

ПРЕДИКТОРНАЯ РОЛЬ ЛОКАЛЬНОГО УРОВНЯ ЦИТОКИНОВ В ТЕЧЕНИИ НИЗКОДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫХ ГЛИАЛЬНЫХ ОПУХОЛЕЙ

Златник Е.Ю., Игнатов С.Н., Сагакянц А.Б., Солдаткина Н.В., Росторгуев Э.Е.,
Енгибарян М.А., Шульгина О.Г., Пушкин А.А., Пандова О.В.

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения РФ, Ростов-на-Дону, e-mail: Ignatov_Sergey_@mail.ru

Низкодифференцированные глиальные опухоли являются наиболее часто встречаемыми злокачественными опухолями головного мозга и составляют около 65% от злокачественных опухолей ЦНС. Диагностика и лечение данной патологии остается острой проблемой в нейроонкологии. Цель исследования: изучение изменений цитокинового состава в ткани различных гистологических и молекулярно-генетических подтипов глиальных опухолей. В исследовании приняли участие 49 пациентов. В основную группу вошли 34 пациента с впервые выявленной супратенториальной глиальной опухолью. В контрольную группу вошли 15 пациентов с впервые выявленной супратенториальной менингиомой. Во время операции у пациентов основной группы проводился забор опухолевой ткани, а у пациентов контрольной группы – прилежащего к менингиоме неизмененного мозгового вещества в функционально незначимой зоне. В основной группе диффузная астроцитома верифицирована у 4 пациентов, у 4 – анапластическая астроцитома и у 26 – глиобластома. Среди пациентов с HGG мутация гена IDH1 обнаружена у 3 пациентов. У 30 пациентов с HGG определен уровень метилирования промотора MGMT. Изучение локального цитокинового состава неизмененного мозгового вещества и опухолевой ткани осуществлялось методом ИФА. При сравнении цитокинового состава неизмененного мозгового вещества с тканью HGG имеются статистически достоверные отличия ($p < 0,05$) в содержании ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10, ФНО- α . У больных с HGG и наличием мутации в генах IDH1 тканевой уровень ИЛ-4 был в 33 раза выше, чем у больных без мутации, а уровни ИЛ-6 и ИЛ-8, напротив, были ниже в 33 и 249 раз соответственно. При уровне метилирования промотора MGMT $>10\%$ отмечено статистически достоверное повышение локального уровня ИЛ-1 β . Изучение локального цитокинового состава HGG наряду с гистологическими и молекулярно-генетическими абберациями может служить предиктором течения заболевания и чувствительности к химиотерапии препаратами алкилирующей группы.

Ключевые слова: низкодифференцированные глиальные опухоли, глиобластома, IDH1/2, MGMT, ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-1 β .

PREDICTIVE ROLE OF LOCAL CYTOKINE LEVELS IN THE COURSE OF POORLY DIFFERENTIATED GLIAL TUMORS

Zlatnik E.Yu., Ignatov S.N., Sagakyants A.B., Soldatkina N.V., Rostorguev E.E.,
Engibaryan M.A., Shulgina O.G., Pushkin A.A., Pandova O.V.

National Medical Research Centre for Oncology, Rostov-on-Don, e-mail: Ignatov_Sergey_@mail.ru

Poorly differentiated glial tumors are the most common malignant brain tumors comprising about 65% of all malignant CNS lesions. Diagnosis and treatment of this pathology are an urgent problem in neuro-oncology. The aim of the study was to analyze changes in cytokine levels in glial tumors depending on their malignancy and molecular genetic characteristics. The study included 49 patients. The main group included 34 patients with newly diagnosed supratentorial glial tumors; the control group included 15 patients with newly diagnosed supratentorial meningiomas. Tumor tissues (in glioma patients) and unchanged brain matter adjacent to tumors in functionally insignificant region (in meningioma patients) were obtained intraoperatively. In the main group, diffuse astrocytoma was verified in 4 patients, anaplastic astrocytoma – in 4 patients, and glioblastoma – in 26 patients. Among HGG patients, the IDH1 gene mutation was revealed in 3 patients. MGMT promoter methylation was determined in 30 HGG patients. Local cytokine levels in tumor tissues and in unchanged brain matter were measured by ELISA. The comparison of cytokine levels in unchanged brain matter and HGG demonstrated statistically significant ($p < 0.05$) differences in the content of IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 and TNF- α . In patients with HGG and IDH1 mutations, tissue levels of IL-4 were 33 times higher than in patients without the mutations, and levels of IL-6 and IL-8, on the opposite, were lower by 33 and 249 times, respectively. MGMT promoter methylation $>10\%$ was accompanied by a statistically significant increase in the local IL-1 β levels. Determination of the local cytokine composition of HGG, together with histological analysis and molecular genetic aberrations, can serve as a predictor of the disease course and of sensitivity to chemotherapy with alkylating agents.

Keywords: poorly differentiated glial tumors, glioblastoma, IDH1/2, MGMT, IL-4, IL-6, IL-8, IL-1 β .

Диагностика и лечение низкодифференцированных глиальных опухолей (НГГ) остается актуальной проблемой в нейроонкологии. Среди НГГ наиболее часто встречаются анапластическая астроцитома (АА) и глиобластома (ГБ), составляя до 85% всех глиальных опухолей и около 65% злокачественных опухолей ЦНС (CBTRUS 2012–2016 г.). Пациенты с ГБ, несмотря на современный комплексный подход к лечению, имеют общую медиану выживаемости 14–16 месяцев, а пятилетний порог преодолевают не более 5% [1]. В последней классификации опухолей ЦНС ВОЗ от 2016 г., помимо гистологических критериев, также отражены и молекулярно-генетические aberrации, наиболее значимыми из которых являются статус мутации в генах IDH1/2, ко-делеция 1p/19q, уровень метилирования промотора MGMT [2].

Так, по результатам ряда исследований, общая медиана выживаемости пациентов с ГБ при стандартизированном подходе к лечению при метилировании промотора MGMT составляет 21 месяц, при отсутствии – 14 месяцев [3], а при его уровне более 10% отмечена большая восприимчивость к темозоломиду [4].

Не менее прогностически значимым является и наличие мутации в генах IDH1/2, которые встречаются в 10% ГБ [4] и независимо от степени злокачественности являются предиктором лучшего ответа на комплексную терапию. Так, в ряде работ отмечено, что пациенты с ГБ при комплексном подходе к лечению и наличии мутации IDH имеют медиану выживаемости 27,1–45,6 месяца, а без мутации – 11,3–15 месяцев [5]. Примечательно, что пациенты с ГБ IDH mt имеют лучший прогноз в сравнении с пациентами с высокодифференцированными глиальными опухолями – LGG IDH wt [5]. На основании наличия данной мутации сформулирована концепция «вторичной глиобластомы», произошедшая от опухолей Gr II–III [4], что подтверждается и их общим транскрипционным профилем [6]. Сочетание мутации в генах IDH1 или IDH2 и метилирования MGMT отмечается в 73% случаев, а при отсутствии мутации метилирование MGMT выявляется в 43% случаев [7, 8].

Агрессивное диффузное распространение опухоли стимулируется и поддерживается формированием микроокружения, способствующего пролиферации опухоли, разрушению внеклеточного матрикса, развитию неоангиогенеза и иммуносупрессии. Возможно, оценка локального содержания цитокинов наряду с гистологическими и молекулярно-генетическими предикторами может оказаться одним из прогностически значимых факторов.

Цель исследования: изучение изменений цитокинового состава в ткани различных гистологических и молекулярно-генетических подтипов глиальных опухолей.

Материалы и методы исследования. В исследовании приняли участие 49 пациентов. В основную группу вошли 34 пациента с впервые выявленной супратенториальной глиальной опухолью: 20 мужчин (средний возраст 52 года) и 14 женщин (средний возраст 54 года). Контрольную группу составили 15 пациентов с впервые выявленной супратенториальной менингиомой, из них 5 мужчин (средний возраст 67 лет) и 10 женщин (средний возраст 59 лет). Критерии включения в исследование: возраст старше 18 лет, впервые выявленная опухоль ЦНС, отсутствие курсов лучевой терапии и химиотерапии в предоперационном периоде. От всех пациентов получено добровольное согласие на участие в исследовании. На проведение исследования получено разрешение этического комитета института.

Всем пациентам выполнена операция – субтотальное удаление опухоли с применением микронейрохирургической техники, флюоресцентной навигации. В зависимости от локализации опухоли и функционально значимых зон головного мозга применялся нейрофизиологический мониторинг. Во время операции у пациентов основной группы проводился забор опухолевой ткани, а у пациентов контрольной группы – прилежащего к менингиоме неизмененного мозгового вещества в функционально незначимой зоне. В послеоперационном периоде у пациентов с менингиомами нарастания неврологического дефицита не отмечено.

Образцы опухолевой ткани и мозгового вещества подвергали механическому дроблению с последующим помещением полученного материала в одноразовый механический дезагрегатор (Medicon, USA) с разделенными экранами на 35 мкм, 50 мкм. Далее добавляли 2 мл промывочного раствора для клеток (Cellwash) с последующим помещением в дезинтегратор ткани BD Medimachine (США) и гомогенизацией в течение 30–60 с. Полученные гомогенизированные ткани центрифугировали на скорости 1500 об/мин в течение 4 мин. В супернатанте с помощью ИФА с применением тест-систем «Вектор-Бест» (Новосибирск, Россия) рассчитывали концентрацию следующих цитокинов: ФНО- α , ИЛ-1 β , ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10, ИФН- α , ИФН- γ . Количественную оценку полученных результатов проводили на анализаторе иммуноферментных реакций АИФР-01 (УНИПЛАН, Россия). Результаты выражали в виде удельного содержания – в пересчете на 1 г белка гомогената, оцениваемого биуретовым методом (пг/мл/г белка), с использованием наборов «Общий белок Ольвекс» («Ольвекс-диагностикум», Россия) в соответствии с инструкцией фирмы-производителя. Результаты реакции оценивали на полуавтоматическом биохимическом анализаторе BS-3000P (Sinnova Medical Science & Technology Co., КНР).

Гистологическое подтверждение опухоли осуществляли методом микроскопии в соответствии с патоморфологической классификацией опухолей ЦНС ВОЗ 2016 [2].

Иммуногистохимическое (ИГХ) исследование проводили с использованием стейнера BenchMark ULTRA Ventana с применением соответствующих антител.

Для выявления молекулярно-генетических aberrаций тотальную ДНК из ткани глиальной опухоли выделяли методом фенол-хлороформной экстракции. Для определения уровня метилирования промотора MGMT проводили бисульфитную конверсию ДНК. Количественное метилирование CpG сайтов промотора оценивали методом пиросеквенирования с применением системы генетического анализа PyroMark Q24 (Qiagen, Germany) в соответствии с рекомендациями производителя. Мутантный статус генов IDH1/2 определяли методом RT-PCR с использованием набора IDH1/2 RGQ PCR Kit (Qiagen, Германия) и прибора Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия).

Статистическую обработку полученных результатов осуществляли с помощью программы STATISTICA 13 (StatSoftInc., США). Учитывая ненормальное распределение полученных данных, результаты представили в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха – 25-го и 75-го перцентилей (Me [LQ; UQ]). Достоверность отличий между выборками определяли с использованием непараметрического критерия Манна–Уитни и считали значимой при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение. Среди 34 пациентов с глиальными опухолями у 4 при гистологическом и ИГХ анализах верифицирована диффузная астроцитома Gr II (11,8%), у 4 – AA Gr III (11,8%) и у 26 – ГБ Gr IV (76,4%). У 15 пациентов с менингиомой верифицированы различные гистологические варианты Gr I.

При анализе содержания цитокинов в супернатанте высокодифференцированных глиальных опухолей и неизмененного мозгового вещества статистически значимых отличий не выявлено. Отсутствие изменений в локальном цитокиновом микроокружении, по всей вероятности, может свидетельствовать о «невидимости» опухоли для иммунной системы, посредством чего создаются благоприятные условия для дальнейшего роста и малигнизации. В то же время при формировании HGG имеются статистически достоверные отличия в содержании ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10, ФНО- α в сравнении с неизмененным мозговым веществом, указывающие на разнонаправленное изменение секреции провоспалительных цитокинов и пониженную секрецию противовоспалительных в ткани HGG (табл.). Изменения содержания ИЛ-1 β , ИФН- α , ИФН- γ статистически недостоверны.

Цитокиновый состав супернатанта низкодифференцированных глиальных опухолей и неизмененного мозгового вещества, Me [LQ; UQ]

Образцы тканей	Ил-2	Ил-4	Ил-6	Ил-8	Ил-10	ФНО- α
----------------	------	------	------	------	-------	---------------

	(пг/мл/г белка)	(пг/мл/г белка)	(пг/мл/г белка)	(пг/мл/г белка)	(пг/мл/г белка)	(пг/мл/г белка)
HGG n=30	8,1 (6,1; 12,4)	0,8 (0,4; 1,5)	27,6 (2,5; 51,6)	71,1 (31,7; 122,8)	2,7 (1,8; 3,9)	2,9 (2,2; 5,0)
Неизмененн ое мозговое вещество n=15	30,2 (20,4; 49,5)	3,0 (2,1; 7,4)	0 (0; 1,5)	1,6 (0,7; 3,7)	7,6 (3,9; 8,7)	6,3 (4,9; 9)
P	0,0005	0,004	0,0003	0,00005	0,018	0,0035

Статистически достоверных отличий в содержании цитокинов у пациентов с АА и ГБ независимо от молекулярно-генетических особенностей не выявлено.

При изучении статуса мутации в генах IDH1/2 у пациентов с HGG (n=30) выявлено 3 (10%) с мутацией в гене IDH1 и 27 (90%) без мутации. При изучении цитокинового состава супернатанта данных двух групп, несмотря на малочисленность пациентов с мутацией, выявлены статистически достоверные отличия в содержании ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-8. У больных с наличием мутации в гене IDH1 тканевой уровень ИЛ-4 был в 32 раза выше, чем у больных без мутации: 25,3 (13,1; 28,2) против 0,8 (0,4; 1,3). При этом уровни ИЛ-6 и ИЛ-8, напротив, были ниже: ИЛ-6 в 33 раз: 0 (0; 8,2) против 33,0 (4,4; 54,1); ИЛ-8 в 249 раз: 0,35 (0,3; 19,6) против 87,3 (37,3; 125,2) (рис. 1). В литературе имеются лишь сообщения о повышении содержания ИЛ-6 в ГБ IDH wt. [9]. Таким образом, комплексная оценка содержания ИЛ-4; ИЛ-6; ИЛ-8 в опухолевой ткани HGG может являться важным прогностическим критерием чувствительности к комплексному лечению.

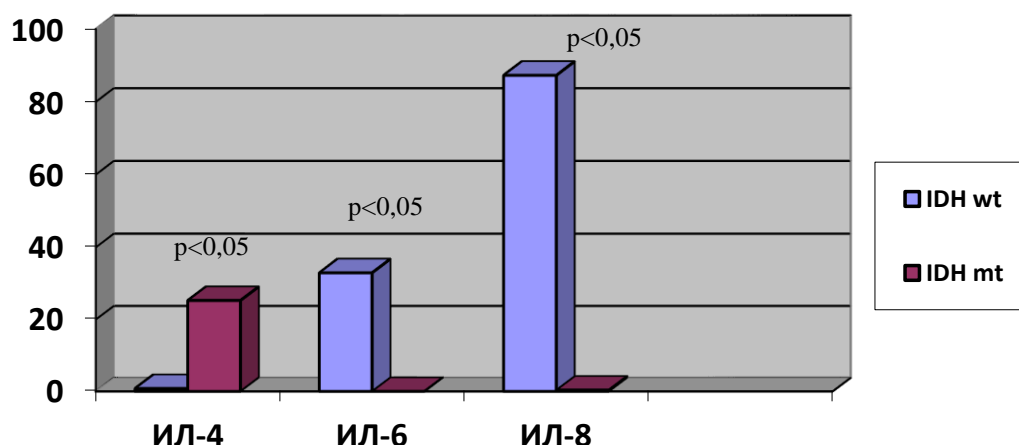


Рис. 1. Содержание ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-8 в HGG в зависимости от статуса мутации гена IDH.

Ось Y – пг/мл/г

Наряду с определением статуса мутации генов IDH1/2 не менее важным является определение уровня метилирования промотора MGMT. При анализе литературы остается

дискутабельным вопросом определения порога чувствительности к терапии алкилирующими препаратами, который варьирует в интервале 9–12,5%. Большинство авторов порогом чувствительности считают уровень в 10% [10], который нами и был использован. В группе пациентов с HGG метилирование промотора MGMT выполнено 30 пациентам, при этом у 9 пациентов (30%) выявлен уровень метилирования $\leq 10\%$ и у 21 пациента (70%) более 10%.

При анализе содержания цитокинов нами обнаружено статистически достоверное отличие в содержании ИЛ-1 β . Так, в опухолях с низким уровнем метилирования MGMT медиана значений ИЛ-1 β составила 2,8 (2,0; 5,0) против 5,1 (3,9; 12,1) при высоком уровне данного показателя (рис. 2).

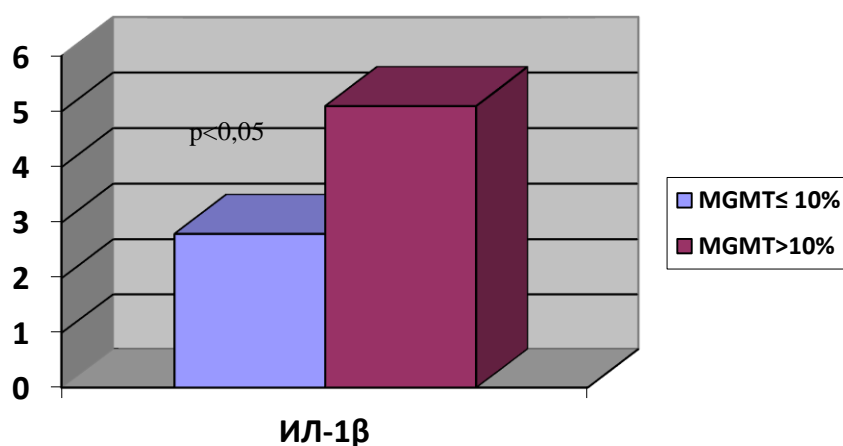


Рис. 2. Содержание ИЛ-1 β в зависимости от уровня метилирования промотора MGMT. Ось Y – нг/мл/г

Таким образом, оценка содержания уровня ИЛ-1 β в ткани HGG наряду с уровнем метилирования промотора MGMT также может служить критерием чувствительности к химиотерапии алкилирующими препаратами.

Несмотря на многочисленные исследования генетических, метаболических, иммунологических особенностей HGG в зависимости от статуса мутации генов IDH1/2 и метилирования MGMT, ведущий фактор таких отличий остается неясным. Опубликованные данные об иммунологическом микроокружении IDH mt и IDH wt свидетельствуют о том, что оно модулируется 2-гидроксиглутаратом (2-HG), присутствующим внеклеточно в IDH mt глиомах, по-видимому, с помощью прямых (проникновение 2-HG в Т-клетки с нарушением их функции) и непрямых (снижение экспрессии хемокинов, привлекающих Т-клетки) механизмов [11]. В HGG без мутации в генах IDH1/2 содержится больше TILs и наблюдается более высокая экспрессия PD-L1, что, казалось бы, противоречит их менее благоприятному клиническому течению [12].

Высказываются предположения о возможной роли других иммунокомпетентных клеток (миелоидного и макрофагального ряда), которые являются продуцентами различных

биологически активных веществ, таких как цитокины, хотя и сами глиальные клетки, являясь аналогами макрофагов, способны к их продукции.

В последнее время большое внимание уделяется регуляторной функции ИЛ-4, содержащегося в ткани мозга, где он, взаимодействуя с рецепторами и изменяя активность различных сигнальных путей, модулирует активность других цитокинов, играет значительную роль при различной патологии ЦНС, в том числе при глиомах. В литературе упоминаются такие проявления его активности, как угнетение неоангиогенеза и поляризации макрофагов из M1 в M2, стимуляция экспрессии на клетках микроглии рецептора дендритных клеток CD11c и MHC II, ингибирование роста ксенографта глиомы, и, хотя эти эффекты показаны на клеточных и экспериментальных моделях, они свидетельствуют о его противоопухолевых свойствах [13]. Значительно более высокие тканевые уровни ИЛ-4 при глиомах IDH mt по сравнению с IDH wt, видимо, говорят о более высокой сохранности опосредуемых этим цитокином иммунных и неиммунных функций микроокружения.

Научный и клинический интерес к гену MGMT возник в связи с развитием химиотерапии препаратами алкилирующей группы. Темозоломид способствует соединению алкилирующей группы с тиминном и гуанином, тем самым вызывая повреждение ДНК опухолевой клетки, инициируя апоптоз [14]. Ген MGMT кодирует фермент MGMT (O⁶-метилгуанин-ДНК-метилтрансфераза), основная функция которого сводится к репарации поврежденной ДНК. Таким образом, наличие метилирования гена MGMT (или низкий уровень его экспрессии в опухолевых клетках) приводит к снижению активности фермента и закономерному снижению репарационных процессов, что и является основой эффективности терапии алкилирующими агентами и увеличивает медиану выживаемости пациентов [3, 4].

Полученные нами данные о цитокиновом составе HGG в зависимости от уровня метилирования промотора MGMT свидетельствуют о роли ИЛ-1 β . Поскольку высокая экспрессия MGMT связана с резистентностью клеток глиомы к темозоломиду, а ее снижение способствует повышению чувствительности к нему, как показано в опытах *in vitro* и *in vivo* [15], описанный нами локальный состав цитокинов может рассматриваться как один из механизмов формирования химиорезистентности HGG.

Заключение. Итак, несмотря на относительно небольшие когорты обследованных нами пациентов, были получены убедительные различия локального цитокинового состава неизмененного мозгового вещества и ткани HGG, а также различных молекулярно-генетических подтипов последних. При отсутствии возможности определения молекулярно-генетических особенностей опухоли определение локального цитокинового состава может являться предиктором течения низкодифференцированных глиальных опухолей и чувствительности к химиотерапии темозоломидом. HGG с наличием мутации в гене IDH1 и

обладающие лучшим клиническим ответом на комплексное лечение характеризуются повышенным содержанием ИЛ-4 и пониженным – ИЛ-6, ИЛ-8, а определение уровня ИЛ-1 β в ткани опухоли может служить критерием определения схемы химиотерапии в послеоперационном периоде. Так, повышение данного интерлейкина сочетается с уровнем метилирования промотора MGMT >10% и предполагает лучшую чувствительность к темозоломиду.

Перечень сокращений

CBTRUS – Central Brain Tumor Register of the United States of America

HGG – high grade glioma

IDH – isocitrate dehydrogenase

mt – mutant type

TIL – tumor-infiltrating lymphocytes

wt – wild type

АА – анапластическая астроцитома

ГБ – глиобластома

ИЛ (IL) – интерлейкин

ИНФ – интерферон

ФНО – фактор некроза опухоли

Список литературы

1. Davis M.E. Epidemiology and Overview of Gliomas. *Semin Oncol Nurs.* 2018. vol. 34. no 5. P. 420-429.
2. Louis D.N, Ohgaki H., Wiestler O.D., Cavenee W.K. WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System, Revised. 4th Ed. IARC (Lyon). 2016.
3. Scheie D., Kufaishi H.H.A., Broholm H., Lund E.L., de Stricker K., Melchior L.C., Grauslund M. Biomarkers in tumors of the central nervous system – a review. *APMIS.* 2019. vol. 127. no 5. P. 265-287.
4. Кобяков Г.Л., Абсалямова О.В., Поддубский А.А., Лодыгина К.С., Кобякова Е.А. Классификация ВОЗ первичных опухолей центральной нервной системы 2016 г.: взгляд клинициста // *Вопросы нейрохирургии* 2018. № 3. С. 88-96.
5. Ahmadipour Y., Jabbarli R., Gembruch O., Pierscianek D., Darkwah Oppong M., Dammann P., Wrede K., Özkan N., Müller O., Sure U., El Hindy N. Impact of multifocality and molecular markers on survival of glioblastoma. *World Neurosurg.* 2019. vol. 122. P. 461-466.
6. Gvaldin D.Y., Pushkin A.A., Timoshkina N.N., Rostorguev E.E., Nalgiev A.M., Kit O.I.

Integrative analysis of mRNA and miRNA sequencing data for gliomas of various grades. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics*. 2020. vol. 21. P. 73.

7. Cohen A.L., Colman H. Glioma biology and molecular markers. *Cancer Treat Res*. 2015. vol. 163. P. 15-30.

8. Кит О.И., Водолажский Д.И., Росторгуев Э.Е., Франциянц Е.М., Панина С.Б. Молекулярно-генетические маркеры глиом // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2017. Т. 35 № 4. С. 132-140.

9. Jiang Y., Han S., Cheng W., Wang Z., Wu A. NFAT1-regulated IL6 signalling contributes to aggressive phenotypes of glioma. *Cell Commun Signal*. 2017. vol. 15. no. 1. P. 54.

10. Gurrieri L., De Carlo E., Gerratana L., De Maglio G., Macerelli M., Pisa F., Masiero E., Aprile G., Follador A., Puglisi F., Fasola G., Rizzato S., Pizzolitto S. MGMT Pyrosequencing-Based Cut-Off Methylation Level and Clinical Outcome in Patients With Glioblastoma Multiforme. *Future Oncol*. 2018. vol. 14. no. 8. P. 699-707.

11. Richardson L.G., Choi B.D., Curry W.T. (R)-2-hydroxyglutarate drives immune quiescence in the tumor microenvironment of IDH-mutant gliomas. *Transl Cancer Res*. 2019. vol. 8. no 2. P 167-170.

12. Bunse L., Pusch S., Bunse T., et al. Suppression of antitumor T cell immunity by the oncometabolite (R)-2-hydroxyglutarate. *Nat Med*. 2018. vol. 24. P. 1192-1203. DOI: 10.1038/s41591-018-0095-6.

13. Gadani S.P., Cronk J.C., Norris G.T., Kipnis J. Interleukin-4: A Cytokine to Remember. *J. Immunol*. 2012. vol. 189. no. 9. P. 4213-4219.

14. Patel M., Vogelbaum M.A., Barnett G.H., Jalali R., Ahluwalia M.S. Molecular targeted therapy in recurrent glioblastoma: current challenges and future directions. *Expert Opin Investig Drugs*. 2012. vol. 21. no. 9. P. 1247-1266.

15. Chia-Kuang Tsai, Li-Chun Huang, Yi-Ping Wu, I-Ying Kan, Dueng-Yuan Hueng. SNAP reverses temozolomide resistance in human glioblastoma multiforme cells through down-regulation of MGMT. *The FASEB Journal*. 2019. vol. 33. no. 12. P. 14171-14184.