



DOI 10.56618/20712693_2022_14_4_64

ВИЗУАЛИЗАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА СТРУКТУРЫ МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК КАК ИНСТРУМЕНТ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА МОЛЕКУЛЯРНОЙ КЛАССИФИКАЦИИ ОПУХОЛЕЙ ЦНС

Е. И. Петрова, С. А. Галстян, Е. Н. Тельшева, М. В. Рыжова

Федеральное государственное автономное учреждение «НМИЦ нейрохирургии им. Н. Н. Бурденко»
Министерства Здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

РЕЗЮМЕ. Ввиду высокой значимости оценки структуры метилирования генома для достоверного определения классов опухолей ЦНС, анализ ДНК с использованием специальных микрочипов постепенно входит в рутинную практику патоморфологической диагностики. Согласно новой версии классификации опухолей ЦНС ВОЗ (5-е издание), в морфологический диагноз рекомендовано включать результаты молекулярно-генетических исследований и учитывать современные представления о профилях метилирования ДНК, характерных для различных классов опухолей.

Для интерпретации данных метилирования ДНК, извлекаемых из биопсийного материала, созданы автоматизированные платформы-классификаторы опухолей на основе алгоритмов машинного обучения. Будучи полезными во многих случаях, эти классификаторы также имеют ограничения и не всегда выдают заключение о метилиционном классе опухоли из-за гетерогенности образца или отсутствия похожих образцов в контрольной группе. Преодолеть эти ограничения можно, внедряя дополнительные графические методы анализа биологических данных, позволяющие отслеживать сходство между метилиционными профилями опухолей и свидетельствовать в пользу определённого диагноза.

В данной работе мы демонстрируем разработанный нами интерактивный инструмент для визуализации данных метилирования ДНК, дающий возможность отобразить степень сходства и распределение по группам для всех образцов опухолей ЦНС, имеющихся в нашей базе данных (n=470), а также сопоставлять гистологические заключения с молекулярными классами. Описанный подход может послужить дополнительным источником информации в работе врача-морфолога и призван повысить качество диагностики в тех случаях, когда иные методы дают неполную или противоречивую картину.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: опухоли центральной нервной системы, молекулярная диагностика, эпигенетика опухолей, классификация опухолей, метилирование ДНК, Illumina EPIC Human Methylation microarray

Список сокращений:

ЦНС — центральная нервная система, ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота, ВОЗ — Всемирная организация здравоохранения, CpG — цитозин-фосфат-гуанин

Для цитирования: Петрова Е. И., Галстян С. А., Тельшева Е. Н., Рыжова М. В. Визуализация результатов анализа структуры метилирования ДНК как инструмент контроля качества молекулярной классификации опухолей ЦНС. Российский нейрохирургический журнал им. проф. А. Л. Поленова. 2022;14(4):64–70. DOI 10.56618/20712693_2022_14_4_64

VISUALIZATION OF DNA METHYLATION PROFILING DATA AS A QUALITY CONTROL TOOL FOR MOLECULAR CLASSIFICATION OF CNS TUMORS

E. I. Petrova, S. A. Galstyan, E. N. Telysheva, M. V. Ryzhova

Federal State Autonomous Institution «N. N. Burdenko National Medical Research Center of Neurosurgery»
of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

ABSTRACT. Considering the importance of genome methylation profile assessment in distinguishing molecular classes within different types of cancer, microarray-based DNA methylation analysis has become routine in modern pathomorphological diagnosis of CNS tumors.

The most recent version (5th edition) of the WHO classification of CNS tumors includes current consensus about DNA methylation-based molecular groups. It is advised that morphological diagnosis should take methylation studies into account since this information is important for risk stratification, prognosis, treatment strategy, as well as for enrollment in clinical trials.

Novel computational tools — machine learning-based online tumor classifiers — were designed to facilitate easier interpretation of DNA methylation data and increase diagnostic precision. While being a valuable resource in many cases, the existing online classifiers still have limitations and are not always conclusive about tumor methylation classes due to

individual sample features or lack of similar samples in the reference cohort. Addressing these limitations is possible by introducing additional graphical methods of methylation data analysis, which would confirm the correspondence between methylation profiles in tumor subgroups and support evidence for a particular diagnosis.

In this work, we demonstrate an interactive tool we developed to visualize the results of DNA methylation analysis, compare histological findings with molecular classes and check the similarities between various tumor types for 470 CNS tumor samples available in our database. This tool provides a beneficial option for a morphologist to achieve a better quality diagnosis in controversial cases where other methods are insufficient or misleading.

KEY WORDS: central nervous system tumors, brain tumors, cancer diagnostics, cancer epigenetics, tumor classification, DNA methylation, Illumina EPIC Human Methylation microarray

List of abbreviations: CNS — central nervous system, DNA — deoxyribonucleic acid, WHO — World Health Organization, CpG — cytosine-phosphate-guanine

For citation: Petrova E. I., Galstyan S. A., Telysheva E. N., Ryzhova M. V. Visualization of DNA methylation profiling data as a quality control tool for molecular classification of CNS tumors. *Rossiiskii neirokhirurgicheskii zhurnal imeni professora A. L. Polenova*. 2022;14(4):64–70. DOI 10.56618/20712693_2022_14_4_64

Введение. Классификация и точная морфологическая диагностика опухолей ЦНС представляют особую сложность ввиду их разнообразия на молекулярном уровне [1, 2]. Внедрение молекулярно-генетических исследований на этапе патоморфологической диагностики позволяет достоверно и детально дифференцировать опухоли ЦНС и предоставить онкологам, нейрохирургам, химио- и лучевым терапевтам важную информацию для более эффективной оценки прогноза и выбора тактики лечения, а также расширить возможности для применения таргетной терапии, проведения научных исследований и включения пациентов в протоколы международных клинических испытаний [3, 4].

Актуальная версия классификации опухолей ЦНС, изданная ВОЗ в 2021 году составлена с учётом современных научных представлений о молекулярно-генетических различиях опухолей и включает большое количество новых классов [5]. Для опухолей, ранее считавшихся однородными на основании гистологической картины, были выделены новые группы и подгруппы, ассоциированные с различными перестройками на уровне молекулярной структуры [6]. Согласно текущему консенсусу, ключевую роль в идентификации опухолей ЦНС в клинике сегодня играет исследование глобальной структуры метилирования ДНК (профиль метилирования ДНК, или метилиационный класс) [7].

Метилирование ДНК — это обратимая модификация генома клетки, при которой происходит присоединение метильных групп к цитозину в определённых участках ДНК, преимущественно в области CpG-динуклеотидов. Было показано, что здоровые ткани разных органов и опухоли разных типов имеют уникальные профили метилирования ДНК (расположение и процент всех метилированных CpG-динуклеотидов), по которым возможна их достоверная идентификация [8, 9].

В основе большинства современных методов исследования статуса метилирования ДНК лежит преобразование первичной последовательности путём бисульфитной конверсии с последующим считыванием сигнала от метилированных и неметилированных

CpG-участков [10]. При этом существуют способы как определения локального статуса метилирования конкретного интересующего гена (например, области промотора MGMT), так и анализа структуры метилирования генома в целом. Среди последних наиболее распространена технология с использованием ДНК-микрочипов, специфичных к CpG-участкам, таких как Illumina EPIC Human Methylation microarray, покрывающий 850 тыс. CpG динуклеотидов [11, 12].

Данные метилирования ДНК образцов опухолей, полученные из материалов биопсии с помощью микрочипов, далее обрабатываются и интерпретируются с помощью автоматизированных вычислительных методов, таких как классификаторы опухолей ЦНС, представленные на платформе <https://www.molecularneuropathology.org/>. Работа данного ресурса основана на алгоритме машинного обучения random forest и позволяет с высокой достоверностью определять класс опухоли по статусу метилирования ДНК опухолей на основании информации, полученной из большой когорты контрольных образцов [3]. Классификатор постоянно обновляется, и последняя версия его (MNP brain classifier version 12.5 от 26.01.22) способна различать через данные метилирования ДНК уже более 180 классов и подклассов опухолей ЦНС. Описывая принцип работы классификатора, авторы отмечают, что в ~5 % случаев он не находит достаточного соответствия образца какому-либо классу, в частности, из-за технических аспектов на этапе пробоподготовки, а также в случаях, когда исследуемый образец содержит редкие малоизученные мутации. Важно отметить, что контрольная когорта, используемая для обучения модели классификатора, не содержит «спорных» образцов опухолей [3].

Учитывая ограничения применения автоматизированных классификаторов, следует обратить внимание на возможность перепроверить результаты и оценить имеющиеся биологические данные, используя другие доступные нам подходы современной биоинформатики. При наличии достаточной когорты образцов ДНК опухолей можно собрать их в единый набор данных и провести его визуальный анализ, приме-

нив один из математических методов снижения размерности и перевода из многомерного пространства в двумерное. Наиболее значимыми примерами являются алгоритмы стохастического вложения соседей с *t*-распределением (англ. *t*-distributed Stochastic Neighbor Embedding, *t*-SNE) [13] и UMAP (Uniform Manifold Approximation and Projection) [14]. Нелинейные алгоритмы минимизации и визуализации сегодня широко применяются для анализа многомерных геномных, эпигеномных и транскриптомных данных, позволяя эффективно выявить значимые различия внутри когорты и группировать исследуемые образцы в соответствии с их ключевыми биологическими характеристиками [15].

Цель работы — разработать инструмент для интерактивной визуализации когорты данных метилирования ДНК, позволяющий проводить оценку сходства образцов опухолей ЦНС различных групп и повысить качество морфологической диагностики в тех случаях, когда молекулярный класс опухоли не удалось достоверно определить другими методами.

Материалы и методы. В настоящей работе использованы данные метилирования ДНК, выделенные из 470 образцов (замороженной ткани или парафиновых блоков) опухолей ЦНС пациентов, находившихся на лечении в НМИЦ нейрохирургии им. Н. Н. Бурденко. Образцы ДНК подготовлены с помощью набора Infinium MethylationEPIC BeadChip Kit и отсканированы на платформе Illumina Next-Seq 550 Sequencing System.

Для каждого из представленных образцов была проведена предварительная гистологическая оценка материала, а также анализ результатов метилирования ДНК на онлайн-платформе классификатора опухолей ЦНС MNP brain classifier version 11b4/12.3/12.5 ©MolecularNeuroPathology.org.

Параллельно с этим, исходные данные об интенсивности сигнала, сгенерированные на приборе Illumina (IDAT-файлы), были обработаны с использованием библиотеки Bioconductor minfi (v.1.42.0) для языка программирования R [16]. В соответствии с рекомендациями производителя микрочипов Illumina, последовательно выполнены фоновая поправка, квантильная нормализация между образцами и подсчёт скорректированных Beta-значений уровней интенсивности сигнала на метилированных и неметилированных CpG-участках. Значения интенсивности сигналов метилирования для всех 470 образцов опухолей объединены в общий набор данных, и для дальнейших этапов анализа и визуализации созданы выборки, включающие по 5000, 10000 и 25000 CpG-участков с наибольшей вариабельностью метилирования ДНК, согласно предыдущему опыту исследователей классификации опухолей ЦНС [3]. Для каждой пары образцов в выборке произведён расчёт линейных коэффициентов корреляции Пирсона, как меры степени взаимосвязи образцов в исходном многомерном пространстве. Дальнейшее нелинейное снижение размерности данных было проведено с ис-

пользованием алгоритмов *t*-SNE и UMAP, получены координаты для представления результатов анализа структуры метилирования ДНК на плоскости. Наконец, выполнена визуализация обработанного набора данных в виде точек на диаграммах рассеяния (scatter plot) в координатах tSNE/UMAP.

Для удобной оценки и интерпретации полученных графиков, результаты расчёта для полного набора данных из 470 образцов, наряду с дополнительной информацией о гистологической оценке и результатах анализа в онлайн-классификаторе MNP, были интегрированы в интерактивное веб-приложение, разработанное нами специально для этой цели с помощью библиотеки R Shiny (<https://shiny.rstudio.com>).

Результаты. Интерактивное веб-приложение, демонстрирующее результат обработки и визуализации когорты данных метилирования ДНК, доступно для пользователя на локальном компьютере через веб-браузер. При запуске графического интерфейса приложения сразу подгружаются результаты расчёта всех координат необходимых для построения tSNE/UMAP диаграммы. На Рисунке 1 показан общий вид интерфейса приложения при запуске: на боковой панели слева пользователь может видеть информацию о количестве образцов, выделить один образец, а также выбрать метод расчёта координат (tSNE или UMAP) и количество наиболее вариабельных CpG-участков (5000–25000). На диаграмме на плоскости в соответствии с оптимизированными координатами размещены результаты анализа метилирования ДНК (каждая точка представляет собой один образец ДНК опухоли).

Цвета точек на представленной на Рисунке 1 диаграмме отражают метилиационные классы опухолей ЦНС, определённые для каждого образца классификатором MNP версии 11. Как можно видеть на Рисунке 1, многие точки одного цвета собираются на графике в отчётливые группы (кластеры) — это свидетельствует о том, что уровни интенсивности сигнала метилирования ДНК в исходных данных этих образцов были максимально похожи и метилиационный класс по классификатору MNP был определён корректно. Точки, отмеченные чёрным цветом, означают образцы ДНК, для которых не удалось получить достоверный ответ от онлайн-классификатора (коэффициент соответствия был ниже 0.3).

При наведении курсора мыши на точку можно увидеть информацию об образце и убедиться, что он расположен на графике по соседству с другими образцами того же молекулярного класса. Например, несколько отмеченных светло-зелёным цветом образцов, расположенных в одной группе в левом нижнем углу графика, являются пинеобластомами (Рисунок 2). По аннотации образца легко проверить, что в подобном случае, как на Рисунке 2, и гистологическая картина, и заключения обеих версий онлайн-классификатора MNP и результат tSNE-визуализации полностью совпадают.

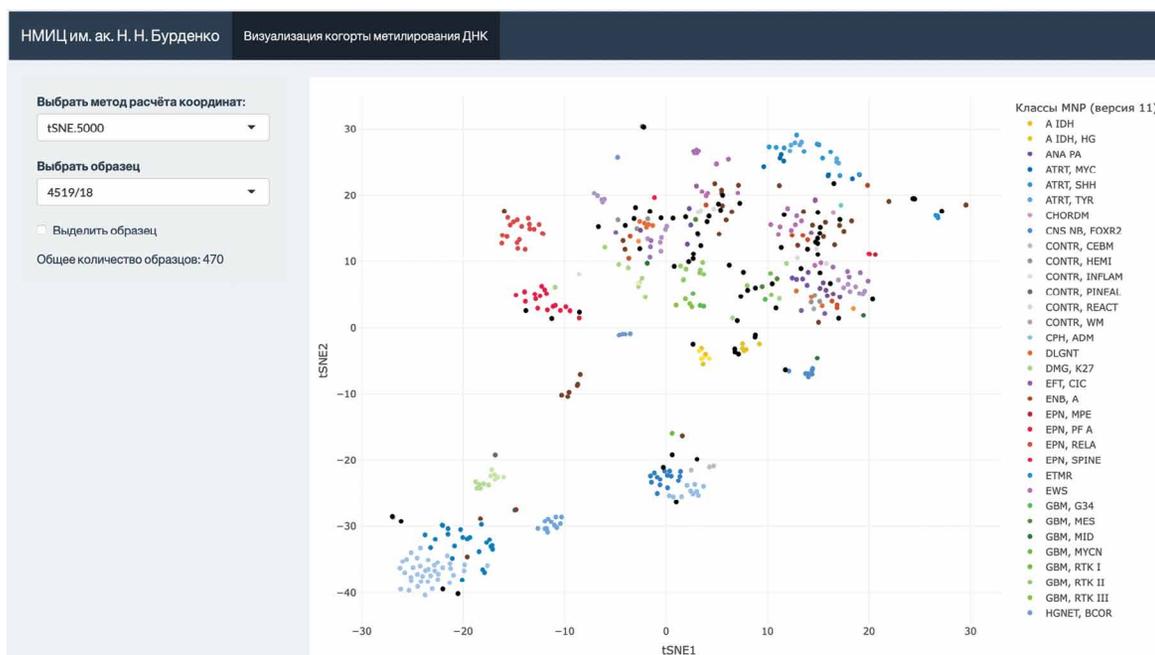


Рисунок 1. Общий вид пользовательского интерфейса приложения для визуализации результатов анализа когорты данных метилирования ДНК. Аббревиатуры классов по MNP 11 для обозначения цветов приведены в соответствии с официальным перечнем (см. Приложение).

Figure 1. Graphical user interface of the DNA methylation data visualization tool. Color code abbreviations are listed in the Supplementary.

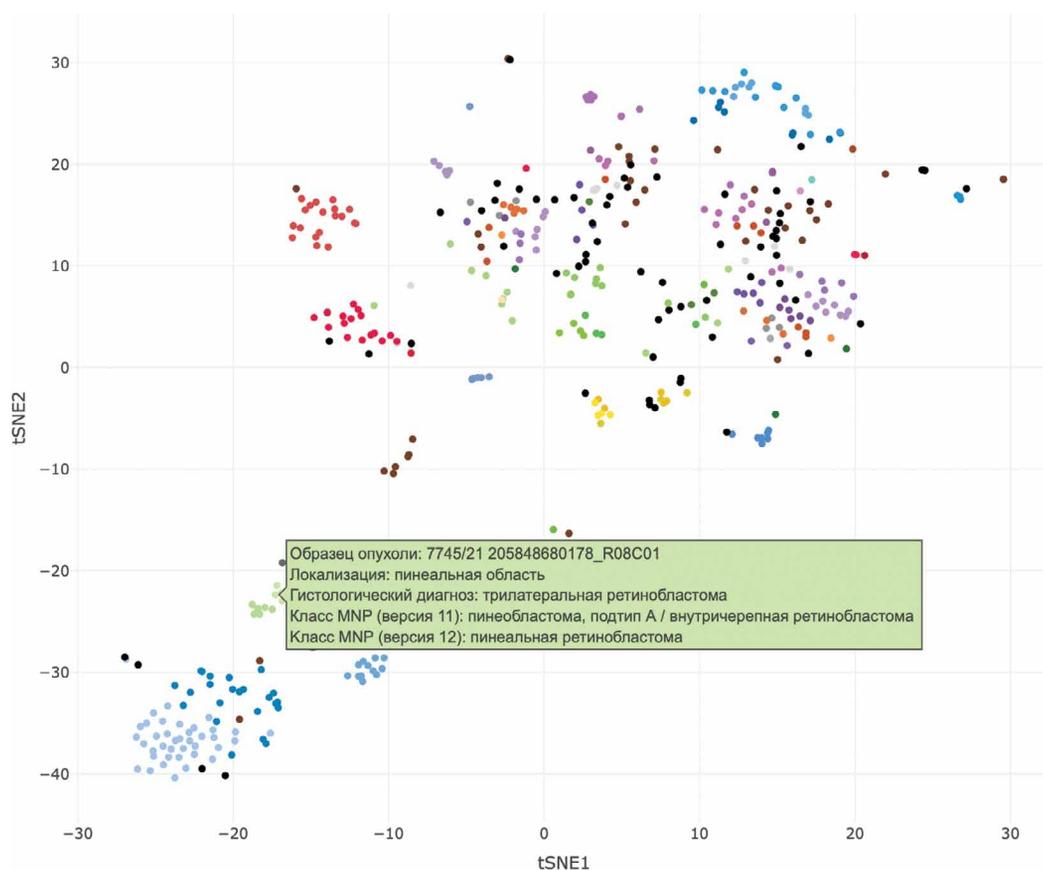


Рисунок 2. Вид интерактивного графика tSNE (n наиболее переменных CpG = 5000) при наведении курсора мыши на точку: всплывающее сообщение с дополнительной информацией об образце 7745/21. Пример совпадения гистологического диагноза, классификации по MNP и расчёта tSNE.

Figure 2. Interactive tSNE-plot (n of top highly variable CpG = 5000) display on mouse hover: a message with additional sample description. Example of agreement between histological diagnosis, MNP classification, and tSNE computation results.

С помощью данной визуализации удобно сопоставлять всю доступную информацию в случаях, когда диагноз вызывает сомнения. Например, на Рисунке 3 отмечен образец, метилиционный профиль которого был ошибочно расценен классификатором MNP v11 как шваннома (доброкачественная опухоль), в то время как по данным гистологической оценки и MNP v12 он был отнесён к классу злокачественных глиом. Анализ с помощью tSNE также указал на сходство данного образца с другими НЗК27-мутантными глиомами (группа точек зелёного цвета, окружающих выделенный образец 5519/21 на Рисунке 3) и подтвердил необходимость дополнительной проверки на наличие указанной мутации.

На Рисунке 4 отмечен образец опухоли, для метилиционного профиля которого классификатор MNP не определил класс. Локализация и гистологическая оценка опухоли в данном случае свидетельствовали в пользу медуллобластомы, а анализ на tSNE графике подтвердил сходство данного образца с другими медуллобластомами из группы SHH.

Заключение. В данной работе мы демонстрируем, что разработанный нами инструмент для интерактивной визуализации результатов анализа когорты данных метилирования ДНК на основе алгоритмов tSNE и UMAP, позволяет врачу-патоморфологу из-

влекать дополнительную полезную информацию из доступных ему результатов молекулярного исследования, наглядно оценить сходство образцов опухолей различных групп, направить диагностический поиск и повысить качество морфологической диагностики в спорных случаях, когда гистологическая оценка и другие существующие методы дают противоречивые результаты и не позволяют с уверенностью идентифицировать опухоль.

По нашему мнению, представленный метод визуализации и анализа данных метилирования ДНК опухолей является перспективным и заслуживает дальнейшего развития и исследования. Наглядность и точность визуализации будет расти по мере добавления новых образцов и внешних контрольных наборов данных (ранее верифицированных в других исследованиях) для детального сравнения. Интерактивное приложение, на основе которого реализована визуализация, легко расширить и дополнить новыми функциями, например, автоматизировать этап добавления новых образцов, отобразить коэффициент соответствия метилиционных классов, включить расчёт и визуализацию количественных изменений ДНК (англ. copy number variation, CNV) и статуса метилирования отдельных генов и другую информацию, представляющую интерес для врача.

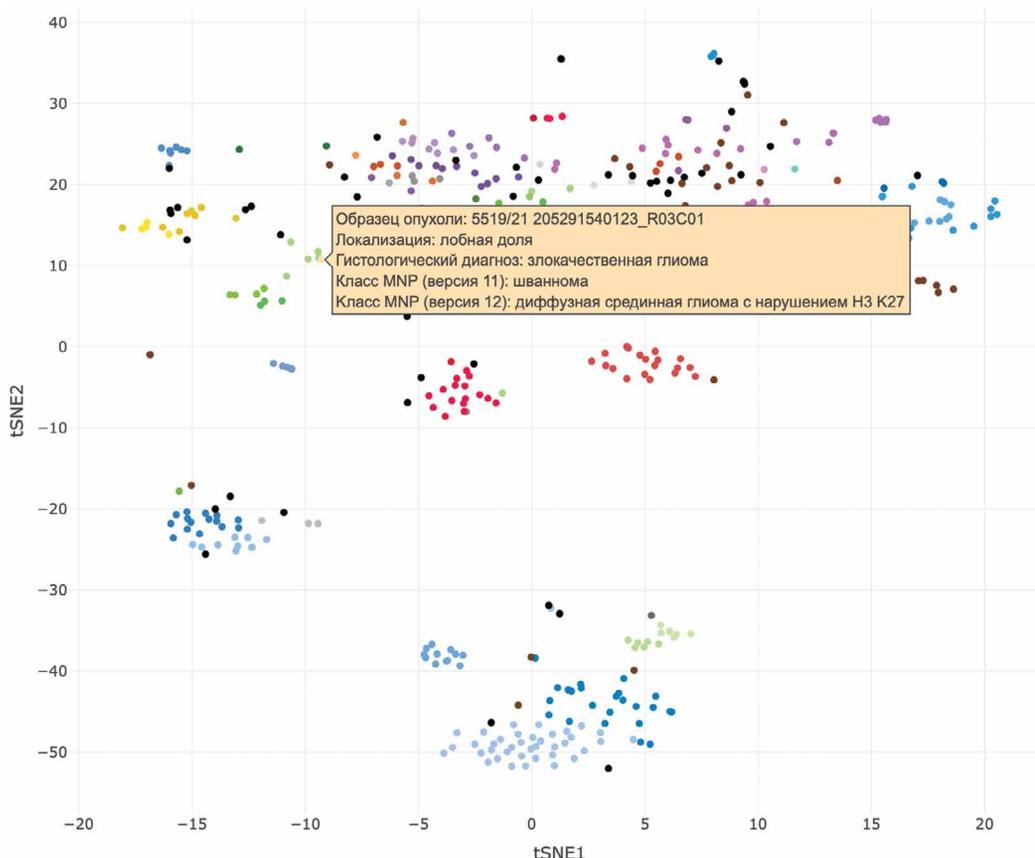


Рисунок 3. Вид интерактивного графика tSNE (n наиболее переменных CpG = 10000) при наведении курсора мыши на точку: пример согласования гистологического диагноза и расчёта tSNE, при ошибочной оценке образца 5519/21 через MNP 11-й версии.
Figure 3. Interactive tSNE-plot (n of top highly variable CpG = 10000) display on mouse hover: a message with additional sample description. Example of agreement between histologic diagnosis and tSNE analysis, in case of incorrect assessment via MNP version 11.

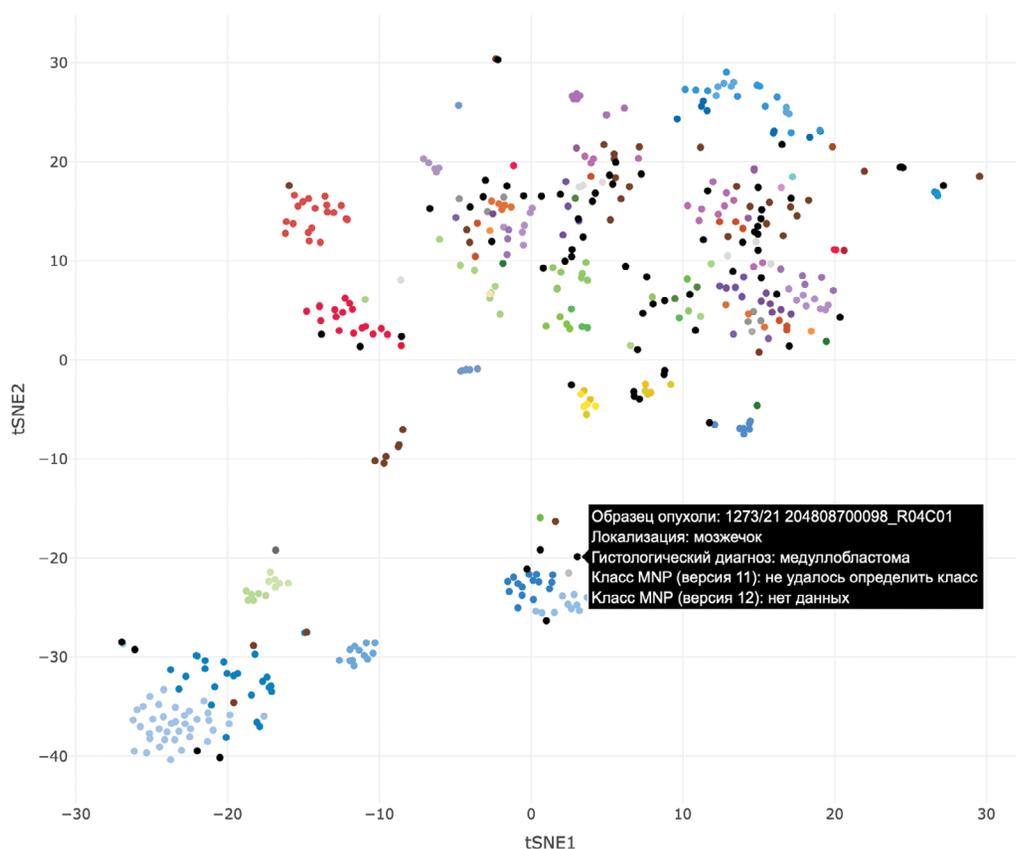


Рисунок 4. Вид интерактивного графика tSNE (n наиболее вариабельных CpG = 5000) при наведении курсора мыши на точку: пример согласования гистологического диагноза и расчёта tSNE, при невозможности классифицировать образец через MNP обеих версий.

Figure 4. Interactive tSNE-plot (n of top highly variable CpG = 5000) display on mouse hover: a message with additional sample description. Example of agreement between histological diagnosis and tSNE analysis, in case when MNP was inconclusive.

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

Финансирование. Работа поддержана Грантом Минобрнауки РФ (номер соглашения 075–15–2021–1343).

Financing. The work is funded by the Ministry of Education and Science of the Russian Federation (075–15–2021–1343).

В публикации представлены обезличенные данные пациентов. The article presents anonymized patient data.

ORCID авторов / ORCID of authors:

Петрова Екатерина Игоревна/ Petrova Ekaterina Igorevna
ORCID 0000-0003-2498-4713

Рыжова Марина Владимировна/
Ryzhova Marina Vladimirovna
ORCID 0000-0001-7206-6365

Галстян Сюзанна Андраниковна/
Galstyan Suzanna Andranikovna
ORCID 0000-0001-9953-6654

Тельешева Екатерина Николаевна/
Telysheva Ekaterina Nikolaevna
ORCID 0000-0002-0370-8667

Приложение / Supplementary

Сокращения классов по MNP (версия 11) для обозначения цветов на Рисунках 1–4:

A IDH – IDH glioma, subclass astrocytoma; A IDH, HG – IDH glioma, subclass high grade astrocytoma; ANA PA – anaplastic pilocytic astrocytoma; ATRT, MYC – atypical teratoid/rhabdoid tumor, subclass MYC; ATRT, SHH – atypical teratoid/rhabdoid tumor, subclass SHH; ATRT, TYR – atypical teratoid/rhabdoid tumor, subclass TYR; CHGL – chordoid glioma of the third ventricle; CHORDM – chordoma; CN – central neurocytoma; CNSNB, FOXR2 – CNS neuroblastoma with FOXR2 activation; CONTR, ADENOPIT – control tissue, pituitary gland anterior lobe; CONTR, CEBM – control tissue, cerebellar hemisphere; CONTR, HEMI – control tissue, hemispheric cortex; CONTR, HYPHAL – control tissue, hypothalamus; CONTR, INFLAM – control tissue, inflammatory tumor microenvironment; CONTR, PINEAL – control tissue, pineal gland; CONTR, PONS – control tissue, pons; CONTR, REACT – control tissue, reactive tumor microenvironment; CONTR, WM – control tissue, white matter; CPH, ADM – craniopharyngioma, adamantinomatous; CPH, PAP – craniopharyngioma, papillary; DLGNT – diffuse leptomeningeal glioneuronal tumor; DMG, K27 – diffuse midline glioma H3 K27M mutant; EFT, CIC – CNS Ewing sarcoma family tumor with CIC alteration; ENB, A – esthesioneuroblastoma, subclass A; ENB, B –

estheseuroblastoma, subclass B; EPN, MPE – ependymoma, мyxоpаpиllаrу; EPN, PF A – ependymoma, posterior fossa group A; EPN, PF B – ependymoma, posterior fossa group B; EPN, RELA – ependymoma, RELA fusion; EPN, SPINE – ependymoma, spinal; EPN, YAP – ependymoma, YAP fusion; ETMR – embryonal tumor with multilayered rosettes; EWS – Ewing sarcoma; GBM, G34 – glioblastoma, IDH wildtype, H3.3 G34 mutant; GBM, MES – glioblastoma, IDH wildtype,

subclass mesenchymal; GBM, MID – glioblastoma, IDH wildtype, subclass midline; GBM, MYCN – glioblastoma, IDH wildtype, subclass MYCN; GBM, RTK I – glioblastoma, IDH wildtype, subclass RTK I; GBM, RTK II – glioblastoma, IDH wildtype, subclass RTK II; GBM, RTK III – glioblastoma, IDH wildtype, subclass RTK III; HGNET, BCOR – CNS high grade neuroepithelial tumor with BCOR alteration; HGNET, MN 1 – CNS high grade neuroepithelial tumor with MN 1 alteration.

Литература/References

1. Azzarelli R, Simons BD, Philpott A. The developmental origin of brain tumours: a cellular and molecular framework. *Development*. 2018;145(10): dev162693. Published 2018 May 14. <https://doi.org/10.1242/dev.162693>
2. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2020. *CA Cancer J Clin*. 2020;70(1):7–30. <https://doi.org/10.3322/caac.21590>
3. Capper D, Jones DTW, Sill M, et al. DNA methylation-based classification of central nervous system tumours. *Nature*. 2018;555(7697):469–474. <https://doi.org/10.1038/nature26000>
4. Capper D, Stichel D, Sahm F, et al. Practical implementation of DNA methylation and copy-number-based CNS tumor diagnostics: the Heidelberg experience. *Acta Neuropathol*. 2018;136(2):181–210. <https://doi.org/10.1007/s00401-018-1879-y>
5. Louis DN, Perry A, Wesseling P, et al. The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Neuro Oncol*. 2021;23(8):1231–1251. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noab106>
6. Smith HL, Wadhvani N, Horbinski C. Major Features of the 2021 WHO Classification of CNS Tumors [published online ahead of print, 2022 May 16]. *Neurotherapeutics*. 2022;10.1007/s13311-022-01249-0. <https://doi.org/10.1007/s13311-022-01249-0>
7. Рыжова М. В., Галстян С. А., Тельшева Е. Н. Значение оценки метилирования ДНК в морфологической диагностике опухолей ЦНС. *Архив патологии*. 2022;84(3):65–75. [Ryzhova MV, Galstyan SA, Telysheva EN. Significance of DNA methylation assessment in the morphological diagnosis of brain tumours. *Archive of Pathology = Arkhiv patologii*. 2022;84(3):65–75. (In Russ.)] <https://doi.org/10.17116/patol20228403165>
8. Moore LD, Le T, Fan G. DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology*. 2013;38(1):23–38. <https://doi.org/10.1038/npp.2012.112>
9. Kristensen BW, Priesterbach-Ackley LP, Petersen JK, Wesseling P. Molecular pathology of tumors of the central nervous system. *Ann Oncol*. 2019;30(8):1265–1278. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdz164>
10. Sang F. Bioinformatics Analysis of DNA Methylation Through Bisulfite Sequencing Data. *Methods Mol Biol*. 2021;2198:441–450. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0876-0_32
11. Mansell G, Gorrie-Stone TJ, Bao Y, et al. Guidance for DNA methylation studies: statistical insights from the Illumina EPIC array. *BMC Genomics*. 2019;20(1):366. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5761-7>
12. Рыжова М. В., Тельшева Е. Н., Шайхаев Е. Г., Старовойтов Д. В., Котельникова А. О., Галстян С. А., Оконечников К. В. Современные диагностические возможности молекулярного исследования опухолей мозга в Центре нейрохирургии им. акад. Н. Н. Бурденко. *Вопросы нейрохирургии имени Н. Н. Бурденко*. 2021;85(6):98–101. [Ryzhova MV, Telysheva EN, Shaikhaev EG, Starovoirov DV, Kotelnikova AO, Galstyan SA, Okonechnikov KV. Current diagnostic methods in molecular classification of brain tumors at the Burdenko Neurosurgical Center. *Burdenko's Journal of Neurosurgery = Zhurnal voprosy neirokhirurgii imeni N. N. Burdenko*. 2021;85(6):98–101. (In Russ.)] <https://doi.org/10.17116/neiro20218506198>
13. van der Maaten L, J.P. and Hinton G. E. Visualizing High-Dimensional Data Using t-SNE. *Journal of Machine Learning Research* 9(Nov):2579–2605, 2008. https://lvdmaaten.github.io/publications/papers/JMLR_2008.pdf
14. McInnes, L., Healy, J., Melville J. UMAP: Uniform Manifold Approximation and Projection for Dimension Reduction, *ArXiv e-prints* (2018). arXiv:1802.03426v3
15. Huang H, Wang Y, Rudin C, Browne EP. Towards a comprehensive evaluation of dimension reduction methods for transcriptomic data visualization. *Commun Biol*. 2022;5(1):719. Published 2022 Jul 19. <https://doi.org/10.1038/s42003-022-03628-x>
16. Aryee MJ, Jaffe AE, Corrada-Bravo H, et al. Minfi: a flexible and comprehensive Bioconductor package for the analysis of Infinium DNA methylation microarrays. *Bioinformatics*. 2014;30(10):1363–1369. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu049>