

Опыт создания специализированного биобанка глиом головного мозга человека

Д.А. Гольбин¹, А.Л. Корочкина¹, С.В. Шугай¹, Т.В. Цуканова¹, М.А. Шифрин¹, А.В. Ревещин²,
А.В. Косырькова¹, Г.В. Данилов¹, Е.Ю. Рыбалкина³, Г.В. Павлова^{1,2}, Г.Л. Кобяков¹, А.А. Потапов¹

¹ ФГАУ Национальный медицинский исследовательский центр нейрохирургии имени академика Н.Н. Бурденко Минздрава России, Москва, Россия

² ФГБУН Институт биологии гена Российской академии наук, Москва, Россия

³ ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина Минздрава России, Москва, Россия

Введение. В настоящее время во всем мире отмечается рост частоты опухолей головного мозга, и глиома не является исключением. Несмотря на большое количество исследований в области терапии данного заболевания, опухоли глиального ряда по-прежнему остаются одними из самых часто диагностируемых первичных новообразований центральной нервной системы, и результат лечения не всегда успешен. Для решения данной проблемы необходимо создать единое криохранилище с систематизированной базой данных, которые позволят углубиться в изучение вопроса патогенеза и инвазии глиом. В настоящее время в России функционирует около 20 хранилищ биоматериалов, но, к сожалению, отсутствуют репозитории опухолей глиального ряда. Цель исследования – разработка биобанка глиальных опухолей с наличием единой электронной системы для хранения ассоциированной клинической информации, которая в дальнейшем будет использоваться для исследований.

Материалы и методы. В ходе оперативного вмешательства у пациентов с предполагаемым диагнозом «злокачественная глиома головного мозга» проводили забор необходимого объема биологического материала, после чего осуществляли его обработку, криоконсервацию и паспортизацию.

Результаты. В период с 1 августа 2018 года по 30 апреля 2020 года накоплено 1452 аликвоты от 358 исследуемых. Каждому образцу из опухоли в криохранилище соответствует парафиновый блок, а также комплекс демографических, клинических, гистологических и катamnестических данных. Вся информация об образцах систематизирована и хранится в электронной информационной системе. В ходе работы был сформулирован формат паспорта глиомы.

Заключение. Создание соответствующей организационной структуры может быть использовано для повышения эффективности в ходе дальнейших экспериментальных работ с возможной перспективой применения и внедрения персонализированных методов лечения в будущем после проведения полного цикла клинических исследований.

Ключевые слова: нейроонкология, глиома, глиобластома, биобанк, криохранилище

Для корреспонденции: Денис Александрович Гольбин. E-mail: denis.golbin@gmail.com

Для цитирования: Гольбин Д.А., Корочкина А.Л., Шугай С.В., Цуканова Т.В., Шифрин М.А., Ревещин А.В., Косырькова А.В., Данилов Г.В., Рыбалкина Е.Ю., Павлова Г.В., Кобяков Г.Л., Потапов А.А. Опыт создания специализированного биобанка глиом головного мозга человека. Клини. эксп. морфология. 2020;9(4):39–49. DOI:10.31088/CEM2020.9.4.39-49.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РФФИ № 18-29-01064 мк «Создание биобанка глиом мозга человека с формированием цифрового архива интегрированных клинических, гистологических и молекулярно-генетических данных».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила 29.06.2020. Получена после рецензирования 26.08.2020. Принята в печать 26.10.2020.

Specialized biorepository for human brain glioma: project development and operational experience

D.A. Golbin¹, A.L. Korochkina¹, S.V. Shugay¹, T.V. Tsukanova¹, M.A. Shifrin¹, A.V. Revishchin²,
A.V. Kosyrkova¹, G.V. Danilov¹, E.Y. Rybalkina³, G.V. Pavlova^{1,2}, G.L. Kobiakov¹, A.A. Potapov¹

¹ N.N. Burdenko National Medical Research Center of Neurosurgery of the Ministry of Health of Russia, Moscow, Russia

² Institute of Gene Biology Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

³ N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia, Moscow, Russia

Introduction. Today we observe an increase in brain tumor incidence around the world, and glioma is no exception. Gliomas are still among the most frequently diagnosed primary central nervous system tumors

despite a large number of glioma management studies. Their control still remains a challenge. It is necessary to create specialized cryogenic storage with a systematized databank that could provide a basis for more profound studies of their pathogenesis and invasion patterns. There are about 20 biorepository facilities in Russia; however, they do not focus on a particular tumor type. The aim of the study was to develop the specific biobank of glial tumors integrated with a dedicated electronic system containing all associated clinical data necessary for the research purposes.

Materials and methods. The required amount of material sampling was carried out during the surgical resection in patients with a preliminary diagnosis of “malignant glioma”, followed by processing, cryopreservation, and passportization.

Results. Between August 1, 2018, and April 30, 2020, a total of 1,452 aliquots from 358 subjects were accumulated in the biobank. Each frozen sample corresponded to a paraffin block and provided with the whole set of associated demographic, clinical, histological, and follow-up data. All these records were stored in the electronic information system. During this study, the design of the glioma passport was developed.

Conclusion. The development of an appropriate facility is necessary for efficient further experimental research. It offers an opportunity for future implementation of personalized treatment methods after a full clinical trial cycle.

Keywords: neurooncology, glioma, glioblastoma, biobank, biorepository

Corresponding author: Denis A. Golbin. E-mail: denis.golbin@gmail.com

For citation: Golbin D.A., Korochkina A.L., Shugay S.V., Tsukanova T.V., Shifrin M.A., Revishchin A.V., Kosyrkova A.V., Danilov G.V., Rybalkina E.Y., Pavlova G.V., Kobiakov G.L., Potapov A.A. Specialized biorepository for human brain glioma: project development and operational experience. *Clin. exp. morphology.* 2020;9(4):39–49. DOI:10.31088/CEM2020.9.4.39-49 (In Russ.).

Funding. The study was supported by the Russian Foundation for Basic Research, Project No.18-29-01064 mk “Development of human brain glioma biorepository with digital archive of associated clinical, histological, molecular, and genetic data”.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received 29.06.2020. **Received in revised form** 26.08.2020. **Accepted** 26.10.2020.

Введение

Интерес к созданию биобанков, которые занимают сбором тех или иных тканей человека, возрос за последние десятилетия [1]. Биобанкирование тканей животных существует уже более полувека. В США первый банк человеческих образцов для трансплантации был создан еще в 1949 году [2]. Следующим шагом в развитии биобанков стал сбор материала не для трансплантации, а для изучения различных заболеваний.

Развитие современных технологий, молекулярно-биологических методов, секвенирования потребовало концентрации тканевого материала для достижения достаточных выборок, которые позволили бы делать более достоверные выводы. Таким образом, начали появляться специализированные биобанки, в которых аккумулировался биологический материал, взятый от пациентов с определенными заболеваниями. В рамках создания подобных биобанков особое место занимают биобанки онкологических заболеваний.

Цель подобных биобанков – сделать опухолевую ткань и другие биологические материалы человека доступными для большого числа исследований онкогенеза [3]. Сегодня появление персонализированной медицины и разработка индивидуальных протоколов лечения превратили знания об отдельных механизмах формирования и роста опухоли в важнейшую задачу поиска стратегий лечения. Исходно исследование бо-

лезней человека в значительной степени осуществлялось на животных, так как считалось, что образцы тканей животных более доступны. Однако в дальнейшем было показано, что результаты исследований, проведенных на животных, не дают возможности в полной мере проецировать их на болезни человека [4]. В последнее время акцент делается на сборе именно материала тканей человека в качестве источника информации для исследований экспрессии генов, протеомики и изучения сигнальных путей. При этом современные технологии требуют большого количества образцов, чего можно достичь только при развитии биобанков [5].

За последние 20 лет потребность в использовании биобанков выросла в несколько раз и, как ожидается, в дальнейшем будет продолжать расти [6]. При этом проблема с созданием биобанков существует не только в России, но и во всем мире. Следует отметить, что во многих случаях сбор образцов и их полноценная паспортизация до сих пор носят фрагментарный характер, часто нет связи данных об анамнезе и проводимом лечении и катamnестического наблюдения пациента даже в пределах одного учреждения. Отсутствие стандартизации сбора образцов приводит к вариативности собранного материала, что снижает его ценность и возможность делать значимые выводы. Таким образом, в требованиях к биобанкам укореняются как можно более точная характеристика материала, описание его обработки и хранения, что, несомненно,

влияет на качество и надежность любых исследований с использованием таких образцов [7]. Можно сказать, что биобанк глиом головного мозга человека решает проблемы, направленные на обеспечение адекватного предоставления исследователям высококачественного тканевого материала глиальных опухолей. В последние годы стало понятно, что всем этим требованиям может удовлетворять только биобанк, созданный при клиниках, больницах и других медицинских учреждениях, являющихся профильными по нейрохирургии, прежде всего по нейроонкологии. При этом необходимо обеспечить стандартизованность процессов, связанных с биобанкированием тканей.

Материалы и методы

Отбор пациентов и обеспечение конфиденциальности данных

Процедуры сбора личных данных, биологического материала, а также их хранения проводятся в соответствии с законодательством Российской Федерации и происходят после подписания пациентами информированного добровольного согласия. Каждый пациент, который подходит для исследования по определенному перечню критериев, дает письменное согласие на предоставление для анализа удаленной опухолевой ткани, образцов крови, данных клинических и диагностических исследований. Вся соответствующая информация о каждом пациенте хранится в единой электронной базе данных, которая доступна исключительно сотрудникам, участвующим в исследовании. Для сохранения конфиденциальности и анонимизации данных каждого клинического случая ему присваивается индивидуальный порядковый идентификатор (например, BU205), который отличается от номера, используемого в медицинской карте лечебного учреждения.

Нами разработаны следующие критерии включения пациентов в исследование.

1. Возраст пациента не менее 16 лет.
2. Наличие магнитно-резонансных изображений головного мозга в стандартных импульсных последовательностях до и после контрастного усиления.
3. Предполагаемый дооперационный диагноз «злокачественная глиома головного мозга» на основании клинических, анамнестических и нейровизуализационных данных.
4. Локализация опухоли вне критических образований головного мозга (ствол, дисцефальные структуры).
5. Отсутствие гемотрансмиссивных инфекций (сифилис, ВИЧ-инфекция, вирусные гепатиты В и С) по данным рутинного дооперационного скрининга.
6. Планируемое хирургическое удаление опухоли.
7. Объем опухоли, достаточный для получения солидной опухолевой ткани в объеме, необходимом как для постановки гистологического диагноза, так и для консервации образцов в биобанке.

Организационная структура

В ходе обсуждения методов реализации проекта было решено создать в рамках НМИЦ нейрохирургии им. Н.Н. Бурденко Минздрава России (НМИЦН) лабораторию нейрохирургической анатомии и консервации биологических материалов. Для длительного хранения используются сосуды Дьюара с жидким азотом. Полученные образцы по клиническим случаям необходимо подготовить для исследований и замораживания. Данные манипуляции выполняют два квалифицированных лаборанта-исследователя. В ходе криоконсервации происходит двойная регистрация медицинской документации – в письменном виде в журнале и в электронной базе данных. Для своевременного оповещения о появлении подходящих клинических случаев, извлечения образцов и пополнения базы данных изображений по пациентам в штате биобанка числятся четыре нейрохирурга. В число участников исследования также входит врач-патологоанатом.

Коллекция образцов и банк данных

Биобанк является обширной базой, которая содержит в себе не только материал, полученный в ходе оперативного вмешательства и удаления пораженной области мозга, но и комплекс данных, позволяющих более широко подойти к вопросу исследования заболевания. Формирование коллекции образцов опухолевой ткани, полученных от пациентов с глиомами головного мозга, связано с использованием двух видов консервации биологического материала – быстрого замораживания в жидком азоте и изготовления парафиновых блоков.

Данные о клинических случаях содержатся в систематизированном виде в электронной информационно-аналитической системе, созданной на базе разработанной в НМИЦН платформы e-Med. Индивидуальный внутренний идентификатор BUXXX позволяет получить всю необходимую информацию.

После согласования возможности забора материала с оперирующим нейрохирургом в начале операции проводится забор крови, которая затем подвергается аликвотированию и центрифугированию. Цельную кровь консервируют в криопробирках в объеме 2 × 4 мл в холодильнике при температуре –80°C, а также центрифугируют при комнатной температуре при 1500 g в течение 10 минут для создания трех или четырех аликвот плазмы объемом 1 мл и при 1200 g в течение 10 минут для создания четырех аликвот сыворотки объемом 1 мл, которые консервируют в криопробирках в холодильнике при температуре –80°C. Опухолевую ткань транспортируют из операционной в лабораторию в пробирке со средой DMEM с добавлением стрептомицина, пенициллина и гентамицина, а затем в стерильных условиях очищают от примесей и разделяют на три аликвоты (или больше, если позволяет объем материала), каждую из которых делят на два фрагмента – 2/3 для криоконсервации и 1/3 для изготовления парафинового блока (рис. 1). Этот процесс занимает

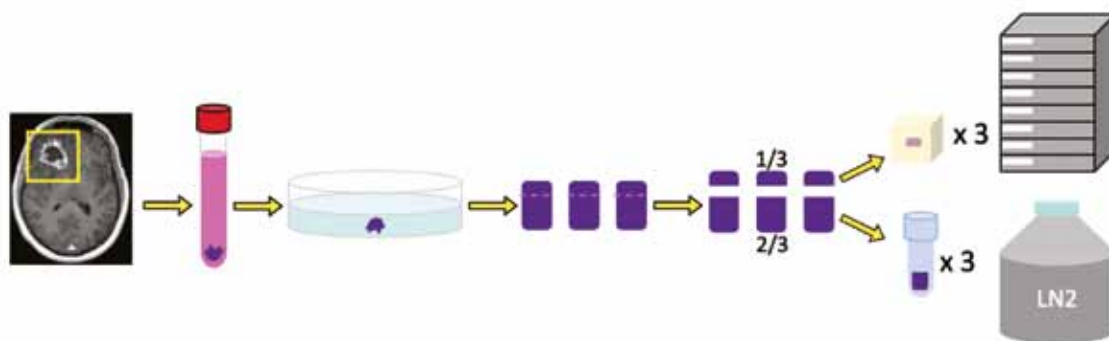


Рис. 1. Схема пути образца опухоли
Fig. 1. Solid tissue specimen procurement scheme

не более 20 минут. Таким образом, опухолевый образец каждой аликвоты анализируется гистологически и иммуногистохимически в отделении патологической анатомии для подтверждения диагноза и оценки качества ткани. Образцы опухоли помещают в предварительно промаркированные криогенные пробирки и консервируют в жидком азоте при температуре -196°C . Информацию об образцах регистрируют в журнале и электронной базе данных. Фрагменты опухолей для изготовления парафиновых блоков помещают в 10% забуференный формалин и до истечения 6 часов транспортируют в отделение патологической анатомии, где проводятся изготовление парафиновых блоков по стандартной технологии и иммуногистохимическое окрашивание срезов для исследования маркерных факторов. Врач-патологоанатом оценивает качество опухолевого материала, вносит гистологическое заключение и результаты оценки в электронную базу данных и сопоставляет морфологическую картину консервированного опухолевого материала с гистологическими препаратами, полученными из диагностического биопсийного материала конкретного пациента.

Результаты

Коллекция образцов и диагностических данных

Сейчас в криохранилище насчитывается 728 случаев и 2736 аликвот (табл. 1). Был выполнен гистологический контроль по 681 образцу, в ходе которого полное соответствие критериям качества выявлено в 418 образцах (61,38%), а частичное в 66 (9,70%). 197 проанализированных образцов (28,92%) не соответствуют критериям положительной оценки качества опухолевого материала в связи с высоким содержанием некротического компонента или малым количеством опухолевых клеточных элементов (материал из перитуморозной зоны).

Модернизация системы хранения данных

В рамках разработанной в НМИЦН технологии e-Med была создана компонента для управления биобанком (biobank-psi), интегрированная с электронной медицинской картой. Такая интеграция позволяет про-

водить совместный анализ морфологических и молекулярно-генетических данных в связи с клинической картиной заболевания и результатами нейровизуализационных исследований. Кроме того, интеграция с электронной медицинской картой дает возможность исследовать свойства биообразцов в динамике при повторных поступлениях пациента в клинику, и именно эта особенность является основной причиной развития собственной разработки системы информационной поддержки биобанка и отказа от приобретения системы стороннего производителя.

В биобанке была введена международная система преаналитического кодирования биообразцов SPREC 2.0 [8]. Эта система позволяет зафиксировать важнейшие особенности материала, способа его консервации и хранения. Кодирование по системе SPREC необходимо для сопоставимости результатов исследований, проведенных в разных центрах. Система кодирования развивается и поддерживается Международным обществом биологических и экологических репозиторий (International Society for biological and Environmental Repositories, ISBER, <http://www.isber.org>).

Код SPREC 2 семипозиционный и описывает тип образца ткани, время теплой и холодной ишемии и основные сведения о способах его получения, консервации и долгосрочного хранения. Аналогичная спецификация для жидких образцов содержит также сведения о центрифугировании.

В 2019 году система SPREC 2.0 модернизирована до SPREC 3.0, которая благодаря последним техническим разработкам и полученным знаниям о критических диапазонах доаналитического времени включает в себя расширенное количество вариантов времени ишемии тканей [9].

Гистологическое исследование материала

Установление гистологического диагноза опухоли проводится в соответствии с классификацией опухолей центральной нервной системы Всемирной организации здравоохранения 2016 года (светооптическая микроскопия парафиновых срезов, окрашенных гематоксилином и эозином, иммуногистохимическое исследование, определение статуса генов *IDH-1* и *IDH-2* методом пря-

Таблица 1 | Table 1

Собранные замороженные образцы за весь срок существования биобанка (с марта 2016 года) и за период выполнения работ по гранту (с 1 августа 2018 года) на 30 апреля 2020 года | Collection of tumor tissue specimens during the complete lifetime of the biobank (since March, 2016) and during the research grant period (since August 1, 2018) by April 30, 2020

Название опухоли (в алфавитном порядке) Tumor type	За весь срок Total		За период гранта During the grant	
	п случаев cases	п алиquot aliquots	п случаев cases	п алиquot aliquots
Анапластическая астроцитома Anaplastic astrocytoma	82	325	46	216
Анапластическая олигодендроглиома Anaplastic oligodendroglioma	62	215	32	126
Анапластическая олигоастроцитома Anaplastic oligoastrocytoma	1	3	–	–
Анапластическая плеоморфная ксантоастроцитома Anaplastic pleomorphic xanthoastrocytoma	7	29	4	20
Анапластическая эпендимомы Anaplastic ependymoma	2	8	–	–
Астробластома Astroblastoma	1	3	1	3
Ганглиоглиома Ganglioglioma	2	5	1	3
Гемистоцитарная астроцитома Hemistocytic astrocytoma	2	12	2	12
Глиобластома Glioblastoma	465	1784	216	851
Глиосаркома Gliosarcoma	4	21	5	12
Диффузная астроцитома Diffuse astrocytoma	61	203	31	151
Олигоастроцитома Oligoastrocytoma	1	3	–	–
Олигодендроглиома Oligodendroglioma	27	95	13	40
Пилоидная астроцитома Pilocytic astrocytoma	4	13	5	12
Пилоидная астроцитома со злокачественной трансформацией Pilocytic astrocytoma with malignant transformation	2	5	–	–
Плеоморфная ксантоастроцитома Pleomorphic xanthoastrocytoma	2	3	–	–
Субэпендимомы Subependymoma	2	6	–	–
Эпителиоидная глиобластома Epithelioid glioblastoma	1	6	1	6
Всего	728	2739	357	1452

мого секвенирования по Сэнгеру, определение статуса метилирования промоторной области гена *MGMT* методом метилспецифической ПЦР в режиме реального времени, определение коделеции 1p/19q методом FISH (флуоресцентная гибридизация *in situ*). Критериями положительной оценки качества опухолевого материала являются совокупный процент опухолевой ткани в образце ≥ 50 , процент опухолевых ядер в образце ≥ 50 , процент некроза в образце < 50 , отсутствие артефактных изменений.

Создание паспорта глиомы

С учетом имеющихся диагностических методов возможна паспортизация образцов, включающая комплекс сведений: демографические данные (пол, возраст, регион), характеристика заболевания (первичное или повторное хирургическое вмешательство, локализация опухоли – рисунок 2, дата хирургического вмешательства, код SPREC 3.0), морфологические данные (гистологический диагноз по классификации опухолей ЦНС ВОЗ 2016 года – рисунок 3, доля опухолевой ткани

в гистологическом срезе (в процентах), доля опухолевых клеток (в процентах), доля некроза (в процентах), *IDH-1/2*-профиль, *MGMT*-профиль, *BRAF*-мутации, наличие коделеции 1p/19q для олигодендроглиальных опухолей), молекулярно-генетические характеристики (маркеры стволовости: *NESTIN*, *OCT4*, *CD133*; онко-маркеры: *EGFR*, *PDGFR*; маркеры нейральной дифференцировки: *GFAP* – рисунок 4), катамнестические данные (проведенное адьювантное лечение, факт рецидива, связь материала с образцом от данного донора, ранее зарегистрированным в биобанке при предыдущем хирургическом вмешательстве).

В результате выполненных работ по организации процессинга биоматериалов и сбора ассоциированных данных нами был сформулирован паспорт глиомы (табл. 2).

Анализ биомаркеров

Анализ биомаркеров глиальных опухолей выполняется методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (RT-PCR) на экспрессию

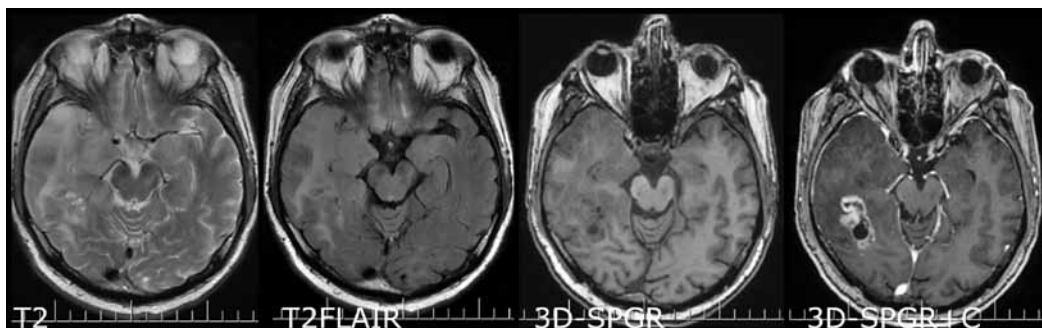


Рис. 2. Дооперационная МРТ. Выявляется опухоль задних отделов правой височной доли с интенсивным накоплением контрастного вещества, гипоинтенсивным некротическим центром и перитуморозным отеком (глиобластома)

Fig. 2. Preoperative MR image of a patient demonstrating an intracerebral tumor (glioblastoma) of the right posterior temporal lobe with prominent contrast enhancement, hyperintensive necrotic center, and peritumoral edema

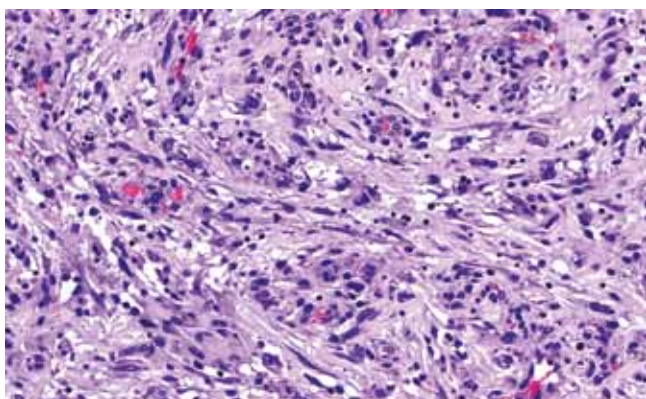


Рис. 3. Гистологический срез ткани удаленной глиобластомы. Обращают внимание выраженный клеточный и ядерный полиморфизм, плотное расположение клеточных элементов. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 200$

Fig. 3 Histological section of resected glioblastoma. Prominent cellular and nuclear polymorphism is present, cells are arranged densely and compactly. H&E stain, $\times 200$

Таблица 2 | Table 2

Пример паспорта глиомы |
Example of glioma passport

Внутренний идентификатор Internal identification number	BU562
Пол Gender	Мужской Male
Возраст Age	62 года 62 years
Регион Region	Город Москва Moscow city
Характер хирургического вмешательства Type of surgery	Первичное Primary
Локализация опухоли Localization of the tumor	Правая височная доля Right temporal lobe
Дата хирургического вмешательства Date of surgery	26.02.2019 02/26/2019
Код SPREC 3.0 SPREC 3.0 code	TIS-SCM-X-C-SNP-A-X
Гистологический диагноз Histological diagnosis	Глиобластома IGH-мутантная Glioblastoma IGH-mutant
% опухолевой ткани в срезе % of tumor tissue in the section	60
% опухолевых клеток % of tumor cells	80
% некроза % of necrosis	0
IDH-1 профиль IDH-1 profile	Положительный Positive
MGMT профиль MGMT profile	Отрицательный Negative
BRAF профиль BRAF profile	Отрицательный Negative
Маркеры Markers	BAX, CD133, MELK, TP53, VASH2*

* BAX – индуктор апоптоза, CD133 – онкомаркер, MELK – маркер стволовости, TP53 – супрессор опухолевой трансформации, VASH2 – ингибитор ангиогенеза.

* BAX – apoptosis inductor, CD133 – oncomarker, MELK – marker of stem cells, TP53 – supressor of tumor tranformation, VASH2 – inhibitor of angiogenesis.

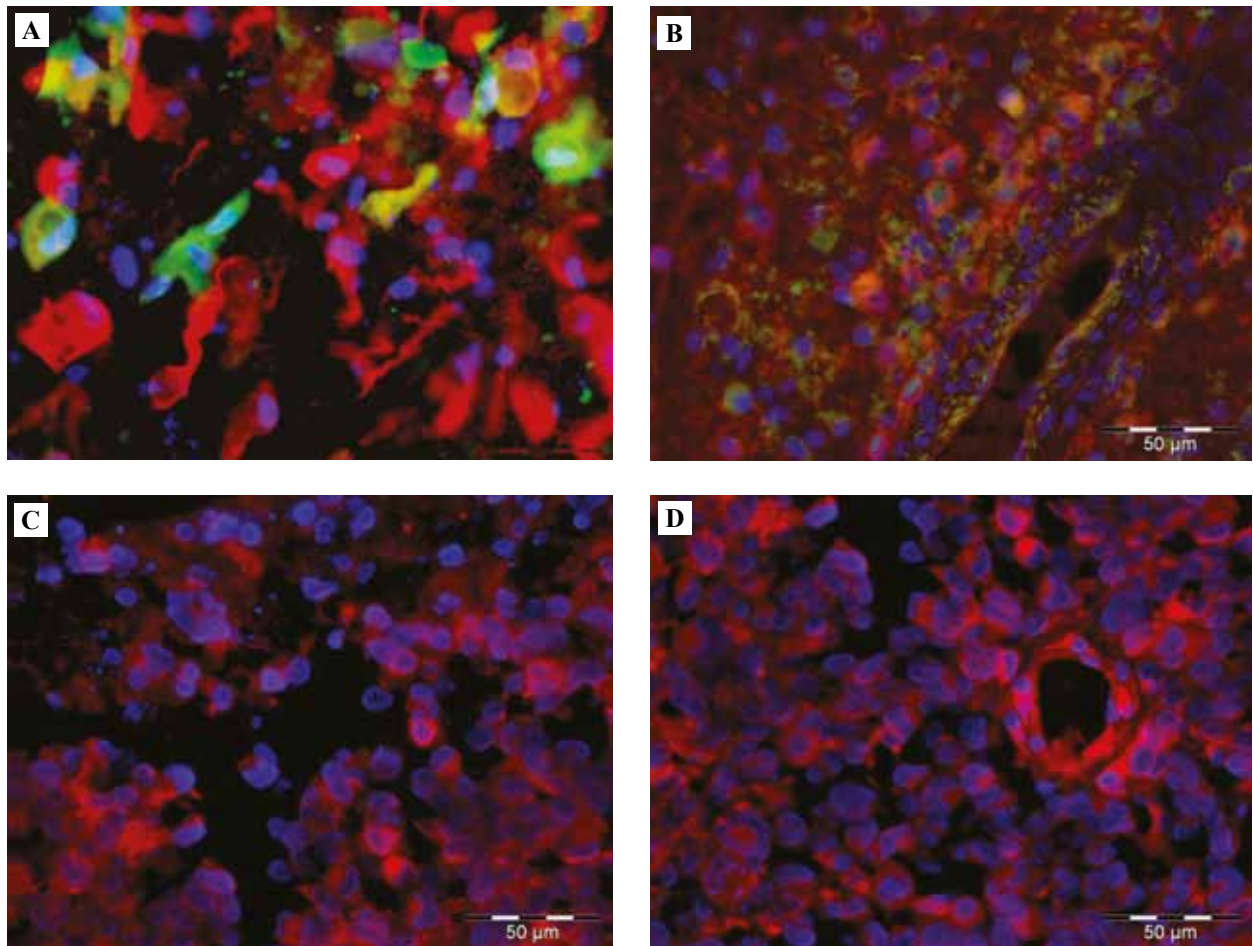


Рис. 4. Примеры иммуногистохимических исследований маркеров в тканях глиобластомы разных пациентов с помощью флуоресцентных меток.

А – *GFAP* – красная флуоресценция, *S100* – зеленая, бисбензимида – окраска ядер (голубая флуоресценция), В – *Sox2* – зеленая флуоресценция, *Nestin* – красная, бисбензимида – окраска ядер (голубая флуоресценция),

С, D – *Nestin* – красная флуоресценция, бисбензимида – окраска ядер (голубая флуоресценция)

Fig. 4. Glioblastoma immunohistochemical assays of the tissue specimens obtained from different patients. Fluorescent labels were used.

А – *GFAP* – red fluorescence, *S100* – green, bisbenzimid – nuclear staining (blue fluorescence), В – *Sox2* – green fluorescence, *Nestin* – red, bisbenzimid – nuclear staining (blue fluorescence); С, D – *Nestin* – red fluorescence, bisbenzimid – nuclear staining (blue fluorescence)

онкомаркеров (*CDK4*, *CDK6*, *FGFR*), маркеров стволовых клеток (*NANOG*, *OCT4*, *SOX2*, *MELK*, *CD133*, *NESTIN*, *NOTCH2*), маркеров нейральной дифференцировки (*GDNF*, *Olig2*, *GFAP*, *MAP2*, β -*III-TUBULIN*). Дополнительно предполагается оценка пролиферативной активности опухолевых клеток путем определения индекса мечения Ki67, а также экспрессии *p53* методом иммуногистохимии. Результаты гистологического, иммуногистологического и молекулярно-генетического исследования опухолевых образцов фиксируются в информационной системе биобанка. Панель генов для исследования клеток глиобластомы также включает следующие гены: *BAX*, *BCL2*, *C3*, *CD133*, *CX1CR1*, *EGFR*, *GDNF*, *GFAP*, *HIF1A*, *MDM2*, *MELK*, *MKI67*, *Olig2*, *PCNA*, *PDGFRa*, *Sox2*, *TEK*, *TIE1*, *TNKR5F1A*, *TP53*, *VASH2*, *VEGFR-2*, *WNT5A* [10]. На

рисунке 5 продемонстрирован пример результатов исследования образцов культуры глиобластомы.

Обсуждение

Биологический банк является неотъемлемой частью исследования опухолей глиального ряда, так как при обеспечении достаточного числа образцов появляется возможность более подробного изучения распространенности, распределения, а также структуры данного заболевания. Тем не менее в настоящее время есть ряд трудностей, которые препятствуют усовершенствованию подхода к исследованию. Во-первых, многие данные о коллекциях опухолей мозга являются закрытыми и не опубликованы в научных изданиях, что мешает в полной мере ознакомиться с полученными результатами других медицинских учреждений. Во-вторых,

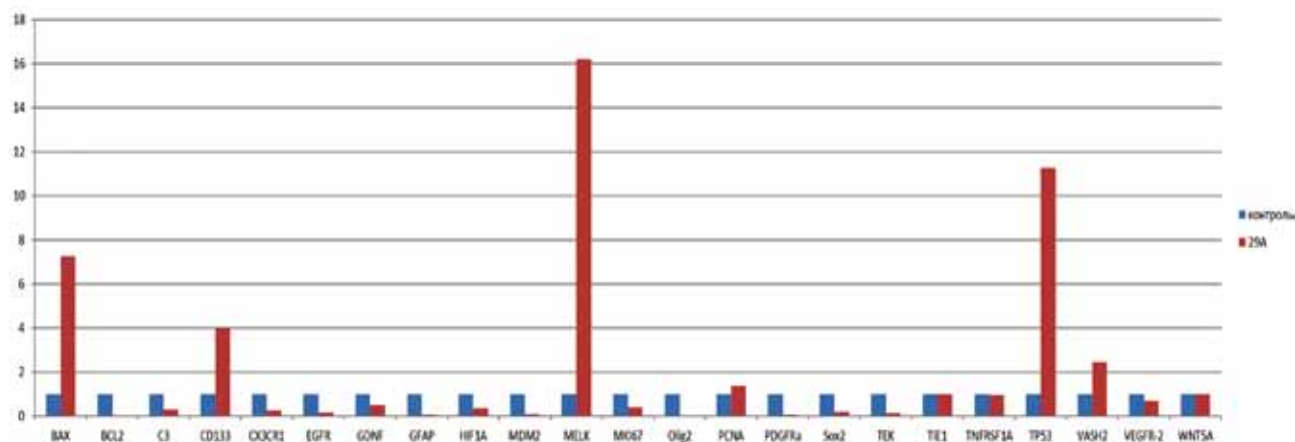


Рис. 5. Пример оценки экспрессии ряда генов выбранной панели, характерной для опухолевых процессов и в особенности для опухолей мозга. Определяется увеличение экспрессии генов *BAX*, *CD133*, *MELK*, *TP53*, *VASH2*

Fig. 5. Example of RT-PCR study of different genes' expression from the selected panel, typical for neoplasms, especially, for brain tumors. Upregulation of genes *BAX*, *CD133*, *MELK*, *TP53*, *VASH2* is demonstrated

большинство нейроонкологических биобанков одно-центровые. Соответственно, результаты исследования, основанные на выборках, предоставленных одним изолированным биобанком, будут искажены критериями отбора пациентов в каждом учреждении.

Преимущества биобанка, созданного в НМИЦН, – процедура деления каждой аликвоты на два фрагмента (для мгновенного замораживания в жидком азоте и для изготовления парафинового блока), проведение максимально точного гистологического контроля качества хранимого опухолевого материала и параллельное создание коллекции парафиновых блоков. Основным источником биоматериала является лечебное учреждение, с которым было согласовано сотрудничество для регулярного предоставления образцов, что облегчает процесс сбора экзemplаров и контроля их качества.

Основная цель проведения гистологических исследований в рамках биобанка – установление взаимосвязи геномных изменений и патогенеза опухолей глиального ряда при помощи статистических данных для конечного прогноза течения заболевания. Например, наличие мутации гена *IDH1* свидетельствует о неблагоприятных исходах для пациента, так как клеточные структуры в таком случае весьма чувствительны к генетическим преобразованиям, но также дают больший ответ на противоопухолевую терапию [11]. Коделеция 1p/19q нередко наблюдается совместно с мутацией *IDH1*, она позволяет диагностировать олигодендроглиому, что сигнализирует о благоприятном прогнозе заболевания и лечения. Ген *MGMT* является своего рода индикатором фермента Об-метилгуанин-метилтрансферазы в опухоли, который отвечает за восстановление поврежденных ДНК [12]. При положительном результате метилирования данного гена повышается вероятность благоприятного исхода лечебных мероприятий.

Технология сбора опухолевых тканевых образцов построена таким образом, что позволяет расширить спектр современных подходов к анализу их особеннос-

тей. В частности, разрабатывается технология получения первичных и перевиваемых клеточных культур из опухолевых тканей, которая позволит индивидуально подходить к терапии у конкретного пациента. Гетерогенность опухолей требует персонализированного анализа каждой из них. Исследование разных схем терапии на клеточных культурах даст возможность более точно подобрать для пациента схему лечения.

Использование накопленных фрагментов тканей глиом способно также обеспечить необходимое число исследований для усовершенствования диагностических технологий. Опухоли глиального ряда являются на данный момент одними из самых часто встречающихся в практике нейрохирургов, но их терапия не всегда успешна. В конце 1980-х годов были разработаны технологии, которые позволили увеличить пропускную способность секвенирования ДНК и гибридизации нуклеиновых кислот. Они положили начало новой эре в области биологических исследований, которые сейчас именуют omics-технологиями [13]. Данный метод позволяет проводить оценку большого объема данных об экспрессии генов, метаболитах биологического объекта и белках средствами многомерной статистики, дисперсным регрессионным анализом, а также программами распознавания образов. Следовательно, при использовании omics-технологий в рамках профессионального стандартизированного банка биообразцов и клинической базы данных появляется возможность приближения к персонализированным методам лечения пациентов и их дальнейшей разработке [14–16].

Продолжительность большинства исследований весьма велика, но благодаря биобанкам биоматериал может храниться длительное время.

В 2011 году аналитическая компания BCCResearch (США) опубликовала отчет о современном состоянии и развитии индустрии биобанков в мире [17], интерес к которым возрос в начале 2000-х вследствие существенного прогресса в расшифровке генома человека.

В настоящее время больше всего биобанков находится в Северной Америке и Европе, что соответствует расположению ключевых фармацевтических и биотехнологических компаний, использующих услуги и ресурсы биобанков. По некоторым оценкам, около 15% всех действующих биобанков специализируется исключительно на онкологии, а значительная их доля имеет смешанный характер и ведет работу, в том числе, в этой специальности. В 2007 году было опубликовано описание французского банка данных об опухолях мозга [18]. В коллекции замороженных опухолей содержались образцы от 2261 пациента с первичными опухолями центральной нервной системы, среди которых глиомы составляли около 50%. Это первый специализированный европейский нейроонкологический биобанк. В клинике Хуашань (Китай) в апреле 2010 года создан специализированный биобанк глиальных опухолей. К сентябрю 2013 года коллекция включала материал от 1326 пациентов, из которых у 73% были астроцитарные опухоли, у 17% – олигодендроглиальные, у 4% – эпендимарные и у 4% – другие опухоли центральной нервной системы, у 2% – олигоастроцитарные [19]. Биологический материал, полученный от пациентов, хранился в замороженном виде. На данный момент существует определенная категория исследований, которые проводятся исключительно с помощью биобанков.

- «Гормональные и репродуктивные факторы и риск развития рака верхней части желудочно-кишечного тракта у мужчин» – проспективное когортное исследование в Великобритании. В исследование были включены 219 425 человек, зарегистрированных в Британском биобанке в 2006–2010 годах [20].
- «Влияние посмертного интервала и лет в хранении на качество РНК ткани в репозитории NIH NeuroBioBank». Мозговую ткань от 1068 доноров анализировали на качество РНК как функцию посмертного интервала (PMI) и лет хранения [21].
- «Сбор и исследование опухолей головного мозга в сотрудничестве с Университетом Майами / Сильвестр Тейсэйшн-Банк Core Facility (UM-TBCF) для обеспечения доступности высококачественных образцов опухолевой ткани центральной нервной системы, а также определения наиболее частых их видов» [22].
- «Создание и поддержание стандартизированного банка тканей глиомы: опыт Хуашань». Одной из основных целей является изучение патогенеза и инвазии глиомы на разных уровнях -омики (таких как протеомика или геномика) и влияния биомаркерного профиля на диагностику, прогнозирование и лечение пациентов с глиомой [19].

На территории Российской Федерации биобанкирование тканей человека только начинает развиваться. Сегодня в России работает около 20 биобанков, а также насчитывается более 200 коллекций биологических материалов (первые отличаются от вторых степенью систематизированности). К наиболее крупным отно-

сятся биобанк НМИЦ им. В.А. Алмазова Минздрава России, Национальный БиоСервис, Центр Биобанк СПбГУ, проект МГУ «Ноев ковчег».

Заключение

Биобанк опухолей глиального ряда, основанный в 2016 году на базе материалов НМИЦН, является первым специализированным нейроонкологическим биобанком на территории Российской Федерации. Таким образом, создание этой организационной структуры может быть использовано для повышения эффективности в ходе дальнейших экспериментальных работ с возможной перспективой применения и внедрения персонализированных методов лечения в будущем, после проведения полного цикла клинических исследований. Кроме того, система биобанкирования тканей построена таким образом, что позволяет внедрять новые подходы для исследований молекулярных особенностей опухолей глиального ряда. В частности, развивается направление по получению из опухолевой ткани первичных и перевиваемых клеточных культур, пригодных для индивидуального подхода к терапии.

Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – Д.А. Гольбин, Г.В. Павлова, Г.Л. Кобыakov, А.А. Потапов.

Сбор и обработка материала – А.Л. Корочкина, А.В. Косырькова, С.В. Шугай, М.А. Шифрин, Т.В. Цуканова, А.В. Ревещин, Г.В. Данилов, Е.Ю. Рыбалкина.

Написание текста – Д.А. Гольбин, Г.В. Павлова, С.В. Шугай, А.Л. Корочкина.

Редактирование – Д.А. Гольбин, Г.В. Павлова, А.В. Ревещин.

Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – D.A. Golbin, G.V. Pavlova, G.L. Kobiakov, A.A. Potapov.

Collected the data and performed the analysis – A.L. Korochkina, A.V. Kosyrkova, S.V. Shugay, M.A. Shifrin, T.V. Tsukanova, A.V. Revishchin, G.V. Danilov, E.Y. Rybalkina.

Wrote the paper – D.A. Golbin, G.V. Pavlova, S.V. Shugay, A.L. Korochkina.

Edited the manuscript – D.A. Golbin, G.V. Pavlova, A.V. Revishchin.

Литература/References

1. *Le Page C, Köbel M, de Ladurantaye M, Rahimi K, Madore J, Babinszky S et al.* Specimen quality evaluation in Canadian biobanks participating in the COEUR repository. *Biopreserv Biobank.* 2013;11(2):83–93. DOI: 10.1089/bio.2012.0044.
2. *Ji X, Zhao XM, Jiang JJ, Yin L, Guo YC.* Clinical biobanks, from the world to China. *Biomed Environ Sci.* 2014;27(6):481–3. DOI: 10.3967/bes2014.079.
3. *Coppola L, Cianflone A, Grimaldi AM, Incoronato M, Bevilacqua P, Messina F et al.* Biobanking in health care: evolution and future directions. *J Transl Med.* 2019;17(1):172. DOI: 10.1186/s12967-019-1922-3.
4. *Agnihotri S, Burrell KE, Wolf A, Jalali S, Hawkins C, Rutka JT et al.* Glioblastoma, a brief review of history, molecular genetics, animal models and novel therapeutic strategies. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2013;61(1):25–41. DOI: 10.1007/s00005-012-0203-0.

5. Kamenski PA, Sazonov AE, Fedyanin AA, Sadovnichy VA. Biological collections: chasing the ideal. *Acta Naturae*. 2016;8(2):6–9. PMID: 27437135.
6. Трофимов Н.А. Отрасль биобанков в ближайшем будущем. *Наука за рубежом*. 2012;13:1–13. Trofimov NA. Otrasl' biobankov v blizhajshem budushchem. *Nauka za rubezhom*. 2012;13:1–13 (In Russ.).
7. Verlinden M, Nys H, Ectors N, Huys I. Access to biobanks: harmonization across biobank initiatives. *Biopreserv Biobank*. 2014;12(6):415–22. DOI: 10.1089/bio.2014.0034.
8. Lehmann S, Guadagni F, Moore H, Ashton G, Barnes M, Benson E et al. Standard preanalytical coding for biospecimens: review and implementation of the Standard PREanalytical Code (SPREC). *Biopreserv Biobank*. 2012;10(4):366–74. DOI: 10.1089/bio.2012.0012.
9. Betsou F, Bilbao R, Case J, Chuaqui R, Clements JA, De Souza Y et al. Standard PREanalytical Code version 3.0. *Biopreserv Biobank*. 2018;16(1):9–12. DOI: 10.1089/bio.2017.0109.
10. Kiseleva LN, Kartashev AV, Vartanyan NL, Pinevich AA, Samoilovich MP, Filatov MV. Characterization of new human glioblastoma cell lines. *Cell and Tissue Biology*. 2018;12(1):1–6. DOI: 10.1134/S1990519X180101008.
11. Yan W, Zhang W, You G, Bao Z, Wang Y, Liu Y et al. Correlation of IDH1 mutation with clinicopathologic factors and prognosis in primary glioblastoma: a report of 118 patients from china. *PLoS One*. 2012;7(1):e30339. DOI: 10.1371/journal.pone.0030339.
12. Lohkamp LN, Schinz M, Gehlhaar C, Guse K, Thomale UW, Vajkoczy P et al. MGMT promoter methylation and BRAF V600E mutations are helpful markers to discriminate pleomorphic xanthoastrocytoma from giant cell glioblastoma. *PLoS One*. 2016;11(6):e0156422. DOI: 10.1371/journal.pone.0156422.
13. Kransdorf EP, Kobashigawa JA. Genetic and genomic approaches to the detection of heart transplant rejection. *Per Med*. 2012;9(7):693–705. DOI: 10.2217/pme.12.84.
14. Langreth R, Waldholz M. New era of personalized medicine: targeting drugs for each unique genetic profile. *Oncologist*. 1999;4(5):426–7. PMID: 10551559.
15. Paving the Way for Personalized Medicine. FDA's Role in a New Era of Medical Product Development. FDA Report, October 2013. Available at: <https://www.fdanews.com/ext/resources/files/10/10-28-13-Personalized-Medicine.pdf> (Accessed online 27th October 2020).
16. Salari K. The dawning era of personalized medicine exposes a gap in medical education. *PLoS Med*. 2009;6(8):e1000138. DOI: 10.1371/journal.pmed.1000138.
17. Highsmith J. Biobanking: technologies and global markets. Market research report. Available at: <https://www.bccresearch.com/market-research/biotechnology/biobanking-technologies-markets-report.html> (Accessed online 27th October 2020).
18. Bauchet L, Rigau V, Mathieu-Daudé H, Figarella-Branger D, Hugues D, Palusseau L et al. French brain tumor data bank: methodology and first results on 10,000 cases. *J Neurooncol*. 2007;84(2):189–99. DOI: 10.1007/s11060-007-9356-9.
19. Aibaidula A, Lu JF, Wu JS, Zou H, Chen H, Wang YQ et al. Establishment and maintenance of a standardized glioma tissue bank: Huashan experience. *Cell Tissue Bank*. 2015;16(2):271–81. DOI: 10.1007/s10561-014-9459-4.
20. McMenamin UC, Kunzmann AT, Cook MB, Johnson BT, Murray LJ, Spence AD et al. Hormonal and reproductive factors and risk of upper gastrointestinal cancers in men: a prospective cohort study within the UK biobank. *Int J Cancer*. 2018;143(4):831–41. DOI: 10.1002/ijc.31375.
21. White K, Yang P, Li L, Farshori A, Medina AE, Zielke HR. Effect of postmortem interval and years in storage on RNA quality of tissue at a repository of the NIH NeuroBioBank. *Biopreserv Biobank*. 2018;16(2):148–57. DOI: 10.1089/bio.2017.0099.
22. Bregy A, Papadimitriou K, Faber DA, Shah AH, Gomez CR, Komotar RJ et al. Banking brain tumor specimens using a university core facility. *Biopreserv Biobank*. 2015;13(4):280–6. DOI: 10.1089/bio.2014.0106.

Информация об авторах

Денис Александрович Гольбин – кандидат медицинских наук, заведующий лабораторией нейрохирургической анатомии и консервации биологических материалов НМИЦ нейрохирургии имени академика Н.Н. Бурденко.

Антонина Леонидовна Корочкина – лаборант-исследователь лаборатории нейрохирургической анатомии и консервации биологических материалов НМИЦ нейрохирургии имени академика Н.Н. Бурденко.

Светлана Викторовна Шугай – врач-патологоанатом отделения патологической анатомии НМИЦ нейрохирургии имени академика Н.Н. Бурденко.

Татьяна Васильевна Цуканова – ведущий инженер лаборатории биомедицинской информатики и искусственного интеллекта НМИЦ нейрохирургии имени академика Н.Н. Бурденко.

Михаил Абрамович Шифрин – кандидат физико-математических наук, старший научный сотрудник лаборатории биомедицинской информатики и искусственного интеллекта НМИЦ нейрохирургии имени академика Н.Н. Бурденко.

Александр Владимирович Ревичин – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории нейrogenетики и генетики развития Института биологии гена.

Александра Вячеславовна Косырькова – лаборант-исследователь лаборатории нейрохирургической анатомии и консервации биологических материалов НМИЦ нейрохирургии имени академика Н.Н. Бурденко.

Глеб Валерьевич Данилов – кандидат медицинских наук, заведующий лабораторией биомедицинской информатики и искусственного интеллекта, ученый секретарь НМИЦ нейрохирургии имени академика Н.Н. Бурденко.

Екатерина Юрьевна Рыбалкина – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории генетики опухолевых клеток НМИЦ онкологии имени Н.Н. Блохина.

Галина Валериевна Павлова – доктор биологических наук, заведующая лабораторией нейрогенетики и генетики развития Института биологии гена, старший научный сотрудник отделения рентгеновских и радионуклидных методов диагностики НМИЦ нейрохирургии имени академика Н.Н. Бурденко.

Григорий Львович Кобяков – доктор медицинских наук, руководитель группы химиотерапии опухолей ЦНС НМИЦ нейрохирургии имени академика Н.Н. Бурденко.

Александр Александрович Потапов – доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, научный руководитель НМИЦ нейрохирургии имени академика Н.Н. Бурденко.

Author information

Denis A. Golbin – Cand. Sci. (Med.), Head of the Laboratory of Neurosurgical Anatomy and Biorepository, N.N. Burdenko National Medical Research Center of Neurosurgery.
<https://orcid.org/0000-0003-0017-2649>

Antonina L. Korochkina – Research Assistant, Laboratory of Neurosurgical Anatomy and Biorepository, N.N. Burdenko National Medical Research Center of Neurosurgery.
<https://orcid.org/0000-0001-5235-8037>

Svetlana V. Shugay – Pathologist, Pathology Department, N.N. Burdenko National Medical Research Center of Neurosurgery.
<https://orcid.org/0000-0001-8079-8523>

Tatiana V. Tsukanova – Leading Engineer, Laboratory of Biomedical Informatics and Artificial Intelligence, N.N. Burdenko National Medical Research Center of Neurosurgery.
<https://orcid.org/0000-0002-0046-1312>

Michael A. Shifrin – Cand. Sci. (Phys.-Math.), Senior Researcher, Laboratory of Biomedical Informatics and Artificial Intelligence, N.N. Burdenko National Medical Research Center of Neurosurgery.
<https://orcid.org/0000-0002-9606-5559>

Alexander V. Revishchin – Cand. Sci. (Biol.), Senior Researcher, Laboratory of Neurogenetics and Developmental Genetics, Institute of Gene Biology.
<https://orcid.org/0000-0002-6007-6440>

Alexandra V. Kosyrkova – Research Assistant, Laboratory of Neurosurgical Anatomy and Biorepository, N.N. Burdenko National Medical Research Center of Neurosurgery.
<https://orcid.org/0000-0002-3019-5203>

Gleb V. Danilov – Cand. Sci. (Med.), Head of the Laboratory of Biomedical Informatics and Artificial Intelligence, Academic Secretary, N.N. Burdenko National Medical Research Center of Neurosurgery.
<https://orcid.org/0000-0003-1442-5993>

Ekaterina Y. Rybalkina – Cand. Sci. (Biol.), Senior Researcher, Laboratory of Genetics of Tumor Cells, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology.
<https://orcid.org/0000-0002-3068-0233>

Galina V. Pavlova – Dr. Sci. (Biol.), Head of the Laboratory of Neurogenetics and Developmental Genetics, Institute of Gene Biology; Senior Researcher, Department of Neuroradiology and Radionuclide Methods of Diagnostics, N.N. Burdenko National Medical Research Center of Neurosurgery.
<https://orcid.org/0000-0002-6885-6601>

Grigory L. Kobiakov – Dr. Sci. (Med.), Head of the Department of Chemotherapy of CNS Tumors, N.N. Burdenko National Medical Research Center of Neurosurgery.
<https://orcid.org/0000-0002-7651-4214>

Alexander A. Potapov – Dr. Sci. (Med.), Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences, Academic Director, N.N. Burdenko National Medical Research Center of Neurosurgery.
<https://orcid.org/0000-0001-8343-3511>