

МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПЕРИФОКАЛЬНОЙ ЗОНЫ ГЛИОБЛАСТОМЫ С ПОМОЩЬЮ ЛУЧЕВЫХ, ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОГО И ИММУНОФЛЮОРЕСЦЕНТНОГО МЕТОДОВ

*Гальковский Б.Э., Митрофанова Л.Б., Рыжкова Д.В., Сулин К.А., Гуляев Д.А., Данилова
И.А., Сидорин В.С., Гайкова О.Н.*

*ФГБУ «НМИЦ им. В.А.Алмазова», Санкт-Петербург, Россия, 197341, 8(812) 702-37-03,
<http://www.almazovcentre.ru>*

*Контактная информация: Митрофанова Л.Б. тел.: 8-921-646-62-59, эл. Адрес:
lubamitr@yandex.ru*

Резюме

Глиобластома (ГБМ)— злокачественная опухоль головного мозга с высокой резистентностью к радио- и химиотерапии. Показатели выживаемости пациентов остаются низкими, средняя продолжительность жизни после постановки диагноза составляет 13-15 месяцев. Радикальная хирургическая резекция является одним из главных аспектов лечения ГБМ. По-прежнему открытыми остаются вопросы определения границ, морфологический состав и биологический потенциал перифокальной зоны ГБМ. **Целью исследования** было изучение экспрессии FoxM1 и Ki-67, а также флуоресценции протопорфирина IX в перифокальной зоне ГБМ в сравнении с данными лучевых методов. **Материалы и методы:** исследовались 10 первичных ГБМ, 10 образцов их перифокальной зоны, 10 фрагментов нормального головного мозга (группа контроля). Перед проведением оперативного вмешательства пациентам назначался пероральный приём 5-аминолевулиновой кислоты. Материал забирался из зоны красной (ГБМ) и розовой флуоресценции. Во всех случаях на парафиновых срезах проводился гистологический, иммуногистохимический анализ с антителами к FoxM1 и Ki-67, морфометрия. С использованием конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (КЛСМ) исследовались мазки-отпечатки, парафиновые срезы, замороженные срезы, нативный материал ГБМ и её перифокальной зоны роста методом КСЛМ с окрашиванием ядер клеток DAPI и флуоресцентным трекарами митохондрий, активных форм кислорода, лизосом. Статистический анализ полученных данных проводился при уровне доверительности $p=0,05$. **Результаты:** гистологическое строение перифокальной зоны ГБМ варьировало от практически нормального головного мозга до морфологической картины диффузной астроцитомы. В перифокальной зоне ГБМ уровень пролиферативной активности по Ki-67 составил 5,6 [1,8; 18,0] %, что было заметно ниже ($U=3,0$; значимость 0,0001) уровня пролиферативной активности клеток опухоли — 33,1 [22,9;

37,7]%. Уровень экспрессии FoxM1 оказался высоким, как в перифокальной зоне ($U = 43,5$; значимость 0,631), так и в зоне опухоли: 96,5 [73,3; 100] % и 100 [75,3; 100]% соответственно. При КЛСМ нативных препаратов ткани ГБМ и перифокальной зоны отмечалась фоновая красная флуоресценция протопорфирина IX (ПрпIX) в цитоплазме клеток, в просвете и стенках сосудов. Также была обнаружена колокализация сигнала ПрпIX и лизосом, митохондрий, активных форм кислорода. **Выводы:** в клетках перифокальной зоны ГБМ был обнаружен высокий уровень экспрессии FoxM1, а значения Ki-67 соответствовали глиомам 2-4-ой степени злокачественности. Протопорфирин IX был обнаружен в митохондриях опухолевых клеток, их лизосомах не только в опухоли, но и в перифокальной зоне и сосудах. Полученные данные указывают на наличие опухолевого потенциала перифокальной зоны опухоли, и являются основанием для рекомендации её хирургической резекции.

Ключевые слова: глиобластома, конфокальная сканирующая лазерная микроскопия, перифокальная зона, FoxM1

MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF THE PERIFOCAL ZONE OF GLIOBLASTOMA USING RADIATION, IMMUNOHISTOCHEMICAL AND IMMUNOFLUORESCENT METHODS

Galkovsky B.E., Mitrofanova L.B., Ryzhkova D.V., Sulin K.A., Gulyaev D.A., Danilova I.A., Sidorin V.S., Gaikova O.N.

Almazov National Medical Research Centre, St. Petersburg, Russia, 197341, 8 (812) 702-37-03, <http://www.almazovcentre.ru>

Contact information: L.B. Mitrofanova, 8-921-646-62-59, e-mail: lubamitr@yandex.ru

Abstract

Glioblastoma (GBM) is a malignant brain tumor with high resistance to radio- and chemotherapy. Patient survival rates remain low, with average life expectancy after diagnosis being 13-15 months. Radical surgical resection is one of the main aspects of GBM treatment. As before, the questions of determining the boundaries, morphological composition and biological potential of the GBM perifocal zone remain open. **The aim of the study** was to study the expression of FoxM1 and Ki-67, as well as the fluorescence of protoporphyrin IX in the perifocal zone of the GBM, in comparison with the data of radiation methods. **Materials and methods:** 10 primary GBM, 10 samples of their perifocal zone, 10 fragments of a normal brain (control group) were studied. Before surgery, patients were prescribed oral administration of 5-

aminolevulinic acid. The material was taken from the zone of red (GBM) and pink fluorescence. In all cases, histological, immunohistochemical analysis with antibodies to FoxM1 and Ki-67, and morphometry were carried out on paraffin sections. Using confocal laser scanning microscopy (CLSM), smears-prints, paraffin sections, frozen sections, native material of GBM and its perifocal growth zone were examined by the CLSM method with staining of cell nuclei with DAPI and fluorescent trackers of mitochondria, reactive oxygen species, and lysosomes. Statistical analysis of the data obtained was carried out at a confidence level of $p = 0.05$.

Results: the histological structure of the GBM perifocal zone varied from an almost normal brain to the morphological picture of diffuse astrocytoma. In the perifocal zone of GBM, the level of proliferative activity according to Ki-67 was 5.6 [1.8; 18.0] %, which was noticeably lower ($U = 3.0$; significance 0.0001) of the level of proliferative activity of tumor cells - 33.1 [22.9; 37.7]%. The level of FoxM1 expression was found to be high both in the perifocal zone ($U = 43.5$; significance 0.631) and in the tumor zone: 96.5 [73.3; 100] % and 100 [75.3; 100]% respectively. With CLSM of native preparations of GBM tissue and perifocal zone, background red fluorescence of protoporphyrin IX (PrpIX) was observed in the cytoplasm of cells, in the lumen and walls of blood vessels. Also, colocalization of the PrpIX signal and lysosomes, mitochondria, and reactive oxygen species was found.

Conclusions: a high level of FoxM1 expression was found in the cells of the GBM perifocal zone, and Ki-67 values corresponded to grade 2-4 gliomas. PrpIX was found in the mitochondria of tumor cells, their lysosomes, not only in the tumor, but also in the perifocal zone and vessels. The data obtained indicate the presence of the tumor potential of the perifocal zone of the tumor, and are the basis for recommending its surgical resection.

Key words: glioblastoma, confocal scanning laser microscopy, perifocal zone, FoxM1

Введение

Глиобластома (ГБМ) одна из самых злокачественных опухолей. При относительно редкой распространённости составляет примерно 2/3 всех опухолей головного мозга взрослых [1]. Отличительными чертами ГБМ можно считать её высокую устойчивость к химио- и радиотерапии [2] и крайне неблагоприятный прогноз для пациентов: средняя продолжительность жизни после постановки диагноза составляет 12-15 месяцев [3]. Одним из основных принципов хирургического лечения злокачественных опухолей является их радикальная резекция, что в случае ГБМ обеспечивает увеличение безрецидивного периода и общей продолжительности жизни [4]. Вместе с тем определить границы опухоли во время операции даже опытным нейрохирургам не всегда удаётся [5]. Для планирования объёма операции и увеличения радикальности резекции в настоящее

время используются магнитно-резонансная и компьютерная томография. Перифокальная зона ГБМ представляет собой область отёка ткани головного мозга, хорошо визуализируемую при использовании инструментальных методов [6]. Позднее в практику вошла интраоперационная флуоресцентная навигация с применением 5-аминолевулиновой кислоты. Продукт её обмена протопорфирин IX избирательно накапливается в клетках ГБМ и имеет красную флуоресценцию в опухоли и розовую — в перифокальной зоне при использовании источника освещения с ультрафиолетовым светом [7].

Морфологический состав перифокальной зоны в настоящее время изучен недостаточно, он включает в себя реактивные астроциты, активированную макро- и микроглию, опухолевые клетки. При гистологическом исследовании эта зона зачастую не отличается от нормальной ткани головного мозга или имеет вид диффузной астроцитомы. В злокачественной трансформации клеток глии большую роль играет нарушение регуляции факторов транскрипции, в частности FoxM1 [8]. Наличие этого фактора в клетках астроцитомы значительно ухудшает прогноз и течение заболевания, а уровень его экспрессии коррелирует со степенью злокачественности опухоли [9].

Цель исследования: изучение экспрессии FoxM1 и Ki-67, а также флуоресценции протопорфирина IX в перифокальной зоне ГБМ в сравнении с данными лучевых методов.

Материалы и методы

Исследовались 10 первичных ГБМ, 10 образцов их перифокальной зоны, 10 фрагментов нормального головного мозга (группа контроля) пациентов, проходивших лечение в ФГБУ «НМИЦ им В.А. Алмазова». Настоящее исследование получило одобрение этического комитета центра и осуществлялось в соответствии с «Хельсинской декларацией» и стандартами «Good clinical practice». Распределение по полу в выборке составило 6 мужчин и 4 женщины. Медиана возраста пациентов составила 56 лет с интерквартильным размахом 47 – 64 лет. Перед проведением оперативного вмешательства пациентам назначался пероральный приём 5-аминолевулиновой кислоты. Материал забирался из зоны красной (ГБМ) и розовой флуоресценции (рисунок 1) в соответствии с принятыми протоколами [10]. Группой контроля послужили фрагменты коры больших полушарий пациентов, умерших от сердечно-сосудистых заболеваний, среди них было 6 мужчин и 4 женщины, с медианой возраста 63 года. Гистологическое исследование включало окраску препаратов гематоксилином-эозином. Во всех случаях на парафиновых срезах проводился имунногистохимический анализ с антителами к FoxM1 (разведение 1:1000; клон G-5:sc-376471; Santa Cruz Biotechnology; USA) и Ki-67 (разведение 1:200; клон MIB-1; DAKO; Denmark). Морфометрический анализ осуществлялся с помощью

анализатора изображения LeicaScopeM, а также с помощью программы FIJI [11]. Уровень экспрессии белков определялся как соотношение клеток с экспрессией антигенов к общему числу клеток в поле зрения при $\times 400$ (в процентах). Средний уровень вычислялся по 10 полям зрения. С использованием конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (КЛСМ) исследовались мазки-отпечатки, парафиновые срезы, замороженные срезы, нативный материал ГБМ и её перифокальной зоны роста методом КСЛМ с окрашиванием ядер клеток DAPI и митохондрий — флуоресцентным трекером CellLight™ Mitochondria-GFP, VacMam 2.0 (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA), активных форм кислорода – 2'-7' dichlorofluorescein (Sigma-Aldrich, USA), лизосом – LysoTracker® Green DND-26 (Cell Signaling Technology, USA). Статистический анализ полученных данных проводился с помощью программы IBM SPSS Statistics 23 при уровне доверительности $p=0,05$. Оценка нормальности распределения проводилась с помощью критерия Шапиро-Уилка, распределение ряда полученных данных отличалось от нормального. Анализ достоверности различий между выборками проводился с помощью критерия Манна-Уитни.

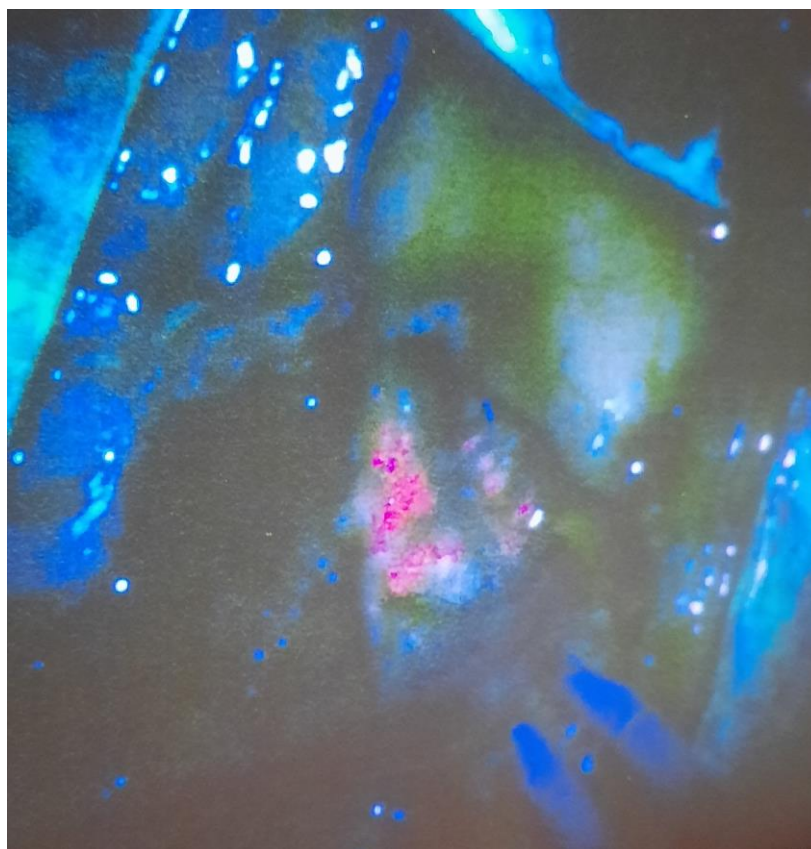


Рисунок 1. Интраоперационная флуоресценция протопорфирина IX в ультрафиолетовом свете. Красная флуоресценция – глиобластома, розовая – перифокальная зона.

Результаты

Гистологическое строение перифокальной зоны ГБМ варьировало от практически нормального головного мозга до морфологической картины диффузной астроцитомы, представленной полями полиморфных отростчатых клеток с умеренной атипией гиперхромных ядер, без выраженной митотической активности, некрозов и сосудистой пролиферации (рисунок 3). Обращал на себя внимание высокий уровень экспрессии FoxM1, который в группе контроля экспрессировался только в ядрах нейронов коры больших полушарий. В перифокальной зоне опухоли медиана уровня пролиферативной активности по Ki-67 составила 5,6 [1,8; 18,0] %, что было заметно ниже ($U=3,0$; значимость 0,0001) уровня пролиферативной активности клеток опухоли — 33,1 [22,9; 37,7] %. Однако, уровень экспрессии FoxM1 оказался высоким, как в перифокальной зоне ($U=43,5$; значимость 0,631), так и в зоне опухоли: медианы составили 96,5 [73,3; 100] % и 100 [75,3; 100] % соответственно (таблица 1).

Таблица 1. Данные исследования перифокальной зоны глиобластомы

№	Пол	Возраст	Уровень пролиферативной активности по Ki-67, %		Уровень экспрессии FoxM1, %	
			Опухоль	Перифокальная зона	Опухоль	Перифокальная зона
1	ж	67	21,0	0,8	100	87,3
2	м	53	35,6	19,0	27,2	65,0
3	ж	53	34,2	5,2	100	100
4	м	59	70,0	1,0	30,0	100
5	ж	63	44,0	10,5	100	75,0
6	м	47	23,0	2,1	100	92,1
7	м	60	32,0	17,6	100	100
8	м	68	30,0	28,3	100	100
9	м	39	22,5	6,0	90,3	100
10	ж	47	34,7	3,8	100	68

При КЛСМ нативных препаратов ткани ГБМ и перифокальной зоны отмечалась фоновая красная флуоресценция протопорфирина IX (PrpIX) в цитоплазме клеток (рисунок 4). При этом флуоресценция была обнаружена не только в клетках, но и в просвете и стенках сосудов (рисунок 5). Для того, чтобы подтвердить внутриклеточное

расположение ПрпІХ мы использовали флуоресцентные трекеры: была обнаружена колокализация сигнала ПрпІХ и лизосом, митохондрий, активных форм кислорода в виде жёлтой флуоресценции (рисунки 6 – 8). Таким образом, было подтверждено, что синтез ПрпІХ происходит в митохондриях клеток опухоли и перифокальной зоны. При этом выделяются активные формы кислорода. Важным фактом также является наличие флюорохрома в сосудах и их стенках.

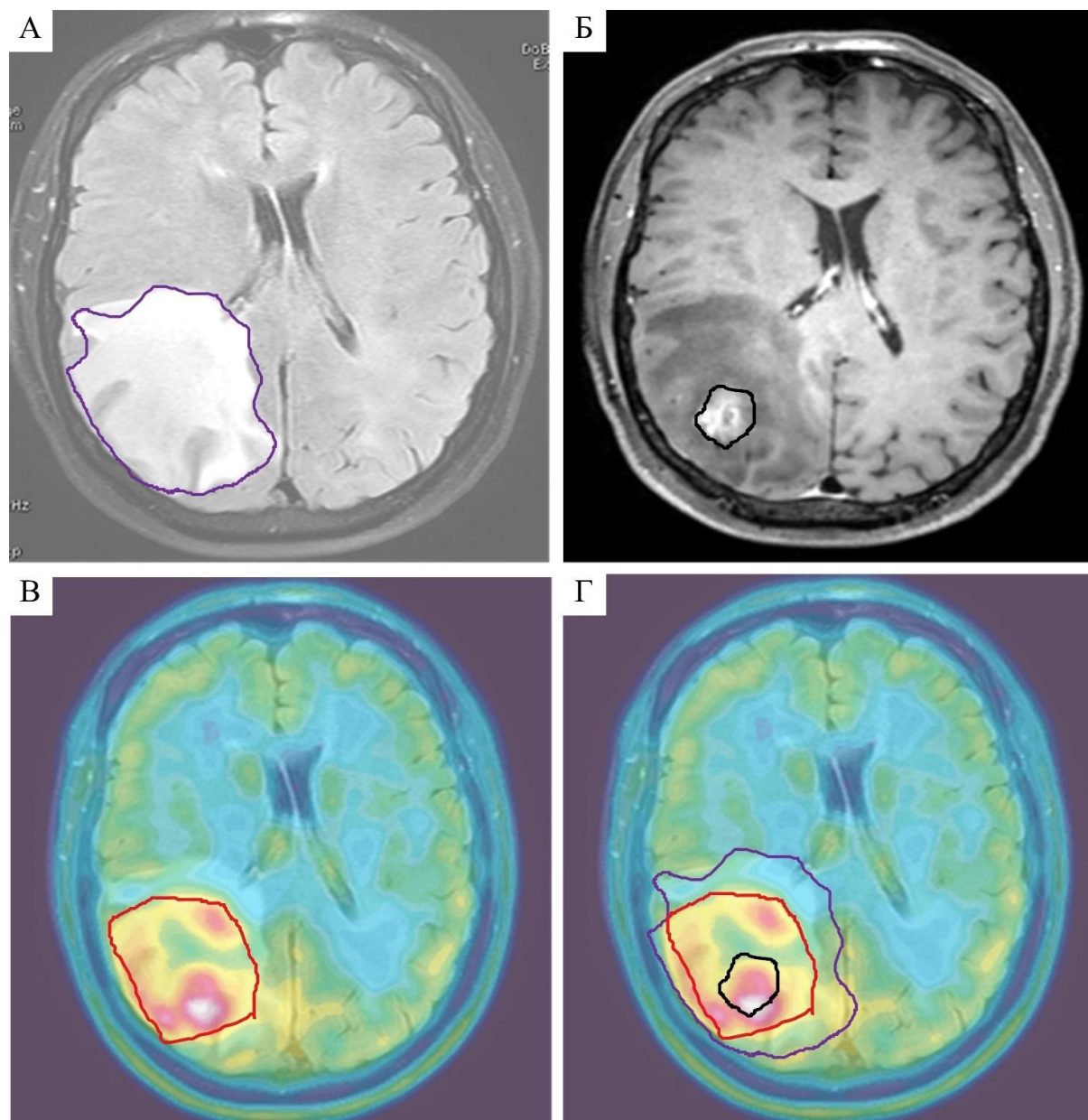


Рисунок 2. Глиобластома с перифокальной зоной при лучевых методах исследования. А. T2 ВИ FLAIR; Б. T1 ВИ+КУ; В. ПЭТ-МРТ с ^{11}C -метионином; Г. Суммарное наложение полученных зон

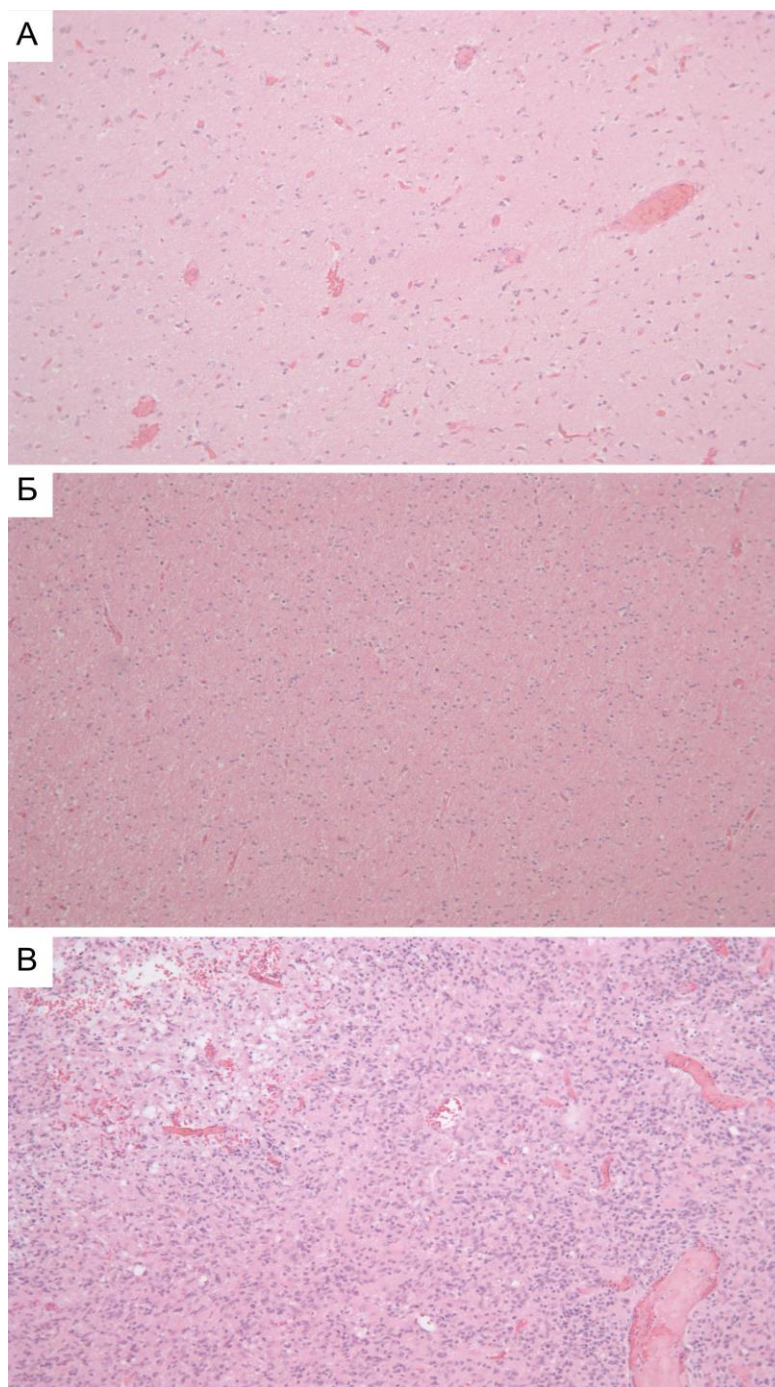


Рисунок 3. Гистологическое строение глиобластомы и её перифокальной зоны. А. Перифокальная зона со строением нормальной ткани головного мозга; Б. Перифокальная зона со строением диффузной астроцитомы; В. Глиобластома; гематоксилин-эозин, x100

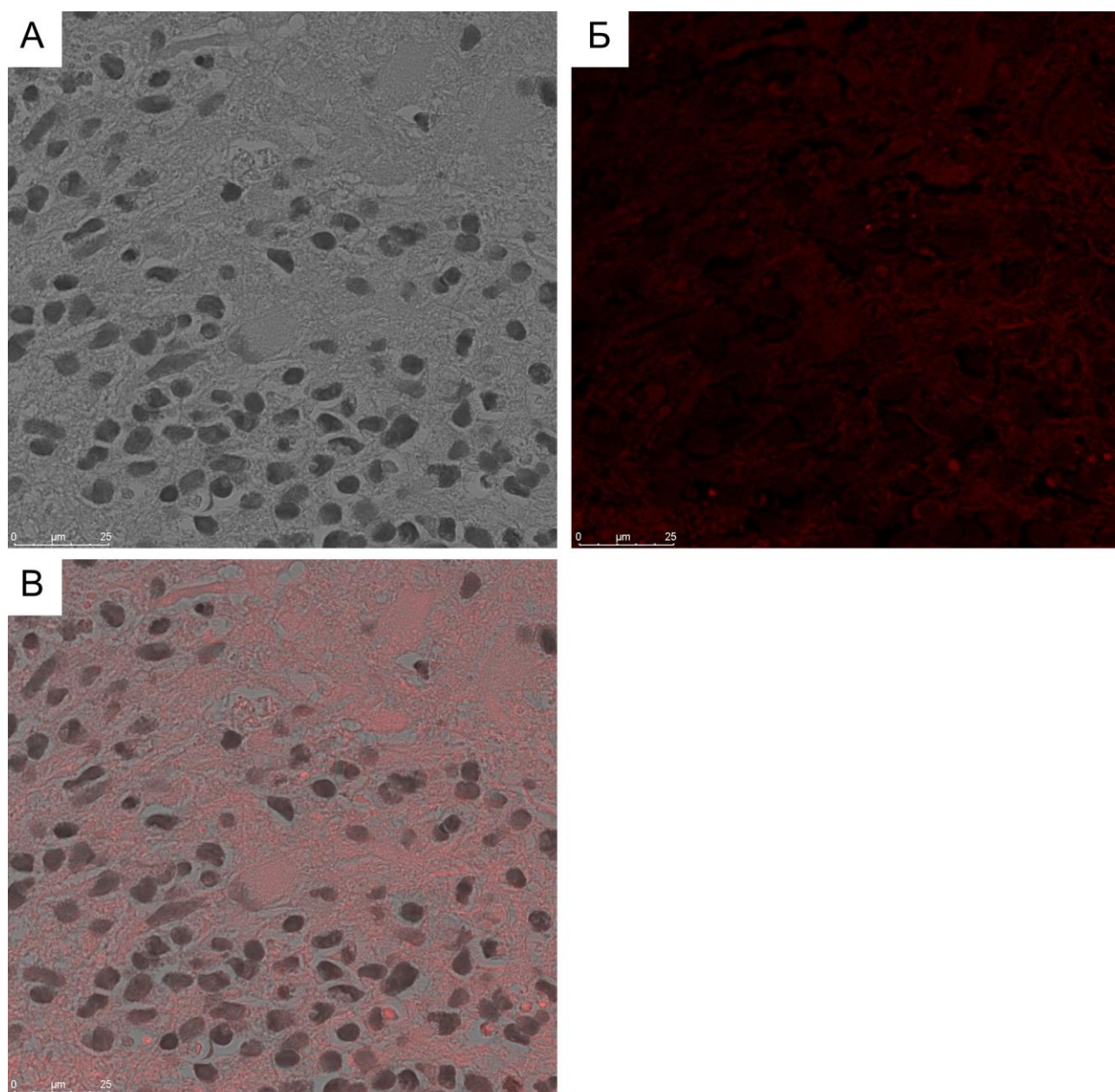


Рисунок 4. Флуоресценция протопорфирина в ткани глиобластомы и перифокальной зоны при использовании конфокальной лазерной микроскопии. А: изображение суммарного белого канала; Б: красная флуоресценция протопорфирина IX; В: колокализация сигналов; увеличение 400

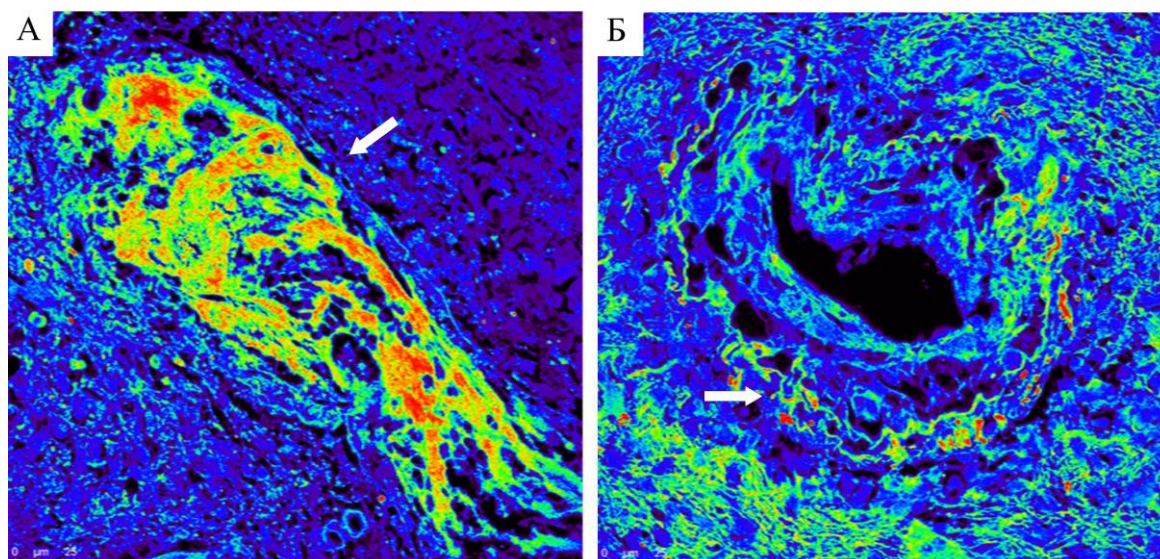


Рисунок 5. Флуоресценция протопорфирина в ткани глиобластомы и перифокальной зоны. А, Б: распределение спектра флуоресценции протопорфирина IX в ткани перифокальной зоны глиобластомы по интенсивности сигнала, синий – слабая, жёлтый и зелёный – умеренная, красный – высокая; белыми стрелками указана флуоресценция в стенках и просвете сосудов; увеличение 200

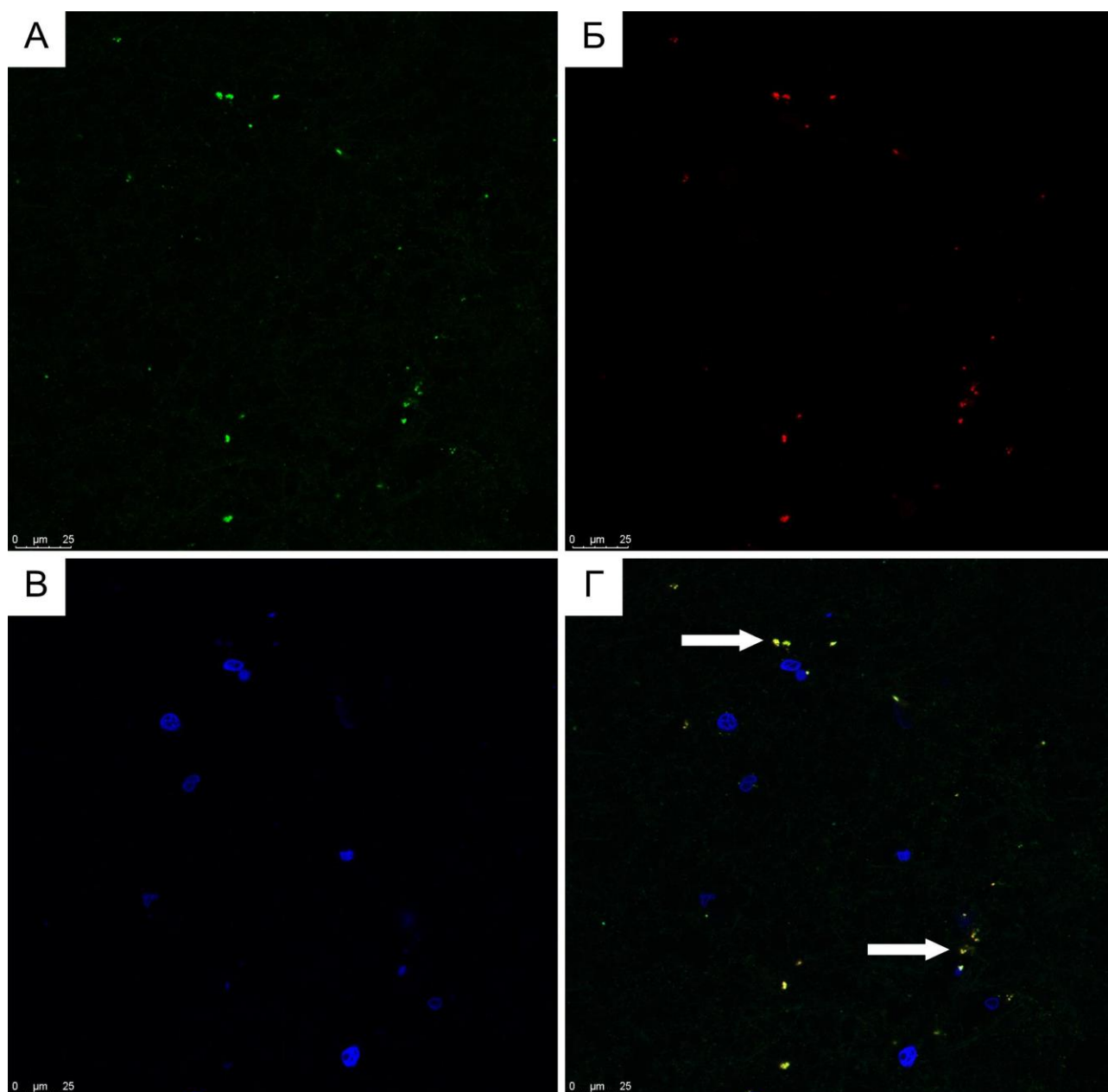


Рисунок 6. Конфокальная сканирующая лазерная микроскопия мазков перифокальной зоны и ткани глиобластомы. А: зеленая флуоресценция митохондрий; Б: красная флуоресценция протопорфирина IX; В: голубая флуоресценция клеточных ядер (DAPI); Г: колокализация протопорфирина IX и митохондрий наблюдалась в виде желтой флуоресценции (указано стрелкой); увеличение 200

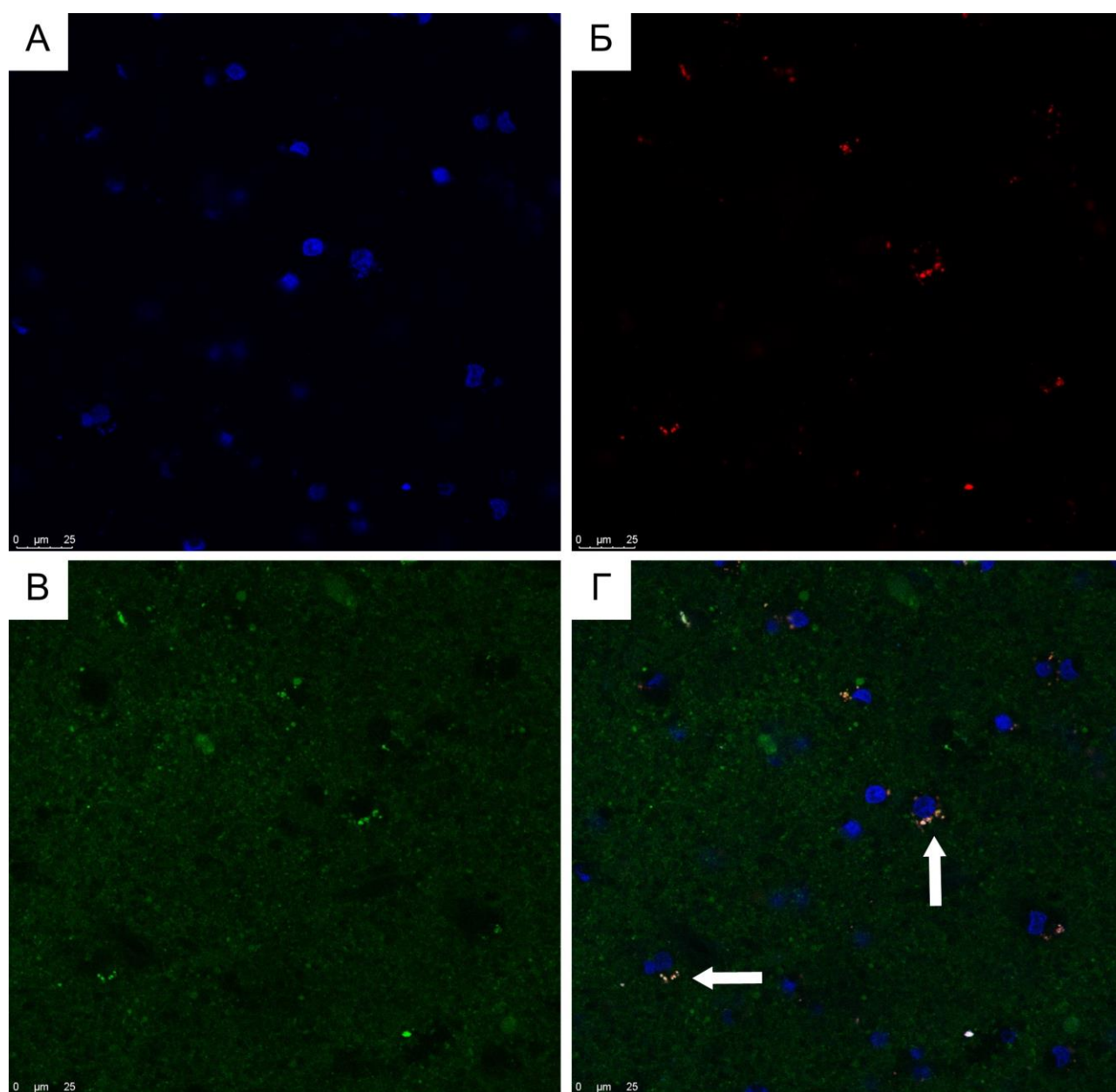


Рисунок 7. Конфокальная сканирующая лазерная микроскопия мазков перифокальной зоны и ткани глиобластомы. А: голубая флуоресценция клеточных ядер (DAPI); Б: красная флуоресценция протопорфирина IX; В: зеленая флуоресценция активных форм кислорода; Г: колокализация протопорфирина IX и активных форм кислорода наблюдалась в виде желтой флуоресценции (указано стрелкой); увеличение 200

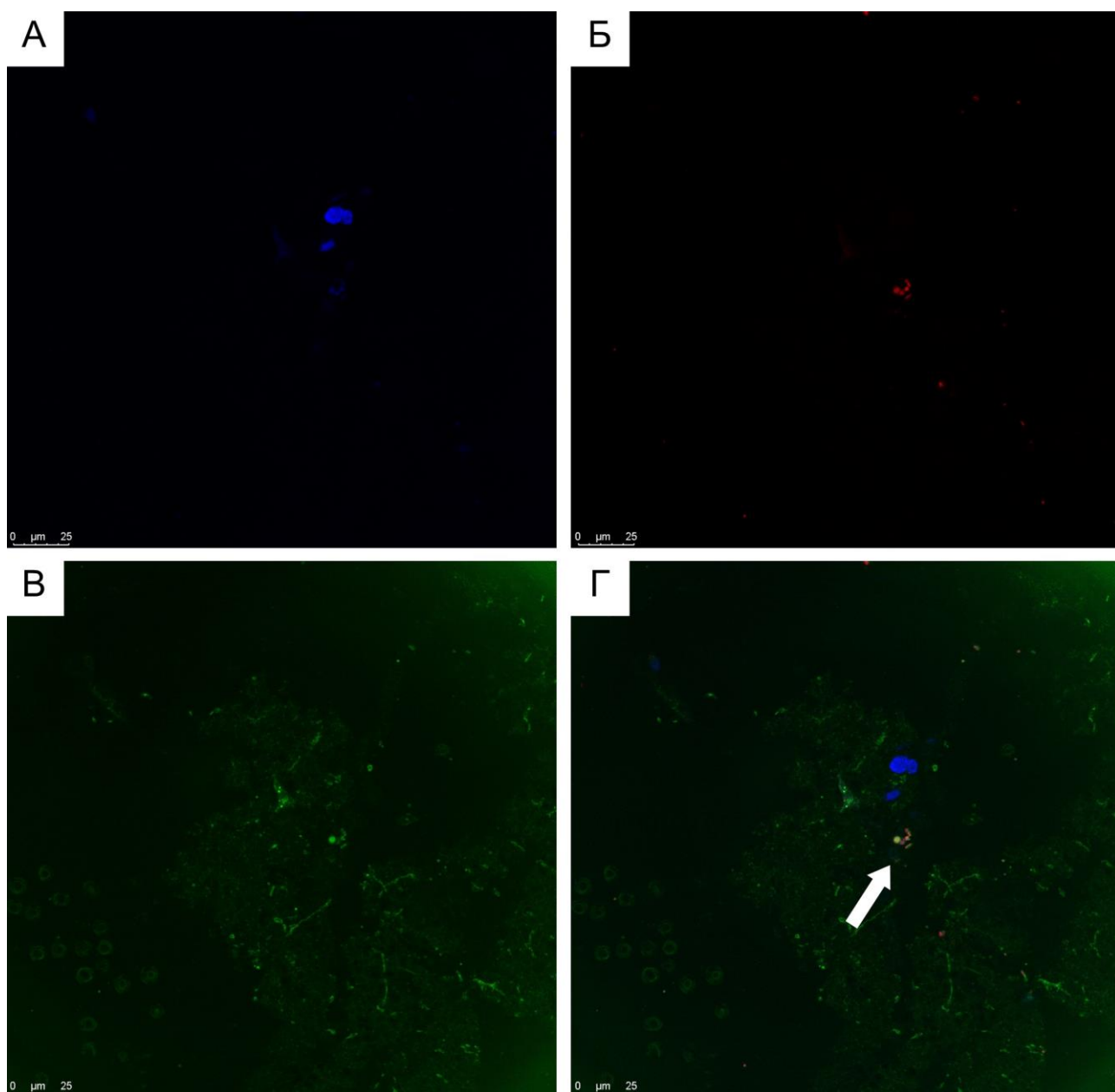


Рисунок 8. Конфокальная сканирующая лазерная микроскопия мазков перифокальной зоны и ткани глиобластомы. А: голубая флуоресценция клеточных ядер (DAPI); Б: красная флуоресценция протопорфирина IX; В: зеленая флуоресценция лизосом; Г: колокализация протопорфирина IX и лизосом наблюдалась в виде желтой флуоресценции (указано стрелкой); увеличение 200

Обсуждение

Морфологический состав перифокальной зоны роста ГБМ, с нашей точки зрения, изучен недостаточно. Опухоли головного мозга, как правило, сопровождаются перифокальным (перитуморальным) отеком вазогенного или инфильтративного характера. Эта зона обычно не накапливает контрастное вещество на постконтрастных T1 ВИ вследствие сохраняющейся целостности гематоэнцефалического барьера [12]. На T2 и FLAIR ВИ оба вида перитуморального отека проявляются одинаково – в виде зоны с

гиперинтенсивным сигналом, окружающей опухоль. Перифокальная зона отёка, видимая в T2 режиме МРТ, изучалась на лабораторных мышах. При этом она была существенно больше, чем видимая инвазия опухоли. Очень близко к ней также были обнаружены инфильтрирующие ткань мозга опухолевые клетки ГБМ. Сама же перифокальная зона отёка не имела типичного гистологического строения злокачественной глиомы по клеточной структуре состояла из активированных астроцитов и микроглии. [13]. Однако, в ряде других исследований в зонах, видимых в T2 FSE и FLAIR как гиперинтенсивные неусиливающиеся участки, при гистологическом исследовании была обнаружена активная опухоль. [14]. Большой научный интерес представляют ГБМ, не накапливающие контраст вообще или имеющие такие зоны в своём составе [15].

При этом не остаётся сомнений в важной роли перифокальной зоны в прогрессии и онкогенезе опухоли. Рецидив глиомы происходит в области 2 см от края первичной локализации в 90% случаев [16-18]. Дополнительным доказательством наличия опухолевого потенциала в перифокальной зоне ГБМ следует считать наличие экспрессии в ней FoxM1 и флуоресценции протопорфирина IX. Центральная роль FoxM1 в онкогенезе глиом доказана экспериментально: при трансфицировании колоний нормальных человеческих астроцитов они приобретают фенотип клеток глиобластомы [19].

Аберрантная экспрессия FoxM1 исключительно важна для регуляции онкогенности клеток глиомы человека. FoxM1 контролирует экспрессию белка Skp2, фазы митоза G1-S и G2-M [20], что является потенциальным механизмом ускорения клеточного цикла клеток ГБМ. Также избыточная экспрессия FoxM1 снижает экспрессию ядерного белка опухолевого супрессора p27Kip1, но увеличивает экспрессию белка Skp2 и cyclin D1 [21]. FoxM1 может регулировать сигнальный путь Wnt/ β -катенин посредством стимуляции ядерной транслокации β -катенина и экспрессии гена-мишени Wnt. С помощью иммунопреципитации и анализа иммунофлуоресцентного окрашивания было выявлено прямое взаимодействие FoxM1 и β -катенина и их колокализация как в цитоплазме, так и в ядре. При воздействии Wnt3a уровень белков FoxM1 и β -катенина повышается, а активация Wnt способствует их транслокации в ядро. Избыточная экспрессия FoxM1 усиливает уровень экспрессии целевых генов Wnt/ β -катенина, Axin2, c-Myc, cyclin D1 и стимулирует клетки ГБМ для образования опухолей головного мозга у голых мышей, тогда как выключение FoxM1 или β -катенина с помощью sh-РНК в клетках глиомы значительно ингибирует онкогенез. FoxM1 также влияет на инвазивный рост ГБМ и на опухолевый неоангиогенез, непосредственно активируя промотор MMP-2 и VEGF через сайт связывания FoxM. Примечательно, что сверхэкспрессия FoxM1 является характерной особенностью злокачественных глиом [22]. Более высокие уровни мРНК FoxM1

обнаружены в анапластической астроцитоме и ГБМ по сравнению с диффузной астроцитомой [23]. При исследовании мозга взрослых мышей с помощью ПЦР в реальном времени уровень экспрессии FoxM1 не была обнаружена [24]. На уровне микро-РНК экспрессия FoxM1 в организме наблюдалась только в эмбриональном периоде [25, 26]. FoxM1 является перспективной мишенью для новых таргетных препаратов. Известные ингибиторы FoxM1: Siomycin A, MG115, MG132, bortozomib, thiostrepton [27-29].

В нормальной ткани головного мозга протопорфирин IX (ПрпХ) накапливается в очень малом количестве в эндотелиальных клетках в зоне сосудистого сплетения, вентрикулярной эпендиме, pia mater и некоторых областях белого вещества [30, 31]. Опухоли головного мозга, в особенности глиомы высокой степени злокачественности, имеют ярко выраженную флуоресценцию ПрпХ после введения АЛК с соотношениями от 20:1 до 50:1 по сравнению с нормальной тканью мозга [32-34], однако механизмы избирательного накопления остаются недостаточно изученными [35]. В отличие от других флуорохромов, таких как флуоресцеин и фотофрин, которые в основном синтезируются в печени и попадают в мозг через гематоэнцефалический барьер перед проникновением в отечную опухоль, синтез ПрпХ происходит внутри опухолевой клетки, что объясняет его специфичность [36]. Эксперименты *in vitro* с клетками глиомы С6, показали, что они способны синтезировать значительное количество порфиринов при добавлении 5-АЛК в среду [37]. Каким же образом 5-АЛК попадает внутрь опухолевых клеток? Гематоэнцефалический барьер имеет очень низкую проницаемость для меченого радиоактивным изотопом АЛК из-за её плохой растворимости в липидах [38]. Более того, после введения 5-АЛК было установлено, что порфирин практически полностью накапливается в эритроцитах, тогда как его концентрация в плазме низкая [39, 40]. В тоже время, специфичный переносчик АЛК из крови в мозг обнаружен не был, хотя в сосудистом сплетении существует насыщаемый механизм транспорта АЛК через гематоэнцефалический барьер [41]. В отношении злокачественных глиом было высказано предположение, что основной механизм накопления ПрпХ обусловлен пассивной диффузией 5-АЛК в ткань глиом с последующим её поглощением вследствие повреждения гематоэнцефалического барьера [42]. Пролиферация, неоваскуляризация и повышенная плотность клеток способствуют повышенному накоплению ПрпХ в ГБМ [43]. Наше исследование показало, что ПрпХ действительно накапливается в сосудах и проходит через их стенки. Этот факт объясняет «ложную» красную флуоресценцию в глиальном рубце. В тоже время, мы доказали синтез этого флуорохрома в митохондриях опухолевых клеток и реакцию лизосом не только в опухоли, но и в перифокальной зоне. Ряд исследователей высказывает мнение, что неоангиогенез, сверхэкспрессия мембранных

транспортёров в ткани злокачественной глиомы и измененная активность ферментов при биосинтезе гема также могут играть важную роль. Например, феррохелатаза, которая превращает ПрпІХ в гем, обладает пониженной активностью в опухолевых клетках, что приводит к накоплению ПрпІХ [44]. Ингибирование этой реакции добавлением хелаторов железа приводило к увеличению АЛК-опосредованного накопления ПрпІХ [45, 46]. Накопление ПрпІХ увеличивается при повышении температуры и рН, снижения уровня глюкозы [47, 48].

При генетическом исследовании перифокальной зоны с помощью РНК-секвенирования, обнаружилось, что неконтрастируемые области пронеурональных глиом отличаются от контрастируемых областей по генотипу и преимущественно содержат OLIG2+ клетки глиомы, подобные прогениторам олигодендроцитов. Эти клетки экспрессируют Sox2, ген пронеуронального развития и маркер стволовых клеток, участвующий в росте и прогрессировании глиомы [49-51].

В последнее время появляются данные об активном взаимодействии клеток перифокальной зоны с тканью нормального мозга и опухолью. Клетки, подобные прогениторам олигодендроцитов, и макрофаги/микроглия быстро мигрируют и пролиферируют в перифокальной области, где они секретируют факторы роста и цитокины, способствуя приобретению стволовых свойств клетками ГБМ и их химиорадиорезистентности [52]. Некоторые исследования показывают возможность интеграции клеток опухолевого микроокружения перифокальной зоны в нормальные нейрональные связи головного мозга, при этом электрохимическая коммуникация нейронов и клеток перифокальной зоны роста глиомы с фенотипом прогениторов олигодендроцитов стимулирует деление и миграцию опухолевых клеток [53].

Резекция перифокальной зоны ГБМ оказывает влияние на прогноз течения заболевания для пациентов. Сравнительно недавно Verburg N. и de Witt Hamer P.C. [54] в большом (n = 643) ретроспективном исследовании показали улучшение показателей общей выживаемости при более обширной ($\geq 53\%$) резекции перифокальных зон аномального сигнала в режиме FLAIR после полной резекции областей с контрастным усилением по сравнению с менее обширными резекциями (медиана выживаемости 20,7 и 15,5 месяцев, соответственно; $p < 0,01$). Примечательно, что согласно полученным данным более обширная хирургическая резекция привела к меньшему количеству осложнений (18% против 26%, $p = 0,04$). При анализе российской популяции пациенты с ГБМ, не имевшей контраст-ненакапливающей зоны, имели большую продолжительность жизни, чем при наличии таковой [55].

Таким образом, дальнейшее изучение перифокальной зоны ГБМ позволит усовершенствовать текущие методы диагностики, хирургического лечения и таргетной терапии опухоли, что в перспективе существенно улучшит качество и продолжительность жизни пациентов.

Заключение

В клетках перифокальной зоны ГБМ был обнаружен высокий уровень экспрессии FoxM1, а значения Ki-67 соответствовали глиомам 2-4-ой степени злокачественности. Протопорфирин IX был обнаружен в митохондриях опухолевых клеток, их лизосомах не только в опухоли, но и в перифокальной зоне и сосудах. Полученные данные позволяют предположить о наличии опухолевого потенциала перифокальной зоны и указывают на необходимость её хирургической резекции. Кроме того, применение ингибиторов FoxM1 в лечении ГЛБ может подавлять перифокальную зону роста опухоли.

Список литературы

1. Harif F, Muzaffar K, Perveen K, Malhi S, Simjee S. Glioblastoma Multiforme: a Review of Its Epidemiology and Pathogenesis through Clinical Presentation and Treatment. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention [Internet]. 2017 [cited 2021 Jun 25];18(1):3–9. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5563115/> doi: 10.22034/APJCP.2017.18.1.3
2. Noch EK, Ramakrishna R, Magge R. Challenges in the Treatment of Glioblastoma: Multisystem Mechanisms of Therapeutic Resistance. World Neurosurgery. 2018 Aug 1;116:505–17. doi: 10.1016/j.wneu.2018.04.022
3. Alexander BM, Cloughesy TF. Adult Glioblastoma. Journal of Clinical Oncology [Internet]. 2017 Jul 20 [cited 2021 Jun 25];35(21):2402–9. Available from: <https://ascopubs.org/doi/pdf/10.1200/JCO.2017.73.0119> doi: 10.1200/jco.2017.73.0119
4. Schupper AJ, Yong RL, Hadjipanayis CG. The Neurosurgeon's Armamentarium for Gliomas: an Update on Intraoperative Technologies to Improve Extent of Resection. Journal of Clinical Medicine [Internet]. 2021 Jan 11 [cited 2021 Jun 25];10(2):236. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7826675/> doi: 10.3390/jcm10020236
5. Lau D, Hervey-Jumper SL, Han SJ, Berger MS. Intraoperative Perception and Estimates on Extent of Resection during Awake Glioma surgery: Overcoming the Learning Curve. Journal of Neurosurgery [Internet]. 2018 May [cited 2021 Jun 25];128(5):1410–8. Available from: <https://thejns.org/view/journals/j-neurosurg/128/5/article-p1410.xml> doi: 10.3171/2017.1.jns161811

6. Zhang H, Tian M, J. Yang D. Editorial: [Hot Topic: Molecular Image-Guided Theranostics and Personalized Medicine]. *Current Medical Imaging Reviews* [Internet]. 2012 Oct 1 [cited 2021 Jun 26];8(4):261–1. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2012/747416/> doi: 10.2174/157340512803759811
7. Díez Valle R, Tejada Solis S, Idoate Gastearena MA, García de Eulate R, Domínguez Echávarri P, Aristu Mendiroz J. Surgery Guided by 5-aminolevulinic Fluorescence in glioblastoma: Volumetric Analysis of Extent of Resection in single-center Experience. *Journal of Neuro-Oncology*. 2010 Jul 6;102(1):105–13. doi: 10.1007/s11060-010-0296-4
8. Xue J, Zhou A, Tan C, Wu Y, Lee H-T, Li W, et al. Forkhead Box M1 Is Essential for Nuclear Localization of Glioma-associated Oncogene Homolog 1 in Glioblastoma Multiforme Cells by Promoting Importin-7 Expression. *The Journal of Biological Chemistry* [Internet]. 2015 Jun 17 [cited 2021 Jun 26];290(30):18662–70. Available from: [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(20\)42343-9/fulltext](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(20)42343-9/fulltext) <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.662882>
9. Nie S, Lou L, Wang J, Cui J, Wu W, Zhang Q, et al. Expression, Association with Clinicopathological Features and Prognostic Potential of CEP55, p-Akt, FoxM1 and MMP-2 in Astrocytoma. *Oncology Letters* [Internet]. 2020 Jun 17 [cited 2021 Jun 26];20(2):1685–94. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7377175/> doi: 10.3892/ol.2020.11742
10. Stummer W, Tonn J-C, Goetz C, Ullrich W, Stepp H, Bink A, et al. 5-Aminolevulinic Acid-derived Tumor Fluorescence. *Neurosurgery* [Internet]. 2013 Dec 12 [cited 2021 Jun 26];74(3):310–20. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4206350/> doi: 10.1227/neu.0000000000000267
11. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, et al. Fiji: an open-source Platform for biological-image Analysis. *Nature Methods* [Internet]. 2012 [cited 2021 Jun 26];9(7):676–82. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22743772> doi: 10.1038/nmeth.2019
12. Nag S, Manias JL, Stewart DJ. Pathology and New Players in the Pathogenesis of Brain Edema. *Acta Neuropathologica*. 2009 Apr 30;118(2):197–217. doi: 10.1007/s00401-009-0541-0
13. Engelhorn T, Savaskan NE, Schwarz MA, Kreutzer J, Meyer EP, Hahnen E, et al. Cellular Characterization of the Peritumoral Edema Zone in Malignant Brain Tumors. *Cancer Science* [Internet]. 2009 Oct [cited 2021 Jun 26];100(10):1856–62. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1349-7006.2009.01259.x> doi: 10.1111/j.1349-7006.2009.01259.x
14. Barajas RF, Phillips JJ, Parvataneni R, Molinaro A, Essock-Burns E, Bourne G, et al. Regional Variation in Histopathologic Features of Tumor Specimens from treatment-naïve

- Glioblastoma Correlates with Anatomic and Physiologic MR Imaging. *Neuro-Oncology* [Internet]. 2012 Jun 18 [cited 2021 Jun 26];14(7):942–54. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3379808/> doi: 10.1093/neuonc/nos128
15. Lasocki A, Gaillard F. Non-Contrast-Enhancing Tumor: a New Frontier in Glioblastoma Research. *American Journal of Neuroradiology* [Internet]. 2019 Apr 4 [cited 2020 Feb 8];40(5):758–65. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7053910/> doi: 10.3174/ajnr.a6025
16. Proescholdt MA, Macher C, Woertgen C, Brawanski A. Level of Evidence in the Literature concerning Brain Tumor Resection. *Clinical Neurology and Neurosurgery*. 2005 Feb;107(2):95–8. doi: 10.1016/j.clineuro.2004.02.025
17. Stummer W, van den Bent MJ, Westphal M. Cytoreductive Surgery of Glioblastoma as the Key to Successful Adjuvant therapies: New Arguments in an Old Discussion. *Acta Neurochirurgica* [Internet]. 2011 Jun 1 [cited 2021 Apr 17];153(6):1211–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21479583/> doi: 10.1007/s00701-011-1001-x
18. Hung AL, Garzon-Muvdi T, Lim M. Biomarkers and Immunotherapeutic Targets in Glioblastoma. *World Neurosurgery*. 2017 Jun;102:494–506. doi: 10.1016/j.wneu.2017.03.011
19. Wang Z, Zhang S, Siu T, Huang S. Glioblastoma Multiforme Formation and EMT: Role of FoxM1 Transcription Factor. *Current Pharmaceutical Design* [Internet]. 2015 Feb 3 [cited 2021 Jun 26];21(10):1268–71. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4380124/> doi: 10.2174/138161282166614121115949
20. Uddin S, Hussain A, Ahmed M, Siddiqui K, Al-Dayel F, Bavi P, et al. Overexpression of FoxM1 Offers a Promising Therapeutic Target in Diffuse Large B-cell Lymphoma. *Haematologica* [Internet]. 2012 Jun [cited 2021 Jun 26];97(7):1092–100. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3396683/> doi: 10.3324/haematol.2011.053421
21. Polyak K. The p27Kip1 Tumor Suppressor gene: Still a Suspect or Proven guilty? *Cancer Cell* [Internet]. 2006 Nov [cited 2021 Jun 28];10(5):352–4. Available from: [https://www.cell.com/cancer-cell/comments/S1535-6108\(06\)00322-9?code=cell-site](https://www.cell.com/cancer-cell/comments/S1535-6108(06)00322-9?code=cell-site) doi: 10.1016/j.ccr.2006.10.015
22. Liu M, Dai B, Kang S-H, Ban K, Huang F-J, Lang FF, et al. FoxM1B Is Overexpressed in Human Glioblastomas and Critically Regulates the Tumorigenicity of Glioma Cells. *Cancer Research* [Internet]. 2006 Apr 1 [cited 2021 Jun 26];66(7):3593–602. Available from: <http://cancerres.aacrjournals.org/content/66/7/3593> doi: 10.1158/0008-5472.can-05-2912
23. van den Boom J, Wolter M, Kuick R, Misek DE, Youkilis AS, Wechsler DS, et al. Characterization of Gene Expression Profiles Associated with Glioma Progression Using

- Oligonucleotide-Based Microarray Analysis and Real-Time Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction. *The American Journal of Pathology* [Internet]. 2003 Sep [cited 2021 Jun 28];163(3):1033–43. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1868272/> doi: 10.1016/s0002-9440(10)63463-3
24. Joshi K, Banasavadi-Siddegowda Y, Mo X, Kim S-H, Mao P, Kig C, et al. MELK-Dependent FOXM1 Phosphorylation Is Essential for Proliferation of Glioma Stem Cells. *Stem Cells* [Internet]. 2013 May 22 [cited 2021 Jun 28];31(6):1051–63. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3744761/> doi: 10.1002/stem.1358
25. Korver W, Roose J, Clevers H. The winged-helix Transcription Factor Trident Is Expressed in Cycling Cells. *Nucleic Acids Research* [Internet]. 1997 May 1 [cited 2021 Jun 28];25(9):1715–9. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC146663/> doi: 10.1093/nar/25.9.1715
26. Ye H, Kelly TF, Samadani U, Lim L, Rubio S, Overdier DG, et al. Hepatocyte Nuclear Factor 3/fork Head Homolog 11 Is Expressed in Proliferating Epithelial and Mesenchymal Cells of Embryonic and Adult tissues. *Molecular and Cellular Biology* [Internet]. 1997 Mar [cited 2019 Sep 25];17(3):1626–41. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC231888/> doi: 10.1128/mcb.17.3.1626
27. Gartel AL. A New Target for Proteasome inhibitors: FoxM1. *Expert Opinion on Investigational Drugs* [Internet]. 2010 Jan 15 [cited 2021 Jun 28];19(2):235–42. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3532816/> doi: 10.1517/13543780903563364
28. Gartel AL. Thiostrepton, Proteasome Inhibitors and FOXM1. *Cell Cycle* [Internet]. 2011 Dec 15 [cited 2021 Jun 28];10(24):4341–2. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3272263/> doi: 10.4161/cc.10.24.18544
29. Nakano I, Joshi K, Visnyei K, Hu B, Watanabe M, Lam D, et al. Siomycin a Targets Brain Tumor Stem Cells Partially through a MELK-mediated Pathway. *Neuro-Oncology* [Internet]. 2011 May 9 [cited 2021 Jun 28];13(6):622–34. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3107094/> doi: 10.1093/neuonc/nor023
30. Walter S, Susanne S, Simon W, Herbert S, Clemens F, Claudia G, et al. Intraoperative Detection of Malignant Gliomas by 5-Aminolevulinic Acid-induced Porphyrin Fluorescence. *Neurosurgery*. 1998 Mar 1;42(3):518–26. doi: 10.1097/00006123-199803000-00017
31. Stummer W, Stocker S, Novotny A, Heimann A, Sauer O, Kempfski O, et al. In Vitro and in Vivo Porphyrin Accumulation by C6 Glioma Cells after Exposure to 5-aminolevulinic Acid. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 1998 Sep;45(2-3):160–9. doi: 10.1016/s1011-1344(98)00176-6

32. Valdes PA, Kim A, Brantsch M, Niu C, Moses ZB, Tosteson TD, et al. δ -aminolevulinic acid-induced Protoporphyrin IX Concentration Correlates with Histopathologic Markers of Malignancy in Human gliomas: the Need for Quantitative fluorescence-guided Resection to Identify Regions of Increasing Malignancy. *Neuro-Oncology* [Internet]. 2011 Jul 28 [cited 2021 Jun 28];13(8):846–56. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3145475/> doi: 10.1093/neuonc/nor086
33. ValdésPA, Kim A, Leblond F, Conde OM, Harris BT, Paulsen KD, et al. Combined Fluorescence and Reflectance Spectroscopy for in Vivo Quantification of Cancer Biomarkers in low- and high-grade Glioma Surgery. *Journal of Biomedical Optics* [Internet]. 2011 [cited 2021 Jun 28];16(11):116007. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3221714/> doi: 10.1117/1.3646916
34. Widhalm G, Wolfsberger S, Minchev G, Woehrer A, Krssak M, Czech T, et al. 5-Aminolevulinic Acid Is a Promising Marker for Detection of Anaplastic Foci in Diffusely Infiltrating Gliomas with Nonsignificant Contrast Enhancement. *Cancer* [Internet]. 2010 Mar 15 [cited 2021 Jun 28];116(6):1545–52. Available from: <https://acsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/cncr.24903> doi: 10.1002/cncr.24903
35. Ennis SR, Novotny A, Xiang J, Shakui P, Masada T, Stummer W, et al. Transport of 5-aminolevulinic Acid between Blood and Brain. *Brain Research*. 2003 Jan;959(2):226–34. doi: 10.1016/s0006-8993(02)03749-6
36. Stummer W, Götz C, Hassan A, Heimann A, Kempfski O. Kinetics of Photofrin II in Perifocal Brain Edema. *Neurosurgery*. 1993 Dec;33(6):1075–82. doi: 10.1227/00006123-199312000-00016
37. Iinuma S, Farshi S, Ortel B, Hasan T. A Mechanistic Study of Cellular Photodestruction with 5-aminolaevulinic acid-induced Porphyrin. *British Journal of Cancer* [Internet]. 1994 Jul 1 [cited 2021 Jun 28];70(1):21–8. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2033301/> doi: 10.1038/bjc.1994.244
38. Terr L, Weiner LP. An Autoradiographic Study of δ -aminolevulinic Acid Uptake by Mouse Brain. *Experimental Neurology*. 1983 Feb;79(2):564–8. doi: 10.1016/0014-4886(83)90234-0
39. Stummer W, Stepp H, Möller G, Ehrhardt A, Leonhard M, Reulen HJ. Technical Principles for Protoporphyrin-IX-Fluorescence Guided Microsurgical Resection of Malignant Glioma Tissue. *Acta Neurochirurgica*. 1998 Oct 22;140(10):995–1000. doi: 10.1007/s007010050206
40. Webber J, Kessel D, Fromm D. Plasma Levels of Protoporphyrin IX in Humans after Oral Administration of 5-aminolevulinic Acid. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 1997 Jan;37(1-2):151–3. doi: 10.1016/s1011-1344(96)07348-4

41. Ocheltree SM, Shen H, Hu Y, Xiang J, Keep RF, Smith DE. Role of PEPT2 in the Choroid Plexus Uptake of Glycylsarcosine and 5-Aminolevulinic Acid: Studies in Wild-Type and Null Mice. *Pharmaceutical Research* [Internet]. 2004 Sep [cited 2021 Jun 28];21(9):1680–5. Available from: <https://deepblue.lib.umich.edu/handle/2027.42/41506> doi: 10.1023/b:pham.0000041465.89254.05
42. Valdés PA, Moses ZB, Kim A, Belden CJ, Wilson BC, Paulsen KD, et al. Gadolinium- and 5-Aminolevulinic Acid-Induced Protoporphyrin IX Levels in Human Gliomas: an Ex Vivo Quantitative Study to Correlate Protoporphyrin IX Levels and Blood-Brain Barrier Breakdown. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* [Internet]. 2012 Sep [cited 2021 Jun 28];71(9):806–13. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3718468/> doi: 10.1097/nen.0b013e31826775a1
43. Montcel B, Mahieu-Williame L, Armoiry X, Meyronet D, Guyotat J. Two-peaked 5-ALA-induced PpIX Fluorescence Emission Spectrum Distinguishes Glioblastomas from Low Grade Gliomas and Infiltrative Component of Glioblastomas. *Biomedical Optics Express* [Internet]. 2013 Mar 13 [cited 2021 Jun 28];4(4):548. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3617717/> doi: 10.1364/boe.4.000548
44. Collaud S, Juzeniene A, Moan J, Lange N. On the Selectivity of 5-Aminolevulinic Acid-Induced Protoporphyrin IX Formation. *Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents*. 2004 May 1;4(3):301–16. doi: 10.2174/1568011043352984
45. Blake E, Curnow A. The Hydroxypyridinone Iron Chelator CP94 Can Enhance PpIX-induced PDT of Cultured Human Glioma Cells. *Photochemistry and Photobiology* [Internet]. 2010 Sep [cited 2021 Jun 28];86(5):1154–60. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1751-1097.2010.00770.x> doi: 10.1111/j.1751-1097.2010.00770.x
46. Valdés PA, Samkoe K, O'Hara JA, Roberts DW, Paulsen KD, Pogue BW. Deferoxamine Iron Chelation Increases δ -Aminolevulinic Acid Induced Protoporphyrin IX in Xenograft Glioma Model. *Photochemistry and Photobiology* [Internet]. 2010 Mar [cited 2021 Jun 28];86(2):471–5. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2875336/> doi: 10.1111/j.1751-1097.2009.00664.x
47. Georgakoudi I, Keng PC, Foster TH. Hypoxia Significantly Reduces Aminolaevulinic acid-induced Protoporphyrin IX Synthesis in EMT6 Cells. *British Journal of Cancer* [Internet]. 1999 Feb 26 [cited 2021 Jun 28];79(9-10):1372–7. Available from: <https://www.nature.com/articles/6690220> doi: 10.1038/sj.bjc.6690220
48. Wyld L, Reed M, Brown N. The Influence of Hypoxia and pH on Aminolaevulinic acid-induced Photodynamic Therapy in Bladder Cancer Cells in Vitro. *British Journal of Cancer*

- [Internet]. 1998 May [cited 2021 Jun 28];77(10):1621–7. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2150064/> doi: 10.1038/bjc.1998.265
49. Berezovsky AD, Poisson LM, Cherba D, Webb CP, Transou AD, Lemke NW, et al. Sox2 Promotes Malignancy in Glioblastoma by Regulating Plasticity and Astrocytic Differentiation. *Neoplasia* [Internet]. 2014 Mar 1 [cited 2021 Jun 28];16(3):193–206.e25. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1476558614000177> doi: 10.1016/j.neo.2014.03.006
50. Favaro R, Appolloni I, Pellegatta S, Sanga AB, Pagella P, Gambini E, et al. Sox2 Is Required to Maintain Cancer Stem Cells in a Mouse Model of High-Grade Oligodendroglioma. *Cancer Research* [Internet]. 2014 Mar 5 [cited 2021 Jun 28];74(6):1833–44. Available from: <https://cancerres.aacrjournals.org/content/74/6/1833.long> doi: 10.1158/0008-5472.can-13-1942
51. Gill BJ, Pisapia DJ, Malone HR, Goldstein H, Lei L, Sonabend A, et al. MRI-localized Biopsies Reveal subtype-specific Differences in Molecular and Cellular Composition at the Margins of Glioblastoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [Internet]. 2014 Aug 11 [cited 2021 Jun 28];111(34):12550–5. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4151734/> doi: 10.1073/pnas.1405839111
52. Hide T, Komohara Y, Miyasato Y, Nakamura H, Makino K, Takeya M, et al. Oligodendrocyte Progenitor Cells and Macrophages/Microglia Produce Glioma Stem Cell Niches at the Tumor Border. *EBioMedicine* [Internet]. 2018 Apr [cited 2021 Jun 28];30:94–104. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5952226/> doi: 10.1016/j.ebiom.2018.02.024
53. Venkatesh HS, Morishita W, Geraghty AC, Silverbush D, Gillespie SM, Arzt M, et al. Electrical and Synaptic Integration of Glioma into Neural Circuits. *Nature* [Internet]. 2019 Sep 1 [cited 2020 Aug 11];573(7775):539–45. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41586-019-1563-y> doi: 10.1038/s41586-019-1563-y
54. Verburg N, de Witt Hamer PC. State-of-the-art Imaging for Glioma Surgery. *Neurosurgical Review* [Internet]. 2020 Jun 30 [cited 2021 Jun 28];44(3):1331–43. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10143-020-01337-9> doi: 10.1007/s10143-020-01337-9
55. Лахина Ю, Гуляев Д, Красношлык П, Митрофанова Л, Петров А, Белов И, et al. Тактика Хирургического Лечения Глиобластом с Различными МР-Характеристиками. *Саратовский научно-медицинский журнал* [Internet]. 2020 Nov 20 [cited 2021 Jun 28];16(4):912–6. Available from: <https://ssmj.ru/2020/4/912>