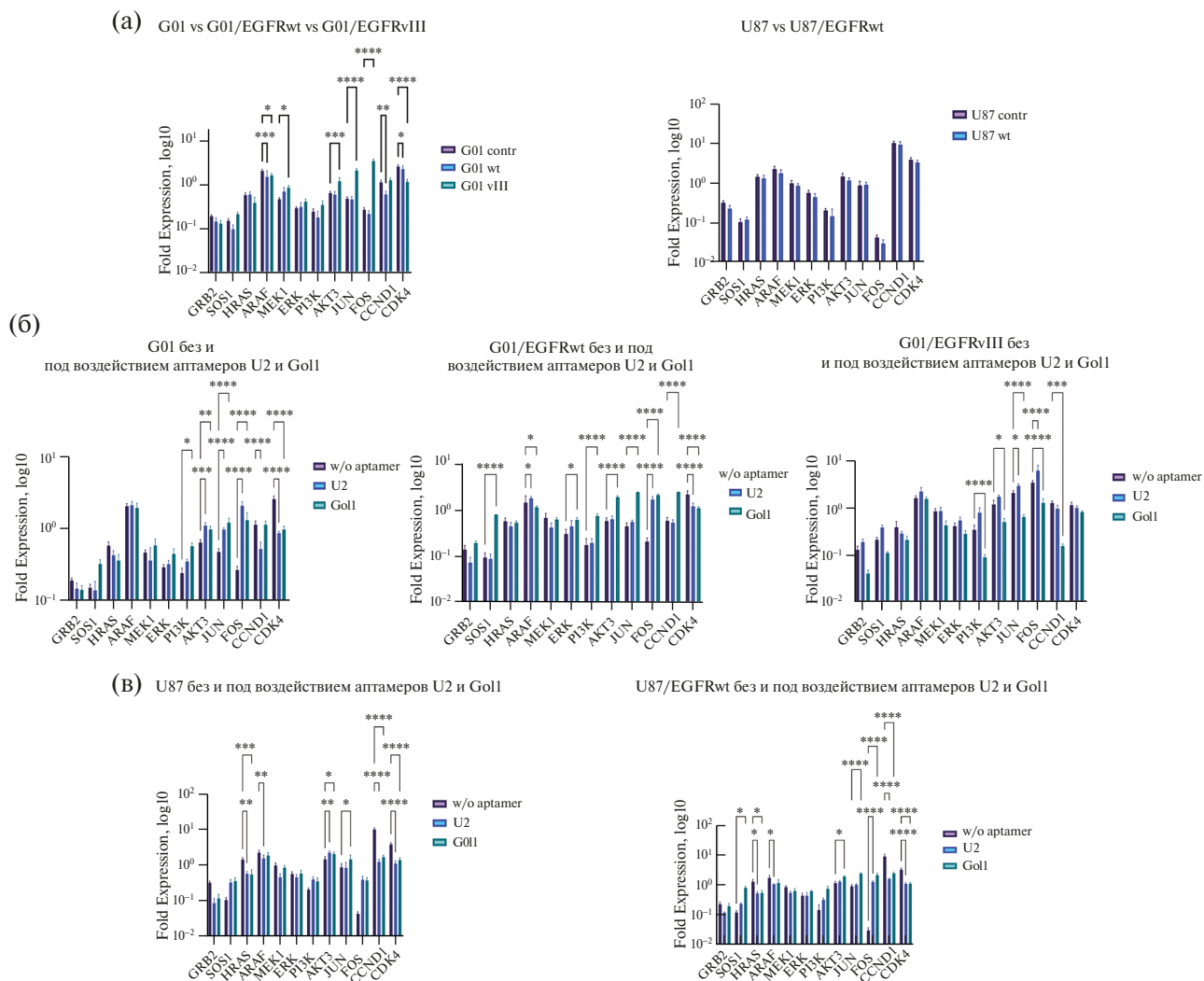


Рис. 3. Анализ изменения уровней экспрессии генов молекул каскада EGFR методом ПЦР-РВ в клетках глиобластомы человека до и после трансфекции (а), до и после добавления аптамеров U2 и Gol1 в клетках линии U87 (б) и клетках культуры G01 (в).

Экспрессию генов нормализовали относительно референсных генов *GAPDH*, *RPL13A* и *TBP*. Данные представлены в виде логарифмической шкалы среднего значения $\pm$ стандартная ошибка среднего, р-критерий считался значимым при $* = p < 0.05$, $** = p < 0.01$, $*** = p < 0.001$, $**** = p < 0.0001$ (ANOVA-тест). Все эксперименты проводились в трех повторностях.

Fig. 3. Analysis of changes in gene expression levels of EGFR cascade molecules by qPCR in human glioblastoma cells before and after transfection (a), before and after the addition of U2 and Gol1 aptamers in U87 line cells (б) and G01 culture cells (в). Gene expression was normalized relative to the reference genes *GAPDH*, *RPL13A* and *TBP*. The data are presented as a logarithmic scale of the mean value $\pm$ standard error of the mean, the p-criterion was considered significant at $* = p < 0.05$, $** = p < 0.01$, $*** = p < 0.001$, $**** = p < 0.0001$ (ANOVA test). All experiments were carried out in three replicates.

пролиферации клеток и их способности к выживанию (PI3K/Akt; RAS/MAPK; MAPK/CREB).

В клетках линии U87/EGFRwt не наблюдается статически значимых изменений экспрессии этих генов по сравнению с исходной U87 (рис. 3 (а)), в отличие от клеток культуры G01, полученных из ткани глиобластомы пациента. В клетках трансгенной культуры G01/EGFRwt наблюдался сниженный уровень экспрессии генов *CCND1* и *CDK4* ($p < 0.05$, $p < 0.01$), по сравнению с G01. Мы наблюдали статистически значимое снижение экспрессии гена *CDK4* в клетках G01/EGFRwt ($p < 0.01$) и в клетках G01/EGFRvIII ($p < 0.0001$), по сравнению с контрольной клеточной культурой G01. При этом в культуре G01/EGFRvIII значительно повышалась экспрессия генов *MEK1*, *JUN*, *FOS* и *AKT3*, по сравнению с контролем ($p < 0.05$).

Далее был проведен анализ изменения экспрессии генов отобранной панели в контрольных и трансфицированных клетках линии U87, а также в культуре глиомы человека G01 при воздействии аптамерами U2 и Gol1.

Анализ оценки влияния аптамера U2 на экспрессию отобранной панели генов в клетках культуры U87 показал статистически значимое снижение экспрессии генов *HRAS*, *ARAF*, *CCND1* и *CDK4*; а экспрессия *AKT3* повышается (рис. 3 (в)). Аналогичная картина наблюдается при добавлении к клеткам данной культуры аптамера Gol1, снижается экспрессия *HRAS*, *CCND1*, *CDK4* и повышается экспрессия *AKT3* и *JUN* (рис. 3 (в)). На трансгенные клетки U87wt аптамеры U2 и Gol1 оказывают практически такой же эффект, что и на контрольной культуре, но в данной культуре оба аптамера значительно повышают экспрессию *FOS*, аптамер U2 не влияет на экспрессию *AKT3*, а Gol1 повышает экспрессию *SOS1* (рис. 3 (в)).

Подобный анализ изменения экспрессии генов отобранной панели был проведен на клетках первичной культуры глиобластомы человека G01, G01/EGFRwt и G01/EGFRvIII (рис. 3 Б). В культуре G01 оба аптамера повышают экспрессию *PI3K* и *AKT3*, участвующих в PI3K/Akt-сигнальном пути, ассоциированном с выживаемостью клеток. Помимо этого, и U2, и Gol1 повышают экспрессию *JUN*, *FOS*. Интересно, что аптамер U2 снижает экспрессию *CCND1* и *CDK4*, а, как уже говорилось выше, как правило, экспрессия *JUN* и *FOS* имеет прямую корре-

ляцию с геном *CCND1*. Аптамер Gol1 не влияет на экспрессию *CCND1*, но снижает экспрессию *CDK4*.

В клетках культуры G01/EGFRwt наблюдается менее выраженный эффект аптамера U2, по сравнению с аптамером Gol1 (рис. 3 (б)), повышается экспрессия генов *ARAF*, *FOS* и снижается экспрессия *CDK4*. Аптамер Gol1 значительно увеличивает экспрессию *PI3K* и *AKT3*, как и экспрессию генов *JUN* и *FOS*, при этом показывая аналогичный эффект и на *CCND1*. Помимо этого, Gol1 увеличивает экспрессию генов *SOS1* и *ERK*.

Оптимальная картина наблюдается при оценке влияния аптамеров U2 и Gol1 на экспрессию панели отобранных генов в клетках культуры G01/EGFRvIII (рис. 3 (б)). В случае аптамера U2 наблюдается повышение экспрессии *JUN* и *FOS*, а аптамер Gol1 снижает экспрессию генов *JUN*, *FOS* и *CCND1*, обуславливающих пролиферацию клеток. При этом впервые наблюдается снижение генов, ассоциированных с выживаемостью клеток, таких как *PI3K* и *AKT3*.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В то время как редкие клетки в ГБ экспрессируют совместно EGFR и EGFRvIII, большинство опухолевых клеток экспрессируют преимущественно EGFR или EGFRvIII. Эти наблюдения предполагают иерархическую модель, в которой EGFR и EGFRvIII потенциально передают сигналы в компартменте опухолевых стволовых клеток и сегрегируют отдельно в дочерние клетки в опухоли (Sugawa et al., 1990) (рис. 4 (а)).

В опухолевых клетках, где EGFR и EGFRvIII экспрессируются совместно, EGFRvIII способствует росту клеток, экспрессирующих EGFR дикого типа, через паракринный интерлейкин 6 (IL-6) и/или LIF-зависимый путь. Эти цитокины активируют EGFR через гликопротеин 130 (GP130) (Reuter, Mathews, 2010). После связывания лиганда с внеклеточным доменом EGFR активируются зависимые от этого связывания сигнальные пути, такие как митоген-активируемые протеинкиназы, фосфоинозитид-3-киназа/Akt, киназа Jak/преобразователь сигнала и активатор транскрипции, а также фосфолипаза C- γ /пути протеинкиназы C (Goto et al., 2023; Wilson et al., 2014). Эти пути приводят к активации транскрипции генов-мишеней, которые важны для клеточной пролиферации, выживания, ми-

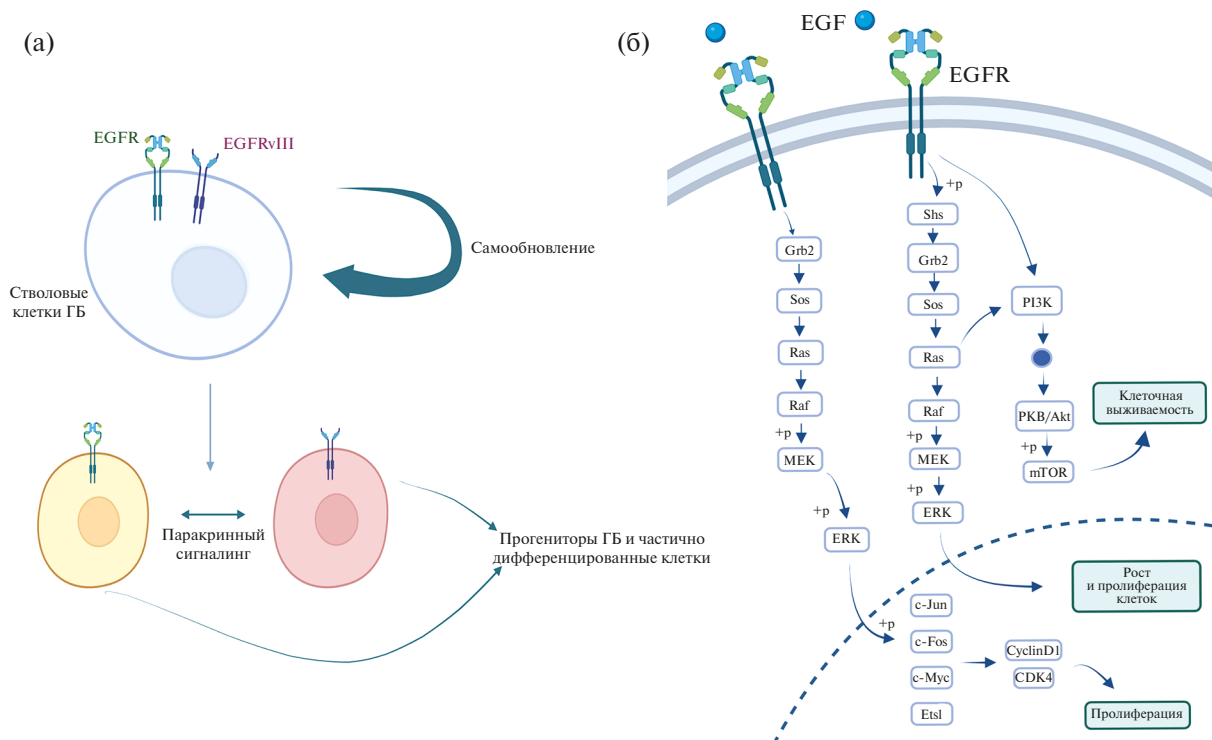


Рис. 4. (а) Иерархическая модель передачи сигналов EGFR и EGFRvIII. Клетки в опухолях глиобластомы человека, экспрессирующие EGFRvIII, могут передавать сигналы клеткам, экспрессирующим EGFR, и наоборот, паракрыным образом (Cvrljevic et al., 2011); (б) Сигнальные пути EGFR в клетках глиомы, взято и адаптировано из KEGG PATHWAY.

Fig. 4. (a) Hierarchical model of EGFR and EGFRvIII signal transmission. Cells in human glioblastoma tumors expressing EGFRvIII can transmit signals to cells expressing EGFR, and vice versa, in a paracrine manner (Cvrljevic et al., 2011); (b) EGFR signaling pathways in glioma cells, taken and adapted from KEGG PATHWAY.

грации, инвазии и свойств, инициирующих опухоли (Cooper et al., 2022). Во многих карциномах гиперэкспрессия EGFR и его мутация участвуют в поддержании пролиферативной передачи сигналов, что является важным признаком рака (Hanahan, 2022; Hanahan, Weinberg, 2011).

Воздействие на столь важную терапевтическую мишень в клетках глиомы, как EGFR, влечет за собой ряд трудностей и неразрешенных вопросов. Препараты моноклональных антител, которые чаще всего используются в медицине для ингибирования EGFR, показывают крайне низкую эффективность при глиоме. Несмотря на применение при лечении других опухолей, ни одно из них не одобрено для лечения глиобластомы ввиду многочисленных отрицательных клинических испытаний (Zok et al., 2018). Аптамеры же представляют особый интерес, в связи с тем, что, как мы уже подчеркивали ранее, обладают продолжительной стабильностью, высокой аффинностью и специфичностью, а также низкой иммуногенностью и токсичностью (Lao

et al., 2015; Zhu, Chen, 2018). В исследовании китайских ученых, опубликованном в 2018 г., продемонстрировано, что аптамер U2 может влиять на рост клеток U87/EGFRvIII и их радиочувствительность. Было обнаружено, что аптамер U2 способен ингибировать пролиферацию, миграцию, инвазию и передачу сигналов в клетках U87/EGFRvIII. Таким образом, результаты показали многообещающий потенциал аптамера U2 как нового кандидата в качестве лекарства и системы доставки лекарств для терапии глиобластомы (Mayer, Arteaga, 2016).

В своей работе мы, наряду с аптамером U2, предположительно специфичным к EGFR дикого типа и EGFRvIII, тестируем его укороченную модифицированную форму – аптамер Goll, который, в связи с сохранением активного центра связывания, сохраняет высокую специфичность связывания с рецептором EGFR.

В данном исследовании получены валидные модели трансгенных клеточных культур G01/

EGFRwt и G01/EGFRvIII на основе эксплантата ткани глиобластомы человека G01, полученной от пациента НМИЦ нейрохирургии им. академика Н. Н. Бурденко. Гиперэкспрессия EGFRwt и EGFRvIII, подтвержденная методом Вестерн-блот-гибридизации, позволила провести апта-иммуноцитохимический анализ.

Анализ результатов окрашивания антителами показал, что EGFR в исследуемых препаратах локализуется по всей цитоплазме клеток, в некоторых случаях по ядерной мембране (рис. 2 (б)). В исследовании Brand и соавт. говорится, что альтернативная локализация EGFR от клеточной мембраны до ядра клетки может являться одним из механизмов устойчивости к ингибиторам EGFR (Brand et al., 2013). Кроме того, внутри ядра EGFR действует как ко-транскрипционный фактор для нескольких генов, участвующих в клеточной пролиферации и ангиогенезе, и как тирозинкиназа – для активации и стабилизации ядерного антигена пролиферирующих клеток и ДНК-зависимой протеинкиназы. Локализованный в ядре EGFR тесно связан с прогрессированием заболевания, ухудшением общей выживаемости при многих видах злокачественных образований и повышенной устойчивостью к лучевой терапии, химиотерапии, в том числе таргетной терапии против EGFR гефитинибом и цетуксимабом (David et al., 2005). Апта-иммуноцитохимией была показана специфичность аптамеров U2 и Gol1 к EGFRwt и EGFRvIII одинаковой окраской клеток антителами и аптамерами. Требуемым внимания фактом является блокирование аптамером Gol1 дальнейшей окраски антителами против EGFRvIII, что особенно наглядно представлено на клетках глиобластомы человека G01 с гиперэкспрессией EGFRvIII (рис. 2 (б)). На основе этого можно предположить конкурентное связывание аптамера и антитела со специфическим эпитопом EGFRvIII. Таким образом, можно утверждать, что оба отобранных аптамера проявляют высокую специфичность к клеткам с экспрессией EGFRwt и EGFRvIII, но при этом аптамер Gol1 демонстрирует более высокую конкурентоспособность связывания с EGFRvIII, по сравнению с аптамером U2 и антителами к EGFRvIII.

Результаты проточной цитометрии демонстрируют, что выбранные аптамеры U2 и Gol1 эффективно окрашивают клетки U87, U87/EGFRwt, G01/EGFRwt и G01/EGFRvIII, но в разной степени. U2 продемонстрировал более

высокую специфичность, что позволяет предположить либо дополнительную мишень, либо дополнительный эпитоп сродства у дикой формы EGFR.

Широко известно, что ингибирование EGFR подавляет пролиферацию и инвазию опухолевых клеток при глиобластоме (Brand et al., 2013; Odajima et al., 2005; Peng et al., 2020; Ratushny et al., 2009). Было выдвинуто предположение, что связывание аптамеров U2 и Gol1 с рецепторами EGFRwt и EGFRvIII приведет к ингибированию активности рецептора, соответственно, будет наблюдаться уменьшение амплификации генов молекул его сигнальных путей, таких как PI3K/Akt, RAS/MAPK, MAPK/CREB, JAK2/STAT, через которые опосредованы рост, пролиферация и выживание клеток глиомы (рис. 4 (б)).

PI3K/Akt-путь, помимо опухолевого роста и ангиогенеза, участвует в клеточной выживаемости (Yu, Cui, 2016). Кроме того, стоит обратить внимание на c-Fos. Например, Linder и соавт. в своей работе (Linder et al., 2018) утверждают, что у пациентов с остеосаркомой с ко-экспрессией EGFR и c-Fos снижается общая выживаемость. Также доклинические исследования с использованием ксенотрансплантатов остеосаркомы человека показали, что только опухоли, экспрессирующие как EGFR, так и c-Fos, реагировали на терапию против EGFR, демонстрируя, что c-Fos можно рассматривать как новый биомаркер, предсказывающий ответ на лечение анти-EGFR у пациентов с остеосаркомой (Pawson, 2004). Следовательно, когда мы говорим о противоопухолевой терапии, помимо снижения экспрессии генов, опосредующих пролиферацию и рост клеток, ожидается снижение выживаемости клеток, то есть экспрессии генов PI3K/Akt-сигнального пути и повышение экспрессии гена c-Fos.

Белок JUN в сочетании с белком Fos образует фактор транскрипции раннего ответа AP-1, который контролирует ряд клеточных процессов, включая дифференцировку, пролиферацию и апоптоз (Karppelmann et al., 2014). AP-1, в свою очередь, регулирует транскрипцию циклина D1 (CCND1) (Shen et al., 2008).

По данным литературы, экспрессия генов CCND1 и CDK4 имеет положительную ассоциацию с уровнем злокачественности опухоли (Fiano et al., 2003; Zhang et al., 2005). В своей работе ученые из США утверждают, что гены

CCND1 и CDK4 участвуют как непосредственно в пролиферации опухолевых клеток, так и в регуляции активности неопухолевых клеток микроокружения, что опосредованно влияет на злокачественную прогрессию (Ciznadija et al., 2011). При этом в другой работе авторы связывают высокую экспрессию CCND1 с хорошим прогнозом рака молочной железы (Peurala et al., 2013).

В работе Zhou и соавт. говорится о том, что генотипное профилирование показывает, что регуляторы клеточного цикла изменены в большинстве EGFR-амплифицированных опухолей, а комбинация ингибиторов циклинзависимой киназы 4/6 (CDK4/6) и EGFR предотвращает появление резистентности *in vitro* и *in vivo* (Zhou et al., 2017). При этом почти во всех случаях был отмечен рост экспрессии генов молекул, отвечающих за способность клетки к выживанию (PI3K, Akt).

В нашей работе при оценке изменения экспрессии генов отобранной панели в клетках контрольной культуры U87 и трансфицированной культуры U87wt не было обнаружено статистически достоверных различий. Под воздействием аптамеров U2 и G01 в обеих вышеперечисленных культурах наблюдалось снижение экспрессии генов, участвующих в пролиферации и росте клеток (*HRAS*, *HRAF*, *CCND1*, *CDK4*). Как отмечалось выше, соотношение экспрессии генов *CCND1* и *CDK4* имеет положительную ассоциацию со степенью злокачественности опухоли. Помимо этого, в клетках культуры U87wt наблюдалось значительное повышение экспрессии гена *FOS*, ассоциированного с благоприятным ответом на EGFR-ассоциированную терапию. Но также было зафиксировано повышение экспрессии гена *AKT3*, ассоциированного с выживаемостью клеток под воздействием аптамера G01 в двух культурах, а аптамера U2 — в контрольных клетках культуры U87.

Следовательно, можно сделать вывод, что клетки культуры U87 являются не лучшей моделью для оценки воздействия на EGFRvIII, поскольку, во-первых, трансфицированные клетки U87vIII продемонстрировали низкую выживаемость, а во-вторых, не было обнаружено статистически значимых изменений в экспрессии основных генов сигнальных путей, опосредованных EGFR, между клетками культур U87 и U87wt, что позволяет предположить низкий вклад мутантной формы рецептора EGFRvIII. Известно, что U87 уже стала достаточно однородной за длительное время использования в ис-

следованиях, что сильно отдаляет эту линию от, собственно, глиобластомы. Возможно, это одна из причин отсутствия результата.

В предлагаемой нами экспериментальной модели первичной клеточной культуры глиобластомы человека G01 был получен ожидаемый эффект. Мы показали, что в трансгенной культуре G01wt снижается экспрессия генов *ARAF*, *CCND1* и *CDK4*, то есть наблюдается тенденция к снижению злокачественности опухоли. В трансгенной культуре G01vIII также наблюдается снижение экспрессии генов *ARAF* и *CDK4*, но при этом не изменяется экспрессия гена *CCND1*; помимо этого, происходит значительное увеличение экспрессии генов *JUN* и *FOS*, опосредующих пролиферацию клеток, и гена *AKT3*, опосредующего клеточную выживаемость.

Аптамер U2 в контрольных клетках G01 увеличивает экспрессию генов *PI3K*, *JUN*, *FOS* и снижает экспрессию генов *CCND1*, *CDK4*, что в совокупности говорит о том, что аптамер снижает злокачественность опухоли, но увеличивает пролиферативный потенциал клеток и их устойчивость. На клетках культуры G01wt данный аптамер не демонстрирует влияние на выживаемость клеток, но увеличивает экспрессию генов *HRAS* и *FOS*, то есть стимулирует пролиферацию клеток, также он снижает экспрессию гена *CDK4*, но не влияет на экспрессию гена *CCND1*, вследствие чего мы не можем говорить о том, что аптамер снижает злокачественность клеток данной культуры. На клетках же культуры G01vIII аптамер U2 демонстрирует небольшое увеличение экспрессии генов *JUN* и *FOS*, но на экспрессию гена *CCND1*, которую опосредуют упомянутые выше два гена, он не влияет, из чего можно сделать вывод, что аптамер U2 не оказывает ощутимого эффекта на клетки, богатые мутантной формой рецептора EGFRvIII.

Наибольший интерес представляют результаты влияния аптамера G01 на клетки культуры G01, G01wt и G01vIII. В клетках G01 и трансфицированных клетках G01wt при воздействии G01 наблюдается увеличение экспрессии генов, отвечающих за выживаемость клеток, то есть *PI3K* и *AKT3*. В клетках G01vIII воздействие G01 снижает экспрессию этих генов, следовательно, потенциально снижает выживаемость клеток, которые, как известно из данных литературы, наиболее тяжело поддаются терапии. То есть аптамер G01, возможно, не только стимулирует

ет снижение выживаемости плохо поддающихся терапии клеток, но и стимулирует выживаемость клеток, которые характеризуются активным ответом на EGFR-опосредованную терапию. Помимо этого, в клетках культуры G01vIII данный аптамер снижает экспрессию генов, опосредующих пролиферацию и рост клеток, а именно генов *JUN*, *FOS* и *CCND1*. Как правило, клеточные агенты, снижающие пролиферацию клеток, стимулируют их выживаемость, в связи с чем можно назвать аптамер G01 многообещающей молекулой в дальнейшей анти-EGFRvIII-противоопухолевой терапии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Глиобластома является одной из наиболее острых проблем современности. С каждым годом наблюдается положительная динамика роста заболеваемости среди населения, при этом методы диагностики и терапии остаются малоэффективными. Одним из наиболее перспективных направлений для решения данной проблемы являются исследования на основе аптамеров.

Поскольку гиперэкспрессия EGFR или его мутантной формы EGFRvIII опосредует сигнальные пути, приводящие к пролиферации и инвазии опухолевых клеток, а также к повышению их выживаемости, в своей работе мы сосредоточились на аптамерах U2 и G01, специфичных именно к данным молекулам-мишеням.

На основе клеточной модели глиобластомы человека с гиперэкспрессией EGFR и EGFRvIII мы продемонстрировали специфичность отобранных аптамеров к целевым молекулам. При использовании метода апта-иммуноцитохимии было показано, что аптамер U2 более специфичен к дикому типу EGFR, а G01, напротив, к его мутантной форме EGFRvIII. Помимо этого, при гиперэкспрессии EGFRvIII аптамер G01 оказывал подавляющий эффект на экспрессию генов, связанных с пролиферацией и выживаемостью клеток (*JUN*, *FOS*, *CCND1*, *PI3K* и *AKT3*), в то время как аптамер U2 не продемонстрировал значимый эффект на клетках *in vitro*. Результаты исследований позволяют нам предположить, что аптамер G01 обладает терапевтическим и диагностическим потенциалом против опухолевых клеток глиобластомы человека, гиперэкспрессирующих рецептор мутантного типа EGFRvIII.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075–15–2021–1343).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Капурин А.Д. Злокачественные новообразования в России в 2021 г. МНИОИ им. П.А. Герцена — филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России. 2022.
- Babic I., Anderson E. S., Tanaka K., Guo D., Masui K., Li B., Zhu S., Gu Y., Villa G. R., Akhavan D., Nathanson D., Gini B., Mareninov S., Li R., Camacho C. E., Kurdistan S. K., Eskin A., Nelson S. F., Yong W. H., Cavenee W. K., Cloughesy T. F., Christofk H. R., Black D. L., Mischel P. S. EGFR mutation-induced alternative splicing of max contributes to growth of glycolytic tumors in brain cancer. *Cell Metabolism*. 2013. 17 (6): 1000–1008. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.04.013>
- Brand T. M., Iida M., Luthar N., Starr M. M., Huppert E. J., Wheeler D. L. Nuclear EGFR as a molecular target in cancer. *Radiother. Oncol.* 2013. 108 (3): 370–377. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2013.06.010>
- Ciznadija D., Liu Y., Pyonteck S. M., Holland E. C., Koff A. Cyclin D1 and Cdk4 mediate development of neurologically destructive oligodendroglioma. *Cancer Res.* 2011. 71 (19): 6174–6183. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-1031>
- Cooper A. J., Sequist L. V., Lin J. J. Third-generation EGFR and ALK inhibitors: mechanisms of resistance and management. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2022. 19 (8): 499–514. <https://doi.org/10.1038/s41571-022-00639-9>
- Cvrljevic A. N., Akhavan D., Wu M., Martinello P., Furnari F. B., Johnston A. J., Guo D., Pike L., Cavenee W. K., Scott A. M., Mischel P. S., Hoogenraad N. J., Johns T. G. Activation of Src induces mitochondrial localisation of de 2–7EGFR (EGFRvIII) in glioma cells: implications for glucose metabolism. *Journal of Cell Science*. 2011. 124 (17): 2938–2950. <https://doi.org/10.1242/jcs.083295>
- David J.-P., Mehic D., Bakiri L., Schilling A. F., Mandic V., Priemel M., Idarraga M. H., Reschke M. O., Hoffmann O., Amling M., Wagner E. F. Essential role of RSK2 in c-Fos-dependent osteosarcoma development. *J Clin. Invest.* 2005. 115 (3): 664–672. <https://doi.org/10.1172/JCI22877>
- Feng H., Hu B., Jarzynka M. J., Li Y., Keezer S., Johns T. G., Tang, C. K., Hamilton, R. L., Vuori, K., Nishikawa, R., Sarkaria, J. N., Fenton, T., Cheng, T., Furnari, F. B., Cavenee, W. K., Cheng, S.-Y. Phosphorylation of dedicator of cytokinesis 1 (Dock180) at tyrosine residue Y722 by Src family kinases mediates EGFRvIII-driven glioblastomatumorigenesis. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 2012. 109 (8): 3018–3023. <https://doi.org/10.1073/pnas.1121457109>
- Fiano V., Ghimenti C., Schiffer D. Expression of cyclins, cyclin-dependent kinases and cyclin-dependent kinase inhibitors in oligodendrogliomas in humans. *Neurosci. Letters*. 2003. 347 (2): 111–115. <https://doi.org/10.1016/>

- S0304–3940(03)00615–3
- Goto N., Suzuki H., Tanaka T., Ishikawa K., Ouchida T., Kaneko M. K., Kato Y. EMab-300 detects mouse epidermal growth factor receptor-expressing cancer cell lines in flow cytometry. *Antibodies* (Basel, Switzerland). 2023. 12 (3): 42. <https://doi.org/10.3390/antib12030042>
- Hammer S., Tschischek B., Flamm C., Hofacker I. L., Findeiß S. RNA blueprint: flexible multiple target nucleic acid sequence design. *Bioinformatics*. 2017. 33 (18): 2850–2858. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx263>
- Hammer S., Wang W., Will S., Ponty Y. Fixed-parameter tractable sampling for RNA design with multiple target structures. *BMC Bioinformatics*. 2009. 20 (1): 209. <https://doi.org/10.1186/s12859-019-2784-7>
- Hanahan D. Hallmarks of cancer: new dimensions. *Cancer Discovery*. 2022. 12 (1): 31–46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>
- Hanahan D., Weinberg R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011. 144 (5): 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Horvath S., Zhang B., Carlson M., Lu K. V., Zhu S., Felciano R. M., Laurance M. F., Zhao W., Qi S., Chen Z., Lee Y., Scheek A. C., Liao L. M., Wu H., Geschwind D. H., Febbo P. G., Kornblum H. I., Cloughesy T. F., Nelson S. F., Mischel P. S. Analysis of oncogenic signaling networks in glioblastoma identifies ASPM as a molecular target. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006. 103(46): 17402–17407. <https://doi.org/10.1073/pnas.0608396103>
- Kappelmann M., Bosserhoff A., Kuphal S. AP-1/c-Jun transcription factors: Regulation and function in malignant melanoma. *Eur. J. Cell Biol.* 2014. 93 (1–2): 76–81. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2013.10.003>
- Kopylov A. M., Fab L. V., Antipova O., Savchenko E. A., Revishchin A. V., Parshina V. V., Pavlova S. V., Kireev I. I., Golovin A. V., Usachev D. Y., Pavlova G. V. RNA aptamers for theranostics of glioblastoma of human brain. *Biochemistry* (Moscow). 2021. 86(8): 1012–1024. <https://doi.org/10.1134/S0006297921080113>
- Lao Y.-H., Phua K. K. L., Leong K. W. Aptamer nanomedicine for cancer therapeutics: barriers and potential for translation. *ACS Nano*. 2015. 9 (3): 2235–2254. <https://doi.org/10.1021/nn507494p>
- Linder M., Glitzner E., Srivatsa S., Bakiri L., Matsuoka K., Shahrouzi P., Dumanic M., Novoszel P., Mohr T., Langer O., Wanek T., Mitterhauser M., Wagner E. F., Sibilila M. EGFR is required for FOS-dependent bone tumor development via RSK2/CREB signaling. *EMBO Mol. Med.* 2018. 10: e9408. (11). <https://doi.org/10.15252/emmm.201809408>
- Mayer I. A., Arteaga C. L. The PI3K/AKT pathway as a target for cancer treatment. *Ann. Rev. Med.* 2016. 67 (1): 11–28. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-062913-051343>
- Odajima T., Sasaki Y., Tanaka N., Kato-Mori Y., Asanuma H., Ikeda T., Satoh M., Hiratsuka H., Tokino T., Sawada N. Abnormal β -catenin expression in oral cancer with no gene mutation: correlation with expression of cyclin D1 and epidermal growth factor receptor, Ki-67 labeling index, and clinicopathological features. *Hum. Pathol.* 2005. 36 (3): 234–241. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2004.12.009>
- Oprița A., Baloiș C., Staicu G.-A., Alexandru O., Tache D. E., Danoiu S., Micu E. S., Sevastre A. -S. Updated insights on EGFR signaling pathways in glioma. *Int. J. Mol. Sci.* 2021. 22 (2): 587. <https://doi.org/10.3390/ijms22020587>
- Pavlova G., Kolesnikova V., Samoylenkova N., Drozd S., Revishchin A., Usachev D., Kopylov A. Novel weapon to conquer human glioblastoma: G-quadruplexes and neuro-inducers. 2021.
- Pawson T. Specificity in signal transduction. *Cell*. 2004. 116(2): 191–203. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)01077-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)01077-8)
- Peng L., Liang Y., Zhong X., Liang Z., Tian Y., Li S., Liang J., Wang R., Zhong Y., Shi Y., Zhang X. Aptamer-conjugated gold nanoparticles targeting epidermal growth factor receptor variant III for the treatment of glioblastoma. *Int. J. Nanomed.* 2020. 15: 1363–1372. <https://doi.org/10.2147/IJN.S238206>
- Peurala E., Koivunen P., Haapasaaari K.-M., Bloigu R., Jukkola-Vuorinen A. The prognostic significance and value of cyclin D1, CDK4 and p16 in human breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2013. 15 (1): R5. <https://doi.org/10.1186/bcr3376>
- Ratushny V., Astsaturov I., Burtneess, B. A., Golemis, E. A., & Silverman, J. S. Targeting EGFR resistance networks in head and neck cancer. *Cell. Signal.* 2009. 21 (8): 1255–1268. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2009.02.021>
- Reuter J. S., Mathews D. H. RNA structure: software for RNA secondary structure prediction and analysis. *BMC Bioinformatics*. 2010. 11 (1): 129. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-129>
- Shen Q., Uray I. P., Li Y., Krisko T. I., Strecker T. E., Kim H.-T., Brown P. H. The AP-1 transcription factor regulates breast cancer cell growth via cyclins and E2F factors. *Oncogene*. 2008. 27 (3): 366–377. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210643>
- Sugawa N., Ekstrand A. J., James C. D., Collins V. P. Identical splicing of aberrant epidermal growth factor receptor transcripts from amplified rearranged genes in human glioblastomas. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1990. 87 (21): 8602–8606. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.21.8602>
- Wan Y., Kim Y., Li N., Cho S. K., Bachoo R., Ellington A. D., Iqbal S. M. Surface-immobilized aptamers for cancer cell isolation and microscopic cytology. *Cancer Res.* 2010. 70 (22): 9371–9380. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-0568>
- Ward A. F., Braun B. S., Shannon K. M. Targeting oncogenic Ras signaling in hematologic malignancies. *Blood*. 2012. 120 (17): 3397–3406. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-05-378596>
- Wilson T., Karajannis M., Harter D. Glioblastoma multiforme: State of the art and future therapeutics. *Surg. Neurol. Int.* 2014. 5 (1): 64. <https://doi.org/10.4103/2152-7806.132138>
- Wu X., Liang H., Tan Y., Yuan C., Li S., Li X., Li G., Shi Y., Zhang X. Cell-SELEX aptamer for highly specific radionuclide molecular imaging of glioblastoma in vivo. *PLoS ONE*. 2014. 9 (3): e90752. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090752>
- Xia W., Wei Y., Du Y., Liu J., Chang B., Yu Y.-L., Huo L.-F., Miller S., Hung M.-C. Nuclear expression of epidermal

- growth factor receptor is a novel prognostic value in patients with ovarian cancer. *Mol. Carcinogen.* 2009. 48 (7): 610–617. <https://doi.org/10.1002/mc.20504>
- Yu J. S. L., Cui W. Proliferation, survival and metabolism: the role of PI3K/AKT/mTOR signalling in pluripotency and cell fate determination. *Development.* 2016. 143 (17): 3050–3060. <https://doi.org/10.1242/dev.137075>
- Zhang X., Zhao M., Huang A., Fei Z., Zhang W., Wang X. The effect of cyclin D expression on cell proliferation in human gliomas. *J. Clin. Neurosci.* 2005. 12 (2), 166–168. <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2004.03.036>
- Zhou J., Wu Z., Wong G., Pectasides E., Nagaraja A., Stachler M., Zhang H., Chen T., Zhang H., Liu J. Bin, Xu X., Sicinska E., Sanchez-Vega F., Rustgi A. K., Diehl J. A., Wong K.-K., Bass A. J. CDK4/6 or MAPK blockade enhances efficacy of EGFR inhibition in oesophageal squamous cell carcinoma. *Nat. Commun.* 2017. 8 (1): 13897. <https://doi.org/10.1038/ncomms13897>
- Zhu G., Chen X. Aptamer-based targeted therapy. *Adv. Drug Del. Rev.* 2018. 134: 65–78. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.08.005>
- Zok T., Antczak M., Zurkowski M., Popena M., Blazewicz J., Adamiak R. W., Szachniuk M. RNAdbee 2.0: multi-functional tool for RNA structure annotation. *Nucl. Acids Res.* 2018. 46 (W1): W30–W35. <https://doi.org/10.1093/nar/gky314>

SPECIFICITY OF U2 AND GOL1 APTAMERS TO EGFR-POSITIVE HUMAN GLIOBLASTOMA CELLS *IN VITRO*

F. M. Dzarieva^{a, #}, D. V. Shamadykova^a, O. V. Sluchanko^b, S. A. Pavlova^a, L. V. Fab^a, A. V. Ryabova^c, D. Yu. Panteleev^a, A. M. Kopylov^d, D. Yu. Usachev^e, A. V. Golovin^{d, f}, G. V. Pavlova^{a, e, f, ##}

^a*Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology of the Russian Academy of Sciences (IHNA), Moscow, Russia*

^b*Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia*

^c*Prokhorov General Physics Institute, Moscow, Russia*

^d*M.V. Lomonosov Moscow State University (MSU), Moscow, Russia*

^e*N.N. Burdenko National Medical Research Center of Neurosurgery, Ministry of Healthcare of Russia, Moscow, Russia*

^f*I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (MSMU), Moscow, Russia*

[#]*e-mail: dz.fatima@mail.ru,*

^{##}*e-mail: lkorchkin@mail.ru*

Overexpression of the epidermal growth factor receptor (EGFR) or its mutations mediate signaling pathways leading to proliferation, invasion of tumor cells, as well as to an increase in their survival. Despite the success of the clinical use of antibodies against EGFR in patients with colorectal cancer and squamous cell carcinoma of the head and neck, their low effectiveness in glioblastoma has been shown. Therefore, for the treatment of gliomas, a specific EGFR drug is needed, capable of penetrating into the tumor focus in the brain, and having low immunogenicity.

In this work, aptamers – single-stranded DNA oligonucleotides specific to EGFR, U2 and Gol1 are presented as such a preparation. In this study, we obtained a cellular model of human glioma with EGFR and EGFRvIII overexpression, which showed the specificity of U2 and Gol1 aptamers to these receptors using classical methods, as well as the method of aptaimmunocytochemistry. A study of the effect of binding of the Gol1 aptamer to the EGFRvIII receptor on the next steps of the signaling pathway showed a change in the expression levels of genes associated with cell proliferation and survival (*JUN*, *FOS*, *CCND1*, *PI3K* and *AKT3*), while the U2 aptamer did not demonstrate a significant effect on cells *in vitro*.

These results showed that the Gol1 aptamer has therapeutic potential against human glioblastoma tumor cells overexpressing the EGFRvIII mutant type receptor.

Keywords: EGFR, EGFRvIII, glioblastoma, aptamer, glioma cell model, aptaimmunocytochemistry

УДК 612.822.1

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АНТИ-EGFR АПТАМЕРНОЙ КОНСТРУКЦИИ GR20hh ДЛЯ РЕГУЛИРУЕМОЙ ДОСТАВКИ ДОКСОРУБИЦИНА В КЛЕТКИ ГЛИОБЛАСТОМЫ ПАЦИЕНТА

© 2024 г. Б. М. Иванов^{1, *}, О. М. Антипова¹, Я. А. Слиман^{2, 3}, Н. С. Самойленкова²,
И. Н. Пронин², Г. В. Павлова^{2, 4, 5}, А. М. Копылов¹

¹Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, химический факультет, Москва, Россия

²ФГАУ "Национальный медицинский исследовательский центр нейрохирургии им. академика Н. Н. Бурденко"

Минздрава России, Москва, Россия

³Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Долгопрудный, Россия

"ФБГУН" Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН", Москва, Россия

⁵ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова» Минздрава России,
Москва, Россия

*e-mail: ivanovb661@yandex.ru

Поступила в редакцию 05.10.2023 г.

После доработки 31.10.2023 г.

Принята к публикации 01.12.2023 г.

В данной статье представлено исследование возможности регулируемой доставки доксорубина (ДОКС) в клетки глиобластомы (ГБ) в составе нековалентной конструкции с ДНК-аптамером, специфичным к EGFR, путем интеркаляции в искусственно созданный дуплекс. Конструкция представляла собой ранее описанный ДНК-аптамер GR20 (46 нуклеотидов), удлинённый на 18 нуклеотидов с 3'-конца (GR20h), который гибридизовали с комплементарным ДНК-олигонуклеотидом (h). Сборка дуплекса происходит эффективно, полученная конструкция GR20hh стабильна при 37 °С, T_{пл} = 59 °С. В конструкцию интеркалирован ДОКС. С помощью метода xCelligence, с оригинальной обработкой данных, обнаружено, что при добавлении в культуру клеток ДОКС, в составе нековалентной конструкции GR20hh-ДОКС, сохраняет цитотоксические свойства, однако кинетика действия комплекса на клетки ГБ оказалась принципиально отличной от действия чистого ДОКСа. Уникальный подход и полученные с его помощью данные открывают возможности для регулирования цитотоксической активности ДОКС и разработки методов направленного действия на клетки-мишени ГБ.

Ключевые слова: доксорубин, глиоблостома, аптамер, таргетная доставка

DOI: 10.31857/S0044467724010107

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ДОКС	— доксорубин
ГБ	— глиоблостома
Ат	— антитела
ВЭЖХ	— высокоэффективная жидкостная хроматография
EGFR	— рецептор эпидермального фактора роста (англ. epidermal growth factor receptor)

ВВЕДЕНИЕ

Стандартная терапия глиобластомы (ГБ) состоит в хирургическом вмешательстве, облучении и химиотерапии, однако эффективность последней часто ограничена в связи с низкой селективностью и высокой токсичностью применяемых противоопухолевых препаратов. Регулируемая и таргетная доставка цитотоксического агента к клеткам опухоли позволяет снизить негативное воздействие на клетки

нормы, тем самым снижая нежелательные побочные эффекты. Доксорубин (ДОКС) — известный представитель антрациклиновых противоопухолевых терапевтических препаратов, который применяется в медицине (Martins-Teixeira et al., 2020). Противоопухолевая активность антрациклиновых препаратов основана на их способности эффективно ингибировать синтез нуклеиновых кислот в клетке, что обусловлено рядом механизмов, в том числе интеркаляцией в двуцепочечную ДНК клетки и по-

следующим блокированием топоизомеразы II (Minotti et al., 2004). Действие ДОКСа не специфично, поэтому его токсичность для нормальных клеток высока (Pugazhendhi et al., 2018). Возможным решением этой проблемы является регуляция активности ДОКСа и нацеливание его на клетки глиобластомы (ГБ) с помощью таргетирующего агента.

В качестве нацеливающего агента традиционно используют антитела (Ат). Одним из способов селективной доставки ДОКСа является создание ковалентных конъюгатов противоопухолевого препарата с векторными молекулами (ADC, antibody-drug conjugate), такими как Ат и пептиды (Ai et al., 2018; Akhtar et al., 2022). Однако при конъюгации ДОКСа происходит химическая модификация, что снижает его противоопухолевую активность.

Способность ДОКСа интеркалировать в двойную спираль ДНК позволяет осуществить доставку ДОКСа в клетки с использованием нековалентного комплекса ДОКСа и двуцепочечным фрагментом ДНК. Успешное применение комплекса ДОКСа с двуцепочечной ДНК, конъюгированной с Ат, для направленной доставки ДОКСа было описано (Liu et al., 2019).

В настоящей работе в качестве потенциально таргетирующего агента использовали ДНК-аптамер к рецептору эпидермального фактора роста (EGFR) – GR20 (Zavyalova et al., 2020). EGFR является значимым молекулярным маркером ГБ и, соответственно, может быть использован в качестве мишени для направленной доставки ДОКСа к клеткам ГБ (Horbinski et al., 2021). Конструкцию GR20hh получали путем гибридизации олигодезоксирибонуклеотида h с комплементарным ему 3'-концевым одноцепочечным участком аптамера GR20h и затем использовали ее для связывания ДОКСа путем интеркаляции в полученный двуцепочечный участок.

Целью настоящей работы было исследование возможности использования конструкции на базе аптамера GR20 для доставки токсического агента – ДОКСа, в клетки ГБ. Было необходимо получить ответы на следующие вопросы: как собрать нековалентную конструкцию аптамера с дополнительным двутяжевым участком ДНК; насколько конструкция стабильна в клеточных тестах; сохраняется ли активность аптамера GR20 в конструкции GR20hh; насколько эффективна интеркаляция ДОКСа в двуцепочечный участок

конструкции; действует ли комплекс GR20hh-ДОКС на клетки ГБ и отличается ли кинетика действия от кинетики для самого ДОКСа?

МЕТОДИКА

Олигонуклеотиды и реактивы. Нуклеотидные последовательности ДНК-аптамера GR20, ДНК-аптамера GR20h с 3'-концевым одноцепочечным дополнительным участком и комплементарного олигонуклеотида h приведены в табл. 1.

Таблица 1. Используемые в работе олигонуклеотиды
Table 1. Oligonucleotides used in the research

Шифр	Длина, нт	Нуклеотидная последовательность, 5' – 3'
ah	18	TTGTGTTGGTCCTAAATG
h	18	CATTTAGGACCAACACAA
GR20	46	ACGCACCATTGTTTAAATATGTTTT TTAATTCCTTGTGGTGTGT
GR20h	64	ACGCACCATTGTTTAAATATGTTTT TTAATTCCTTGTGGTGTGTGCATT TAGGACCAACACAA

Получение комплекса аптамера GR20hh или дуплекса ahh. Удлиненный аптамер GR20h и комплементарный олигонуклеотид h смешивали в одинаковой концентрации в буфере Tris-HCl pH = 7.4 с добавлением 50 mM NaCl, 10 mM KCl, 5 mM MgCl₂ и преформировали: раствор нагревали течение 5 мин при температуре 95 °C, после чего медленно охлаждали до комнатной температуры. Аналогично дуплекс ahh получали смешением двух олигонуклеотидов: ah и комплементарного ему h.

УФ-спектроскопия. Спектрофотометрические кривые плавления образцов олигонуклеотидов регистрировали в кювете с длиной оптического пути 10 мм с помощью УФ-спектрофотометра Hitachi U-2900 (Hitachi, Япония), оснащенной термоэлектрическим контроллером SPR-10. Данные собирали в интервале температур от 20 до 90 °C при длине волны 260 нм. Скорость нагрева составляла 0.5 °C/мин.

Эксклюзионная ВЭЖХ. Эксклюзионную ВЭЖХ проводили на ВЭЖХ-системе Agilent 1200 (Agilent, Santa Clara, CA, USA) при температуре 25 °C и скорости потока 0.5 мл/мин, на хроматографической колонке TSKgel G2000SWXL длиной 30 см, диаметр частиц 5 мкм, средний диаметр пор 12.5 нм (Tosoh Bioscience, South San Francisco, CA, USA). Подвижная фаза состояла из калийно-фосфатного буфера (60 mM KH₂PO₄

и 140 мМ K_2HPO_4 , рН 6.85) и ацетонитрила в соотношении 9:1 об/об. Детектировали поглощение при 260 нм. Калибровку колонки и эксперименты проводили, как описано ранее (Zavyalova et al., 2019), (Alieva et al., 2019).

Интерферометрия биослоев. Концентрация комплекса аптамера biotin-GR20hh в буфере Tris-HCl составляла 2 мкМ. Рекомбинантный внеклеточный домен человеческого EGFR компании Cloud-Clone Corp. (США) растворяли в охлажденном фосфатном буферном растворе, концентрация стокового раствора составляла 0.1 мг/мл. Образцы белка готовили путем последовательного разбавления стокового раствора в фосфатном буферном растворе до концентраций: 12 нМ, 2.5 нМ, 0.5 нМ, 0.1 нМ. Для регенерации сенсоров использовался 1 М раствор этаноламина гидрохлорида рН 8.5, и на стадии отмывки использовали фосфатный буферный раствор. Для проведения измерений использовали биосенсоры с иммобилизованным стрептавидином, SA (ForteBio, США). Иммобилизацию осуществляли за счет использования меченого биотином по 5'-концу олигонуклеотида h. Экспериментальное исследование выполнялось на приборе Sartorius Octet R2 (Германия). Обработку сенсограмм проводили с помощью программы Origin 2021 (OriginLab, США) в соответствии с моделью связывания Ленгмюра 1:1.

Флуориметрическое титрование. Спектрофлуориметрическое титрование проводили на приборе Varian Cary BIO 50 UV/VIS/NIR (Agilent Technologies Inc., США). Спектры поглощения измерялись в кварцевых кюветках с длиной оптического пути 1 см. Длина волны возбуждения λ_{ex} — 480 нм; диапазон длин волн испускания λ_{em} 520–750 нм с шагом в 1 нм.

В буферный раствор Tris-HCl, содержащий фиксированную концентрацию ДОКСа ($C_{ДОКС} = 1$ мкМ), последовательно добавляли по 1–5 мкл стокового раствора исследуемого олигонуклеотида или комплекса олигонуклеотида, раствор перемешивали и выдерживали в течение минуты для установления равновесия, а затем регистрировали спектр флуоресценции. Измерения повторяли 3 раза. Перед экспериментом регистрировали базовую линию флуоресценции буферного раствора. Базовая линия автоматически вычиталась программным обеспечением прибора. Измеренные спектры флуоресценции усредняли, расчеты вели по усредненным данным.

Получение комплекса GR20hh+ДОКС. К охлажденному раствору комплекса GR20hh добавляли эквимольное количество ДОКСа, тщательно перемешивали, выдерживали не менее 30 мин при комнатной температуре, после чего полученный раствор использовали для тестирования жизнеспособности клеток.

Культивация клеток. Клетки культуры Sus/fp2, выделенные из опухолевой ткани глиобластомы пациента, для проведения исследования любезно предоставлены лабораторией молекулярно-клеточной нейрогенетики ФГАУ «НИИ нейрохирургии им. Н.Н. Бурденко» Минздрава России. Клетки, используемые в эксперименте, культивировали в ростовой среде DMEM/F12 с пируватом натрия с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 1% раствора NEPES для поддержания рН, 1% GlutaMAX и 1% антибиотика стрептомицина в среде 5% CO_2 при 37°C.

Исследование выживаемости клеток. Исследование жизнеспособности проводили с помощью клеточного анализатора xCelligence S16 (Agilent Technologies, США). Исходный уровень сопротивления измеряли, поместив в прибор планшет с заполненными средой лунками. Клетки Sus/fp2 рассеивали на лунки по 7000 в объеме 200 мкл. Далее планшет помещали в анализатор и регистрировали сопротивление лунок планшета. Через 24 ч регистрацию останавливали, к клеткам добавляли исследуемые вещества: ДОКС в концентрациях 1 мкМ и 0.05 мкМ, комплекс ДОКСа с аптамером GR20hh—ДОКС в концентрации 1 мкМ (соотношение аптамер:ДОКС в комплексе — 1:1), в контрольные лунки вносили аналогичный объем фосфатно-солевого буфера, после чего возвращали планшет в прибор, и в режиме реального времени регистрировали сопротивление в лунках еще в течение 100 ч. Полученные данные обрабатывали с помощью ПО Origin 2021 (OriginLab, США). Полученные кривые выживаемости сглаживали, затем дифференцировали по времени для получения графиков изменения скорости роста/гибели клеток.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Спектрофотометрический анализ плавления олигонуклеотидов при 260 нм использовали для верификации образования дуплексов ДНК. На кривых плавления дуплекса в 18 пар нуклеотидов ahh наблюдается перегиб (рис. 1 (а)), соответствующий плавлению дуплекса. Обнаружить образование двуцепочечных участков в структу-

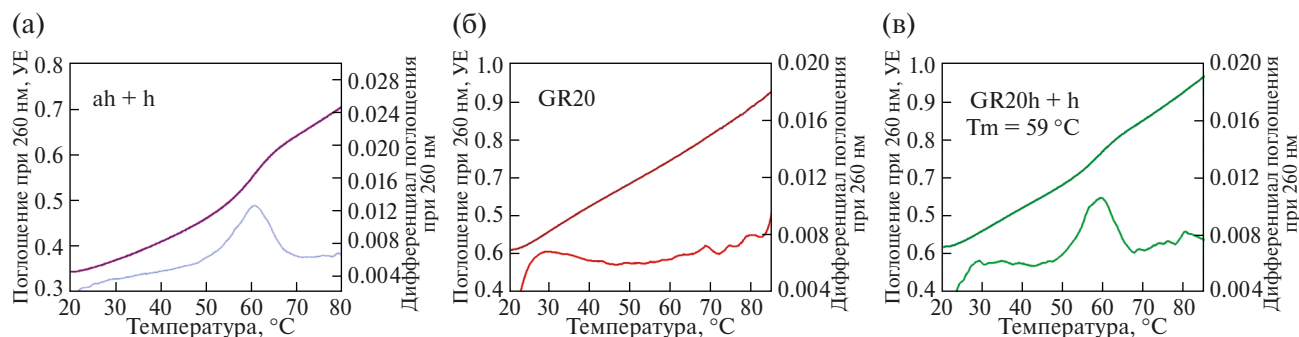


Рис. 1. Спектрофотометрическое плавление двуцепочечного дуплекса ahh (а), аптамера GR20 (б) и конструкции удлиненного аптамера GR20h с комплементарным олигонуклеотидом h (в). На каждом графике приведены собственно кривые плавления при 260 нм и их дифференциальный вид (снизу).

Fig. 1. Spectrophotometric melting of the double-stranded duplex ahh (a), the GR20 aptamer (б), and the construct of the extended GR20h aptamer hybridized with complementary oligonucleotide h (в). Each graph shows the melting curves at 260 nm and their differential appearance (bottom).

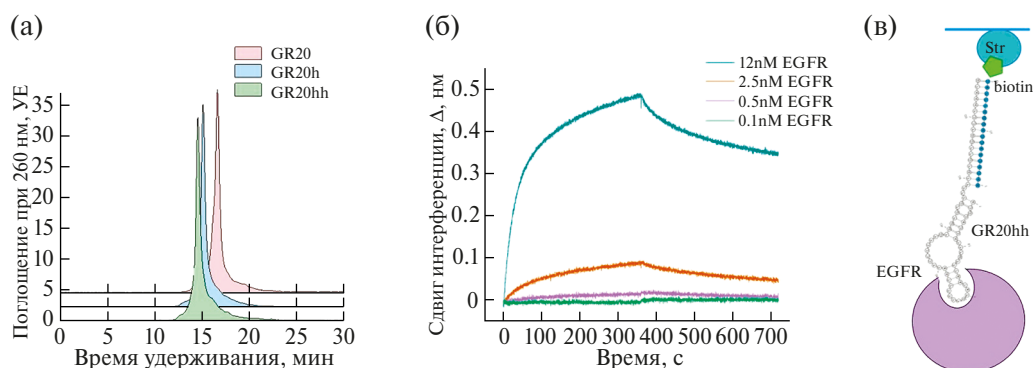


Рис. 2. Хроматограммы разделения аптамера GR20 (красная), его удлиненного варианта GR20h (голубая) и нековалентной конструкции GR20hh (зеленая) (а). Сенсограммы связывания иммобилизованной конструкции GR20hh с рекомбинантным внеклеточным доменом белка EGFR (б). Схема образования ДНК-белкового комплекса, иллюстрирующего предыдущий пункт (в).

Fig. 2. Chromatogram of the GR20 aptamer (red line), its extended variant GR20h (blue line), and the construction of the extended GR20h aptamer hybridized with its complementary oligonucleotide h (green line) (а) – Sensograms of binding of the construction GR20hh with the recombinant EGFR protein (б). Scheme of interaction of immobilized aptamer construction GR20hh with protein EGFR (в).

ре исходного аптамера GR20 с помощью плавления затруднительно (рис. 1 (б)). Кривая плавления нековалентной конструкции GR20hh соответствовала суперпозиции кривых плавления отдельных элементов – аптамера GR20 и дуплексного модуля (рис. 1 (в)) с $T_{пл} = 59^\circ\text{C}$.

Прямое доказательство образования конструкции GR20hh получали с помощью оригинального варианта метода эксклюзионной ВЭЖХ (Zavyalova et al., 2019; Alieva et al., 2019). При проведении ВЭЖХ для конструкции GR20hh на хроматограмме наблюдается единственный пик, смещенный в область более низких времен удерживания относительно пика исходного аптамера GR20 и удлиненного варианта аптамера GR20h (рис. 2(а)).

Кинетику взаимодействия иммобилизованного GR20h с рекомбинантным внеклеточным доменом рецептора EGFR изучали методом интерферометрии биослоев. Комплементарный олигонуклеотид h с биотиновой меткой на 5'-конце иммобилизовали на поверхность стрептавидинового сенсора и добавляли GR20h, чтобы собрать конструкцию GR20hh (рис. 2 (б, в)).

За включением ДОКСа в двуцепочечный участок конструкции GR20hh наблюдали при тушении флуоресценции ДОКСа. Спектры флуоресценции, полученные в ходе титрования ДОКСа исходным аптамером GR20 и конструкцией GR20hh, приведены на рис. 3 (а, б). ДОКС обладает максимумом эмиссии флуоресценции при длине волны 590 нм, при добавлении аптамера

или конструкции наблюдалось снижение интенсивности максимума флуоресценции.

Значения максимумов флуоресценции при 590 нм пересчитывали в относительные значения связанного ДОКСа, принимая значение максимума флуоресценции для чистого ДОКСа за единицу, наносили на график зависимости относительной интенсивности флуоресценции от соотношения концентрации аптамера и ДОКСа в растворе (рис. 3 (в)). Согласно графикам, уже при соотношении 0.5:1 GR20hh по отношению к ДОКСу значение падения флуоресценции выходит на плато.

Для 1 мкМ концентрации исходного аптамера GR20 и ДОКСа около 75% ДОКСа интерка-

лировано, в то время как конструкция GR20hh связывает в комплекс 95% ДОКСа. Именно эту концентрацию использовали для тестирования регулируемой доставки ДОКСа в клетки ГБ.

Изучение эффективности доставки ДОКСа в составе конструкции GR20hh в клетки ГБ проводили с использованием уникального современного метода xCelligence — определения жизнеспособности клеток по изменению проводимости подложки адгезивных клеток. Так как метод измерения клеточного индекса xCelligence еще достаточно новый, то универсальный подход, позволяющий интерпретировать получаемые данные в полном объеме, еще не разработан. Программное обеспечение прибора, предоставленное производителем, позволяет рассчитывать

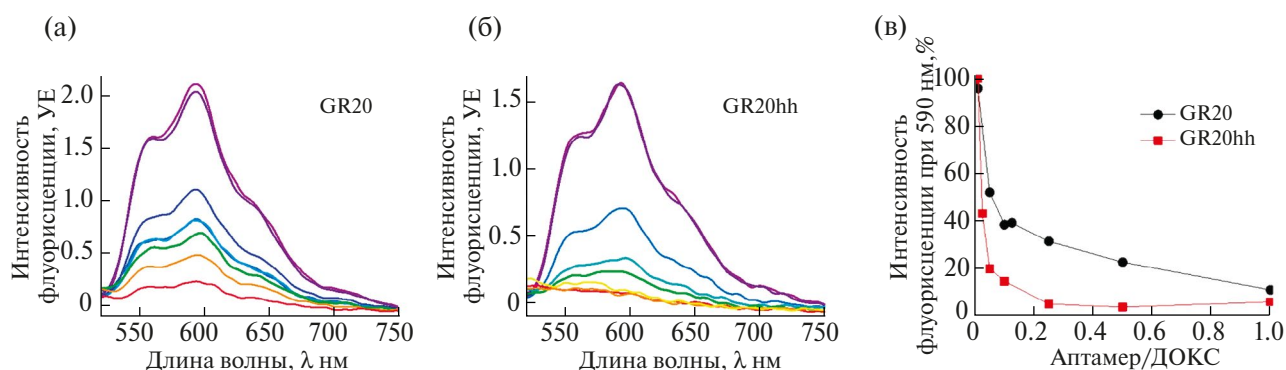


Рис. 3. Спектры эмиссии флуоресценции раствора ДОКСа ($C_{\text{ДОКС}} = 1 \text{ мкМ}$) при добавлении GR20 (а) и конструкции GR20hh (б). Зависимость интенсивности максимума флуоресценции ДОКСа от соотношения концентраций олигонуклеотида и ДОКСа (в).

Fig. 3. Fluorescence emission spectra of DOX ($C_{\text{DOX}} = 1 \text{ μМ}$) solution upon addition of the GR20 (а) and GR20hh construction (б). Dependence of the intensity of the DOX fluorescence maximum on the ratio of the concentrations of the oligonucleotide and DOX (в).

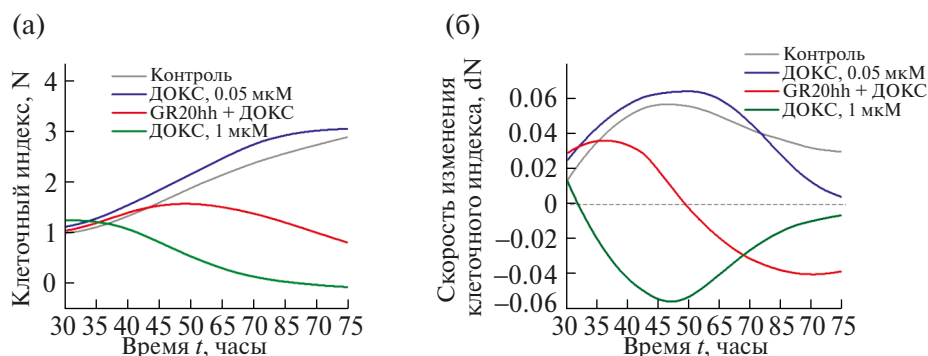


Рис. 4. Изменение клеточного индекса для клеток перевиваемой клеточной культуры ГБ Sus/fp2 при воздействии ДОКСа в концентрациях 0.05 мкМ и 1 мкМ (голубая и синяя линии) и ДОКСа, интеркалированного в конструкцию GR20hh (оранжевая линия); интактные клетки Sus/fp2 без обработки (серая линия). Данные в стандартном представлении (а), данные в виде оригинальных дифференциальных кривых, отражающих скорость роста/гибели клеток (б).

Fig. 4. Cellular index alteration for cells of the continuous GB cell culture Sus/fp2 when cells were exposed to DOX at concentrations of 0.05 μM and 1 μM (blue and blue lines) and DOX intercalated into the GR20hh complex (orange line); intact Sus/fp2 cells without exposure (gray line). Data in classical representation (а) and the same data in differentiated form, representing the rate of cell growth/death (б).

временной показатель удвоения популяции клеток и отражает итог воздействия в целом только для конкретного рассматриваемого промежутка времени.

Предлагаемый нами новый подход анализа дифференциальных кривых клеточного индекса позволяет перейти к рассмотрению процесса цитотоксического воздействия в динамике. Дифференцирование кривых клеточного индекса позволяет получить новые параметры для описания пролиферативных процессов — скорости роста или гибели клеток (рис. 4).

Внесение образцов препаратов в клеточный адгезионный слой в приборе изменяет адгезию клеток, поэтому обсчет данных проводили начиная с 30 ч ведения эксперимента, после того как состояние клеток стабилизировалось. Кривые выживаемости клеток, полученные для ДОКСа в контрольной концентрации 0.05 мкМ (остаточная концентрация ДОКСа, не связанного с конструкцией), существенно не отличаются от кривых, полученных для буферного раствора. В обоих случаях значения производной клеточного индекса оставались положительными, что говорит об отсутствии токсичности. Добавление к клеткам ДОКСа в рабочей концентрации 1 мкМ приводит к полной гибели клеток в течение двух суток после его добавления, при этом значение производной клеточного индекса падало ниже нуля уже через 8 ч после добавления ДОКСа (на 32-й ч эксперимента) и на протяжении всего эксперимента оставалось отрицательным, что говорит о гибели клеток. Минимум значения производной клеточного индекса наблюдался через 23 ч после добавления ДОКСа. Затем скорость гибели клеток постепенно снижалась. Добавление ДОКСа, интеркалирован-

ного в конструкцию GR20hh, также приводит к гибели клеток, однако производная клеточного индекса опускается ниже нуля только через 25 ч (против 8 ч) после добавления интеркалированного ДОКСа, а минимум значения производной был достигнут только через 46 ч после добавления (против 23 ч). Это говорит об отложенном действии ДОКСа, интеркалированного в конструкцию.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Образование нековалентной конструкции, состоящей из удлиненной версии аптамера GR20h и его комплемента h, анализировали с помощью оригинального метода эксклюзионной ВЭЖХ, образование дуплекса происходит с количественным выходом. Тпл конструкции GR20hh составляла 59 °С, что значительно превосходит температурные диапазоны его применения в биомедицинских исследованиях.

С помощью метода интерферометрии биослоев было показано, что конструкция GR20hh способна связываться с мишенью исходного аптамера GR20 — с рецептором EGFR без потери аффинности в наномолярном диапазоне.

Эффективность интеркаляции ДОКСа в дуплетный участок конструкции GR20hh определяли с помощью флуоресцентного титрования. ДОКС интеркалирует между комплементарными парами азотистых оснований (Pérez-Arnaiz et al., 2014). Возможные вторичные структуры аптамера GR20 и конструкции GR20hh приведены на рис. 5 (Zavyalova et al., 2020). В предполагаемой структуре аптамера GR20 имеется два двутяжевых участка с суммарной длиной в 11 нуклеотидов, в то время как дополнительный двутяжевой участок имеет длину 18 нуклеоти-

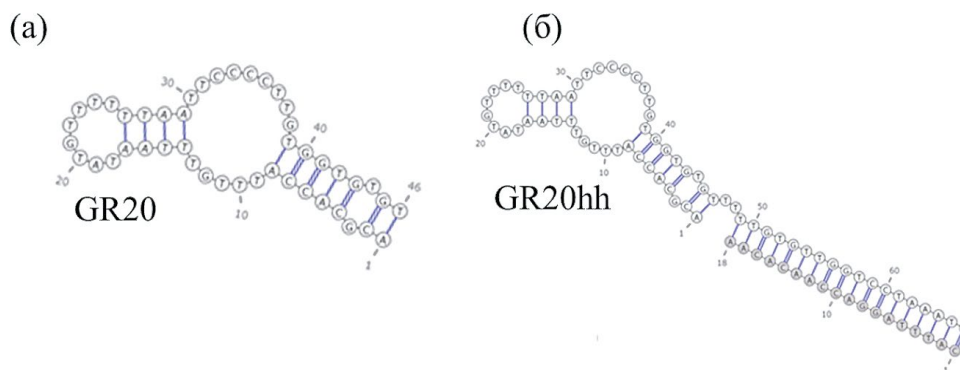


Рис. 5. Возможная вторичная структура аптамера GR20 (а) и конструкции GR20hh (б).
Fig. 5. Possible secondary structure of aptamer GR20 (a) and GR20hh construction (b).

дов. Увеличение кривизны кривой связывания для GR20hh говорит о том, что дополнительный двутяжевой участок обеспечивает основное, более эффективное связывание ДОКСа, при этом концентрация свободного ДОКСа не превышала 5% от исходной. Различие в эффективности связывания ДОКСа с аптамером GR20 и с конструкцией GR20hh обусловлено разным количеством центров связывания и разной природой. Таким образом, за счет формирования дополнительного дуплекса в нековалентной конструкции GR20hh удалось увеличить эффективность связывания ДОКСа.

Впервые для измерения непрерывной кинетики цитотоксического действия ДОКСа на клетки использован метод измерения электрической проводимости адгезионной культуры клеток — xCelligence в реальном времени.

Впервые предложен метод обчета данных, который позволяет оценивать результат выживаемости клеток не в конкретной точке, по достижении какого-то конкретного момента времени, а в динамике, в реальном времени — на всем протяжении времени проведения эксперимента. Оригинальный разработанный метод применили для обчета результатов экспериментов по изучению цитотоксического действия ДОКСа, интеркалированного в конструкцию GR20hh, на перевиваемую культуру клеток ГБ человека Sus/fP2.

Клетки перевиваемой культуры ГБ человека Sus/fP2 по-разному реагируют на действие свободного ДОКСа и комплекса GR20hh-ДОКС.

При добавлении 1 мкМ ДОКСа к клеткам наблюдается продолжение роста клеточного индекса в течение 8 ч (рис. 4 (б)). Затем значение производной клеточного индекса становится отрицательным, что отражает начало гибели клеток. Затем скорость гибели клеток увеличивается, что можно объяснить накоплением ДОКСа в клетках. Через 23 ч после добавления ДОКСа наблюдается снижение скорости гибели клеток, что, скорее, связано с уменьшением общего количества живых клеток.

При добавлении комплекса GR20hh-ДОКС в течение 25 ч наблюдается постепенное замедление роста клеток, после чего клеточный индекс начинает уменьшаться. Концентрация ДОКСа 5% от исходной не является цитотоксичной, жизнеспособность клеток не изменяется.

Отсюда следует, что при добавлении к клеткам нековалентного комплекса GR20hh-ДОКС мы наблюдаем действие именно ДОКСа, интеркалированного в конструкцию, а не остаточного свободного ДОКСа вне конструкции.

Если ДОКС в низкой концентрации практически не токсичен, то при добавлении ДОКСа в концентрации 1 мкМ наблюдается гибель клеток. ДОКС в составе комплекса GR20hh-ДОКС сохраняет активность, уже через двое суток воздействия клетки практически полностью погибают (рис. 4). Однако характер действия комплекса GR20hh-ДОКС на клетки ГБ Sus/fP2 оказался принципиально отличным от действия свободного ДОКСа: предложенный нами метод обчета данных xCelligence позволил выявить временной лаг в действии комплекса относительно действия свободного ДОКСа. Такое поведение комплекса объяснимо, если предположить иной механизм проникновения в клетки ГБ Sus/fP2 комплекса GR20hh-ДОКС, по сравнению с чистым ДОКСом. Таким образом, показана возможность изменять кинетику цитотоксического действия ДОКСа на клетки ГБ. Приводит ли это к изменению механизма гибели клеток и уменьшению общей токсичности ДОКСа, еще предстоит выяснить.

ВЫВОДЫ

В данной работе впервые создана и охарактеризована система для регулируемой доставки противоопухолевого цитотоксического агента — ДОКСа, которая представляет собой аптамер к опухолевому биомаркеру EGFR — GR20 с дополнительным двучепочным участком для более эффективного связывания ДОКСа. Действие комплекса GR20hh-ДОКС было протестировано на опухолевых клетках перевиваемой культуры глиобластомы Sus/fP2, полученной из постоперационного образца опухоли пациента. Тестирование проводили методом измерения жизнеспособности клеток по проводимости поверхности, на которой растут прикрепленные клетки, на приборе xCelligence. В свободном виде ДОКС начинает действовать на клетки Sus/fP2 сразу, проникая через мембрану опухолевых клеток путем свободной диффузии. Цитотоксическое действие ДОКСа в комплексе с нековалентной конструкцией сохраняется, однако кинетика действия свободного ДОКСа и ДОКСа, интеркалированного в конструкцию GR20hh, раз-

личается кардинально: наблюдается запаздывание действия комплекса GR20hh-ДОКС на жизнеспособность клеток. Детально механизм попадания ДОКСа в комплексе с нековалентной конструкцией в клетку не исследовался. Можно предположить, что различие в кинетике происходит вследствие ряда причин: иной механизм проникновения конструкции в клетку, медленное высвобождение конструкции из эндосом и медленное высвобождение ДОКСа из конструкции.

В настоящей работе показано сохранение токсичности доксорубина, интеркалированного в двойную спираль ДНК. Полученные данные служат основой для создания других нековалентных конструкций. Например, для направленного токсического действия на определенный тип клеток-мишеней за счет дизайна узнающего участка аптамерной конструкции.

Предложенный новый подход для дифференцирования и интерпретации данных xCelligence позволяет изучать кинетику действия многих токсических агентов на адгезионные культуры клеток.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят Ташлицкого В. Н. за помощь в постановке экспериментов эксклюзивной ВЭЖХ и Кубареву Е. А. за содействие при проведении УФ-спектрофотометрического плавления олигонуклеотидов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации по соглашению № 075–15–2021–1343 от 4 октября 2021 г.

Заявление об информированном согласии: пациенты дали письменное информированное согласие на участие в исследованиях. Исследования были одобрены локальным комитетом по этике Центра нейрохирургии им. Н. Н. Бурденко.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ai S., Duan J., Liu X., Bock S., Tian Y., Huang Z. Biological evaluation of a novel doxorubicin – peptide conjugate for targeted delivery to EGF receptor-overexpressing tumor cells. *Mol. Pharm.* 2011. 8 (2): 375–386.
- Akhtar N., Mohammed H. A., Yusuf M., Al-Subaiyel A., Sulaiman G. M., Khan R. A. SPIONs conjugate supported anticancer drug doxorubicin's delivery: current status, challenges, and prospects. *Nanomaterials*. 2022. 12 (20): 3686.
- Aliieva R. R., Zavyalova E. G., Tashlitsky V. N., Kopylov A. M. Quantitative characterization of oligomeric state of G-quadruplex antithrombin aptamers by size exclusion HPLC. *Mendeleev Communications*. 2019. 29 (4): 424–425.
- Horbinski C., Berger T., Packer R. J., Wen, P. Y. Clinical implications of the 2021 edition of the WHO classification of central nervous system tumours. *Nat. Rev. Neurol.* 2022. 18 (9): 515–529.
- Kopylov A. M., Fab L. V., Antipova O., Savchenko E. A., Revishchin A. V., Parshina V. V., Pavlova S. V., Kireev I. I., Golovin A. V., Usachev D. Y., Pavlova G. V. RNA aptamers for theranostics of glioblastoma of human brain. *Biochemistry (Moscow)*. 2021. 86: 1012–1024.
- Liu T., Song P., Märcher A., Kjems J., Yang C., Gothelf K. V. Selective delivery of doxorubicin to EGFR+ cancer cells by Cetuximab–DNA conjugates. *Chem. Bio. Chem.* 2019. 20 (8): 1014–1018.
- Martins-Teixeira M. B., Carvalho I. Antitumour anthracyclines: progress and perspectives. *Chem. Med. Chem.* 2020. 15 (11): 933–948.
- Minotti G., Menna P., Salvatorelli E., Cairo G., Gianni L. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol. Rev.* 2004. 56 (2): 185–229.
- Pérez-Arnaiz C., Busto N., Leal J. M., García B. New insights into the mechanism of the DNA/doxorubicin interaction. *J. Phys. Chem B*. 2014. 118 (5): 1288–1295.
- Pugazhendhi A., Edison T. N. J. I., Velmurugan B. K., Jacob J. A., Karuppusamy I. Toxicity of doxorubicin (Dox) to different experimental organ systems. *Life Sci.* 2018. 200: 26–30.
- Zavyalova E. G., Legatova V. A., Aliieva R. S., Zalevsky A. O., Tashlitsky V. N., Arutyunyan A. M., Kopylov A. M. Putative mechanisms underlying high inhibitory activities of bimodular DNA aptamers to thrombin. *Biomolecules*. 2019. 9 (2): 41.
- Zavyalova E., Turashev A., Novoseltseva A., Legatova V., Antipova O., Savchenko E., Balk S., Golovin A., Pavlova G., Kopylov A. Pyrene-modified DNA aptamers with high affinity to wild-type EGFR and EGFRvIII. *Nucl. Acid Therap.* 2020. 30 (3): 175–187.

ANTI-EGFR APTAMERIC CONSTRUCT GR20HH FOR CONTROLLABLE DELIVERY OF DOXORUBICIN INTO GLIOBLASTOMA CELLS

**B. M. Ivanov^{a, #}, O. M. Antipova^a, Y. A. Sliman^{b, c}, N. S. Samoylenkova^b, I. N. Pronin^b,
G. V. Pavlova^{b, d, e}, A. M. Kopylov^a**

^a*Lomonosov Moscow State University, Chemistry Department, Moscow, Russia*

^b*Burdenko National Medical Research Center of Neurosurgery, Ministry of Healthcare of Russia, Moscow, Russia*

^c*Moscow institute of physics and technology, national research university, Dolgoprudny, Russia*

^d*Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

^e*Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia*

[#]*e-mail: ivanovb661@yandex.ru*

This publication describes research on a possibility of controllable delivery of doxorubicin (DOX) into glioblastoma (GB) cells, being inside non-covalent construct with anti-EGFR DNA aptamer by intercalating into artificially created duplex. The construct has been made with previously described DNA aptamer GR20 (46 nucleotides), with 3'-end 18 nucleotides extension (GR20h), which was hybridized with the complementary DNA oligonucleotides (h). The duplex assembly is effective, the construct GR20hh is stable at 37 °C, T_m = 59 °C. DOX is intercalated into the construct. By applying xCelligence Real-Time Cell Analysis (RTCA) combined with self-created data processing, it has been shown that during a treatment of cell culture DOX, inside the non-covalent construct GR20hh – DOX, saves cytotoxic ability, though a kinetics of toxic action of the complex on GB cells is completely different from the kinetics of DOX along.

The unique approach and the data are the bases for a development of both a regulation and a targeting of DOX cytotoxic activity toward specific GB cells.

Keywords: doxorubicin, glioblastoma, aptamer, targeted delivery

УДК 577.25

АНТИПРОЛИФЕРАТИВНЫЙ ЭФФЕКТ L1CAM–СПЕЦИФИЧНЫХ АПТАМЕРОВ В КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУРАХ ГЛИОБЛАСТОМЫ ЧЕЛОВЕКА

© 2024 г. В. А. Колесникова^{1,*}, А. К. Митина², А. В. Рябова³, Л. В. Фаб¹, И. Н. Пронин⁴,
Г. В. Павлова^{1,4,5}

¹ФГБУН «Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН», Москва, Россия

²ФГАОУ ВО «РНИМУ им. Н. И. Пирогова» МЗ РФ, Москва, Россия

³Институт общей физики им. А. М. Прохорова РАН, Москва, Россия

⁴ФГАУ «НМИЦ нейрохирургии им. академика Н. Н. Бурденко» Минздрава России, Москва, Россия

⁵Первый МГМУ им. И. М. Сеченова, Москва, Россия

*e-mail: v.kolesnikova@ihna.ru

Поступила в редакцию 04.09.2023 г.

После доработки 23.09.2023 г.

Принята к публикации 01.12.2023 г.

Глиобластома остается неизлечимой формой опухоли головного мозга. Существующие методы терапии способны только незначительно продлить жизнь пациентов с таким диагнозом. Поэтому необходимо искать новые подходы и разрабатывать новые способы терапии глиобластомы. В данной работе мы описываем принцип воздействия на опухолевые клетки глиобластомы, заключающийся в направленном ингибировании пролиферации L1CAM-позитивных клеток с помощью аптамеров. L1CAM принято считать маркером опухолевых стволовых клеток глиомы, наличие которых в опухоли может отвечать за резистентность к терапии. В результате работы из панели аптамеров к L1CAM был отобран аптамер y12, для которого был продемонстрирован антипролиферативный эффект, более выраженный на клетках глиобластомы человека с повышенной экспрессией L1CAM. Таким образом, оказываемое воздействие может решить вопрос устойчивости клеток глиобластомы и предотвратить рецидивирование опухоли за счет влияния на опухолевые стволовые клетки глиомы.

Ключевые слова: глиобластома, опухолевые стволовые клетки глиомы, пролиферация, L1CAM, аптамеры

DOI: 10.31857/S0044467724010112

ВВЕДЕНИЕ

Глиобластома – это самая распространенная и агрессивная форма опухоли головного мозга, относящаяся к глиомам IV Grade. Согласно статистике, процент выживаемости пациентов с этим диагнозом составляет около 42.5% (Caruso et al., 2017; Louis et al., 2021; Ostrom et al., 2021; Stoyanov et al., 2022). На настоящий момент высокой выживаемостью считается 36 месяцев с момента первого хирургического вмешательства и проведения лучевой и химиотерапии для предотвращения возможных рецидивов заболевания. Процент пациентов, проживших более 36 месяцев, в среднем составляет примерно 15%, больных, проживших более 5 лет, – 6,8% (Louis et al., 2021; Stoyanov et al., 2022). Согласно статистике, в среднем на 100 тыс. человек каждый год выявляют примерно 3–5 человек с данным диагнозом (Caruso et al., 2017; Louis et al., 2021).

Одной из причин устойчивости клеток глиобластомы к существующим видам терапии может

считаться наличие популяции опухолевых стволовых клеток глиомы (ОСКГ), составляющих, по разным данным, 1–5% опухолевой массы (Biserova et al., 2021). Эти клетки обладают способностью к самообновлению (Aum et al., 2014; Li et al., 2009) и продуцированию прогениторных клеток опухоли (Biserova et al., 2021). ОСКГ характеризуются наличием таких маркеров, как CD133, CD44, L1CAM, Nestin, и очевидно, что это не конечный их список (Tang et al., 2021). Также стоит отметить такие особенности ОСКГ, как склонность к инвазии, устойчивость к лекарственным препаратам и лучевой терапии. Исследователи отмечают, что ОСКГ обладают общими молекулярными маркерами и функциональным сходством с обычными стволовыми клетками (Pesenti et al., 2019).

На сегодняшний день нет точной характеристики ОСКГ, поэтому можно сделать предположение о существовании различных популяций ОСКГ, характеризующихся более выраженным

наличием одного или нескольких маркеров. В данной работе основное внимание уделяется маркеру L1CAM как мишени для воздействия на ОСКГ, для которых характерна экспрессия этого маркера.

L1CAM представляет собой поверхностный маркер, отвечающий за клеточную адгезию, а также связанный с процессами выживания, миграции нервных клеток и разрастанием их аксонов (Maness, Schachner, 2007). Высокий уровень экспрессии L1CAM обычно связан с худшим прогнозом и более неблагоприятным исходом у пациентов (Giordano, Cavallaro, 2020; Wachowiak et al., 2018). Клетки, экспрессирующие L1CAM, могут проявлять повышенную инвазивность и метастатические свойства. Интересно отметить, что высокий уровень экспрессии L1CAM часто наблюдается в клетках, которые также экспрессируют CD133, также предположительно связанный со стволовостью (Bao et al., 2009).

Молекула L1 (L1CAM) является молекулой клеточной адгезии и представляет собой гликопротеин, присутствующий в клеточной мембране и имеющий массу от 200 до 220 кДа. В ее полноразмерной форме, известной как L1CAM-FL (FL), она содержит длинный эктодомен, состоящий из шести иммуноглобулиноподобных (Ig) доменов, за которыми следуют пять повторов фибронектина III типа. Кроме того, L1CAM содержит один трансмембранный домен и относительно короткий, но высококонсервативный цитоплазматический домен (Hegron и др., 2009). У человека L1CAM кодируется геном *L1CAM*, расположенном на длинном плече X-хромосомы (Xq28; *chrX: 153,861,514–153,886,173* (GRCh38/hg38)), и включает в себя 29 экзонных областей (база данных PubMed Gene). На настоящий момент, помимо основной формы белка, обнаружены еще 2 изоформы, получающиеся в результате альтернативного сплайсинга, в которых отсутствуют экзоны 2 или 27 (Yunusova et al., 2019).

Помимо мембранной локализации, обнаруживается еще цитоплазматическая локализация L1CAM, где эта молекула отвечает за взаимодействие с другими белками и участвует в различных клеточных процессах, таких как сигнальные пути и регуляция клеточной активности (Guo et al., 2017; Maten et al., 2019; Raveh et al., 2009).

Роль L1CAM во множестве биологических процессов клетки, в том числе в росте нейро-

нов, фасцикуляции, клеточной адгезии, миграции клеток, миелинизации и выживании клеток, указывает на его участие в активации сигнальных путей, отвечающих за реализацию данных процессов. L1CAM может активировать важные сигнальные пути в опухолевых стволовых клетках глиобластомы, включая PI3K/Akt/mTOR, Wnt/ β -катенин и Notch (Almeida Magalhães de et al., 2020; Cheriya-mundath, Ben-Ze'ev, 2020; Jhanwar-Uniyal et al., 2015).

В сигнальном пути PI3K/Akt/mTOR, который важен для клеточного роста и выживаемости, L1CAM активирует фосфоинозитид-3-киназу (PI3K), что приводит к фосфорилированию белка Akt и активации молекулярного комплекса mTOR. То есть активированный L1CAM способствует выживаемости и пролиферации опухолевых стволовых клеток глиобластомы (Jhanwar-Uniyal et al., 2015).

Сигнальный путь Wnt/ β -катенин играет важную роль в регуляции клеточной пролиферации и дифференцировки. L1CAM может взаимодействовать с участниками этого пути, включая фосфопротеин γ -катенин, и активировать сигнальные механизмы, связанные с β -катенином. Активация этого пути влияет на судьбу опухолевых стволовых клеток глиобластомы и их способность продуцировать прогениторные клетки опухоли разной дифференцировочной специализации (Cheriya-mundath, Ben-Ze'ev, 2020).

Также L1CAM может связываться с рецепторами Notch и влиять на активацию сигнального пути Notch. Активированный Notch регулирует различные клеточные процессы, включая пролиферацию и выживаемость клеток, в том числе клеток глиобластомы (Almeida Magalhães de et al., 2020).

В данной работе мы акцентируем внимание на молекуле L1CAM как маркере ОСКГ глиобластомы человека и ее взаимосвязи с пролиферативным потенциалом этих клеток.

Аптамеры, которые являются аналогами антител, представляют собой структурированные короткие одноцепочечные олигонуклеотиды на основе молекул ДНК или РНК с оптимальной длиной 30–40 нуклеотидов, которые специфично связываются со своими молекулами-мишенями. Они являются перспективным инструментом для диагностики и терапии различных патологий, в том числе опухолей.

Таблица 1. Список используемых в работе ДНК-аптамеров
Table 1. List of DNA aptamers used in the work

Название аптамера	Длина аптамера (нукл.)	Последовательность
ylQ3	85	AAGGAGCAGCGTGGAGGATAGGGGGTAGCTCGGTCGTGTTTTGGGTTGT TTGGTGGGTCTTCTGTAGGGGTGTGTCGTCTGTT
uly4	57	TGGAGGATAGGGGGTAGCTCGGTCGTGTTTTGGGTTGTTGGTGGGTCT TCTGTTA
uly10	54	TGGAGGATAGGGGGTAGCTCGGTCGTGTTTTGGGTTGTTGGTGGGTCT TCTG
uly11	54	AGGATAGGGGGTAGCTCGGTCGTGTTTTGGGTTGTTGGTGGGTCTTCT GTTA
uly12	51	AGGATAGGGGGTAGCTCGGTCGTGTTTTGGGTTGTTGGTGGGTCTTCTG

МЕТОДИКА

Клеточные культуры G01 и Sus\pP2

Клеточные культуры G01 и Sus\pP2 выращивали в среде DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12) (Gibco, Великобритания) с добавлением 10% бычьей сыворотки (FBS) (Fetal Bovine Serum) и 1% глутамина (ПанЭко, Россия). Культуры содержали в CO₂-инкубаторе при 37 °C.

Иммуномагнитная сепарация

Для удаления конгломератов клетки в количестве $1 \cdot 10^7$ пропускали через фильтр с диаметром 40 микрон, после чего клетки центрифугировали при 1000 об/мин в течение 10 мин. Для проведения разделения клеток по маркеру L1CAM использовали набор L1CAM MicroBead Kit (Miltenyi Biotec, США). Мечение и разделение клеток на колонке проводили согласно протоколу.

Полученные фракции L1CAM⁺ и L1CAM⁻ центрифугировали при 1000 об/мин в течение 10 мин. После центрифугирования клетки подсчитывали и высаживали в культуральные флаконы.

Культивирование клеточных культур в присутствии L1CAM- специфичных аптамеров

В качестве подавляющих клеточную пролиферацию агентов были выбраны аптамеры uly4, uly10, uly11, uly12, ylQ3 (GenTerra, Россия) (табл. 1).

Аптамер преформировали перед его введением в среду культивирования клеточной культуры глиобластомы человека. Преформация проводилась при 95 °C в течение 5 мин с последующим охлаждением при комнатной температуре в течение 1 ч. В работе использовались аптамеры в концентрациях 37.5 и 10 мкМ.

По сравнению с антителами аптамеры имеют некоторые преимущества: процесс их получения более простой и менее дорогостоящий, аптамеры не обладают иммуногенностью и токсичностью (Bouchard et al., 2010). Синтез аптамеров осуществляется с помощью технологии SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment), благодаря которому в процессе позитивной, а затем негативной селекции происходит постепенный отбор аптамеров с наибольшим сродством к мишени. На сегодняшний день разработано множество вариаций этой технологии, выбор осуществляется исходя из задач исследования и возможностей метода (Sharma et al., 2017).

В нашей работе в качестве блокаторов активности L1CAM были использованы аптамеры, исследованные Wang L. et al. (Wang et al., 2018). Для аптамеров ylQ3, uly12 и uly10 была доказана мишень L1CAM, и экспериментально было доказано их ингибирующее действие на процессы роста нейронов. Аптамеры uly11 и uly4 были сконструированы на базе приведенных выше аптамеров (Kelly et al., 2021; Zhou et al., 2019).

В ходе исследований из панели аптамеров был выбран аптамер, показавший наилучший антипролиферативный эффект и не обладающий цитотоксическими свойствами. В работе продемонстрирована разница в ответе L1CAM-обогащенных и L1CAM-обедненных клеток глиобластомы человека в ответ на воздействие аптамером. Полученные результаты подтверждают значимость молекулы L1CAM в жизнедеятельности клеток глиобластомы и открывают перспективы для дальнейшего использования антипролиферативного подхода с использованием аптамеров в терапии экспрессирующих L1CAM опухолей.

MTS-тест

Для оценки влияния исследуемых аптамеров на пролиферацию клеток глиобластомы G01 и Sus\p2 использовали MTS-тест. Клетки высаживали из расчета 1000 клеток на лунку на 96-луночные плашки (Corning, США). Культуры глиобластом человека вели на среде DMEM/F12 (Gibco, США) с добавлением 10% FBS (Gibco, США) и L-глутамина (ПанЭко, Россия) при 37 °C во влажной атмосфере с 5% CO₂. При постановке MTS-теста производили смену среды и из расчета 1:10 к 100 мкл свежей среды добавляли 10 мкл реагента MTS. Клетки инкубировали в течение 2 ч во влажной атмосфере с 5% CO₂. Для определения оптической плотности использовали анализатор SPECTROstar Nano при длине волны 495 нм с использованием программы MARS. В качестве контроля использовали клетки без добавления аптамера.

Антоцитохимическое окрашивание клеток аптамерами и антителами

Иммунофлуоресцентное окрашивание клеточных культур глиобластом человека проводили для детекции связывания исследуемого аптамера с целевой молекулой-мишенью. Клетки в количестве 20000 высевали на покровные стекла для культуральных планшетов (SPL Lifesciences, Корея), вложенные в 4-луночный планшет, и на следующий день в среду добавляли аптамеры, меченные флуоресцентной меткой в необходимой концентрации. Инкубирование культур производили в термостате при 37 °C и 5% CO₂ в течение 3 ч. Затем производили отмывку культур от среды с использованием раствора фосфатно-солевого буфера (PBS) (pH 7.3) и дальнейшую фиксацию клеток с помощью параформальдегида в течение 20 мин при температуре +4 °C. После чего производили трехкратную 5-минутную отмывку в PBS.

Далее клетки инкубировали в растворе первичных антител кролика против L1CAM (разведение 1:100, PA5–85876, Invitrogen, США) с добавлением 0.3% Triton X-100 (Sigma, США). После инкубации при комнатной температуре в течение 1 ч клетки трижды промывали в PBS в течение 5 мин. Затем проводилась инкубация клеток с вторичными ослиными анти-кроличьими антителами, конъюгированными с флуоресцентным красителем Alexa Fluor 594 (Jackson ImmunoResearch, США), в PBS с 0.3% Triton X-100. Инкубацию производили в темноте при комнатной температуре в течение 1 ч. После этого клетки 3 раза по 5 мин промывали в растворе PBS.

Для окраски клеточных ядер использовали раствор бисбензимида Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich, Германия), который добавляли к клеткам глиобластомы на 5 мин, и далее промывали в растворе PBS в течение 5 мин. Клетки фиксировали с использованием среды на основе поливинилового спирта Mowiol 4–88 (Sigma-Aldrich, Германия). Оценку флуоресцентной окраски проводили с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа Carl Zeiss LSM 900.

Иммуноцитохимическое окрашивание клеточных культур глиобластом человека

Клетки высаживали на покровные стекла для культуральных планшетов (SPL Lifesciences, Корея) в количестве $2 \cdot 10^4$ с добавлением 350 мкл среды DMEM/F12 (Gibco, Великобритания). Инкубацию проводили в течение 10 суток, при этом исследуемый аптамер вносили каждые три дня. По истечении времени эксперимента среду удаляли, клетки промывали в PBS (pH 7.3) (Gibco, Великобритания). Клетки фиксировали добавлением 500 мкл 4%-го параформальдегида и выдерживали при температуре +4 °C в течение 20 мин. После этого клетки снова промывали в PBS трижды по 5 мин.

После отмывки клетки окрашивали первичными антителами в пяти различных комбинациях:

- 1) кроличьи антитела против L1CAM (титр 1:100, PA5–85876, Invitrogen, США) + мышинные антитела против CD133/1 (титр 1:50, W6B3C1, MiltenyiBiotec, США);
- 2) кроличьи антитела против L1CAM (титр 1:100, PA5–85876, Invitrogen, США) + мышинные антитела против CD44 (титр 1:100, FNab01483, FineTest, Китай);
- 3) кроличьи антитела против ki67 (титр 1:100, ab15580, Abcam, Великобритания) + мышинные антитела против L1CAM (титр 1:100, ab24345, Abcam, Великобритания);
- 4) козьи антитела против Nestin (титр 1:25, sc-21248, Santa Cruz Biotechnology, США) + кроличьи антитела против Sox2 (титр 1:100, ab97959, Abcam, Великобритания).

Инкубацию проводили в течение 1 ч при комнатной температуре. После инкубации с первичными антителами клетки отмывали трижды в PBS в течение 5 мин. Далее клетки инкубировали с вторичными ослиными антителами к IgG кролика, конъюгированными с флуоресцентным красителем Alexa Fluor 488 (Jackson ImmunoResearch, США) и ослиными антителами к IgG мыши и козла, конъюгированными

Таблица 2. Панель праймеров для ПЦР-РВ
Table 2. Panel of primers for RT-qPCR

Исследуемые гены	Нуклеотидная последовательность прямых праймеров, 5' – 3'	Нуклеотидная последовательность обратных праймеров, 5' – 3'
<i>CD133</i>	TGGATGCAGAACTTGACAACGT	ATACCTGCTACGACAGTCGTGGT
<i>CD44</i>	CCCCAGCAACCCTACTGATG	GCCTCTTGGTTGCTGTCTCA
<i>Nestin</i>	TTGCTGTCTACCTTGAGAC	GGGCTCTGATCTCTGCATCTAC
<i>L1CAM</i>	CATGTGATGGAGCCACCTGT	CCCAGCTCTTCCTTGGGGTTT
<i>Sox2</i>	GCTCGCAGACCTACATGAAC	GGGAGGAAGAGGTAACCACA
<i>GFAP</i>	GCACGCAGTATGAGGCAATG	TAGTCGTTGGCTTCGTGC TT
<i>HPRT</i>	TGAGGATTTGGAAAGGGTGT	GAGCACACAGAGGGCTACAA
<i>GAPDH</i>	AGATCCCTCCAAAATCAAGTGG	GGCAGAGATGATGACCCTTTT

с флуоресцентным красителем Alexa Fluor 594 (Jackson ImmunoResearch, США) в соотношении 1:50 в PBS с добавлением 0.3% Triton X-100. Инкубацию производили в темном месте в течение 1 ч. По истечении времени инкубации клетки промывали раствором PBS3 раза по 5 мин. Для визуализации клеточных ядер клетки инкубировали в растворе бисбензида (разведение 1:500, Hoechst 33342, Sigma) в течение 5 мин. Затем клетки трижды отмывали в PBS в течение 5 мин. Клетки фиксировали с использованием среды на основе поливинилового спирта Mowiol 4–88 (Sigma-Aldrich, Germany). Оценку флуоресцентной окраски проводили с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа Carl Zeiss серии LSM 900.

ПЦР-РВ

Оценку экспрессии маркеров стволовости *CD133*, *CD44*, *Nestin*, *L1CAM*, *Sox2* и *GFAP* после воздействия аптамера проводили при помощи метода ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) на клеточных культурах глиобластомы человека G01 L1CAM⁺ и G01 L1CAM[−]. В качестве контроля использовали клеточные культуры без действия аптамера.

Для выделения тотальной РНК с помощью RNazol® RT использовали протокол RNazol® RT RNA Isolation Reagent User Manual (MRC, США). Для синтеза кДНК применяли обратную транскриптазу MMLV (MMLV RT kit, Евроген) и рандомный N10 праймер (Евроген) в соответствии с протоколом производителя. Реакцию проводили с помощью амплификатора LightCycler 96 (Roche, Швейцария) и набора 5X qPCRmix-HS SYBR (Евроген, Россия).

Для проведения ПЦР-РВ были использованы специфические праймеры, перечисленные в табл. 2. Праймеры подбирали с использованием

программы Primer-Blast (NCBI). В качестве генов «домашнего хозяйства» были выбраны GAPDH и HPRT.

Исследование проводили с использованием следующих температурных условий: нагрев смеси при 95 °C 5 мин, далее денатурация ДНК при 94 °C 20 сек, отжиг праймеров при 60 °C 12 сек и элонгация при 72 °C 15 сек. Количество циклов 41.

Для анализа полученных данных использовали программное обеспечение CFX96, поставляемое с прибором LightCycler® 96 SW 1.1 (Roche, Швейцария). Для каждого образца выполняли 3 повтора.

Статистическая обработка

Статистическую обработку проводили с использованием программы GraphPad Prism 9. Полученные данные представлены в виде means ± SD. Для анализа использовали метод ANOVA, статистически значимые различия показаны с помощью астериков, * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$, *** – $p < 0.001$, **** – $p < 0.0001$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Подбор клеточных культур глиобластом человека с различной экспрессией L1CAM и определение рабочей концентрации аптамеров, специфичных к L1CAM

С помощью ПЦР-РВ в пяти культурах глиобластом человека (IV Grade) была исследована экспрессия L1CAM, и на основе полученных данных были выбраны две культуры, с высокой и низкой экспрессией этого маркера. Из рис. 1 (а) видно, что наибольшей экспрессией L1CAM обладает культура глиобластомы человека G01. В качестве культуры сравнения была выбрана культура глиобластомы человека Sus\fp2 с низкой экспрессией целевого гена.

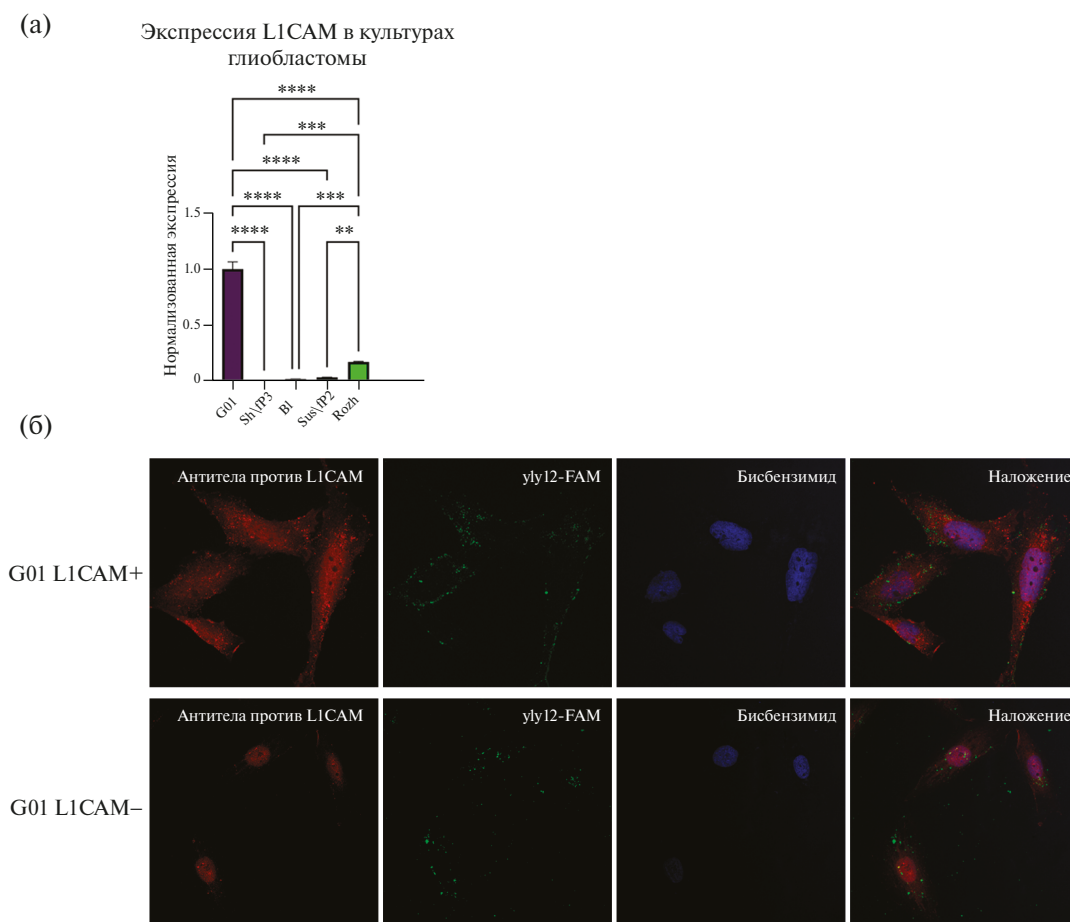


Рис. 1. Экспрессия L1CAM в культурах клеток глиобластомы и аптocyтохимическое окрашивание культур клеток G01 L1CAM⁺ и G01 L1CAM⁻ антителами против L1CAM и меченым аптамером yly12-FAM. (а) — уровни экспрессии гена L1CAM в клеточных культурах глиобластомы человека G01, Sus\fp2, BI, Sh\fp3, Rozh. Данные представлены в виде mean $\pm$ SD; n = 3 для каждой группы. Статистически значимые различия показаны с помощью астерисков (One-Way ANOVA, post-hoc Tukey HSD Test, ** — p < 0.01, *** — p < 0.001, **** — p < 0.0001). (б) — Аптocyтохимическое окрашивание клеток глиобластомы человека G01 L1CAM⁺ и G01 L1CAM⁻ аптамером yly12-FAM (зеленое свечение) и антителами против L1CAM (красное свечение). Ядра клеток окрашивали раствором бисбензимида (Hoechst 33342) — синее свечение.

Fig. 1. Expression of L1CAM in glioblastoma cell cultures and aptocytochemical staining of G01 L1CAM⁺ and G01 L1CAM⁻ cells with anti-L1CAM antibodies and labeled yly12-FAM aptamer. (a) — Levels of L1CAM expression in human glioblastoma cell cultures G01, Sus\fp2, BI, Sh\fp3, Rozh. Data are represented as mean $\pm$ SD. n = 3 for each group. Statistically significant differences between the control and the treatment groups are indicated by asterisks (One-Way ANOVA, post-hoc Tukey HSD Test, ** — p < 0.01, *** — p < 0.001, **** — p < 0.0001). (б) — Aptocytochemical staining of human glioblastoma cells G01 L1CAM⁺ and G01 L1CAM⁻ with yly12-FAM aptamer (green), and anti-L1CAM antibodies (red). Nuclei are stained with Hoechst 33342 (blue).

Для изучения влияния аптамеров на уровень пролиферативной активности клеточных культур глиобластомы были выбраны две концентрации аптамеров: 10 и 37.5 мкМ. Оценка пролиферативной активности проводилась с использованием метода MTS-теста (рис. 2 (а)). Для клеток культуры G01 не наблюдалось статистически значимого снижения пролиферации. В случае с культурой Sus\fp2 антипролиферативный эффект был выражен у аптамеров yly4, yly10 и yly11 в концентрации 10 мкМ (рис. 2 (б)).

На основании этих результатов для дальнейших исследований была выбрана концентрация 10 мкМ, которая показала выраженный антипролиферативный эффект на культуре Sus\fp2.

Анализ влияния L1CAM-специфичных аптамеров на пролиферативный потенциал G01 L1CAM⁺ и G01 L1CAM⁻ культур клеток глиобластомы

Для проверки специфичности аптамеров, которые должны оказывать действие, связываясь с целевой молекулой L1CAM, проводилось

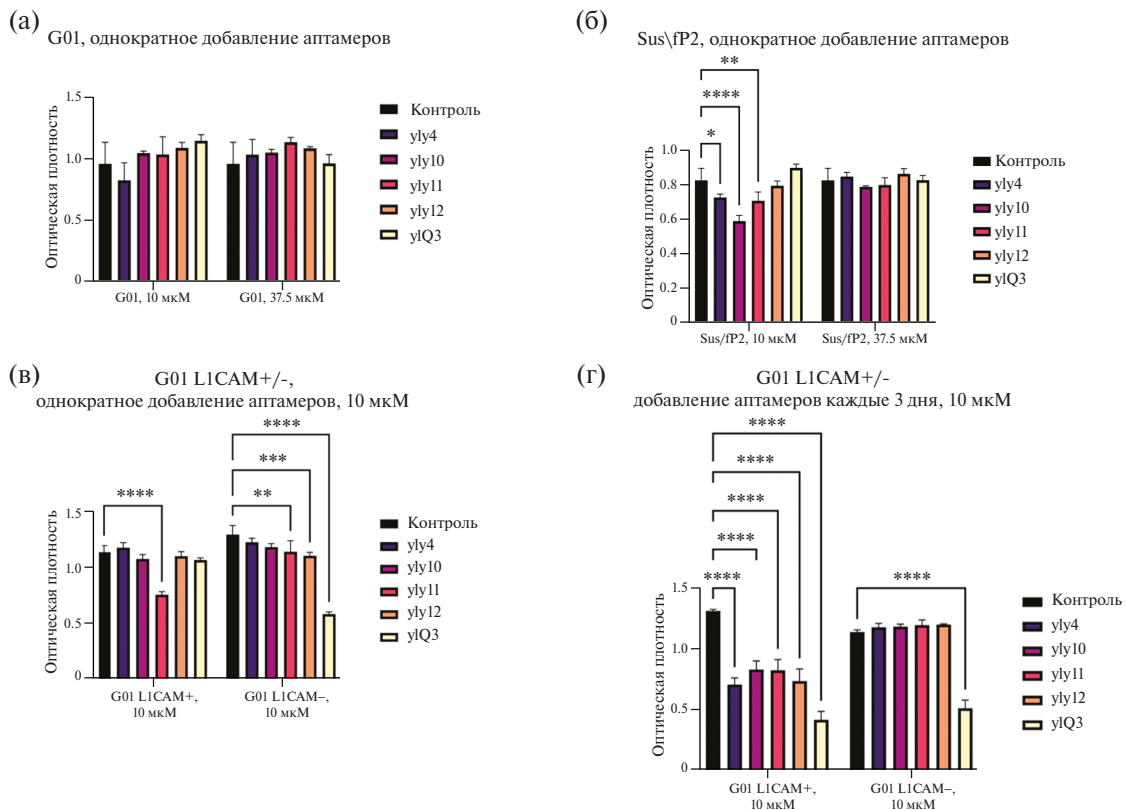


Рис. 2. Результаты MTS-теста при однократном и трехкратном добавлении аптамеров к L1CAM к клеткам глиобластомы человека. MTS-тест на 10-й день после добавления к клеткам глиобластомы (а) – G01, (б) – Sus\fp2 аптамеров к L1CAM yly4, yly10, yly11, yly12, yIQ3 в концентрациях 10 и 37.5 мкМ. MTS-тест на 10-й день после добавления аптамеров к L1CAM yly4, yly10, yly11, yly12, yIQ3 в концентрации 10 мкМ к клеткам G01 L1CAM+ и G01 L1CAM- (в) однократно и (г) каждые три дня. Данные представлены в виде mean $\pm$ SD; n = 3 для каждой группы. Статистически значимые различия показаны с помощью астерисков (Two-Way ANOVA, post-hoc Bonferroni test, ** – $p < 0.01$, *** – $p < 0.001$, **** – $p < 0.0001$).

Fig. 2. Results of the MTS assay for single and triple addition of aptamers to L1CAM to human glioblastoma cells. MTS-assays on the 10th day after exposure to L1CAM aptamers yly4, yly10, yly11, yly12, yIQ3 to glioblastoma cells (а) – G01, (б) – Sus\fp2 in concentrations 10 мкМ and 37.5 мкМ. MTS-assays on the 10th day after exposure to L1CAM aptamers yly4, yly10, yly11, yly12, yIQ3 in concentration 10 мкМ to glioblastoma cells G01 L1CAM+ and G01 L1CAM- (в) once and (г) every three days. Data are represented as mean $\pm$ SD. n = 3 for each group. Statistically significant differences between the control and the treatment groups are indicated by asterisks (Two-Way ANOVA, post-hoc Bonferroni Test, ** – $p < 0.01$, *** – $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$).

исследование на обогащенных и обедненных по L1CAM клетках культуры глиобластомы человека G01. Аптамеры в концентрации 10 мкМ добавлялись на следующие сутки после высева клеток, на 10-й день эксперимента проводился MTS-тест.

Как видно из рис. 2 (в), при однократном добавлении аптамеров в концентрации 10 мкМ на культуре G01 L1CAM⁺ не наблюдалось значительного снижения пролиферативной активности клеток, за исключением аптамера yly11. Культура клеток G01 L1CAM⁻ оказалась менее устойчивой к воздействию аптамерами, значимое снижение пролиферации наблюдалось при действии аптамерами yly11, yly12 и yIQ3.

Чтобы проверить, будет ли усиление антипролиферативного эффекта для клеток G01 L1CAM⁺ после многократного добавления аптамеров, был выбран интервал добавления аптамеров раз в три дня.

Снижение пролиферации в G01 L1CAM⁺ отмечалось при действии всех исследуемых аптамеров (рис. 2 (г)). При этом аптамер yIQ3 оказал антипролиферативный эффект при действии на культуру G01 L1CAM⁻, что указывает на его неспецифичность, следовательно, он является неподходящим для дальнейшего исследования.

Для дальнейшей работы был выбран аптамер yly12, значительно снижающий пролиферацию клеток G01 L1CAM⁺.

Оценка связывания аптамера уly12 с целевой молекулой-мишенью L1CAM

Аптоцитохимический анализ локализации в клетке аптамера уly12-FAM, связанного с флуоресцентной меткой, проводился на клеточных культурах глиобластомы человека, обогащенных (G01 L1CAM⁺) и обедненных (G01 L1CAM⁻) по целевому маркеру. В качестве подтверждения связывания аптамера именно с L1CAM использовался иммуноцитохимический анализ с применением антител против L1CAM (титр 1:100, PA5-85876, Invitrogen, США).

Показано, что клеточная культура G01 L1CAM⁻ обладает низким сигналом красной флуоресценции, детектируемой в основном в области ядра, характерной для экспрессии L1CAM, что подтверждает отсутствие данной молекулы на поверхности и ее преимущественную локализацию в нуклеоплазме (рис. 1 (б)). На изображении слева, в опыте с G01 L1CAM⁺, наблюдается высокий уровень сигнала для L1CAM, в основном располагающегося в области цитоплазмы и по периметру клетки на мембране опухолевых клеток (рис. 1 (б)). Данный результат подтверждает специфичность уly12 к белку-мишени L1CAM.

Иммуноцитохимический анализ влияния L1CAM-специфичного аптамера уly12 на экспрессию маркеров стволовости клеток глиобластомы человека

Был проведен иммуноцитохимический анализ клеточных культур глиобластомы человека G01 с высокой экспрессией L1CAM и Sus/fP2 с низкой экспрессией L1CAM после воздействия аптамера уly12. Разработчики уly12 показали, что уly12 специфически связывается с L1CAM, что мы также подтвердили в своих экспериментах (Wang et al., 2018). Было обнаружено, что при воздействии уly12 на клетки G01 обнаруживается снижение экспрессии на уровне белка L1CAM с одновременным снижением CD133, что может говорить о влиянии на клетки, имеющие общие маркеры стволовости L1CAM и CD133 (рис. 3 (а)). При этом при воздействии уly12 на клетки Sus/fP2 (где незначительна экспрессия L1CAM) обнаруживается представленность CD133 в клетках, что подтверждает тот факт, что уly12 не ингибирует экспрессию CD133 в отсутствие L1CAM (рис. 3 (а)). Для подтверждения этого предположения мы проанализировали воздействие аптамера уly12 на G01 L1CAM⁺ и G01 L1CAM⁻, где подтвердили предположение (рис. 3 (а)). В G01

L1CAM⁺ после добавления аптамера уly12 экспрессия CD133 резко снижалась до отсутствия визуализации, тогда как в G01 L1CAM⁻ после введения уly12 в небольшом количестве присутствовали клетки CD133-позитивные (рис. 3 (а)).

При анализе других маркеров стволовости в клетках G01 и Sus/fP2 было обнаружено, что в обеих культурах после добавления аптамера уly12 снижается экспрессия Sox2 и Nestin (рис. 3 (а)). При этом мы обратили внимание, что в клетках G01, обладающих высокой пролиферативной активностью и высокой представленностью L1CAM, Nestin-позитивных клеток существенно меньше, чем в клеточной культуре Sus/fP2. После воздействия аптамера уly12 Nestin-позитивных клеток мы не обнаруживали ни в одной культуре (рис. 3 (а)). Что касается маркера CD44, то мы обнаружили существенное снижение его представленности в клетках Sus/fP2 и незначительное снижение в клетках G01 воздействия уly12 (рис. 3 (а)).

При разделении G01 на две культуры – G01 L1CAM⁺ и G01 L1CAM⁻ – было показано, что после введения в культуры аптамера уly12 снижалась экспрессия Sox2 (рис. 3 (а)). Что касается Nestin-позитивных клеток, то до воздействия мы обнаруживали их только в клеточной культуре G01 L1CAM⁺, но не в G01 L1CAM⁻, а после использования аптамера экспрессия Nestin не наблюдалась ни в G01 L1CAM⁺, ни в G01 L1CAM⁻ (рис. 3 (а)). Данный результат сопоставим с результатом на неразделенных клеточных культурах G01 и Sus/fP2.

Кроме того, после воздействия аптамера уly12 наблюдается падение ki67 – маркера пролиферативной активности опухолевой клетки в культуре G01 L1CAM⁺, при этом в G01 L1CAM⁻ этот показатель не меняется (рис. 3 (а)).

Оценка уровня экспрессии маркерных генов стволовости на уровне РНК в культурах G01 L1CAM⁺ и G01 L1CAM⁻ после воздействия аптамера уly12

В целях сравнения стволовых характеристик в культурах G01 L1CAM⁺ и G01 L1CAM⁻ после воздействия уly12 проводили анализ экспрессии генов, ассоциированных со стволовостью, *CD133*, *L1CAM*, *CD44*, *Nestin*, *Sox2* и *GFAP* с помощью ПЦР-РВ. Анализ экспрессии генов на уровне мРНК проводили на 10-й день после воздействия аптамера уly12. В качестве контроля использовали клетки, инкубированные в тех же условиях без использования уly12.

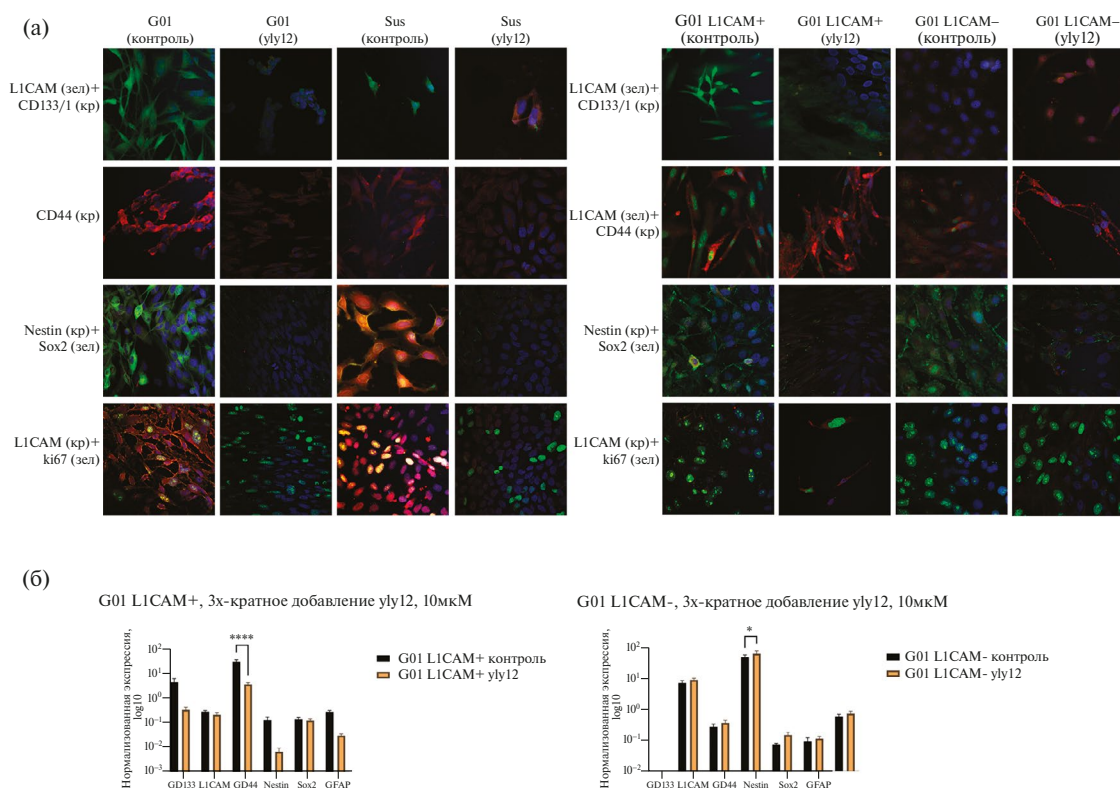


Рис. 3. Иммуноцитохимическое окрашивание клеток глиобластомы G01, Sus\fp2, G01 L1CAM⁺ и G01 L1CAM⁻ и ПЦР-анализ клеток глиобластомы G01 L1CAM⁺ и G01 L1CAM⁻ после воздействия аптамером к L1CAM yly12. (a) – иммуноцитохимическое окрашивание клеток G01, Sus\fp2, G01 L1CAM⁺ и G01 L1CAM⁻ после воздействия аптамером yly12 на маркеры стволовости CD133, L1CAM, CD44, Nestin, Sox2 и маркер пролиферирующих клеток ki67. Зел – зеленое свечение, кр – красное свечение. Ядра клеток окрашивали раствором бисбензимида (Hoechst 33342) – синее свечение. (б) – ПЦР-РВ генов, ассоциированных со стволовостью CD133, L1CAM, CD44, Nestin, Sox2 и GFAP, в культурах клеток G01 L1CAM⁺ и G01 L1CAM⁻ после воздействия аптамером yly12. Статистически значимые различия показаны с помощью астерисков (Two-Way ANOVA, post-hoc Bonferroni test, * – $p < 0.05$, **** – $p < 0.0001$).

Fig. 3. Immunocytochemical staining of glioblastoma cells G01, Sus\fp2, G01 L1CAM⁺ and G01 L1CAM⁻ and PCR analysis of glioblastoma cells G01 L1CAM⁺ and G01 L1CAM⁻ after exposure to the aptamer to L1CAM yly12. (a) – Immunocytochemical staining of G01, Sus\fp2, G01 L1CAM⁺ and G01 L1CAM⁻ cells after exposure to yly12 aptamer on stem cell markers CD133, L1CAM, CD44, Nestin, Sox2 and proliferation marker ki67. Зел – green, кр – red. Nuclei are stained with Hoechst 33342 (blue). (б) – Real-time quantitative PCR associated with stemness CD133, L1CAM, CD44, Nestin, Sox2 and GFAP, in cell cultures G01 L1CAM⁺ and G01 L1CAM⁻ after exposure to yly12 aptamer. Statistically significant differences between the control and the treatment groups are indicated by asterisks (Two-Way ANOVA, post-hoc Bonferroni Test, * – $p < 0.05$, **** – $p < 0.0001$).

При анализе данных, полученных в результате ПЦР-РВ для клеточной культуры G01 L1CAM⁺, приведенных на рис. 3 (б), отмечается значимое снижение экспрессии гена CD44 после воздействия аптамером yly12. В то же время после действия yly12 в культуре G01 L1CAM⁻ наблюдалось повышение экспрессии гена CD44 (рис. 3 (б)).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Глиобластома как одна из наиболее агрессивных и сложных форм опухоли продолжает представлять серьезную медицинскую пробле-

му с ограниченными возможностями лечения. Традиционные методы, такие как хирургическое удаление, химиотерапия и радиотерапия, оказывают временный эффект и не способны не только обеспечить полное излечение пациентов, но и увеличить их продолжительность жизни (Rong et al., 2022). В связи с этим исследование глиобластомы и поиск новых подходов к ее лечению становятся особенно актуальными. Один из перспективных подходов – использование ДНК-аналогов антител – аптамеров. В данном исследовании использовали ряд аптамеров, специфичных к молекуле L1CAM, которая играет важную роль в функционировании клеток

глиобластомы (Wachowiak et al., 2018). L1CAM считается одним из маркеров опухолевых стволовых клеток глиобластомы (ОСКГ) (Tegane et al., 2020), предполагается, что данный мембранный белок участвует в поддержании выживания этих клеток (Bao et al., 2009). Кроме того, известно, что L1CAM активирует NBS1, который является участником комплекса NBS1/hMre11/Rad50, необходимого для репарации двухцепочечных разрывов ДНК (Cheng et al., 2011).

Таким образом, L1CAM является особенно привлекательной мишенью для разработки новых подходов к терапии глиобластомы, посредством воздействия на ОСКГ (Cheng et al., 2011). Однако мы обнаружили, что клеточные культуры глиобластом человека имеют достаточно различную экспрессию L1CAM. Поэтому для работы мы выбрали две клеточные культуры глиобластомы человека – G01 и Sus\fp2, – которые имели высокую и низкую экспрессию гена *L1CAM* соответственно (рис. 1 (а)). Важно было понять, насколько существенно влияет специфичный к L1CAM аптамер на экспрессию маркеров, характерных для ОСКГ. Мы отметили, что однократное добавление всех анализируемых аптамеров к L1CAM показало низковыраженный эффект на клеточной культуре G01, что заставило нас предположить, что для перехода в «восприимчивое» состояние клеткам необходимо более длительное воздействие, поскольку на переключение сигнальных путей может требоваться больше времени. Поэтому в дальнейшем использовали добавление аптамеров каждые три дня в течение 10 дней эксперимента. Для точности исследований из клеточной культуры G01 были получены обедненная (G01 L1CAM⁻) и обогащенная (G01 L1CAM⁺) по L1CAM клеточные культуры, на которых была подтверждена эффективность трехкратного воздействия аптамеров. Кроме того, было показано, что наибольшим антипролиферативным эффектом обладает yly12 (рис. 2 (г)). В ходе исследования из всех аптамеров, специфично блокирующих L1CAM, был выбран yly12, так как именно этот аптамер показал наилучший дозозависимый антипролиферативный эффект на обеих клеточных культурах глиобластом при использовании двух концентраций – 10 и 37.5 мкМ.

Иммуноцитохимическое окрашивание клеток G01 L1CAM⁻ и G01 L1CAM⁺, предварительно меченных специфичным к L1CAM аптамером, антителами против L1CAM показало, что в клетках глиобластомы G01 L1CAM⁻ L1CAM встреча-

ется в единичных клетках в области ядра, а в G01 L1CAM⁺ высоко представлен на поверхности клеток (рис. 1 (б)). При этом yly12 проявляет аффинность к L1CAM глиобластомы человека, а также способен не только взаимодействовать с мембранной формой L1CAM, но и проникать внутрь клетки и взаимодействовать с ядерной формой L1CAM, оказывать антипролиферативное действие путем ингибирования L1CAM, что подтверждается результатами MTS-тестов (рис. (2)). Очень интересна ядерная локализация L1CAM. По этому поводу крайне мало сообщений, но в работе F. Angiolini показана цитоплазматическая форма L1CAM, которую авторы назвали L1-ΔTM, характерная именно для опухолевых стволовых клеток. Авторами показано, что L1-ΔTM получается посредством NOVA2-опосредованного альтернативного сплайсинга. L1-ΔTM проявляет проангиогенную активность и активируется в опухолевых сосудах, что может иметь большое клиническое значение (Angiolini et al., 2019). Данное наблюдение не является целью наших исследований, но может служить объяснением ряда наших результатов.

Мы показали, что при воздействии на клеточную культуру G01 с высокой экспрессией L1CAM аптамером yly12 наблюдается падение экспрессии некоторых белков, характерных для ОСКГ, таких как CD133, CD44, Sox2, Nestin (иммуноцитохимический анализ). При этом в низко-экспрессирующей L1CAM клеточной культуре Sus\fp2 воздействие yly12 стимулировало понижение экспрессии CD44, Sox2, Nestin, но не влияло на представленность CD133 в небольшом количестве клеток. Для более подробного исследования феномена одновременного падения экспрессии маркеров L1CAM и CD133 в культуре клеток G01 и падения экспрессии маркера L1CAM без изменения экспрессии CD133 в культуре клеток Sus\fp2 после воздействия аптамера yly12 мы решили проанализировать этот эффект на культурах клеток G01 L1CAM⁻ и G01 L1CAM⁺.

Полученный результат совпал с результатом на G01 и Sus\fp2. Было обнаружено, что в G01 L1CAM⁺ после воздействия yly12 падает экспрессия L1CAM и CD133, в то время как в G01 L1CAM⁻ при падении экспрессии L1CAM экспрессия CD133 возрастает (рис. 3 (а)). Вероятно, в случае G01 L1CAM⁺ мы имеем дело с нормальной молекулой L1CAM, взаимодействие с которой влияет на представленность CD133 в клетках. А в случае G01 L1CAM⁻, вероятно, мы имеем дело с растворимой формой L1-ΔTM, которая никак не

связана с каскадами, управляющими CD133. Данный результат очень интересен для дальнейших исследований разных типов опухолевых стволовых клеток глиобластомы. Кроме того, для дальнейших исследований важен тот факт, что из всех аптамеров, специфичных к L1CAM, только uyl2 специфичен к любой форме этого белка, что показывает его универсальность и предпочтительность. Кроме того, мы обнаружили, что при воздействии аптамера uyl2 на клеточные культуры Sus\fp2 и G01 падает экспрессия другого белка, связанного с опухолевыми столбовыми клетками глиобластомы, – Sox2. Причем подобное падение Sox2 характерно не только для обеих культур, но и для G01 L1CAM⁺ и G01 L1CAM[–], что говорит о том, что ингибирование молекулы L1CAM при помощи аптамера uyl2 оказывает влияние на процессы клеточного самообновления. Это дает основания предположить, что L1CAM играет важную роль в сигнальном пути Wnt/ β -катенин.

Мы обратили внимание, что в опухолевых клетках крайне плохо представлен маркер нейтральных стволовых клеток Nestin. Так, его практически нет в клеточной культуре с высокой экспрессией L1CAM G01 и очень мало в низко-экспрессирующей L1CAM Sus\fp2; воздействие на клеточные культуры аптамером либо снижает эту экспрессию, либо блокирует вовсе (как это видно в культуре G01 L1CAM[–]) (рис. 3 (а)).

В обеих культурах глиобластом человека – G01 и Sus\fp2 – аптамер uyl2 снижал экспрессию CD44. Такой эффект может свидетельствовать о большом количестве определенных ОСКГ, обладающих высокой степенью адгезии. Считается, что данный ген связан с процессами стволовости и пролиферации и высоко экспрессируется в ОСКГ (Mesrati et al., 2021; Morath et al., 2016). Результат подтверждается и на культурах G01 L1CAM⁺ и G01 L1CAM[–] (рис. 3 (б)). Таким образом, можно заключить, что аптамер uyl2 оказывает влияние на процессы, происходящие в стволовых клетках, и может изменять экспрессию Sox2, CD44, Nestin, CD133. При этом разная представленность маркеров стволовых клеток и изменение экспрессии этих маркеров в ответ на добавление аптамеров, специфичных к L1CAM, позволяют изучать в дальнейшем разные типы ОСКГ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В целом, данное исследование подтверждает антипролиферативный эффект аптамера uyl2,

что особенно выражено на клетках с повышенной экспрессией L1CAM. Эти результаты могут иметь важное значение для разработки новых подходов к лечению глиобластомы и преодоления ее лекарственной резистентности.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075–15–2021–1343).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Almeida Magalhães T. de, Cruzeiro G.A.V., Sousa G.R. de, Silva K.R. da, Lira R.C.P., Scrideli C.A., Tone L.G., Valera E.T., Borges K.S. Notch pathway in ependymoma RELA-fused subgroup: upregulation and association with cancer stem cells markers expression. *Cancer Gene. Ther.* 2020. 27 (6): 509–512.
- Angiolini F., Belloni E., Giordano M., Campioni M., Forneris F., Paronetto M.P., Lupia M., Brandas C., Pradella D., Matteo A. Di, Giampietro C., Jodice G., Luise C., Bertalot G., Freddi S., Malinverno M., Irimia M., Moulton J.D., Summerton J., Chiapparino A., Ghilardi C., Giavazzi R., Nyqvist D., Gabellini D., Dejana E., Cavallaro U., Ghigna C. A novel L1CAM isoform with angiogenic activity generated by NOVA2-mediated alternative splicing. *Elife.* 2019. 8: 1–27.
- Aum D.J., Kim D.H., Beaumont T.L., Leuthardt E.C., Dunn G.P., Kim A.H. Molecular and cellular heterogeneity: The hallmark of glioblastoma. *Neurosurg. Focus* 2014. 37 (6): 1–11.
- Bao S., Wu Q., Li Z., Sathornsumetee S., Wang H., McLendon R.E., Hjelmeland A.B., Rich J.N. Targeting cancer stem cells through L1CAM suppresses glioma growth. *Cancer Res.* 2009. 68 (15): 6043–6048.
- Biserova K., Jakovlevs A., Uljanovs R., Strumfa I. Cancer stem cells: Significance in origin, pathogenesis and treatment of glioblastoma. *Cells.* 2021. 10 (3): 1–20.
- Bouchard P.R., Hutabarat R.M., Thompson K.M. Discovery and development of therapeutic aptamers. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2010. 50: 237–257.
- Caruso R., Pesce A., Wierzbicki V. A very rare case report of long-term survival: A patient operated on in 1994 of glioblastoma multiforme and currently in perfect health. *Int. J. Surg. Case Rep.* 2017. 33: 41–43.
- Cheng L., Wu Q., Huang Z., Guryanova O.A., Huang Q., Shou W., Rich J.N., Bao S. L1CAM regulates DNA damage checkpoint response of glioblastoma stem cells through NBS1. *EMBO J.* 2011. 30 (5): 800–813.
- Cheriyamundath S., Ben-Ze'ev A. Wnt/ β -catenin target genes in colon cancer metastasis: The special case of l1cam. *Cancers (Basel).* 2020. 12 (11): 1–13.
- Giordano M., Cavallaro U. Different shades of l1cam in the pathophysiology of cancer stem cells. *J. Clin. Med.* 2020. 9 (5): 1502.
- Guo J.C., Xie Y.M., Ran L.Q., Cao H.H., Sun C., Wu J.Y.,

- Wu Z. Y., Liao L. Di, Zhao W. J., Fang W. K., Li E. M., Xu L. Y., Schachner M., Xie J. J. L1CAM drives oncogenicity in esophageal squamous cell carcinoma by stimulation of ezrin transcription. *J. Mol. Med.* 2017. 95 (12): 1355–1368.
- Herron L. R., Hill M., Davey F., Gunn-Moore F. J. The intracellular interactions of the L1 family of cell adhesion molecules. *Biochem. J.* 2009. 419 (3): 519–531.
- Jhanwar-Uniyal M., Labagnara M., Friedman M., Kwasnicki A., Murali R. Glioblastoma: Molecular pathways, stem cells and therapeutic targets. *Cancers (Basel)*. 2015. 7 (2): 538–555.
- Kelly L., Maier K. E., Yan A., Levy M. A comparative analysis of cell surface targeting aptamers. *Nat. Commun.* 2021 12 (1): 6275.
- Li G., Chen Z., Hu Y. De, Wei H., Li D., Ji H., Wang D. L. Autocrine factors sustain glioblastoma stem cell self-renewal. *Oncol. Rep.* 2009. 21 (2): 419–424.
- Louis D. N., Perry A., Wesseling P., Brat D. J., Cree I. A., Figarella-Branger D., Hawkins C., Ng H. K., Pfister S. M., Reifenberger G., Soffietti R., Deimling A. Von, Ellison D. W. The 2021 WHO classification of tumors of the central nervous system: A summary. *Neuro. Oncol.* 2021. 23 (8): 1231–1251.
- Maness P. F., Schachner M. Neural recognition molecules of the immunoglobulin superfamily: Signaling transducers of axon guidance and neuronal migration. *Nat. Neurosci.* 2007 10 (1): 19–26.
- Maten M. V., Reijnen C., Pijnenborg J. M. A., Zegers M. M. L1 cell adhesion molecule in cancer, a systematic review on domain-specific functions. *Int. J. Mol. Sci.* 2019. 20 (17): 4180.
- Mesrati M. H., Syafruddin S. E., Mohtar M. A., Syahir A. CD44: A multifunctional mediator of cancer progression. *Biomolecules.* 2021. 11 (12): 1850.
- Morath I., Hartmann T. N., Orian-Rousseau V. CD44: More than a mere stem cell marker. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2016. 81: 166–173.
- Ostrom Q. T., Cioffi G., Waite K., Kruchko C., Barnholtz-Sloan J. S. 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.
- Pesenti C., Navone S. E., Guarnaccia L., Terrasi A., Costanza J., Silipigni R., Guarneri S., Fusco N., Fontana L., Locatelli M., Rampini P., Campanella R., Tabano S., Miozzo M., Marfia G. The genetic landscape of human glioblastoma and matched primary cancer stem cells reveals intratumour similarity and intertumour heterogeneity. *Stem. Cells Int.* 2019: 2617030.
- Raveh S., Gavert N., Ben-Ze'ev A. L1 cell adhesion molecule (L1CAM) in invasive tumors. *Cancer Lett.* 2009. 282 (2): 137–145.
- Rong L., Li N., Zhang Z. Emerging therapies for glioblastoma: current state and future directions. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 2022. 41 (1): 1–18.
- Sharma T. K., Bruno J. G., Dhiman A. ABCs of DNA aptamer and related assay development. *Biotechnol Adv.* 2017. 35 (2): 275–301.
- Stoyanov G. S., Lyutfi E., Georgieva R., Georgiev R., Dzhankov D. L., Petkova L., Ivanov B. D., Kaprelyan A., Ghenev P. Reclassification of glioblastoma multiforme according to the 2021 World Health Organization classification of central nervous system tumors: a single institution report and practical significance. *Cureus* 2022. 1. 14 (2): e21822.
- Tang X., Zuo C., Fang P., Liu G., Qiu Y., Huang Y., Tang R. Targeting glioblastoma stem cells: a review on biomarkers, signal pathways and targeted therapy. *Front. Oncol.* 2021. 11: 701291.
- Terraneo N., Jacob F., Peitzsch C., Dubrovskaya A., Krudewig C., Huang Y.-L., Heinzelmann-Schwarz V., Schibli R., Béhé M., Grünberg J. L1 Cell adhesion molecule confers radioresistance cell population. *Cancers (Basel)*. 2020. 12 (217): 1–17.
- Wachowiak R., Krause M., Mayer S., Peukert N., Suttikus A., Müller W. C., Lacher M., Meixensberger J., Nestler U. Increased L1CAM (CD171) levels are associated with glioblastoma and metastatic brain tumors. *Med. (United States)*. 2018. 97 (38): e12396.
- Wang L., Bing T., Liu Y., Zhang N., Shen L., Liu X., Wang J., Shangguan D. Imaging of neurite network with an anti-L1CAM aptamer generated by Neurite-SELEX. *J. Am. Chem. Soc.* 2018. 140 (51): 18066–18073.
- Yunusova N. V., Patysheva M. R., Molchanov S. V., Zambalova E. A., Grigor'eva A. E., Kolomiets L. A., Ochirov M. O., Tamkovich S. N., Kondakova I. V. Metalloproteinases at the surface of small extracellular vesicles in advanced ovarian cancer: Relationships with ascites volume and peritoneal canceromatosis index. *Clin. Chim. Acta.* 2019. 494: 116–122.
- Zhou F., Fu T., Huang Q., Kuai H., Mo L., Liu H., Wang Q., Peng Y., Han D., Zhao Z., Fang X., Tan W. Hypoxia-activated PEGylated conditional aptamer/antibody for cancer imaging with improved specificity. *J. Am. Chem. Soc.* 2019. 141 (46): 18421–18427.

ANTIPROLIFERATIVE EFFECT OF L1CAM-SPECIFIC APTAMERS IN HUMAN GLIOBLASTOMA CELL CULTURES

V. A. Kolesnikova^{a, #}, A. K. Mitina^b, A. V. Ryabova^c, L. V. Fab^a, I. N. Pronin^d, G. V. Pavlova^{a, d, e}

^a*Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology of RAS, Moscow, Russia*

^b*Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia*

^c*Natural Sciences Center of Prokhorov General Physics Institute RAS, Moscow, Russia*

^d*Federal State Autonomous Institution «N. N. Burdenko National Medical Research Center of Neurosurgery» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia*

^e*Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia*

[#]*e-mail: v.kolesnikova@ihna.ru*

Glioblastoma remains an incurable form of brain tumor. Existing methods of therapy allows to insignificantly prolong patient's lifespan with this diagnosis. Thus, it is necessary to search for new approaches and develop new principals of glioblastoma therapy. In this paper, we describe the principle of impact on glioblastoma tumor cells, which consists in targeted inhibition of the proliferation of L1CAM-positive cells using aptamers. L1CAM is considered to be a marker of tumor glioma stem cells, the presence of which in a tumor may be responsible for resistance to therapy. As a result of the work, the yly12 aptamer was selected from a panel of aptamers for L1CAM and its antiproliferative effect was shown, which was more pronounced on human glioblastoma cells with increased expression of L1CAM. Thus, the effect can solve the problem of glioblastoma cell resistance and prevent tumor recurrence by influencing cancer glioma stem cells.

Keywords: glioblastoma, cancer glioma stem cells, proliferation, L1CAM, aptamer

АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ, ТОМ 74, 2024

<i>Khayrullina G.M., Panfilova E.A., Martynova O.V.</i> Features of oculomotor reactions in highly anxious volunteers with different level of impulsivity in solving different types of the anti-saccade task	3	411
<i>Suchkov D.S., Shumkova V.V., Sitdikova V.R., Silaeva V.M., Logashkin A.E., Mamleev A.R., Minlebaev M.G.</i> WEEGIT – software for visualization and annotation of the electrophysiological activity registration data	6	857
<i>Vinarskaya A.Kh., Balaban P.M., Zuzina A.B.</i> Histone acetylation increase rescues a weak remote fear memory in rats	6	809
<i>Алехина Т.А.</i> Эффект таурина на проявление аудиогенной эпилепсии у крыс с маятникообразными движениями	1	88
<i>Аникаев А.Е., Чалян В.Г., Мейшвили Н.В., Аникаева Е.Н.</i> Изучение способности к исследовательской деятельности у низших обезьян	2	271
<i>Асеев Н.А.</i> Ходьба децеребрированной кошки при одновременно различных скоростях на расщепленном тредбане	1	76
<i>Бабенко В.В.</i> Зрительные механизмы второго порядка: обзор исследований	1	3
<i>Боброва Е.В., Решетникова В.В., Вершинина Е.А., Гришин А.А., Исаев М.Р., Бобров П.Д., Герасименко Ю.П.</i> Оценка эффективности управления мозг-компьютерным интерфейсом при обучении воображению движений верхних и нижних конечностей	1	52
<i>Боброва Е.В., Решетникова В.В., Гришин А.А., Вершинина Е.А., Исаев М.Р., Пляченко Д.Р., Бобров П.Д., Герасименко Ю.П.</i> Анализ мозговой и мышечной активности при управлении кортико-спинальным нейроинтерфейсом	4	510
<i>Бочаров А.В., Савостьянов А.Н., Таможников С.С., Карпова А.Г., Сапрыгин А.Е., Милахина Н.С., Заварзин Е.А., Рудыч П.Д., Меркулова Е.А., Князев Г.Г.</i> Особенности баланса сетей покоя после переезда в условия Севера	3	357
<i>Васильев А.Н., Маковская А.Е., Каплан А.Я.</i> Динамика сенсомоторного ритма ЭЭГ при мысленном повторении за наблюдаемым движением	4	490
<i>Верхлютов В.М., Бурлаков Е.О., Гуртовой К.Г., Введенский В.Л.</i> Распознавание устной речи по данным МЭГ с использованием ковариационных фильтров	6	800
<i>Вольф Н.В., Приводнова Е.Ю.</i> Фоновая ЭЭГ-активность опосредует ассоциации между BDNF-VAL66MET-полиморфизмом и памятью при старении	3	398
<i>Гарах Ж.В., Голимбет В.Е., Ларионова Е.В., Лежейко Т.В., Стрелец В.Б., Зайцева Ю.С.</i> Ассоциация полиморфизма RS1344706 гена ZNF804A с индуцированными изменениями ритмов ЭЭГ при зрительном восприятии вербальных стимулов у здоровых испытуемых и больных шизофренией	1	38
<i>Герасименко Н.Ю., Кушир А.Б., Михайлова Е.С.</i> Базовая и суперординатная категоризация изображений. Влияние степени конгруэнтности и временных параметров предъявления предшествующего стимула	5	606
<i>Джебраилова Т.Д., Коробейникова И.И., Каратыгин Н.А., Венерина Я.А., Янтикова Е.В.</i> Когерентность тета1-диапазона ЭЭГ в состоянии относительного покоя и при тестировании внимания у испытуемых с разной личностной тревожностью	2	214
<i>Ерофеев А.И., Петрушан М.В., Лысенко Л.В., Винокуров Е.К., Власова О.Л., Безprozванный И.Б.</i> Поиск оптимальных значений параметров пакета анализа		

данных кальциевой визуализации Minian с использованием модельных данных	5	704
<i>Журавлева З.Н., Мальков А.Е., Попова И.Ю.</i> Влияние подавления гликолиза на ультраструктуру гигантских синапсов гиппокампа	1	94
<i>Зенько М.Ю., Баранова К.А., Кукина М.В., Рыбникова Е.А.</i> Эффекты различных режимов интервальных гипоксических тренировок в экспериментальных моделях тревожно-депрессивных состояний на грызунах	6	845
<i>Зюзина А.Б., Балабан П.М.</i> Вклад эпигенетических механизмов в формирование, поддержание и реконсолидацию долговременной пищевой аверсивной памяти виноградной улитки	5	688
<i>Идова Г.В., Альперина Е.Л., Жанаева С.Я.</i> Нейровоспаление и иммунные нарушения в механизмах развития болезни Паркинсона	4	454
<i>Кайда А.И., Михайлова А.А., Португальская А.А., Павленко В.Б.</i> Реактивность сенсомоторных ритмов ЭЭГ у детей 4–7 лет в ситуациях помогающего поведения	3	384
<i>Канаев И.А., Дряева Э.Д.</i> Эволюционный путь сознания и разума: когнитом с точки зрения философии	1	124
<i>Каримова Е.Д., Смольская Д.В., Нараткина А.А.</i> Активность зеркальной системы мозга у людей с депрессивным симптомокомплексом	2	230
<i>Князев Г.Г.</i> Смена парадигмы в когнитивных науках?	1	102
<i>Князев Г.Г., Савостьянов А.Н., Рудыч П.Д., Бочаров А.В.</i> Использование методов машинного обучения для анализа паттернов активности мозга в процессе оценки себя и других людей	2	242
<i>Козунова Г.Л., Закиров Ф.Х., Рытикова А.М., Строганова Т.А., Чернышев Б.В.</i> Нейробиологические факторы нарушения исполнительных функций при аутизме	2	147
<i>Кудряшова И.В.</i> Координирующая роль актинового цитоскелета в кратковременной нейросетевой пластичности с участием возбуждающих и тормозных синапсов	5	579
<i>Кулешова О.Н.</i> Возрастные и половые особенности поведения пренатально стрессированных крыс в черно-белой модификации поведенческой модели “Суок-тест”	4	550
<i>Кутлубаев М.А., Шагиева Д.Р., Каримова Г.И., Измалкова А.И., Мячиков А.В.</i> Пупиллометрия в оценке психоэмоционального состояния и когнитивных функций человека	5	651
<i>Лебедева И.С., Паникратова Я.Р., Абдуллина Е.Г., Мигалина В.В., Тихонов Д.В., Омельченко М.А., Каледя В.Г.</i> Нейровизуализационные (фМРТ покоя) и нейropsychологические особенности “неманифестировавших” пациентов из группы клинически высокого риска шизофрении	3	369
<i>Ляховецкий В.А., Шкорбатова П.Ю., Горский О.В., Мусиенко П.Е., Меркульева Н.С.</i> Восприятие цвета и его кодирование в коре приматов	1	62
<i>Майорова Л.А., Кушнир А.Б.</i> Половые различия селективного слухового внимания при дихотическом прослушивании различной степени сложности: данные фМРТ-исследования	5	637
<i>Марченко В.Г., Зайченко М.И.</i> Обратные тормозные связи через ГАМК-Б-рецепторы синхронизируют интерикальные разряды в коре	4	524
<i>Миронова В.И., Притворова А.В., Акулова В.К., Михайленко В.А., Отеллин В.А., Хожай Л.И., Ордян Н.Э.</i> Салифен предотвращает вызванные перинатальной гипоксией нарушения способности к обучению и изменения экспрессии ГАМКв-рецепторов в неокортексе крыс	4	537
<i>Михалкин А.А., Меркульева Н.С.</i> Дорзальное ядро наружного коленчатого тела: анатомия, гистология, онтогенез	3	311

<i>Моисеев С.А., Городничев Р.М.</i> Пространственно-временные паттерны кортико-мышечного взаимодействия при локомоции	5	666
<i>Муртазина Е.П., Гинзбург-Шик Ю.А.</i> Спектральные характеристики тета- и альфа-ритмов ЭЭГ в покое у групп испытуемых с различной результативностью совместной деятельности в диадах	1	24
<i>Незвинский А.А., Белова Е.М., Сайфулина К.Э., Гамалея А.А., Томский А.А., Седов А.С.</i> Связь ритмической альфа-активности субталамического ядра с нарушениями двигательного контроля у пациентов с болезнью Паркинсона	6	723
<i>Ньето-Доваль К., Рагимова А.А., Феурра М.</i> Влияние зрительного предъявления движений пальцев руки на моторный ответ, вызванный транскраниальной магнитной стимуляцией. Эффект, связанный с возможной реакцией системы зеркальных нейронов	3	334
<i>Павленко В.Б., Орехова Л.С., Португальская А.А., Михайлова А.А.</i> Становление просоциального поведения в раннем детстве и его нейрофизиологические механизмы	2	193
<i>Перикова Е.И., Филиппова М.Г., Макарова Д.Н., Гнедых Д.С.</i> Вклад вербальных обозначений в процессы быстрого картирования и явного кодирования	6	749
<i>Петропавловская Е.А., Шестопалова Л.Б., Саликова Д.А., Семенова В.В.</i> Суммарные реакции мозга человека на выключение сигнала в условиях пространственной маскировки	6	735
<i>Подвигина Д.Н., Иванова Л.Е., Хараузов А.К.</i> Особенности удержания в рабочей памяти цветных и монохромных изображений у обезьян <i>Macaca mulatta</i>	5	680
<i>Портнова Г.В., Канцерова А.О., Окнина Л.Б., Пицхелаури Д.И., Подлепич В.В., Вологодина Я.О., Машеров Е.Л.</i> Увеличение пиковой частоты альфа-ритма ЭЭГ при предъявлении собственного имени во время глубокой анестезии	5	622
<i>Рагимова А.А., Феурра М.</i> Методы исследования головного мозга при изучении цервикальной дистонии	2	173
<i>Рогачёв А.О., Сысоева О.В.</i> Динамика теменно-затылочного альфа-ритма головного мозга при сравнении длительностей временных интервалов	4	479
<i>Сизов В.В., Лебедев А.А., Пюрвеев С.С., Бычков Е.Р., Мухин В.Н., Дробленков А.В., Шабанов П.Д.</i> Способ обучения крыс электрической самостимуляции в ответ на подъем головы в телеметрической установке, регистрирующей уровень внеклеточного дофамина	4	563
<i>Соловьева А.К., Соловьев Н.К., Мокроусова А.О., Украинцева Ю.В.</i> Восстановление моторных и когнитивных функций при форсированном пробуждении из третьей стадии дневного сна	6	785
<i>Федотова И.Р., Бобров П.Д., Кондур А.А.</i> Показатели нейропластических и функциональных перестроек при восстановлении двигательной функции в ходе реабилитации после инсульта	4	435
<i>Филиппова М.Г., Чернов Р.В., Горбунов И.А.</i> Незамеченные, но не забытые: ЭЭГ-корреляты прайминг-эффектов двойственных изображений	3	348
<i>Хайруллин А.Е., Ефимова Д.В., Иванова Д.В., Балтина Т.В., Балтин М.Э., Гришин С.Н., Зиганшин А.У.</i> Нарушения двигательной активности на модели расстройств аутистического спектра	6	819
<i>Черкасова А.Н., Яцко К.А., Ковязина М.С., Варако Н.А., Кремнева Е.И., Рябинкина Ю.В., Супонева Н.А., Пирадов М.А.</i> Выявление феномена “скрытого сознания” у пациентов с хроническими нарушениями сознания: обзор данных фМРТ с парадигмами	3	291
<i>Чернышев Б.В., Павлова А.А., Рытикова А.М., Буторина А.В., Строганова Т.А.</i> Продление мозговой репрезентации стимула как вероятный механизм ассоциативной пластичности при семантическом научении	6	764

<i>Чижова Н.Д., Смирнова К.В., Дубровина Н.И., Липина Т.В., Амстиславская Т.Г.</i> Половые и линейные различия у мышей DISC1-L100P и C57BL/6 в угашении условной реакции пассивного избегания	3	425
<i>Шестопалова Л.Б., Саликова Д.А., Петропавловская Е.А.</i> Слуховое последствие: влияние неподвижного адаптера на восприятие движущегося стимула	2	256
<i>Щербак Н.С., Юкина Г.Ю., Гурбо А.Г., Сухорукова Е.Г., Саргсян А.Г., Томсон В.В.</i> Влияние хлоралгидрата на морфологические изменения неокортекса и функциональное состояние старых самцов крыс	6	833

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

“Журнал высшей нервной деятельности им. И.П.Павлова” публикует экспериментальные, теоретические и обзорные статьи по нейрофизиологии и патофизиологии высшей нервной деятельности человека и животных на русском и английском языках, ранее нигде не опубликованные.

В журнале имеются разделы: краткие сообщения; обзоры и теоретические статьи; физиология высшей нервной (когнитивной) деятельности человека; физиологические механизмы поведения животных (восприятие внешних стимулов, двигательная активность, обучение и память); экспериментальная патология высшей нервной деятельности; нейробиофотоника и нейрогенетика; клеточная нейрофизиология; нейрофилософия; методика; дискуссионные статьи; история исследования ВНД.

К обзорным статьям предъявляются следующие требования:

- 1) у авторов должны быть собственные работы по теме обзора;
- 2) список цитированной литературы должен включать работы, опубликованные по данной теме в течение последних 5 лет;
- 3) обзор не должен быть дословным цитированием кусков ранее опубликованных работ, в нем должен быть критический разбор цитируемых материалов и своя концепция, свое видение проблемы, побудившее авторов написать данный обзор.

В рубрике журнала «Краткие сообщения» публикуются короткие (до 10 страниц, включая список литературы и рисунки) статьи приоритетного характера; после положительной оценки двумя рецензентами и утверждения главным редактором и редколлегией журнала эти статьи будут иметь преимущество по срокам опубликования.

По решению редколлегии журнала статьи, не имеющие цитирования (из истории науки; хроника; рецензии; информация), размещаются только на сайте журнала.

ПРЕДСТАВЛЕНИЕ РУКОПИСЕЙ

Редакция принимает на рассмотрение рукописи, присланные по электронной почте на адреса редакции: zhvnd@yahoo.com, zhvndpavlov@gmail.com.

При первичном представлении следует предоставить электронную версию статьи, таблиц и рисунков к ней (при наличии), а также следующие сопроводительные документы: направление от института и заключение экспертной комиссии, договор о передаче авторского права. Первая страница статьи должна быть завизирована руководителем лаборатории, отдела или кафедры учреждения, в котором была выполнена работа.

Авторы могут назвать четырех потенциальных рецензентов статьи (ФИО, место работы, контактный телефон и e-mail). Редакция оставляет за собой право обратиться к указанным или иным рецензентам.

В случае необходимости внести изменения в статью в соответствии с замечаниями рецензентов и требованиями редакции автор должен вернуть статью в течение двух месяцев, иначе статья считается поступившей вновь. К переработанной рукописи авторам необходимо приложить письмо с описанием сделанных исправлений и содержащее ответы на каждое замечание рецензента.

ОФОРМЛЕНИЕ РУКОПИСЕЙ

1. Объем рукописей

Краткие сообщения — не должны превышать 10 страниц текста, включая резюме на русском и английском языках и список литературы, до 3 рисунков и таблиц.

Экспериментальные работы — до 30 страниц текста, включая резюме на русском и английском языках, список литературы, до 6 рисунков и таблиц.

Обзорные и теоретические статьи — до 60 страниц текста, включая резюме на русском и английском языках, список литературы, до 3 рисунков и таблиц.

2. Текст

Заглавие должно быть максимально кратким, информативным и не включать сокращений.

Текст печатается через полтора интервала; верхнее, нижнее и левое поля должны быть не менее 2.5 см. Шрифт Times New Roman 14, нумерация страниц дается вверху, в центре. Начало статьи оформляется по образцу: УДК (индекс уникальной десятичной классификации) в левом верхнем углу страницы, название статьи, авторы (инициалы перед фамилией), полное название учреждений, в которых выполнялась работа, адрес электронной почты, дата поступления, дата доработки и дата принятия к публикации (приводятся после окончательного принятия статьи). Например:

УДК 612.821.6

НАЗВАНИЕ СТАТЬИ

© 2024 г. А.А.Иванов*, А.Б.Петров

Кафедра физиологии, Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова, Москва, Россия

* e-mail.....

Поступила в редакцию (дата)

После доработки (дата)

Принята к публикации (дата)

Далее следует краткая аннотация (не более 1/2 страницы) и ключевые слова (не более 10). Аннотация и ключевые слова на английском языке ставится в конце текста, после списка литературы. Не рекомендуется вводить в аннотацию нестандартные аббревиатуры и ссылки на литературу.

В начале статьи следует привести обоснование и четко сформулировать задачу работы, затем выделить разделы: МЕТОДИКА (где следует указать, кто и руководствуясь какими правилами утвердил протоколы работы с животными, наличие оснований для работы на человеке), РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ, ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ и ЗАКЛЮЧЕНИЕ или ВЫВОДЫ.

В статьях, публикуемых ЖВНД, обязательна статистическая обработка полученных результатов. В разделе МЕТОДИКА должно присутствовать описание статистических методов, а также должен быть указан статистический пакет, применявшийся при обработке результатов, и номер его версии.

Далее следует указать отдельными абзацами:

Информация о вкладе каждого автора

Источник финансирования работы

Благодарности (при наличии)

Указание на отсутствие или наличие конфликта интересов

Соблюдение этических стандартов (разрешение этической комиссии учреждения с номером и датой; указание на наличие информированного согласия от пациентов)

Указание на доступность первичных данных.

3. Список литературы

Список литературы должен начинаться с новой страницы и включать только опубликованные работы, процитированные в тексте. Ссылки на работы в тексте в соответствии со списком даются в круглых скобках (Фамилия, год). Например, (Иванов, 1987), (Иванов, Петров, 1993), три и более трех авторов (Иванов и др., 1995), (Roger et al., 1985).

В список литературы следует включать работы в алфавитном порядке, сначала на русском языке, затем на иностранных языках. Следует привести фамилии всех авторов, название статьи, название журнала, год, том, первую и последнюю страницы; или название книги, город, издательство, год, число страниц. Список идет без нумерации.

Например:

Иванов И.М., Петров П.П. Векторное кодирование и нейронные карты. Журн. высш. нерв. деят. им. И.П.Павлова. 1993. 43 (5): 102–110.

Симонов П.В. Мотивированный мозг. М.: Наука, 1987. 269 с.

Olds J. Mechanisms of instrumental conditioning. EEG a. Clin. Neurophysiol. 1963. 24: 219–225.

Roger D. Operant control of evoked potentials. Self-regulation of the Brain and Behavior. Ed. Elbert T.H.

Berlin: Springer-Verlag, 1984. 180–195 pp.

Если статья была опубликована в нашем журнале, а затем переведена и опубликована в «Neuroscience and Behavioral Physiology», цитировать ее следует по первой публикации в «Журнале высшей нервной деятельности им. И.П.Павлова».

Цитировать Журнал высшей нервной деятельности в статьях на английском языке нужно следующим образом:

Zh. Vyssh. Nerv. Deiat. 2000. V.50. № 3. P. 25–30.

Важные требования

1) не менее 50% цитируемой в статье литературы должно быть новой, то есть опубликованной за 5 последние лет (за исключением особых случаев, согласованных с редакцией); 2) самоцитирование (ссылки на работы авторов и соавторов статьи) не должно превышать 15%.

4. Таблицы

Таблицы следует приводить в тех случаях, когда данные не могут быть приведены в тексте. Каждая таблица оформляется на отдельной странице и имеет свой заголовок. Заголовок таблицы дается на русском и английском языках. Колонки в таблице должны быть озаглавлены. Необходимо стремиться к максимальной краткости заголовков колонок. Повторение одних и тех же данных в тексте, в таблицах или на рисунках не допускается. Таблицы принимаются только в формате Word (doc, docx).

5. Иллюстрации

Форматы файлов: tif, jpg.

Рисунок должен обладать высоким реальным разрешением: не ниже 300 dpi для полутоновых иллюстраций; не ниже 600 dpi для штриховых и смешанных (полутоновых/штриховых) иллюстраций. Линии рисунков должны быть толщиной не менее 3 пунктов (point). Следует избегать чрезмерно мелких обозначений (букв, цифр, значков и т.д.).

Рисунки даются в виде отдельных графических файлов. Название каждого файла должно содержать порядковый номер рисунка в настоящей статье (например: «1_Схема.tif»).

В тексте статьи, на полях должно быть указано, где именно следует поместить рисунок. На рисунках рекомендуется размер букв и цифр 9 пунктов, шрифт Arial.

Рисунки не должны содержать подрисуночные подписи.

Подрисуночные подписи (максимально краткие) даются на русском и английском языках на отдельных листах и должны содержать информацию обо всех рисунках, на которые есть ссылки в статье: номер рисунка (в порядке упоминания в тексте), его название, все надписи, расположенные на рисунке, а также расшифровку всех обозначений, использованных на рисунке.

Цветные иллюстрации публикуются бесплатно для авторов в том случае, если они будут размещены

только в электронной версии статьи, а в печатной версии журнала они будут в черно-белом исполнении. При этом авторы должны иметь в виду, что в печатной версии с черно-белыми рисунками сохраняются подрисуночные подписи из цветной электронной версии, поэтому следует избегать указаний на цвет в подрисуночных подписях. Авторам необходимо подбирать цвета таким образом, чтобы при черно-белой печати не утратилась информативность. Цветные линии графиков желательно размечать обозначениями, цифрами или спецсимволами или делать различающиеся типы линий для каждого цвета. Цветные области на иллюстрациях желательно размечать различающимися обозначениями или спецсимволами, а не одинаковыми символами разных цветов. Если цветовое разделение областей находится примерно в одном цветовом тоне, то желательно провести тонкую линию границы между ними. При большом количестве цветных областей в схожих цветовых тонах желательно дополнительно обозначить области символами или штриховкой. Все надписи и обозначения желательно делать не цветными, а черными или белыми, в зависимости от цвета подложки.

Подготовленные рисунки желательно распечатать и убедиться, что они хорошо выглядят в напечатанном виде. Все элементы рисунка должны быть хорошо видны на распечатке, фон должен быть чистым, надписи и цифры должны быть четкими.

Если рисунок был опубликован ранее, необходимо письменное разрешение от владельца права на его публикацию.

6. Формулы

Формулы должны быть оформлены только в MathType.

7. Дополнительные материалы

Ссылка на наличие дополнительных материалов при их наличии. Дополнительные материалы публикуются только в электронной версии журнала на сайте журнала <https://jvnd.ru/supplemental-materials/>

Подробнее с правилами оформления можно ознакомиться на сайте журнала <https://jvnd.ru/index.php>. Статьи, оформленные не по правилам, не рассматриваются.