

БИОХИМИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022

Обухова Л.М.¹, Евдокимов И.И.², Медяник И.А.¹, Орлинская Н.Ю.¹, Гришин А.С.¹, Бабинцев В.Е.¹,
Барин Ю.А.¹, Конторщиков М.М.¹, Горшкова Т.Н.³, Лазукин В.Ф.¹.

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ЭЛЕМЕНТНОГО СТАТУСА КРОВИ ДЛЯ ОЦЕНКИ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПРОФИЛЯ ГЛИОМ

¹ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Минздрава РФ, 603950, Нижний Новгород, Россия;

²ФГБУН «Институт химии высокочистых веществ им. Г.Г. Девярых» РАН, 603951, Нижний Новгород, Россия;

³ФБУЗ «Приволжский окружной медицинский центр» Федерального медико-биологического агентства России, 603001, Нижний Новгород, Россия

Установлено, что элементный гомеостаз крови имеет отношение к глиоматозу, что повышает привлекательность анализа его компонентов как перспективных дооперационных опосредованных характеристик молекулярно-генетического профиля глиом. Цель данной работы проанализировать взаимосвязь параметров минерального обмена с иммуногистохимическими характеристиками глиальных опухолей и оценить клиническую значимость анализа элементного гомеостаза крови для дооперационной оценки молекулярного профиля глиом. Уровень онкомаркёров MGMT, Ki-67, p-53, IDH1 определяли иммуногистохимически с использованием клонов соответствующих антител. Анализ уровня микроэлементов осуществляли методом атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной плазмой, пересчитывая результаты на 1 г белка, который определяли методом Лоури. Данные об уровне онкомаркёров, полученные в первичных опухолях головного мозга (20) и в плазме крови больных глиомами (20) и практически здоровых людей (5) сопоставляли с применением ряда статистических программ. Выявлены значимые отличия уровней натрия, калия, цинка и меди в зависимости от величины митотического индекса Ki-67 и мутации генов изофермента изоцитратдегидрогеназы IDH1. Впервые отмечена значимая корреляция, показывающая согласованность между уровнем онкомаркёров глиальных опухолей и минеральным обменом крови. Выявленные зависимости углубляют понимание механизмов глиоматоза и могут быть использованы в качестве предиктивной дооперационной оценки молекулярно-генетических маркеров глиом.

Ключевые слова: микроэлементы; медь; цинк; макроэлементы; натрий; калий; молекулярно-генетические маркеры глиом; IDH1; MGMT; Ki 67; p 53.

Для цитирования: Обухова Л.М., Евдокимов И.И., Медяник И.А., Орлинская Н.Ю., Гришин А.С., Бабинцев В.Е., Барин Ю.А., Конторщиков М.М., Горшкова Т.Н., Лазукин В.Ф. Перспективы использования элементного статуса крови для оценки молекулярно-генетического профиля глиом. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67 (9): 497-503.
DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-9-497-503>

Для корреспонденции: Обухова Лариса Михайловна, д-р биол. наук, доц., проф. каф. биохимии им. Г.Я. Городиской; e-mail: ObuhovaLM@yandex.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Программы развития ПИМУ «Приоритет 2030» № 204.

Поступила 22.06.2022

Принята к печати 01.07.2022

Опубликовано 12.09.2022

*Obukhova L.M.¹, Evdokimov I.I.², Medyanik I.A.¹, Orlynskaya N.Yu¹, Grishin A.S.¹, Babintsev V.E.¹, Barinov Yu.A.¹,
Kontorshchikov M.M.¹, Gorshkova T.N.³, Lazukin V.F.¹*

PROSPECTS OF USING THE ELEMENTAL STATUS OF BLOOD TO ASSESS THE MOLECULAR GENETIC PROFILE OF GLIOMAS

¹Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Educational «Privolzhsky Research Medical University» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Nizhny Novgorod, 603950, Russia;

²Federal Budgetary Scientific Institution G.G. Devyatikh Institute of Chemistry High-Purity Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Nizhny Novgorod, 603951, Russia;

³Federal State-Funded Healthcare Institution "Privolzhsky District Medical Center of Federal and Biological Agency of Russia, Nizhny Novgorod, 603001, Nizhny Novgorod, Russia

It has been established that blood element homeostasis is related to gliomagenesis which increases the attractiveness of the analysis of its components as a promising preoperative mediated characteristics of the molecular genetic profile of gliomas. The aim of this work is to analyze the relationship between mineral metabolism parameters and immunohistochemical characteristics of glial tumors and evaluate the clinical significance of blood element homeostasis analysis for preoperative assessment of the molecular profile of gliomas. The levels of cancer specific markers MGMT, Ki-67, p-53, IDH1 were determined immunohistochemically using the corresponding antibody clones. Micronutrient levels were analyzed by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry recalculating the results per 1 g of protein which was determined by the Lowry method. The data on cancer-specific marker levels obtained in primary brain tumors (20) and in blood plasma of gliomas patients (20) and practically healthy subjects (5) were compared using a number of statistical programs. We found significant differences in the levels of sodium, potassium,

zinc and copper depending on the value of the mitotic index Ki-67 and IDH1 isocitrate dehydrogenase gene mutation. For the first time, a significant correlation showing the consistency between the level of glial tumor cancer-specific markers and blood mineral metabolism was observed. The revealed correlations provide new insights into understanding of gliomagenesis mechanisms and can be used as a predictive preoperative assessment of molecular genetic markers of gliomas.

Key words: trace elements; copper; zinc; macroelements; sodium; potassium; molecular genetic markers of gliomas; IDH1; MGMT; Ki 67; p 53.

For citation: Obukhova L.M., Evdokimov I. I., Medyanik I.A., Orlynskaya N.Yu., Grishin A.S., Babintsev V.E., Barinov Yu.A., Kontorshchikov M.M., Gorshkova T.N., Lazukin V.F. Prospects for the use of blood elemental status to assess the molecular genetic profile of gliomas. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67(9): 497-503 (in Russ.). DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-9-497-503>

For correspondence: Obukhova Larisa Mikhailovna, Doctor of Biological Sciences, associate professor, professor of the Department of Biochemistry. G.Ya. Gorodissky; e-mail: ObuhovaLM@yandex.ru

Information about authors:

Obukhova L.M.,	https://orcid.org/0000-0003-4064-9616 ;
Evdokimov I.I.,	https://orcid.org/0000-0002-1341-9105 ;
Medyanik I.A.,	https://orcid.org/0000-0002-7519-0959 ;
Orlynskaya N.Yu.,	https://orcid.org/0000-0003-2896-2968 ;
Grishin A.S.,	https://orcid.org/0000-0001-7885-8662 ;
Babintsev V.E.,	https://orcid.org/0000-0002-7566-0930 ;
Barinov Yu.A.,	https://orcid.org/0000-0002-4789-2048 ;
Kontorshchikov M.M.,	https://orcid.org/0000-0002-0262-5448 ;
Gorshkova T.N.,	https://orcid.org/0000-0001-9859-4123 ;
Lazukin V.F.,	https://orcid.org/0000-0003-0916-0468 .

Conflict of interest. The authors declare the absence of a conflict of interest.

Acknowledgment. This work was supported financially by PIMU Development Program "Priority 2030" № 204.

Received 22.06.2022
Accepted 01.07.2022
Published 12.09.2022

Введение. В мире ежегодно фиксируется около 240 000 новых случаев и около 175 000 смертей от опухолей мозга [1]. Начиная с 2016 г. в классификационные параметры первичных опухолей ЦНС включены ряд генетических мутаций. К наиболее часто используемым в клинической практике маркерам, определяемым с помощью иммуногистохимии, относятся мутации IDH, метилирование промотора MGMT, белок p53, уровень пролиферативной активности Ki-67 [2].

Ген IDH кодирует фермент цикла трикарбоновых кислот изоцитратдегидрогеназу [3]. Изоцитратдегидрогеназа I, которая в основном располагается в цитоплазме, катализирует окислительное декарбоксилирование изоцитрата с образованием альфа-кетоглутарата и восстановленной формы NADPH₂. Мутации IDH появляются на самых ранних этапах формирования опухоли, участвуя в глиоматогенезе [4].

Опухолевый супрессор белок p53 индуцирует апоптоз при повреждениях генома, блокирует клеточный цикл, предотвращая накопление генетически дефектных клеток [5]. Мутации TP53 приводят к инактивации соответствующего белка и дальнейшему развитию онкогенеза [6].

Ki-67 – ядерный белок, ассоциирован с пролиферацией клеток и принимает участие в синтезе рибосомальной РНК [7]. Он обнаруживается во всех активных фазах клеточного цикла и не проявляет себя в фазе покоя. Его экспрессия отражает выраженность пролиферативной активности ткани. В глиальных новообразованиях Ki-67 используется как вспомогательный маркер для дифференциальной диагностики Low Grade (I, II) и High Grade (III, IV) глиом [8, 9].

О-6-метилгуанин-ДНК-метилтрансфераза (MGMT) осуществляет репарацию ДНК [10]. Присоединение метильной группы к промотору ограничивает способность

ДНК-полимеразы связываться с ним, делая невозможным дальнейшую экспрессию гена [11]. Метилирование промотора MGMT – наиболее значимый предиктивный маркер выраженности ответа на химиотерапию алкилирующими агентами [12].

Важное предиктивное значение имеет метилирование промотора гена фермента О-6-метилгуанин-ДНК-метилтрансферазы (MGMT). Также отмечается детерминирующее и прогностическое значение многих других маркеров, к примеру, ядерного белка Ki-67, транскрипционного белка p53 [2].

Данные о молекулярном профиле глиом появляются лишь после проведения иммуногистохимического анализа биопсийного или послеоперационного материала. Достоверная информация о уровне опухолевых маркеров глиом позволит существенно повысить эффективность лечения и оптимизировать тактику ведения неоперабельных пациентов, которым, в силу расположения опухоли, невозможно провести биопсию.

Многие белки, в том числе и белки клеточных сигнальных путей, используя в качестве кофактора металлы, способны изменять свою активность в зависимости от концентрации соответствующих ионов. Поэтому неудивительно, что элементный гомеостаз играет значимую роль в патогенезе опухолевого роста через процессы пролиферации, дифференцировки, регенерации, апоптоза и некроза клеток [13,14].

Цель данной работы – проанализировать взаимосвязь параметров минерального обмена с иммуногистохимическими характеристиками глиальных опухолей и оценить клиническую значимость анализа элементного гомеостаза крови для дооперационной оценки молекулярного профиля глиом.

Материал и методы. Обследовали 20 больных с глиомами в возрасте от 39 до 61 года до проведе-

ния противоопухолевой терапии при микрохирургическом удалении опухоли под навигационным и нейрофизиологическим мониторингом с интраоперационным пробуждением и контролем речевой функции (табл. 2). Исследование одобрено этическим комитетом ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава РФ (№6 от 17.04.2019г.). У всех пациентов клинический диагноз подтвержден данными гистологического исследования опухоли в соответствии с классификацией ВОЗ опухолей ЦНС [2] (табл. 1).

Иммуногистохимическое исследование маркеров глиальных опухолей. Послеоперационный материал фиксировался в растворе 10% формалина. Перед окрашиванием проводилась стандартная процедура депарфинизации и демаскировки. Применялись следующие клоны антител: Anti-IDH1 R132H (Dianova International, Испания); Anti-MGMT (клон EP337), артикул AC-

0307RUO (Epitomics, США), Anti-p53 (клон DO-7) (Leica biosystems, Германия), антитела Ki-67 (клон SP6) (Thermo Scientific, США). Наличие мутации IDH1 оценивалось по присутствию цитоплазматической экспрессии. Уровень маркеров MGMT, Ki-67, p-53 считался по доле позитивного ядерного окрашивания. При исследовании во внимание принималось окрашивание только с умеренной или высокой выраженностью (рис. 1, а–г). Значения распространённости IDH1 и p53 были расформированы по группам: менее 1/10, от 1/10 до 1/3, от 1/3 до 1/2, более 1/2 окрашенных клеток [15, 16]. Подсчёт доли Ki-67 и MGMT осуществлялся в 10 полях зрения при увеличении $\times 400$ [17]. Значения полученных результатов выражались как доля окрашенных клеток в 10 полях зрения [18]. При исследовании наличия метилирования промотора MGMT позитивным результатом считалось ядерное окрашивание в менее 15% клеток [19].

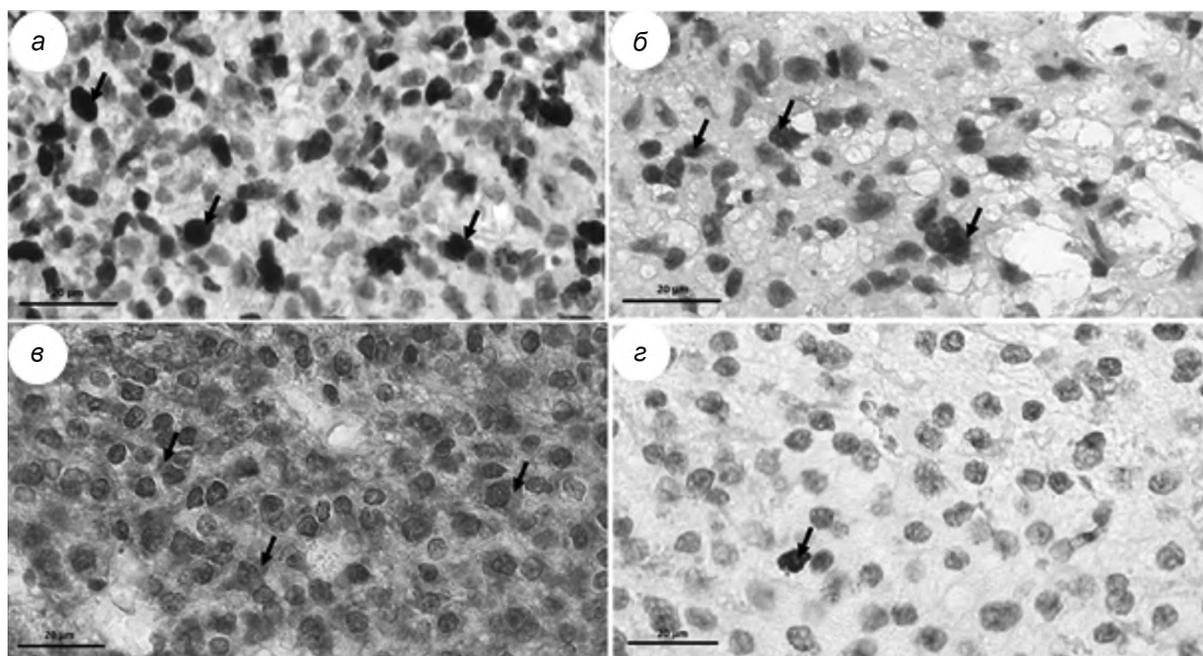


Рис. 1. Иммуногистохимическое исследование маркеров глиальных опухолей.

а – уровень ядерного негистонового белка – маркера пролиферации клеток Ki-67 в материале глиобластомы Grade IV. Диффузное выраженное ядерное коричневое окрашивание (стрелки) показывает реакцию связывания антиген – антитело (до 50% клеток в горячих точках), что свидетельствует о высоком индексе пролиферации Ki-67. б – наличие маркера p53 в материале анапластической астроцитомы Grade III. Диффузное умеренно выраженное ядерное окрашивание (стрелки) показывает реакцию связывания антиген – антитело, что свидетельствует о наличии мутантного белка p53. в – наличие мутации IDH1 в материале диффузной астроцитомы Grade II. Диффузное умеренно выраженное коричневое окрашивание в цитоплазме показывает реакцию связывания антиген – антитело (стрелки), что свидетельствует о наличии мутации IDH1. г – наличие метилирования MGMT в материале диффузной астроцитомы Grade II. Точечное (менее 10% клеток) ядерное коричневое окрашивание (стрелка) показывает реакцию связывания антиген – антитело, что свидетельствует о наличии метилирования промотора MGMT. Ув. $\times 1000$, Bar: 20 μm .

Таблица 1

Характеристика клинического материала с клинико-патологическими особенностями больных глиомами

Показатели	Возраст, годы		Пол		Средний объем опухоли (cm^3)
	< 60	≥ 60	Муж.	Жен.	
Контрольная группа (n=5)	4	1	2	3	-
Grade I (n=1)	1			1	121,9
Grade II (n=6)	2	4	2	4	99,06
Grade III (n=3)	2	1	2	1	66,6
Grade IV (n=10)	3	7	7	3	89,7

Так как IDH1, MGMT, p53 оцениваются в формате наличие/отсутствие, без единиц измерения, результаты представлены как % случаев наличия маркера. При оценке Ki-67 определяли % окрашивания в препарате, поэтому для данного маркера результаты указаны как медиана и межквартильный диапазон.

Анализ элементного гомеостаза крови. Анализ уровня макро- и микроэлементов осуществляли методом атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной плазмой на спектрометре iCAP6300Duo (Thermo Scientific, США). Результаты пересчитывали на 1 г белка, который определяли методом Лоури с использованием набора реактивов ООО «Фирма Синтакон» (Россия). Контролем служила кровь практически здоровых людей.

Статистический анализ клинико-лабораторных данных. Статистическая обработка данных проводилась с использованием пакета StatPlus6. Выбор основных характеристик и статистических критериев при их сравнении осуществляли после изучения распределения признака и его сравнения с распределением Гаусса по критериям Колмогорова-Смирнова/Лиллифорса, Шапиро-Уилка. Поскольку распределение данных отличалось от нормального, полученные результаты представляли в виде медианы, квартилей и применяли непараметрические методы сравнения. Достоверность полученных различий оценивали с применением непараметрических критериев (U-критерий Манна-Уитни, критерий Колмогорова-Смирнова). U-критерий Манна-Уитни используют для оценки различий между двумя независимыми выборками по уровню количественного признака, что позволяет выявлять различия в значении параметра между малыми выборками. Критерий Колмогорова-Смирнова позволяет проверить гипотезу о том, что данные в двух выборках являются частью одного распределения, и также может применяться для оценки достоверности различий между двумя независимыми выборками, однако, обладает меньшей статистической мощностью, чем U-тест Манна-Уитни. Для всех статистических критериев значения $p < 0,05$ считали статистически значимыми. Проводили корреляционный анализ по Спирмену для непараметрических данных с расчетом коэффициента корреляции и уровня его значимости.

Результаты и обсуждение. Уровень молекулярно-генетических маркеров глиом. Иммуногистохимический профиль изучался в пилочитарной астроцитоме Grade I, в астроцитомах и олигодендроглиомах с уровнем

анаплазии II, III, а также в первичных глиобластомах, глиоме средней линии и астроцитомах Grade IV. Были исследованы мутация IDH1 как прогностический маркер поведения опухоли; метилирование промотора MGMT, как предиктивный маркер ответа на химиотерапию; уровень Ki-67, как отражение пролиферативной активности; белок p53, как косвенный маркер астроцитарных новообразований, включённый в цепочку онкогенеза. По результатам иммуногистохимического исследования маркеры IDH1, метилирование промотора MGMT, p53 встречались во всех группах глиом (табл. 2).

Значение пролиферативного индекса Ki-67 возрастало с увеличением степени анаплазии и было наиболее высоким в группе глиом Grade IV. Выявление белка p53 не имело явной зависимости от степени злокачественности (см. табл.2). Однако, опухолевый маркер p53 отсутствовал во всех четырёх случаях олигодендроглиом и присутствовал в большинстве астроцитарных образований. IDH1 мутация прослеживалась во всех случаях олигодендроглиом и астроцитом Grade II-IV. В первичных глиобластомах, глиоме средней линии и пилочитарной астроцитоме мутация IDH1 не обнаружена. Метилирование промотора MGMT преобладало в глиомах II, III степени. Полученные результаты соответствуют классификации ВОЗ первичных опухолей ЦНС 2021.

Изменение уровня макроэлементов в крови пациентов с глиомами. В табл. 3 представлены статистические характеристики концентрации макроэлементов в плазме крови при глиомах.

Как следует из данных, приведенных в табл. 3, при глиальных опухолях в крови значимо возрастает уровень натрия, кальция, магния, фосфора, серы, а уровень калия наоборот снижается.

Изменение уровня микроэлементов в крови пациентов с глиомами. В табл. 4 представлены статистические характеристики концентрации микроэлементов в плазме крови при глиомах.

Как следует из данных, приведенных в табл. 4, в плазме крови у пациентов с глиомами значимо увеличивается содержание железа, цинка, лития. Уровень селена, молибдена, алюминия, кобальта, хрома, ванадия и никеля – снижается по сравнению с практически здоровыми людьми.

Характеристика элементного гомеостаза крови в зависимости от иммуногистохимического профиля глиом. Была проанализирована корреляционная зависимость уровня макро- и микроэлементов плазмы крови с

Таблица 2

Морфометрическая оценка опухолевых маркеров в ткани глиом различной степени анаплазии

Grade	I	II	III	IV
Число пациентов в группе	1	6	3	10
IDH1, % выявления мутации	0%	100%	100%	30%
MGMT, % выявления метилирования	100%	83%	100%	30%
p53, % выявления	0%	66%	0%	80%
Ki-67 высокий (более 10%), % выявления	0%	0%	100%	100%
Ki-67 низкий (менее 10%), % выявления	100%	100%	0%	0%
Медиана Ki-67	-	2%	12%	37%
Межквартильные интервалы Ki-67 (25-75)	-	1,5-3%	-	25-40%

маркерами опухолевого роста глиом (табл.5). Значимые взаимосвязи с уровнем онкомаркеров были выявлены только для Ki-67 и IDH1 (табл. 5).

Далее данные о параметрах минерального обмена были разделены по группам в зависимости от иммуногистохимического профиля по соответствующему маркеру. На рисунках представлены только данные со значимыми отличиями между группами.

Концентрация натрия в плазме крови значимо ниже в группе с низким митотическим индексом Ki-67 (U-критерий Манна-Уитни, $p=0,08$) (рис. 2).

Поскольку содержание онкомаркера Ki-67 демонстрирует выраженность пролиферативной активности опухолевой ткани, можно сказать, что при высокой митотической активности опухоли (при III, IV степени анаплазии) удельная концентрация натрия в крови возрастает, по всей видимости, это связано с изменением активности Na/K-АТФазы.

Уровень натрия (U-критерий Манна-Уитни, $p=0,03$) и калия (U-критерий Манна-Уитни, $p=0,07$) в плазме крови значимо отличается в группе с выявленной мутацией IDH1. Наличие мутации IDH в глиальных новообразованиях взрослых является мощным прогностическим маркером: при её наличии опухоль ведёт себя менее агрессивно, отмечается улучшение прогноза в виде увеличения безрецидивной и общей выживаемости [20]. Изоцитратдегидро-

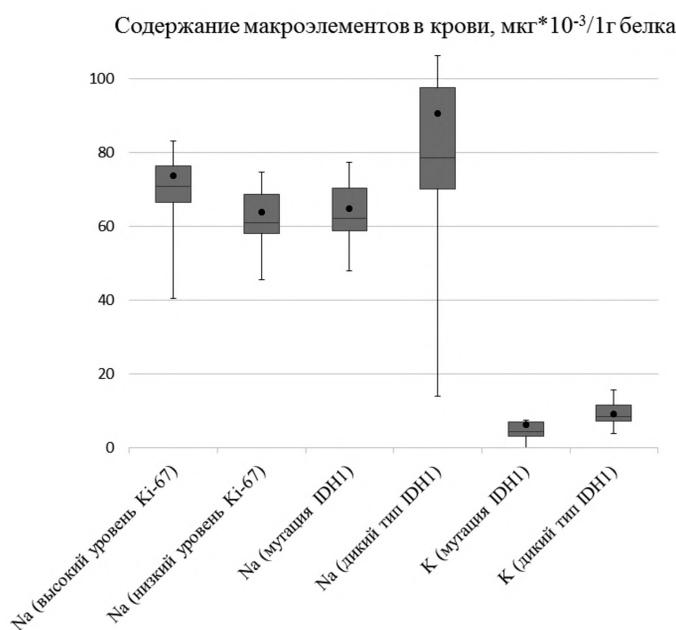


Рис. 2. Медиана и межквартильные диапазоны содержания макроэлементов в плазме крови в зависимости от величины митотического индекса Ki-67 и мутации генов изофермента изоцитратдегидрогеназы IDH1.

Таблица 3

Содержание макроэлементов ($\text{мкг} \times 10^{-3} / \text{г белка}$) в крови при глиомах

Макроэлементы	Контроль ($n=5$)		Глиомы, $\text{мкг} \times 10^{-3} / \text{г белка}$		U-критерий Манна-Уитни	Критерий Колмогорова-Смирнова
	Медиана; квартили	Пределы; 95%ДИ	Медиана; квартили	Пределы; 95%ДИ		
Na	48,8729; 48,4889-49,4462	48,4889- 49,4462	68,8324*; 61,5385-74,0741	61,5385- 74,0741	$p=0,0023$	$p= 0,0242$
K	22,1065; 21,9171-23,0641	21,9171-23,0641	7,0769*; 3,5930-8,3182	3,5930- 8,3182	$p=0,0023$	$p=0,0019$
Ca	1,1151; 1,0815-1,1644	1,0815-1,1644	1,4166*; 1,2991-1,6620	1,2991- 1,6620	$p=0,0121$	$p= 0,0868$
Mg	0,2549; 0,2461-0,2659	0,2461-0,2659	0,3755*; 0,2879-0,4665	0,2879- 0,4665	$p=0,0093$	$p= 0,2497$
P	0,7275; 0,6184-0,8931	0,6184-0,8931	1,6074*; 1,4337-2,2059	1,4337- 2,2059	$p=0,0087$	$p=0,056$
S	0,3451; 0,2471-0,4239	0,2471-0,4239	10,6087*; 8,8880-11,6667	8,8880- 11,6667	$p=0,0052$	$p=0,0241$

Примечание. * – статистически значимые отличия с контрольной группой ($p \leq 0,05$).

Таблица 4

Содержание микроэлементов ($\text{мкг} \times 10^{-3} / \text{г белка}$) в крови при глиомах

Макроэлементы	Контроль ($n=5$)		Глиомы, $\text{мкг} \times 10^{-3} / \text{г белка}$		U-критерий Манна-Уитни	Критерий Колмогорова-Смирнова
	Медиана; квартили	Пределы; 95%ДИ	Медиана; квартили	Пределы; 95%ДИ		
Cu	0,0165; 0,0151- 0,0167	0,0151- 0,0167	0,0162; 0,0136- 0,0188	0,0136- 0,0188	$p=0,5910$	$p= 0,3500$
Fe	0,0174; 0,0135- 0,0187	0,0135- 0,0187	0,0285*; 0,0189- 0,0405	0,0189- 0,0405	$p=0,0394$	$p= 0,1513$
Zn	0,0081; 0,0066- 0,0090	0,0066- 0,0090	0,0160*; 0,0104- 0,0521	0,0104- 0,0521	$p=0,0072$	$p= 0,0471$
Li	0,00004; 0,00003-0,00004	0,00003-0,00004	0,0002*; 0,0001- 0,0002	0,0001- 0,0002	$p=0,0023$	$p= 0,0242$
Se	0,0101; 0,0098- 0,0105	0,0098- 0,0105	0,0011*; 0,0006- 0,0013	0,0006- 0,0013	$p=0,0023$	$p= 0,0019$
Mo	0,0010; 0,0010- 0,0010	0,0010- 0,0010	0,0003*; 0,0003- 0,0004	0,0003- 0,0004	$p=0,0023$	$p=0,0019$
Al	0,0179; 0,0154- 0,0215	0,0154- 0,0215	0,0046*; 0,0035- 0,0087	0,0035- 0,0087	$p=0,0487$	$p= 0,0401$
Ba	0,0001; 0,00006- 0,0002	0,00006- 0,0002	0,0003; 0,0002- 0,0006	0,0002- 0,0006	$p=0,1069$	$p= 0,3887$
Co	0,0009; 0,0008- 0,0009	0,0008- 0,0009	0,0003*; 0,0003- 0,0004	0,0003- 0,0004	$p=0,0023$	$p= 0,0019$
Cr	0,0006; 0,0006- 0,0006	0,0006- 0,0006	0,0002*; 0,0001- 0,0002	0,0001- 0,0002	$p=0,0487$	$p= 0,0203$
Sr	0,0008; 0,0007- 0,0009	0,0007- 0,0009	0,0012; 0,0006- 0,0020	0,0006- 0,0020	$p=0,4202$	$p= 0,7128$
V	0,0014; 0,0014- 0,0015	0,0014- 0,0015	0,0004*; 0,0003- 0,0007	0,0003- 0,0007	$p=0,0041$	$p= 0,0044$
Ni	0,0014; 0,0014- 0,0015	0,0014- 0,0015	0,0005*; 0,0004- 0,0010	0,0004- 0,0010	$p=0,0488$	$p= 0,0203$

Примечание. * – статистически значимые отличия с контрольной группой ($p \leq 0,05$).

Корреляции (коэффициент Спирмена) между иммуногистохимическими маркерами глиом и параметрами элементного гомеостаза

	Элемент	Маркеры опухолевого роста			
		IDH1	Ki-67	MGMT	p53
Макроэлементы	Na	-0,5669* (0,0275)	0,4410* (0,0999)	-0,2048 (0,5231)	-0,3419 (0,3336)
	K	-0,4725* (0,0753)	-0,1260 (0,6546)	0,1024 (0,7514)	-0,0380 (0,9170)
	Ca	-0,0315 (0,9113)	-0,1575 (0,5751)	-0,1536 (0,6336)	-0,2659 (0,4577)
	Mg	0,2520 (0,3649)	-0,1575 (0,5751)	-0,1536 (0,6336)	0,0380 (0,9170)
	P	0,2835 (0,3059)	-0,0315 (0,9113)	-0,2560 (0,4218)	0,4938 (0,1469)
	S	-0,2364 (0,3962)	-0,1260 (0,6546)	-0,3585 (0,2525)	0,4179 (0,2295)
	Cu	-0,5040* (0,0554)	0,2835 (0,3059)	0,1024 (0,7514)	-0,3419 (0,3336)
Микроэлементы	Fe	-0,1260 (0,6546)	-0,1890 (0,5000)	0,1536 (0,6336)	0,2659 (0,4577)
	Zn	0,4410* (0,0999)	-0,4725* (0,0753)	-0,1024 (0,7514)	0,1899 (0,5992)
	Li	-0,1575 (0,5751)	0,1890 (0,5000)	-0,3073 (0,3313)	-0,1140 (0,7539)
	Se	-0,2835 (0,3059)	-0,0630 (0,8235)	-0,1536 (0,6336)	-0,0380 (0,9170)
	Mo	-0,0630 (0,8235)	-0,0630 (0,8235)	-0,1024 (0,7514)	-0,1140 (0,7539)

Примечание. * – статистически значимые корреляционные взаимосвязи ($p \leq 0.05$).

Содержание микроэлементов в крови, $\text{мкг} \cdot 10^{-3} / 1\text{г}$ белка

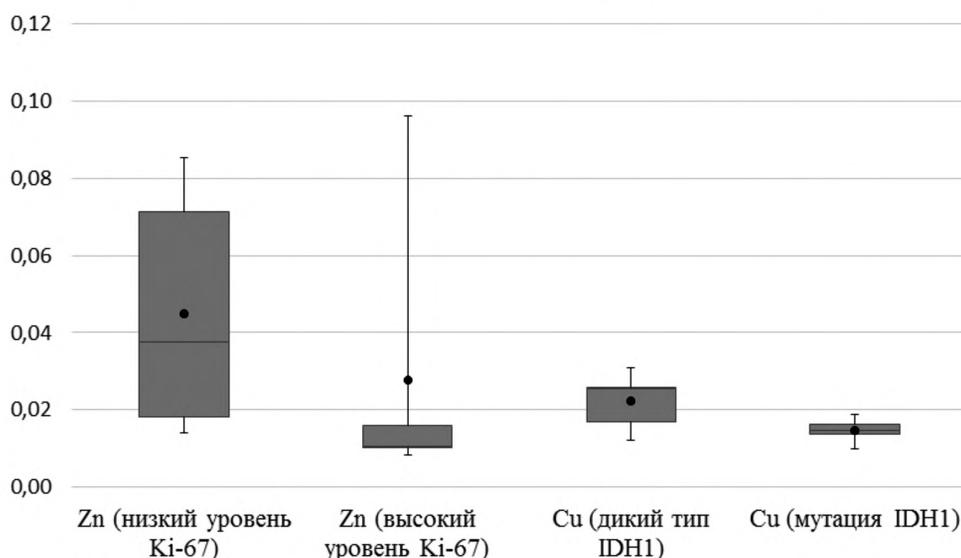


Рис. 3. Медиана и межквартильные диапазоны содержания микроэлементов в плазме крови в зависимости от величины митотического индекса Ki-67 и мутации генов изофермента изоцитратдегидрогеназы IDH1.

геназа IDH1 – лимитирующий фермент цикла трикарбоновых кислот. Мутации IDH снижают уровень АТФ за счет ингибирующего фосфорилирования пируватдегидрогеназы [21], что также будет влиять на активность Na/K-АТФазы.

Концентрация цинка в плазме крови значимо выше в группе с низким митотическим индексом Ki-67 (U-критерий Манна-Уитни, $p=0,07$) (рис.3).

Содержание меди в плазме крови значимо выше в группе с диким типом IDH1 (U-критерий Манна-Уитни, $p=0,07$).

Роль меди и цинка в глиоматогенезе может определяться участием вышеуказанных микроэлементов в структуре такого фермента антиоксидантной защиты как супероксиддисмутаза [22].

Клетки глиальных опухолей, обладая повышенным уровнем базальной метаболической активности и дисфункцией митохондрий и, как следствие, высокими показателями свободнорадикальных процессов, сохраняют высокие темпы пролиферации за счет редкоопосредованного усиления сигнализации по MAP-киназному каскаду через активацию ERK1/2 и Ras. Вместе с тем, компенсаторно увеличивается экспрессия ферментов антиоксидантных систем (в том числе, супероксиддисмутаза), обеспечивающих защиту опухолевых клеток от окислительного стресса и индукции апоптоза [23].

Кроме участия в антиоксидантной системе как кофактор супероксиддисмутаза, цинк может также служить лигандом белков сигнального пути Hedgehog, в

частности Hedgehog взаимодействующего белка ННПР [24], активно синтезируемого в клетках глиом.

Заключение. В представленном исследовании изучен уровень макро- и микроэлементов в плазме крови 20 пациентов с первичными опухолями головного мозга, в 5 образцах плазмы крови практически здоровых людей. Анализ взаимосвязи молекулярно-генетического профиля глиом с параметрами элементного гомеостаза плазмы крови продемонстрировал значимые отличия уровней натрия, калия, цинка и меди в зависимости от величины митотического индекса Ki-67 и мутации генов изофермента изоцитратдегидрогеназы IDH1. Впервые отмечена значимая корреляция, показывающая согласованность между уровнем онкомаркеров глиальных опухолей и минеральным обменом крови. Можно предположить, что полученные данные по содержанию натрия и калия обусловлены нарушением работы фермента Na/K-АТФазы. Роль цинка и меди в глиомагенезе, вероятно, не ограничивается участием этих микроэлементов в работе антиоксидантных систем, но и определяется их функционированием в качестве лигандов сигнальных путей клеточной пролиферации. Полученные нами результаты углубляют понимание механизмов глиомагенеза и могут быть использованы в качестве предиктивной дооперационной оценки молекулярно-генетических маркеров глиом.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Global battle against cancer won't be won with treatment alone Effective prevention measures urgently needed to prevent cancer crisis. The International Agency for Research on Cancer Organization, World Health, Press release N 224. Lyon/London; 2014.
- Louis D.N. WHO Classification of Tumours Editorial Board. Central nervous system tumours [Internet]; International Agency for Research on Cancer: Lyon, France, 5th ed. 2021; Vol. 6. URL: <https://tumourclassification.iarc.who.int/chapters/45>.
- Dimitrov L., Hong C.S., Yang C., Zhuang Z., Heiss J.D. New developments in the pathogenesis and therapeutic targeting of the IDH1 mutation in glioma. *Int. J. Med. Sci.* 2015; 12: 201–13. DOI: 10.7150/ijms.11047.
- Tateish K., Wakimoto H., Iafrate A.J., Tanaka S., Loebel F., Lelic N., Wiederschain D., Bedel O., Deng G., Zhang B. et al. Extreme Vulnerability of IDH1 Mutant Cancers to NAD⁺ Depletion. *Cancer cell.* 2015; 28: 773–84. DOI: 10.1016/j.ccell.2015.11.006.
- Tamura R.E., Vasconcellos J.F., Sarkar D., Libermann T.A., Fisher P.B., Zerbini L.F. GADD45 proteins: central players in tumorigenesis. *Curr. Mol. Med.* 2012; 12: 634–51. DOI: 10.2174/156652412800619978.
- Aubrey B.J., Strasser A., Kelly G.L. Tumor-Suppressor Functions of the TP53 Pathway. *Cold Spring Harb. Perspect Med.* 2016; 6: a026062. DOI: 10.1101/cshperspect.a026062.
- Bullwinkel J., Baron-Luehr B., Ludemann A., Wohlenberg C., Gerdes J., Scholzen T. Ki-67 protein is associated with ribosomal RNA transcription in quiescent and proliferating cells. *J. Cell Physiol.* 2006; 206: 624–35. DOI: 10.1002/jcp.20494.
- Theresia E., Malueka R.G., Pranacipta S., Kameswari B., Dananjoyo K., Asmedi A. et al. Association between Ki-67 Labeling index and Histopathological Grading of Glioma in Indonesian Population. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 2020; 21: 1063–8. DOI: 10.31557/APJCP.2020.21.4.1063.
- Yoda R.A., Marxen T., Longo L., Ene C., Wirsching H.G., Keene C.D., Holland E.C., Cimino P.J. Mitotic Index Thresholds Do Not Predict Clinical Outcome for IDH-Mutant Astrocytoma. *J. Neuro-pathol. Exp. Neurol.* 2019; 78: 1002–10. DOI: 10.1093/jnen/nlz082.
- Tano K., Shiota S., Collier J., Foote R.S., Mitra S. Isolation and structural characterization of a cDNA clone encoding the human DNA repair protein for O6-alkylguanine. *Proc. Nat. Acad. Sci. U S A.* 1990; 87: 686–90. DOI: 10.1073/pnas.87.2.686.
- Chen X., Zhang M., Gan H., Wang H., Lee J.H., Fang D., Kitange G.J., He L., Hu Z., Parney I.F. et al. A novel enhancer regulates MGMT expression and promotes temozolomide resistance in glioblastoma. *Nat. Commun.* 2018; 9: 2949. DOI: 10.1038/s41467-018-05373-4.
- Hegi M.E., Diserens A.C., Gorlia T., Hamou M.F., Tribolet N., Weller M., Kros J.M., Hainfellner J.A., Mason W., Mariani L. et al. MGMT Gene Silencing and Benefit from Temozolomide in Glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* 2005; 352: 997–1003. DOI: 10.1056/NEJMoa043331.
- Khuri F.R. Lung cancer chemoprevention. *Semin Surg. Oncol.* 2000; 18(2):100–5.
- Gresner P., Gromadzinska J., Jablonska E., Kaczmarek J., Wasowicz W. Expression of selenoprotein-coding genes SEPP1, SEP15 and hGPX1 in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer.* 2009; 65(1):34–40.
- Cai J., Zhu P., Zhang C., Li Q., Wang Z., Li G., Wang G., Yang P., Li J., Han B. et al. Detection of ATRX and IDH1-R132H immunohistochemistry in the progression of 211 paired gliomas. *Oncotarget.* 2016; 7: 16384–95. DOI: 10.18632/oncotarget.7650.
- Chaurasia A., Park S.H., Seo J.W., Park C.K. Immunohistochemical Analysis of ATRX, IDH1 and p53 in Glioblastoma and Their Correlations with Patient Survival. *J. Korean Med. Sci.* 2016; 31:1208–14. DOI: 10.3346/jkms.2016.31.8.1208.
- Leung S.C.Y., Nielsen T.O., Zabaglo L., Arun I., Badve S.S., Bane A.L., Bartlett J.M.S., Borgquist S., Chang M.C., Dodson A. et al. Analytical validation of a standardized scoring protocol for Ki67: phase 3 of an international multicenter collaboration. *NPJ Breast Cancer.* 2016; 2:16014. DOI: 10.1038/npjbcancer.
- Nielsen L.A.G., Bangso J.A., Lindahl K.H., Dahlrot R.H., Hjelmberg J.B., Hansen S., Kristensen B.W. Evaluation of the proliferation marker Ki-67 in gliomas: Interobserver variability and digital quantification. *Diagnostic pathology.* 2018; 3: 8. DOI: 10.1186/s13000-018-0711-2.
- Younis S.G., Khedr R.A.G., El-Shorbagy S.H. Immunohistochemical analysis of O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) protein expression as prognostic marker in glioblastoma patients treated with radiation therapy with concomitant and adjuvant Temozolomide. *J. Egypt Natl. Canc. Inst.* 2016; 28: 23–30. DOI: 10.1016/j.jnci.2015.11.003.
- Xia L., Wu B., Fu Z., Feng F., Qiao E., Li Q. et al. Prognostic role of IDH mutations in gliomas: a meta-analysis of 55 observational studies. *Oncotarget.* 2015; 6 (19): 17354–65. DOI: 10.18632/oncotarget.4008.
- Izquierdo-Garcia J.L., Viswanath P., Eriksson P., Cai L., Radoul M., Chaumeil M.M., Blough M., Luchman H.A., Weiss S., Cairncross J.G. et al. IDH1 mutation induces reprogramming of pyruvate metabolism. *Cancer Res.* 2015; 75: 2999–3009. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-15-0840.
- Roberts B.R., Tainer J.A., Getzoff E.D., Malencik D.A., Anderson S.R., Bomben V.C., Meyers K.R., Karplus P.A., Beckman J.S. Structural characterization of zinc-deficient human superoxide dismutase and implications for ALS. *J. Mol. Biol.* 2007; 373(4):877–90.
- Salazar-Ramiro A., Perez V. de la Cruz, Hernandez-Pedro N.Y., Gonzalez-Esquivel D.F., Sotelo J., Pineda B. Role of Redox Status in Development of Glioblastoma. *Front Immunol.* 2016; 7: 156.
- Bosanac I., Maun H.R., Scales S.J., Wen X., Lingel A., Bazan J.F., de Sauvage F.J., Hymowitz S.G., Lazarus R.A. The structure of SHH in complex with HHIP reveals a recognition role for the Shh pseudo active site in signaling. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2009; 16(7):691–7.