

Идентификация предиктивных маркеров в спинномозговой жидкости больных глиобластомой

Н.Е. Арноцкая, Т.И. Кушнир, И.А. Кудрявцев, А.А. Митрофанов, А.Х. Бекашев, В.Е. Шевченко

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115522 Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Валерий Евгеньевич Шевченко vshev2015@yandex.ru

Введение. Глиобlastома (ГБ) пока неизлечима, несмотря на достижения в терапии других злокачественных солидных опухолей. Тактика лечения ГБ основывается исключительно на гистопатологических признаках, томографической визуализации опухоли и ее геномном анализе (соматические мутации в генах изоцитратдегидрогеназы, статус метилирования промотора гена 0⁶-метилгуанин-ДНК-метилтрансфераза). Для адаптации лечения к самой последней эволюции опухоли молекулярная информация должна поступать регулярно на протяжении всего курса терапии. Однако опухолевая ткань часто недоступна для диагностики при прогрессировании заболевания. В связи с этим актуальной становится разработка менее инвазивных методов, например анализа протеома биологических жидкостей пациентов. Особый интерес представляет спинномозговая жидкость (СМЖ) – важный источник биомаркеров заболевания для мониторинга наличия и прогрессирования заболевания.

Цель исследования – идентификация протеомных предиктивных биомаркеров в СМЖ больных ГБ.

Материалы и методы. В ходе исследования были использованы образцы СМЖ пациентов, протеомная масс-спектрометрия высокого разрешения, современные биохимические методы и биоинформатические технологии.

Результаты. Впервые проведен анализ протеомов образцов СМЖ больных ГБ, полученных до и спустя 7 дней после удаления первичной опухоли. Идентифицированы потенциальные биомаркеры ГБ. После их валидации с использованием открытых баз данных отобраны 11 протеомных предиктивных маркеров ГБ (S100A9, S100A8, PLA2G15, PRIB, LTBP2, VIM, LAMB1, STC1, NRP1, COL6A1, HSPA5) и проведена оценка их роли в молекулярных механизмах глиоматоза.

Заключение. Предложенная панель протеомных предиктивных биомаркеров СМЖ больных ГБ может в дальнейшем использоваться при разработке тест-систем для оценки эффективности терапии и раннего выявления рецидивов заболевания.

Ключевые слова: глиобlastома, протеом, спинномозговая жидкость, масс-спектрометрия

Для цитирования: Арноцкая Н.Е., Кушнир Т.И., Кудрявцев И.А. и др. Идентификация предиктивных маркеров в спинномозговой жидкости больных глиобlastомой. Успехи молекулярной онкологии 2023;10(2):117–25. DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-2-117-125

Identification of predictive markers in the cerebrospinal fluid of patients with glioblastoma

N.E. Arnotskaya, T.I. Kushnir, I.A. Kudryavtsev, A.A. Mitrofanov, A.Kh. Bekyashev, V.E. Shevchenko

N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115522, Russia

Contacts: Valery Evgenievich Shevchenko vshev2015@yandex.ru

Introduction. Glioblastoma (GB) is not yet curable despite recent advances in the treatment of other malignant solid tumors. The management of GB is based solely on histopathological features, imaging of the tumor and its genomic analysis (somatic mutations in the isocitrate dehydrogenase genes, methylation status of the 0⁶-methylguanine-DNA methyltransferase gene promoter). To adapt the treatment to the most recent tumor evolution, molecular information should be received regularly throughout the course of therapy. However, tumor tissue is often not available for diagnosis as the disease progresses. In this regard, the development of less invasive methods, such as analysis of the proteome of biological fluids of patients, is of particular interest. Cerebrospinal fluid (CSF) is an important source disease biomarkers to monitor the presence and progression of the disease.

Aim. To identify proteomic predictive biomarkers in the CSF of patients with GB.

Materials and methods. During the study, samples of patients' CSF samples, high-resolution proteomic mass spectrometry, modern biochemical methods and bioinformatic technologies were used.

Results. For the first time, the analysis of proteomes of CSF samples of patients with GB obtained before and 7 days after the removal of the primary tumor was carried out. Potential biomarkers of GB have been identified. After their validation using open databases, 11 proteomic predictive markers of GB (S100A9, S100A8, PLA2G15, PPIB, LTBP2, VIM, LAMB1, STC1, NRP1, COL6A1, HSPA5) were selected and their role in the molecular mechanisms of gliomagenesis was assessed.

Conclusion. The proposed panel of proteomic predictive CSF biomarkers in GB patients can be further used in the development of test systems for assessing the effectiveness of therapy and early detection of disease relapses.

Keywords: glioblastoma, proteome, cerebrospinal fluid, mass spectrometry

For citation: Arnotskaya N.E., Kushnir T.I., Kudryavtsev I.A. et al. Identification of predictive markers in the cerebrospinal fluid of patients with glioblastoma. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2023;10(2): 117–25. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-2-117-125

ВВЕДЕНИЕ

Наиболее распространенная и агрессивная первичная опухоль головного мозга глиобластома (ГБ) пока неизлечима, несмотря на достижения в терапии других злокачественных солидных опухолей. Общая выживаемость пациентов с этой патологией остается на уровне 15–20 мес [1]. Диагностика ГБ и последующая тактика ее лечения долгое время основывались исключительно на гистопатологических признаках. Полногеномный анализ глиом выявил знаковые соматические мутации в генах изоцитратдегидрогеназы (IDH) [2], идентифицировал транскрипционно и эпигенетически определенные подмножества глиом [3] и пролил свет на их мутационный ландшафт [4]. Тем не менее статус метилирования промотора гена *MGMT* (O⁶-метилгуанин-ДНК-метилтрансфераза) остается основным параметром, определяющим тактику лечения больных глиомами, и предиктором их выживаемости [5]. Однако метилирование ДНК *MGMT* может быть прогностическим биомаркером для ответа на лечение только у пациентов с ГБ классического подтипа [6].

Терапия ГБ начинается с нейрохирургической резекции опухоли с последующими лучевой терапией и введением темозоломида [6]. Несмотря на этот режим, данная опухоль практически всегда рецидивирует, что связано с различными механизмами резистентности к терапии [7]. Для того чтобы адаптировать лечение к самой последней эволюции опухоли, молекулярная информация должна поступать регулярно на протяжении всего курса терапии. Однако опухолевая ткань часто недоступна для диагностики при прогрессировании ГБ, так как повторные операции трудно-выполнимы, сопряжены с риском и часто не приносят пользы больному с точки зрения выживаемости по сравнению с удалением первичной опухоли [8].

В связи с вышесказанным необходимо разработать менее инвазивные методы, например анализ протеома биологических жидкостей пациентов. Однако идентификация белковых маркеров часто затрудняется использованием антител, которые позволяют одновременно обнаруживать только ограниченное количество белков. Протеомная масс-спектрометрия (МС) стала мощной технологией, преодолевшей эти ограничения.

Данный метод позволяет идентифицировать и количественно определять тысячи белков в однократном эксперименте [9]. Протеомная МС уже использовалась при открытии предиктивных биомаркеров некоторых онкологических заболеваний, таких как гепатоцеллюлярная карцинома [10] и рак яичников [11].

Особый интерес представляют проксимальные жидкости, такие как спинномозговая жидкость (СМЖ) и кистозная жидкость, являющиеся важным источником биомаркеров заболевания для мониторинга наличия и прогрессирования заболевания. Спинномозговая жидкость — внеклеточная жидкость, циркулирующая в подпаутинном (субарахноидальном) пространстве головного и спинного мозга, желудочках и цистернах головного мозга. Она транспортирует биологические вещества, удаляет отходы и токсины, выделяемые мозгом. Исследование СМЖ имеет большое значение в диагностике многих неврологических заболеваний воспалительной и инфекционной природы, а также ряда опухолевых процессов.

В настоящем исследовании впервые проведен анализ протеомов образцов СМЖ больных ГБ, полученных до и после удаления первичной опухоли. Статистически значимые карты дифференциально экспрессированных белков (ДЭБ) использовались для идентификации потенциальных предиктивных биомаркеров заболевания и оценки их роли в молекулярных механизмах глиомогенеза. После их валидации с использованием открытых баз данных были отобраны 11 протеомных маркеров СМЖ, которые, по нашему мнению, могут применяться для оценки эффективности терапии ГБ и раннего выявления рецидивов заболевания.

Цель исследования — методом протеомной МС высокого разрешения провести картирование протеома СМЖ больных ГБ для идентификации потенциальных предиктивных маркеров заболевания.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение клинических образцов. Образцы СМЖ больных ГБ получали в отделении нейрохирургии Научно-исследовательского института клинической онкологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина»

Минздрава России. Проводилась люмбальная пункция до удаления первичной опухоли и спустя 7 дней после операции. Клинические данные пациентов, участвовавших в исследовании, представлены в табл. 1.

Приготовление образцов спинномозговой жидкости для масс-спектрометрии. Спинномозговую жидкость центрифугировали при 10000 об./мин в течение 10 мин, аликвотировали и хранили при температуре -80°C . Две объединенные аликвоты СМЖ до (СМЖ_{до}) и после (СМЖ_{после}) хирургического вмешательства готовили из 9 образцов СМЖ, взятых у больных ГБ до и после операции: первая содержала 950 мкг, вторая — 975 мкг белка соответственно. Спинномозговую жидкость подвергали ультрафильтрации для удаления низкомолекулярных соединений ранее описанным методом [12].

Таблица 1. Клинические данные больных глиобластомой (ГБ), участвовавших в исследовании

Table 1. Clinical data of patients with glioblastoma (GB) participating in the study

Пациент Patient	Клинический диагноз Clinical diagnosis	Пол Sex	Возраст Age
1	ГБ левой височной доли головного мозга GB of the left temporal lobe of the brain	М M	58
2	ГБ левой теменно-затылочной области головного мозга GB of the left parieto-occipital region of the brain	Ж F	65
3	ГБ правой височной доли головного мозга GB of the right temporal lobe of the brain	М M	78
4	ГБ правой теменно-затылочной области головного мозга GB of the right parietal-occipital region of the brain	М M	57
5	ГБ правой затылочной доли головного мозга GB of the right occipital lobe of the brain	М M	58
6	ГБ левой лобной доли головного мозга с кровоизлиянием GB of the left frontal lobe of the brain with hemorrhage	Ж F	63
7	ГБ правой лобной доли головного мозга GB of the right frontal lobe of the brain	Ж F	57
8	Анапластическая астроцитома правой лобной доли головного мозга Anaplastic astrocytoma of the right frontal lobe of the brain	Ж F	34
9	ГБ правой лобной доли головного мозга GB of the right frontal lobe of the brain	М M	68

После трипсинолиза объединенных образцов СМЖ [12] их упаривали при $+30^{\circ}\text{C}$ в центрифужном концентраторе Labconco CentriVap (США) и использовали для предварительного фракционирования триптических пептидов.

Фракционирование продуктов трипсинолиза биообразцов. Продукты трипсинолиза образцов СМЖ (100 мкг) растворяли в 50 мкл 0,1 % муравьиной кислоты и фракционировали на колонке Zorbax 300 Extend-C18 ($2,1 \times 500$ мм; 3,5 мкм, Agilent, США) на модульном хроматографе для высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) Agilent 1100 (Agilent, США), оборудованном коллектором фракций и ультрафиолетовым (УФ) детектором. Объем введенной пробы составлял 20 мкл, температура колонки — 25°C ; детектирование проводили по УФ-поглощению при длине волны 214, 254 и 280 нм. Подвижная фаза состояла из фаз А (20 мМ NH_4OH , pH 10) и В (20 % фазы А плюс 80 % ацетонитрила). Колонку уравнивали фазой А в течение 30 мин перед вводом образца. Градиент подвижной фазы при скорости потока 300 мкл/мин устанавливали следующим образом: а) от 0 до 5 мин — 0 % фазы В; б) от 5 до 35 мин — от 0 до 35 % фазы В; в) от 35 до 45 мин — от 35 до 100 % фазы В; г) от 45 до 60 мин — 100 % фазы В; д) от 60 до 70 мин — от 100 до 0 % фазы В. Всего было собрано 12 фракций от 0 до 50 мин с интервалами 1,5 и 3 мин. Фракции упаривали досуха при 30°C на центрифужном концентраторе Labconco CentriVap (Labconco, США) и повторно разбавляли 100 мкл 0,1 % муравьиной кислоты для МС-анализа.

Масс-спектрометрический анализ. Анализ триптических пептидов проводили с использованием нано-ВЭЖХ-Dionex Ultimate 3000 и масс-спектрометра LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific Inc., США) с источником ионизации NanoSpray [12]. Масс-спектрометрические данные обрабатывали с помощью программ MaxQuant 1.6.17.0 (Biochemistry Computational Systems, Biochemistry Max Planck, Martinsried, Германия) и Perseus 1.6.0.7 (Max Planck Institute of Biochemistry, Германия).

Биоинформатический анализ. Биоинформатический анализ проводили с использованием программы DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery; <https://david.ncifcrf.gov>), а также открытой базы данных PubMed (www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed). Информацию по экспрессии матричной РНК (мРНК) и белков в опухолевой и нормальной тканях получали из баз «Атлас ракового генома» (The Cancer Genome Atlas, TCGA), Clinical Proteomic Tumor Analysis Consortium (CPTAC) и International Cancer Proteogenome Consortium (ICPC). Анализ данных для группы мРНК в базе TCGA с учетом субтипов ГБ выполняли с помощью программы Glioblastoma BioDiscovery Portal (GBM-BioDP) (<https://gbm-biodp.nci.nih.gov/#genes>). Корреляцию между экспрессией генов и их клинической значимостью анализировали с использованием UALCAN (<https://ualcan.path.uab.edu/index.html>).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Картирование протеома спинномозговой жидкости больных глиобластомой до и после хирургического вмешательства. Для идентификации потенциальных предиктивных маркеров ГБ в настоящей работе впервые выполнен сравнительный протеомный анализ объединенных образцов СМЖ_{до} и СМЖ_{после} 9 больных ГБ (см. табл. 1), полученных до и после хирургического удаления первичной опухоли. Мы использовали label-free количественный метод ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием (нано-ВЭЖХ-МС/МС) для панорамного картирования протеомов 2 типов образцов (в триплетах) без предварительного снижения уровней высокопредставленных белков.

Протеомный анализ триптических пептидов 2 образцов СМЖ с использованием программы MaxQuant позволил идентифицировать в общей сложности 911 белков путем сопоставления тандемных (МС/МС) масс-спектров с пептидными последовательностями в базе данных UniProtKB_human с ложным уровнем обнаружения (false discovery rate, FDR) 1 % для тройных повторов 2 видов образцов. В ходе обработки данных с помощью программы Perseus было распознано следующее количество белков: образец 01 (СМЖ_{до}) — 691 белок по 5176 пептидам (2605 уникальных пептидов); образец 02 (СМЖ_{после}) — 837 белков по 5411 пептидам (2787 уникальных пептидов). Из них 69 % протенинов идентифицировали по совпадению 2 и более пептидов и 31 % — по совпадению 1 пептида. Процент сиквенс-покрытия исследуемых белков изменялся от 0,2 до 97,4 %. Коэффициент корреляции Пирсона между образцами СМЖ_{после} и СМЖ_{до} варьировал от 0,81 до 0,90.

Дифференциально экспрессированными оказались 266 протеинов; они присутствовали в обоих образцах СМЖ и имели статистически значимые изменения экспрессии в СМЖ_{до} по сравнению с СМЖ_{после} ($p < 0,05$) с кратностью изменения >2 или $<0,5$. Экспрессия 128 белков была выше, а 138 белков — ниже в СМЖ_{до} по сравнению с СМЖ_{после}. Увеличение экспрессии более чем на порядок наблюдали у 28 ДЭБ, включая HSP90AA1, LTF, GOLPH2, CCDC42, ATL2, ARFIP1 и MERP1. Одновременно снижение экспрессии более чем на порядок отмечали для 31 ДЭБ, включая GPR37, VCAN, F10, SHISA5, MRC1L1, ATP1A3 и TGOLN2.

Результаты биоинформатического анализа. Данные протеомного картирования ДЭБ СМЖ до и после удаления первичной опухоли подвергали сравнительному биоинформатическому анализу. Каждый из 266 ДЭБ классифицировали по клеточной локализации с использованием открытых баз данных, указанных выше. Если один белок был обнаружен более чем в одном клеточном компартменте, он также учитывался. Большую часть ДЭБ составляли сигнальные протеины (63,1 %). Белки СМЖ в основном были локализованы во внеклеточной области (49,4 %), межклеточном пространстве (13 %), экзосомах (43,9 %), лизосомах (32,4 %) и плазматической мембране (37,5 %).

Классификация белков СМЖ по биологическим процессам показала, что большинство протеинов вовлечены в сигнальную трансдукцию (28,1 %), клеточную коммуникацию (27,3 %), рост клеток и их развитие (16,1 %), метаболизм белков (15 %) и общий метаболизм (12,7 %).

Основная часть белков СМЖ выполняла молекулярные функции, проявляя активность клеточных адгезивных молекул (7,9 %), внеклеточных матричных компонентов (6,7 %), рецепторную (6 %) и каталитическую (4,9 %).

Идентификация потенциальных предиктивных маркеров глиобластомы. Проводили сравнительный анализ

Таблица 2. Изменение экспрессии потенциальных предиктивных маркеров спинномозговой жидкости (СМЖ) после хирургического удаления первичной глиобластомы ($p < 0,05$)

Table 2. Changes in the expression of potential predictive cerebrospinal fluid (CSF) markers after surgical removal of the primary glioblastoma ($p < 0.05$)

Ген Gene	Белок Protein	СМЖ _{до} / СМЖ _{после} CSF _{before} / CSF _{after}
<i>S100A9</i>	Протеин S100-A9 Protein S100-A9	13,7
<i>PLA2G15</i>	Группа XV фосфолипаза A2 Group XV phospholipase A2	6,2
<i>PPIB</i>	Пептидил-пролил-цис-транс-изомераза B Peptidyl-prolylcis-trans isomerase B	5,8
<i>LTBP2</i>	Бета-связывающий белок 2 латентного трансформирующего фактора роста Latent-transforming growth factor beta-binding protein 2	4,2
<i>VIM</i>	Виментин Vimentin	3,1
<i>LAMB1</i>	Субъединица ламинина бета-1 Laminin subunit beta-1	2,6
<i>STC1</i>	Станниокальцин-1 Stanniocalcin-1	2,6
<i>S100A8</i>	Протеин S100-A8 Protein S100-A8	2,2
<i>NRP1</i>	Нейропилин-1 Neuropilin-1	2,2
<i>COL6A1</i>	Цепь коллагена альфа-1 (VI) Collagen alpha-1 (VI) chain	1,8
<i>HSPA5</i>	Белок 78 кДа, регулируемый глюкозой 78 kDa glucose-regulated protein	1,5

Примечание. СМЖ_{до} — образцы СМЖ, взятые до операции; СМЖ_{после} — образцы СМЖ, взятые после операции.

Note. CSF_{before} — CSF samples taken before surgery; CSF_{after} — CSF samples taken after surgery.

протеомных карт СМЖ больных ГБ, полученных до удаления первичной опухоли и спустя 7 дней после операции. Повышенное внимание уделяли 128 ДЭБ, экспрессия которых снижалась после хирургического вмешательства. Дополнительную фильтрацию кандидатных протеинов осуществляли с учетом их участия в патогенезе ГБ или других злокачественных новообразований (PubMed), уровней этих белков и экспрессии их мРНК в опухолевой ткани по сравнению с нормальной тканью головного мозга, взятой в районе первичной опухоли (базы TCGA, CPTAC, ICPC), а также клинической значимости. В результате были отобраны 11 кандидатных маркеров, включая 9 ДЭБ и COL6A1, HSPA5, данные по которым представлены в табл. 2. Проведенный анализ показал, что уровни 3 белков из этого списка (S100A9, PLA2G15, PPIB) в СМЖ больных ГБ после удаления опухоли снижались более чем в 5 раз.

Для оценки клинической значимости панели генов, кодирующих группу потенциальных предиктивных маркеров ГБ (S100A9, PLA2G15, PPIB, LTBP2, VIM, LAMB1, STC1, S100A8, NRP1, COL6A1, HSPA5), с помощью программы GBM-BioDP строили кривые Каплана–Майера для 4 субтипов ГБ (классического, мезенхимального, пронеурального и нейрального) на основе мультигенного прогностического индекса отношения рисков (ОР) (отношения риска события в определенный момент времени (t) в одной и другой группах) (рис. 1). Показатель относится к методам оценки выживаемости и оценивается при проведении регрессионного анализа. Отношение рисков связано с вероятностью того, что событие, не произошедшее к определенному моменту времени, случится в следующий интервал времени. Вероятность того, что событие в одной группе наступит раньше, чем в другой, может быть рассчитана на основании показателя ОР по формуле:

$$p = \text{OP} / (1 + \text{OP}).$$

Согласно данным, представленным на рис. 1, для всех субтипов ГБ наблюдаются статистически значимые значения HR с диапазоном изменения величин от 1,84 до 8,38, что указывает на достоверное увеличение показателей общей выживаемости больных ГБ при снижении мультигенного параметра.

ОБСУЖДЕНИЕ

На протяжении последних лет СМЖ активно изучается как перспективный источник биомаркеров глиом [13]. Протеомный анализ ликвора дал много полезной информации о потенциальных маркерах этих заболеваний, однако, к сожалению, большинство из них оказались низкоспецифичными и не нашли применения в клинической практике [14]. Описанная ситуация оправдывает необходимость продолжения исследований в данном направлении и поиска причин отрица-

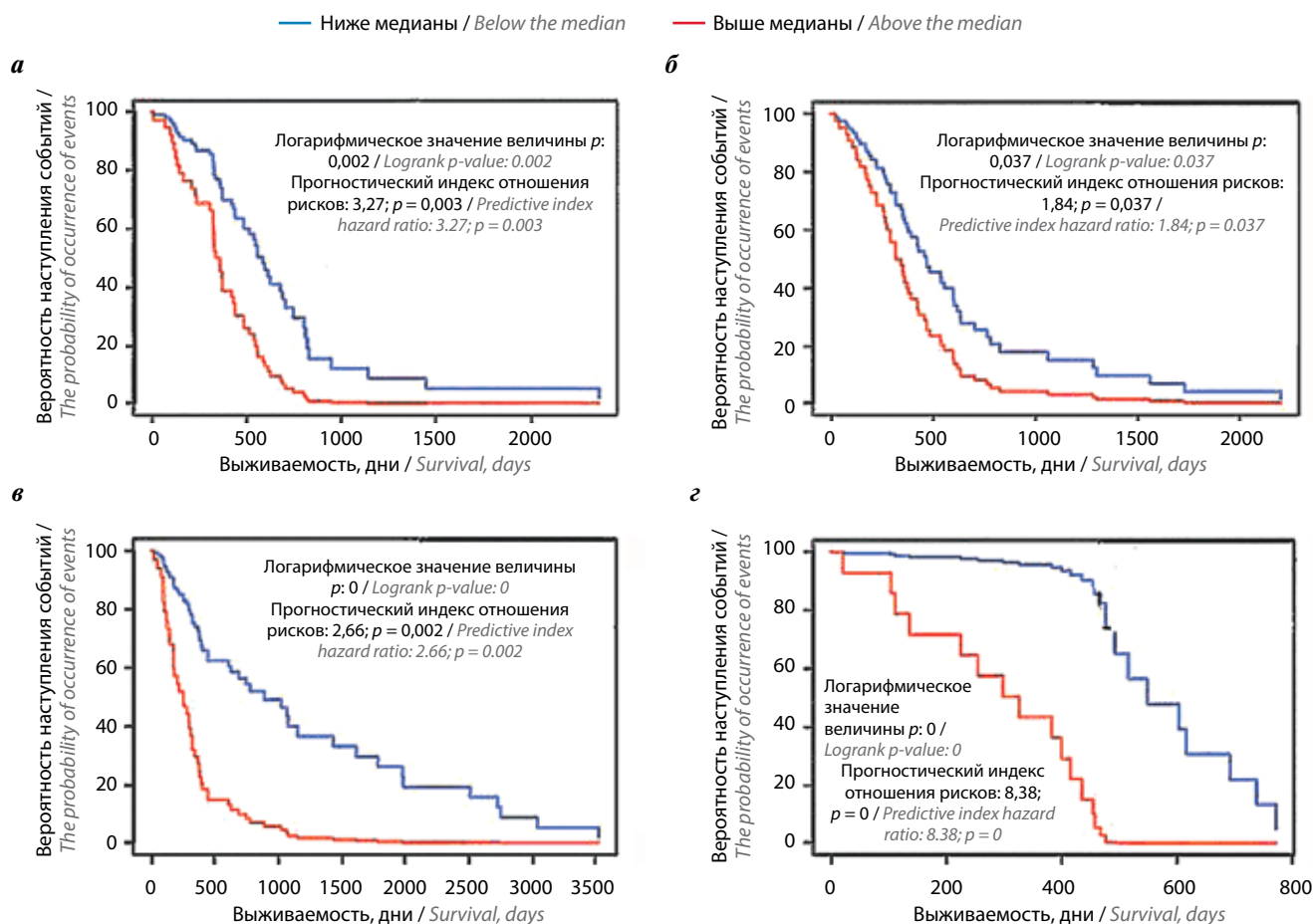
тельного результата. Анализ литературы показал, в частности, что во всех более ранних работах в качестве контроля использовались образцы ликвора от больных неонкологическими патологиями, а вектор исследований в основном был направлен на идентификацию диагностических биомаркеров глиом.

В данном исследовании впервые выполнен сравнительный протеомный анализ СМЖ больных ГБ до и после хирургического удаления первичной опухоли. Такой подход позволяет более точно обнаруживать ДЭБ, имеющие отношение к опухолевому процессу, и формировать панель предиктивных маркеров. Полученные результаты указывают на значительные изменения в протеомном составе СМЖ пациентов спустя 7 дней после оперативного вмешательства, что подтверждается довольно большим количеством ДЭБ. Из 911 идентифицированных протеинов 14 % снижали экспрессию, а 15 % – повышали ($p < 0,05$) более чем в 2 раза. Важно отметить, что внеклеточные белки составляли основную часть протеома СМЖ человека. Большая часть ДЭБ (55,4 %) участвовала в сигнальной трансдукции и клеточной коммуникации.

При идентификации потенциальных предиктивных маркеров основное внимание уделялось ДЭБ, уровни которых снижались после удаления первичной опухоли. В процессе отбора кандидатных белков проводили их многоступенчатую фильтрацию с применением открытых баз данных. Во-первых, оставили группу белков, уровни которых были значительно повышены в опухолевой ткани по сравнению с нормальной тканью головного мозга (базы CPTAC и ICPC). Во-вторых, из полученного списка отобрали только белки с увеличенной экспрессией их мРНК в опухолевой ткани по отношению к норме (база TCGA). В-третьих, исключили протеины, для мРНК которых кривые Каплана–Майера статистически значимо не показывали увеличение показателей общей выживаемости больных ГБ. В результате получили список из 11 потенциальных предиктивных маркеров ГБ (S100A9, PLA2G15, PPIB, LTBP2, VIM, LAMB1, STC1, S100A8, NRP1, COL6A1, HSPA5).

Мультигенный анализ клинической значимости полученной тест-системы, по данным TCGA (AgilentG4502A_07_1/2; 497 больных ГБ), выполнили с помощью программы GBM-BioDP с использованием модели пропорциональных интенсивностей Кокса. Согласно данным, представленным на рис. 1, снижение в опухоли экспрессии мРНК, отвечающих перечисленным выше белкам, приводит к увеличению показателей общей выживаемости пациентов с ГБ. Наибольший эффект наблюдался у больных с пронеуральным и нейральным субтипами ГБ.

Согласно данным, представленным в табл. 2, при удалении первичной опухоли уровни белков S100A8 и S100A9 в СМЖ больных ГБ снижались в 2,2 и 13,7 раза соответственно. Экспрессия S100A8/A9 значительно увеличена в мезенхимальном субтипе ГБ и в подгруппе



Анализ выживаемости 497 больных с классическим (а), мезенхимальным (б), пронеуральным (в) и нейральным (з) субтипами глиобластомы на основе мультигенного прогностического индекса отношения рисков с использованием данных по матричным РНК потенциальных предиктивных маркеров из базы «Атлас ракового генома» (<https://gbm-biopd.nci.nih.gov/#genes>)

Survival analysis of 497 patients with with classical (a), mesenchymal (б), pronural (в), and neural (з) subtypes of glioblastoma based on the multigenic prognostic index Hazard ratio using matrix RNA data of potential predictive markers from The Cancer Genome Atlas Database (<https://gbm-biopd.nci.nih.gov/#genes>)

дикого типа IDH1, более агрессивном и с плохим прогнозом [15]. Концентрации S100A8/9 повышены в сыворотке крови больных ГБ, но только уровни S100A8 коррелировали с выживаемостью пациентов [15]. S100A8/A9 высоко экспрессируются в опухолевых стволовых клетках и стимулируют миграцию и инвазию клеток глиомы [15].

Гипоксия идентифицирована как новый регулятор экспрессии S100A8/A9. В отличие от S100A8, уровни S100A9 и фактора, индуцируемого гипоксией, 1- α (hypoxia-induced factor-1 α , HIF-1 α) заметно коррелировали со временем до рецидива [16].

LYPLA3. Этот белок кодируется геном *PLA2G15*, участвует в метаболизме липидов, обладает кальций-независимой активностью, опосредует внутри- и внеклеточную передачу сигналов и влияет на различные онкогенные процессы, включая миграцию клеток, инвазию, пролиферацию и ангиогенез [17]. J.E. Jang и соавт. обнаружили, что NFATC3-PLA2G15 FT (транскрипт слияния) регулирует клеточную пролиферацию в качестве гена-драйвера в клеточных линиях колорек-

тального рака, однако функциональные механизмы этого процесса пока не раскрыты [17].

PP1B. Данный белок регулирует свойства глиальных клеток, ускоряя в них превращение транс-конформации в цис-конформацию протеинов, таких как GFAP и NDRG2, что приводит к изменению активности глиальных клеток [18]. В базах данных TCGA, Lembrandt и Severance отмечено увеличение экспрессии PP1B в зависимости от степени злокачественности глиомы. Клетки U87 и TS15–88 имели высокий уровень PP1B, коррелирующий с пролиферацией клеток ГБ. Также этот маркер регулирует рост глиомасфер через процесс убиквитинирования с помощью лигазы E3 [18].

LTBP2. Этот протеин является членом суперсемейства белков внеклеточного матрикса фибриллин/LTBP [19], играет большую роль в клеточной адгезии [20] и может косвенно модулировать активность трансформирующего фактора роста β (transforming growth factor- β , TGF- β), высвобождая LTBP1 из микрофирилл. Участие LTBP2 в патогенезе злокачественных

опухолей остается неясным. Предложены молекулярные механизмы, объясняющие роль этого маркера как в развитии опухоли, так и в подавлении ее роста [19]. Показано, что экспрессия LTBP2 повышается в тканях и клеточных линиях рака желудка и связана с глубиной инвазии опухоли и стадией метастазирования. Кроме того, снижение экспрессии LTBP2 в клетках рака желудка эффективно подавляет их пролиферацию, миграцию, инвазию и эпителиально-мезенхимальный переход, супрессирует активность GSH и GPX4, приводя к ферроптозу [21].

Виментин. В настоящее время виментин (VIM) рассматривается как маркер высокоагрессивных и метастатических форм почти всех видов рака. Более высокая экспрессия VIM связана с прогрессированием ГБ и снижением показателей выживаемости у пациентов. Активация этого белка наблюдалась в классическом и мезенхимальном подтипах ГБ, а переходы от классической к мезенхимальной ГБ коррелировали с более высокой экспрессией VIM и повышенной пролиферацией и миграцией клеток опухоли [22]. Подавление экспрессии VIM снижало инвазию и миграцию опухолевых клеток, действуя как регулятор AXL рецептора тирозинкиназы [23].

Гипоксия вызывает изменения в локализации сети промежуточных филаментов VIM [24], а экспрессия HIF-1 α положительно коррелирует с уровнями маркеров эпителиально-мезенхимального перехода (LOX и VIM) в клетках ГБ [25].

LAMB1. Этот белок участвует во многих биологических процессах, включая клеточную адгезию, дифференцировку, миграцию, передачу сигналов и метастазирование [26]. LAMB1 высоко экспрессирован в глиомах высокой степени злокачественности, что предполагает его участие в прогрессировании опухолевого процесса [27]. Этот белок взаимодействует с интегринами на поверхности опухолевых клеток [28], способствуя их адгезии и миграции. Кроме того, LAMB1 влияет на экспрессию факторов роста и промоторов инвазии, таких как фактор роста эндотелия сосудов (vascular endothelial growth factor, VEGF), TGF- β и матриксная металлопротеиназа 2 (MMP-2), что усиливает процессы ангиогенеза и инвазии [27].

STC1. Этот гликопротеин связан с ангиогенезом, клеточной пролиферацией, инвазией, метастазированием, апоптозом и воспалением [29, 30]. Повышенная экспрессия STC1, наблюдаемая при ГБ, способствует прогрессированию заболеваний [30]. Кроме того, экспрессия STC1 увеличивается в условиях гипоксии, а HIF1- α активирует STC1 в опухолевых клетках [31, 32]. Концентрация этого гликопротеина в СМЖ при ГБ выше, чем при глиоме низкой степени злокачественности [32]. Сообщается, что STC1 активирует сигнальный каскад PI3K (phosphoinositide-3-kinase, фосфоинозитид-3-киназа)/Akt и JNK [33].

NRP1. Этот белок высоко экспрессируется в клетках ГБ [34], и его повышенная экспрессия связана с плохим прогнозом у пациентов [35]. NRP1 регулирует

ангиогенез и действует как корецептор для TGF- β , фактора роста тромбоцитов (platelet-derived growth factor) и нейротрофического фактора глиальной клеточной линии (glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF) [34]. GDNF увеличивает экспрессию мРНК и белка NRP1 и способствует прогрессированию ГБ [34]. Сообщается, что субпопуляция клеток NRP1+ демонстрирует повышенную экспрессию маркеров плюрипотентности и высокие способности клеток к миграции и самообновлению. Помимо этого, NRP1 является прямой мишенью HIF-1 α , повышающего экспрессию E-кадгерина, MMP-2 и VIM в условиях гипоксии [36].

COL6A1. Этот белок участвует в миграции и инвазии опухолевых клеток [37, 38], а его экспрессия в глиоме значительно выше, чем в окружающих нормальных тканях [38]. COL6A1 связан с ангиогенезом в условиях гипоксической микросреды через VEGF и сигнальный путь PI3K/Akt [37, 38]. Под контролем P4HA1 в условиях гипоксии COL6A1 повышает экспрессию CD31 и дифференцировку опухолевых стволовых клеток в эндотелиальные клетки в опытах *in vitro* и *in vivo*. Предполагается, что сигнальный путь P4HA1/COL6A1 является адаптивным ответом на гипоксическую микросреду [37].

HSPA5. Данный белок индуцирует окислительный стресс, гипоксию [39] и способствует агрессивному росту и радиорезистентности ГБ. HSPA5 может активировать онкогенные пути, участвуя в регуляции пролиферации, апоптоза и подвижности опухолевых клеток [40]. По сравнению с первичными глиомами этот белок высоко экспрессирован в рецидивирующих глиомах и, как полагают, является потенциальным предиктивным маркером [39]. Таргетирование HSPA5 подавляет самообновление и радиорезистентность опухолевых стволовых клеток (особенно мезенхимального подтипа) *in vitro* и *in vivo*, что сопровождается подавлением путей STAT3, ядерного фактора каппа-би (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, NF- κ B) и C/EBP β [40].

На основе полученных результатов можно сделать вывод о том, что СМЖ является уникальным биологическим объектом для открытия протеомных маркеров ГБ. Удаление первичной опухоли приводит к изменению протеомного ландшафта СМЖ больных ГБ, что может успешно использоваться для идентификации потенциальных предиктивных маркеров заболевания, играющих важную роль в глиоматогенезе. Биоинформатический комплексный анализ протеомных карт СМЖ, полученных на разных этапах терапии ГБ, представляет новые возможности для оценки эффективности терапии и предсказания рецидива заболевания. Открытые протеомные и геномные базы облегчают отбор и валидацию потенциальных биомаркеров ГБ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Спинномозговая жидкость — уникальный источник биомаркеров ГБ для мониторинга наличия и про-

грессирования заболевания. В настоящем исследовании впервые проведено картирование протеома СМЖ больных ГБ до и после хирургического удаления первичной опухоли. В целом идентифицированы 911 протеинов, 266 из которых являлись ДЭБ. Полученные результаты указывают на значительные изменения в протеомном составе СМЖ больных ГБ после оперативного вмешательства, что может успешно использоваться для иден-

тификации потенциальных предиктивных маркеров. В результате комплексного биоинформатического анализа ДЭБ с использованием открытых баз данных предложена основа для создания тест-системы из 11 потенциальных предиктивных маркеров ГБ (S100A9, PLA2G15, PPIB, LTBP2, VIM, LAMB1, STC1, S100A8, NRP1, COL6A1, HSPA5) для оценки эффективности терапии и предсказания рецидива заболевания.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Stupp R., Mason W.P., van den Bent M.J. et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 2005;352:987–96. DOI: 10.1056/NEJMo a043330
2. Yan H., Parsons D.W., Jin G. et al. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med* 2009;360(8):765–73. DOI: 10.1056/nejmo a0808710
3. Sturm D., Witt H., Hovestadt V. et al. Hotspot mutations in H3F3A and IDH1 define distinct epigenetic and biological subgroups of glioblastoma. *Cancer Cell* 2012;22(4):425–37. DOI: 10.1016/j.ccr.2012.08.024
4. Brennan C.W., Verhaak R.G.W., McKenna A. et al. The somatic genomic landscape of glioblastoma. *Cell* 2013;155(2):462–77. DOI: 10.1016/j.cell.2013.09.034
5. Wick A., Kessler T., Platten M. et al. Superiority of temozolomide over radiotherapy for elderly patients with RTK II methylation class, MGMT promoter methylated malignant astrocytoma. *Neurooncol* 2020;22(8):1162–72. DOI: 10.1093/neuonc/noaa033
6. Weller M., van den Bent M., Preusser M. et al. EANO guidelines on the diagnosis and treatment of diffuse gliomas of adulthood. *Nat Rev Clin Oncol* 2021;18(3):170–86. DOI: 10.1038/s41571-020-00447-z
7. Sørensen M.D., Fosmark S., Hellwege S. et al. Chemoresistance and chemotherapy targeting stem-like cells in malignant glioma. *Adv Exp Med Biol* 2015;853:111–38. DOI: 10.1007/978-3-319-16537-0
8. Sastry R.A., Shankar G.M., Gerstner E.R. et al. The impact of surgery on survival after progression of glioblastoma: a retrospective cohort analysis of a contemporary patient population. *J Clin Neurosci* 2018;53:41–7. DOI: 10.1016/j.jocn.2018.04.004
9. Aebersold R., Mann M. Mass-spectrometric exploration of proteome structure and function. *Nature* 2016;537(7620):347–55. DOI: 10.1038/nature19949
10. Jiang Y., Sun A., Zhao Y. et al. Proteomics identifies new therapeutic targets of early-stage hepatocellular carcinoma. *Nature* 2019;567(7747):257–61. DOI: 10.1038/s41586-019-0987-8
11. Coscia F., Lengyel E., Duraiswamy J. et al. Multi-level proteomics identifies CT45 as a chemosensitivity mediator and immunotherapy target in ovarian cancer. *Cell* 2014;175(1):159–70. DOI: 10.1016/j.cell.2018.08.065
12. Bryukhovetskiy A., Shevchenko V., Kovalev S. et al. To the novel paradigm of proteome-based cell therapy of tumors: through comparative proteome mapping of tumor stem cells and tissuespecific stem cells of humans. *Cell Transplant* 2014;23(Suppl. 1):151–70. DOI: 10.3727/096368914X684907
13. Shen F., Zhang Y., Yao Y. et al. Proteomic analysis of cerebrospinal fluid: toward the identification of biomarkers for gliomas. *Neurosurg Rev* 2014;37(3):367–80. DOI: 10.1007/s10143-014-0539-5
14. Schmid D., Warnken U., Latzer P. et al. Diagnostic biomarkers from proteomic characterization of cerebrospinal fluid in patients with brain malignancies. *J Neurochem* 2021;158(2):522–38. DOI: 10.1111/jnc.15350
15. Wang H., Mao X., Ye L. et al. The role of the S100 protein family in glioma. *J Cancer* 2022;13(10):3022–30. DOI: 10.7150/jca.73365
16. Grebhardt S., Veltkamp C., Ströbel P. et al. Hypoxia and HIF-1 increase S100A8 and S100A9 expression in prostate cancer. *Int J Cancer* 2012;131(12):2785–94. DOI: 10.1002/ijc.27591
17. Jang J.E., Kim H.P., Han S.W. et al. NFATC3-PLA2G15 fusion transcript identified by RNA sequencing promotes tumor invasion and proliferation in colorectal cancer cell lines. *Cancer Res Treat* 2019;51(1):391–401. DOI: 10.4143/crt.2018.103
18. Oh Y., Lee E.H., Kang S.G. PPIB is overexpressed in glioblastoma and regulates tumor growth by inducing self-ubiquitination by E3 ligase, Smurf2. *Brain Tumor Res Treat* 2022;10:S255. DOI: 10.14791/btrt.2022.10.F-1443
19. Zhao J., Liu X., Cong K. et al. The prognostic significance of LTBP2 for malignant tumors: Evidence based on 11 observational studies. *Medicine* 2022;101(17):e29207. DOI: 10.1097/MD.00000000000029207
20. Wang J., Liang W.J., Min G.T. et al. LTBP2 promotes the migration and invasion of gastric cancer cells and predicts poor outcome of patients with gastric cancer. *Int J Oncol* 2018;52(6):1886–98. DOI: 10.3892/ijo.2018.4356
21. Wang T.A., Zhou Z., Wang C. et al. LTBP2 knockdown promotes ferroptosis in gastric cancer cells through p62-keap1-Nrf2 pathway. *BioMed Res Int* 2022;2022:1–15. DOI: 10.1155/2022/6532253
22. Li Q., Aishwarya S., Li J.P. et al. Gene expression profiling of glioblastoma to recognize potential biomarker candidates. *Front Genet* 2022;13:832742. DOI: 10.3389/fgene.2022.832742
23. Lin H., Hong Y., Huang B. et al. Vimentin overexpressions induced by cell hypoxia promote vasculogenic mimicry by renal cell carcinoma cells. *BioMed Res Int* 2019;2019:1–13. DOI: 10.1155/2019/7259691
24. Liu T., Guevara O.E., Warburton R.R. et al. Regulation of vimentin intermediate filaments in endothelial cells by hypoxia. *Am J Physiol* 2010;299(2):363–73. DOI: 10.1152/ajpcell.00057.2010
25. Srivastava C., Irshad K., Dikshit B. et al. FAT1 modulates EMT and stemness genes expression in hypoxic glioblastoma. *Int J Cancer* 2018;142(4):805–12. DOI: 10.1002/ijc.31092
26. Li Y., Deng G., Qi Y. et al. Bioinformatic profiling of prognosis-related genes in malignant glioma microenvironment. *Med Sci Monit* 2020;26:e924054-1. DOI: 10.12659/MSM.924054
27. Chen T.Y., Liu Y., Chen L. et al. Identification of the potential biomarkers in patients with glioma: a weighted gene co-expression network analysis. *Carcinogenesis* 2020;41(6):743–50. DOI: 10.1093/carcin/bgz194
28. Virga J., Bognár L., Hortobágyi T. et al. Prognostic role of the expression of invasion-related molecules in glioblastoma. *J Neurol Surg A: Cent Eur Neurosurg* 2017;78(1):12–9. DOI: 10.1055/s-0036-1584920
29. Zhang F., Wang X., Bai Y. et al. Development and validation of a hypoxia-related signature for predicting survival outcomes in patients with bladder cancer. *Front Genet* 2021;12:670384. DOI: 10.3389/fgene.2021.670384
30. Xiong Y., Wang Q. STC1 regulates glioblastoma migration and invasion via the TGF β /SMAD4 signaling pathway. *Mol Med Rep* 2019;20(4):3055–64. DOI: 10.3892/mmr.2019.10579

31. Yeung H.Y., Lai K.P., Chan H.Y. et al. Hypoxia-inducible factor-1-mediated activation of stanniocalcin-1 in human cancer cells. *Endocrinology* 2005;146(11):4951–60. DOI: 10.1210/en.2005-0365
32. Sakata J., Sasayama T., Tanaka K. et al. MicroRNA regulating stanniocalcin-1 is a metastasis and dissemination promoting factor in glioblastoma. *J Neurooncol* 2019;142:241–51. DOI: 10.1007/s11060-019-03113-2
33. Ma X., Gu L., Li H. et al. Hypoxia-induced overexpression of stanniocalcin-1 is associated with the metastasis of early stage clear cell renal cell carcinoma. *J Transl Med* 2015;13(1):1–14. DOI: 10.1186/s12967-015-0421-4
34. Sun S., Lei Y., Li Q. et al. Neuropilin-1 is a glial cell line-derived neurotrophic factor receptor in glioblastoma. *Oncotarget* 2017;8(43):74019–35. DOI: 10.18632/oncotarget.18630
35. Liu Y., Liu Y., Gao Y. et al. H19-and hsa-miR-338-3p-mediated NRP1 expression is an independent predictor of poor prognosis in glioblastoma. *PloS One* 2021;16(11):e0260103. DOI: 10.1371/journal.pone.0260103
36. Fu R., Du W., Ding Z. et al. HIF-1 α promoted vasculogenic mimicry formation in lung adenocarcinoma through NRP1 upregulation in the hypoxic tumor microenvironment. *Cell Death Dis* 2021;12(4):394. DOI: 10.1038/s41419-021-03682-z
37. Han X., Wang Q., Fang S. et al. P4HA1 Regulates CD31 *via* COL6A1 in the Transition of Glioblastoma Stem-Like Cells to Tumor Endothelial Cells. *Front Oncol* 2022;12:836511. DOI: 10.3389/fonc.2022.836511
38. Lin H., Yang Y., Hou C. et al. Identification of COL6A1 as the key gene associated with antivascular endothelial growth factor therapy in glioblastoma multiforme. *Genet Test Mol Biomarkers* 2021;25(5):334–45. DOI: 10.1089/gtmb.2020.0279
39. Wen X., Chen X., Chen X. Increased expression of GRP78 correlates with adverse outcome in recurrent glioblastoma multiforme patients. *Turk Neurosurgery* 2020;30(1):11–6. DOI: 10.5137/1019-5149.jtn.21840-17.4
40. Chen Z., Wang H., Zhang Z. et al. Cell surface GRP78 regulates BACE2 *via* lysosome-dependent manner to maintain mesenchymal phenotype of glioma stem cells. *J Exp Clin Cancer Res* 2021;40(1):1–17. DOI: 10.1186/s13046-020-01807-4

Вклад авторов

Н.Е. Арноцкая: получение масс-спектрометрических данных, редактирование статьи;
 Т.И. Кушнир: статистический анализ данных;
 И.А. Кудрявцев: подготовка образцов для анализа;
 А.А. Митрофанов: обзор публикаций по теме статьи;
 А.Х. Бекашев: научное редактирование статьи;
 В.Е. Шевченко: разработка дизайна исследования, анализ полученных данных, написание текста статьи.

Authors' contributions

N.E. Arnotskaya: obtaining mass spectrometric data, editing editing.
 T.I. Kushnir: statistical data analysis;
 I.A. Kudryavtsev: preparation of samples for analysis;
 A.A. Mitrofanov: review of publications on the topic of the article;
 A.Kh. Bekyashev: scientific editing;
 V.E. Shevchenko: developing the research design, analysis of the received data, article writing.

ORCID авторов / ORCID of authors

Н.Е. Арноцкая / N.E. Arnotskaya: <https://orcid.org/0000-0002-0154-8604>
 Т.И. Кушнир / T.I. Kushnir: <https://orcid.org/0000-0001-9626-6847>
 И.А. Кудрявцев / I.A. Kudryavtsev: <https://orcid.org/0000-0001-7588-1066>
 А.А. Митрофанов / A.A. Mitrofanov: <https://orcid.org/0000-0002-4125-7342>
 А.Х. Бекашев / A.Kh. Bekyashev: <https://orcid.org/0000-0002-4160-9598>
 В.Е. Шевченко / V.E. Shevchenko: <https://orcid.org/0000-0002-0401-9900>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Финансируется в рамках государственной темы № 2021-76.
Funding. It is funded under the state budget theme No. 2021-76.

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики

Протокол исследования одобрен локальным этическим комитетом ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.
 Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.
Compliance with patient rights and principles of bioethics
 The protocol of the study was approved by the local ethics committee of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia.
 All patients gave written informed consent to participate in the study.

Статья поступила: 19.04.2023. **Принята к публикации:** 29.05.2023.
Article submitted: 19.04.2023. **Accepted for publication:** 29.05.2023.