

«Жидкая биопсия» при опухолях мозга: состояние проблемы

О.И. Щербенко¹, Э.В. Кумирова², О.С. Регентова¹

¹ФГБУ «Российский научный центр рентгенодиагностики» Минздрава России; Россия, 117997, Москва, ул. Профсоюзная, 86а;

²ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России; Россия, 117997, Москва, ул. Саморы Машела, 1

Контактные данные: Олег Ильич Щербенко sherbenko@mail.ru

Возможности традиционных методов диагностики (лучевой и морфологической) опухолей мозга на сегодняшний день практически исчерпаны. Они доступны и наглядны, но имеют ряд недостатков: риск субъективизма при оценке изображений и микроскопической картины, ограниченные возможности существующей аппаратуры, необходимость использования инвазивных методик для получения материала. Кроме того, они не дают возможности индивидуализировать методы лечения, которые становятся доступны по мере углубления знаний о молекулярно-генетических особенностях опухолей. В последние годы разрабатывают метод «жидкой биопсии», который основан на определении клеток или других компонентов опухоли в биологических жидкостях. Этот метод показал свою информативность при ряде злокачественных опухолей внутренних органов. С его помощью удается идентифицировать генотип опухоли и на этой основе индивидуализировать процесс лечения, а также оценить его эффективность. Процесс поиска методов и разработки методик неинвазивной уточненной диагностики генотипов опухолей мозга в настоящее время находится в стадии развития. При помощи определения специфичных для каждой опухоли маркеров в периферической крови и спинномозговом ликворе уже сегодня можно идентифицировать наличие и состояние критически важных для генов IDH-1 и MGMT и приступить к решению проблемы индивидуализации терапии.

Ключевые слова: опухоли мозга, молекулярно-генетическая диагностика, клетки опухоли, экзосомы, нуклеиновые кислоты, индивидуализация лечения

Для цитирования: Щербенко О.И., Кумирова Э.В., Регентова О.С. «Жидкая биопсия» при опухолях мозга. Состояние проблемы. Российский журнал детской гематологии и онкологии 2019;6(2):61–7.

“Liquid biopsy” for brain tumors: state of problem

O.I. Shcherbenko¹, E.V. Kumirova², O.S. Regentova¹

¹Russian Scientific Center of Roentgenoradiology, Ministry of Health of Russia; 86a Profsoyuznaya St., Moscow, 117997, Russia;

²Dmitriy Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Ministry of Health of Russia; 1 Samory Machela St., Moscow, 117997, Russia

The possibilities of traditional methods of diagnosis (radiological and morphological) of brain tumors are now almost exhausted. With their availability and visibility, they have a number of drawbacks in the form of risks of subjectivity in the evaluation of images and microscopic pictures, limited capabilities of existing equipment, the need to use invasive techniques to obtain material. In addition, they do not meet the requirements for individualization of treatment methods, which becomes available as knowledge about the molecular genetic characteristics of tumors deepens. Developed in recent years, the method of “liquid biopsy”, based on the definition in the biological fluids of cells or other components of the tumor has shown its informative in a number of malignant tumors of internal organs. With its help, it is possible to identify the genotype of the tumor and on this basis to individualize the treatment process, as well as to evaluate its effectiveness. The process of finding methods and developing techniques for non-invasive diagnosis of refined genotypes of brain tumors is currently under development. By identifying tumor-specific markers in peripheral blood and cerebrospinal fluid, it is already possible to identify the presence and condition of IDH-1 and MGMT genes that are critical for gliomas and to start solving the problem of individualization of therapy.

Key words: brain tumors, molecular genetic diagnosis, tumor cells, exosomes, nucleic acids, individualization of treatment

For citation: Shcherbenko O.I., Kumirova E.V., Regent O.S. “Liquid biopsy” in brain tumors. State of the problem. Russian Journal of Pediatric Hematology and Oncology 2019;6(2):61–7.

Информация об авторах

О.И. Щербенко: д.м.н., профессор, заведующий научно-организационным отделом РНЦРР, e-mail: sherbenko@mail.ru; <http://orcid.org/0000-0003-0786-5448>

Э.В. Кумирова: д.м.н., врач-детский онколог, заведующая отделом нейроонкологии НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева, e-mail: k_ella2004@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0001-6125-2410>

О.С. Регентова: врач-радиотерапевт детского онкологического отделения радиотерапии и комплексных методов лечения РНЦРР, e-mail: olgagraudensh@mail.ru; <http://orcid.org/0000-0002-0219-7260>

Information about the authors

O.I. Shcherbenko: Dr. of Sci. (Med.), Professor, Head of the Scientific and Organizational Department Russian Scientific Centre of Roentgenoradiology, Ministry of Health of Russia, e-mail: sherbenko@mail.ru; <http://orcid.org/0000-0003-0786-5448>

E.V. Kumirova: Dr. of Sci. (Med.), Pediatric Oncologist, Head of Department of Neurooncology Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Ministry of Health of Russia, e-mail: k_ella2004@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0001-6125-2410>

O.S. Regentova: Radiotherapist of the Children's Oncology Department of Radiotherapy and Complex Treatment Methods Russian Scientific Centre of Roentgenoradiology Ministry of Health of Russia, e-mail: olgagraudensh@mail.ru; <http://orcid.org/0000-0002-0219-7260>

Вклад авторов

О.И. Щербенко: обоснование актуальности, анализ и систематизация информации
Э.В. Кумирова: редактирование и оформление статьи
О.С. Регентова: сбор информации

Authors' contributions

O.I. Shcherbenko: justification of relevance, analysis and systematization of information
E.V. Kumirova: editing and design article
O.S. Regentova: collection of information

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

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки. / *Funding.* The study was performed without external funding.

Введение

В последние 10 лет в методах диагностики и контроля течения злокачественных опухолей происходят поистине революционные изменения. В дополнение к традиционным методам клинического осмотра, обследования при помощи методов визуализации и гистологического исследования материала разработаны и широко применяются методики углубленного изучения структуры опухолей, в том числе на молекулярно-генетическом уровне. Получаемые данные позволяют разрабатывать и использовать методики индивидуализированной и таргетной терапии. Одно из перспективных направлений исследований в онкологии — развитие неинвазивных методов диагностики и контроля эффективности лечения опухолей, основанных на определении в биологических жидкостях (крови, спинномозговой жидкости, моче) маркеров, выделяемых практически всеми типами опухолей, позволяющих идентифицировать природу и оценить динамику патологии. Эти маркеры могут быть представлены в виде опухоле-специфических белков, отдельных клеток опухоли или их скоплений, а также нуклеиновых кислот, мелких молекул и др. Примером определения белковых продуктов опухоли могут служить реакции на выявление простатспецифического антигена, карциноэмбрионального антигена, СА-125 и др. Недостатком этих маркеров является возможность их присутствия в небольших концентрациях в крови здоровых людей [1, 2] и, напротив, наличие лишь в незначительных концентрациях при распространенном раке [3, 4], что лимитирует их специфичность и чувствительность.

Обнаружение новых биологических маркеров, свидетельствующих о генетических нарушениях при появлении и прогрессировании опухолей, положило начало широкому кругу исследований, направленных на выявление соматических мутаций, свойственных только определенному типу опухоли и не наблюдаемых в норме [5]. Наиболее информативно определение наличия этих мутаций при исследовании гистологических препаратов. Однако получение материала для гистологического исследования не всегда возможно, поэтому разрабатываются методики определения генетических маркеров опухоли в биологических жидкостях, получить которые значительно

проще, чем выполнить биопсию. Определение молекулярно-генетического профиля опухолей по жидким средам получило название «жидкая биопсия». Такие методики открывают перспективы для создания новых, неинвазивных методов диагностики и мониторинга опухолей [6].

Маркеры опухоли попадают в биологические жидкости с клетками новообразования, которые, отделяясь от основного массива и поступая в кровоток или ликворное пространство, циркулируют там. Источником получения информации могут быть также нуклеиновые кислоты (ДНК и РНК) опухоли (ОНК) и их фрагменты, высвобождающиеся в результате спонтанной или индуцированной гибели клеток опухоли и поступающие в биологические жидкости [7, 8].

Новые методы определения ОНК в крови открывают возможности не только диагностики, но и оценки эффективности лечения. Определение ОНК в ряде случаев существенно опережает изменения, которые визуализируются при компьютерной томографии (КТ). Так, S.J. Dawson et al. диагностировали, по данным ОНК, рецидив рака молочной железы за 5 мес до того, как он был выявлен при КТ [9]. Аналогичные результаты получены при раке легкого [10, 11]. Это позволяет оценивать данные тесты как имеющие большие возможности по сравнению с традиционными методами диагностики и мониторинга злокачественных опухолей. С помощью данного метода можно определить минимальное остаточное заболевание, что уже доказано при опухолях системы гемопоеза [12]. Изменения в содержании ОНК в процессе лучевой терапии (ЛТ) или после ее окончания можно использовать для оценки эффекта и прогнозирования течения заболевания [13]. Поскольку полупериод жизни ОНК в крови составляет от 0,5 до 2 ч [14], степень изменений в концентрации ОНК после первых сеансов ЛТ позволяет оценить радиочувствительность опухоли, что показано на примере рака носоглотки [15]. Динамика уровня ОНК в процессе лечения может стать основанием для изменения программы лечения или подключения других методов.

Данный обзор, основанный на анализе публикаций, имеющихся в информационной системе MEDLINE, имеет своей целью представить состояние проблемы определения генотипа опухолей мозга при помощи метода «жидкой биопсии».

Молекулярная диагностика опухолей мозга

Положительные результаты исследований, направленных на определение в опухолях и биологических жидкостях маркеров при раке молочной железы, легкого, предстательной железы и др., создали платформу для проведения аналогичных исследований при опухолях мозга.

Диагностика и мониторинг течения опухолей мозга на данный момент в основном базируются на использовании морфологических и лучевых методов. Последние, несмотря на доступность и наглядность, обладают рядом существенных недостатков, обусловленных как техническими возможностями аппаратуры и опытом врача, так и влиянием различных факторов на качество получаемого изображения. С помощью КТ и магнитно-резонансной томографии (МРТ) часто затруднительно дифференцировать постлучевые изменения от рецидива опухоли. Воздействие ионизирующей радиации на ткань мозга приводит к отеку и может сопровождаться повышением накопления контраста, что дает повод для ошибочной диагностики рецидива опухоли в случаях так называемой псевдопрогрессии, которая фактически является проявлением локального нарушения гематоэнцефалического барьера или радиационного некроза [16]. Широко используемые при лечении опухолей мозга антиангиогенные препараты, напротив, могут уменьшать накопление контрастного вещества в опухоли за счет снижения проницаемости сосудистой стенки, что создает повод для ошибочного заключения об эффективности лечения [17]. Надо также учитывать, что методы лучевой диагностики, основанные на использовании ионизирующего излучения, сами по себе обладают канцерогенным эффектом [18], и их применение, особенно у детей, желательно ограничивать.

Оценка состояния процесса с помощью хирургической биопсии при опухолях мозга, особенно после проведенного химиолучевого лечения, связана с риском повреждения функционально важных структур мозга или развития кровоизлияния, которое может иметь даже фатальный характер. Кроме того, локальный забор материала для гистологического исследования не позволяет оценить состояние гетерогенности структуры опухоли, свойственной опухолям мозга [19].

Проведенные в последние годы молекулярно-генетические исследования опухолей мозга позволили выявить ряд полезных для диагностики и планирования лечения маркеров при различных морфологических вариантах. При глиомах, составляющих 64 % всех злокачественных опухолей центральной нервной системы, прогностическое значение имеет состояние гена *IDH1* и степень метилирования промотора гена *O6* метилгуанин-ДНК-метилтрансферазы (*MGMT*). L. Mu et al. изучили методом иммуногистохимии наличие мутации гена *IDH1* R132H в 55 парах гистологических препаратов первичных и рецидивировавших астроцитарных опухолей. В 5 парах имела место пилоцитарная астроцитома; в 35 — астроцитома

II–III степени злокачественности и в 15 случаях — глиобластома. Во всех наблюдениях из парных проб извлекали ДНК и с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) изучали состояние гена *IDH1*. Установлено, что мутации гена *IDH1* R132H в группе больных с астроцитомой II–III степени злокачественности составили 68,6 % (у 24 из 35 больных), причем наличие мутации коррелировало с более длинным безрецидивным периодом, но это не влияло на показатели выживаемости. В препаратах пациентов с пилоцитарной астроцитомой и глиобластомой мутаций этого гена не выявлено. Изменений состояния гена *IDH1* при рецидиве опухоли, в том числе при повышении степени злокачественности, также не обнаружено [20].

Установлен также факт влияния на прогноз степени метилирования промотора гена фермента *MGMT* у больных со злокачественными глиомами. Этот фермент принимает участие в репарации повреждений молекул ДНК, защищая при этом клетки опухоли от цитотоксического действия химиопрепаратов: если промотор гена метилирован, т. е. к нему присоединена метильная группа CH_3 , процессы репарации повреждений ДНК тормозятся и цитотоксический эффект ЛТ и химиотерапии усиливается. A. Lee et al. провели анализ результатов лечения 12 725 больных глиобластомой, у 626 (4,9 %) из которых ген *MGMT* был метилирован, а у 1037 (8,1 %) — нет. Медиана продолжительности жизни и 2-летняя выживаемость в 1-й группе составили соответственно 20 мес и 40,2 %, а во 2-й — 14,6 мес и 27,5 % [21].

В связи со сложностями получения материала из мозга для исследования генетического профиля опухоли по гистологическому препарату особое значение приобретает разработка малоинвазивных методик диагностики, среди которых ведущее место в настоящее время занимает методика «жидкой биопсии» с использованием в качестве объектов исследования периферической крови и спинномозговой жидкости.

Выявление в ликворе и крови больных с опухолями мозга циркулирующих клеток (ЦКО) стало доступно благодаря созданию современной лабораторной аппаратуры [22]. Большая часть опубликованных работ посвящена исследованиям наличия ЦКО при глиобластомах. Выделение ЦКО из общего количества клеток, присутствующих в ликворе или крови, технологически весьма сложный процесс. Традиционно используют метод «положительной селекции», основанный на определении белков на поверхности клетки при помощи антител [23]. Однако его применение возможно только при наличии на клетке белков, специфичных для данного вида опухоли. Другой вариант их изоляции — метод «отрицательной селекции», т. е. удаление из биологической жидкости клеток, не относящихся к данной опухоли [24]. F. Gao et al. использовали интегрированный клеточно-молекулярный способ обнаружения клеток глиобластомы в крови и выявили эти клетки у 24 (77 %) из 31 больного. Авторы пришли к выводу, что частота наличия клеток глиобластомы в кровотоке значительно выше,

чем выявление сформировавшихся метастазов при помощи МРТ [25]. Так, в исследовании С. Müller et al. клетки глиобластомы в крови выявили у 29 из 141 больного глиобластомой и диффузной глиомой [26]. К.М. MacArthur et al. с помощью определения промотора теломеразы на поверхности клеток обнаружили клетки опухоли у 8 (72 %) из 11 больных со злокачественной глиомой до лечения и у 1 (12 %) из 8 пациентов после ЛТ [27]. J.P. Sullivan et al. получили ЦКО у 13 (39 %) из 33 больных глиобластомой [28]. Эти клетки позволяют оценить генотип опухоли и решать проблему индивидуализации терапии, а также определить природу источника метастатического поражения мозга. J.G. Lohr et al. установили, что мутации в клетках рака предстательной железы, обнаруживаемых в пробах крови, в 90 % случаев позволяют точно определить их принадлежность именно к этой опухоли [29]. Культивирование выделенных ЦКО теоретически позволяет использовать полученные клеточные культуры для оценки эффективности цитотоксических препаратов. Ограничение в применении этого метода заключается в необходимости использовать для исследования только свежую пробу крови или ликвора, т. е. неотложно проводить анализ. Следовательно, такое исследование, требующее сложной аппаратуры и обученного персонала, можно выполнить только в отдельных крупных центрах, что ограничивает возможности его использования в широкой практике для мониторинга состояния опухоли.

Большие диагностические перспективы имеет и более сложный метод — обнаружение в биологических жидкостях принадлежащих данной опухоли молекул ДНК, РНК или их фрагментов. При опухолях мозга процесс поступления в плазму крови опухолевой ДНК затруднен наличием гематоэнцефалического барьера, через который большие частицы проходят с трудом. Однако в крови и других жидкостях обнаружены иные биомаркеры, в том числе специфичные для опухолей. В частности, последние исследования показали, что нормальные клетки и клетки опухолей мозга выделяют пузырьки, названные «экзосомами» (ЭС), размером от 30 до 2000 нм, проходящие через все биологические мембраны и содержащие фрагменты ДНК, специфичные для каждого вида клеток. В обзоре D.R. Santiago-Dieppa et al. описано, что биологические функции ЭС разнообразны: ремоделирование клеток, внутриклеточные коммуникации, изменение микроокружения опухоли, регулирование иммунных функций; ЭС рассматривают как возможный источник макромолекул для выполнения процесса «жидкой биопсии» при опухолях мозга [30]. J. Skog et al. сообщили, что ЭС могут быть изолированы из сыворотки крови больного с опухолью мозга, и в них могут быть обнаружены специфические альтерации в гене *EGFR* [31]. J.C. Akers et al. обнаружили эти пузырьки, содержащие фрагменты РНК глиобластомы, в ликворе больных с этой опухолью [32]. W.W. Chen et al. с помощью специально разработанной методики BEAM нашли эти элементы не только в ликворе, но

и в крови, и выделили из них фрагменты мутантного гена *IDH1*. По их данным, чувствительность этого метода по результатам исследования ликвора составляет 63 %, а специфичность — 100 %. По мнению авторов, предложенный метод представляется новым направлением в диагностике рака [33]. J.M. Figueroa et al. сообщили, что им удалось обнаружить онкоген *EGFRvII* в РНК внеклеточных ЭС с показателем чувствительности — 60 % и специфичности — 98% [34]. S.Y. Manda et al. провели аналогичное исследование с ЭС, полученными из плазмы, и установили, что возможность дифференцировки опухолевой РНК от нормальной составляет 80 % по критерию чувствительности и 78 % — по критерию специфичности [35]. Аналогичные результаты получили также J.C. Akers et al. при исследовании ЭС, полученных из спинномозговой жидкости [36].

Проблему для «жидкой биопсии» на основе выделения ЭС составляет сложный состав ЭС, полученных из крови. Так, установлено, что общая популяция везикул у ракового больного разнообразна и потенциально может включать несколько субпопуляций одновременно: 1) ЭС, высвобождающиеся из делящихся опухолевых клеток: эти везикулы имеют молекулярный профиль, аналогичный профилю опухолевых клеток, и могут информировать об опухолевом росте, эволюции или патогенезе рака; 2) ЭС, полученные из иммунных клеток: понимание и профилирование молекулярных характеристик между иммунными везикулами и производными от опухоли, которые, как было показано, иммуносупрессивны, также может информировать врачей о состоянии опухоли и/или ответе на терапию; 3) везикулы, полученные из нормальной стромы вокруг опухоли, а также из других органов, которые прямо или косвенно затронуты присутствием опухоли [37]. Необходимы дополнительные исследования для того чтобы точно разделить, изолировать и профилировать различные субпопуляции ЭС, чтобы определить поверхностные маркеры или другие молекулярные различия, дабы правильно дифференцировать источники и диагностическое значение обнаруженных везикул.

В исследовании Н. Shao et al. [38] продемонстрирована новая технология выявления опухолеассоциированных белков на поверхности ЭС. Она основана на использовании магнитных наночастиц с прикрепленными к ним маркерами белков глиобластомы. Полученную от больного глиобластомой кровь обрабатывают этим реактивом и исследуют при помощи миниатюрной магнитно-резонансной системы. Метод обладает высокой чувствительностью и позволяет не только выделить ЭС, происходящие из глиобластомы, но и определить наличие мутаций, вызванных терапевтическим воздействием. С его помощью можно оперативно оценить эффективность химиотерапии и при необходимости внести коррекцию в ее схемы.

Свободно циркулирующие ДНК и РНК (ЦНК) опухоли также стали объектом разработки методов

«жидкой биопсии» при опухолях мозга. Y. Wang et al. показали, что у всех больных с интракраниальными опухолями, прилежащими к цистернальным пространствам, а также у всех больных со злокачественными глиомами можно определить ЦНК в ликворе. Авторы обнаруживали ЦНК в ликворе у всех пациентов с медуллобластомами, эпендимомы и злокачественными глиомами. При других формах опухолей, не прилежащих к желудочковой системе, ЦНК не выявляли. Поэтому люмбальный ликвор может быть наиболее реальным объектом для определения генотипа опухоли мозга по содержащимся в нем ЦНК [39].

Обычно концентрация ЦНК в биологических жидкостях значительно меньше, чем в клетках или ткани опухоли. Этот показатель может составлять менее 100 нг/мл, т. е. в одной пробе может быть только несколько молекул. Кроме того, ЦНК представлена в крови не в виде целых молекул, а в виде их фрагментов, поэтому для их определения требуются очень точные методики, позволяющие повысить их концентрацию за счет очистки пробы от других элементов. Проводятся исследования, показывающие возможность обнаружения ЦНК в различных биожидкостях. T.Y. Huang et al. показали, что внеклеточная ЦНК может быть выделена из цереброспинальной жидкости, и по ней можно определить специфические мутации в вариантах гена гистона H3. Чувствительность теста (87,5 %) и его специфичность (100 %) были подтверждены иммуногистохимическим методом и секвенированием по Сэнгеру в 8 образцах опухолевой ткани [40]. J. Chen et al. показали, что ЦНК из опухоли у больных глиомой имеют более низкий по сравнению с контролем уровень метилирования элемента Alu, который является одним из самых коротких элементов в геномной ДНК и суррогатным маркером для оценки уровня метилирования всей геномной ДНК организма [41].

Стандартизация и воспроизводимость

Существует насущная потребность в стандартизации процесса получения материала для «жидкой

биопсии». Например, на результаты получения макромолекул при различных методах получения биологической жидкости могут влиять протоколы замораживания/оттаивания, способ сбора, время обработки, уровень гемолиза, экспозиция консерванта и условия хранения [42]. В случае ЭС метод подсчета везикул также может давать различные результаты [43], и эту переменную следует учитывать при анализе. Еще одна причина ограниченной воспроизводимости биомаркерных исследований — отсутствие стандартизированных рекомендаций, в каждом исследовании по-разному рассматриваются вопросы, касающиеся размеров когорта, влияния факторов лечения, а также выбора контрольных групп. Микрочипы, количественная ПЦР в режиме реального времени, РНК и цифровая капельная ПЦР — одни из наиболее часто используемых методов исследования биомаркеров, каждый из которых имеет свои преимущества, ограничения и недостатки. Необходимо обеспечить непрерывность технологии, используемой от начала до полной проверки анализа.

Заключение

Разработка и использование методики «жидкой биопсии» при опухолях мозга находятся в начале своего пути, но, несомненно, перспективны. Это особенно актуально в тех ситуациях, когда выполнение традиционной биопсии связано с высокой опасностью осложнений: в случаях диффузно растущих опухолей мозга, при состояниях после проведенного комплексного лечения. Выявление в крови и ликворе ЭС и фрагментов ДНК и РНК опухоли может стать существенным дополнением к традиционным методам диагностики и мониторинга течения опухолей мозга. Однако сфокусированный, рентабельный анализ биомаркеров из жидких биоматериалов будет возможен по мере того, как будущие исследования покажут, какие именно геномные изменения предоставляют важную клиническую информацию для выработки стратегии лечения.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Mazzucchelli R., Colanzi P., Pomante R., Muzzonigro G., Montironi R. Prostate tissue and serum markers. *Adv Clin Pathol* 2000;4(3):111–20. PMID: 11080790.
2. Ruibal-Morell A. CEA serum levels in non-neoplastic disease. *Int J Biol Markers* 1992;7(3):160–6. PMID: 1431339.
3. Ballehaninna U.K., Chamberlain R.S. Serum CA 19-9 as a biomarker for pancreatic cancer – a comprehensive review. *Indian J Surg Oncol* 2011;2(2):88–100. PMID: 22811878.
4. Wanebo H.J., Rao B., Pinsky C.M., Hoffman R.G., Stearns M., Schwartz M.K., Oettgen H.F. Preoperative carcinoembryonic antigen level as a prognostic indicator in colorectal cancer. *N Engl J Med* 1978;299(9):448–51. doi: 10.1056/NEJM197808312990904.
5. Vogelstein B., Papadopoulos N., Velculescu V.E., Zhou S., Diaz L.A., Kinzler K.W. Cancer genome landscapes. *Science* 2013;339(6127):1546–58. doi: 10.1126/science.1235122.
6. Li M., Chen W.D., Papadopoulos N., Goodman S.N., Bjerregaard N.C., Laurberg S., Levin B., Juhl H., Arber N., Moinova H., Durkee K., Schmidt K., He Y., Diehl F., Velculescu V.E., Zhou S., Diaz L.A. Jr, Kinzler K.W., Markowitz S.D., Vogelstein B. Sensitive digital quantification of DNA methylation in clinical samples. *Nat Biotechnol* 2009;27(9):858–63. doi: 10.1038/nbt.1559.
7. Fleischhacker M., Schmidt B. Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer – a survey. *Biochim Biophys Acta* 2007;1775(1):181–232. PMID: 17137717.
8. Alix-Panabieres C., Schwarzenbach H., Pantel K. Circulating tumor cells and circulating tumor DNA. *Annu Rev Med* 2012;6(3–4):199–215. doi: 10.1146/annurev-med-062310-094219.
9. Dawson S.J., Tsui D.W., Murtaza M. Analysis of circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 2013;368:1199–209. doi: 10.1056/NEJMoal213261.
10. Oxnard G.R., Pawletz C.P., Kuang Y., Mach S.L., O’Connell A., Messineo M.M., Luke J.J., Butaney M., Kirschmeier P., Jackman D.M., Jänne P.A. Noninvasive detection of response and resistance in EGFR-mutant lung cancer using quantitative next-generation genotyping of cell-free plasma DNA. *Clin Cancer Res* 2014;20(6):1698–705. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-2482.
11. Sorensen B.S., Wu L., Wei W., Tsai J., Weber B., Nexø E., Meldgaard P. Monitoring of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor-sensitizing and resistance mutations in the plasma DNA of patients with advanced non-small cell lung cancer during treatment with erlotinib. *Cancer* 2014;120:3896–901. doi: 10.1002/cncr.28964.
12. Schrappe M. Detection and management of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2014;2014(1):244–9. doi: 10.1182/asheducation-2014.1.244.
13. Cheng C., Omura-Minamisawa M., Kang Y., Hara T., Koike I., Inoue T. Quantification of circulating cell-free DNA in the plasma of cancer patients during radiation therapy. *Cancer Sci* 2009;100(2):303–9. doi: 10.1111/j.1349-7006.2008.01021.x.
14. Diehl F., Schmidt K., Choti M.A., Romans K., Goodman S., Li M., Thornton K., Agrawal N., Sokoll L., Szabo S.A., Kinzler K.W., Vogelstein B., Diaz L.A. Jr. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nature Med* 2008;14(9):985–90. doi: 10.1038/nm.1789.
15. Lo Y.M., Leung S.F., Chan L.Y., Chan A.T., Lo K.W., Johnson P.J., Huang D.P. Kinetics of plasma Epstein–Barr virus DNA during radiation therapy for nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res* 2000;60(9):2351–5. PMID: 10811107.
16. Peca C., Pacelli R., Elefante A., Del Basso De Caro M.L., Vergara P., Mariniello G., Giamundo A., Maiuri F. Early clinical and neuroradiological worsening after radiotherapy and concomitant temozolomide in patients with glioblastoma: tumour progression or radionecrosis? *Clin Neurol Neurosurg* 2009;111(4):331–4. doi: 10.1016/j.clineuro.2008.11.003.
17. Neagu M.R., Huang R.Y., Reardon D.A., Wen P.Y. How treatment monitoring is influencing treatment decisions in glioblastomas. *Curr Treat Options Neurol* 2015;17(4):343. doi: 10.1007/s11940-015-0343-8.
18. Frush D.P., Donnelly L.F., Rosen N.S. Computed tomography and radiation risks: what pediatric health care providers should know. *Pediatrics* 2003;112(4):951–7. PMID: 14523191.
19. Patel A.P., Tirosh I., Trombetta J.J., Shalek A.K., Gillespie S.M., Wakimoto H., Cahill D.P., Nahed B.V., Curry W.T., Martuza R.L., Louis D.N., Rozenblatt-Rosen O., Suvà M.L., Regev A., Bernstein B.E. Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma. *Science* 2014;344(6190):1396–401. doi: 10.1126/science.1254257.
20. Mu L., Xu W., Li Q., Ge H., Bao H., Xia S., Ji J., Jiang J., Song Y., Gao Q. *IDH1* R132H mutation is accompanied with malignant progression of paired primary recurrent astrocytic tumours. *J Cancer* 2017;8(14):2704–12. doi: 10.7150/jca.20665.
21. Lee A., Youssef I., Osborn V.W., Safdieh J., Becker D.J., Schreiber D. The utilization of *MGMT* promoter methylation testing in United States hospitals for glioblastoma and its impact on prognosis. *J Clin Neurosci* 2018;51(5):85–90. doi: 10.1016/j.jocn.2018.02.009.
22. Adamczyk L.A., Williams H., Frankow A., Ellis H.P., Haynes H.R., Perks C., Holly J.M., Kurian K.M. Current understanding of circulating tumor cells – potential value in malignancies of the central nervous system. *Front Neurol* 2015;10(6):174. doi: 10.3389/fneur.2015.00174.
23. Ferreira M.M., Ramani V.C., Jeffrey S.S. Circulating tumor cell technologies. *Mol Oncol* 2016;10(3):374–94. doi: 10.3389/fneur.2015.00174.
24. Pratt E.D., Huang C., Hawkins B.G., Gleghorn J.P., Kirby B.J. Rare cell capture in micro-fluidic devices. *Chem Eng Sci* 2011;66(7):1508–22. doi: 10.1016/j.ces.2010.09.012.
25. Gao F., Cui Y., Jiang H., Sui D., Wang Y., Jiang Z., Zhao J., Lin S. Circulating tumor cell is a common property of brain glioma and promotes the monitoring system. *Oncotarget* 2016;7(44):71330–40. doi: 10.18632/oncotarget.11114.
26. Müller C., Holtschmidt J., Auer M., Heitzer E., Lamszus K., Schulte A., Matschke J., Langer-Freitag S., Gasch C., Stoupiec M., Mauer mann O., Peine S., Glatzel M., Speicher M.R., Geigl J.B., Westphal M., Pantel K., Riethdorf S. Hematogenous dissemination of glioblastoma multiforme. *Sci Transl Med* 2014;6(247):247–301. doi: 10.1126/scitranslmed.3009095.
27. Macarthur K.M., Kao G.D., Chandrasekaran S., Alonso-Basanta M., Chapman C., Lustig R.A., Wileyto E.P., Hahn S.M., Dorsey J.F. Detection of brain tumor cells in the peripheral blood by a telomerase promoter-based assay. *Cancer Res* 2014;74:2152–9. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-0813.
28. Sullivan J.P., Nahed B.V., Madden M.W., Oliveira S.M., Springer S., Bhore D., Chi A.S., Wakimoto H., Rothenberg S.M., Sequist L.V., Kapur R., Shah K., Iafrate A.J., Curry W.T., Loeffler J.S., Batchelor T.T., Louis D.N., Toner M., Maheswaran S., Haber D.A. Brain tumor cells in circulation are enriched for mesenchymal gene expression. *Cancer Discov* 2014;4(11):1299–309. doi: 10.1158/2159-8290.CD-14-0471.
29. Lohr J.G., Adalsteinsson V.A., Cibulskis K., Choudhury A.D., Rosenberg M., Cruz-Gordillo P., Francis J.M., Zhang C.Z., Shalek A.K., Satija R., Trombetta J.J., Lu D., Tallapragada N., Tahirova N., Kim S., Blumenstiel B., Sougnez C., Lowe A., Wong B., Auclair D., Van Allen E.M., Nakabayashi M., Lis R.T., Lee G.S., Li T., Chabot M.S., Ly A., Taplin M.E., Clancy T.E., Loda M., Regev A., Meyerson M., Hahn W.C.4, Kantoff P.W., Golub T.R., Getz G., Boehm J.S., Love J.C. Whole exome sequencing of circulating tumor cells provides a window into metastatic prostate cancer. *Nat Biotechnol* 2014;32(5):479–84. doi: 10.1038/nbt.2892.
30. Santiago-Dieppa D.R., Gonda D.D., Cheung V.J., Steinberg J.A., Carter B.S., Chen C.C. Extracellular vesicles as a platform for glioma therapeutic development. *Prog Neurol Surg* 2018;32(5):172–9. doi: 10.1159/000469689.
31. Skog J., Wurdinger T., van Rijn S., Meijer D.H., Gainche L., Sena-Esteves M., Curry W.T. Jr, Carter B.S., Krichevsky A.M., Breakefield X.O. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol* 2008;10(12):1470–6. doi: 10.1038/ncb1800.
32. Akers J.C., Ramakrishnan V., Kim R., Phillips S., Kaimal V., Mao Y., Hua W., Yang L., Fu C.C., Nolan J., Nakano I., Yang Y., Beaulieu M., Carter B.S., Chen C.C. miRNA contents of cerebrospinal fluid

- extracellular vesicles in glioblastoma patients. *J Neurooncol* 2015;123(2):205–16. doi: 10.1007/s11060-015-1784-3.
33. Chen W.W., Balaj L., Liao L.M. BEAMing and droplet digital PCR analysis of mutant *IDH1* mRNA in glioma patient serum and cerebrospinal fluid extracellular vesicles. *Mol Ther Nucleic Acids* 2013;2:e109. doi: 10.1038/mtna.2013.28.
 34. Figueroa J.M., Skog J., Akers J., Komotar R., Jensen R., Ringel F., Yang I., Kalkanis S., Thompson R., LoGuidice L., Berghoff E., Parsa A., Liao L., Curry W., Cahill D., Bettgowda C., Lang F.F., Chiocia E.A., Henson J., Kim R., Breakefield X., Chen C., Messer K., Hochberg F., Carter B.S. Detection of wtEGFR amplification and EGFRvIII mutation in CSF-derived extracellular vesicles of glioblastoma patients. *Neuro Oncol* 2017;19(11):1494–502. doi: 10.1093/neuonc/nox085.
 35. Manda S.V., Kataria Y., Tatireddy B.R., Ramakrishnan B., Ratnam B.G., Lath R., Ranjan A., Ray A. Exosomes as a biomarker platform for detecting epidermal growth factor receptor-positive high-grade gliomas. *J Neurosurg* 2017;128(4):1091–101. doi: 10.3171/2016.11.JNS161187.
 36. Akers J.C., Hua W., Li H., Yang Z., Quan K., Zhu W., Li J., Figueroa J., Hirshman B.R., Miller B., Piccioni D., Ringel F., Komotar R., Messer K., Galasko D.R., Hochberg F., Mao Y., Carter B.S., Chen C.C. A cerebrospinal fluid microRNA signature as biomarker for glioblastoma. *Oncotarget* 2017;8(40):68769–79. doi: 10.18632/oncotarget.18332.
 37. Fritz J.V., Heintz-Buschart A., Ghosal A., Wampach L., Etheridge A., Galas D., Wilmes P. Sources and functions of extracellular small RNAs in human circulation. *Annu Rev Nutr* 2016;36:301–36. doi: 10.1146/annurev-nutr-071715-050711.
 38. Shao H., Chung J., Balaj L., Charest A., Bigner D.D., Carter B.S., Hochberg F.H., Breakefield X.O., Weissleder R., Lee H. Protein typing of circulating micro-vesicles allows real-time monitoring of glioblastoma therapy. *Nat Med* 2012;18(12):1835–40. doi: 10.1038/nm.2994.
 39. Wang Y., Springer S., Zhang M., McMahon K.W., Kinde I., Dobbyn L., Ptak J., Brem H., Chaichana K., Gallia G.L., Gokaslan Z.L., Groves M.L., Jallo G.I., Lim M., Olivi A., Quinones-Hinojosa A., Rigamonti D., Riggins G.J., Sciubba D.M., Weingart J.D., Wolinsky J.P., Ye X., Oba-Shinjo S.M., Marie S.K., Holdhoff M., Agrawal N., Diaz L.A. Jr., Papadopoulos N., Kinzler K.W., Vogelstein B., Bettgowda C. Detection of tumor-derived DNA in cerebrospinal fluid of patients with primary tumors of the brain and spinal cord. *Proc Natl Acad Sci USA* 2015;112(31):9704–9. doi: 10.1073/pnas.1511694112.
 40. Huang T.Y., Piunti A., Lulla R.R., Qi J., Horbinski C.M., Tomita T., James C.D., Shilatfard A., Saratsis A.M. Detection of Histone *H3* mutations in cerebrospinal fluid-derived tumor DNA from children with diffuse midline glioma. *Acta Neuropathol Commun* 2017;5(1):28. doi: 10.1186/s40478-017-0436-6.
 41. Chen J., Huan W., Zuo H., Zhao L., Huang C., Liu X., Hou S., Qi J., Shi W. Alu methylation serves as a biomarker for non-invasive diagnosis of glioma. *Oncotarget* 2016;7(18):26099–106. doi: 10.18632/oncotarget.8318.
 42. Akers J.C., Ramakrishnan V., Yang I., Hua W., Mao Y., Carter B.S., Chen C.C. Optimizing preservation of extracellular vesicular miRNAs derived from clinical cerebrospinal fluid. *Cancer Biomark* 2016;17(2):125–32. doi: 10.3233/CBM-160609.
 43. Akers J.C., Ramakrishnan V., Nolan J.P., Duggan E., Fu C.-C., Hochberg F.H., Chen C.C., Carter B.S. Comparative analysis of technologies for quantifying extracellular vesicles (EVs) in clinical cerebrospinal fluids (CSF). *PLoS One* 2016;11(2):e0149866. doi: 10.1371/journal.pone.0149866.

Статья поступила в редакцию: 11.03.2019. Принята в печать: 02.04.2019.

Article was received by the editorial staff: 11.03.2019. Accepted for publication: 02.04.2019.