

Анализ профиля метилирования ДНК подтверждает содержание высокого процента иммунных клеток в образцах глиобластом

Е.И. Петрова¹, Л.В. Ольхова², С.А. Галстян¹, Е.Н. Телышева¹, О.Г. Желудкова^{3,4}, М.В. Рыжова¹

¹ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр нейрохирургии имени академика Н.Н. Бурденко» Минздрава России; Россия, 125047, Москва, ул. 4-я Тверская-Ямская, 16;

²Российская детская клиническая больница — филиал ФГАУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Минздрава России; Россия, 119571, Москва, Ленинский просп., 117;

³ГБУЗ «Научно-практический центр специализированной медицинской помощи детям имени В.Ф. Войно-Ясенецкого Департамента здравоохранения города Москвы», Россия, 119620, Москва, ул. Авиаторов, 38;

⁴ООО «Лечебно-диагностический центр Международного института биологических систем имени Сергея Березина»; Россия, 194354, Санкт-Петербург, ул. Есенина, 2, корп. 3

Контактные данные: Марина Владимировна Рыжова mrizhova@nsi.ru

Глиобластомы — класс злокачественных новообразований центральной нервной системы, представляющий особую сложность для молекулярной диагностики и подтверждения диагноза ввиду значительной внутриопухолевой гетерогенности. Помимо поиска характерных генетических мутаций, например IDH, H3F3A, в «горячих точках» G34 и K27, согласно рекомендациям Всемирной организации здравоохранения, важную роль играет анализ эпигенома опухоли — определение ее класса по структуре метилирования ДНК и статуса метилирования конкретных участков генома, в частности области промотора гена MGMT. Исходя из практического опыта, результаты молекулярно-генетических исследований нередко оказываются противоречивыми из-за неоднородного клеточного состава глиобластом. В данной работе мы приводим серию наблюдений из 35 образцов глиобластом, где сопоставляем морфологические особенности и результаты анализа клеточных типов методом деконволюции на основе общих профилей метилирования ДНК. Согласно нашим результатам, образцы глиобластом мезенхимального класса могут содержать более 50 % неопухолевых иммунных клеток, что следует учитывать при генетических исследованиях данных опухолей.

Ключевые слова: глиобластома, эпигенетика опухолей центральной нервной системы, молекулярная диагностика, метилирование ДНК, деконволюция клеточных типов, Illumina EPIC Methylation microarray

Для цитирования: Петрова Е.И., Ольхова Л.В., Галстян С.А., Телышева Е.Н., Желудкова О.Г., Рыжова М.В. Анализ профиля метилирования ДНК подтверждает содержание высокого процента иммунных клеток в образцах глиобластом. Российский журнал детской гематологии и онкологии. 2023;10(3):15–21.

Информация об авторах

Е.И. Петрова: младший научный сотрудник патологоанатомического отделения НМИЦ нейрохирургии им. акад. Н.Н. Бурденко, e-mail: petrova.katr@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0003-2498-4713>

Л.В. Ольхова: к.м.н., врач-детский онколог отделения трансплантации костного мозга РДКБ — филиала РНИМУ им. Н.И. Пирогова, e-mail: rylkova87@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-7531-6443>, SPIN-код: 3968-0470

С.А. Галстян: врач-патологоанатом патологоанатомического отделения НМИЦ нейрохирургии им. акад. Н.Н. Бурденко, e-mail: sgalstyan@nsi.ru; <https://orcid.org/0000-0001-9953-6654>, SPIN-код: 9641-7996

Е.Н. Телышева: к.б.н., биолог патологоанатомического отделения НМИЦ нейрохирургии им. акад. Н.Н. Бурденко, e-mail: telisheva_k@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-0370-8667>, SPIN-код: 8700-1335

О.Г. Желудкова: д.м.н., профессор, эксперт ВАК по детской нейроонкологии, главный научный сотрудник НПЦ СМПД им. В.Ф. Войно-Ясенецкого ДЗМ, врач-детский онколог ООО «ЛДЦ МИБС», e-mail: clclud@mail.ru; <https://www.orcid.org/0000-0002-8607-3635>, SPIN-код: 4850-7788

М.В. Рыжова: д.м.н., заведующая патологоанатомическим отделением НМИЦ нейрохирургии им. акад. Н.Н. Бурденко, e-mail: mrizhova@nsi.ru; <https://orcid.org/0000-0001-7206-6365>, SPIN-код: 2388-5809

Вклад авторов

Е.И. Петрова, С.А. Галстян, Е.Н. Телышева: выбор тематики публикации, разработка дизайна статьи, написание текста рукописи, обзор публикаций по теме статьи, подготовка списка литературы, составление резюме

Л.В. Ольхова, О.Г. Желудкова, М.В. Рыжова: разработка дизайна статьи, литературное и научное редактирование

Analysis of DNA methylation profiles confirms a high proportion of immune cells in glioblastoma samples

E.I. Petrova¹, L.V. Olkhova², S.A. Galstyan¹, E.N. Telysheva¹, O.G. Zheludkova^{3,4}, M.V. Ryzhova¹

¹N.N. Burdenko National Medical Research Center of Neurosurgery, Ministry of Health of Russia; 16 4th Tverskaya-Yamskaya St., Moscow, 125047, Russia; ²Russian Children's Clinical Hospital — Branch of the N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, Ministry of Health of Russia; 117 Leninskiy Pros., Moscow, 117997, Russia; ³Scientific and Practical Center for Specialized Medical Care for Children named after V.F. Voyno-Yasenetsky Moscow Healthcare Department; 38 Aviatorov St., Moscow, 119620, Russia; ⁴Diagnostic and Treatment Center of International Institution for Biological Systems named after Sergey Berezin; Bldg. 3, 2 Yesenin St., S.-Petersburg, 194354, Russia

Glioblastomas are malignant tumors that belong to the central nervous system and are challenging to diagnose due to their significant intratumoral heterogeneity, which makes molecular testing and diagnosis confirmation particularly difficult. In addition to identifying typical genetic mutations such as IDH, H3F3A G34 and K27, WHO recommendations emphasize the importance of analyzing the tumor epigenome to define its class based on DNA methylation patterns and methylation status of specific genomic regions, particularly the MGMT promoter region. Based on our clinical experience, molecular genetic studies sometimes yield contradictory results due to the heterogeneous cellular composition of glioblastomas. In this study, we present a series of observations made on 35 glioblastoma samples in which we compare the morphological features and the results of cell type detection by deconvolution method based on total DNA methylation profiles. Our results suggest that samples of mesenchymal class glioblastomas may contain over 50 % non-tumor immune cells, which should be considered in genetic testing of these tumors.

Key words: glioblastoma, epigenetics of CNS tumors, molecular diagnostics, DNA methylation, cell type deconvolution, Illumina EPIC Methylation microarray

For citation: Petrova E.I., Olkhova L.V., Galstyan S.A., Telysheva E.N., Zheludkova O.G., Ryzhova M.V. Analysis of DNA methylation profiles confirms a high proportion of immune cells in glioblastoma samples. Russian Journal of Pediatric Hematology and Oncology. 2023;10(3):15–21.

Information about the authors

E.I. Petrova: Research Assistant Pathology Department at N.N. Burdenko National Medical Research Center of Neurosurgery, Ministry of Health of Russia, e-mail: petrova.katr@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0003-2498-4713>

L.V. Olkhova: Cand. of Sci. (Med.), Pediatric Oncologist, Department of Bone Marrow Transplantation at Russian Children's Clinical Hospital – Branch of the N.I. Pirogov Russian National Research Medical University of Ministry of Health of Russia; e-mail: rylkova87@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-7531-6443>, SPIN-code: 3968-0470

S.A. Galstyan: Pathologist Pathology Department at N.N. Burdenko National Medical Research Center of Neurosurgery, Ministry of Health of Russia, e-mail: sgaltyan@nsi.ru; <https://orcid.org/0000-0001-9953-6654>, SPIN-code: 9641-7996

E.N. Telysheva: Cand. of Sci. (Biol.), Biologist Pathology Department at N.N. Burdenko National Medical Research Center of Neurosurgery, Ministry of Health of Russia, e-mail: telisheva_k@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-0370-8667>, SPIN-code: 8700-1335

O.G. Zheludkova: Dr. of Sci. (Med.), Professor, Expert of the Higher Attestation Commission on Pediatric Neuro-Oncology, Chief Researcher of Practical Center for Specialized Medical Care for Children named after V.F. Voyno-Yasenetsky Moscow Healthcare Department, Pediatric Oncologist DTC IIBS named after S. Berezin, e-mail: cledud@mail.ru; <https://www.orcid.org/0000-0002-8607-3635>, SPIN-code: 4850-7788

M.V. Ryzhova: Dr. of Sci. (Med.), Head of the Pathology Department at N.N. Burdenko National Medical Research Center of Neurosurgery, Ministry of Health of Russia, e-mail: mrizhova@nsi.ru; <https://orcid.org/0000-0001-7206-6365>, SPIN-code: 2388-5809

Authors' contributions

E.I. Petrova, S.A. Galstyan, E.N. Telysheva: choosing the subject of publication, article design development, writing the text of the article, review of publications on the topic of the article, preparation of the list of references, composing a resume

L.V. Olkhova, O.G. Zheludkova, M.V. Ryzhova: article design development, literary and scientific edition of the article

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

Финансирование. Работа выполнена при поддержке гранта Министерства образования и науки № 075-15-2021-1343 «Развитие биоресурсной коллекции опухолей нервной системы человека с молекулярно-генетической паспортизацией для персонализированного лечения пациентов с нейроонкологическими заболеваниями». / **Funding.** The study was financially supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (Agreement No. 075 15 2021 1343) “Development of a bioresource collection of tumors of the human nervous system with molecular genetic certification for personalized treatment of patients with neuro-oncological diseases”.

Введение

Глиобластома — наиболее частая первичная внутримозговая опухоль, поражающая как детей, так и взрослых, и отличающаяся крайне неблагоприятным прогнозом [1].

Исторически под глиобластомами понимались злокачественные диффузные опухоли глиального ряда, характеризующиеся 2 основными морфологическими признаками: пролиферацией эндотелия сосудов и некрозами. При дальнейшем изучении стало понятно, что это гетерогенная группа опухолей, и в 4-м издании классификации опухолей центральной нервной системы (ЦНС) Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) от 2016 г. глиобластомы были впервые подразделены в зависимости от мутационного статуса генов IDH [2].

Следующим шагом стало выделение 2 глобальных групп глиобластом — взрослые и педиатрические — в 5-м издании классификации опухолей ЦНС ВОЗ от 2021 г. [3]. Такая нозологическая единица, как «глио-

бластома» теперь рассматривается исключительно как диффузная астроцитарная глиома взрослого типа высокой степени злокачественности (high grade) с дикими типами генов IDH1, IDH2. IDH-мутантные астроцитарные глиомы в классификации теперь определяются как «астроцитомы, IDH-мутантная», а группа бывших педиатрических глиобластом включает в себя 3 нозологии: диффузная срединная глиома, H3 K27-мутантная, диффузная полушарная глиома, H3 G34-мутантная и диффузная глиома педиатрического типа высокой степени злокачественности, IDH-дикий тип, H3-дикий тип.

Одной из основ типирования глиобластом стало исследование особенностей их эпигенома: сочетание метилированных и неметилированных CpG-островков ДНК опухоли, складывающееся в уникальный для каждой опухоли профиль. Изначально глиобластомы были подразделены на 6 групп: IDH-мутантные, H3F3A K27-мутантные, H3F3A G34-мутантные, RTK I (PDGFRA), RTK II (классические) и мезенхимальные [4].

В 2018 г. D. Carreer с коллегами разработали и опубликовали свою версию классификации опухолей ЦНС, основанную на профиле метилирования ДНК [5]. В этой классификации глиобластомы, *IDH*-дикий тип, были подразделены на 7 метилиционных классов: GBM RTK I, GBM RTK II, GBM RTK III, GBM MES, GBM MID, GBM MYCN, GBM G34. Отдельно от глиобластом выделялась диффузная срединная глиома, H3 K27-мутантная – DMG K27.

В последней версии (12.8) классификатора опухолей ЦНС на основе метилирования ДНК структура приближена к классификации ВОЗ: есть глобальное подразделение на диффузные глиомы взрослого и педиатрического типа. В диффузные глиомы взрослого типа входит глиобластома, *IDH*-дикий тип с 5 подтипами (RTK1, RTK2, мезенхимальный, с примитивным нейрональным компонентом и средней линии/задней черепной ямки *H3/IDH*-дикий тип). Все остальные описанные подтипы теперь рассматриваются как группа диффузных глиом высокой степени злокачественности педиатрического типа.

Классификация опухолей ЦНС ВОЗ от 2021 г. [3] и опыт ведущих мировых научных центров [6] показывают важность внедрения эпигенетических исследований для точной диагностики и выбора адекватных методов лечения пациентов с опухолями ЦНС. С 2021 г. в патологоанатомическом отделении НМИЦ нейрохирургии им. акад. Н.Н. Бурденко используются микрочипы Illumina Infinium Methylation EPIC BeadChip Array для анализа общего профиля метилирования ДНК опухолей в целях определения их молекулярного класса [7].

Помимо молекулярной классификации полученные данные могут быть применены для анализа метилирования специфических участков генома, хромосомных вариаций, визуализации эпигенетического сходства между образцами [8, 9], а также для научных исследований, направленных на изучение биологических свойств редких и малоизученных типов опухолей ЦНС.

Цель настоящей работы – провести анализ молекулярных классов и клеточного состава образцов глиобластом на основе общего профиля метилирования ДНК и сопоставить полученные результаты с особенностями морфологии данного подтипа опухоли.

Материалы и методы

В ходе данной работы были исследованы 35 образцов опухолей (замороженной ткани или парафиновых блоков) взрослых пациентов в возрасте 30–82 лет, проходивших обследование и лечение в НМИЦ нейрохирургии им. акад. Н.Н. Бурденко в 2021–2022 гг. с диагнозом «глиобластома, NOS, CNS WHO grade 4» и «глиобластома, *IDH*-дикий тип, CNS WHO grade 4».

Диагноз установлен одним или двумя врачами-патологоанатомами на основании диагностических критериев 5-го издания классификации опухолей ЦНС ВОЗ от 2021 г.

Выделение ДНК для определения общего профиля метилирования проводилось из свежемороженых образцов ткани опухоли набором Illumina Infinium Methylation EPIC BeadChip Kit. Далее подготовленные образцы ДНК были отсканированы на платформе Illumina Next-Seq 550 Sequencing System. Для каждого образца опухолевой ДНК был выполнен анализ профилей метилирования ДНК, определен молекулярный (метилиционный) подкласс опухоли и статус области промотора гена *MGMT*.

Первичная обработка данных об интенсивности сигнала метилирования, полученных на приборе Illumina, проводилась в среде Rstudio с помощью средств языка программирования R и специализированной библиотеки Bioconductor minfi (v1.42.0) [10]. Для получения данных о структуре метилирования ДНК, согласно рекомендациям производителя микрочипов Illumina [11], был выполнен подсчет M- и Beta-значений уровней интенсивности сигнала на метилированных и неметилированных CpG-участках опухолевой ДНК. Для оценки статуса метилирования области промотора гена *MGMT* был использован специальный алгоритм анализа данных MGMT-STP27 [12]. Для определения молекулярных классов глиобластом на основании профилей метилирования ДНК был задействован классификатор опухолей ЦНС (MNP brain classifier v11b4/12.3/12.5), основанный на алгоритмах машинного обучения [5] и реализованный на онлайн-платформе <https://www.molecularneuropathology.org/>.

На основании результатов морфологической оценки и определения молекулярных классов образцы опухолей были отобраны для дальнейшего анализа клеточных типов методом деконволюции данных. С этой целью был применен комбинированный алгоритм EpiDISH (Epigenetic Dissection of Intra-Sample-Heterogeneity) [13], позволяющий разделить сигналы метилирования ДНК, свойственные определенным типам клеток, из общего массива Beta-значений уровней интенсивности сигнала метилирования ДНК в образце опухоли, представляющем собой неоднородную смесь клеток. В качестве контрольного набора данных для определения клеточного состава образцов были использованы характерные профили метилирования ДНК 11 типов неопухолевых/иммунных клеток, наиболее характерных для опухолей ЦНС: регуляторные Т-клетки, CD4⁺ Т-клетки, CD8⁺ Т-клетки, В-клетки, NK-клетки, эозинофилы, нейтрофилы, моноциты, эндотелиальные клетки, глиальные клетки и нейроны [14].

Результаты

В результате анализа общих профилей метилирования ДНК образцов глиобластом были определены следующие молекулярные классы (согласно 11-й версии классификатора): глиобластома, *IDH*-дикий тип, RTK 1 (7 образцов), глиобластома, *IDH*-дикий тип, RTK 2 (11 образцов), глиобластома, *IDH*-дикий тип,

мезенхимальная (9 образцов), *IDH*-глиома/астроцитома (1 образец), нормальная ткань коры головного мозга/опухолевое микроокружение (6 образцов), не удалось определить класс для 1 образца. При повторной оценке с помощью более новой уточненной 12-й версии классификатора опухоли распределились следующим образом: глиобластома, *IDH*-дикий тип, *RTK* 1 (5 образцов), глиобластома, *IDH*-дикий тип, *RTK* 2 (8 образцов), глиобластома, *IDH*-дикий тип, мезенхимальная (15 образцов), *IDH*-глиома/астроцитома (1 образец), диффузная глиома детского типа *RTK*1/2 (2 образца) нормальная ткань/опухолевое микроокружение (2 образца), не удалось определить класс для 2 образцов. Область промотора гена *MGMT* была метилирована в 17 образцах, неметилирована – в 18.

Для дальнейшего анализа клеточных типов были отобраны 18 образцов глиобластом мезенхимального класса и классов *RTK*1/2, у которых конечный результат совпадал по обеим версиям классификатора, а также получил высокую оценку (prediction score/коэффициент соответствия > 0.9). Образцы, получившие противоречивые результаты, низкие коэффициенты соответствия, а также классифицированные как нормальная ткань/опухолевое микроокружение, были исключены из следующих этапов анализа.

При последующей деконволюции клеточного состава образцов было обнаружено, что во всех при-

сутствовали неопухолевые/иммунные клетки в разных пропорциях. При этом в образцах глиобластом классов *RTK*1/2 доля неопухолевых клеток составляла 17–47 %, в то время как для мезенхимальных глиобластом этот показатель был значимо выше (43–70 %) (рис. 1).

Состав неопухолевых клеток в разных образцах был неоднородным, однако в части мезенхимальных глиобластом преобладали моноциты и нейтрофилы (рис. 2).

Вышеизложенные результаты подтверждались наблюдениями в ходе морфологической оценки: инфильтрация нейтрофилами наблюдалась лишь в глиобластомах мезенхимального подтипа и была ассоциирована с выраженным ангиоматозом и кровоизлияниями (рис. 3).

При морфологической оценке инфильтрации иммунными клетками условно были выделены 4 группы: менее 1 %, менее 10 %, от 10 до 30 % и более 30 %. В группе мезенхимальных глиобластом было выявлено следующее распределение: 3 образца имели более 30 % лимфоидной инфильтрации, 4 образца – от 10 до 30 %, 3 образца – менее 10 %. В группе *RTK*1 2 образца имели от 10 до 30 % лимфоидной инфильтрации, 1 образец – менее 10 % и 1 образец – менее 1 %. В группе *RTK*2 2 образца имели более 30 % лимфоидной инфильтрации и 1 образец – от 10 до 30 %.

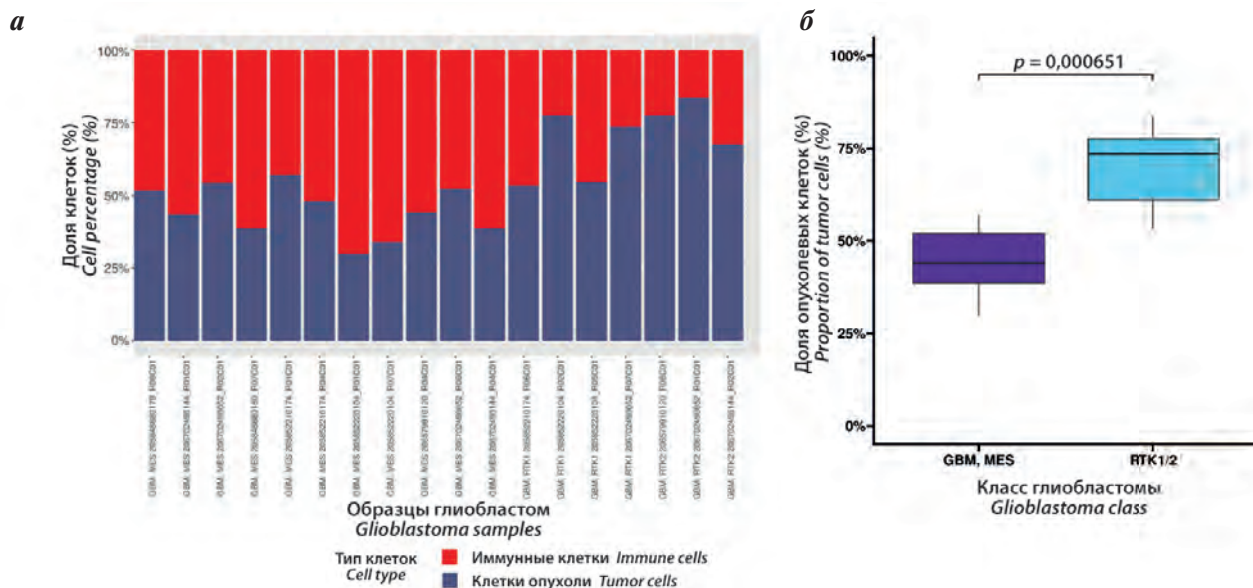


Рис. 1. а – оценка процентного соотношения опухолевых и иммунных клеток в образцах глиобластом. Столбики гистограммы по оси абсцисс обозначают образцы, по оси ординат показан процент содержания клеток. Образцы помечены как GBM MES – мезенхимальная глиобластома, GBM RTK1, RTK2 – глиобластома класса RTK1, RTK2 соответственно; б – сравнение процентного содержания опухолевых клеток в образцах глиобластом разных классов. По оси ординат – процент опухолевых клеток согласно профилю метилирования, по оси абсцисс – группы образцов опухолей в соответствии с молекулярным классом (GBM MES – мезенхимальная глиобластома, GBM RTK1/RTK2 – глиобластома класса RTK1 и RTK2 вместе). Значение *p*-value приведено на основании *t*-теста

Fig. 1. а – estimated percentage of tumor and immune cells in glioblastoma samples. The bars of the histogram along the x-axis denote tumor samples, while the y-axis shows the percentage of cell types. Samples are labeled as GBM MES – mesenchymal glioblastoma, GBM RTK1, RTK2 – RTK1, RTK2 class glioblastoma, respectively; б – comparison of tumor cell proportion in glioblastoma samples of different classes. Along the y-axis is the percentage of tumor cells according to methylation profile, along the x-axis are the groups of tumor samples according to molecular class (GBM MES – mesenchymal glioblastoma, GBM RTK1/RTK2 – glioblastoma of RTK1 and RTK2 class together). The *p*-value is given based on *t*-test

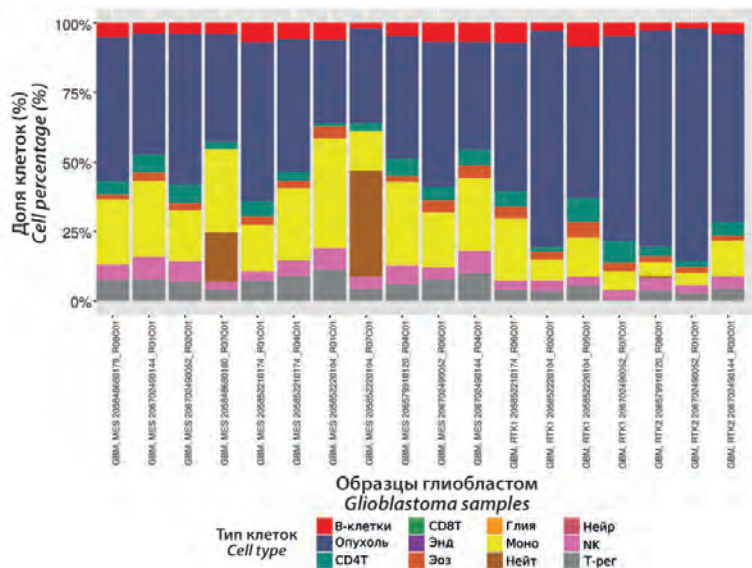


Рис. 2. Оценка процентного содержания разных типов неопухолевых/иммунных клеток в образцах глиобластом. Столбики гистограммы по оси абсцисс обозначают образцы, по оси ординат показан процент содержания клеток. Образцы помечены как GBM MES – мезенхимальная глиобластома, GBM RTK1, RTK2 – глиобластома класса RTK1, RTK2 соответственно. Сокращенные названия типов клеток: регуляторные Т-клетки (T-reg), CD4⁺ Т-клетки (CD4-T), CD8⁺ Т-клетки (CD8-T), В-клетки (В-клетки), NK-клетки (NK), эозинофилы (Эоз), нейтрофилы (Нейт), моноциты (Моно), эндотелиальные клетки (Энд), глиальные клетки (Глия) и нейроны (Нейр)

Fig. 2. Estimated percentage of different types of non-tumor/immune cells in glioblastoma samples. The bars of the histogram along the x-axis denote the samples, while the y-axis shows the percentage of cell types. Samples are labeled as GBM MES – mesenchymal glioblastoma, GBM RTK1, RTK2 – glioblastoma of RTK1, RTK2 class, respectively. Abbreviations of cell types: regulatory T cells (T-reg), CD4⁺ T cells (CD4-T), CD8⁺ T cells (CD8-T), B cells (В-клетки), NK cells (NK), eosinophils (Эоз), neutrophils (Нейт), monocytes (Моно), endothelial cells (Энд), glial cells (Глия), and neurons (Нейр)

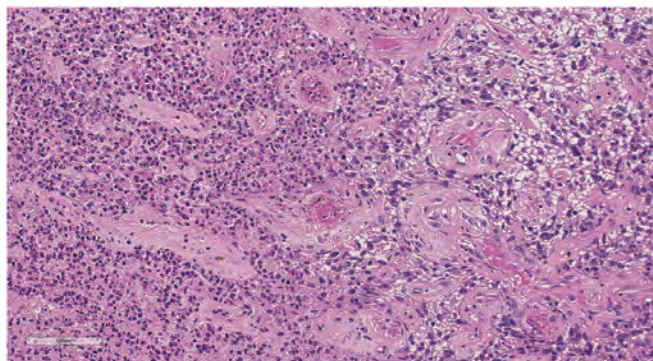


Рис. 3. Мезенхимальный подтип глиобластомы с выраженной микрососудистой пролиферацией и инфильтрацией нейтрофилами. Окраска гематоксилином и эозином, × 200

Fig. 3. Mesenchymal subtype of glioblastoma with brisk microvascular proliferation and neutrophilic infiltration. Stained with hematoxylin and eosin, × 200

Обсуждение

В ходе данной работы мы наблюдали высокую инфильтрацию ткани глиобластом иммунными клетками при деконволюции данных общего профиля метилирования. Вероятно, высокое процентное содержание иммунных клеток обусловлено тем, что в своем развитии глиобластомы активно стимулируют ангиогенез с явлениями микрососудистой пролиферации, которая приводит к нарушению плотных контактов в гематоэнцефалическом барьере (ГЭБ). Повышенная проницаемость ГЭБ позволяет иммунным клеткам более свободно проникать в опухоль. Глиомы рекрутируют иммунные клетки и «заставляют» их ингибировать иммунные реакции, например,

за счет повышения экспрессии индоламин-2,3-диоксигеназы 1 (от англ. – indoleamine 2,3-dioxygenase 1, IDO1) [15–18].

Чем выше проницаемость ГЭБ, тем больше иммунных клеток сможет проникнуть в ткань опухоли. Выделенные условные группы имели между собой гистологические сходства: группу «менее 1 %» чаще всего составляли образцы в краевой зоне опухоли на границе с инфильтрацией мозгового вещества и единичными иммунными клетками; группа «менее 10 %» была представлена опухолью с начальными явлениями микрососудистой пролиферации и отсутствием некротизированных участков; группа «от 10 до 30 %» отличалась уже более «развернутой» морфологической картиной глиобластомы с явной микрососудистой пролиферацией и сформированными очагами некроза; и последняя группа «более 30 %» зачастую характеризовалась преобладанием сосудистого и некротического компонентов над витальной опухолью, что сопровождалось выраженной инфильтрацией иммунными клетками, в том числе высоким содержанием нейтрофилов, нетипичных опухолей ЦНС. Особенно часто в последнюю группу входили образцы мезенхимальной глиобластомы. Это может быть связано, например, с более активной стимуляцией ангиогенеза в сравнении с глиобластомами группы RTK.

Помимо повышения жизнеспособности опухоли, иммунные клетки снижают точность определения молекулярных классов глиобластом, так как вносят «шум», искажающий работу алгоритмов-классификаторов профилей метилирования ДНК – это, вероятно, является причиной того, что разные вер-

сии классификаторов в нашей практике показывают противоречивые результаты и низкие коэффициенты соответствия.

С другой стороны, высокий процент иммунных клеток в образце опухоли не стоит рассматривать только как «шум», затрудняющий диагностику, — возможно, именно для таких пациентов наиболее перспективным методом лечения окажется иммунотерапия. Данные молекулярного подтипа глиобластом и процентного содержания различных популяций иммунных клеток в перспективе можно использовать в качестве одного из критериев включения в клиническое исследование иммунной терапии у пациентов с глиобластомами.

Для изучения взаимосвязи молекулярного подтипа и клеточного состава опухоли с ответом на иммунную терапию необходимо исследовать большее количество различных образцов, уделяя особенное внимание выбору зоны взятия пробы для последующего выделения ДНК предварительным созданием криостатных срезов, и, возможно, сочетать примененный нами метод с более традиционными методами типирования клеток, например, с иммуногистохимическим исследованием.

В дальнейшем деконволюцию клеточного состава образцов можно использовать и для других опухолей

ЦНС, оценивая перспективы использования иммунной терапии.

Выводы

В данной работе продемонстрированы результаты анализа молекулярных классов и клеточного состава образцов глиобластом на основе общего профиля метилирования ДНК и проведена оценка их соответствия особенностям морфологической картины данного подтипа опухолей ЦНС. Примененный нами алгоритм деконволюции данных для выделения иммунных клеток в исследуемых образцах ДНК показал свою эффективность и позволил обнаружить статистически значимые различия в содержании иммунных клеток между глиобластомами различных классов.

Следует отметить, что проведенный анализ демонстрирует потенциальные возможности иммуно-метиломного профилирования как дополнительного инструмента для оценки опухолей на основе данных метилирования ДНК. Мы предполагаем, что развивающиеся вычислительные методы деконволюции клеточных типов впоследствии будут полезны для отбора пациентов и дальнейших исследований в области иммунотерапии опухолей ЦНС.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Ostrom Q.T., Price M., Neff C., Cioffi G., Waite K.A., Kruchko C., Barnholtz-Sloan J.S. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2015–2019. *Neuro Oncol.* 2022;24(Suppl 5):v1–v95. doi: 10.1093/neuonc/noac202.
- Louis D.N., Ohgaki H., Wiestler O.D., Cavenee W.K. World Health Organization Classification of Tumours of the Central Nervous System. 4th ed., updated ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2016.
- WHO Classification of Tumours Editorial Board. World Health Organization Classification of Tumours of the Central Nervous System. 5th ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2021.
- Sturm D., Witt H., Hovestadt V., Khuong-Quang D.A., Jones D.T., Konermann C., Pfaff E., Tönjes M., Sill M., Bender S., Kool M., Zapatka M., Becker N., Zucknick M., Hielscher T., Liu X.Y., Fontebasso A.M., Ryzhova M., Albrecht S., Jacob K., Wolter M., Ebinger M., Schuhmann M.U., van Meter T., Frühwald M.C., Hauch H., Pekrun A., Radlwimmer B., Niehues T., von Kumorowski G., Dürken M., Kulozik A.E., Madden J., Donson A., Foreman N.K., Drissi R., Fouladi M., Scheurlen W., von Deimling A., Monoranu C., Roggendorf W., Herold-Mende C., Unterberg A., Kramm C.M., Felsberg J., Hartmann C., Wiestler B., Wick W., Milde T., Witt O., Lindroth A.M., Schwartzentruber J., Faury D., Fleming A., Zakrzewska M., Liberski P.P., Zakrzewski K., Hauser P., Garami M., Klekner A., Bogner L., Morrissy S., Cavalli F., Taylor M.D., van Sluis P., Koster J., Versteeg R., Volckmann R., Mikkelsen T., Aldape K., Reifemberger G., Collins V.P., Majewski J., Korshunov A., Lichter P., Plass C., Jabado N., Pfister S.M. 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.
- Capper D., Jones D.T.W., Sill M., Hovestadt V., Schrimpf D., Sturm D., Koelsche C., Sahm F., Chavez L., Reuss D.E., Kratz A., Wefers A.K., Huang K., Pajtl K.W., Schweizer L., Stichel D., Olar A., Engel N.W., Lindenberg K., Harter P.N., Braczynski A.K., Plate K.H., Dohmen H., Garvalov B.K., Coras R., Hölsken A., Hewer E., Beverunge-Hudler M., Schick M., Fischer R., Beschoner R., Schittenhelm J., Staszewski O., Wani K., Varlet P., Pages M., Temming P., Lohmann D., Selt F., Witt H., Milde T., Witt O., Aronica E., Giangaspero F., Rushing E., Scheurlen W., Geisenberger C., Rodriguez F.J., Becker A., Preusser M., Haberler C., Bjerkvig R., Cryan J., Farrell M., Deckert M., Hench J., Frank S., Serrano J., Kannan K., Tsirigos A., Brück W., Hofer S., Brehmer S., Seiz-Rosenhagen M., Hänggi D., Hans V., Rozsnoki S., Hansford J.R., Kohlhof P., Kristensen B.W., Lechner M., Lopes B., Mawrin C., Ketter R., Kulozik A., Khatib Z., Heppner F., Koch A., Jouvett A., Keohane C., Mühleisen H., Mueller W., Pohl U., Prinz M., Benner A., Zapatka M., Gottardo N.G., Driever P.H., Kramm C.M., Müller H.L., Rutkowski S., von Hoff K., Frühwald M.C., Gnekow A., Fleischhack G., Tippelt S., Calaminus G., Monoranu C.M., Perry A., Jones C., Jacques T.S., Radlwimmer B., Gessi M., Pietsch T., Schramm J., Schackert G., Westphal M., Reifemberger G., Wesseling P., Weller M., Collins V.P., Blümcke I., Bendszus M., Debus J., Huang A., Jabado N., Northcott P.A., Paulus W., Gajjar A., Robinson G.W., Taylor M.D., Jaunmuktane Z., Ryzhova M., Platten M., Unterberg A., Wick W., Karajannis M.A., Mittelbronn M., Acker T., Hartmann C., Aldape K., Schüller U., Buslei R., Lichter P., Kool M., Herold-Mende C., Ellison D.W., Hasselblatt M., Snuderl M., Brandner S., Korshunov A., von Deimling A., Pfister S.M. DNA methylation-based classification of central nervous system tumours. *Nature.* 2018;555(7697):469–74. doi: 10.1038/nature26000.
- Capper D., Stichel D., Sahm F., Jones D.T.W., Schrimpf D., Sill M., Schmid S., Hovestadt V., Reuss D.E., Koelsche C., Reinhardt A., Wefers A.K., Huang K., Sievers P., Ebrahimi A., Schöler A., Teichmann D., Koch A., Hänggi D., Unterberg A., Platten M., Wick W., Witt O., Milde T., Korshunov A., Pfister S.M., von Deimling A. Practical implementation of DNA methylation and copy-number-based CNS tumor diagnostics: the Heidelberg experience. *Acta Neuropathol.* 2018;136(2):181–210. doi: 10.1007/s00401-018-1879-y.
- Рыжова М.В., Галстян С.А., Тельшева Е.Н. Значение оценки метилирования ДНК в морфологической диагностике опухолей

- ЦНС. Архив патологии. 2022;84(3):65–75. doi: 10.17116/patol20228403165. [Ryzhova M.V., Galstyan S.A., Telysheva E.N. Significance of DNA methylation assessment in the morphological diagnosis of brain tumours. *Arkhiv patologii = Pathology Archive*. 2022;84(3):65–75. (In Russ.)].
8. Рыжова М.В., Телышева Е.Н., Шайхаев Е.Г., Старовойтов Д.В., Котельникова А.О., Галстян С.А., Оконеchnikov К.В. Современные диагностические возможности молекулярного исследования опухолей мозга в центре нейрохирургии им. акад. Н.Н. Бурденко. *Журнал Вопросы нейрохирургии им. Н.Н. Бурденко*. 2021;85(6):98–101. doi: 10.17116/neiro20218506192. [Ryzhova M.V., Telysheva E.N., Shaikhaev E.G., Starovoitov D.V., Kotelnikova A.O., Galstyan S.A., Okonechnikov K.V. Current diagnostic methods in molecular classification of brain tumors at the Burdenko Neurosurgical Center. *Zhurnal Voprosy Neurokhirurgii Imeni N.N. Burdenko = Burdenko's Journal of Neurosurgery*. 2021;85(6):98–101. (In Russ.)].
 9. Петрова Е.И., Галстян С.А., Телышева Е.Н., Рыжова М.В. Визуализация результатов анализа структуры метилирования ДНК как инструмент контроля качества молекулярной классификации опухолей ЦНС. *Российский нейрохирургический журнал им. проф. А.Л. Поленова*. 2022;14(4):64–70. doi: 10.56618/20712693_2022_14_4_64. [Petrova E.I., Galstyan S.A., Telysheva E.N., Ryzhova M.V. Visualization of DNA methylation profiling data as a quality control tool for molecular classification of CNS tumors. *Rossiyskiy neyrokhirurgicheskiy zhurnal imeni professora A.L. Polenova = Russian Neurosurgical Journal named after prof. A.L. Polenov*. 2022;14(4):64–70. (In Russ.)].
 10. Aryee M.J., Jaffe A.E., Corrada-Bravo H., Ladd-Acosta C., Feinberg A.P., Hansen K.D., Irizarry R.A. Minfi: a flexible and comprehensive Bioconductor package for the analysis of Infinium DNA methylation microarrays. *Bioinformatics*. 2014;30(10):1363–9. doi: 10.1093/bioinformatics/btu049.
 11. Mansell G., Gorrie-Stone T.J., Bao Y., Kumari M., Schalkwyk L.S., Mill J., Hannon E. Guidance for DNA methylation studies: statistical insights from the Illumina EPIC array. *BMC Genomics*. 2019;20(1):366. doi: 10.1186/s12864-019-5761-7.
 12. Bady P., Sciuscio D., Diserens A.C., Bloch J., van den Bent M.J., Marosi C., Dietrich P.Y., Weller M., Mariani L., Heppner F.L., McDonald D.R., Lacombe D., Stupp R., Delorenzi M., Hegi M.E. MGMT methylation analysis of glioblastoma on the Infinium methylation BeadChip identifies two distinct CpG regions associated with gene silencing and outcome, yielding a prediction model for comparisons across datasets, tumor grades, and CIMP-status. *Acta Neuropathol*. 2012;124(4):547–60. doi: 10.1007/s00401-012-1016-2. Erratum in: *Acta Neuropathol*. 2013;126(1):159.
 13. Teschendorff A.E., Breeze C.E., Zheng S.C., Beck S. A comparison of reference-based algorithms for correcting cell-type heterogeneity in Epigenome-Wide Association Studies. *BMC Bioinformatics*. 2017;18(1):105. doi: 10.1186/s12859-017-1511-5.
 14. Grabovska Y., Mackay A., O'Hare P., Crosier S., Finetti M., Schwalbe E.C., Pickles J.C., Fairchild A.R., Avery A., Cockle J., Hill R., Lindsey J., Hicks D., Kristiansen M., Chalker J., Anderson J., Hargrave D., Jacques T.S., Straathof K., Bailey S., Jones C., Clifford S.C., Williamson D. Pediatric pan-central nervous system tumor analysis of immune-cell infiltration identifies correlates of antitumor immunity. *Nat Commun*. 2020;11(1):4324. doi: 10.1038/s41467-020-18070-y.
 15. Chen Z., Hambardzumyan D. Immune Microenvironment in Glioblastoma Subtypes. *Front Immunol*. 2018;9:1004. doi: 10.3389/fimmu.2018.01004.
 16. Mo F., Pellerino A., Soffietti R., Rudà R. Blood-Brain Barrier in Brain Tumors: Biology and Clinical Relevance. *Int J Mol Sci*. 2021;22(23):12654. doi: 10.3390/ijms222312654.
 17. Han S., Ma E., Wang X., Yu C., Dong T., Zhan W., Wei X., Liang G., Feng S. Rescuing defective tumor-infiltrating T-cell proliferation in glioblastoma patients. *Oncol Lett*. 2016;12(4):2924–9. doi: 10.3892/ol.2016.4944.
 18. Zhai L., Ladomersky E., Lauing K.L., Wu M., Genet M., Gritsina G., Györfy B., Brastianos P.K., Binder D.C., Sosman J.A., Giles F.J., James C.D., Horbinski C., Stupp R., Wainwright D.A. Infiltrating T Cells Increase *IDO1* Expression in Glioblastoma and Contribute to Decreased Patient Survival. *Clin Cancer Res*. 2017;23(21):6650–60. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-17-0120.

Статья поступила в редакцию: 03.09.2023. Принята в печать: 30.09.2023.

Article was received by the editorial staff: 03.09.2023. Accepted for publication: 30.09.2023.