Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Федеральный исследовательский центр фундаментальной и
трансляционной медицины»

На правах рукописи

Цидулко Александра Юрьевна

Протеогликаны как прогностические маркеры глиобластомы и их роль в развитии рецидива заболевания

03.00.04 – биохимия

Диссертация
на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:

д-р.биол.наук Григорьева Эльвира Витальевна

Новосибирск-2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ 5
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ 10
1.1. Микроокружение опухоли 10
1.1.1. Клеточный компонент микроокружения 11
1.2. Внеклеточный матрикс 13
1.3. Протеогликаны 14
1.3.1. Гликозаминогликаны 15
1.3.2. Локализация и функции протеогликанов 19
1.3.3. Внеклеточные протеогликаны 20
1.3.4. Протеогликаны базальной мембраны 25
1.3.5. Протеогликаны клеточной поверхности 27
1.3.6. Внутриклеточные протеогликаны 31
1.4. Протеогликаны в ткани головного мозга 33
1.5. Глиобластома 35
1.5.1. Терапия глиобластомы 35
1.5.2. Потенциальные молекулярные механизмы развития глиобластомы 36
1.6. Протеогликаны в глиобластоме 37
1.6.1. Коровые белки протеогликанов в глиобластоме 37
1.6.2. Гликозаминогликаны в глиобластоме 39
1.6.3. Система биосинтеза гликозаминогликанов в глиобластоме 39
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ 41
2.1. МАТЕРИАЛЫ 41
2.2. Клинические образцы тканей опухолей 44
2.3. МЕТОДЫ 46
2.3.1. Выделение суммарной РНК 46
2.3.2. Горизонтальный электрофорез нуклеиновых кислот в агарозном геле 47
2.3.3. Определение концентрации РНК 47
2.3.4. Обратная транскрипция 47
2.3.5. ПЦР в реальном времени 48
2.3.6. Dot-blot анализ 48
2.3.7. Иммуногистохимическое окрашивание 49
2.3.8. Иммунофлуоресцентное окрашивание 50
2.3.9. Культивирование клеток 50
2.3.10. Определение жизнеспособности, апоптоза и пролиферации клеток *in vitro* 51

2.3.11. Органотипическая культура срезов гиппокампа крысы *ex vivo* 52
2.3.12. Обработка органотипических срезов гиппокампа крысы химиотерапевтическими препаратами 52
2.3.13. Изменение содержания ГАГ в культуре органотипических срезов гиппокампа крысы 52
2.3.14. Совместное культивирование клеток глиобластомы с органотипическими срезами 53
2.3.15. Изучение влияния химиотерапевтических препаратов на головной мозг крыс *in vivo* 54
2.3.16. Изучение влияния химиотерапевтических препаратов на рост экспериментальных опухолей в модели рецидива глиобластомы *in vivo* 55
2.3.17. Ортотопическая ксенотрансплантация клеток U87 мышам линии SCID 56
2.3.18. Статистическая обработка результатов 57
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ 58
3.1. Протеогликаны в опухолях головного мозга человека *in vivo* 58
3.1.1. Экспрессия протеогликанов в глиомах различной степени злокачественности 58
3.1.2. Ассоциация экспрессии протеогликанов с выживаемостью пациентов с глиобластомой 59
3.2. Гликозаминогликаны в опухолях головного мозга человека *in vivo* 61
3.2.1. Хондроитинсульфат 61
3.2.2. Гепарансульфат 63
3.3. Влияние химиотерапии на пролиферацию и жизнеспособность клеток глиобластомы *in vitro* 66
3.4. Влияние химиотерапии на экспрессию ПГ в клетках глиобластомы *in vitro* 68
3.5. Влияние химиотерапии на ВКМ нормальной ткани головного мозга 70
3.6. Влияние изменений, индуцированных химиотерапией в органотипических срезах гиппокампа, на опухолевые клетки при их совместном культивировании *ex vivo* 74
3.7. Роль гликозаминогликанов ткани головного мозга в пролиферации и инвазии клеток глиобластомы U87 в системе *ex vivo* 76
3.8. Влияние изменений, индуцированных химиотерапией в ВКМ головного мозга, на рост экспериментальных опухолей *in vivo* 78
3.9. Ассоциация экспрессии ПГ с размером экспериментальных опухолей 82
Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ 84
ЗАКЛЮЧЕНИЕ 90
ВЫВОДЫ 91

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....92
СПИСОК ЦИТИРОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....94

ВВЕДЕНИЕ

Опухоли головного мозга занимают 17 место по частоте возникновения по всему миру и ежегодно диагностируется более 250 тысяч случаев таких заболеваний. Семьдесят процентов из всех опухолей мозга – это глиальные опухоли, среди которых глиобластома является наиболее агрессивным заболеванием. Несмотря на активные исследования в данной области, лечение глиобластомы по-прежнему остается малоэффективным. По данным ВОЗ, медиана выживаемости пациентов с глиобластомой составляет 4 месяца без лечения и 15 месяцев при использовании общепринятой схемы лечения. При этом для глиобластомы характерно частое возникновение рецидивов заболевания – почти у 100% пациентов развивается рецидив в течение 6-9 месяцев после хирургического удаления опухоли. Лечение глиобластомы также осложнено активной инвазией опухолевых клеток глиобластомы в окружающую нормальную ткань головного мозга.

Известно, что инвазивность опухоли зависит не только от ивазивного потенциала самих опухолевых клеток, но и от опухолевого микроокружения, включая внеклеточный матрикс (ВКМ), изменение состава и свойств которого может приводить к усилению пролиферации и инвазии опухолевых клеток. ВКМ головного мозга значительно отличается по составу от ВКМ других органов: в нем практически отсутствуют коллагены и фибронектин, а основу составляют гликозаминогликаны (ГАГ) и протеогликаны (Miyata and Kitagawa, 2017). Протеогликаны (ПГ) – это сложные белково-углеводные молекулы, состоящие из корового белка и ковалентно присоединенных одной или нескольких углеводных цепей ГАГ. ПГ не только формируют структуру ВКМ, но также регулируют сигнальные пути, адгезию клеток к белкам ВКМ и их миграцию и пролиферацию (Theocharis and Karamanos, 2019).

Вовлеченность ПГ в процесс злокачественной трансформации различных тканей показана на уровне их коровых белков для многих ПГ (например, синдекан-1, глипиканы-1, 3 и -4, перлекан) (Wiksten *et al*., 2008; Yuan *et al*., 2008; Bix *et al*., 2008). Ранее в нашей лаборатории было показано, что паттерн экспрессии ПГ в опухолях молочной железы (Eshchenko *et al.,* 2007), раке толстой кишки (Suhovskih *et al.,* 2015) и предстательной железы (Suhovskih *et al.,* 2013) значительно отличается от такового в нормальной ткани, что позволило предложить ПГ в качестве молекулярных маркеров данных видов опухолей. Было высказано предположение, что ПГ в значительной мере вовлечены также в развитие первичной и рецидивирующей глиобластомы.

Известно, что при злокачественной трансформации нервной ткани происходят изменения состава, структуры и функциональных свойств некоторых ПГ (Wade *et al.,* 2013). Показана ассоциация экспрессии синдекана-1 (Xiong *et al*., 2014), глипикана-1

(Listik and Toma, 2020), CSPG4/NG2 (Schiffer *et al.*, 2018), CD44 (Mooney *et al.*, 2016) и версикана (Asher *et al.*, 2002) с агрессивностью глиальных опухолей и низкой выживаемостью пациентов. Также известно, что экспрессия декорина и люмикана ассоциирована устойчивостью клеток глиобластомы к химиотерапии (Farace *et al.*, 2015).

Возможно, изменения структуры и состава протеогликанов ВКМ происходят не только в процессе злокачественной трансформации ткани мозга, но также под действием системных химиотерапевтических препаратов, используемых при лечении опухолей. Возникающие изменения в структуре ВКМ нормальной ткани, окружающей опухолевый очаг, могут оказывать значительное влияние на течение заболевания, приводить к активации роста опухоли, устойчивости опухолевых клеток к терапии и возникновению рецидивов заболевания.

Однако полноценное комплексное исследование роли протеогликанов и гликозаминогликанов в глиобластоме ранее не проводилось.

Целью данной работы является изучение роли протеогликанов и гликозаминогликанов в прогрессировании глиобластомы, эффективности ее лечения, а также развитии рецидива заболевания.

В соответствии с целью были поставлены следующие задачи:

1. Определить взаимосвязь экспрессии коровых белков протеогликанов и содержания гликозаминогликанов в ткани глиобластом человека с клиническими характеристиками заболевания и прогнозом его течения;
2. Изучить изменение экспрессии коровых белков протеогликанов в клетках глиобластомы человека U87 *in vitro* под действием химиотерапевтических препаратов темозоломида и дексаметазона, используемых при терапии глиобластомы;
3. Изучить изменение экспрессии протеогликанов в нормальной ткани головного мозга экспериментальных животных (крысы, мыши) под воздействием темозоломида и дексаметазона в модельных системах *ex vivo* и *in vivo*;
4. Исследовать роль протеогликанов и гликозаминогликанов нормальной ткани головного мозга крысы в адгезии, пролиферации и инвазии опухолевых клеток в ткань головного мозга в экспериментальной системе *ex vivo*;
5. Изучить влияние изменений ВКМ головного мозга мышей SCID под воздействием химиотерапевтических препаратов на рост экспериментальных опухолей U87 *in vivo*.

Научная новизна работы

Научная новизна данной работы заключается в том, что впервые проведено исследование внеклеточных гликозилированных компонентов ткани головного мозга в качестве потенциальных прогностических биомаркеров развития рецидива глиобластомы.

По результатам исследования предложена панель принципиально новых маркеров, включающая декорин, NG2/CSPG4, перлекан и гепарансульфат, использование которых поможет оптимизировать выбор лечебной стратегии для пациентов с глиобластомой. Впервые проведено исследование молекулярных механизмов побочного действия химиотерапии глиобластомы, связанных с нарушением состава и локализации ПГ и ГАГ ткани головного мозга. Показано, что нарушения состава гликозилированных молекул ВКМ головного мозга под действием химиотерапии способствуют повышенной инвазивности опухолевых клеток глиобластомы и развитию рецидива заболевания.

Научно-практическая значимость

Результаты проведенных исследований носят как фундаментальный характер, так и могут иметь прикладное значение в клинической практике. Полученные результаты исследования показали, что экспрессия ряда ПГ, таких как декорин, CSPG4/NG2, перлекан, а также содержание углеводных молекул гепарансульфата в ткани опухоли ассоциированы с низкой выживаемостью пациентов с глиобластомой, что позволяет предложить их в качестве прогностических маркеров глиобластомы.

Экспрессия протеогликанов в клетках глиобластомы *in vitro* и нормальной ткани головного мозга *ex vivo* и *in vivo* значительно изменяется под воздействием препаратов темозоломида (ТМЗ) и дексаметазона (ДКС), используемых при терапии глиобластомы. Эти изменения приводят к усилению адгезии, пролиферации и инвазии опухолевых клеток в системе совместного культивирования органотипических срезов гиппокампа с клетками глиобластомы *ex vivo*, а также увеличению скорости роста экспериментальных опухолей *in vivo*.

Также полученные данные о том, что одним из молекулярных механизмов развития рецидива глиобластомы является повреждение гликозилированных компонентов нормальной ткани головного мозга, окружающей опухоль, под действием интенсивной химиотерапии позволяют поставить вопрос о необходимости внесения изменений в стандартную схему лечения глиобластомы для уменьшения негативных эффектов терапии на нормальную ткань головного мозга. Оптимизация адъювантной химиотерапии глиобластомы может способствовать снижению вероятности возникновения рецидивов опухоли и улучшению качества жизни пациентов с данным видом заболевания.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Повышение экспрессии декорина, CSPG4/NG2 и перлекана и содержания углеводных цепей гепарансульфата в ткани глиобластомы являются молекулярными маркерами плохого прогноза течения заболевания.

2. Обработка клеток глиобластомы человека U87 темозоломидом и дексаметазоном приводит к изменению уровня мРНК индивидуальных протеогликанов и общего паттерна их экспрессии в данных клетках.
3. Экспрессия коровых белков протеогликанов в нормальной ткани головного мозга крыс и мышей изменяется под действием темозоломида и дексаметазона в экспериментальных системах *ex vivo* и *in vivo*. Наибольшее влияние на экспрессию протеогликанов оказывает комбинация данных препаратов
4. Изменение содержания углеводных молекул хондроитинсульфата и дерматансульфата в ткани головного мозга крысы под действием темозоломида и дексаметазона способствует активной пролиферации, адгезии и инвазии клеток глиобластомы U87 в органотипический срез гиппокампа *ex vivo.*
5. Нарушения паттернов экспрессии протеогликанов и структуры внеклеточного матрикса у мышей SCID, получавших темозоломид и дексаметазон, приводят к ускоренному развитию экспериментальных опухолей U87 в головном мозге экспериментальных животных *in vivo*.

Апробация работы

Результаты работы были представлены и обсуждены на X конференции молодых ученых-онкологов «Актуальные вопросы экспериментальной и клинической онкологии» (Томск, Россия, 2015); 20-м Международном конгрессе достижений в биологии и 18-м международном симпозиуме по молекулярной медицине (20th World Congress on Advances in Oncology and 18th International Symposium on Molecular Medicine, Афины, Греция, 2015); V Съезде Биохимиков России (Сочи, Россия, 2016); 21-м Международном конгрессе достижений в биологии и 19-м международном симпозиуме по молекулярной медицине (21st World Congress on Advances in Oncology and 19th International Symposium on Molecular Medicine, Афины, Греция, 2016); Международной конференции по гликобиологии и гликомике (ICGG 2016: 18th International Conference on Glycobiology and Glycomics, Сеул, Южная Корея, 2016); XX Российском Онкологическом Конгрессе (Москва, Россия, 2016); Конгрессе Европейского общества медицинской онкологии 2017 (ESMO 2017 Congress, Мадрид, Испания, 2017); 22-м международном симпозиуме по исследованию рака (22nd International Charles Heidelberger Symposium on Cancer Research, Томск, Россия, 2018); Конгрессе Европейского общества медицинской онкологии 2018 (ESMO 2018 Congress, Мюнхен, Германия, 2018); XXII Российском Онкологическом Конгрессе (Москва, Россия, 2018); 24-м Международном конгрессе достижений в биологии и 24-м международном симпозиуме по молекулярной медицине (24st World Congress on Advances in Oncology and 24th International Symposium on Molecular Medicine,

Спарта, Греция, 2019); Международной молодежной школе-конференции FEBS Advanced Lecture Course «Matrix Pathobiology, Signaling and Molecular Targets» (Порто Хели, Греция, 2019); Конгрессе Европейского общества медицинской онкологии 2020 (ESMO Virtual Congress 2020, онлайн конгресс, 2020).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 17 научных работ, из которых 6 статей в рецензируемых журналах.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов, обсуждения, заключения, выводов и списка цитированной литературы. Работа изложена на 116 страницах машинописного текста, включает 33 рисунка и 2 таблицы. Библиография включает 249 наименований.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Микроокружение опухоли

Ткань опухоли имеет сложную структуру и организацию и содержит не только опухолевые клетки, но и внеклеточный матрикс (ВКМ), а также множество незлокачественных клеток стромы: фибробласты, иммунные клетки, перициты, адипоциты, эпителиальные клетки, глиальные клетки, лимфатические и эндотелиальные клетки. В совокупности, эту сложную структуру ткани называют микроокружением опухоли (Tumor microenvironment, TME) (Hanahan and Weinberg, 2011) (Рис. 1). В норме строма является критически важной для поддержания физиологического гомеостаза ткани и недавние исследования подтвердили, что некоторые стромальные компоненты обладают противоопухолевой активностью (Chen *et al.*, 2015). Однако при трансформации нормальной стромы в опухоль-ассоциированную, она может способствовать развитию опухоли. Растущее число исследований демонстрирует корреляцию между опухолевым ангиогенезом, опухоль-ассоциироваными фибробластами, инфильтрирующими иммунными клетками и прогнозом течения заболевания, тем самым подчеркивая значимость TME при агрессивном развитии опухоли (Chouaib *et al.*, 2010).

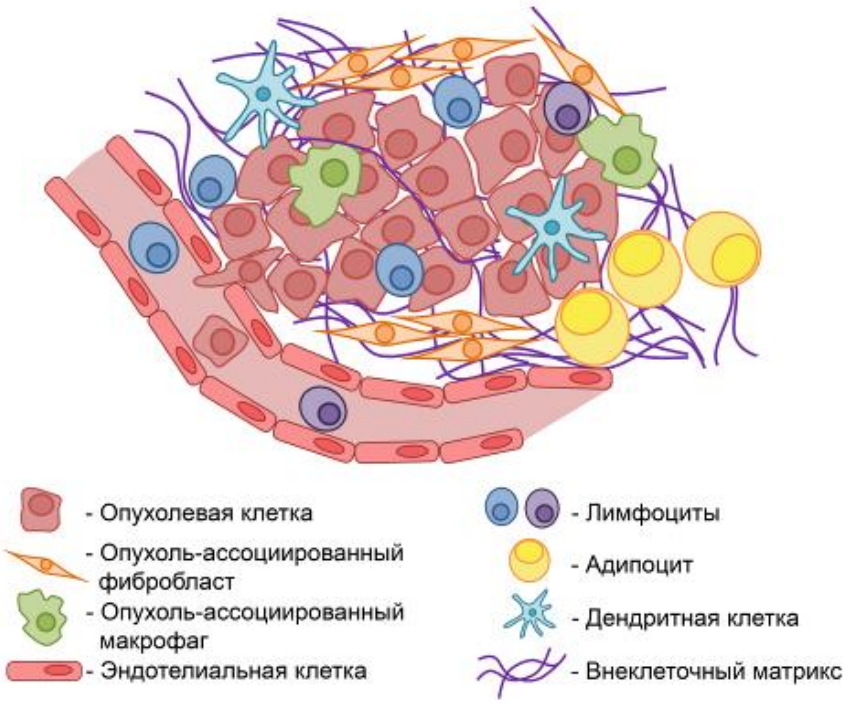


Рисунок 1. Схематическое изображение опухолевого микроокружения.

Важным, но недооцениваемым фактом является то, что TME может составлять до 90% всей опухоли (LeBleu, 2015). Состав и структура TME обладают высокой гетерогенностью и могут сильно варьировать между различными типами опухолей, между

пациентами с одинаковым типом опухоли, а также между различными узлами опухоли у одного пациента. Кроме того, химиотерапия, лучевая терапия и даже хирургическая резекция могут еще больше увеличить гетерогенность TME, поскольку все эти вмешательства прямо или косвенно влияют на выживаемость и функциональный вклад клеточных компонентов TME (LeBleu, 2015).

1.1.1. Клеточный компонент микроокружения

Клетки, формирующие микроокружение опухоли, включают опухоль-ассоциированные фибробласты, адипоциты, эндотелиальные клетки, перициты, дендритные клетки, опухоль-ассоциированные макрофаги, иммунные клетки, тучные клетки и гематопоэтические клетки.

1.1.1.1. Опухоль-ассоциированные фибробласты

Фибробласты в норме регулируют структуру и функцию здоровых тканей посредством ремоделирования ВКМ и участвуют в регенерации тканей (Öhlund *et al.*, 2014). При этом множество исследований демонстрирует, что фибробласты играют ключевую роль в онкогенезе и являются наиболее представленными стромальными клетками в опухоли, особенно при раке молочной железы, раке предстательной железы и раке поджелудочной железы (Öhlund *et al.*, 2014). Опухоль-ассоциированные фибробласты (Cancer-Associated Fibroblasts, CAFs) демонстрируют высокую скорость пролиферации, способствуют росту опухоли с помощью различных механизмов и обеспечивают устойчивость опухоли к терапии (Cirri and Chiarugi, 2011). Известно также, что опухоль-ассоциированные фибробласты способны стимулировать воспаление и неоангиогенез, а также рекрутировать макрофаги, усиливая рост опухоли (Erez *et al.*, 2010). Опухоль-ассоциированные фибробласты также могут иметь черты миофибробластов и участвовать в ремоделировании ВКМ. Постепенное повышение жесткости внеклеточного матрикса позволяет им формировать сократительные микрофиламентные пучки цитоплазматических актинов (стрессовых волокон), которые являются характерными для прото-миофибробластов (Denton *et al.*, 2018). Трансформирующий фактор роста-1 (TGF-1) в сочетании с жестким внеклеточным матриксом стимулирует экспрессию α-гладкомышечного актина (α-SMA) и включению его в стрессовые волокна, что приводит к дальнейшему увеличению жесткости ВКМ и может влиять на опухолевые клетки. Помимо этого, опухоль-ассоциированные фибробласты способны поддерживать злокачественную трансформацию клеток и их инвазию путем секреции металлопротеиназ матрикса (MMP) (Kessenbrock *et al.*, 2010).

1.1.1.2. Адипоциты

Адипокины, секретируемые адипоцитами способствуют негативным последствиям разрастания жировой ткани при опухолях, сердечнососудистых заболеваниях и диабете (Nieman *et al.*, 2011). Более того, адипокины, такие как лептин, регулируют экспрессию и активацию ММР. Например, лептин индуцирует продукцию ММР-13 в клетках глиомы, что приводит к увеличению миграции и инвазии опухоли. Стволовые клетки жировой ткани человека, культивируемые совместно с опухолевыми клетками, продуцируют хемокин CCL5, который, в свою очередь, способствует активации ММР-9 и, как следствие, инвазии клеток рака молочной железы (Kessenbrock *et al.*, 2010). Помимо этого, адипоциты способны экспрессировать ММР-11 который непосредственно влияет на прогрессирование опухоли. ММР-11 отрицательно регулирует адипогенез, останавливая дифференцировку преадипоцитов и активируя де-дифференцировку зрелых адипоцитов, что приводит к накоплению незлокачественных перитуморальных фибробластоподобных клеток, которые способствуют выживанию опухолевых клеток и прогрессированию опухоли (Kessenbrock *et al.*, 2010).

1.1.1.3. Эндотелиальные клетки

Опухоль-ассоциированные эндотелиальные клетки играют важную роль в развитии и прогрессировании опухоли. С одной стороны, они образуют новые сосуды в опухоли путем прорастания из ранее существовавших сосудов или эндотелиальных клеток-предшественников из костного мозга для обеспечения питания растущей опухоли. С другой стороны, они являются связующим звеном между циркулирующими клетками крови, опухолевыми клетками и внеклеточным матриксом, тем самым играя центральную роль в рекрутировании лейкоцитов, движении опухолевых клеток и образовании метастазов (Carmeliet and Jain, 2011).

1.1.1.4. Дендритные клетки

Миелоидные дендритные клетки человека (ДК) являются основными продуцентами интерлейкина-12. Это способствует подавлению неоангиогенеза, что должно подавлять рост опухоли и метастазирование (Carmeliet and Jain, 2000). Однако было показано, что в ТМЕ отсутствуют миелоидные ДК, ингибирующие ангиогенез, в то время как присутствуют ДК, стимулирующие ангиогенез, такие как плазмоцитоидные ДК. Эти клетки, в свою очередь, способны индуцировать васкуляризацию, спонтанно продуцируя фактор некроза опухоли (TNF-α) и интерлейкин-8 (de Visser *et al.*, 2006).

1.1.1.5. Опухоль-ассоциированные макрофаги

Опухоль-ассоциированные макрофаги играют важную роль в развитии, выживании и росте опухолевых клеток. Они представляют собой гетерогенную популяцию клеток в зависимости от содержания кислорода (гипоксия или нормоксия) и стадии прогрессирования опухоли (Kim and Bae, 2016). На ранней стадии развития опухоли макрофаги типа 1 (M1) могут инфильтрировать и активироваться в ответ на медиаторы воспаления и высвобождать провоспалительные цитокины и хемокины, чтобы привлекать Т-хелперы Th1 и Th17 и натуральные киллеры. На более поздних стадиях развития опухоли или в гипоксических областях TME опухоль-ассоциированные макрофаги приобретают фенотип, схожий с M2, и могут способствовать ингибированию противоопухолевого иммунитета посредством продукции трансформирующего фактора роста β1 (TGF-β1) (Kim and Bae, 2016).

1.1.1.6. Тучные клетки

Тучные клетки могут способствовать развитию опухоли путем нарушения нормальной коммуникации между клеткой и стромой, усиления ангиогенеза в опухоли, высвобождения различных факторов роста и индукции иммуносупрессии (Conti *et al.*, 2007). Тучные клетки накапливаются в местах роста опухоли в ответ на многочисленные хемоатрактанты, и их накопление ассоциировано с плохим прогнозом. Тучные клетки могут также участвовать в разрушении гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) и, таким образом, способствовать метастазированию в головной мозг (Theoharides *et al.*, 2008).

1.2. Внеклеточный матрикс

Одним из важнейших компонентов опухолевого микроокружения является внеклеточный матрикс (ВКМ). Внеклеточный матрикс чаще всего определяется как неклеточный компонент ткани, который обеспечивает биохимическую и существенную структурную поддержку для его клеточных компонентов. ВКМ не просто заполняет межклеточное пространство, он является физиологически активным компонентом живой ткани, ответственным за межклеточное взаимодействие, клеточную адгезию и пролиферацию клеток (Walker *et al.*, 2018).

ВКМ состоит из множества различных молекул, определяющих его структуру и функции. Основные компоненты ВКМ включают коллаген, ламинин и фибронектин и протеогликаны. Различные подтипы этих компонентов дополнительно определяют их функцию в общей структуре и свойствах ВКМ (Walker *et al.*, 2018).

Множество молекул ВКМ выполняет ряд функций, которые влияют на биохимические и биофизические процессы в клетке. В течение многих лет ВКМ рассматривался как инертный каркас, исключительно обеспечивающий структуру ткани, однако в последние два десятилетия была доказана его роль в определении функций и фенотипов клеток (Bonnans *et al.*, 2014). ВКМ может контролировать адгезию и миграцию клеток: клетки мигрируют вдоль волокон ВКМ, а также по градиенту адгезии из регионов с более низкой концентрацией молекул к более высокой (Rozario and DeSimone, 2010). В дополнение к структурной целостности и адгезии, компоненты ВКМ могут связывать факторы роста, контролируя их высвобождение и представление клеткам-мишеням. Наконец, ВКМ передает механические сигналы в клетки, которые активируют внутриклеточные сигнальные пути (Pickup *et al.*, 2014). Геометрия, жесткость и другие физические свойства ECM воспринимаются клетками и в конечном итоге определяют их дифференцировку (Lu *et al.*, 2012).

Таким образом, ВКМ является важным компонентом микроокружения, способным влиять на множество процессов в нормальных тканях и опухолях и его изучение является актуальной задачей, в том числе для понимания процессов канцерогенеза и разработки стратегий лечения заболеваний.

1.3. Протеогликаны

Одним из ключевых компонентов ВКМ являются протеогликаны (ПГ), которые контролируют множество нормальных и патологических процессов, включая супрамолекулярную структуру ВКМ, морфогенез, клеточный сигналинг, иммунный ответ, регенерацию тканей, ангиогенез и прогрессирование опухолей. ПГ на поверхностях клеток регулируют поступающие сигналы, выступая в качестве корецепторов для факторов роста, посредников передачи сигналов хемокинов через их рецепторы и модуляторов функций стволовых клеток (Iozzo and Schaefer, 2015; Theocharis and Karamanos, 2019). Такие клеточные характеристики как адгезия, миграция, передача сигналов, рост и выживание клеток, зависят в том числе и от специфической экспрессии ПГ (Karamanos *et al.*, 2018). Очевидно, что протеогликаны, играющие важную роль в функционировании нормальных тканей, вовлечены и в развитие патологий, включая канцерогенез.

Протеогликаны представляют собой сложные молекулы, состоящие из корового белка и ковалентно присоединенных к нему одной или нескольких углеводных цепей гликозаминогликанов (ГАГ) (Рис. 2). Состав и структура ГАГ существенно влияет на функциональные свойства ПГ. Их размер и характер сульфатирования, обеспечивают

специфические регуляторные роли для каждой комбинации ГАГ и корового белка (Afratis *et al.*, 2012).

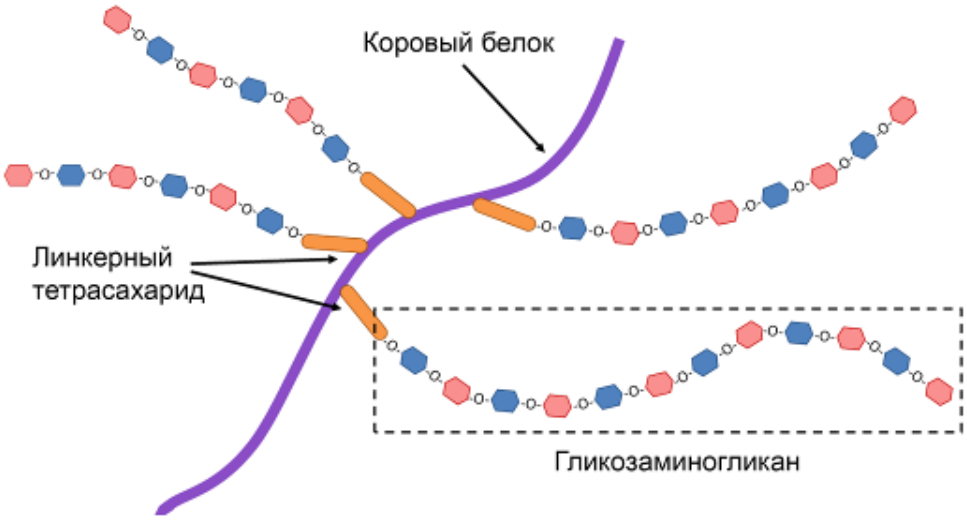


Рисунок 2. Схема молекулы протеогликана

1.3.1. Гликозаминогликаны

ГАГ представляют собой линейные отрицательно заряженные полисахариды, состоящие из повторяющихся дисахаридов, структура которых определяет классификацию ГАГ. Существует шесть различных типов ГАГ, которые различаются по составу дисахаридных звеньев и степени сульфатирования: хондроитинсульфат (ХС), дерматансульфат (ДС), кератансульфат (КС), гепарансульфат (ГС), гепарин (Геп) и гиалуроновая кислота (ГК) (Karamanos *et al.*, 2018).

Все ГАГ синтезируются нематрично скоординированной работой комплекса различных ферментов в эндоплазматическом ретикулуме и аппарате Гольджи. Синтез всех ГАГ (кроме ГК) начинается с присоединения к коровому белку линкерного тетрасахарида, а присоединение следующего остатка гексозамина определяет дальнейший синтез ХС/ДС или ГС/Геп (Uyama *et al.*, 2007).

Взаимодействие ГАГ с различными белками, в основном за счет электростатического взаимодействия между отрицательно заряженными карбоксильными и сульфатными группами ГАГ и положительно заряженными аминокислотами белков, может оказывать значительное влияние на физиологические процессы, такие как развитие, рост клеток, гемостаз и транспорт/абсорбция липидов (Karamanos *et al.*, 2018).

1.3.1.1. Хондроитинсульфат

Хондроитинсульфат (ХС) состоит из повторяющихся дисахаридных звеньев галактозамина (GalN) и глюкуроновой кислоты (GlcA) (Uyama *et al.*, 2007). Размер цепей ХС, как правило, составляет 40-400 моносахаридных остатков, а молекулярная масса 10-

100 кДа. Сульфатирование дисахаридов происходит по различным положениям, в основном в положении C-2 GlcA и в положениях C-4 и/или C-6 остатков GalNAc. Специфический паттерн сульфатирования дисахаридов определяет структуру и функции цепей ХС, и позволяет разделить их на подклассы O, A, C, D и E (Mikami and Kitagawa, 2013). Эпимеризация GlcA в идуроновую кислоту (IdoA) превращает ХС в его стереоизомер, дерматансульфат (ДС) (Рис. 3).

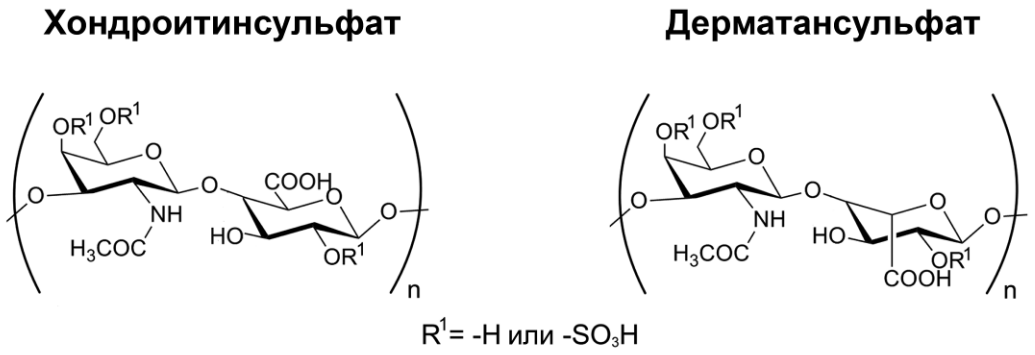


Рисунок 3. Структура дисахаридов, образующих углеводные цепи ХС и ДС.

В тканях млекопитающих наиболее широко распространены моносульфатированные ХС-А и ХС-С. Функционально эти классы ХС могут иметь противоположные функции, например, в нервной ткани ХС-А подавляет аксональное наведение и рост нейронов, в то время как ХС-С ускоряют регенерацию аксонов (Sugahara, 2003; Wang *et al.*, 2008). Также известно, что ХС-С является основным ХС во время эмбриогенеза, а ХС-А активно нарабатывается в тканях взрослых животных (Djerbal *et al.*, 2017). Анализ молекулярных взаимодействий показал, что ХС-D и ХС-E с высокой аффинностью связываются с различными факторами роста, такими как плейотропин (PTN), фактор роста фибробластов (FGF), фактор роста гепатоцитов (HGF) и нейотрофический фактор мозга (BDNF), и могут выступать в роли их ко-рецепторов или резервуаров факторов роста в тканях (Mikami and Kitagawa, 2013; Sugahara, 2003). Содержание цепей ХС также важно в эмбриональном развитии. В частности, недостаточная продукция ХС на ранних и ранних стадиях эмбриогенеза приводит к гибели клеток, сопровождаемой их аномальной многоядерностью (Izumikawa *et al.*, 2010; Wilson *et al.*, 2012).

Паттерн сульфатирования ХС также играет важную роль в развитии опухолей (Theocharis *et al.*, 2006). Так, например, структурный анализ цепей ХС в двух клеточных линиях карциномы Льюиса мышей выявил более высокую долю ХС-E в высоко метастатической клеточной линии по сравнению с клеточной линией с низким метастатическим потенциалом (Li *et al.*, 2008). Аналогично, в мышиных клетках

остеосаркомы LM8G7, которые образуют опухолевые узлы в печени, экспрессия ХС-Е выше, чем в неметастатических клетках LM8 (Basappa *et al.*, 2009).

Также известно, что некоторые патогены, включая паразитов, бактерии и вирусы, используют цепи ХС на клеточной поверхности для прикрепления и инфицирования клеток-хозяев. Например, адгезия эритроцитов, инфицированных малярийным плазмодием (Plasmodium falciparum), к эндотелиальным клеткам требует наличия на их поверхности цепей ХС-А (Gowda, 2006), а ХС-Е может играть роль рецептора для вируса простого герпеса (Bergefall *et al.*, 2005).

1.3.1.2. Дерматансульфат

Стереоизомер хондроитинсульфата, содержащий IdoA вместо GlcA, определяют как ХС-В или дерматансульфат (Trowbridge and Gallo, 2002). IdoA может присутствовать в цепи ДС в трех разных вариантах: в виде одного IdoA-содержащего дисахарида, окруженного GlcA-содержащими дисахаридами; в структурах, где они чередуются с GlcA-содержащими дисахаридами; или в длинных блоках, содержащих только IdoA. Характер сульфатирования цепей ДС различается в зависимости от распределения IdoA в цепи, что обеспечивает разнообразие их функций (Thelin *et al.*, 2013).

Для изучения роли ДС, в основном, используют косвенный метод, основанный на увеличении экспрессии или нокауте специфических эпимераз DS-epi1 и DS-epi2, осуществляющих эпимеризацию GlcA в IdoA в цепи ХС. Известно, что большая часть мышей, нокаутных по генам этих эпимераз, умирает в перинатальном периоде, хотя некоторые животные доживают до 7-недельного возраста, при этом они характеризуются хрупкостью кожи из-за дефектов формирования коллагеновых волокон (Maccarana *et al.*, 2009).

Показано также, что ДС участвует в развитии различных структур головного мозга, хотя и обнаруживается в нем в низких концентрациях (Akatsu *et al.*, 2010). Интересно, что цепи ХС/ДС, полученные из мозга эмбрионов, обладают большей афинностью к FGF, плейотропину, и фактору роста эндотелия сосудов, чем цепи ХС/ДС, полученные из мозга взрослых животных, что говорит о функциональной значимости структуры ГАГ (Sugahara and Mikami, 2007).

1.3.1.3. Гепарансульфат

Мономерами гепарансульфата (ГС) являются дисахариды, состоящие из глюкозамина (GlcN) и глюкуроновой кислоты (GlcA), модифицированные по различным положениям (Karamanos *et al.*, 2018) (Рис. 4). Часть остатков GlcNAc подвергается деацетилированию и сульфатированию по N-положению. Некоторые остатки GlcA

подвергаются эпимеризации в IdoA. Кроме того, остатки GlcA и IdoA могут быть сульфатированы по положениям C-2, C-6 или C-3. Эндосульфатазы плазматической мембраны могут удалять сульфатные группы с определенных сайтов, изменяя общую структуру молекулы. За счет этих модификаций ГС обладает высоким отрицательным зарядом (Li and Kusche-Gullberg, 2016).

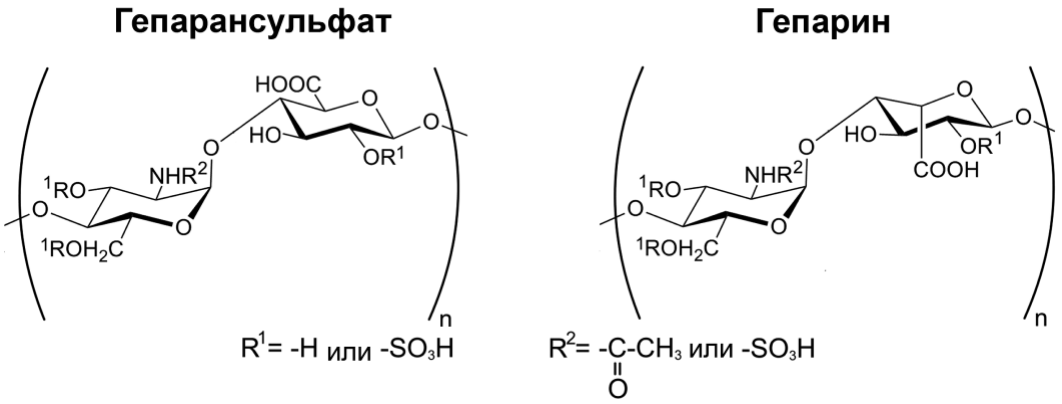


Рисунок 4. Структура дисахаридов, образующих углеводные цепи ГС и гепарина.

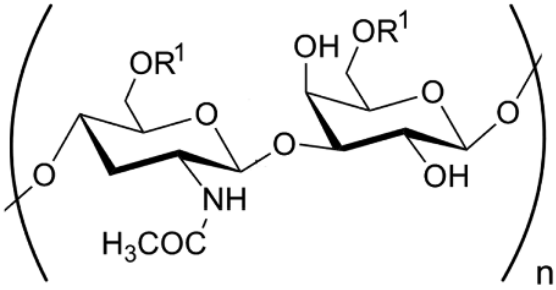
ГС крайне важен в процессах развития организма. Мутации, вызывающие общее нарушение биосинтеза ГС, например, нокаут ферментов, участвующих в элонгации цепи ГС (EXT1, EXT2), приводят к ранней эмбриональной смерти (Yamaguchi *et al.*, 2010). Подавляющее большинство белковых лигандов взаимодействует с гепарансульфат протеогликанами (сложными молекулами, в которых цепи ГС ковалентно прикреплены к коровому белку, ГСПГ) через сульфатированные домены их цепей ГС. Эти лиганды, часто называемые «гепарин-связывающими белками», весьма разнообразны и включают ферменты и ингибиторы ферментов, цитокины, морфогены, факторы роста, белки ВКМ и липопротеины (Xu and Esko, 2014).

В опухолях разрушение цепей ГС ферментом гепараназой может активировать механизмы, ассоциированные с инвазией и метастазированием (Hulett *et al.*, 1999). Разрушение цепей ГС приводит к нарушению целостности ВКМ и высвобождает факторы роста, связанные с ГС, что приводит к активации сигнальных путей, ассоциированных с метастазированием, ангиогенезом, а также воспалением (Vlodavsky and Friedmann, 2001).

Также известно, что поверхностные белки многих патогенных микроорганизмов (вирусы, бактерии и паразиты) взаимодействуют с ГС (Tiwari *et al.*, 2012). Например, белок оболочки gp120 ВИЧ-1 связывается с ГС на поверхности клетки-хозяина, и ингибирование этого взаимодействия может предотвратить проникновение вируса в клетки (Connell and Lortat-Jacob, 2013).

1.3.1.4. Кератансульфат

Кератансульфат (КС) является наименее изученным из всех ГАГ. Высокое содержание КС показано в ВКМ некоторых тканей, таких как роговица, хрящи и кости. Дисахариды КС состоят из звеньев галактозы (Gal) и глюкозамина (GlcN), что делает КС единственным типом ГАГ, не содержащим уроновую кислоту (и, соответственно, карбоксильную группу) (Pomin, 2015). Хотя оба звена дисахарида могут быть 6-О-сульфатированными, чаще сульфатирование происходит по остатку глюкозамина (Рис. 5).



R^1= -H или -SO_3H

Рисунок 5. Структура дисахарида, образующего углеводные цепи КС.

Высокое содержание КС в роговице связано с поддержанием надлежащих уровней гидратации и прозрачности ткани, а в хрящах КС необходим для устойчивости ткани к физической деформации. КС также участвует в развитии организма, передаче сигнальной информации и миграции клеток. В нервной ткани КС в состве КСПГ экспрессируется глиальными клетками и может играть роль в регулировании роста нейритов и миелинезации нервных волокон (Caterson and Melrose, 2018).

1.3.2. Локализация и функции протеогликанов

ПГ классифицируются согласно их локализации на внеклеточные, внутриклеточные ПГ, ПГ базальной мембраны и ПГ клеточной поверхности (Рис. 6). Внутри каждого класса выделяются подклассы в соответствии с гомологией генов, структурными и функциональными свойствами (Karamanos *et al.*, 2018).

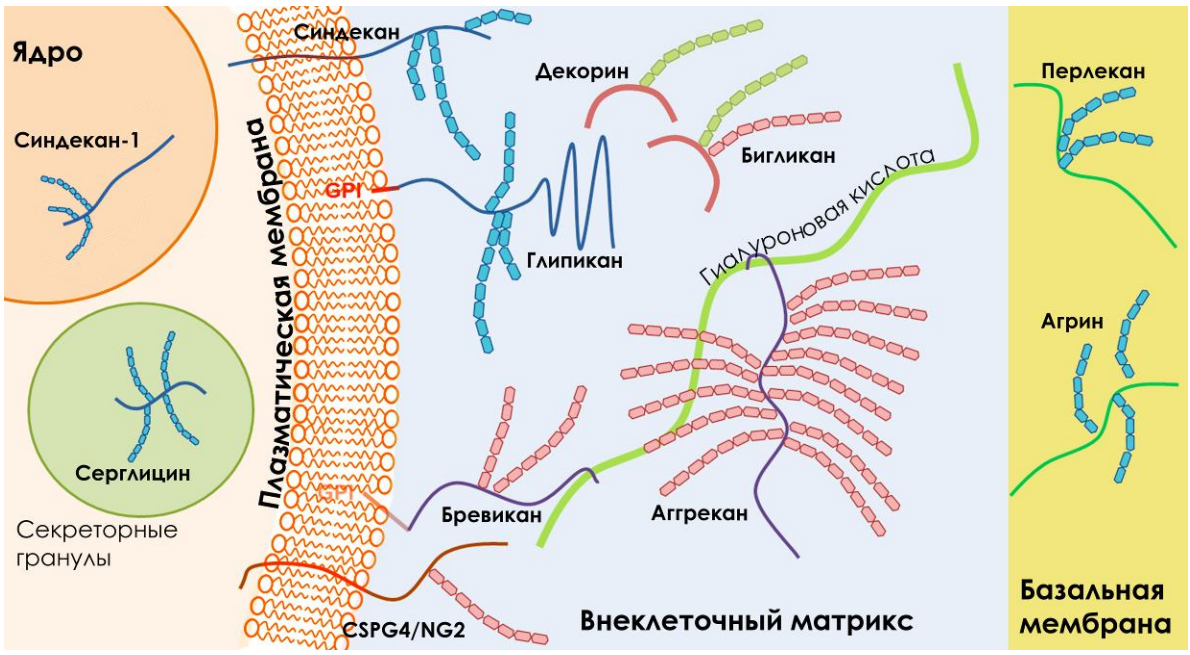


Рисунок 6. Схематическое изображение локализации протеогликанов в ткани

1.3.3. Внеклеточные протеогликаны

Внеклеточные ПГ локализованы в ВКМ и представлены тремя классами: галектанами (лектиканами), малыми лейцин богатыми ПГ (small leucine rich PG – SLRP) и кальций-связывающими тестиканами.

1.3.3.1. Галектаны

Класс галектанов содержит четыре ПГ: аггрекан, версикан, бревикан и нейрокан. Они являются ключевыми структурными компонентами хряща, кровеносных сосудов и центральной нервной системы и обладают глобулярными доменами на N- и C-концах, с помощью которых они связывают различные компоненты ВКМ, включая ГК, образуя крупные агрегаты. Галектаны различны по своей структуре и демонстрируют тканеспецифический паттерн экспрессии. Альтернативный сплайсинг и изменчивость гликозилирования обеспечивают разнообразные функции этих протеогликанов (Karamanos *et al.*, 2018).

Аггрекан

Аггрекан имеет склонность к агрегации в крупные надмолекулярные комплексы >200 МДа с гиалуроновой кислотой и линекерным белком, что отражается в его названии. Крупные агрегаты аггрекана с ГК образуют плотный гидратированный гель, который может быть объединен в сложную сеть с фибриллами коллагенов, других протеогликанов и гликопротеинов (Heinegård, 2009). Структурно коровый белок аггрекана состоит из трех глобулярных доменов (G1-3) и трех протяженных доменов (Ig-подобный домен, KC-домен и XC-домен). Домен G3 аггрекана содержит 2 EGF-подобных повтора, домен лектина C-

типа и домен регуляторного белка комплемента (CRP). G3 может связывать галактозу, присутствующую на коллагене типа II и других компонентах внеклеточного матрикса и клеточной поверхности. Более того, домен G3 аггрекана взаимодействует с тенасцинами, фибулинами и сульфатированными гликолипидами (Aspberg *et al.*, 1997). Почти 90% массы аггрекана составляют цепи ГАГ, в основном, ХС, но также возможно присоединение и цепей КС. Аггрекан содержит около 100 цепей ХС, масса каждой из которых ~20 кДа. Цепей кератансульфата содержится меньше (до 60) и они обычно имеют меньший размер (5-15 кДа) (Kiani *et al.*, 2002). Высокий отрицательный заряд аггрекана объясняет его способность удерживать большое количество воды, что определяет его структурную функцию в хрящах, межпозвоночных дисках и мозге (Giamanco and Matthews, 2012; Kiani *et al.*, 2002). Кроме того, электростатические силы, создаваемые многочисленными отрицательно заряженными цепями ХС и КС, обеспечивают жесткость ВКМ.

Версикан

Версикан является крупнейшим представителем семейства галектанов. Ген *VCAN* включает 15 экзонов, кодирующих полноразмерный ~ 400 кДа коровый белок (вариант V0) (Iozzo and Schaefer, 2015). Общая структурная организация корового белка версикана похожа на аггрекан, за некоторым исключением. В частности, N-концевой домен версикана содержит только один IgG-повтор, за которым следуют два последовательных белковых домена, аналогичных G1, которые участвуют в связывании с гиалуроновой кислотой. Центральный домен версикана состоит из двух относительно больших субдоменов, обозначаемых GAGα (кодируется экзоном 7) и GAGβ (кодируется экзоном 8), альтернативный сплайсинг которых обеспечивает существование трех изоформ корового белка версикана V1, V2 и V3 (Naso et al., 1994). Экспрессия изоформ версикана тканеспецифична. Изоформа V1 является наиболее распространенной в большинстве тканей человека и часто ассоциирована с регенерацией и ремоделированием ВКМ при травмах и заболеваниях. Изоформа V0, в основном экспрессируется во время эмбрионального развития и менее распространена во взрослом организме. Изоформа V2 в основном присутствует в головном мозге (Zimmermann and Dours-Zimmermann, 2008).

Функции версикана разнообразны. Накопление версикана происходит в тканях с активным клеточным делением. В комплексе с гиалуроновой кислотой версикан способствует расширению околоклеточного ВКМ, создавая очень податливую среду, влияющую на механотрансдукцию и поддерживающую изменение формы клетки, которые необходимы для пролиферации и миграции клеток (Wight *et al.*, 2014). Версикан также может напрямую влиять на пролиферацию клеток, связываясь с рецепторами

факторов роста через EGF-мотивы в домене G3 (Wu *et al.,* 2005). Версикан также участвует в воспалении, за счет его способности взаимодействовать со многими рецепторами на поверхности иммунных клеток (Karamanos *et al.,* 2018).

Версикан является одним из наиболее исследованных протеогликанов в канцерогенезе. Версикан экспрессируется как самими опухолевыми клетками (что влияет на их собственные характеристики), так и стромальными клетками опухолевого микроокружения, регулируя структуру ВКМ, при этом его экспрессия ассоциирована с плохим прогнозом (Karamanos *et al.,* 2018). Эксперименты *in vitro* с использованием различных линий опухолевых клеток показали, что высокая экспрессия версикана может способствовать пролиферации и инвазии клеток (Zheng *et al.,* 2004). Повышенная экспрессия версикана в опухоли на ранних стадиях ассоциирована с повышенным риском прогрессирования и рецидивирования рака предстательной железы и рака молочной железы (Ricciardelli *et al.,* 1998). Исследования рака эндометрия показали, что экспрессия версикана в опухоли повышена на поздних стадиях, а также в метастазах в лимфатических узлах и яичниках (Kodama *et al.,* 2007).

Нейрокан

Третьим представителем галектанов является нейрокан. Как и другие галектаны, нейрокан имеет N-концевой домен, структурно гомологичный линкерному белку, несущий домен G1 и повтор Ig. Весьма вероятно, что, как и все N-концевые домены галектанов, N-конец нейрокана способен связываться и взаимодействовать с ГК и линкерным белком, образуя гигантские надмолекулярные агрегаты (Rauch *et al.,* 2001). Следующий домен нейрокана содержит около семи потенциальных сайтов связывания ХС. С-концевой модуль нейрокана имеет значительную гомологию с G3-доменом аггрекана и версикана. Этот домен может связывать несколько гликопротеинов мозга, включая Ng-CAM, N-CAM и тенасцин, которые являются молекулами клеточной адгезии и участвуют в разрастании и навигации нейритов (Zimmermann and Dours-Zimmermann, 2008). Нейрокан также может связываться с различными компонентами внеклеточного матрикса и молекулами клеточной поверхности. Эти взаимодействия могут модулировать их активность и ингибировать взаимодействия молекул адгезии суперсемейства Ig и семейства кадхеринов в нервных клетках (Rauch *et al.,* 2001).

Роль нейрокана в канцерогенезе изучена слабо. Известно, что высокая экспрессия нейрокана ассоциирована с плохим прогнозом у пациентов с нейробластомой, а также с более агрессивным фенотипом опухолевых клеток нейробластомы *in vitro* (Su *et al.,* 2017).

Бревикан

Бревикан является одним из важнейших галектанов центральной нервной системы и представляет собой ключевой компонент перинейрональных сетей, которые способствуют балансу между пластичностью и устойчивостью нервных цепей. Он содержит типичную конфигурацию галектана с N- и C-концевыми гомологичными доменами, но с более коротким ГАГ-связывающим доменом (Frischknecht and Seidenbecher, 2012). Бревикан иногда также называют BEHAB, что является аббревиатурой от «Brain-enriched hyaluronan binding protein» − высоко экспрессируемый в мозге белок, связывающийся с гиалуроновой кислотой (Viapiano *et al.*, 2003). Бревикан синтезируется и секретируется как нейронами, так и глиальными клетками и впоследствии включается в ВКМ вокруг нейронов или непосредственно связывается с поверхностью клетки (Carulli *et al.*, 2005). Бревикан взаимодействует с тенасцином-R и фибулином-2 и гликолипидами на поверхности клеток (Frischknecht and Seidenbecher, 2012). Помимо секретируемого полноразмерного бревикана существует изоформа, заякоренная на мембране клетки через гликозилфосфатидилинозитол (GPI-якорь), кодируемая более короткой мРНК и высоко экспрессируемая во время постнатального развития (Viapiano *et al.*, 2003).

1.3.3.2. Малые лейцин-богатые протеогликаны

Протеогликаны семейства SLRP (Small Leucin-Rich Proteoglycan) присутствуют в ВКМ большинства тканей. Для них характерны относительно низкая молекулярная масса и наличие общих структурных мотивов, лейцин-богатых повторов (LRR) (Moreth *et al.*, 2012). Каждая единица LRR состоит из ~24 аминокислот, характеризуется консервативной последовательностью гидрофобных остатков, формирующих короткие параллельные β-складки на вогнутой грани корового белка, и спирали полипролина II на выпуклой (внешней) стороне корового белка. LRR образуют изогнутую соленоидную структуру, и взаимодействия с другими белками происходят главным образом через боковые цепи остатков аминокислот, выступающих из коротких параллельных β-складок, образующих внутреннюю (вогнутую) поверхность соленоида. LRR окружены на N- и C-концах дисульфидно-связанными «колпачками», состав которых определяет различные классы SLRP (Iozzo, 1997). SLRP делятся на пять классов (I, II, III, IV и V) в соответствии с гомологией генов и белков. Классы I (декорин, бигликан, аспорин, ECM2 и ECMX), II (фибромодулин, люмикан, PRELP и кератокан) и III (эпификан, оптицин и остеоглицин) считаются каноническими SLRP, тогда как классы IV (хондрохерин, никталопин) и V

(подокан и подоканоподобный белок 1) являются неканоническими SLRP (Appunni *et al.*, 2019).

Декорин

Декорин, SLRP класса I, был назван так из-за его способности «декорировать» коллагеновые волокна (Appunni *et al.*, 2019). Коровый белок декорина нековалентно связывается с определенными участками на поверхности коллагеновых волокон примерно через каждые 67 нм (Scott, 1988). Специфическое расположение ГАГ-связывающего домена на N-конце декорина обеспечивает высокую степень подвижности его единственной углеводной цепи ДС, которая может располагаться ортогонально или параллельно коллагеновым волокнам. Это определяет функцию декорина в поддержании прозрачности роговицы и биомеханических свойств различных соединительных тканей (Reed and Iozzo, 2002; Reese *et al.*, 2013). Декорин секретируется в ВКМ стромальными клетками, такими как фибробласты, эндотелиальные клетки и миофибробласты (Neill *et al.*, 2012). Декорин является природным лигандом для рецепторных тирозинкиназ, рецептора эпидермального фактора роста (EGFR), инсулиноподобного фактора роста-1R (IGF-1R), рецептора фактора роста фибробластов (FGFR) и рецептора фактора роста гепатоцитов, Toll-like рецепторов на иммунных клетках и трансформирующего фактора роста-β (TGF-β) (Neill *et al.*, 2012; Neill *et al.*, 2016; Schaefer and Iozzo, 2008).

Декорин является «защитником» ВКМ, проявляя онкосупрессорные свойства (Neill *et al.*, 2012). Снижение экспрессии декорина наблюдается при инвазивном раке молочной железы и связано с плохим клиническим прогнозом (Oda *et al.*, 2012). Также снижение экспрессии мРНК и содержания корового белка декорина в ткани опухоли и низкая концентрация декорина в сыворотке, были показаны при раке мочевого пузыря (Appunni *et al.*, 2017). В других исследованиях на людях и животных также показано снижение экспрессии декорина в раке толстой кишки, немелкоклеточном раке легких, карциноме печени и раке предстательной железы, что свидетельствует о том, что для роста опухоли необходимо подавление экспрессии декорина (Appunni *et al.*, 2019).

Бигликан

Бигликан является SLRP класса I, имеет коровый белок размером 42 кДа, структурно схожий с коровым белком декорина и несет две углеводные цепи ГАГ. Он экспрессируется практически во всех тканях и служит ключевым компонентом ВКМ и важной сигнальной молекулой (Nastase *et al.*, 2012). Ключевой функцией этого SLRP является регулирование постнатального роста скелета (Xu *et al.*, 1998). Как правило, кости у мышей, нокаутных по бигликану, растут медленнее, чем у животных дикого типа, и в конечном итоге имеют меньшую длину и меньшую костную массу. Бигликан может

модулировать BMP-4-индуцированную дифференцировку остеобластов (Chen *et al.*, 2004). Помимо этого, бигликан взаимодействует с рецепторами TLR2 и TLR4 на иммунных клетках, инициируя воспаление через NF-κB (Schaefer *et al.*, 2017), а также проявляет проангиогенную активность через воздействие на сигнальный путь Wnt (Berendsen *et al.*, 2011).

Повышенная экспрессия бигликана связана с высокой инвазивностью опухоли (Appunni *et al.*, 2019). Также было показано, что при раке мочевого пузыря концентрация бигликана в сыворотке, а также экспрессия его в ткани значительно повышается (Appunni *et al.*, 2017). Кроме того, при раке прямой кишки, высокий уровень экспрессии бигликана в ткани опухоли по сравнению с окружающей нормальной стромой, положительно коррелирует с метастазированием опухоли (Gu *et al.*, 2011).

Люмикан

Люмикан - это SLRP класса II. Коровый белок люмикана имеет размер 40 кДа и содержит 6-10 LRR, фланкированных с обеих сторон доменами, обогащенными цистеином, и несет четыре цепи КС (Nikitovic *et al.*, 2008). Цепи КС люмикана с высоким сродством связываются с FGF2 и участвуют в регулировании активности факторов роста и формировании градиента морфогенов (Weyers *et al.*, 2013). Люмикан экспрессируется повсеместно и локализуется преимущественно в мезенхимальных тканях, а также его экспрессия резко повышается в различных опухолях, особенно в опухолях легких, желудка, толстой кишки, поджелудочной железы и мочевого пузыря (de Wit *et al.*, 2017; Schaefer and Iozzo, 2008). Показано, что люмикан может влиять на рост и развитие опухолей через различные молекулярные механизмы, однако точного понимания его роли при злокачественной трансформации на данный момент нет. Люмикан очень высоко экспрессируется опухоль-ассоциированными фибробластами при раке желудка и усиливает рост опухоли путем активирования FAK сигнального пути (Schaefer and Iozzo, 2008). В опухолях предстательной железы, напротив, было показано снижение миграции и инвазии опухолевых клеток *in vitro* при увеличении экспрессии люмикана. Высокая экспрессия люмикана также снижает пролиферацию и инвазию ряда клеточных линий рака молочной железы (Appunni *et al.*, 2019). Люмикан также участвует в воспалении, вызывая рекрутирование и инвазию нейтрофилов после повреждения, и в заживлении ран (Hayashi *et al.*, 2010).

1.3.4. Протеогликаны базальной мембраны

Класс ПГ базальной мембраны включает в себя перлекан и агрин, а также два члена суперсемейства коллагенов: коллагены типа XV и XVIII (Karamanos *et al.*, 2018).

Перлекан

Перлекан (альтернативное название HSPG2) кодируется большим геном со сложным промотором. У человека в общей сложности 97 экзонов кодируют коровый белок, который имеет молекулярную массу 467 кДа (Nicole *et al.,* 2000). Присоединение 3–4 цепей ГАГ может увеличить молекулу до размера более 750 кДа, что делает перлекан одной из крупнейших мономерных молекул ВКМ. Коровый белок перлекана состоит из пяти доменов, называемых доменами I-V, которые состоят из тандемно повторяющихся мотивов, расположенных линейно, напоминающих по внешнему виду «жемчуг на нити», от чего и происходит название протеогликана «перлекан» (от англ. «perl» – жемчуг) (Martinez *et al.,* 2018). Домен I содержит три сайта присоединения ГАГ, с которыми могут быть связаны цепи ГС или ХС (Bork and Patthy, 1995). Домен II содержит четыре мотива рецепторов липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) и один изолированный иммуноглобулин-подобный (IG) мотив (Cohen *et al.,* 1994). Обе структуры удерживаются вместе дисульфидными связями и способствуют компактной модульной форме перлекана. Домен III содержит мотив связывания эпидермального фактора роста (EGF). Домен IV участвует в адгезии и взаимодействии со многими компонентами ВКМ, включая фибронектин (Hopf *et al.,* 1999). Домен V содержит четыре EGF-мотива и имеет четвертый вариабельный сайт присоединения ГАГ. Домен V содержит область, которая при отщеплении протеазами известна как эндорепеллин. Полноценный коровый белок перлекана обладает проангиогенными свойствами, а эндоропеллин обладает антиангиогенной активностью (Zoeller *et al.,* 2009).

Активность перлекана зависит от клеточного контекста и формы, в которой он представлен. Посттрансляционные модификации, влияющие на функции перлекана, включают соотношение цепей ГАГ (содержание ГС в сравнении с содержанием ХС), протеолитическое расщепление корового белка и отщепление ГАГ ферментами (хондроитиназой, гепараназой). Кроме того, различные факторы могут влиять на состав и структуру цепей ГАГ и, следовательно, на функции перлекана (Martinez *et al.,* 2018).

Вовлеченность перлекана в развитие опухолей и их ангиогенз была впервые показана в инвазивных меланомах, где его экспрессия на уровне мРНК увеличивается в 15 раз по сравнению с нормальной тканью, а также увеличивается содержание корового белка перлекана в ВКМ опухоли (Cohen *et al.,* 1994). Роль перлекана в ангиогенезе была подтверждена несколькими независимыми исследованиями с использованием антисмысловых siРНК в различных опухолевых клетках как *in vitro*, так и *in vivo*. Например, как в ксенотрансплантатах опухоли толстой кишки человека, так и в аллотрансплантатах опухоли меланомы мыши подавление перлекана вызывало

существенное ингибирование роста опухоли и ангиогенеза (Iozzo and San Antonio, 2001). Нокдаун перлекана также приводил к подавлению пролиферации и инвазии клеток меланомы (Adatia *et al.*, 1997) и снижению чувствительности к FGF2 и VEGFA клеток рака предстательной железы человека (Savorè *et al.*, 2005). Напротив, клетки фибросаркомы, лишенные перлекана, быстрее пролиферируют и образуют более агрессивные опухоли, что свидетельствует о важности клеточного контекста (Mathiak *et al.*, 1997).

Агрин

Структура корового белка агрина гомологична структуре перлекана. Изоформа, ассоциированная с большинством базальных мембран, содержит целый N-концевой домен, а сплайсинг N-концевой области приводит к формированию трансмембранного варианта агрина, экспрессируемого в нервной ткани. N-концевой домен агрина обладает высоким сродством к γ1-цепи ламинина, тем являясь связующим звеном между поверхностью клетки и базальной мембраной. За N-концевым доменом следуют девять фоллистатиноподобных повторов, после которых идут два серин/треонин-богатых домена, которые могут быть альтернативно сплайсированы (Bezakova and Ruegg, 2003). N-концевые и центральные области корового белка агрина содержат сайты присоединения цепей ГС. Цепи ГС агрина могут связывать FGF2, тромбоспондин и β-амилоидный пептид (Iozzo and Schaefer, 2015).

Увеличение экспрессии агрина показано в некоторых опухолях по сравнению с нормальными тканями. Так экспрессия агрина выше в злокачественных опухолях ротоглотки по сравнению с доброкачественными и с нормальной тканью, а подавление его экспрессии приводит к снижению пролиферации и подвижности опухолевых клеток *in vitro* (Rivera *et al.*, 2018). Повышенная экспрессия агрина в гепатоцеллюлярной карциноме ассоциирована с усилением опухолевого ангиогенеза и повышенной адгезией опухолевых клеток к эндотелиоцитам сосудов (Njah *et al.*, 2019).

1.3.5. Протеогликаны клеточной поверхности

ПГ клеточной поверхности включают тринадцать генов, разделенных на два основных подсемейства, синдеканы и глипиканы, и другие одиночные ПГ, такие как CSPG4/NG2. Ряд ПГ клеточной поверхности являются «факультативными» протеогликанами, поскольку могут существовать как в виде ПГ, так и в негликозилированной форме, например, CD44, фосфакан, нейропилин и бетагликан (Iozzo and Schaefer, 2015).

Синдеканы

Семейство синдеканов (SDC) содержит четыре гена (SDC1, SDC2, SDC3 и SDC4), которые широко экспрессируются в различных клетках и тканях, за исключением синдекана-3, который, по-видимому, экспрессируется главным образом в нервной ткани (Afratis *et al.*, 2017). Синдеканы являются трансмембранными ПГ и содержат эктодомен, трансмембранный домен и короткий цитоплазматический хвост. С эктодоменом может быть связано от одной до трех цепей ГС. Синдекан-1 и синдекан-3 также могут нести цепи ХС. Трансмембранные и цитоплазматические домены проявляют высокую гомологию среди членов семейства, их последовательности на 60–70% идентичны, в то время как эктодомены демонстрируют наименьшую консервативность. Трансмембранный домен содержит мотив димеризации, который обеспечивает как гомодимеризацию, так и гетеродимеризацию синдеканов (Teng *et al.*, 2012). Внутриклеточный домен состоит из двух областей консервативной аминокислотной последовательности, разделенных центральной вариабельной последовательностью аминокислот, которая уникальна для каждого члена семейства. С-конец всех четырех синдеканов содержит последовательности для связывания PDZ-содержащих белков, которые способствуют закреплению трансмембранных белков на цитоскелете (Choi *et al.*, 2011).

Синдеканы участвуют в самых разнообразных биологических функциях. Они связывают многочисленные факторы роста и определяют градиенты морфогенов во время развития огранизма. Вместе с другими ГСПГ на клеточной поверхности синдеканы могут действовать как рецепторы эндоцитоза, а также участвовать в поглощении экзосом. Синдеканы могут также выступать в качестве корецепторов для многих рецепторов с тирозинкиназной активностью (RTK) и в качестве рецепторов для атерогенных липопротеинов (Iozzo and Schaefer, 2015).

Синдекан может подвергаться частичному протеолизу, высвобождая эктодомен, несущий цепь ГС. Такое расщепление синдеканов является важной посттрансляционной модификацией, которая может регулировать количество ГСПГ, связанных с клеточной поверхностью, и присутствующих в околоклеточном микроокружении. Некоторые воспалительные цитокины могут индуцировать отщепление эктодомена синдекана путем активации металлопротеиназ (Teng *et al.*, 2012).

При злокачественной трансформации эпителиальные клетки часто теряют экспрессию синдекана-1 и Е-кадхерина, которые вместе являются ключевыми в регуляции эпителиально-мезенхимального перехода (Sun *et al.*, 1998). Показано, что снижение экспрессии синдекана-1 связано с ускоренным развитием опухоли и снижением выживаемости пациентов при некоторых типах карциномы (Nackaerts *et al.*, 1997). И

наоборот, при некоторых типах опухолей, таких как рак молочной железы и гематологические злокачественные новообразования, синдекан-1 часто высоко экспрессируется и ассоциирован с повышенной инвазивностью опухоли и плохим прогнозом (Davies, 2004). Экспрессия синдекана-2 усиливается в ряде опухолей, где он играет важную роль в обеспечении формы, адгезии и миграции клеток (Munesue *et al.,* 2002). Синдекан-2 также высоко экспрессируется в сосудах глиомы мыши, а ингибирование его экспрессии в эндотелиальных клетках снижает их миграцию и образование капилляров *in vitro* (Fears *et al.,* 2006).

Глипиканы

Глипиканы (GPC) представляют собой ГСПГ, заякоренные на клеточной мембране при помощи гликозилинозитол-фосфатного якоря (GPI). У млекопитающих обнаружено 6 генов глипиканов (GPC1-6). Глипиканы экспрессируются в основном мезенхимальными и эпителиальными клетками и могут нести до трех цепей ГС, прикрепленных близко к поверхности клетки (Theocharis and Karamanos, 2019). Такое прикрепление позволяет трем линейным цепям ГС охватывать большую часть поверхности плазматической мембраны, тем самым представляя различные морфогены и факторы роста соответствующим рецепторам. Несмотря на то, что в поляризованных клетках GPI-заякоренные белки обычно располагаются на апикальной мембране, что обусловлено их связью с липидными рафтами, глипиканы, как правило, располагаются на базолатеральной мембране (Filmus *et al.,* 2008).

Показано, что глипиканы связывают и модулируют активность Hedgehog (Hh), Wnt и FGFs (Capurro *et al.,* 2005; Filmus and Capurro, 2014). Глипиканы также участвуют в фундаментальных биологических процессах, таких как взаимодействия клетки и ВКМ, контроль клеточного деления, дифференцировки и морфогенеза (Filmus *et al.,* 2008). Глипиканы также могут высвобождаться во внеклеточную среду путем расщепления GPI-якоря и участвовать в транспорте Wnt, Hh и BMP при формировании градиента морфогенов (Traister *et al.,* 2008).

Среди семейства глипиканов, глипикан-3 наиболее изучен в контексте развития злокачественных новообразований. Экспрессия и функции глипикана-3 коррелируют с типом опухоли, поэтому анализ глипикана-3 может помочь в диагностике и прогнозе некоторых видов рака. При раке молочной железы (Xiang *et al.,* 2001), легкого (Kim *et al.,* 2003) или яичников (Lin *et al.,* 1999) экспрессия глипикана-3 часто подавляется с прогрессированием опухоли. Напротив, в новообразованиях, происходящих из тканей, которые экспрессируют глипикан-3 только в эмбриогенезе, его экспрессия вновь появляется при злокачественной трансформации (Ota *et al.,* 2006).

CSPG4/NG2

Ассоциированный с меланомой хондроитинсульфат протеогликан (MCSP) был открыт более 30 лет и впоследствии был обнаружен у различных видов. Крысиный ортолог MCSP называется нервно-глиальный антиген 2 (NG2) (Nishiyama et al., 1991), а термин CSPG4 обозначает человеческий ген. CSPG4/NG2 представляет собой трансмембранный протеогликан, несущий одну цепь хондроитинсульфата на большом эктодомене, состоящем из трех субдоменов. N-концевой домен содержит два ламинино-подобных глобулярных повтора. Вероятно, что эти домены, как и у других протеогликанов, опосредуют связывание лигандов, взаимодействие клеток с другими клетками и с ВКМ, а также взаимодействие с интегринами и RTK. Центральный субдомен содержит 15 тандемных ХСПГ-повторов, к которым присоединена цепь ХС (Price *et al.*, 2011). Этот повтор, по-видимому, участвует во взаимодействии клетки с ВКМ, в частности, он может связываться с коллагенами V и VI, FGF и PDGF. Околомембранный субдомен содержит многочисленные сайты расщепления протеазами, а также углеводную модификацию, способную связывать интегрины и галектин. Внутриклеточный домен содержит многочисленные сайты фосфорилирования и PDZ-связывающий домен, который может связываться с PDZ-доменом ряда белков цитоскелета (Trotter *et al.*, 2010).

В норме CSPG4/NG2 обнаруживается в нервной ткани на поверхности незрелых клеток-предшественников, включая клетки-предшественники олигодендроцитов (OPC) и перициты, способствуя их пролиферации и миграции (Trotter *et al.*, 2010). PDGFAA и FGF-2 демонстрируют высокое сродство к коровому белку CSPG4/NG2, что позволяет предположить его участие в RTK-сигналинге в качестве резервуара и корецептора для этих факторов роста (Goretzki *et al.*, 1999).

CD44

Белки CD44 образуют большое семейство многофункциональных трансмембранных гликопротеинов, принадлежащих к классу молекул клеточной адгезии (CAM). Все члены семейства CD44 у человека кодируются одним единственным геном, содержащим 19 экзонов. Экзоны с 1 по 16 кодируют внеклеточную часть CD44. Первые 5 экзонов присутствуют во всех изоформах, а экзоны 6-15 являются вариантными (v1-v10) и подвергаются альтернативному сплайсингу. Экзон 17 кодирует гидрофобный трансмембранный домен, а экзоны 18 или 19 дают начало внутриклеточной части CD44 (Morath *et al.*, 2016; Naor *et al.*, 1997). Гетерогенность семейства CD44 дополнительно увеличивается за счет нескольких посттрансляционных модификаций, таких как N- и O-гликозилирование.

Известно, что CD44 является основным рецептором гиалуроновой кислоты, однако в форме протеогликана он способен связываться и с другими компонентами ВКМ. Цепи ХС и ГС CD44 способны связываться с глобулярным доменом ламинина, а также с коллагеном типа IV и фибронектином (Ishii *et al.*, 1993).

Высокая экспрессия CD44 часто ассоциирована с инициацией канцерогенеза, а также со специфическими свойствами опухолевых клеток, похожими на свойства стволовых клеток. На данный момент CD44 отдельно или в комбинации с другими маркерами, такими как CD133, CD34 или CD24 используется как маркер стволовых опухолевых клеток (Cancer Stem Cell, CSC) (Yan *et al.*, 2015). Способность CD44 связываться с гиалуроновой кислотой и другими молекулами ВКМ позволяет CSC модифицировать сигнальные пути в ответ на изменения в микроокружении, что, в свою очередь, может приводить к повышенной выживаемости этих клеток, а также устойчивости к химиотерапии (Bourguignon *et al.*, 2014). Отдельные изоформы CD44 также связаны с прогрессированием различных типов опухолей. Например, высокая экспрессия изоформы CD44v6 увеличивает метастазирование в опухолях поджелудочной железы, а также ассоциирована с плохим прогнозом у пациентов с колоректальным раком (Morath *et al.*, 2016). Увеличение экспрессии изоформы CD44v8-10 в раке молочной железы приводит к увеличению метастазирования в легкие (Yae *et al.*, 2012), а экспрессия изоформы CD44v3 ассоциирована с усилением миграции клеток плоскоклеточной карциномы головы и шеи (Reategui *et al.*, 2006).

1.3.6. Внутриклеточные протеогликаны

ПГ могут присутствовать внутри клетки, однако такая локализация нехарактерна и функции внутриклеточных ПГ изучены слабо. Наиболее изученым внутриклеточным протеогликаном является серглицин. Было показано, что он широко экспрессируется в гематопоэтических, эндотелиальных и гладкомышечных клетках, а также в фибробластах. Он несет до восьми цепей ГАГ различных типов ХС/ДС/ГС/Геп, прикрепленных к специфической последовательности корового белка, характеризующейся повторами Ser/Gly (Theocharis and Karamanos, 2019). Серглицин является единственным ПГ, который может нести в качестве цепи ГАГ гепарин. Серглицин хранится в цитоплазматических секреторных гранулах и везикулах и играет важную роль в их созревании. Он служит в качестве каркаса для хранения различных компонентов, включая факторы роста, цитокины и протеазы, а также играет важную роль в их секреции и доставке. Наиболее изучена функция серглицина в тучных клетках, где он необходим для правильной сборки

и упаковки многочисленных протеаз, которые выделяются при воспалении (Douaiher *et al.*, 2014).

В опухолевых клетках серглицин часто секретируется, а также может находиться на клеточной мембране (Korpetinou *et al.*, 2014). Серглицин также участвует в опухолевом ангиогенезе и способствует адгезии и миграции клеток миеломы (Purushothaman and Toole, 2014).

ПГ также обнаруживаются в клеточном ядре, хотя их функции там малоизучены. Внутриядерные ПГ были впервые описаны в 1970-х годах и было показано, что присутствие улеводных цепей ГАГ в ядре специфично для типа клеток (Bhavanandan and Davidson, 1975; Margolis *et al.*, 1976). Происхождение ядерных ПГ на данный момент до конца не ясно. Предполагается, что ПГ могут транслоцироваться в ядро с клеточной поверхности, а также ядерной траслокации подвергаются экзогенные ГС специфической структуры, причем в виде свободных цепей ГАГ, не связанных с коровым белком (Ishihara *et al.*, 1986). Благодаря высокому отрицательному заряду цепи ГАГ могут связываться со многими молекулами в клеточном ядре и, таким образом, влиять на их функции (Суховских и Григорьева, 2018). Например, показано, что синдекан-1 может образовывать комплекс с FGF-2, и эти молекулы транслоцируются в ядро по одинаковому пути и колокализованы в ядре. При этом увеличение экспрессии синдекана-1 в клетках приводит к накоплению FGF-2 в ядре, что говорит о функциональной значимоасти синдекана-1 в процессе транслокации данного фактора роста (Zong *et al.*, 2009). Роль ядерных ГСПГ также показана в регуляции пролиферативной активности клеток. Так, степень сульфатирования цепей ГС, накапливающихся в ядре, имеет отрицательную корреляцию со скоростью роста клеток, а экспериментальное снижение содержания ГС в ядре приводит к потере контактного торможения и чрезмерному росту культур клеток (Ishihara and Conrad, 1989). Ядерные ГСПГ также участвуют в регуляции ацетилирования гистонов, а потеря ядерного синдекана-1 может приводить к увеличению ацетилирования гистонов и экспрессии генов, ассоциирванных с агрессивным фенотипом миеломы (Purushothaman *et al.*, 2011).

Таким образом, множество исследований демонстрируют важность протеогликанов и гликозаминогликанов в функционировании нормальных тканей, а также развитии различных типов опухолей, что делает их интересными объектами исследования как для понимания процессов канцерогенеза, так и для разработки новых стратегий лечения злокачественных новообразований.

1.4. Протеогликаны в ткани головного мозга

Внеклеточный матрикс составляет около 20% ткани головного мозга. Особенностью ВКМ головного мозга является практически полное отсутствие коллагена и других фибриллярных белков, характерных для ВКМ других тканей, за исключением базальной мембраны и менингеальных слоев (Miyata and Kitagawa, 2017). Основными компонентами ВКМ головного мозга являются протеогликаны и гликозаминогликаны.

Экспрессия различных ПГ и их локализация ассоциированы с конкретными фазами развития ЦНС, что подразумевает их функциональное участие в этих процессах развития. Экспрессия различных типов протеогликанов во время развития мозга тесно связана с синхронизацией их функций в качестве корецепторов сигнальных молекул или в качестве субстратов, необходимых для роста новых типов клеток (Schwartz and Domowicz, 2018).

Например, известно, что передачу сигналов, необходимых для пролиферации и самообновления нейральных клеток-предшественников и дифференцировки нейрональных и глиальных подтипов, регулируют гепарансульфат протеогликаны (ГСПГ) (Bernfield *et al.*, 1999). С самых ранних стадий формирования головного мозга ГСПГ необходимы для регионализации нервной трубки в главные домены ЦНС и дифференцировки трех основных клеточных линий (нейронов, астроцитов и олигодендроцитов) из стволовых клеток (Inatani, 2003).

Аналогично, хондроитинсульфат протеогликаны (ХСПГ) важны для развития нервной системы, включая: эмбриональный цитокинез, активную пролиферацию нервных клеток, миграцию клеток нервного гребня в развивающуюся нервную трубку и неокортекс и пролиферацию и дифференцировку нервных стволовых клеток (Sirko *et al.*, 2007). В развивающемся головном мозге крысы показаны изменения паттерна экспрессии и содержания ХСПГ. Так, экспрессия аггрекана и бревикана постепенно растет до 5-месячного возраста, а экспрессия нейрокана быстро увеличивается в раннем постнатальном периоде, а затем снижается (Oohira *et al.*, 1994). Также известно, что изоформы версикана V0 и V1 активно экспрессируются при раннем созревании головного мозга, а затем их экспрессия снижается к двухмесячному возрасту, в то время как экспрессия изоформы V2 увеличивается в зрелом мозге (Schmalfeldt *et al.*, 1998).

Важность ПГ при развитии головного мозга была подтверждена рядом исследований, с использованием нокаутных животных или с применением специфических ферментов, разрушающих цепи ГАГ. Так, например, нокаут гена, кодирующего коровый белок глипикана-1, приводит к уменьшению размера мозга и преждевременной дифференцировке постмитотических нейронов (Jen *et al.*, 2009), а нокаут гена корового белка аггрекана приводит к преимущественной дифференцировке нервных стволовых

клеток в астроциты в головном мозге птиц (Domowicz *et al.*, 2008). Снижение содержания цепей ХС в развивающемся головном мозге, индуцированное инъекцией хондроитиназы в желудочки мозга, приводит к нарушению пролиферации и дифференцировки нейронов и глии (Sirko *et al.*, 2010). В зрелом мозге ПГ играют важную роль в формировании синапсов. ХСПГ аггрекан, версикан, бревикан и фосфакан являются компонентами так называемых перинейрональных сетей (perineuronal nets, PNNs), которые окружают нейроны и их дендриты в ЦНС (Galtrey *et al.*, 2008; Wang and Fawcett, 2012) и участвуют в формировании длительной памяти, направлении роста аксонов и синаптической пластичности (Miyata and Kitagawa, 2017).

Помимо изменения паттернов экспрессии в процессе развития головного мозга, ПГ дифференцированно экспрессируются в различных типах клеток головного мозга и часто локализованы в отдельных компартментах клеток, где они выполняют специализированные функции. Так, например, синдекан-3 активно экспрессируется в развивающемся мозге и концентрируется в аксонах, в то время как синдекан-2 активнее экспрессируется в зрелом мозге и локализуется в синапсах (Schwartz and Domowicz, 2018). Нейрокан, в основном, экспрессируется нейронами (Margolis and Margolis, 1997), версикан синтезируется астроцитами и олигодендроцитами (Lebaron, 1996), а аггрекан и бревикан экспрессируются как нейронами, так и глиальными клетками (Seidenbecher *et al.*, 1995). Интересно, что GPI-заякоренная форма бревикана специфична для глиальных клеток (Seidenbecher *et al.*, 1995).

Поскольку протеогликаны участвуют во всех основных процессах развития ЦНС, дефекты синтеза или деградации ПГ могут быть связаны с изменениями в любом из этих процессов и приводить к различным нарушениям функций головного мозга. Показано, что мутации в некоторых генах, кодирующих ферменты биосинтеза гликозаминогликанов, а также коровые белки протеогликанов, ассоциированы с психическими расстройствами. Например, мутации в генах, кодирующих ферменты ксилозилтрансферазу-1 и галактозилтрансферазу-2, участвующие в синтезе линкерного тетрасахарида ГАГ, приводят к умственной отсталости (Malfait *et al.*, 2013; Schreml *et al.*, 2013). Аналогично, делеция в гене *EXT1*, кодирующем фермент, участвующий в элонгации цепи ГС, ассоциирована с аутизмом (Li *et al.*, 2002), а loss-of-function мутации в гене *CHSY1*, который кодирует хондроитинсинтазу-1, характеризуются задержкой моторного и нервного развития (Li *et al.*, 2010). Помимо нарушения синтеза цепей ГАГ, нарушение модификации цепей ГС из-за миссенс-мутаций в гене *NDST1* вызывает интеллектуальные нарушения и эпилепсию (Reuter *et al.*, 2014).

При повреждении ткани головного мозга, которое обычно включает в себя разрыв аксонов и нарушение гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), происходит каскад нейровоспалительных реакций, включая активацию провоспалительных цитокинов и хемокинов, активацию астроцитов и микроглии, синтез и высвобождение ГСПГ, и образование глиального рубца (Gesteira *et al.*, 2016). Хотя образование глиального рубца имеет решающее значение в процессе заживления путем герметизации ГЭБ и восстановления гомеостаза, оно также связано с недостаточностью регенерации (Fawcett and Asher, 1999) из-за образования физического барьера, состоящего из реактивных астроцитов и ХСПГ, препятствующих восстановлению аксонов (Fawcett *et al.*, 2012). Разрушение цепей ХС хондроитиназой в глиальном шраме улучшает рост аксонов и приводит к восстановлению функций мозга в многочисленных моделях травм головного мозга (Miyata and Kitagawa, 2017). Ингибирующие свойства для роста аксонов показаны для CSPG4/NG2, декорина, бигликана, нейрокана, бревикана, фосфакана, версикана и аггрекана (Burnside and Bradbury, 2014).

Известно, что протеогликаны также играют важную роль в развитии опухолей, включая опухоли головного мозга. Вовлеченность различных ПГ показана для различных опухолей головного мозга, включая нейробластомы, медуллобластомы, эпендимомы, однако наибольший интерес для исследователей представляет роль ПГ в развитии глиобластомы.

1.5. Глиобластома

Глиобластома (ГБМ) является глиомой IV степени злокачественности (Grade IV), наиболее часто встречающейся злокачественной опухолью головного мозга, на которую приходится 16% всех первичных новообразований центральной нервной системы. Средний возраст пациентов с ГБМ – 64 года, однако данное заболевание может возникать в любом возрасте (Thakkar *et al.*, 2014). ГБМ классифицируют как первичные, возникшие de novo, без известного предшественника; или вторичные, когда опухоль низкой степени злокачественности с течением времени перерождается в ГБМ. Большинство ГБМ являются первичными, и пациенты с такими опухолями, как правило, имеют худший прогноз, чем пациенты с вторичными ГБМ (Wilson *et al.*, 2014).

1.5.1. Терапия глиобластомы

Лечение ГБМ требует междисциплинарного подхода. Современная стандартная терапия включает в себя максимально безопасную хирургическую резекцию с последующим одновременным облучением и химиотерапией темозоломидом (ТМЗ), пероральным алкилирующим химиотерапевтическим средством, а затем адъювантную химиотерапию ТМЗ (Davis, 2016).

Полная хирургическая резекция ГБМ практически невозможна, поскольку эти опухоли проявляют инфильтративный рост и часто находятся в жизненно важных областях мозга, включая области, которые контролируют речь, двигательную функцию и органы чувств. Из-за высокой степени инвазивности опухолевые клетки неизменно остаются в окружающем мозге, несмотря на радикальную резекцию первичной опухолевой массы, что впоследствии приводит к прогрессированию или рецидиву заболевания (Wilson *et al.*, 2014).

Послеоперационная лучевая терапия была стандартом адъювантной терапии до 2005 года, когда было показано, что эффективность радиотерапии с сопутствующей химиотерапией ТМЗ выше (Stupp *et al.*, 2005). Одновременно с радиотерапией ТМЗ обычно вводится в дозе 75 мг/м^2 ежедневно в течение шести недель. В качестве последующей химиотерапии применяется ТМЗ в дозе 150 мг/м^2 ежедневно в течение пяти дней каждый месяц. Согласно стандарту, химиотерапия ТМЗ должна продолжаться 6 месяцев, но на практике многие врачи продолжают циклы химиотерапии в течение 12–18 месяцев, хотя нет данных, подтверждающих эффективность настолько длительного лечения (Johnson *et al.*, 2015).

Несмотря на максимальную резекцию опухолевого узла и комплексную терапию, почти у 70% пациентов с ГБМ развивается рецидив заболевания в течение одного года после постановки диагноза (Stupp *et al.*, 2005), а пятилетняя выживаемость составляет менее 5% (Davis, 2016).

1.5.2. Потенциальные молекулярные механизмы развития глиобластомы

За последние два десятилетия было идентифицировано большое количество молекулярных изменений в глиомах (и особенно в глиобластоме), которые позволяют лучше охарактеризовать данный вид опухолей и определить сигнальные пути, которые нарушены при данном злокачественном заболевании.

Выявлен ряд генетических аномалий, которые предполагают участие определенных молекулярных и сигнальных путей в развитии и прогрессировании глиальных опухолей. Они включают потерю генов-супрессоров опухоли CDKN2A, RB1 и TP53, в дополнение к мутациям в генах, участвующих в сигнальных путях, регулируемых этими белками (Chen *et al.*, 2012). Мутации в генах IDH1, ATRX и p53 считаются характерными признаками анапластических астроцитом, а также вторичных ГБМ, и, что интересно, мутации TP53 также встречаются почти во всех случаях редкого гигантоклеточного варианта ГБМ (Aldape *et al.*, 2015). Также в глиомах происходит активация про-онкогенных сигнальных путей, например, с участием рецепторных

тирозинкиназ. В большинстве ГБМ также активированы сигнальные пути PI3K–AKT–mTOR и RAS–MAPK. Дерегулирующие мутации в этих путях включают мутации в генах, кодирующих каталитические (PIK3CA) или регуляторные (PIK3R1) домены PI3K, которые, в свою очередь, индуцируют активность этих ферментов, а также делеции и/или мутации в PTEN (Network, 2013). Недавние исследования продемонстрировали и наличие мутации или делеции соматического гена антагониста Ras нейрофибромина-1 в 15–18% первичных ГБМ (Parsons *et al.*, 2008).

ГБМ являются высоко гетерогенными по составу опухолевых клеток и обширному спектру ассоциированных с опухолью незлокачественных клеток, включая микроглию, астроциты, перициты и эндотелиальные клетки, которые поддерживают прогрессирование опухоли (Brandao *et al.*, 2019). Экспрессия многих компонентов ВКМ головного мозга, протеогликанов и связанных с ними белков, а также гиалуроновой кислоты, повышена в опухолевых клетках ГБМ и окружающих опухоль клетках стромы, что может способствовать инвазии и выживанию опухолевых клеток (Charles *et al.*, 2012).

1.6. Протеогликаны в глиобластоме

Экспрессия протеогликанов и ферментов, синтезирующих и модифицирующих их углеводные цепи ГАГ, в глиобластоме все еще изучена недостаточно.

1.6.1. Коровые белки протеогликанов в глиобластоме

Известно, что экспрессия коровых белков некоторых ПГ клеточной поверхности отличается в глиобластоме по сравнению с нормальной тканью головного мозга (Wade *et al.*, 2013). Наиболее изученными являются синдекан-1 (Xiong *et al.*, 2014), глипикан-1 (Listik and Toma, 2020), CSPG4/NG2 (Schiffer *et al.*, 2018) и CD44 (Mooney *et al.*, 2016).

Было показано, что экспрессия ГСПГ синдекана-1 в глиальных опухолях ассоциирована со степенью злокачественности опухоли: самая высокая экспрессия была обнаружена в глиобластоме IV степени злокачественности, а выживаемость пациентов с высокой экспрессией синдекана-1 в ткани опухоли была значительно ниже, чем пациентов с низкой экспрессией синдекана-1 (Xiong *et al.*, 2014). В недавнем исследовании было также показано, что повышение содержания синдекана-1 в плазме коррелирует со степенью злокачественности глиомы, что может быть использовано для малоинвазивной диагностики (Chandran *et al.*, 2019). Глипикан-1 стимулирует переход в S-фазу клеточного цикла и репликацию ДНК в клетках глиомы человека и нормальных астроцитах (Theocharis *et al.*, 2010). Снижение экспрессии глипикана-1 в клетках глиобластомы U251-MG приводит к значительному снижению миграции клеток, а также делает клетки более восприимчивыми к темозоломиду *in vitro* (Listik and Toma, 2020). Показано также, что

высокая экспрессия глипикана-1 в ткани опухоли ассоциирована с низкой общей выживаемостью пациентов с глиобластомой, а также диссеминированным ростом опухоли (Saito *et al.*, 2017).

Высокая экспрессия ХСПГ CSPG4/NG2 положительно коррелирует с низкой выживаемостью пациентов и множественной лекарственной устойчивостью, обусловленной повышенной активацией интегрина α3β1 и активацией PI3K/Akt путей сигналинга, способствуя выживанию клеток ГБМ (Schiffer *et al.*, 2018). Было показано, что нокдаун CSPG4/NG2 имеет противоопухолевый эффект и дополнительно сенсибилизирует опухолевые клетки к цитотоксическому лечению *in vitro* и *in vivo* (Chekenya *et al.*, 2008). Экспрессия CD44 ассоциирована с выживаемостью пациентов с глиобластомой - выживаемость более 20 месяцев после постановки диагноза была показана приблизительно у 40%, 20% и 10% пациентов с низким, средним и высоким уровнем экспрессии CD44 соответственно (Mooney *et al.*, 2016). Было показано, что CD44 усиливает инвазию опухолевых клеток ГБМ *in vitro*, а ингибирование CD44 моноклональными антителами снижает инвазивность клеточных линий ГБМ человека на 64% по сравнению с контролем (Merzak *et al.*, 1994) и адгезию клеток ГБМ к гиалуроновой кислоте и другим компонентам ВКМ, таким как хондроитинсульфат, фибронектин, ламинин и коллаген IV (Radotra *et al.*, 1994).

Из секретируемых ПГ в глиобластоме наиболее значительно повышается экспрессия версикана, что может стимулировать TGF-β2-индуцированную миграцию опухолевых клеток (Asher *et al.*, 2002). Последние исследования свидетельствуют, что изоформа версикана V1 регулирует пролиферацию и миграцию клеток ГБМ, в то время, как другие изоформы не оказывают на клетки ГБМ значительного влияния (Onken *et al.*, 2014). Интересно, что экспрессия других галектанов, аггрекана и бревикана, в ГБМ зависит от молекулярного подтипа опухоли (Giamanco and Matthews, 2012). Так, экспрессия аггрекана значительно увеличена в проневральном подтипе ГБМ по сравнению с другими подтипами, а экспрессия бревикана также увеличена в проневральном и уменьшена в мезенхимальном подтипах. Недавно было экспериментально показано, что нокдаун бревикана способствует снижению агрессивности глиальных опухолей (Dwyer *et al.*, 2014), а для опосредованного бревиканом усиления инвазии клеток ГБМ необходимо расщепление корового белка бревикана металлопротеиназой ADAMTS-5 (Nakada *et al.*, 2005). Было экспериментально подтверждено, что мутантная форма бревикана, которую не может расщепить ADAMTS-5, не способствует инвазии клеток ГБМ *in vitro* и усиленному росту экспериментальных опухолей *in vivo*, в отличие от нормального бревикана (Viapiano *et al.*, 2008).

Малый лейцин богатый протеогликан декорин в большинстве опухолей демонстрирует противоонкогенные свойства. Однако существующие данные относительно его роли в глиобластоме противоречивы. Показано, что активация экспрессии декорина при помощи аденовирусного вектора непосредственно в ксенографтных глиобластомах *in vivo* приводит к снижению экспрессии в опухоли ряда генов, ассоциированных с жизнеспособностью опухолевых клеток, а также к увеличению выживаемости животных (Ma *et al.,* 2014). В другом исследовании показано, что экспрессия декорина и люмикана ассоциирована с увеличением количества стволовых опухолевых клеток в нейросферах *in vitro*, а также с их устойчивостью к химиотерапии темозоломидом (Farace *et al.,* 2015).

1.6.2. Гликозаминогликаны в глиобластоме

Роль углеводных молекул ГАГ в глиобластоме изучена достаточно слабо. Показано, что цепи гепарансульфата способны связывать белок теплового шока Hsp90, тем самым регулируя опосредованную им миграцию и инвазию опухолевых клеток *in vitro*. Расщепление цепей ГС гепаритиназой, а также подавление сульфатирования цепей ГС снижает миграцию и инвазию клеток ГБМ *in vitro* (Snigireva *et al.,* 2019). В недавнем исследовании также была показана роль сульфатирования цепей хондроитинсульфата в инвазии клеток ГБМ. Клетки ГБМ активнее инвазируют *in vitro* в искусственные 3D матриксы, состоящие из высокосульфатированных цепей ХС, по сравнению с матриксами, состоящими из моносульфатированных цепей ХС или гиалуроновой кислоты (Logun *et al.,* 2019).

1.6.3. Система биосинтеза гликозаминогликанов в глиобластоме

В большинстве работ ГАГ в глиобластоме исследуются косвенно, путем анализа состояния системы биосинтеза ГАГ.

Экспрессия ферментов биосинтеза ГС в глиобластоме преимущественно подавлена, за исключением сульфотрансферазы HS3ST3a1 (Xiong *et al.,* 2014). Кроме того, сульфатазы, которые отщепляют сульфатную группу на 6-О положении ГС, также активируются в ГБМ (Xiong *et al.,* 2020). Противоречивые данные получены относительно фермента гепараназы, расщепляющего цепи ГС. Так, в ряде работ показано повышение ее экспрессии в ГБМ по сравнению с нормальной тканью головного мозга, что может активировать различные сигнальные пути, связанные с пролиферацией клеток (Xiong *et al.,* 2020), однако в других работах показано снижение содержания гепараназы в ткани опухоли, особенно под действием химиотерапии (Suhovskih *et al.,* 2020). Это

противоречие может объясняться значительной межопухолевой и внутриопухолевой гетерогенностью ГБМ, однако требует дальнейшего изучения.

В то же время экспрессия ферментов биосинтеза ХС в ГБМ преимущественно повышена. Наиболее исследован фермент хондроитинсинтаза-1. Показано, что его экспрессия повышена в глиомах и ассоциирована со степенью злокачественности опухоли. Увеличение экспрессии хондроитинсинтазы-1 приводит к повышенной жизнеспособности клеток ГБМ *in vitro* и усиленному росту ортотопической опухоли *in vivo*, в то время как подавление ее экспрессии замедляет рост опухоли (Liao *et al.*, 2020).

В целом, множество исследований подтверждают важную роль протеогликанов при развитии глиобластомы. Понимание молекулярных механизмов влияния протеогликанов на передачу сигнальной информации в опухоли и взаимодействие опухолевых клеток с их микроокружением является важной задачей для поиска новых опухолевых биомаркеров и мишеней для разработки таргетной терапии глиобластомы.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. МАТЕРИАЛЫ

2.1.1 Химические реактивы и расходные материалы

Нуклеозидтрифосфаты (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), ДНК - маркер 100bp PLUS, готовый к нанесению - «Диаэм», Россия;

Глицин, трис(оксиметил)аминометан, агароза, борная кислота - «Медиген», Россия;

10% нейтральный забуференный формалин (B06-003/1250), гематоксилин Майера (05-002/M) - «Биовитрум», Россия;

Taq-ДНК-полимераза 1 ед/мкл - ИМКБ СО РАН, Россия;

Натривая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА), красители бромфеноловый синий, ксиленцианол - «Serva», Германия;

Среда IMDM (12440061), среда Neurobazal A (10888022), добавка B27 (17504044), L-глютамин (35050038), пенициллин/стрептомицин (15140122), телячья эмбриональная сыворотка (FBS) (16000044), Трипсин/ЭДТА (15400054) - «Gibco», США;

Раствор для стабилизации РНК RNA*Later* (AM7021), реагент для выделения РНК TRIzol (15596026), покровная среда для сохранения флуоресценции с красителем для ядер SlowFade Gold antifade mountant with DAPI (S36938), ДМСО для культур клеток, Lab Vision™ HIER Buffer L (100X) (TA-135-HBL), RIPA-буфер (89900), флуоресцентный краситель SYBR Green, праймеры для ПЦР (Табл. 1) - «ThermoFisher Scientific», США;

Коктейль ингибиторов протеаз cOmplete mini (10481700) - «Roche», Германия;

Полупроницаемые вставки для органотипических культур Millicell (PICM0RG50), PVDF мембрана Immobilon-P (IPVH00010) - «Millipore», США;

Бромистый этидий, 2-меркаптоэтанол - «Amresco», США;

Краситель Хёхста bisBenzimide H 33342 trihydrochloride (14533), пропидий йодид (PI) (81845), Tween-20 (P9416), хондроитиназа AC из Flavobacterium heparinum (EC 4.2.2.5, C2780), хондроитиназа B из Flavobacterium heparinum (EC 4.2.2.19, C8058), хондроитинсульфат A (C9819), хондроитинсульфат C (27043), хондроитинсульфат B (C3788), бычий сывороточный альбумин (BSA) (A9418) - «Sigma», США;

Готовая смесь для ПЦР iTaq Universal SYBR Green Supermix (1725121), сухое обезжиренное молоко (1706404) - «BioRad», США;

Покровная среда Tissue-Tek® Glas™ (1408N) - «Sakura Finetek», США;

Темозоломид (ТМЗ) - «MSD», Финляндия;

Дексаметазон (ДКС) - «KRKA», Словения;

Прочие реактивы: этиловый спирт, ксилол, изопропиловый спирт, хлороформ, цитрат натрия, кислоты серная, уксусная, соляная – отечественного производства категории ОСЧ.

Таблица 1. Последовательности праймеров, использованных в работе

Описание	GeneBank	Ген	Организм	Последовательность
Синдекан-1	NM_002997	SDC1	Homo sapiens	F 5′-CTCTGGCTCTGGCTGTGC-3′ R 5′-AGCCATCTTGATCTTCAGGG-3′
	NM_013026.2	Sdc1	Rattus norvegicus	F 5’ - GAACCCACCAGCAGGGATAC - 3’ R 5’ - CACACTTGGAGGCTGATGGT - 3’
	NM_011519.2	Sdc1	Mus musculus	F 5’- GGTCTGGGCAGCATGAGAC -3’ R 5’- GGAGGAACATTTACAGCCACA -3’
Глипикан-1	NM_002081	GPC1	Homo sapiens	F 5′-AGATCTACGGAGCCAAGGG-3′ R 5′-TGTAGCCCTGGGGACAGAT-3′
	NM_030828.1	Gpc1	Rattus norvegicus	F 5’ - GCCAGATCTACGGGGCTAAG - 3’ R 5’ - AGACGCAGCTCAGCATACAG - 3’
	NM_016696.5	Gpc1	Mus musculus	F 5’- CTTTAGCCTGAGCGATGTGC -3’ R 5’- GGCCAAATTCTCCTCCATCT -3’
Перлекан	NM_001291860	HSPG2	Homo sapiens	F 5′-TCGGCCATGAGTCCTTCTAC-3′ R 5′-CCTGCTGTGTAGGAGAGGGT-3′
	XM_017593851.1	Hspg2	Rattus norvegicus	F 5’ - TGATGACGAGGACTTGCTGG - 3’ R 5’ - ACACCACACTGACAACCTGG - 3’
	NM_008305.3	Hspg2	Mus musculus	F 5’- CCGTGCTATGGACTTCAACG -3’ R 5’- TGAGCTGTGGAGGGTGTATG -3’
Версикан	NM_004385	VCAN	Homo sapiens	F 5′-TCTCCCCAGGAAACTTACGA-3′ R 5′-CACTCTTTTGCAGCCTCCTC-3′
	NM_001170558.1	Vcan	Rattus norvegicus	F 5’ - ATGTGGATCATCTGGACGGC - 3’ R 5’ - GTTTCGATGGTGGTTGCCTC - 3’
	NM_001081249.1	Vcan	Mus musculus	F 5’- GGAGGTCTACTTGGGGTGAG -3’ R 5’- GGGTGATGAAGTTTCTGCGAG -3’
Аггрекан	NM_001135	ACAN	Homo sapiens	F 5′-TTCTTGGAGAAGGGAGTCCA-3′ R 5′-ACAGCTGCAGTGATGACCCT -3′
Бревикан	NM_021948	BCAN	Homo sapiens	F 5′-ACCCCAGCCCTGGGTAG-3′ R 5′-GTCTCCTTCCAGAACATCTGC-3′
	NM_012916.2	Bcan	Rattus norvegicus	F 5’ -AGGGGACCTCACAAGTTCTTC - 3’ R 5’ - ATTTGACTCGGGGAAAGCCC -3’
	NM_012916.2	Bcan	Mus musculus	F 5’- GTGGAGTGGCTGTGGCTC -3’ R 5’- AACATAGGCAGCGGAAACC -3’
NG2	NM_001897	CSPG4	Homo sapiens	F 5′-TATGTTGGCCAGACTTGCAT-3′ R 5′-TGCAGGTCTATGTCGGTCAG-3′
	NM_031022.1	Cspg4	Rattus norvegicus	F 5’ - ATCTGGGAGGGGGCTATTGT - 3’ R 5’ - GTACGCCATCAGAGAGGTCG - 3’
	NM_139001.2	Cspg4	Mus musculus	F 5’- TCTTACCTTGGCCCTGTTGG -3’ R 5’- ACTCTGGTCAGAGCTGAGGG -3’
CD44	NM_000610	CD44	Homo sapiens	F 5′-GACAAGTTTTGGTGGCACG-3′ R 5′-CACGTGGAATACACCTGCAA-3′
	NM_009851.2	Cd44	Mus musculus	F 5’- CAAGTTTTGGTGGCACACAG -3’ R 5’- AGCGGCAGGTTACATTCAAA -3’
Серглицин	NM_002727	SRGN	Homo sapiens	F 5′-TCCTGGTTCTGGAATCCTCA-3′ R 5′-TTCTTCAAGGCAGTTTGCAG-3′
Декорин	NM_001920	DCN	Homo sapiens	F 5′-AATGCCATCTTCGAGTGGTC-3′ R 5′-TGCAGGTCTAGCAGAGTTGTGT-3′

	NM_024129.1	Dcn	Rattus norvegicus	F 5’ - AATGCCATCTCCGAGTGGTG - 3’ R 5’ - TTGTCGTGGAGTCGAAGCTC - 3’
	NM_007833.6	Dcn	Mus musculus	F 5’- CCCCTGATATCTATGTGCCC -3’ R 5’- GTTGTGTCGGGTGGAAAATC -3’
Бигликан	NM_001711	BGN	Homo sapiens	F 5′-AACTAGTCAGCCTGCGCCT-3′ R 5′-CTCCCAGAAGCCTCTCTGCT-3′
	NM_017087.1	Bgn	Rattus norvegicus	F 5’ - GAACAGTGGCTTTGAACCCG - 3’ R 5’ - CCTCCAACTCGATAGCCTGG - 3’
	NM_007542.5	Bgn	Mus musculus	F 5’- GCCTGACAACCTAGTCCACC -3’ R 5’- CAGCAAGGTGAGTAGCCACA -3’
Люмикан	NM_002345	LUM	Homo sapiens	F 5′-ACCAACTGTCAATGAAAACCTTG-3′ R 5′-AGTAGGATAATGGCCCCAGG-3′
	NM_031050.1	Lum	Rattus norvegicus	F 5’ - AATTTGACCGAGTCCGTGGG - 3’ R 5’ - GCCTTTCAGAGAAGCCGAGA - 3’
Нейрокан	NM_007789.3	Ncan	Mus musculus	F 5’- CCAGCGACATGGGAGTAGAT -3’ R 5’- GGGACACTGGGTGAGATCAA -3’
глицеральдегид 3-фосфат дегидрогеназа	NM_002046	GAPDH	Homo sapiens	F 5′-AAGGTGAAGGTCGGAGTCAA-3′ R 5′-AATGAAGGGGTCATTGATGG-3′
	NM_017008.4	Gapdh	Rattus norvegicus	F 5’ - ATGGCCTTCCGTGTTCCTAC - 3’ R 5’ - TCCAGGGTTTCTTACTCCTTGG - 3’
	NM_008084.3	Gapdh	Mus musculus	F 5’- CGTCCCGTAGACAAAATGGT -3’ R 5’- TTGATGGCAACAATCTCCAC -3’

2.1.2. Среды и буферы

Фосфатно-солевой буфер (PBS): 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4•2 H_2O, 2 mM KH_2PO_4, pH 7.4 - «Медиген», Россия;

PBST: PBS, 0,05% Tween-20;

Сбалансированный солевой раствор Хэнкса (HBSS): 1,26 мМ $CaCl_2$, 5,33 мМ KCl, 0,44 мМ KH_2PO_4, 0,5 мМ $MgCl_2$*$6H_20$, 0,41 мМ $MgSO_4$*$7H_2O$, 138 мМ NaCl, 4 мМ $NaHCO_3$, 0,3 мМ Na_2HPO_4, 5,6 мМ глюкоза - «ThermoFisher Scientific», США;

TBST: 20 mM Трис, 150 mM NaCl, 0,05% Tween-20, pH 7.6 - «ThermoFisher Scientific», США;

10x буфер для ПЦР: 10 мМ Tris-HCl, 1.7 мМ $MgCl_2$, 50 мМ KCl, pH 8.3

TBE: 89 мМ Трис, 0.05 М ЭДТА, 89 мМ борная кислота, pH 8.0

Цитратный буфер: 10 мМ цитрат натрия, 0,05% Tween-20, pH 6.0;

Реакционный буфер для хондроитиназы АС и хондроитиназы В: 150 мМ NaCl, 25 мМ K_2PO_4, pH 6.5;

Среда IMDM Complete: IMDM, 10% FBS, 2 мМ L-глютамин, 100 ед. пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицин;

Нейробазальная среда: Neurobazal A, 2% B27, 100 ед. пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина.

2.1.3. Коммерческие наборы

Набор для выделения и очистки РНК RNeasy Plus mini kit (74134) - «Qiagen», Германия;

Набор для определения концентрации РНК Qubit RNA BR Assay Kit (Q10210); набор для определения концентрации белка Pierce™ BCA Protein Assay Kit (23225); набор для обратной транскрипции РНК RevertAid First Strand cDNA Synthesis kit (K1622); набор для иммуногистохимического окрашивания с использованием автостейнера UltraVision Quanto HRP DAB kit (TL-125-QHD) - «ThermoFisher Scientific», США;

Хемилюминесцентный субстрат для проявки Optiblot ECL Substrate Kit (ab133406) - «Abcam», Великобритания.

2.1.4. Антитела

Мышиные моноклональные anti-Syndecan-1 (ab34164); кроличьи поликлональные anti-Decorin (ab175404); кроличьи поликлональные anti-NG2 (ab83178); козьи anti-mouse, коньюгированные с AlexaFluor 488 (ab150117); козьи anti-rabbit, коньюгированные с AlexaFluor 647 (ab150063); козьи anti-mouse IgG H&L, коньюгированные с пероксидазой хрена (HRP) (ab6789) - «Abcam», Великобритания;

Кроличьи моноклональные anti-Ki-67 - «Thermo Scientific», США;

Мышиные моноклональные anti-Heparan Sulfate (MAB2040) - «Millipore», США;

Мышиные моноклональные anti-Chondroitin Sulfate (C8035) - «Sigma», США.

2.1.5. Приборы

CO2 инкубатор NU-5510 («NuAire», США);

Центрифуга MiniSpin, центрифуга 5418R («Eppendorf», Германия);

Lab Vision™ Autostainer 720-2D, модуль PT для депарафинизации и демаскировки, флуориметр Qubit 3.0 («Thermo Scientific», США);

Амплификатор CFX-96, источник питания PowerPac HC, камера для горизонтального электрофореза Sub Cell, система визуализации гелей ChemiDoc («BioRad», США);

Лазерный конфокальный сканирующий микроскоп LSM 710, световой микроскоп Axiostar Plus («Carl Zeiss», Германия);

Лазерный конфокальный сканирующий микроскоп Fluoview FV1000 («Olympus», США);

Автоматическая система визуализации клеток IN cell Analyzer 2200 («GE Healthcare», США);

Чоппер для нарезки живой ткани McIlwain Tissue Chopper («Campden Instruments», США);

Высокопольный томограф BioSpec 117/16 USR («Bruker», Германия).

2.2. Клинические образцы тканей опухолей

Образцы тканей были получены от пациентов с опухолями головного мозга во время хирургического удаления опухоли в Национальном медицинском

исследовательском центре имени академика Е. Н. Мешалкина (НИИПК, г. Новосибирск) (Табл. 2). Образцы фиксировали в растворе RNALater (Thermo Scientific, USA) для дальнейших молекулярно-биологических исследований и в 10% нейтральном забуференном формалине для приготовления парафиновых блоков. Диагноз глиобластома (Grade IV) был установлен патоморфологами НИИПК согласно классификации опухолей головного мозга ВОЗ (Louis *et al.*, 2016). Суммарно 40 образцов ткани от 36 пациентов было использовано в исследовании (36 образцов ткани опухоли и 4 образца околоопухолевой ткани). Медиана выживаемости пациентов составила 11 месяцев, а средний и медианный возраст – 50 и 52 года соответственно. Все пациенты получали адъювантную радиотерапию в течение 30 дней в дозе 2 Гр/день на фоне темозоломида 75мг/м^2 и 3-12 курсов химиотерапии темозоломидом 150мг/м^2 в день 5 дней/месяц. Образцы ткани головного мозга, полученные от пациентов с генерализированной эпилепсией (мужчина, 18 лет) и сосудистой мальформацией (мужчина, 67 лет) были использованы в качестве контроля как не злокачественная ткань головного мозга. От всех пациентов имеется письменное информированное согласие на участие в исследовании, эксперименты соответствуют этическим принципам Хельсинкской декларации и стандартам биоэтических комитетов НИИПК и НИИМББ ФИЦ ФТМ.

Таблица 2. Клиническая информация пациентов с глиобластомой, образцы ткани которых были использованы в исследовании

Фактор	***N* (всего=36)**	**%**
Возраст		
Медиана (разброс)	52 (28–67)	
>52	17	47.2
≤52	19	52.8
Пол		
Мужчины	16	44.4
Женщины	20	55.6
Рецидив		
Да	18	50.0
Нет	18	50.0
Развитие опухоли		
Первичная	26	72.2
Вторичная	10	27.8
Локализация		
Лобная доля	14	33.3
Височная доля	14	38.9
Теменная доля	8	22.2

Другое	2	5.6
Резекция		
95-100%	21	58.3
80-95%	15	41.7
Смерть		
Да	34	94.4
Нет	2	5.6

2.3. МЕТОДЫ

2.3.1. Выделение суммарной РНК

Выделение суммарной клеточной РНК из ткани головного мозга проводили с помощью реагента Trizol (ThermoFisher Scientific, США). Образец ткани массой около 20 мг гомогенизировали в 500 мкл TRIzol Reagent. Инкубировали при комнатной температуре в течение 5 минут для полной диссоциации нуклеопротеиновых комплексов. К раствору добавляли 0,1 мл хлороформа, перемешивали в течение 15 секунд и инкубировали при комнатной температуре в течение 3 минут, затем центрифугировали при 12000 g в течение 15 минут при охлаждении до 4°C. Доочистку РНК проводили при комнатной температуре с использованием набора RNeasy Plus mini kit (Qiagen, Германия). Водную фазу образца переносили на колонку gDNA Eliminator, центрифугировали 15 секунд при 12000 g, к прошедшему через колонку раствору добавляли 1 объем 70% этилового спирта и перемешивали. Полученный раствор переносили на колонку RNeasy spin column и центрифугировали 15 секунд при 12000 g. На колонку наносили 700 мкл буфера RW1, центрифугировали 15 секунд при 12000 g, затем колонку дважды промывали добавлением 500 мкл буфера RPE и центрифугированием в течение 15 секунд при 12000 g, затем высушивали центрифугированием в течение 2 минут при 12000 g. Суммарную РНК элюировали с колонки в 30 мкл воды, свободной от РНКаз.

Выделение суммарной РНК из клеток проводили с использованием набора RNeasy Plus mini kit при комнатной температуре. Непосредственно перед выделением РНК к необходимому объему буфера RLT добавляли 1% β-меркаптоэтанола для приготовления лизирующего буфера. Клетки промывали PBS и осаждали центрифугированием при 2000g, супернатант удаляли, а к осадку добавляли 600 мкл свежеприготовленного лизирующего буфера и перемешивали на вортексе в течение 30 секунд. Лизат клеток переносили на колонку gDNA Eliminator, центрифугировали 15 секунд при 12000 g, к прошедшему через колонку раствору добавляли 1 объем 70% этилового спирта и перемешивали. Полученный раствор переносили на колонку RNeasy spin column и центрифугировали 15 секунд при 12000 g. На колонку добавляли 700 мкл буфера RW1,

центрифугировали 15 секунд при 12000 g, затем колонку дважды промывали добавлением 500 мкл буфера RPE и центрифугированием в течение 15 секунд при 12000 g, затем высушивали центрифугированием в течение 2 минут при 12000 g. Суммарную РНК элюировали с колонки в 30 мкл воды, свободной от РНКаз.

2.3.2. Горизонтальный электрофорез нуклеиновых кислот в агарозном геле

Анализ целостности РНК определяли методом горизонтального гель-электрофореза в 1%-ном агарозном геле, содержащем 0,5 мкг/мл бромистого этидия, в буфере TBE (89 мМ Трис, 0,05 М ЭДТА, 89 мМ борная кислота, pH 8.0) при напряженности электрического поля 6-8 В/см в течение 30 минут. Перед нанесением на гель к пробам добавляли 6х буфер для нанесения (50% глицерин, 0,1% бромфеноловый синий, 0,1% ксиленцианол). Сканирование геля проводили в УФ свете при помощи ChemiDoc (BioRad, США).

2.3.3. Определение концентрации РНК

Для измерения концентрации суммарной РНК использовали флуориметр Qubit 3.0 и набор реактивов Qubit RNA BR Assay Kit (ThermoFisher Scientific, США), следуя рекомендациям производителя. Рабочий раствор состоял из флюоресцирующего реагента (Qubit RNA BR Reagent) и буфера (Qubit RNA BR Buffer) в соотношении 1:200. Для калибровки прибора по двум точкам использовали смеси 190 мкл рабочего раствора и 10 мкл раствора 1 (Standard 1 C=0 нг/мкл) или раствора 2 (Standard 2 C=10 нг/мкл). Для определения концентрации РНК к 1 мкл выделенной РНК добавляли 199 мкл рабочего раствора, инкубировали при комнатной температуре 2 – 3 минуты и помещали в флуориметр.

2.3.4. Обратная транскрипция

кДНК синтезировали с использованием набора реагентов RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (ThermoFisher Scientific, США) согласно инструкции производителя. Реакцию обратной транскрипции проводили в объёме 20 мкл. К 1 мкг суммарной РНК добавляли 1 мкл 100 мкМ раствора праймера Oligo(dT)18 и воды до объема 12 мкл. Инкубировали при температуре 65°С в течение 5 минут. Охлаждали пробирку на льду и добавляли 4 мкл буфера 5X Reaction Buffer, 2 мкл смеси dNTP (10 мМ каждого), 1 мкл ингибитора РНКаз RiboLock RNase Inhibitor (20 ед./мкл) и 1 мкл фермента RevertAid M-MuLV Reverse Transcriptase (200 ед./мкл). Реакционную смесь инкубировали при 42°С в течение 1 часа. Реакцию останавливали нагреванием до 70°С в течение 5 минут.

2.3.5. ПЦР в реальном времени

Полуколичественную ПЦР в реальном времени проводили с использованием амплификатора CFX-96 (BioRad, США).

Реакционная смесь для проведения ПЦР с кДНК, полученной из клинических образцов опухолей человека или образцов тканей крыс, состояла из 0,25 мкл полученного раствора кДНК, 2,5 мкл 10×ПЦР-буфера (10 мМ Tris-HCl, 1.7 мМ $MgCl_2$, 50 мМ KCl, pH 8.3), по 10 пмоль прямого и обратного праймеров, 0,2 ммоль каждого дезоксинуклеозидтрифосфата, SYBR Green (ThermoFisher, США) в разведении 1:400 и 0,5 ед. акт. Taq-ДНК-полимеразы. Суммарный объем реакции составлял 25 мкл. ПЦР проводили при следующих условиях: предварительный прогрев при 95°C – 3 мин, после этого следовали 40 основных циклов: денатурация при 95°C – 15 с, отжиг при 59°C – 20 с, элонгация при 72°C – 30 с, сбор данных по флуоресценции в конце шага элонгации.

Реакционная смесь для проведения ПЦР с кДНК, полученной из культур клеток, органотипических срезов гиппокампа или образцов головного мозга мышей SCID, состояла из 0,25 мкл раствора кДНК, по 10 пмоль прямого и обратного праймеров и 10 мкл мастермикса iTaq Universal SYBR Green Supermix (BioRad, США). Суммарный объем реакции составлял 20 мкл. ПЦР проводили согласно инструкции производителя при следующих условиях: предварительный прогрев при 95°C – 1 мин, после этого следовали 40 основных циклов: денатурация при 95°C – 10 с, отжиг и элонгация при 60°C – 30 с, сбор данных по флуоресценции в конце шага элонгации.

Для контроля специфичности ПЦР использовали кривые плавления. В каждом эксперименте на один планшет помещали образцы исследуемых кДНК с праймерами на целевые гены и ген сравнения (по 3 повтора). В качестве гена сравнения использовали ген домашнего хозяйства глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы (GAPDH). Относительный уровень экспрессии генов оценивали с использованием значений пороговых циклов Ct по методу $2^{\Delta Ct}$. Последовательности праймеров, использованных в исследовании, указаны в таблице 1 в главе 2.1.1.

2.3.6. Dot-blot анализ

Гомогенизированные образцы ткани лизировали в RIPA-буфере (ThermoFisher Scientific, США) с добавлением ингибиторов протеаз cOmplete mini (Roche, Германия) на льду в течение 10 мин, затем обрабатывали ультразвуком и центрифугировали при 12000g в течение 15 мин при 4°C. Супернатант отбирали и измеряли концентрацию белка с помощью Pierce™ BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher Scientific, США). Полученный лизат разбавляли PBS до концентрации 1 мкг/мкл.

PVDF мембрану Immobilon-P (Millipore, США) активировали в 96% этаноле в течение 2 минут, инкубировали в PBS в течение 10 минут и подсушивали на воздухе. Лизаты образцов тканией разбавляли PBS до концентрации 1 мкг/мкл и наносили на мембрану точечно в объеме 1 мкл. Мембрану подсушивали до исчезновения капель, затем инкубировали в 5% сухом молоке в PBST для блокирования неспецифического связывания в течение 1 часа при комнатной температуре. Затем мембрану инкубировали с первичными антителами мышиными моноклональными anti-Chondroitin Sulfate (1:100, Sigma, США) или мышиными моноклональными anti-Heparan Sulfate (1:100, Millipore, США) при 4°C в течение ночи. Мембрану промывали PBST 3 раза по 15 минут и инкубировали с вторичными антителами козы anti-mouse, коньюгированными с пероксидазой хрена (1:2000, Abcam, Великобритания) при комнатной температуре в течение 1 часа. Мембрану промывали PBST 3 раза по 15 минут и инкубировали с хемилюминесцентным субстратом Optiblot ECL Substrate Kit (Abcam, Великобритания) для визуализизации специфического сигнала. Хемилюминесцентный сигнал фиксировали при помощи ChemiDoc (BioRad, США). Относительное содержание гликозаминогликанов в образцах оценивали денситометрически при помощи программного обеспечения ImageJ (Schneider *et al.*, 2012).

2.3.7. Иммуногистохимическое окрашивание

Для иммуногистохимического анализа срезы парафиновых блоков толщиной 3 мкм были окрашены с использованием Lab Vision™ Autostainer 720-2D и набора UltraVisionQuanto HRP DAB Protocol (ThermoFisher Scientific, США), согласно инструкции производителя. Депарафинизацию и демаскировку антигенов проводили в модуле PT с использованием Dewax and HIER Buffer L (ThermoFisher Scientific, USA). Затем проводили ингибирование эндогенной пероксидазы, инкубируя срезы в буфере UltraVision Hydrogen Peroxide Block buffer в течение 10 минут. Для блокировки неспецифического связывания антител срезы инкубировали с UltraVision Protein Block solution в течение 5 минут. Затем срезы инкубировали с первичными антителами в течение 1 часа: кроличьими поликлональными anti-NG2 (1:200, Abcam, Великобритания), кроличьми моноклональными anti-Ki-67 (RTU, ThermoFisher Scientific, США), мышиными моноклональными anti-Heparan Sulfate (1:200, Millipore, США) или мышиными моноклональными anti-Chondroitin Sulfate (1:200, Sigma, США). Специфический сигнал визуализировали с помощью Primary Antibody Amplifier Quanto (10 минут), HRP Polymer Quanto (10 минут) и DAB Quanto solution (5 минут). Инкубацию на всех этапах проводили при комнатной температуре. Между всеми этапами срезы промывали буфером TBST (ThermoFisher Scientific, США). Затем срезы контрастировали окрашиванием ядер

гемотоксилином, просветляли и заключали в покровную среду TissueTek (Sakura, США). Препараты анализировали на световом микроскопе Axiostar Plus с камерой AxioCam (Carl Zeiss, Германия) при увеличении x400. Содержание исследуемых антигенов оценивали полуколичественно.

2.3.8. Иммунофлуоресцентное окрашивание

Для иммунофлуоресцентного анализа срезы парафиновых блоков толщиной 3 мкм депарафинировали при помощи ксилола и спиртов различной концентрации: ксилол – 3 минуты 2 раза; этанол 100% - 3 минуты 2 раза; этанол 96% 3 минуты 2 раза; этанол 70% 2 минуты 1 раз. Споласкивали водой mQ, помещали в PBST буфер (PBS, 0,05% Tween-20). Демаскировку антигенов проводили нагреванием срезов в микроволновой печи до 95-99°C в цитратном буфере (10 мМ цитрат натрия, 0,05% Tween-20, pH 6,0) в течение 20 минут. Неспецифическое связывание антител блокировали инкубацией срезов с 1% BSA и 10% FBS в PBST при комнатной температуре в течение часа. Затем инкубировали срезы с первичными антителами в течение 1 часа при комнатной температуре: мышиными моноклональными anti-Syndecan-1 (1:200, Abcam, UK), кроличьими поликлональными anti-Decorin (1:200, Abcam, UK), кроличьими поликлональными anti-NG2 (1:200, Abcam, UK), мышиными моноклональными anti-Heparan Sulfate (1:200, Millipore, США) и мышиными моноклональными anti-Chondroitin Sulfate (1:200, Sigma, США).

Затем срезы отмывали в буфере PBST 3 раза по 5 минут и инкубировали с вторичными антителами, конъюгированными с флуоресцентными метками: anti-mouse, коньюгированными с AlexaFluor 488 и anti-rabbit, коньюгированными с AlexaFluor 647 (1:1000, Abcam, Великобритания) в течение 1 часа при комнатной температуре. Затем отмывали в буфере PBST 3 раза по 5 минут, наносили на срезы покровную среду SlowFade Gold antifade reagent with DAPI (ThermoFisher, США) и накрывали покровным стеклом. Препараты анализировали на лазерном конфокальном сканирующем микроскопе Fluoview FV1000 с программным обеспечением FV10-ASW Viewer (Olympus, США). Количественный анализ проводили при помощи программного обеспечения CellProfiler 2.2.0 (Lamprecht *et al.*, 2007).

2.3.9. Культивирование клеток

Культура клеток глиобластомы человека U87, а также культура клеток U87, стабильно экспрессирующих красный флуоресцентный белок RFP, были получены в Каролинском институте (Стокгольм, Швеция).

Клетки U87 культивировали в среде IMDM, содержащей 2 мМ L-глютамина, 100 ед. пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 10% фетальной бычьей сыворотки, в

5% CO2 атмосфере при 37°C в CO_2-инкубаторе. Для анализа клетки промывали фосфатно-солевым буфером (PBS), снимали с поверхности культуральных флаконов инкубированием с 0,05% трипсином в 0,53 мМ ЭДТА в течение 5 минут при комнатной температуре, осаждали центрифугированием при скорости 600 об/мин с использованием центрифуги MiniSpin (Eppendorf, Германия), осадок промывали фосфатно-солевым буфером, фиксировали в растворе RNA*Later* в течение 24 часов при температуре +4°C и хранили при -20ºC.

Обработку клеток химиотерапевтическими препаратами проводили следующим образом. Препарат темозоломида (ТМЗ) (MSD, Финляндия) растворяли в ДМСО для получения стокового раствора с концентрацией 100 мМ. Препарат дексаметазона (ДКС) (KRKA, Словения) использовали в виде раствора с концентрацией 4 мг/мл, поставляемого производителем. Раствор темозоломида в ДМСО и/или дексаметазона добавляли в культуральную среду до финальной концентрации: ТМЗ (63, 125, 250, 500, 1000 или 2000 мкМ) и ДКС (1, 5, 25, 125 мкМ), и инкубировали в течение 24 часов. Затем клетки промывали фосфатно-солевым буфером, снимали с поверхности и фиксировали в растворе RNA*Later*, как описано выше.

2.3.10. Определение жизнеспособности, апоптоза и пролиферации клеток *in vitro*

Жизнеспособность клеток U87, их апоптоз и пролиферацию оценивали при помощи окрашивания Hoechst 33342/PI, согласно протоколу (Lee and Shacter, 1999). Клетки U87 рассаживали на 96-луночные планшеты в плотности $3*10^3$ клеток на лунку. Через 24 часа к клеткам добавляли раствор ТМЗ (до финальной концентрации в среде 63, 125, 250, 500, 1000 или 2000 мкМ), или ДКС (до финальной концентрации в среде 1, 5, 25,125 мкМ), или комбинацию ТМЗ и ДКС (125, 250 или 500 мкМ и 1 или 25 мкМ, соответственно). К клеткам в контрольных лунках добавляли ДМСО в концентрации 0,5% или 2%, соответствующей концентрации ДМСО при добавлении раствора ТМЗ до концентрации 500 мкМ или 2000 мкМ, соответственно. Через 24, 48 и 72 часа по три лунки с каждой концентрацией препаратов инкубировали с флуоресцентными красителями Hoechst 33342 в течение 30 минут при 37°C и пропидий йодидом в течение 10 минут при 37°C. При помощи системы высокопроизводительного анализа клеток IN Cell Analyzer 2200 (GE Healthcare, UK) производили автоматическую съемку 6 полей в каждой лунке при увеличении x200 в режимах проходящего света и флуоресценции. Полученные изображения использовали для подсчета живых и мертвых клеток и количества апоптозов с использованием программного обеспечения IN Cell Investigator software (GE Healthcare, UK).

2.3.11. Органотипическая культура срезов гиппокампа крысы *ex vivo*

Для органотипических культур *ex vivo* были использованы крысята линии Wistar возрастом 7-9 дней, полученные в виварии ИЦИГ СО РАН. Время от момента изъятия крысят из материнского гнезда до начала эксперимента составляло не более 2 часов.

Органотипическую культуру срезов гиппокампа крыс приготовляли согласно описанному в литературе протоколу (Opitz-Araya and Barria, 2011). Крысят забивали декапитацией, в стерильных условиях извлекали головной мозг и помещали в холодный HBSS. Отделяли гиппокамп и нарезали на поперечные срезы толщиной 400 мкм с использованием ручного чоппера McIlwain Tissue Chopper (Campden Instruments, США). Срезы переносили на культуральные вставки Millicell (Millipore, США), помещенные лунки в 6-луночного культурального планшета, содержащие по 1,2 мл среды IMDM с содержанием 30% HBSS, 10% FBS, 2 мМ L-глютамина, 100 ед. пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина и культивировали в атмосфере с 5% CO_2 при 37°C в CO_2-инкубаторе. Среду в лунках обновляли 2-3 раза в неделю с постепенной сменой на нейробазальную среду (Neurobazal A + B27 supplement).

2.3.12. Обработка органотипических срезов гиппокампа крысы химиотерапевтическими препаратами

Для изучения влияния химиотерапевтических препаратов органотипические срезы гиппокампа крысы культивировали как описано выше в течение 6 дней, на 7 день эксперимента в культуральную среду добавляли ТМЗ (до финальной концентраци в среде 250 мкМ) и/или ДКС (финальной концентраци в среде 1 мкМ). Через 24 часа срезы промывали PBS и фиксировали в растворе RNA*Later* для последующего анализа экспрессии ПГ или промывали культуральной средой, не содержащей препараты, и использовали для совместного культивирования с клетками глиобластомы.

2.3.13. Изменение содержания ГАГ в культуре органотипических срезов гиппокампа крысы

Для изучения влияния содержания ГАГ в ткани применяли два подхода.

Для разрушения эндогенных ГАГ использовали ферменты хондроитиназу АС (EC 4.2.2.5) и хондроитиназу В (EC 4.2.2.19), ресуспендированные в реакционном буфере (150 мМ NaCl, 25 мМ K_2PO_4, pH 6.5). На 8 день эксперимента на срез в объеме 10 мкл наносили хондроитиназу АС (0,5 ед./мл) или хондроитиназу В (30 ед./мл), инкубировали 1 час при 37°C и 5% CO_2, затем промывали культуральной средой, не содержащей ферментов, и использовали для совместного культивирования с клетками глиобластомы.

Для увеличения количества ГАГ в культуре, на 8 день эксперимента в культуральную среду добавляли смесь хондроитинсульфатов А и С или хондроитинсульфата В до финальной концентрации в среде 0,5 мг/мл и поддерживали содержание экзогенных ГАГ в среде при совместном культивировании с клетками глиобластомы.

2.3.14. Совместное культивирование клеток глиобластомы с органотипическими срезами

Для совместного культивирования органотипических срезов гиппокампа крысы и клеток глиобластомы человека клетки U87, стабильно экспрессирующие RFP, снимали с поверхности культуральных флаконов стандартным методом с использованием трипсин/ЭДТА, осаждали центрифугированием и ресуспендировали в нейробазальной среде.

Для оценки адгезии опухолевых клеток к поверхности органотипического среза на каждый срез наносили по 12500 клеток в 10 мкл среды, инкубировали 2 часа при 37°C и 5% CO_2, трижды промывали в PBS, а затем фиксировали в 10% нейтральном формалине при 4°C в течение 16 часов.

Для оценки пролиферации опухолевых клеток и их инвазии в органотипический срез на каждый срез наносили по 2500 клеток в 5 мкл среды, инкубировали в течение 7 дней при 37°C и 5% CO_2, а затем промывали в PBS и фиксировали в 10% нейтральном формалине при 4°C в течение 16 часов. После фиксации срезы трижды промывали в PBS, переносили на предметное стекло, и закрывали покровным стеклом с использованием покровной среды SlowFade Gold (ThermoFisher Scientific, США), содержащей ядерный краситель DAPI. Совместную культуру визуализировали при помощи лазерного конфокального сканирующего микроскопа LSM 710 (Carl Zeiss, Германия). Сканирование проводили в режимах z-stack и tile-scan для визуализации сигнала по всей толщине и площади среза.

Адгезию опухолевых клеток оценивали как площадь поверхности среза, занятую опухолевыми клетками. Пролиферацию опухолевых клеток оценивали как процент площади, занятой опухолевыми клетками в режиме проекции максимальной интенсивности. Инвазию опухолевых клеток оценивали как процент площади, занятой опухолевыми клетками, на глубине 25 микрон от поверхности среза. Получение, обработку и анализ изображений проводили с использованием программного обеспечения ZEN Black 2012 (Carl Zeiss, Германия).

2.3.15. Изучение влияния химиотерапевтических препаратов на головной мозг крыс *in vivo*

Для экспериментов *in vivo* использовали самцов крыс линии Wistar (возраст на начало эксперимента – 2 месяца, вес - 200 – 250 г). Крыс содержали в поликарбонатных клетках по 3-4 особи в клетке со свободным доступом к корму и воде, при естественном режиме свет/темнота, относительной влажности 50-60% и температуре 23-26°С. Для изучения влияния темозоломида и дексаметазона на экспрессию протеогликанов головного мозга *in vivo* 35 животных случайным образом разделяли на группы (по 5 животных в группе):

Группа 1 – физ.раствор подкожно в объеме 200 мкл ежедневно в течение 5 дней;

Группа 2 – дексаметазон 5мг/кг подкожно в объеме ~300 мкл однократно;

Группа 3 – дексаметазон 2,5мг/кг подкожно в объеме ~150 мкл на 2 и 4 дни эксперимента;

Группа 4 –дексаметазон 1мг/кг подкожно в объеме ~60 мкл ежедневно в течение 5 дней;

Группа 5 – темозоломид 30мг/кг перорально в объеме ~50 мкл ежедневно в течение 5 дней;

Группа 6 - темозоломид 30мг/кг перорально в объеме ~50 мкл ежедневно в течение 5 дней и дексаметазон 2,5мг/кг подкожно в объеме ~150 мкл на 2 и 4 дни эксперимента.

Препарат темозоломида поставляется производителем в виде порошка в капсуле. Поскольку водный раствор темозоломида нестабилен, необходимое количество порошка взвешивали и растворяли в воде непосредственно перед введением животным.

Животных из группы 2 выводили из эксперимента через 24 часа. Животных из остальных групп выводили из эксперимента через 48 часов после последнего введения препаратов. Схема эксперимента приведена на рисунке 7.

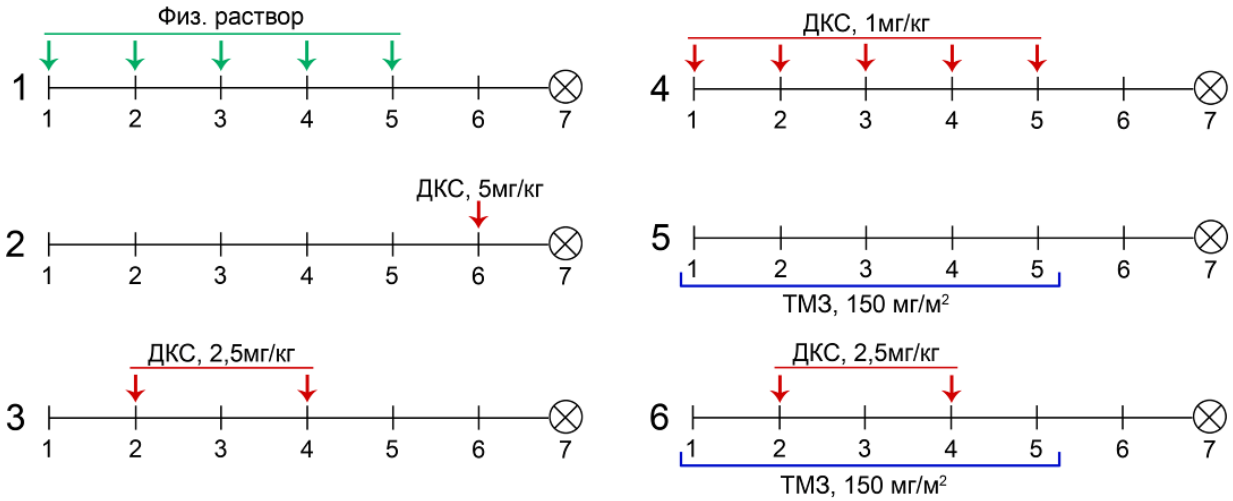


Рисунок 7. Схема введения препаратов группам животных (1-6) в эксперименте по изучению влияния химиотерапии глиобластомы на нормальный мозг крысы.

Животных забивали декапитацией использованием гильотины согласно руководству по гуманной эвтаназии животных (National Research Council Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory, 2011), извлекали головной мозг, из одного полушария отделяли кору головного мозга и гиппокамп, помещали их в раствор RNA*Later*, инкубировали 24 часа при +4°C и хранили при -20°C для дальнейших молекулярно-биологических исследований. Кору головного мозга и гиппокамп второго полушария помещали в 10% нейтральный забуференный формалин, инкубировали 24 часа при комнатной температуре и использовали для приготовления парафиновых блоков. Все эксперименты с животными были выполнены с соблюдением принципов гуманности в соответствии с директивой Европейского сообщества (86/609/EEC).

2.3.16. Изучение влияния химиотерапевтических препаратов на рост экспериментальных опухолей в модели рецидива глиобластомы *in vivo*

Для изучения влияния темозоломида и дексаметазона на рост экспериментальных опухолей *in vivo* использовали животных с пониженным уровнем иммунитета – бестимусных мышей линии SCID (SCID Hairless Outbred SHO-$Prkdc^{scid}Hr^{hr}$ Mouse) (возраст на начало эксперимента – 10 недель, вес - 20 – 25 г). Работа с мышами линии SCID проводилась на базе ЦКП «SPF-виварий» института цитологии и генетики СО РАН (г. Новосибирск). Животные содержались в индивидуально вентилируемых клетках (IVC) системы OptiMice («Animal Care Systems», США) группами по 2-5 особей в контролируемых условиях, при температуре 22-26 °C, относительной влажности 30–60 % и световом режиме свет/темнота 14/10 (включение света 02:00, выключение – 16:00) со свободным доступом к корму и воде, обогащенной минеральной смесью Северянка («Северянка», Россия).

64 самца мышей SCID были в случайном порядке разбиты на 4 группы по 16 животных в группе:

Контроль – внутрижелудочное введение воды в объеме 240 мкл;

ТМЗ – внутрижелудочное введение темозоломида 30мг/кг в объеме 240 мкл;

ДКС – внутрибрюшинная инъекция дексаметазона 1мг/кг в объеме 100 мкл;

ТМЗ+ДКС – внутрижелудочное введение темозоломида 30мг/кг в объеме 240 мкл и внутрибрюшинная инъекция дексаметазона 1мг/кг в объеме 100 мкл.

Препараты вводили экспериментальным животным согласно схеме: три цикла по 5 дней подряд введение с 9-дневным перерывом между циклами (всего 15 введений препаратов). Животных взвешивали 1 раз в неделю, начиная с первого дня, до гибели животного или вывода его из эксперимента.

На 39 сутки после начала эксперимента по 6 животных из каждой группы выводили из эксперимента цервикальной дислокацией согласно руководству по гуманной эвтаназии животных (National Research Council Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory, 2011), извлекали головной мозг, одно полушарие помещали в раствор RNA*Later* для дальнейших молекулярно-биологических исследований, инкубировали 24 часа при +4°C и хранили при -20°C, а второе – в 10% нейтральный забуференный формалин, инкубировали 24 часа при комнатной температуре и использовали для приготовления парафиновых блоков. Оставшимся животным ортотопически вводили опухолевые клетки глиобластомы человека U87. Схема эксперимента представлена на рисунке 8.

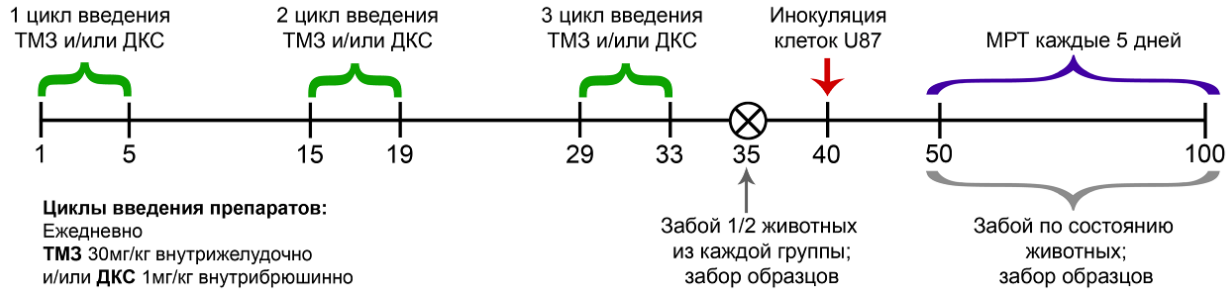


Рисунок 8. Схема эксперимента, использванного для моделирования рецидива глиобластомы на мышах SCID.

Все эксперименты с животными были выполнены с соблюдением принципов гуманности в соответствии с директивой Европейского сообщества (86/609/EEC).

2.3.17. Ортотопическая ксенотрансплантация клеток U87 мышам линии SCID

Перед операцией животное помещали в камеру с протоком воздуха 450–500 мл/мин и концентрацией изофлюрана в воздушной смеси 1,5%. Через 3 мин животное переносили на подогреваемый операционный столик с температурой поверхности 37°C и помещали под наркозную маску с подачей изофлюрана в концентрации 1,5% в воздушной смеси. Суспензию клеток U87 вводили в подкорковые структуры мозга через отверстие в черепной коробке животного. Для этого на голове в каудально-краниальном направлении делали надрез кожи длиной 3–4 мм в районе брегмы и через отверстие в черепной коробке вводили 5 мкл суспензии клеток (500 тыс. клеток на одно животное) (Shchelkunov *et al.*, 2018). Эксперименты были выполнены с соблюдением принципов гуманности в соответствии с директивой Европейского сообщества (86/609/EEC).

Динамику роста опухолей исследовали с помощью магнитно-резонансной томографии (МРТ) на высокопольном томографе BioSpec 117/16 USR (Bruker, Германия), 11.7 Т. Животных для исследования наркотизировали изофлюраном (1,5% изофлюрана в кислородной смеси при скорости потока 350-450 мл/мин).

Размеры опухолей оценивали с помощью Т2-взвешенных изображений методом TurboRARE (Rapid Imaging with Refocused Echoes) с характеристиками: параметры импульсной последовательности метода (TE = 33 мс, TR = 1500 мс), параметры изображения (размер 2,5 × 2,5 см; матрица 512 × 512 пикселей (размер пикселя – 0,05 × 0,05 мм)); толщина среза – 0,05 мм; расстояние между срезами – 0,05 мм; количество срезов – 15; ориентация срезов аксиальная, общее время сканирования – 3 мин. Значения размеров опухоли высчитывали с помощью пакета программ Paravision 5.0 (Bruker, Германия), основываясь на разнице в контрасте между окружающими тканями и опухолью. Полученный объем опухоли выражали в мкл. Контрастность опухоли оценивали как отношение МРТ сигнала в области новообразования к МРТ сигналу окружающих нервных тканей той же площади.

2.3.18. Статистическая обработка результатов

Результаты представлены в виде средней величины и стандартного отклонения (M ± SD). Нормальность распределения оценивали при помощи критерия Шапиро-Уилка. Достоверность отличий оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа ANOVA с апостериорным критерием Фишера для определения различий между группами (уровень значимости $p < 0,05$, $p < 0,01$ или $p < 0,001$) при помощи программного обеспечения OriginPro 8.5. Для оценки связи исследуемых параметров с общей и безрецидивной выживаемостью пациентов были использованы метод Каплана-Мейера и модель пропорциональных рисков Кокса (программное обеспечение MedCalc 12.5.0.0).

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. Протеогликаны в опухолях головного мозга человека *in vivo*

3.1.1. Экспрессия протеогликанов в глиомах различной степени злокачественности

Для изучения вовлеченности протеогликанов в канцерогенез опухолей головного мозга человека была определена экспрессия генов коровых белков протеогликанов синдекана-1 (SDC1), глипикана-1 (GPC1), перлекана (HSPG2), аггрекана (ACAN), версикана (VCAN), бревикана (BCAN), CSPG4/NG2, CD44, серглицина (SRGN), декорина (DCN), бигликана (BGN) и люмикана (LUM) в клинических образцах астроцитарных опухолей головного мозга человека *in vivo* методом ОТ-ПЦР в реальном времени (Рис. 9). Уровень экспрессии оценивали в относительных единицах, используя в качестве гена сравнения ген глицеральдегид 3-фосфат дегидрогеназы (GAPDH). Экспрессия протеогликанов была оценена в образцах астроцитом 2-4 степени злокачественности (Grade II, III, IV), в качестве контроля была использована ткань головного мозга, полученная от пациентов без злокачественных новообразований.

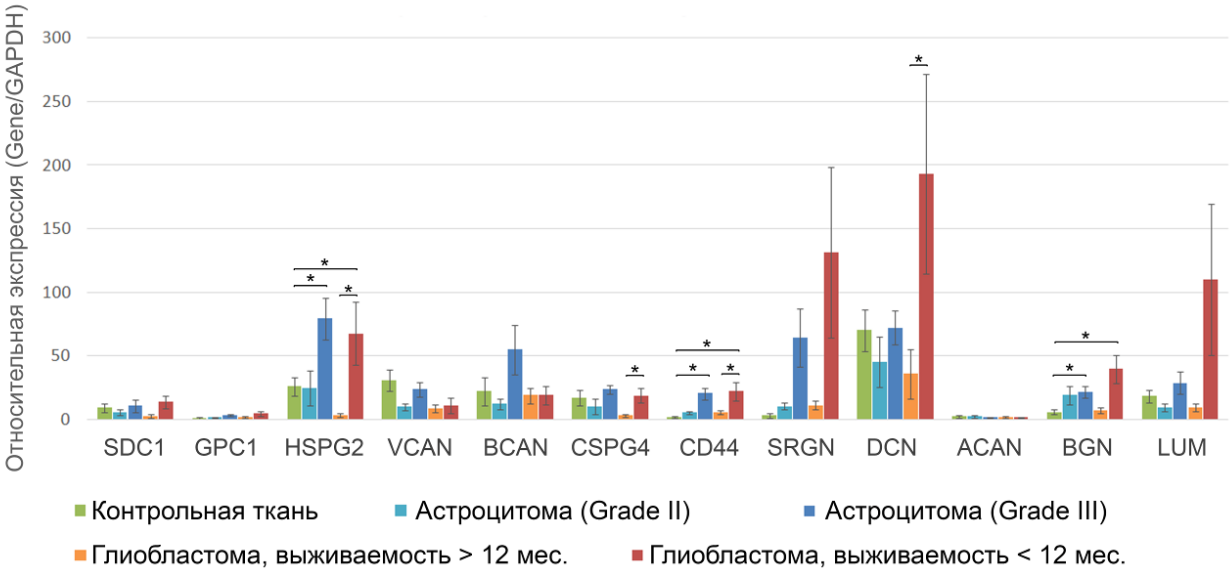


Рисунок 9. Экспрессия протеогликанов в астроцитарных опухолях головного мозга человека. Результаты ОТ-ПЦР в реальном времени. Приведены средние значения для группы ± SD, * - p <0,05.

Было показано, что паттерн экспрессии протеогликанов значительно изменяется с повышением уровня злокачественности опухоли. Так, в опухолях Grade II экспрессия исследуемых протеогликанов статистически значимо не отличалась от таковой в контрольной ткани. В астроцитомах Grade III была значительно повышена экспрессия

перлекана (+3,1 раза, p <0,05), CD44 (+11 раз, p <0,05) и бигликана (+3,7 раз, p <0,05) по сравнению с контрольной тканью.

Экспрессия протеогликанов в глиобластомах (Grade IV) проявляла высокую гетерогенность. Для дальнейшего анализа пациенты с диагнозом «глиобластома» были разделены на две группы по выживаемости на условно «хороший прогноз» (общая выживаемость более 12 месяцев) и «плохой прогноз» (общая выживаемость менее 12 месяцев). Было показано, что экспрессия протеогликанов в опухолях Grade IV с «хорошим прогнозом» достоверно не отличалась от таковой в контрольной ткани, тогда как в опухолях Grade IV с «плохим прогнозом» была значительно повышена экспрессия перлекана (+2,6 раза, p <0,05), CD44 (+12,1 раза, p <0,05) и бигликана (+6,9 раза, p <0,05) по сравнению с контрольной тканью головного мозга. Сравнение уровней экспрессии практически всех исследованных протеогликанов в опухолях с «плохим прогнозом» по сравнению с опухолями с «хорошим прогнозом» выявило статистически значимое увеличение экспрессии для перлекана (+14 раз, p <0,05), CSPG4/NG2 (+2,5 раза, p <0,05), CD44 (+2,7 раза, p <0,05), декорина (+6 раз, p <0,05) и бигликана (+5,8 раза, p <0,05).

Таким образом, экспрессия некоторых протеогликанов изменяется в глиомах, с общей тенденцией к увеличению уровня экспрессии с ростом степени злокачественности опухоли.

3.1.2. Ассоциация экспрессии протеогликанов с выживаемостью пациентов с глиобластомой

Для определения клинической значимости изменения экспрессии протеогликанов в ткани опухоли данные об экспрессии протеогликанов были проанализированы в сочетании с клиническими данными пациентов (возраст, пол, локализация опухоли, общая выживаемость).

При помощи анализа выживаемости Каплана-Мейера было показано, что высокая экспрессия CSPG4/NG2 (p =0,036), декорина (p =0,049) и перлекана (p =0,024) ассоциирована с низкой выживаемостью пациентов с глиобластомой (Рис. 10). Для бигликана и CD44 достоверных различий в выживаемости пациентов показано не было (Tsidulko *et al.*, 2015).

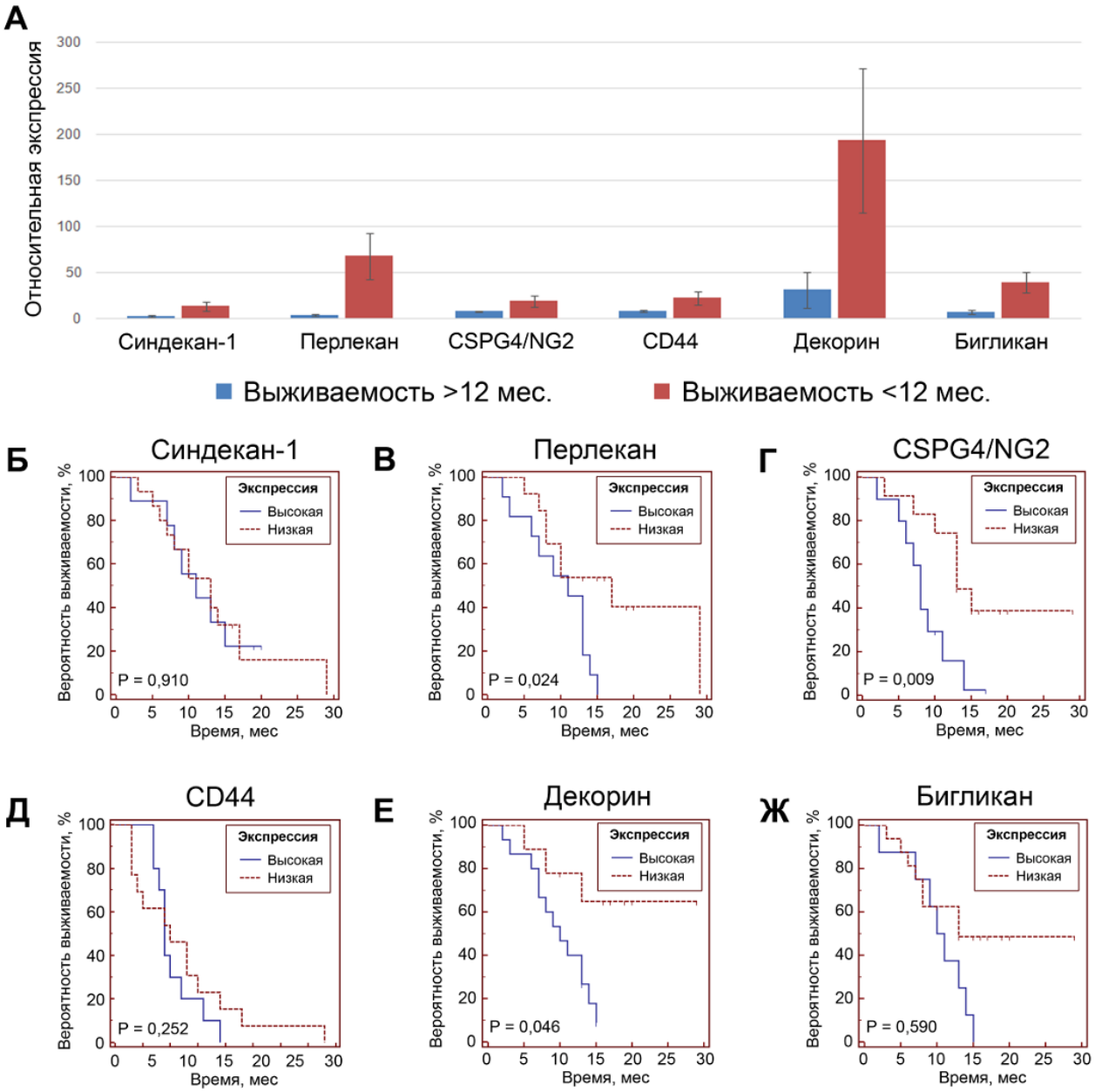


Рисунок 10. Ассоциация экспрессии протеогликанов с выживаемостью пациентов. А – результаты ОТ-ПЦР в реальном времени, относительная экспрессия определена по методу 2^{dCt}, данные представлены в виде среднего значения ±SD. Б-Ж – анализ выживаемости Каплана-Мейера для пациентов с высокой или низкой экспрессией протеогликанов в опухоли: Б – синдекана-1, В – перлекана, Г - CSPG4/NG2, Д – CD44, Е – декорина, Ж – бигликана.

Увеличение экспрессии CSPG4/NG2 в опухолях пациентов с выживаемостью менее 12 месяцев было подтверждено на белковом уровне методом иммуногистохимического анализа (Рис. 11) (Tsidulko *et al.*, 2017).

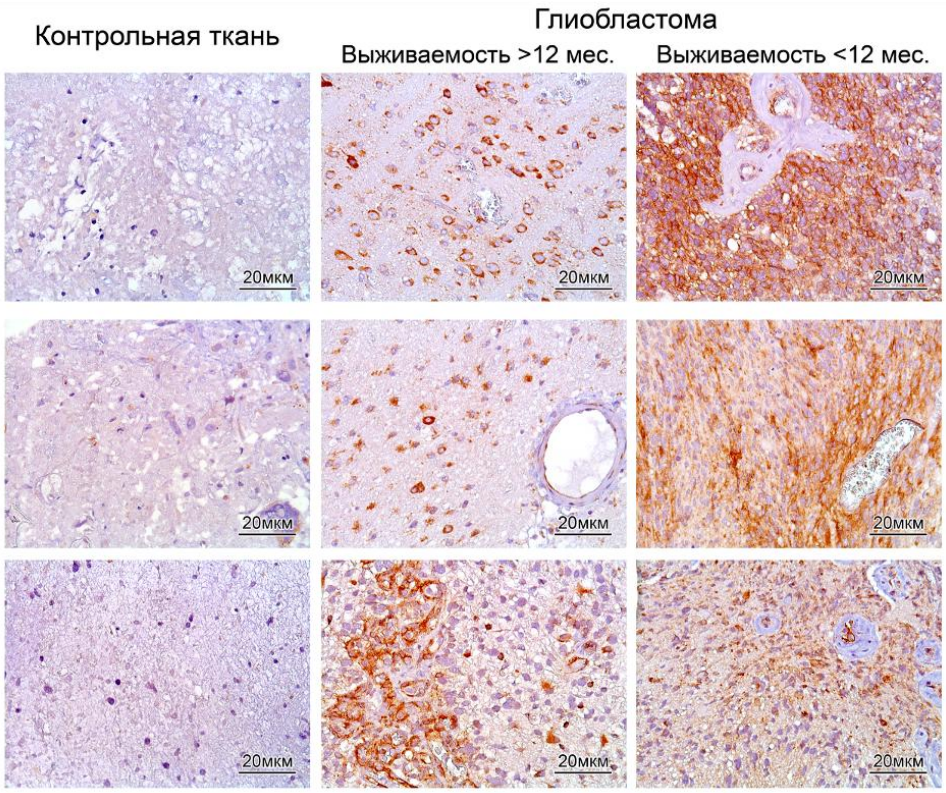


Рисунок 11. Экспрессия протеогликана CSPG4/NG2 в глиобластоме. Иммуногистохимическое окрашивание с использованием антител, специфичных к CSPG4/NG2 в условно нормальной и опухолевой ткани головного мозга; увеличение 400x.

Таким образом, показано, что экспрессия CSPG4/NG2, декорина и перлекана в опухоли ассоциирована с выживаемостью пациентов с глиобластомой, что позволяет предложить данные молекулы в качестве маркеров для уточняющей диагностики и прогнозирования течения заболевания.

3.2. Гликозаминогликаны в опухолях головного мозга человека *in vivo*

Поскольку функции протеогликанов определяются не только свойствами коровых белков, но и, во многом, составом цепей ГАГ, было изучено содержание углеводных цепей гликозаминогликанов в глиобластомах методом ИГХ с использованием антител, специфичных непосредственно к цепям ГАГ.

3.2.1. Хондроитинсульфат

Было показано, что в глиобластоме повышено содержание углеводных цепей хондроитинсульфата (ХС) по сравнению с нормальной тканью головного мозга. При этом для содержания ХС характерна внутриопухолевая гетерогенность, которая не связана с определенным морфологическим типом клеток. Накопление ХС ассоциировано с отдельными структурами: перинекротической зоной, периваскулярной зоной, утолщенной стенкой кровеносных сосудов опухоли и псевдопалисадными структурами (Рис. 12).

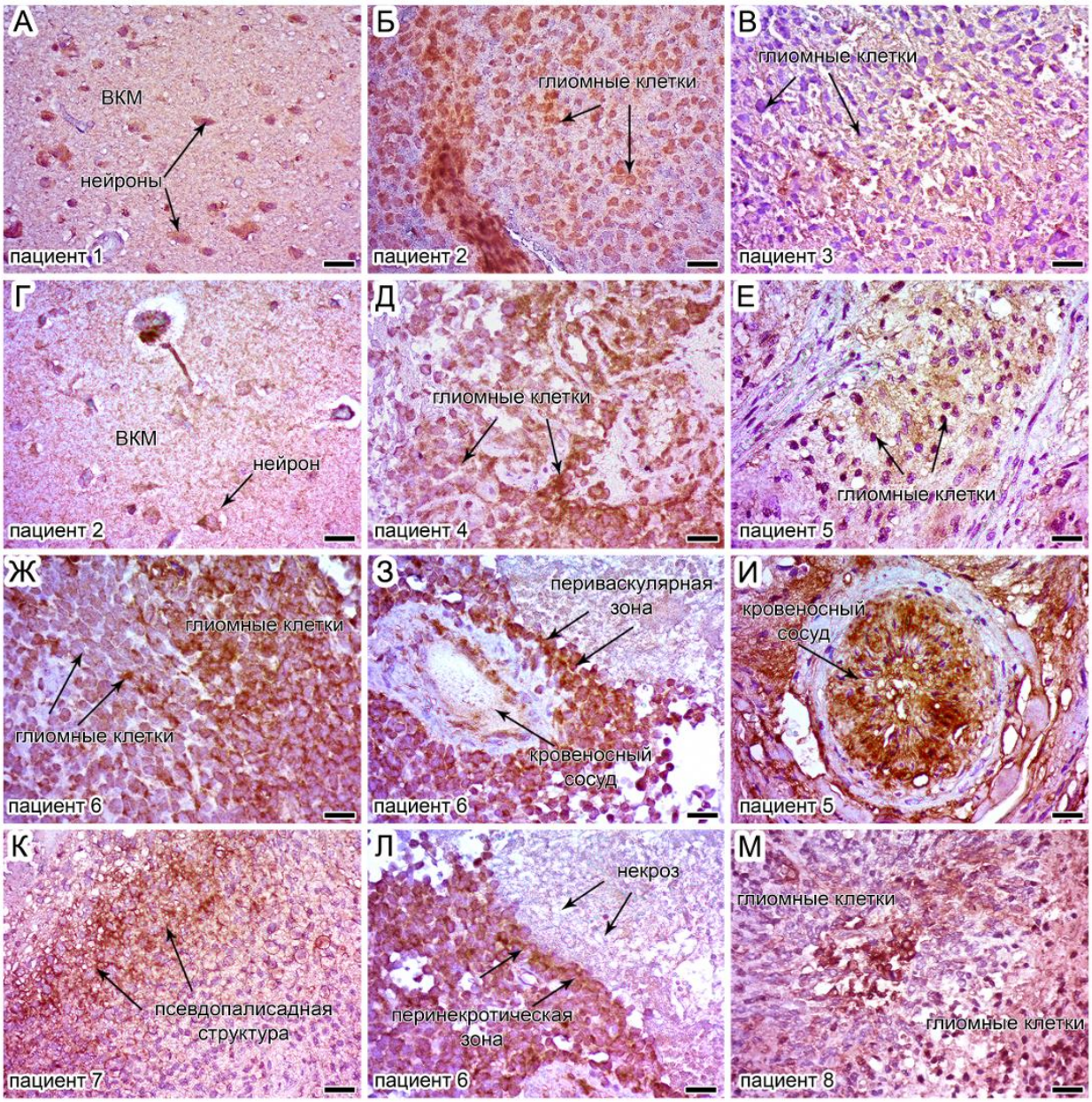


Рисунок 12. Содержание углеводных цепей хондроитинсульфата в глиобластоме. Иммуногистохимическое окрашивание с использованием антител к углеводным цепям хондроитинсульфата. А, Г - условно нормальная ткань головного мозга; Б, В, Д, Е – образцы глиобластомы от разных пациентов; Ж, К – гетерогенное содержание ХС в морфологически одинаковых клетках; З, И, Л, М – содержание ХС в периваскулярной, перинекротической зонах, зоне некроза и в пролиферирующем сосуде. Увеличение 400х.

Иммуногистохимический анализ образцов опухолей с использованием антител к маркеру пролиферации Ki-67 показал, что высокое содержание ХС в клетках глиобластомы ассоциировано с повышенной пролиферацией опухолевых клеток (Рис. 13А). Однако анализ выживаемости Каплана-Мейера не выявил достоверных отличий в общей и безрецидивной выживаемости пациентов с высоким или низким содержанием ХС как в опухолевых клетках, так и в ВКМ опухоли (Рис. 13Б) (Tsidulko *et al.*, 2020).

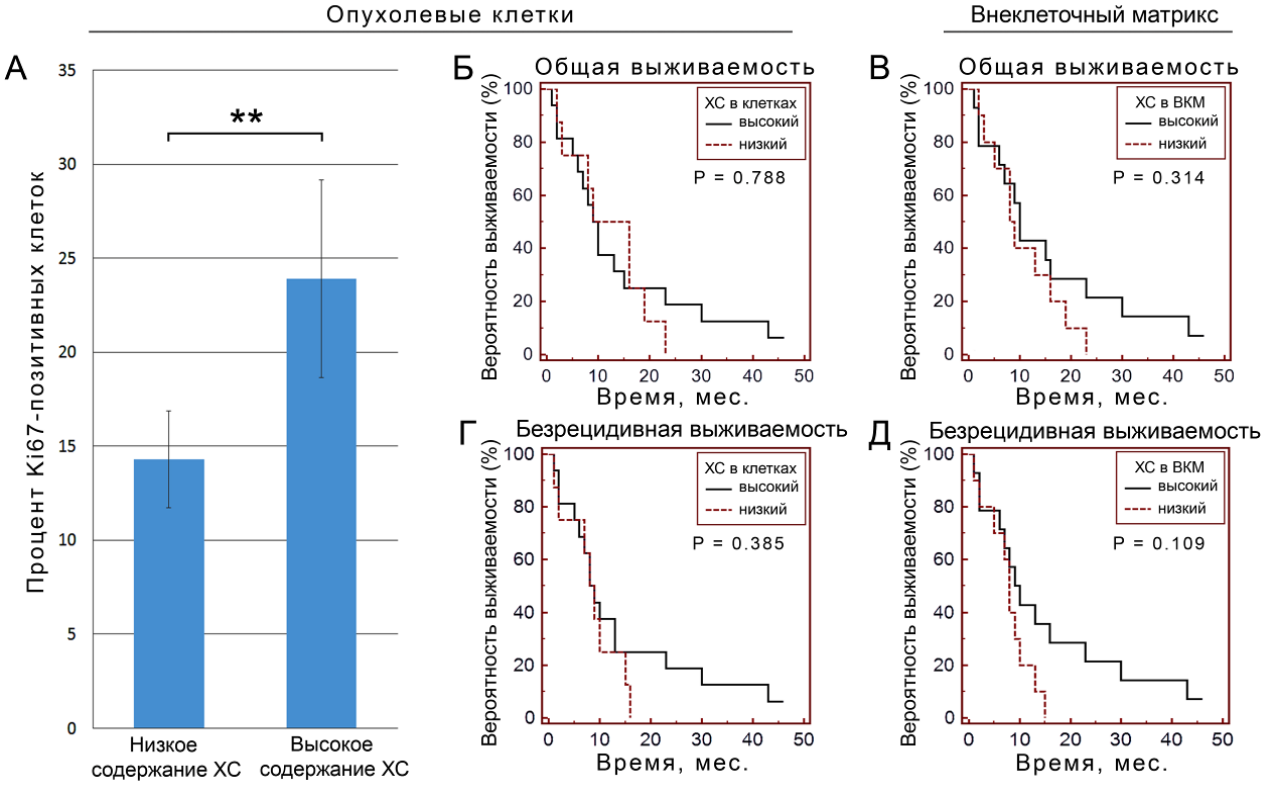


Рисунок 13. Анализ клинической значимости содержания ХС в опухоли. А. Индекс пролиферации Ki-67 в клинических образцах опухолей с высоким и низким содержанием ХС. Б. Анализ выживаемости Каплана-Мейера.

3.2.2. Гепарансульфат

Было также изучено содержание углеводных цепей гепарансульфата (ГС) в глиобластомах. ГС практически не детектировался в околоопухолевой ткани (за исключением периваскулярных пространств), в то время как в глиобластоме содержание ГС было повышено и характеризовалось внутриопухолевой и межопухолевой гетерогенностью (Рис. 14 Б,В,Д,Е). Высокое содержание ГС было показано для 50-55% изученных опухолей и часто обнаруживалось на границе некроза и в гранулярных структурах опухоли (Рис. 14 Ж,К), но не было ассоциировано с определенным типом клеток (разное содержание ГС в морфологически одинаковых клетках) (Рис. 14 З,И, Л,М).

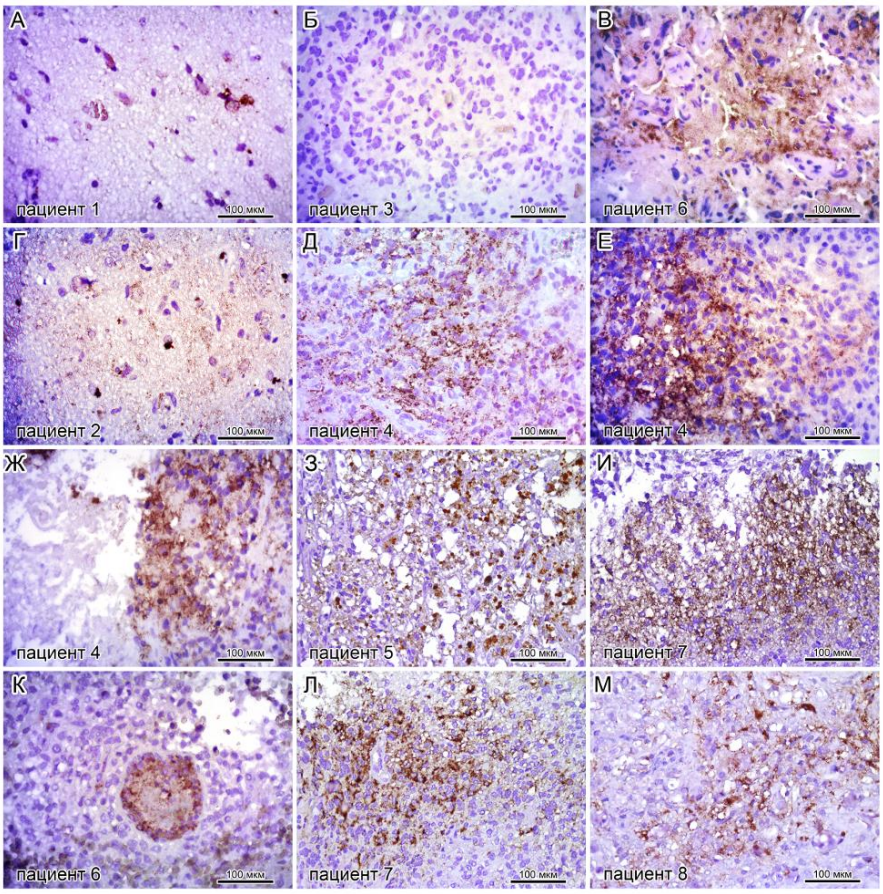


Рисунок 14. Содержание гепарансульфата в глиобластоме и околоопухолевой ткани головного мозга человека. Иммуногистохимический анализ с использованием специфических антител к гепарансульфату. А, Г – околоопухолевая ткань; Б, В, Д, Е – вариабельность содержания ГС в ткани опухоли у разных пациентов; Ж, К – отдельные морфологические структуры, характеризующиеся высоким содержанием ГС; З, И, Л, М – внутриопухолевая гетерогенность содержания ГС в морфологически одинаковых клетках. Увеличение 400х.

Анализ маркера пролиферации Ki-67 в образцах опухоли не выявил ассоциации содержания ГС в опухолевых клетках и их пролиферативной активности (Рис. 15).

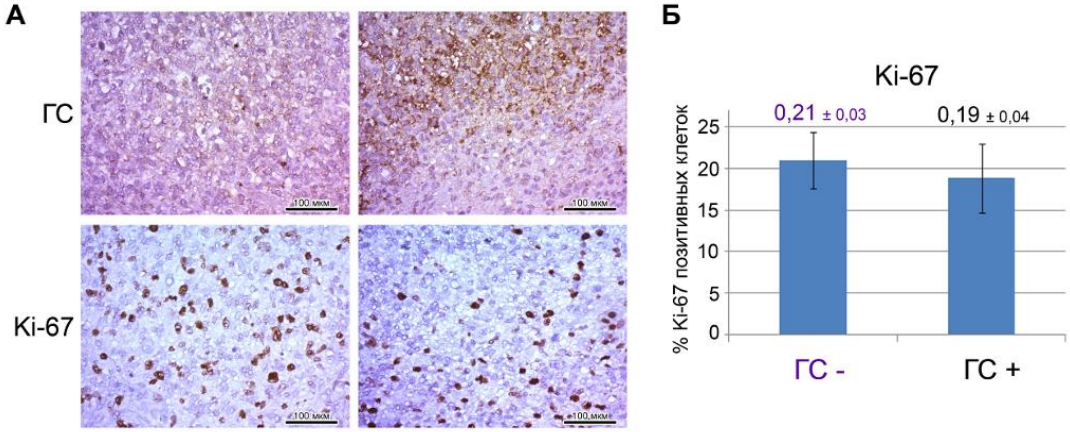


Рисунок 15. Маркер пролиферации Ki-67 в образцах глиобластомы с высоким и низким содержанием ГС. А – Иммуногистохимический анализ с использованием специфических антител к гепарансульфату и Ki-67, увеличение 400х. Б – пролиферативный индекс, оцененный как процент Ki-67-позитивных клеток, в опухолях с высоким и низким содержанием ГС.

Однако при помощи анализа выживаемости Каплана-Мейера было показано, что содержание ГС в ткани опухоли ассоциировано с безрецидивной выживаемостью пациентов. Медиана безрецидивной выживаемости пациентов с низким содержанием ГС в опухоли была статистически значимо выше, чем для пациентов с высоким содержанием ГС в опухоли (13 месяцев против 9 месяцев, p =0.0424) (Рис. 16Б) (Kazanskaya *et al.*, 2018).

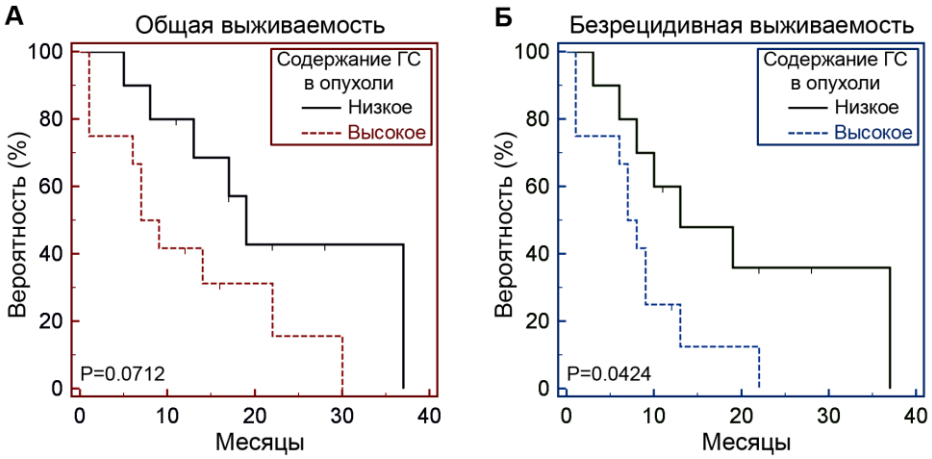


Рисунок 16. Анализ выживаемости Каплана-Мейера в группах пациентов с высоким и низким содержанием ГС в опухоли. А. Общая выживаемость. Б. Безрецидивная выживаемость.

Аналогичная тенденция была показана и для общей выживаемости пациентов, однако различия не были статистически достоверными (Рис. 16А).

Был также проведен сравнительный анализ содержания ГС в образцах ткани первичной и рецидивирующей глиобластомы, полученных от одних и тех же пациентов в ходе хирургического удаления опухоли (1 и 2 операция, соответственно). Содержание ГС в рецидивирующих глиобластомах было значительно выше, чем в образцах первичной глиобластомы того же пациента, что может дополнительно свидетельствовать о повышенной агрессивности опухолей с высоким содержанием ГС (Рис. 17).

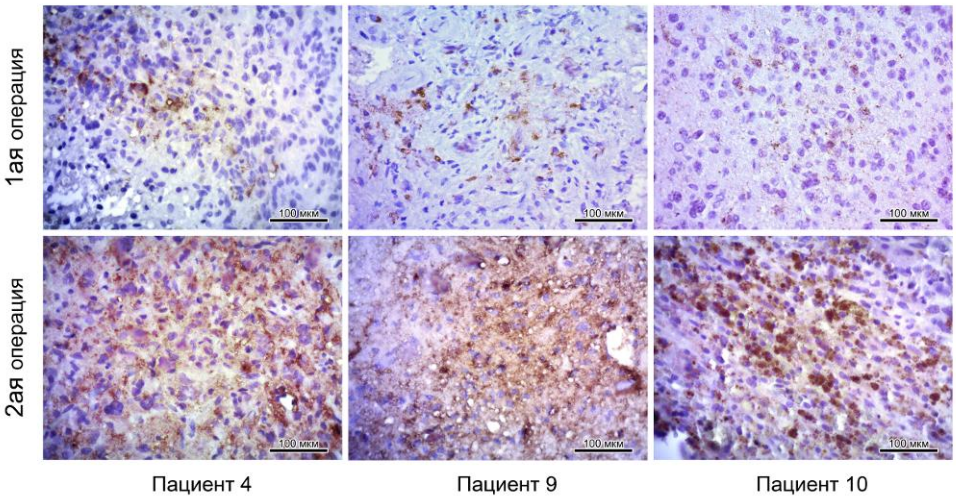


Рисунок 17. Содержание гепарансульфата в первичной и рецидивирующей глиобластоме. Иммуногистохимический анализ с использованием специфических антител к гепарансульфату. Увеличение 400х.

Таким образом, было показано, что содержание углеводных цепей гликозаминогликанов (хондроитин- и гепарансульфата) повышено в глиобластомах по сравнению с условно нормальной тканью головного мозга. Высокое содержание ХС ассоциировано с высокой пролиферативной активностью опухолевых клеток, а высокое содержание ГС – с низкой безрецидивной выживаемостью пациентов, что позволяет предложить гепарансульфат (наряду с декорином, CSPG4/NG2 и перлеканом) в качестве гликомаркера агрессивности опухоли и прогноза течения заболевания.

В целом, полученные результаты впервые продемонстрировали, что изменения в экспрессии и содержании гликозилированных молекул ткани головного мозга (протеогликанов и гликозаминогликанов) ассоциированы с агрессивностью глиобластомы и скоростью развития рецидива заболевания.

Рецидив глиобластомы, как правило, возникает в течение 6 месяцев после удаления первичного узла опухоли, несмотря на интенсивную химиолучевую терапию, которой подвергаются пациенты с диагнозом глиобластома. Темозоломид, являющийся единственным стандартным препаратом химиотерапии глиобластомы, а также глюкокортикоидный препарат дексаметазон, используемый для уменьшения отечности головного мозга до и после операции, являются системными препаратами, способными влиять на все клетки организма, и имеют большое количество побочных эффектов. Нами была высказана гипотеза, что изменение паттерна экспрессии ПГ и повышение содержания углеводных цепей ГАГ в рецидивирующих опухолях может быть одним из побочных эффектов интенсивной адъювантной радиохимиотерапии, которой подвергаются пациенты с глиобластомой, и может приводить к образованию специфического микроокружения, способствующего пролиферации остаточных опухолевых клеток и, следовательно, развитию рецидива.

Для проверки данной гипотезы были проведены эксперименты на клетках глиобластомы *in vitro*, ткани головного мозга *ex vivo* и животных *in vivo,* чтобы определить влияние темозоломида и дексаметазона на рост экспериментальных опухолей и вовлеченность протеогликанов опухолевых клеток глиобластомы и нормальной ткани головного мозга в этих процессы.

3.3. Влияние химиотерапии на пролиферацию и жизнеспособность клеток глиобластомы *in vitro*

Для изучения влияния химиотерапевтических препаратов на клетки глиобластомы *in vitro* была использована клеточная линия U87 глиобластомы человека. Для определения дозы препаратов для дальнейших исследований клетки U87 были инкубированы с различными концентрациями темозоломида (ТМЗ) (63, 125, 250, 500, 1000 или 2000 мкМ)

или дексаметазона (ДКС) (1, 5, 25, 125 мкМ) или комбинации ТМЗ+ДКС (125, 250 или 500 мкМ+1 или 25 мкМ, соответственно), и была оценена их скорость пролиферации и жизнеспособность с использованием автоматической системы визуализации клеток IN Cell Analyzer. Кривые роста были построены по данным о количестве клеток в поле зрения через 24, 48 и 72 часа инкубации с препаратами. Скорость пролиферации была оценена как наклон прямой, полученный при аппроксимации полученных точек. Процент мертвых клеток был определен при помощи окрашивания пропидий йодидом и автоматического подсчета флуоресцирующих клеток (Рис. 18). В качестве контроля были использованы клетки U87, культивированные в присутствии 0,5% или 2% ДМСО в среде (соответствует концентрации ДМСО в среде при добавлении раствора ТМЗ до концентрации 500 или 2000 мкМ соответственно).

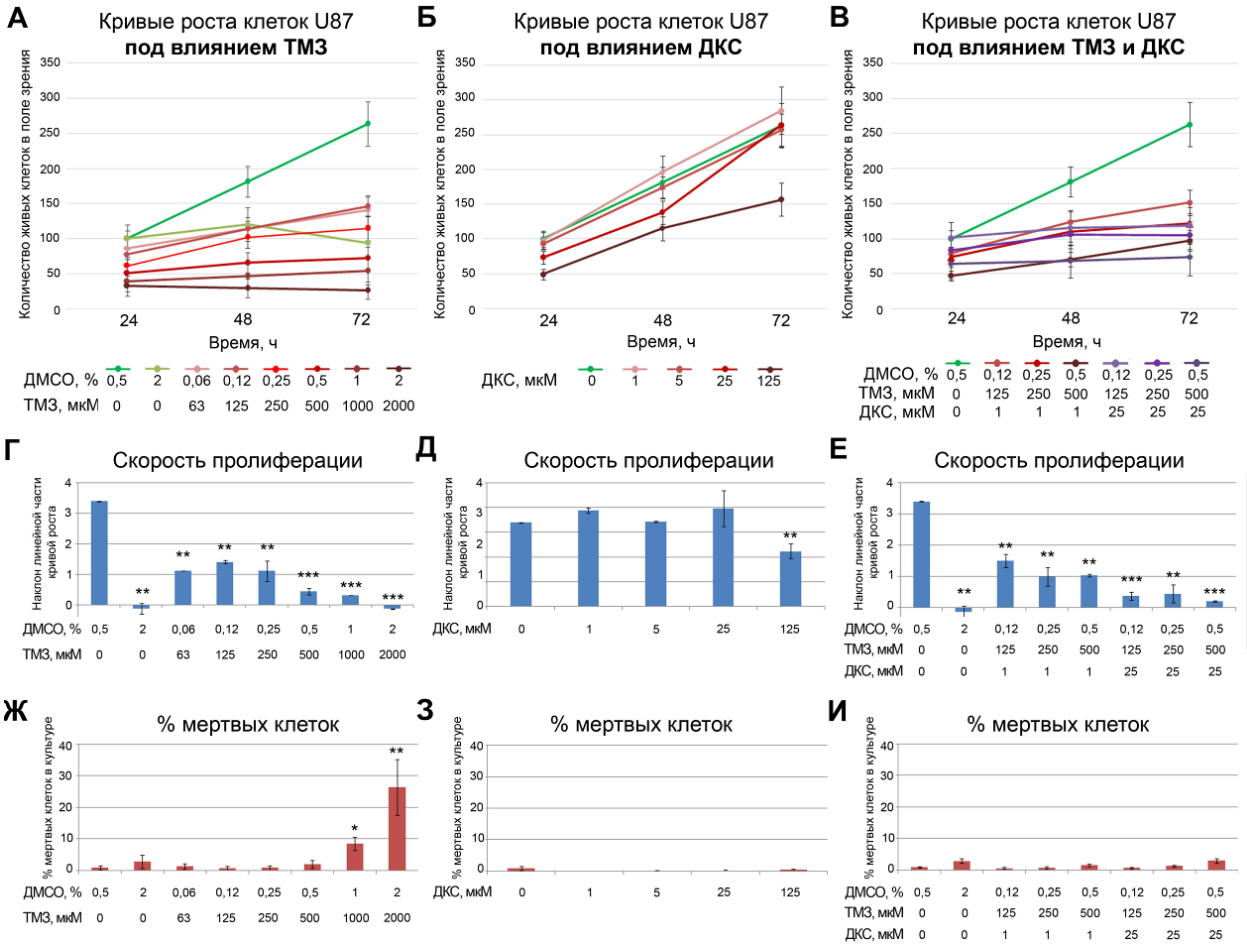


Рисунок 18. Влияние химиотерапевтических препаратов на пролиферацию и жизнеспособность клеток U87 *in vitro*. А, Г, Ж – влияние ТМЗ; Б, Д, З – влияние ДКС; В, Е, И – влияние комбинации ТМЗ+ДКС. А-В – кривые роста клеток; Г-Е – скорость пролиферации клеток, оцененная как наклон линейной части кривой роста; Ж-И - % мертвых клеток в культуре после инкубации в течение 72 часов.

Было показано, что ТМЗ в концентрациях 63-500 мкМ снижал скорость пролиферации клеток U87 в 3-7 раз по сравнению с контрольными клетками, однако достоверно не увеличивал количество мертвых клеток; в концентрации 1000 мкМ -

достоверно снижал скорость пролиферации клеток U87 в 10,8 раз ($p < 0,01$) и увеличивал количество мертвых клеток в 8,1 раза ($p < 0,01$); в концентрации 2000 мкМ - полностью ингибировал рост клеток глиобластомы U87 (хотя значительный вклад в этот эффект вносила токсичность ДМСО, в котором растворен ТМЗ, поскольку добавление только ДМСО в соответствующей концентрации также полностью ингибировало рост клеток U87) и достоверно увеличивал количество мертвых клеток в 8,9 раз ($p < 0,05$) по сравнению с 2% ДМСО. Несмотря на значительное подавление пролиферации и снижение жизнеспособности клеток U87 под действием ТМЗ, даже при использовании максимальной концентрации ТМЗ количество мертвых клеток не превышало 35% от их общего числа через 72 часа после добавления препарата в среду.

ДКС в концентрациях 1-25 мкМ достоверно не изменял скорость пролиферации и не влиял на жизнеспособность клеток глиобластомы U87, а в концентрации 125 мкМ - достоверно снижал скорость пролиферации клеток U87 в 1,5 раза ($p < 0,05$), однако так же не приводил к увеличению количества мертвых клеток.

Применение комбинации ТМЗ в концентрации 125-500 мкМ и ДКС в концентрации 1 мкМ не приводило к достоверному изменению скорости пролиферации и жизнеспособности опухолевых клеток по сравнению с использованием только ТМЗ в соответствующих концентрациях. Комбинация ТМЗ и ДКС в концентрации 25 мкМ дополнительно снижала скорость пролиферации клеток U87 по сравнению с только ТМЗ в 2-3 раза ($p < 0,05$), однако достоверно не влияла на их жизнеспособность.

Таким образом, препараты темозоломида и дексаметазона, используемые при терапии глиобластомы, снижают скорость пролиферации клеток глиобластомы *in vitro*, однако даже в высоких концентрациях убивают не более 35% клеток.

Для дальнейших экспериментов были выбраны концентрации ТМЗ 250 мкМ и ДКС 1 мкМ, как оказывающие влияние на пролиферацию клеток U87 *in vitro*, но не превышающие возможные концентрации в опухолях пациентов более чем на порядок (Kumari et al., 2017; Loew et al., 1986; Portnow et al., 2009).

3.4. Влияние химиотерапии на экспрессию ПГ в клетках глиобластомы *in vitro*

Была высказана гипотеза, что под действием темозоломида и дексаметазона в выживших клетках глиобластомы может изменяться экспрессия множества генов, в том числе генов коровых белков протеогликанов. Для проверки этого предположения клетки U87 были инкубированы с 250 мкМ ТМЗ и/или 1 мкМ ДКС в течение 24 часов, а затем экспрессия коровых белков протеогликанов в этих клетках была проанализирована при помощи ОТ-ПЦР в реальном времени.

Было показано, что инкубация клеток U87 с ТМЗ приводит к увеличению экспрессии глипикана-1 в 2 раза (p <0,05), снижению экспрессии CD44 в 1,5 раза (p <0,05) и бигликана в 3,8 раза (p <0,05) по сравнению с контрольными клетками. Использование ДКС приводило к увеличению экспрессии серглицина (в 3 раза, p <0,05), декорина (в 4,8 раза, p <0,05) и люмикана (в 2,5 раза, p <0,05) по сравнению с контролем (Рис. 19).

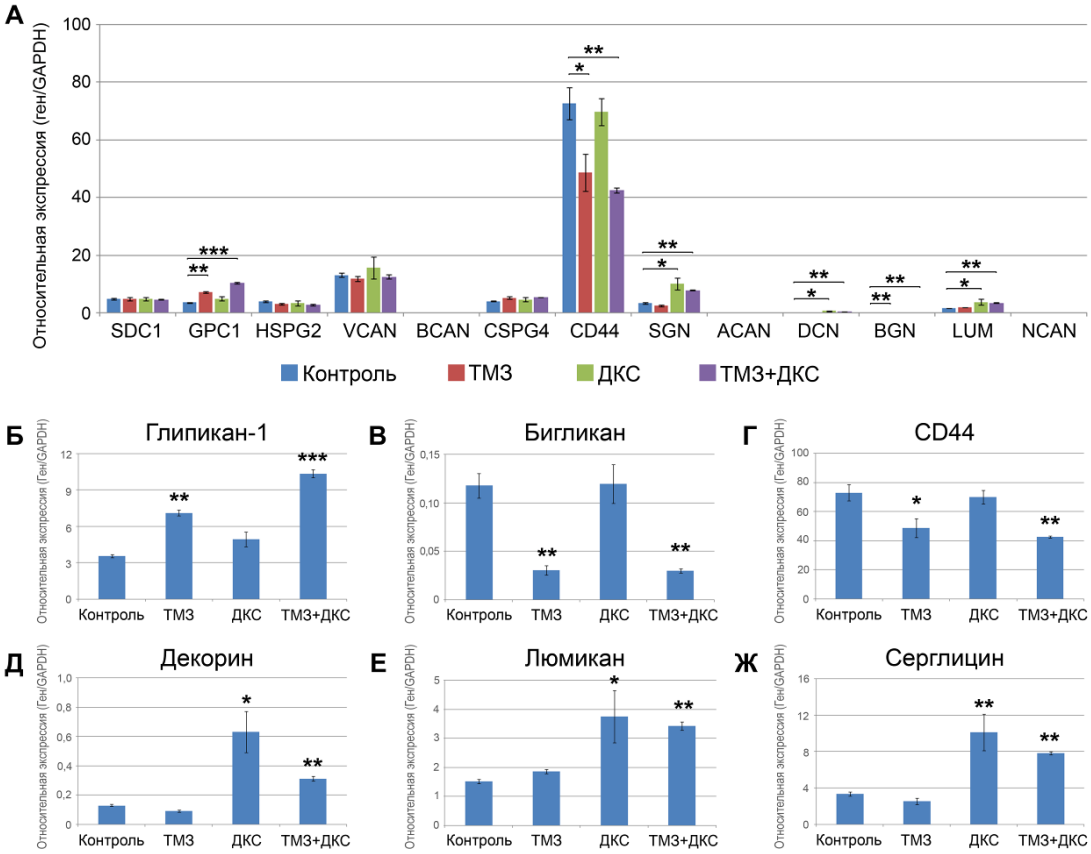


Рисунок 19. Влияние темозоломида и дексаметазона на экспрессию протеогликанов в клетках U87 глиобластомы человека *in vitro*. Результаты ОТ-ПЦР в реальном времени. А – относительная экспрессия всех изученных протеогликанов; Б-Ж – Относительная экспрессия индивидуальных ПГ. Приведены средние значения для группы ± SD. * - p <0,05; ** - p <0,01; *** - p <0,001 по сравнению с контролем.

Согласно результатам, полученным на клинических образцах глиобластомы, высокая экспрессия декорина ассоциирована с низкой выживаемостью пациентов, а повышение экспрессии декорина усиливает устойчивость клеток глиобластомы к терапии темозоломидом (Farace et al., 2015). Высокая экспрессия глипикана-1 (Saito et al., 2017) в глиобластоме также ассоциирована с плохим прогнозом течения заболевания, а снижение его экспрессии приводит к повышению эффективности темозоломида (Listik and Toma, 2020). В целом, показанные значительные изменения общего паттерна и уровня экспрессии ПГ в клетках глиобластомы под действием химиотерапевтических препаратов могут свидетельствовать об изменении фенотипа опухолевых клеток в сторону большей агрессивности и устойчивости к терапии, что может вносить свой вклад в развитие рецидива заболевания.

3.5. Влияние химиотерапии на ВКМ нормальной ткани головного мозга

Известно, что рост и инвазивность опухоли определяется не только свойствами опухолевых клеток, но и во многом зависит от окружающей опухоль ткани, в том числе от свойств ее внеклеточного матрикса. Нарушение состава и структуры ВКМ окружающей опухоль нормальной ткани может приводить к возникновению благоприятных условий для роста опухолевых клеток и, как следствие, ускоренному развитию опухоли.

Была высказана гипотеза, что ТМЗ и ДКС, являющиеся системными препаратами, помимо влияния на опухолевые клетки глиобластомы, способны нарушать экспрессию протеогликанов в нормальной ткани головного мозга, тем самым изменяя состав гликозилированных компонентов ВКМ, что может оказывать влияние на развитие рецидива заболевания.

Для проверки данной гипотезы было изучено воздействие ТМЗ и ДКС на ткань головного мозга экспериментальных животных *in vivo*. В качестве стандартного лечения глиобластомы используется ТМЗ в дозе 150мг/м^2 циклами по 5 дней с перерывом в 23 дня, однако доза ДКС не стандартизована и подбирается индивидуально с учетом состояния пациента и клинического опыта лечащего врача. В данном эксперименте были использованы различные схемы введения препаратов. Самцам крыс Wistar вводили ТМЗ перорально в дозе 30 мг/кг, соответствующей дозе 150мг/м^2 для животных весом 200-250г (Gouma et al., 2012), ежедневно в течение 5 дней. ДКС вводили подкожно в различных дозах и режимах для получения суммарной дозы 5мг/кг: 5мг/кг однократно, 2,5 мг/кг на 2 и 4 дни эксперимента или 1мг/кг ежедневно в течение 5 дней. Также была использована комбинация ТМЗ (30 мг/кг, 5 дней подряд) и ДКС (2,5 мг/кг на 2 и 4 дни). В качестве контроля были использованы животные, получавшие инъекцию физиологического раствора. Экспрессию протеогликанов анализировали методом ОТ-ПЦР в реальном времени в коре головного мозга и в гиппокампе экспериментальных животных.

Было показано, что наибольшей экспрессией в ткани головного мозга крыс обладают протеогликаны синдекан-1, глипикан-1, декорин, бигликан и люмикан. Введение животным однократно высокой дозы ДКС (5 мг/кг) приводило в гиппокампе к увеличению экспрессии синдекана-1 (+4,4 раза), бревикана (+3,9 раз), CSPG4/NG2 (+3,4 раза) и люмикана (+3,5 раза) и снижению экспрессии декорина (-1,8 раз), а в коре головного мозга – к увеличению экспрессии синдекана-1 (+3,9 раз), глипикана-1 (+1,9 раз), бревикана (+14,6 раз), CSPG4/NG2 (+12,5 раз), бигликана (+4,4 раза) и люмикана (+11,9 раз) по сравнению с контрольными животными. Введение ДКС двумя дозами по 2,5мг/кг приводило к увеличению экспрессии глипикана-1 (+3,5 раза), версикана (+4,2 раза) и бревикана (+7,6 раз) в гиппокампе, однако не оказывало значительного влияния на

экспрессию протеогликанов в коре головного мозга. Наименьшие изменения в экспрессии протеогликанов как в коре головного мозга, так и в гиппокампе, были показаны при использовании дозы 1 мг/кг/день в течение 5 дней (Рис. 20А,Б).

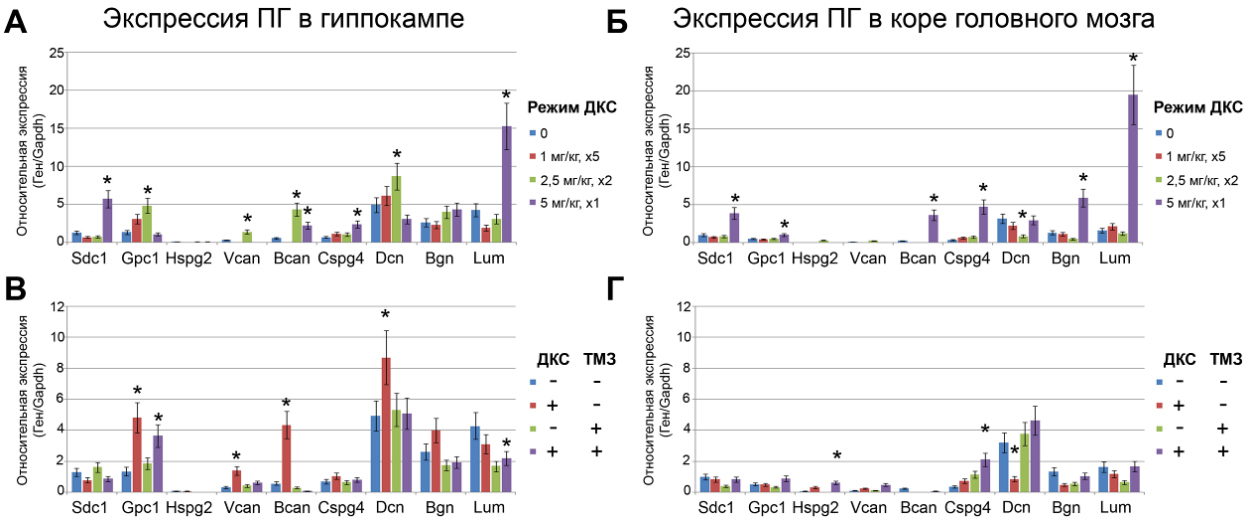


Рисунок 20. Влияние темозоломида и дексаметазона на экспрессию протеогликанов в гиппокампе (А, В) и коре головного мозга (Б, Г) крыс Wistar *in vivo*. Результаты ОТ-ПЦР в реальном времени. А, Б – влияние различных режимов введния ДКС; В, Г – влияние введения 150 мг/м^2 ТМЗ в течение 5 дней и/или 2,5 мг/кг ДКС на 2 и 4 дни эксперимента. Приведены средние значения для группы ± SD; * - p <0,05.

Введение 30 мг/кг ТМЗ в течение 5 дней не приводило к статистически значимым изменениям экспрессии протеогликанов как в коре, так и в гиппокампе экспериментальных животных по сравнению с контролем. Применение комбинации 30 мг/кг ТМЗ в течение 5 дней и введения 2,5 мг/кг ДКС на 2 и 4 дни эксперимента приводило к увеличению экспрессии глипикана-1 (+2,7 раз) и снижению экспрессии люмикана (-2 раза) в гиппокампе и увеличению экспрессии перлекана (+8,8 раз) и CSPG4/NG2 (+5,6 раз) в коре головного мозга (Рис. 20В,Г) по сравнению с контролем.

Таким образом, показано, что применение высоких доз ДКС (2,5 мг/кг и 5 мг/кг) и комбинации ТМЗ+ДКС приводит к значительному изменению паттерна экспрессии протеогликанов в нормальной ткани головного мозга экспериментальных животных *in vivo* на уровне мРНК.

Для подтверждения полученных результатов на уровне белка был использован иммунофлуоресцентный анализ. В коре и гиппокампе крыс, получавших ДКС (2,5 мг/кг дважды), ТМЗ (30 мг/кг, 5 дней подряд) и комбинацию данных препаратов, а также контрольных животных было определено содержание белка синдекана-1, CSPG4/NG2 и декорина. Эти протеогликаны были выбраны как обладающие высоким уровнем экспрессии в нормальной ткани головного мозга крысы (как в гиппокампе, так и в коре головного мозга), а также в качестве представителей основных типов ПГ (гепарансульфат протеогликан, хондроитинсульфат протеогликан и дерматансульфат протеогликан).

Было показано, что исследуемые препараты оказывают различное влияние на содержание коровых белков протеогликанов в разных зонах мозга. Так в гиппокампе использование ДКС приводило к снижению содержания корового белка декорина (-5 раз, p <0,001), а применение ТМЗ значительно увеличивает экспрессию синдекана-1 (+3 раза, p <0,001) по сравнению с контролем (Рис. 21).

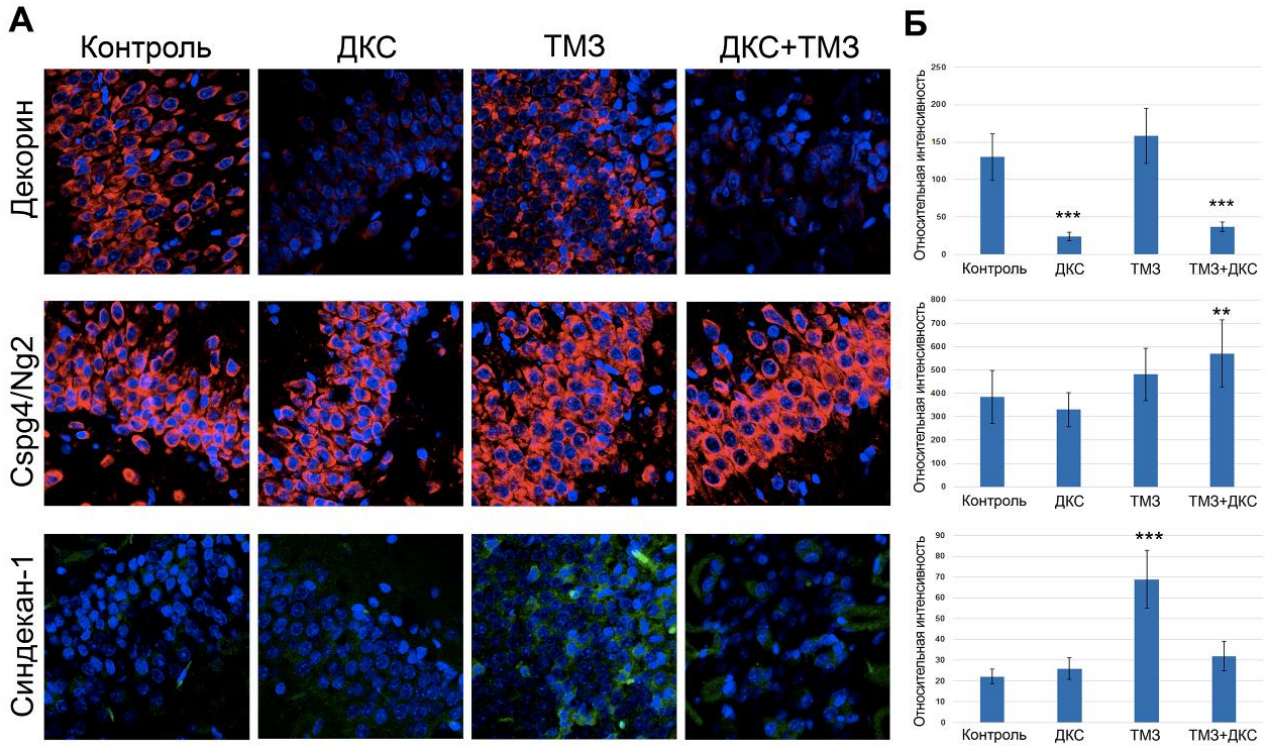


Рисунок 21. Иммунофлуоресцентный анализ содержания коровых белков протеогликанов в гиппокампе крыс под действием ТМЗ и ДКС. А - иммуокрашивание с использованием специфических антител к декорину, Cspg4/NG2 или синдекану-1. Визуализация с использованием вторичных антител, конъюгированных AlexaFluor 647 (красный, для декорина и Cspg4/NG2) или AlexaFluor 488 (зеленый, для синдекана-1). Увеличение x400. Б - Количественный анализ содержания коровых белков протеогликанов (CellProfiler 2.2.0). * - p <0.05, ** - p < 0.01 *** - p < 0.001.

В коре головного мозга использование и ДКС, и ТМЗ приводило к снижению содержания коровых белков декорина (-4,5 раза, p <0,001; -2 раза p <0,001, соответственно) и синдекана-1 (-2 раза p <0,001) по сравнению с контрольной тканью коры головного мозга (Рис. 22). Наиболее выраженные эффекты были показаны для комбинации препаратов ТМЗ+ДКС. В гиппокампе наблюдалось значительное снижение содержания корового белка декорина (-3-4 раза, p <0,001) и увеличение содержания CSPG4/NG2 (+1,5 раза, p <0,01). В коре головного мозга увеличивалось содержание коровых белков CSPG4/NG2 и синдекана-1 (+2 раза, p <0,001), однако содержание декорина не изменялось.

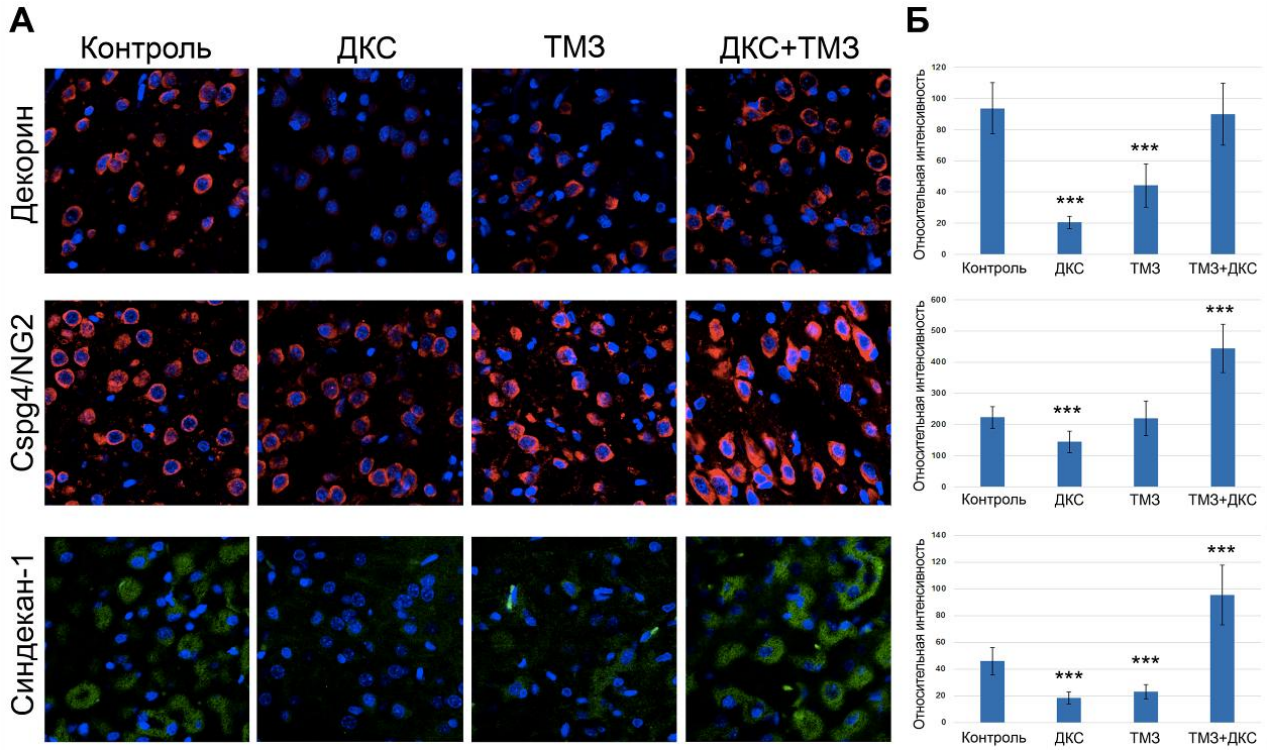


Рисунок 22. Иммунофлуоресцентный анализ содержания коровых белков протеогликанов в коре головного мозга крыс под действием ТМЗ и ДКС. А - иммуноокрашивание с использованием специфических антител к декорину, Cspg4/NG2 или синдекану-1. Визуализация с использованием вторичных антител, конъюгированных AlexaFluor 647 (красный, для декорина и Cspg4/NG2) или AlexaFluor 488 (зеленый, для синдекана-1). Увеличение x400. Б - Количественный анализ содержания коровых белков протеогликанов (CellProfiler 2.2.0). * - $p < 0.05$, ** - $p < 0.01$ *** - $p < 0.001$.

Полученные данные о нарушении содержания коровых белков протеогликанов в нормальной ткани головного мозга, под действием ТМЗ и/или ДКС согласуются с данными об изменении уровня мРНК, полученными при помощи ОТ-ПЦР.

Таким образом, показано, что препараты темозоломид и дексаметазон, используемые при терапии глиобластомы оказывают значительное влияние на экспрессию протеогликанов не только в клетках глиобластомы, потенциально усиливая их агрессивность, но также и в нормальной ткани головного мозга (Tsidulko et al., 2018). Однако функциональная значимость изменений ВКМ окружающей опухоль нормальной ткани головного мозга не ясна. Следующей задачей данного исследования было изучить влияние нарушения состава ПГ нормальной ткани головного мозга, происходящего под действием темозоломида и дексаметазона, на пролиферацию, адгезию и инвазию клеток глиобластомы, а также на скорость роста экспериментальных опухолей *in vivo*.

3.6. Влияние изменений, индуцированных химиотерапией в органотипических срезах гиппокампа, на опухолевые клетки при их совместном культивировании *ex vivo*

Для изучения влияния изменений в ВКМ головного мозга под воздействием химиотерапевтических препаратов на функциональные характеристики опухолевых клеток была использована модель совместного культивирования клеток глиобластомы U87 с органотипической культурой гиппокампа крысы *ex vivo*. Модель органотипических срезов *ex vivo* была использована вместо культуры нормальных астроцитов, поскольку она является полноценной 3D культурой и содержит различные клетки нормальной ткани головного мозга, а также ВКМ естественного состава.

Органотипические срезы гиппокампа были инкубированы с ТМЗ и/или ДКС в течение 24 часов, затем среда была заменена на не содержащую эти препараты и на органотипические срезы была нанесена суспензия клеток глиобластомы U87, стабильно экспрессирующих красный флуоресцирующий белок RFP (Рис. 23А).

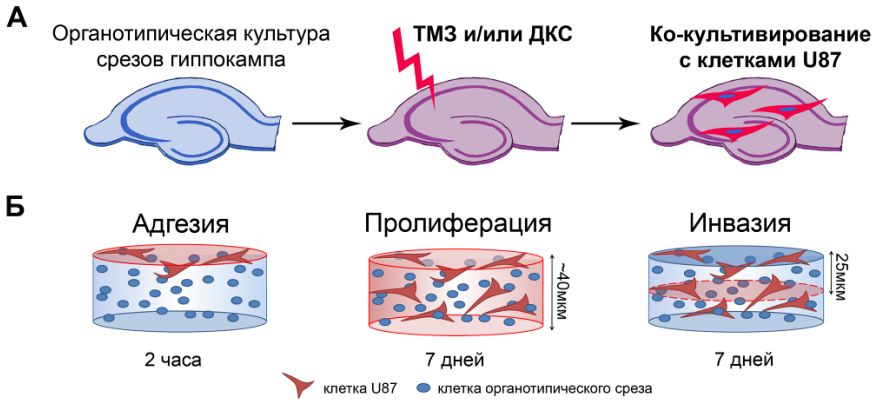


Рисунок 23. Схема эксперимента по совместному культивированию клеток глиобластомы и органотипических срезов гиппокампа. А – дизайн эксперимента; Б – схематичное изображение режимов анализа изображения для оценки адгезии, пролиферации и инвазии опухолевых клеток. Красным выделены зоны, учтенные при анализе каждого параметра.

Для оценки адгезии опухолевых клеток к поверхности среза, совместная культура была инкубирована в течение 2 часов, затем промыта PBS для удаления не прикрепившихся клеток и зафиксирована в формалине для дальнейшего изучения. Для оценки пролиферации и инвазии опухолевых клеток, органотипические срезы гиппокампа и клетки глиобластомы U87 были совместно культивированы в течение 7 дней. Анализ совместной культуры был проведен с использованием конфокальной микроскопии. Адгезия опухолевых клеток была оценена, как процент площади поверхности среза, занятый опухолевыми клетками. Пролиферация опухолевых клеток на срезах была оценена как процент площади среза, занятый опухолевыми клетками, в режиме проекции максимальной интенсивности, позволяющей суммировать сигнал со всего объема среза.

Инвазия опухолевых клеток была оценена как процент площади среза, занятый опухолевыми клетками на глубине 25 мкм от поверхности среза (Рис. 23Б).

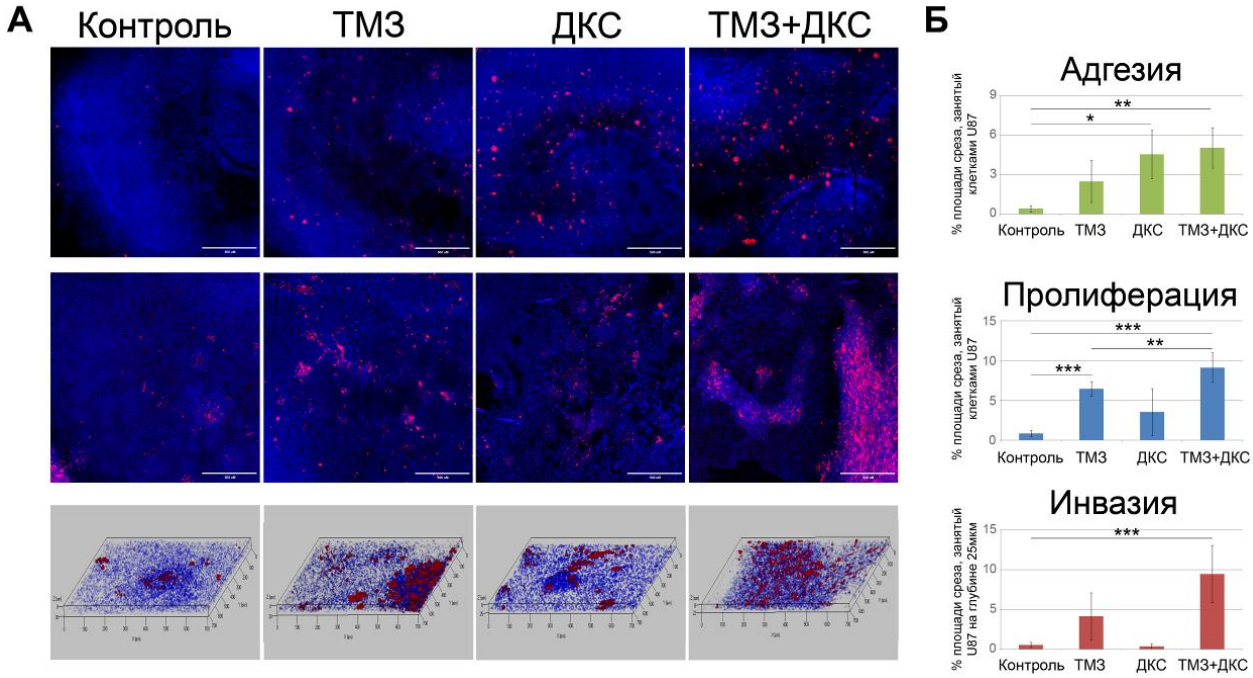


Рисунок 24 Совместная культура опухолевых клеток глиобластомы U87 и органотипических срезов гиппокампа крысы, обработанных или необработанных ТМЗ и/или ДКС. А – флуоресцентные микрофотографии срезов и 3D-реконструкция фрагмента совместной культуры (конфокальная микроскопия в режиме Z-stack). Красным цветом отображены клетки U87, ядра всех клеток подкрашены DAPI. Увеличение 200х; Б – Количественный анализ содержания клеток U87 в совместной культуре, приведены средние значения ±SD. * - p <0,05, ** - p <0,01 *** - p <0,001.

Было показано, что опухолевые клетки U87 обладают слабой адгезией к поверхности не обротанных срезов гиппокампа, а также не способны активно пролиферировать и инвазировать вглубь ткани при совместном культивировании контрольными срезами (Рис. 24).

Обработка срезов ДКС приводила к усилению адгезии клеток U87 к срезу в 10,8 раз (p <0,05), но статистически значимо не изменяла пролиферацию или инвазию опухолевых клеток по сравнению с контрольными срезами. Обработка срезов ТМЗ приводила к значительному увеличению пролиферации клеток глиобластомы в совместной культуре (+7,8 раз, p <0,001). Была также показана тенденция к увеличению адгезии клеток U87 к поверхности среза и увеличению их инвазии вглубь среза при длительном культивировании со срезами, обработанными ТМЗ, по сравнению с контролем, однако эти изменения не были статистически значимыми. Комбинация ТМЗ+ДКС демонстрировала кумулятивный эффект препаратов. Было показано увеличение адгезии опухолевых клеток U87 к поверхности среза (+12 раз, p <0,05), их пролиферации (+11,1 раз, p <0,001) и

инвазии вглубь среза (+17,5 раз, $p < 0{,}001$) при культивировании со срезами, обработанными ТМЗ+ДКС по сравнению с контрольными срезами.

Таким образом, показано, что темозоломид и дексаметазон оказывают значительное влияние на нормальную ткань головного мозга, нарушая ее способность противостоять росту клеток глиобластомы в системе *ex vivo*.

3.7. Роль гликозаминогликанов ткани головного мозга в пролиферации и инвазии клеток глиобластомы U87 в системе *ex vivo*

Поскольку изменение содержания протеогликанов и гликозаминогликанов в ткани головного мозга под воздействием темозоломида и дексаметазона может быть побочным эффектом, не оказывающим влияния на скорость роста опухолей, был проведен дополнительный эксперимент для доказательства их роли в данном процессе.

Органотипические срезы гиппокампа крысы были обработаны ферментами, специфически расщепляющими углеводные цепи гликозаминогликанов, а затем культивированы совместно с клетками глиобластомы U87. Для дифференциального анализа роли различных типов гликозаминогликанов было использовано два фермента: хондроитиназа-АС, расщепляющая хондроитинсульфат А и С, и хондроитиназа-В, расщепляющая дерматансульфат (эпимеризованный хондроитинсульфат, ХС-В).

Для изучения влияния увеличения количества ГАГ на рост опухолевых клеток в совместной культуре с органотипическими срезами гиппокампа *ex vivo*, в культуральную среду добавляли экзогенный хондроитнсульфат или дерматансульфат. Схема эксперимента приведена на рисунке 25.

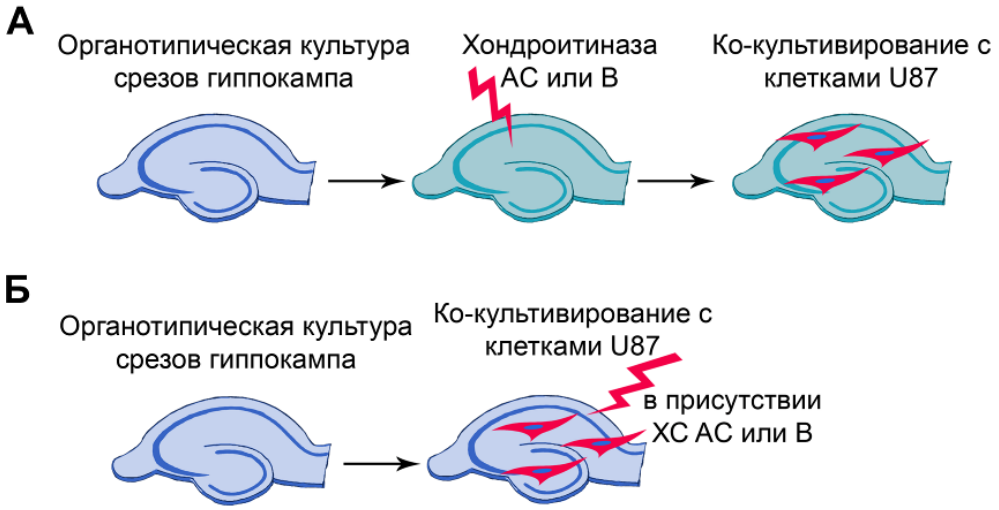


Рисунок 25. Схематичное изображение совместной культуры органотипических срезов гиппокампа и клеток глиобластомы. А – эксперимент с разрушением эндогенных цепей ХС хондроитиназой; Б – эксперимент с добавлением экзогенного ХС к совместной культуре.

Клетки глиобластомы человека U87 культивировали с обработанными срезами гиппокампа и анализировали их адгезию, пролиферацию и инвазию (как описано в главе 3.6, Рис. 23). Было показано, что разрушение углеводных цепей ХС хондроитиназой АС в органотипических срезах гиппокампа приводит к значительному усилению адгезии (+7,1 раз, p <0,05) опухолевых клеток U87 к поверхности среза и их инвазии (+2,9 раза, p <0,05) вглубь среза по сравнению с контролем. Добавление к совместной культуре экзогенного хондроитинсульфата-АС не приводило к достоверным изменениям исследованных характеристик опухолевых клеток по сравнению с контролем (Рис. 26).

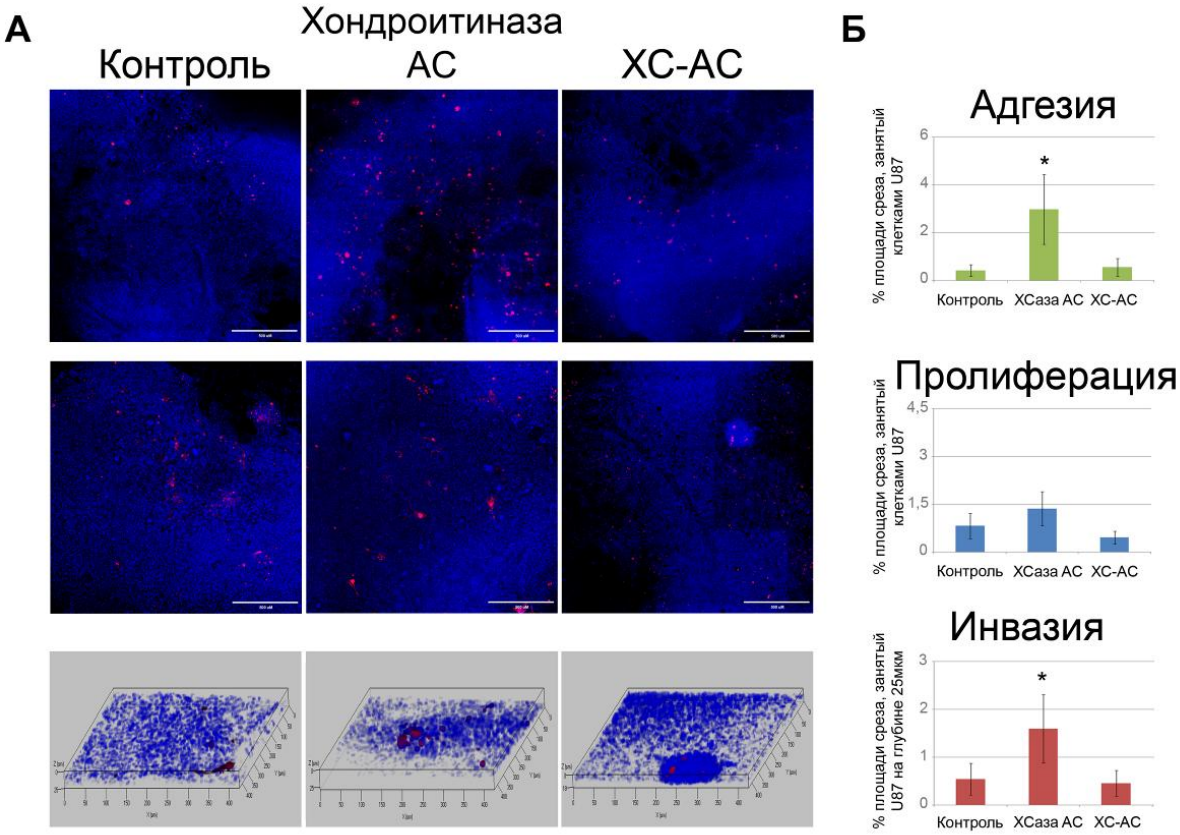


Рисунок 26. Влияние хондроитинсульфата АС (ХС-АС) на рост клеток глиобластомы U87 в совместной культуре с органотипическими срезами гиппокампа крысы. А – флуоресцентные микрофотографии срезов и 3D-реконструкция фрагмента совместной культуры (конфокальная микроскопия в режиме Z-stack), красным цветом отображены клетки U87, ядра всех клеток подкрашены DAPI. Увеличение 200x; Б – Количественный анализ содержания клеток U87 в совместной культуре, приведены средние значения ±SD. * - p <0,05 (ANOVA).

В отношении дерматансульфата (ХС-В) был показан противоположный эффект. Разрушение в органотипических срезах углеводных цепей хондроитиназой-В не приводило к статистически значимым изменениям адгезии, инвазии или пролиферации клеток U87 в совместной культуре. Однако добавление экзогенного дерматансульфата значительно увеличивало адгезию клеток U87 к поверхности среза (+3,4 раза, p <0,05), их пролиферацию (+2,7 раза, p <0,05), и инвазию вглубь среза (+2,6 раза, p <0,01) по сравнению с контролем (Рис. 27).

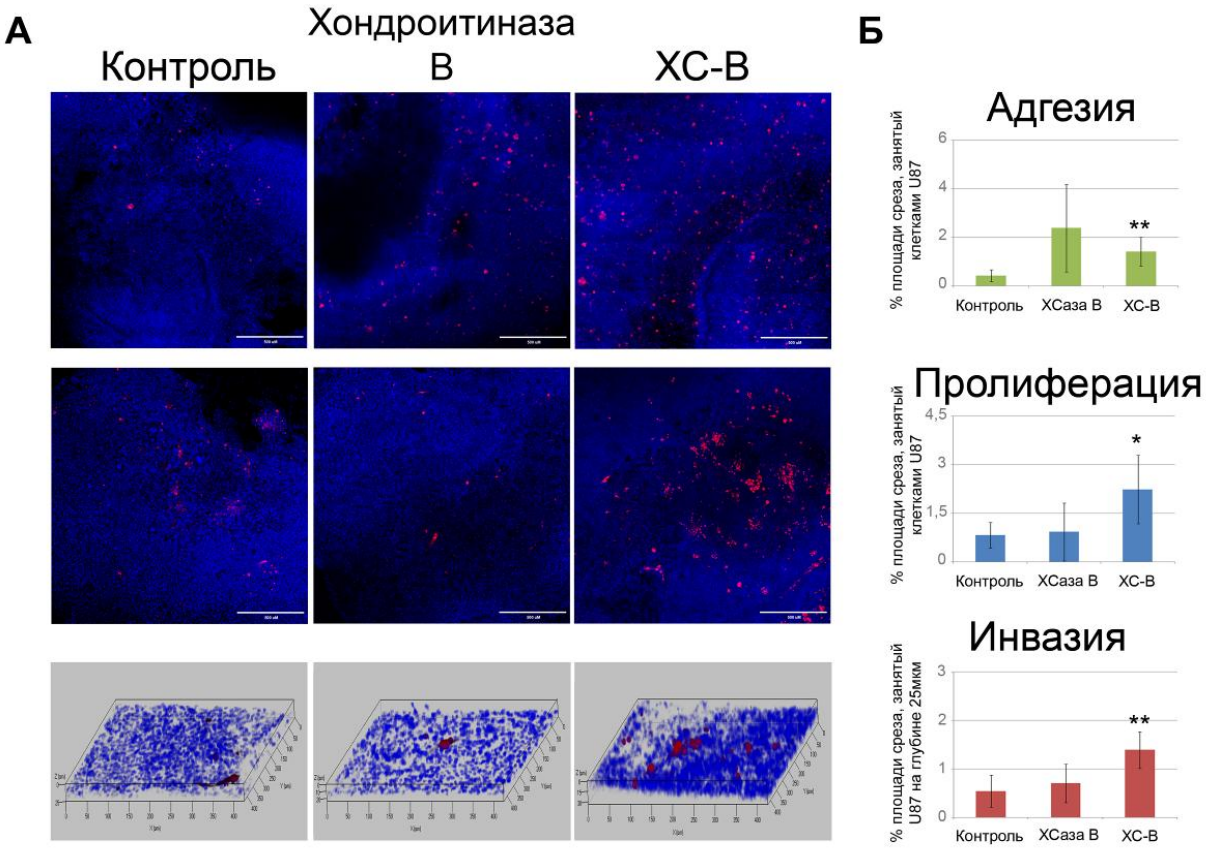


Рисунок 27. Влияние дерматансульфата (ХС-В) на рост клеток глиобластомы U87 в совместной культуре с органотипическими срезами гиппокампа крысы. А – флуоресцентные микрофотографии срезов и 3D-реконструкция фрагмента совместной культуры (конфокальная микроскопия в режиме Z-stack), красным цветом отображены клетки U87, ядра всех клеток подкрашены DAPI. Увеличение 200x; Б – Количественный анализ содержания клеток U87 в совместной культуре, приведены средние значения ±SD. * - p <0,05 (ANOVA).

Таким образом, показано, что содержание и структура углеводных цепей ГАГ в нормальной ткани головного мозга, оказывает значительное влияние на адгезию, пролиферацию и инвазию клеток глиобластомы.

3.8. Влияние изменений, индуцированных химиотерапией в ВКМ головного мозга, на рост экспериментальных опухолей *in vivo*

Для подтверждения эффектов, показанных в системе *ex vivo*, был проведен эксперимент по изучению влияния современной схемы лечения глиобластомы на рост опухоли в модели рецидива *in vivo*. Для моделирования рецидива глиобластомы здоровым иммунодефицитным мышам линии SCID вводили ТМЗ (30 мг/кг, внутрижелудочно) и/или ДКС (1 мг/кг, внутрибрюшинно) в течение 3 курсов по 5 дней с перерывами в 9 дней, имитируя адъювантное лечение глиобластомы, а затем проводили ортотопическую ксенотрансплантацию клеток U87. В качестве контроля были использованы животные линии SCID, получавшие воду внутрижелудочно. Схема эксперимента представлена на рисунке 28.

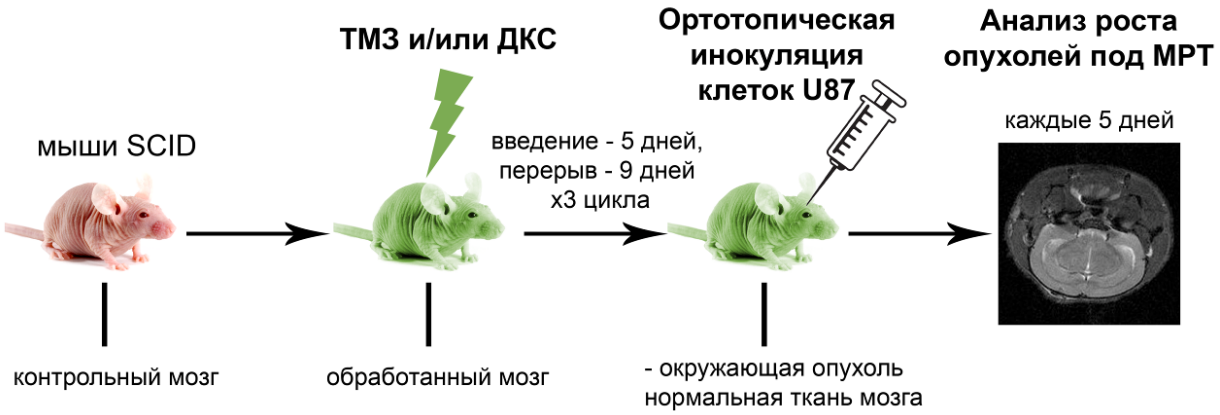


Рисунок 28. Схема эксперимента по моделированию рецидива глиобластомы на иммунодефицитных мышах линии SCID.

Для подтверждения влияния ТМЗ и ДКС на ВКМ ткани головного мозга, экспрессия протеогликанов была определена в коре и внекорковых структурах головного мозга мышей до и после инокуляции опухоли.

Было показано, что ТМЗ не оказывает значительного влияния на экспрессию коровых белков протеогликанов в ткани головного мозга мышей SCID, а под действием ДКС увеличивалась экспрессия бигликана (+2,7 раза, $p < 0,05$) в коре головного мозга, синдекана-1 (+4,3 раза, $p < 0,05$), глипикана-1 (+3,5 раза, $p < 0,01$) и версикана (+3,1 раза, $p < 0,001$) во внекорковых структурах головного мозга. Введение комбинации ТМЗ+ДКС приводило к увеличению экспрессии CD44 (+6,3 раза, $p < 0,01$), декорина (+3,6 раза, $p < 0,01$) и бигликана (+4,3 раза, $p < 0,05$) в коре головного мозга мышей и увеличению экспрессии глипикана-1 (+3,2 раза, $p < 0,01$) и версикана (+3,7 раз, $p < 0,001$) во внекорковых структурах головного мозга (Рис. 29).

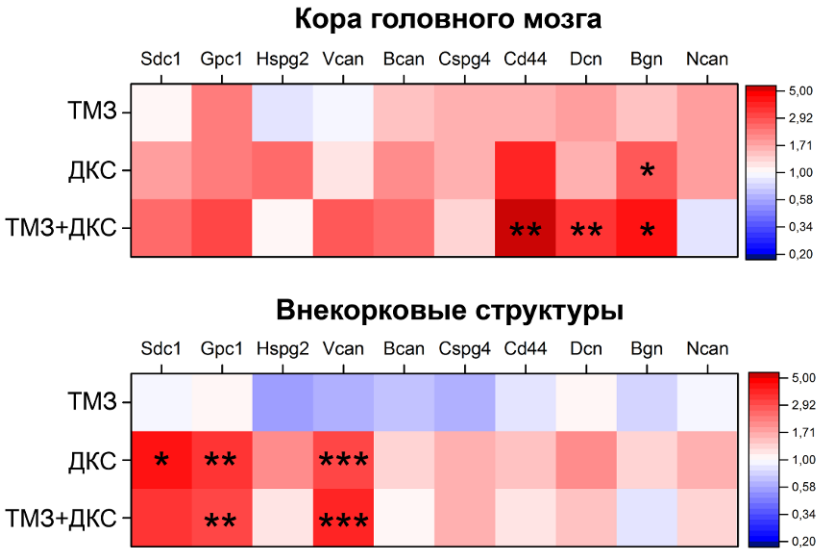


Рисунок 29. Изменение экспрессии протеогликанов в ткани головного мозга мышей SCID под действием ТМЗ и/или ДКС. Данные представлены в виде тепловой карты, где красный цвет соответствует увеличению экспрессии, а синий – снижению экспрессии, а белый – отсутствие изменений по сравнению с контролем. * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$, *** - $p < 0,001$.

Результаты согласуются с данными об изменении экспрессии ПГ в ткани головного мозга под действием ТМЗ и ДКС, полученными ранее на модели крыс Wistar *in vivo*.

Содержание углеводных цепей хондроитинсульфата в ткани головного мозга было оценено с помощью методов ИГХ и dot-blot с использованием специфических антител к хондроитинсульфату АС. Было показано, что в нормальной ткани головного мозга мышей содержание ХС-АС снижается во внекорковых структурах под действием ТМЗ в 1,9 раз ($p < 0{,}01$), а под действием ДКС в 2,2 раза ($p < 0{,}01$). Введение мышам комбинации ТМЗ+ДКС снижало содержание ХС-АС в коре головного мозга в 2 раза ($p < 0{,}01$) по сравнению с контролем (Рис. 30).

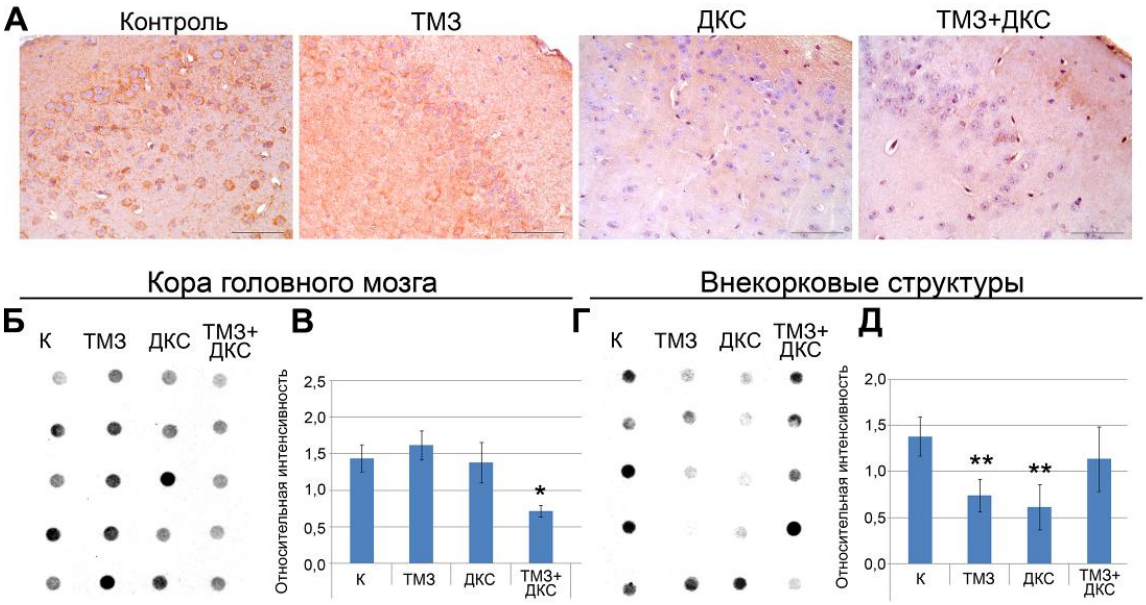


Рисунок 30. Анализ влияния ТМЗ и ДКС на содержание углеводных цепей ХС-АС в ткани головного мозга мышей SCID. А – иммуногистохимическое окрашивание с использованием антител, специфичных к хондроитинсульфату АС; увеличение 400х. Б, Г – dot-blot анализ с использованием антител к хондроитинсульфату АС; В, Д – денситометрический анализ dot-blot. Приведены средние значения ±SD. * - $p < 0{,}05$; ** - $p < 0{,}01$.

Таким образом, темозоломид и дексаметазон значительно изменяют как экспрессию коровых белков ПГ, так и содержание углеводных цепей ГАГ в ткани головного мозга экспериментальных животных, что может приводить к формированию специфического микроокружения, способствующего росту опухоли.

После трех курсов ТМЗ и/или ДКС по 5 дней с перерывами в 9 дней экспериментальным животным были инокулированы клетки U87. Состояние животных в течение эксперимента регистрировалось ежедневно, начиная с 5 суток после первого введения исследуемых препаратов. При этом были оценены изменения состояния кожных покровов, двигательной активности и поведения. При потере массы тела более 20% животные подвергались эвтаназии в соответствии с требованиями гуманного отношения к животным.

Было показано, что введение препаратов в выбранных дозах не оказывает значительного токсического воздействия, о чем можно судить по некритическим колебаниям массы тела (Рис. 31А), а также не оказывало достоверного влияния на выживаемость животных, согласно анализу Каплана-Мейера (Рис. 31Б).

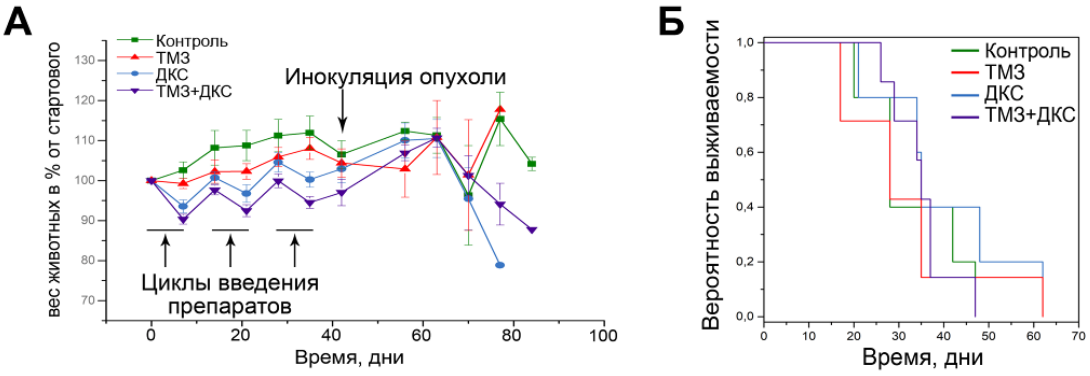


Рисунок 31. Влияние ТМЗ и ДКС на массу тела и выживаемость экспериментальных животных. А – анализ выживаемости Каплана-Мейера; Б – средняя продолжительность жизни животных после инокуляции опухоли; В – динамика изменения веса животных в течение эксперимента; Г – средняя масса животных на окончание эксперимента в процентах от начального веса. Приведены средние значения ±SD.

За развитием опухолей наблюдали при помощи магнитно-резонансной томографии. Было показано, что скорость роста опухолей, а также финальный объем опухолей достоверно больше у животных, получавших ТМЗ и/или ДКС (+2,7 – 3,4 раза, $p < 0,05$) по сравнению с контрольными животными (Рис. 32).

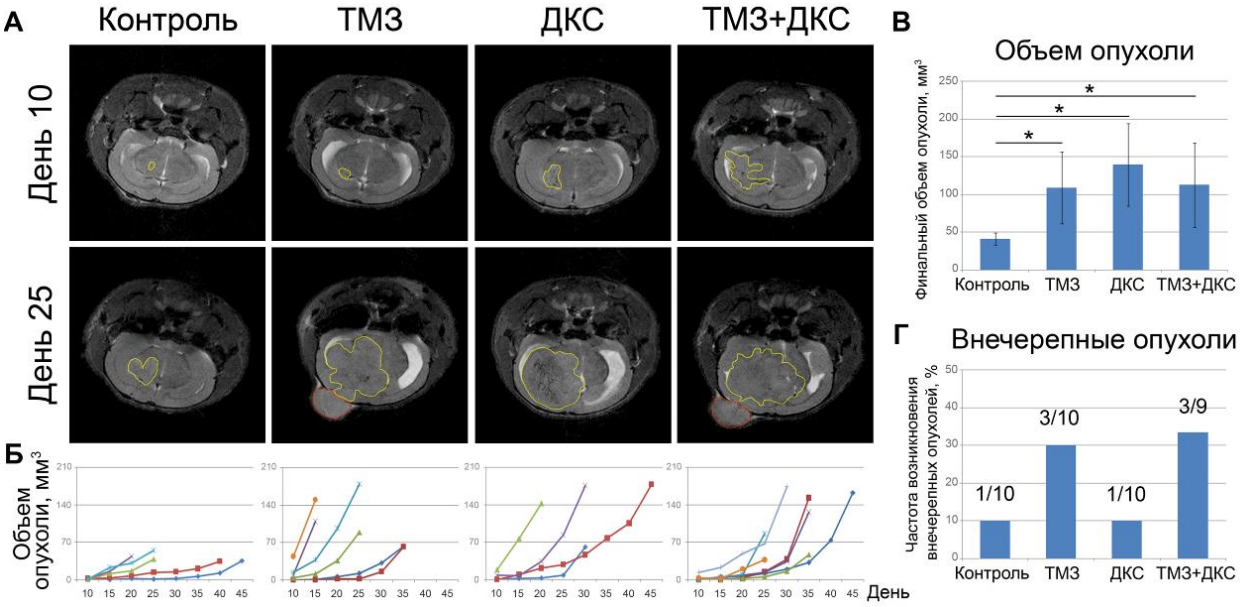


Рисунок 32. Влияние темозоломида и дексаметазона на рост экспериментальных опухолей *in vivo*. А – результаты МРТ на 10 и 25 дни после инокуляции опухолевых клеток U87. Репрезентативное изображение одного животного из группы. Желтым обозначен контур опухоли, красным – контур внечерепного образования; Б – кривые роста опухолей; В – финальный объем опухоли. Представлены средние значения для группы ±SD; Г – частота возникновения экстракраниальных опухолей.

Было также отмечено, что у большинства животных опухоль развивается в виде единого узла в мозге, тогда как у некоторых животных опухоль также прорастает за пределы черепа. Такие внечерепные образования были обнаружены только у 10% животных из контрольной группы и группы животных, получавших инъекцию ДКС, тогда как в группах, получавших ТМЗ или комбинацию ТМЗ+ДКС, внечерепные образования были обнаружены у 30% животных (Рис. 32Г). Такой характер роста опухоли может свидетельствовать о повышенной инвазивности ксенографтных опухолей, развивающихся в мозге животных, получавших химиотерапию.

3.9. Ассоциация экспрессии ПГ с размером экспериментальных опухолей

Также была исследована ассоциация экспрессии протеогликанов в окружающей опухоль ткани с размером сформировавшейся опухоли. Для этого все животные были разделены на группы с условно маленькой (менее 30 мкл), средней (от 30 до 70 мкл) или большой (более 70 мкл) опухолью. Было показано, что экспрессия ряда ПГ в коре головного мозга животных с большими опухолями значительно выше таковой у животных с маленькими опухолями: экспрессия синдекана-1 выше в 3,4 раза ($p < 0,05$), глипикана-1 – в 4,7 раз ($p < 0,01$), бревикана – в 3,8 раз ($p < 0,01$), Cspg4/NG2 – в 4,9 раз ($p < 0,01$), декорина – в 3,2 раза ($p < 0,01$), бигликана – в 2,7 раз ($p < 0,05$) и нейрокана – в 4,7 раз ($p < 0,05$) (Рис. 33А). Достоверных отличий в экспрессии ПГ во внекорковых структурах между животными с разным объемом опухолей выявлено не было.

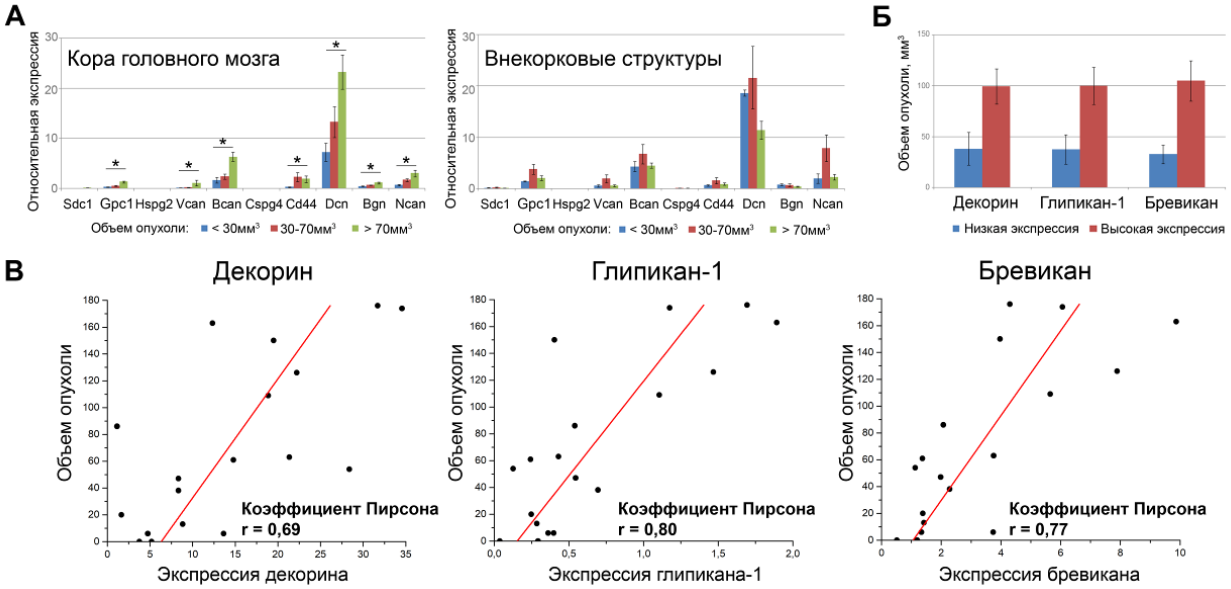


Рисунок 33. Ассоциация экспрессии ПГ в нормальной ткани головного мозга с размером опухоли. А – Относительная экспрессия протеогликанов в коре и внекорковых структурах головного мозга мышей SCID с различным размером развившихся опухолей. Данные ОТ-ПЦР, приведены средние значения ±SD. Б – Объем опухолей у животных с условно низкой или высокой экспрессией отдельных ПГ в коре головного мозга. В – корреляция экспрессии отдельных ПГ в коре головного мозга с объемом опухоли.

В качестве альтернативного подхода, все экспериментальные животные были разделены на группы по уровню экпрессии ПГ (животные с условно низкой и высокой экспрессией) и проанализированы объемы опухолей в полученных группах. Была показана высокая позитивная корреляция уровней экспрессии декорина (r = 0,69), глипикана-1 (r = 0,80) и бревикана (r = 0,77) с размером опухоли (Рис. 33Б,В).

Таким образом, показано, что темозоломид и дексаметазон, используемые при терапии глиобластомы, оказывают значительное влияние на гликозилированные компоненты нормальной ткани головного мозга, и эти изменения ассоциированы с усилением роста опухоли *in vivo* (Tsidulko et al., 2020). Эти данные позволяют предложить потенциальный молекулярный механизм возникновения рецидива глиобластомы, основанный на нарушении структуры и состава ВКМ нормальной ткани головного мозга под действием химиотерапии глиобластомы, приводящем к формированию специфического микроокружения, благоприятствующего повторному росту опухоли.

Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Несмотря на многочисленные исследования, лечение глиобластомы остается недостаточно эффективным. Дополнительная диагностика с использованием биомаркеров, предсказывающих ответ на лечение и исход заболевания, может оказаться решающей в оптимизации схемы лечения пациентов с глиобластомой. В настоящее время наиболее достоверно установленными прогностическими факторами являются возраст и состояние пациента, степень злокачественности опухоли, а также объем хирургической резекции. В последнее десятилетие исследования выявили ряд потенциальных прогностических молекулярных маркеров. На сегодняшний день наиболее используемым прогностическим биомаркером глиобластомы является статус метилирования промотора MGMT, который часто ассоциирован с выживаемостью пациентов и ответом на химиотерапию. Другие прогностические маркеры также используются в клинике, например, определение мутаций в гене IDH, однако их применение может быть ограничено вторичными глиобластомами и глиомами более низкой степени злокачественности из-за низкой частоты встречаемости (<10%) в первичных глиобластомах (Xavier-Magalhães *et al.*, 2013). В силу этого поиск новых прогностических биомаркеров глиобластомы является актуальной задачей. В данном исследовании была проанализирована прогностическая значимость протеогликанов, являющихся важными компонентами внеклеточного матрикса нормальной и опухолевой ткани головного мозга.

В данной работе было показано увеличение экспрессии коровых белков CSPG4/NG2, CD44, декорина, бигликана и перлекана в ткани глиобластомы с «плохим прогнозом» (общая выживаемость менее 12 месяцев) по сравнению с тканью опухолей с «хорошим прогнозом» (выживаемость более 12 месяцев). Изучение экспрессии такого широкого набора протеогликанов в глиобластомах никем ранее не проводилось, была изучена только экспрессия отдельных протеогликанов. Ранее в литературе было показано, что высокая экспрессия CSPG4/NG2 ассоциирована с повышенной пролиферативной активностью первичной культуры клеток глиобластомы человека *in vitro*, а также с повышенной скоростью роста опухолей в модели ксенотрансплантации *in vivo* (Al-Mayhani *et al.*, 2011). Экспрессия CSPG4/NG2 в глиомах человека ассоциирована со степенью злокачественности опухоли, а также с активным ангиогенезом (Stallcup and Huang, 2008). Существуют работы, в которых показана связь экспрессии CSPG4/NG2 с эффективностью лечения: показано, что высокая экспрессия CSPG4/NG2 ассоциирована с устойчивостью клеток глиобластомы к радиотерапии *in vitro* и *in vivo* (Svendsen *et al.*, 2011), а также с множественной лекарственной устойчивостью *in vitro* (Chekenya *et al.*,

2008). В нашей работе показано, что, согласно анализу Каплана-Мейера, высокая экспрессия CSPG4/NG2 (p =0,036) ассоциирована с низкой выживаемостью пациентов с глиобластомой, что хорошо согласуются с описанными литературными данными.

Что касается CD44, данные о его прогностической значимости в глиобластоме противоречивы. Было показано, что CD44 является одним из маркеров опухолевых стволовых клеток глиобластомы (Bradshaw *et al.,* 2016) и глиобластомы пронейрального подтипа (Brown *et al.,* 2015). Экспрессия CD44 положительно коррелирует с радиорезистентностью первичной культуры клеток глиобластомы, тогда как все другие протестированные маркеры стволовых опухолевых клеток (CD133, нестин SOX2, GFAP) показывают обратную корреляцию (Lemke *et al.,* 2014). С другой стороны, несмотря на повышенную экспрессию CD44 в глиобластоме, более низкий уровень экспрессии CD44 неожиданно коррелирует с низкой выживаемостью пациентов (Wei *et al.,* 2010). Ассоциация повышенных уровней экспрессии CD44 с низкой выживаемостью не является статистически значимой, что согласуется с результатами нашего исследования.

В нашей работе также показана ассоциация высокой экспрессии декорина с низкой выживаемостью пациентов с глиобластомой. В литературе декорин в основном характеризуется как ген-супрессор во многих типах опухолей, однако данных о декорине в глиобластоме крайне мало. Согласно работе Biglari и соавторов, эктопическая экспрессия декорина замедляла развитие глиомы у крыс *in vivo* и увеличивала выживаемость животных (Biglari *et al.,* 2004). Однако две другие работы демонстрируют декорин как маркер опухолевых стволовых клеток глиобластомы, а его высокая экспрессия ассоциирована с устойчивостью к гипоксии (Santra *et al.,* 2006) и химиотерапии темозоломидом *in vitro* (Farace *et al.,* 2015).

Экспрессия бигликана и перлекана в глиобластоме ранее не была изучена. В нашей работе впервые показано, что высокая экспрессия перлекана достоверно ассоциирована с низкой выживаемостью пациентов с глиобластомой ($p<0,05$). Известно, что в разных типах опухолей экспрессия перлекана усиливается как *in vivo*, так и *in vitro* (Jiang and Couchman, 2003). Он активно участвует в функционировании гематоэнцефалического барьера (Roberts *et al.,* 2012), и значительная (более чем 50-кратная) гиперэкспрессия перлекана показана для метастазов рака легких и меланомы в мозг по сравнению с исходными опухолями (Ilhan-Mutlu *et al.,* 2016).

Помимо изменений в экспрессии коровых белков протеогликанов большое значение для правильного функционирования клеток или их злокачественной трансформации имеют углеводные цепи гликозаминогликанов. В данной работе показано значительное увеличение содержания ГС в 50–55% глиобластом, что соответствует ранее

обнаруженному увеличению содержания [3H]-меченного глюкозамина ГС в клетках глиомы высокой степени злокачественности *in vitro*, по сравнению с таковым в нормальных клетках головного мозга (Steck *et al.*, 1989) и более высокому содержанию ГС в глиобластоме по сравнению с астроцитомами Grade II *in vivo* (Shao *et al.*, 2013). Выявленная в нашей работе межопухолевая гетерогенность содержания ГС согласуется с данными Tran и соавторов о гетерогенном содержании и ГС в четырех клеточных линиях, полученных из образцов глиобластом человека (Tran *et al.*, 2017). Ранее внутриопухолевая гетерогенность содержания ГС в глиобластоме *in vivo* не была показана, и полученные в данном исследовании результаты позволяют впервые идентифицировать гепарансульфат, как один из компонентов внутриопухолевой гетерогенности глиобластом. Показанная в нашей работе ассоциация содержания ГС в глиобластоме с безрецидивной выживаемостью пациентов согласуется с данными о том, что ГС способствует инвазии клеток глиобластомы (Tran *et al.*, 2017; Xiong *et al.*, 2014), а также миграции, опосредованной белком теплового шока Hsp90 (Snigireva *et al.*, 2019).

Повышенное содержание углеводных цепей хондроитинсульфата в глиобластоме по сравнению с нормальной тканью головного мозга было нами показано в 60-65% опухолей. В ХС-позитивных опухолях ХС был распределен гетерогенно и связан с перинекротическими и периваскулярными зонами. Содержание ХС в глиобластоме изучено слабо, однако увеличение содержания ХС ранее было продемонстрировано при раке простаты и молочной железы. Повышенное содержание ХС в опухолях простаты связано с плохим прогнозом и низкой безрецидивной выживаемостью пациентов (Ricciardelli *et al.*, 1997). Экспрессия ХС была предложена в качестве независимого предиктора безрецидивной выживаемости пациентов с раком яичников и коррелировала с хорошим ответом на химиотерапию препаратами на основе платины (Vallen *et al.*, 2012). Детальное исследование злокачественных опухолей молочной железы человека показало, что, хотя высокая экспрессия ХС в злокачественных клетках молочной железы прогнозирует более короткую безрецидивную и общую выживаемость, содержание ХС в строме не коррелирует с известными маркерами агрессивности опухоли или с клиническим исходом (Svensson *et al.*, 2011). Наши результаты не показали достоверной связи содержания ХС с выживаемостью пациентов с глиобластомой, что, кажется, противоречит результату о взаимосвязи уровня ХС в глиобластоме с индексом пролиферации Ki67. Однако активная пролиферация клеток глиобластомы не коррелирует напрямую с низкой выживаемостью пациентов. Помимо пролиферативной активности клеток глиобластомы (индекс Ki67), прогноз значительно зависит как от инвазивного потенциала клеток глиобластомы, так и от микроокружения опухоли, где ХС является

одним из ключевых компонентов. Указанное противоречие отражает важный вклад микроокружения опухоли в прогноз заболевания.

Полученные нами данные позволяют впервые предложить оригинальную панель гликозилированных прогностических биомаркеров (декорин, CSPG4/NG2, перлекан и ГС) для дополнительной диагностики глиобластомы. Внедрение этих прогностических биомаркеров в клиническую практику позволит персонализировать лечение пациентов с глиобластомой и своевременно выявлять пациентов, которые вряд ли будут реагировать на стандартные методы лечения, что позволит избежать нежелательных побочных эффектов при неэффективности лечения и тем самым повысить качество жизни пациентов.

Другой целью данного исследования было изучить влияние современной химиотерапии глиобластомы на гликозилированные компоненты (протеогликаны, гликозаминогликаны) нормальной и опухолевой ткани головного мозга и их вклад в развитие рецидива заболевания. На данный момент общепринятой схемой лечения первичной глиобластомы является хирургическое удаление опухоли с последующей радиотерапией и химиотерапией с применением алкилирующего препарата темозоломида (в большинстве случаев на фоне дексаметазона в качестве противоотечного агента) (Davis, 2016). Несмотря на интенсивность лечения, эффективность этой схемы по-прежнему недостаточно высока. Одной из причин недостаточной эффективности лечения может быть односторонний подход к терапии. Как правило, при разработке противоопухолевых препаратов и определении схемы их введения пациентам учитывается только способность данной терапии подавлять рост опухолевых клеток, и недостаточное внимание уделяется побочным эффектам терапии на микроокружение опухоли и нормальную ткань головного мозга. В то же время известно, что компоненты стромы нормальной ткани способны противостоять росту опухоли, а их разрушение может приводить к формированию специфической среды, благоприятной для пролиферации оставшихся после резекции опухолевых клеток (Chen *et al.*, 2015).

В последние годы появляется все больше исследований, подтверждающих роль повреждения микроокружения при терапии опухолей в эффективности терапии и развитии лекарственной устойчивости (Wu and Dai, 2017). В контексте глиобластомы на данный момент существует несколько исследований, демонстрирующих воздействие ионизирующего излучения на все ключевые компоненты ВКМ мозга, ослабляющее его защитные и регуляторные функции (Gupta and Burns, 2018; Shankar *et al.*, 2014; Yoo *et al.*, 2018). Однако данных о влиянии химиотерапии глиобластомы на нормальную ткань головного мозга в целом и различные компоненты микроокружения, включая

протеогликаны ВКМ, крайне мало. В единственной опубликованной работе показано, что комбинация ионизирующего излучения и темозоломида приводит к значительному изменению экспрессии ряда генов, что может формировать иммуносуппрессивное микроокружение, способствующее росту опухолевых клеток (Tamura *et al.,* 2020). Влияние дексаметазона изучено несколько больше, его токсические побочные эффекты продемонстрированы для многих видов рака (Murayi and Chittiboina, 2016; Shields *et al.,* 2015), а в глиомах его применение может снижать эффективность лечения и уменьшать выживаемость пациентов (Pitter *et al.,* 2016). Однако данных о влиянии темозоломида и дексаметазона на протеогликаны нормальной ткани головного мозга на данный момент в литературе нет.

В нашей работе показано, что введение дексаметазона и комбинации темозоломида с дексаметазоном приводит к изменению экспрессии синдекана-1, глипикана-1, бревикана, перлекана, декорина и CSPG4/NG2 в нормальной ткани головного мозга экспериментальных животных *in vivo*. Функциональная значимость данных изменений была показана при помощи совместного культивирования клеток глиобластомы U87 с обработанными темозоломидом и/или дексаметазоном орагнотипическими срезами гиппокампа *ex vivo*. Показано, что изменения, происходящие в нормальной ткани головного мозга под действием данных препаратов, приводят к значительному снижению ее способности противостоять росту опухоли: увеличивается адгезия клеток глиобластомы к поверхности срезов, ускоренная пролиферация опухолевых клеток, а также их инвазия вглубь среза. На модели ортотопической ксенотрансплантации клеток глиобластомы человека U87 животным, получавшим до инокуляции темозоломид и/или дексаметазон, нами было подтверждено увеличение скорости роста экспериментальных опухолей по сравнению с животными, не получавшими препаратов, и размеры опухолей были ассоциированы с паттерном экспрессии протеогликанов в окружающей опухоль ткани головного мозга. Полученные нами результаты являются уникальными и их невозможно сопоставить с литературными данными, поскольку аналогичные исследования ранее никогда не проводились.

Продемонстрированная способность традиционной химиотерапии глиобластомы изменять экспрессию и содержание ПГ и ГАГ в нормальной ткани головного мозга впервые указывает на необходимость пересмотра текущей схемы лечения глиобластомы, в особенности, схемы использования дексаметазона. Длительное применение низких доз дексаметазона может быть более целесообразным для сохранения экспрессии протеогликанов и, как следствие, структуры ВКМ головного мозга, чем однократная инъекция высокой дозы. Поскольку влияние дексаметазона на нормальную ткань

головного мозга может вносить вклад в отсроченные неврологические, психологические и социальные проблемы у пациентов с глиобластомой (Gately *et al.*, 2017), уменьшение негативных побочных эффектов терапии дексаметазоном может улучшить качество жизни пациентов с глиобластомой, отсрочить возникновение рецидива заболевания и увеличить выживаемость. Даже относительно незначительное увеличение продолжительности жизни пациентов с глиобластомой в 2-3 месяца сравнимо с внедрением в клиническую практику нового препарата для лечения глиобластомы. Так, внедрение темозоломида в дополнение к радиотерапии привело к увеличению медианы выживаемости с 12,1 до 14,6 месяцев (Herbener *et al.*, 2020), а применение Авастина в клинических испытаниях приводит к увеличению безрецидивной выживаемости всего на 4 месяца (Carlsson *et al.*, 2014). При этом изменение схемы лечения с использованием уже хорошо известных и применяемых препаратов может быть осуществлено намного быстрее, чем разработка принципиально нового препарата.

Таким образом, результаты данного исследования доказывают важность неклеточного компонента микроокружения, протеогликанов, в побочных эффектах существующей схемы терапии глиобластомы, потенциально приводящих к ускорению развития рецидива заболевания. Полученные результаты могут иметь большое практическое значение для увеличения эффективности лечения пациентов с глиобластомой и улучшения качества их жизни.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Протеогликаны являются ключевыми компонентами ВКМ ткани головного мозга и могут играть важную роль в злокачественной трансформации этой ткани. В данной работе была изучена экспрессия ПГ в глиобластоме, и было показано, что экспрессия коровых белков декорина, CSPG4/NG2 и перлекана повышена в ткани глиобластомы по сравнению с контрольной тканью головного мозга, а также негативно ассоциирована с выживаемостью пациентов. Содержание углеводных цепей ГАГ в ткани опухоли также имеет клиническую значимость: высокое содержание гепарансульфата ассоциировано с низкой безрецидивной выживаемостью, а высокое содержание хондроитинсульфата – с повышенной пролиферативной активностью опухолевых клеток. Полученные результаты позволяют впервые предложить панель гликозилированных прогностических биомаркеров (перлекан, декорин, CSPG4/NG2 и ГС) для дополнительной диагностики глиобластомы. Внедрение этих биомаркеров в клиническую практику позволит персонализировать лечение и выявлять пациентов, невосприимчивых к стандартным методам лечения, что позволит избежать нежелательных побочных эффектов при лечении и тем самым повысить качество жизни пациентов.

Применение химиотерапевтических препаратов темозоломида и дексаметазона, используемых при лечении глиобластомы, приводит к изменению уровня и паттерна экспрессии ПГ как в опухолевых клетках глиобластомы *in vitro*, так и в нормальной ткани головного мозга экспериментальных животных *ex vivo* и *in vivo* и нарушению структуры ВКМ ткани головного мозга, что способствует росту и инвазии клеток глиобластомы в органотипические срезы гиппокампа крысы *ex vivo*, а также увеличению скорости роста экспериментальных опухолей U87 в головном мозге мышей SCID *in vivo*. Важную роль в этом процессе играет баланс содержания углеводных цепей ГАГ в нормальной ткани головного мозга - снижение содержания ХС-АС и увеличение содержания ХС-В в нормальной ткани головного мозга *ex vivo* приводит к увеличению инвазии в нее опухолевых клеток глиобластомы и их ускоренной пролиферации.

Таким образом, результаты данного исследования показывают важность ПГ в развитии глиобластомы, а нарушение их экспрессии под действием химиотерапевтических препаратов может приводить к формированию специфической ниши, способствующей дальнейшему росту опухоли, что может быть одним из молекулярных механизмов развития рецидива глиобластомы. Продемонстрированная способность химиотерапевтических препаратов изменять экспрессию и содержание ПГ и ГАГ в нормальной ткани головного мозга впервые показывает необходимость пересмотра

общепринятой схемы лечения глиобластомы с учетом как целевых, так и ее побочных эффектов, связанных с нарушением состава гликозилированных молекул в структуре ткани головного мозга. При этом изменение схемы лечения с использованием уже хорошо известных и применяемых препаратов может быть осуществлено намного быстрее, чем разработка принципиально нового препарата. Полученные результаты могут иметь практическое значение для увеличения эффективности лечения пациентов с глиобластомой и улучшения качества их жизни.

ВЫВОДЫ

1. Определена панель прогностических маркеров глиобластомы: высокая экспрессия коровых белков декорина, CSPG4/NG2 и перлекана в ткани опухоли негативно ассоциирована с общей выживаемостью пациентов с глиобластомой, а содержание углеводных цепей гепарансульфата – с низкой безрецидивной выживаемостью пациентов.
2. Темозоломид и дексаметазон избирательно влияют на экспрессию протеогликанов в клетках глиобластомы человека U87: значительно увеличивается экспрессия глипикана-1, серглицина, декорина и люмикана и снижается экспрессия CD44 и бигликана по сравнению с контрольными клетками, что приводит к изменению паттерна экспрессии протеогликанов в этих клетках. Скорость пролиферации клеток U87 под действием препаратов значительно снижается по сравнению с контролем, однако эти препараты не влияют на жизнеспособность клеток in vitro.
3. Паттерн экспрессии протеогликанов в нормальной ткани головного мозга экспериментальных крыс и мышей изменяется под действием темозоломида и дексаметазона: увеличивается экспрессия синдекана-1, глипикана-1, бигликана и декорина. Наибольшее влияние на экспрессию протеогликанов оказывает комбинация данных препаратов.
4. Изменение паттернов экспрессии протеогликанов и содержание хондроитин- и дерматансульфата в огранотипических срезах гиппокампа крысы *ex vivo*, обработанных темозоломидом и/или дексаметазоном, приводит к увеличению пролиферативной активности клеток глиобластомы U87, их адгезии к поверхности среза и инвазии вглубь среза в системе их совместного культивирования.
5. Применение темозоломида и дексаметазона приводит к изменению паттерна экспрессии протеогликанов в нормальной ткани головного мога мышей SCID и увеличению скорости роста и размера экспериментальных опухолей U87 *in vivo*.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВКМ – внеклеточный матрикс

ВОЗ – всемирная организация здравоохраненения

ГАГ – гликозаминогликан

ГБМ – глиобластома

Геп – гепарин

ГК – гиалуроновая кислота

ГС – гепарансульфат

ГСПГ – гепарансульфат протеогликан

ГЭБ – гематоэнцефалический барьер

ДК – дендритные клетки

ДКС – дексаметазон

ДМСО – диметилсульфоксид

ДС – дерматансульфат

ДСПГ – дерматансульфат протеогликан

КС – кератансульфат

МРТ – магнитно-резонансная томография

ОТ – обратная транскрипция

ПГ – протеогликан

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ТМЗ – темозоломид,

ХС – хондроитинсульфат

ХСПГ – хондроитинсульфат протеогликан

ЦНС – центральная нервная система

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

ANOVA – однофакторный дисперсионный анализ

CSC – стволовые опухолевые клетки

EGF – эпидермальный фактор роста

EGFR – рецептор эпидермального фактора роста

FGF – фактор роста фибробластов

FGFR – рецептор фактора роста фибробластов

GalNAc – галактозамин

GlcA – глюкуроновая кислота

GPI – гликозилфосфатидилинозитол

IdoA – идуроновая кислота

IGF – инсулиноподобный фактор роста

LRR – лейцин–богатый повтор

MCSP – ассоциированный с меланомой хондроитинсульфат протеогликан

MMP – металлопротеиназа матрикса

NG2 – нервно–глиальный антиген 2

PDGF – фактор роста тромбоцитов

RFP – красный флуоресцирующий белок

RTK – рецепторы с тирозинкиназной активностью

SCID – линия бестимусных мышей Hairless Outbred SHO–PrkdcscidHrhr Mouse

SLRP – малые лейцин богатые ПГ

TGF – трансформирующий фактор роста

TME – микроокружение опухоли

TNF – фактор некроза опухоли

СПИСОК ЦИТИРОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Суховских А. В., Григорьева Э. В. Протеогликаны в нормальной физиологии и канцерогенезе // Успехи молекулярной онкологии. – 2018. – Т. 5, № 1. – С. 8-25.
2. Цидулко А.Ю., Кобозев В.В., Волков А.М., Костромская Д.В., Айдагулова С.В., Киселёв Р.С., Прудникова Т.Ю., Кривошапкин А.Л. Транскрипционная активность CSPG4/NG2 как прогностический маркер послеоперационного течения глиобластом // Патология кровообращения и кардиохирургия. – 2015. – Т. 19, № 3. – С. 110-113.
3. Adatia R., Albini A., Carlone S., Giunciuglio D., Benelli R., Santi L., Noonan D. M. Suppression of invasive behavior of melanoma cells by stable expression of anti-sense perlecan cDNA // Annals of Oncology. – 1997. – 1997/12. – V. 8, № 12. – P. 1257-1261.
4. Afratis N., Gialeli C., Nikitovic D., Tsegenidis T., Karousou E., Theocharis A. D., Pavao M. S., Tzanakakis G. N., Karamanos N. K. Glycosaminoglycans: key players in cancer cell biology and treatment // Febs Journal. – 2012. – V. 279, № 7. – P. 1177-1197.
5. Afratis N. A., Nikitovic D., Multhaupt H. A., Theocharis A. D., Couchman J. R., Karamanos N. K. Syndecans - key regulators of cell signaling and biological functions // Febs j. – 2017. – V. 284, № 1. – P. 27-41.
6. Akatsu C., Mizumoto S., Kaneiwa T., Maccarana M., Malmström A., Yamada S., Sugahara K. Dermatan sulfate epimerase 2 is the predominant isozyme in the formation of the chondroitin sulfate/dermatan sulfate hybrid structure in postnatal developing mouse brain // Glycobiology. – 2010. – V. 21, № 5. – P. 565-574.
7. Al-Mayhani M. T., Grenfell R., Narita M., Piccirillo S., Kenney-Herbert E., Fawcett J. W., Collins V. P., Ichimura K., Watts C. NG2 expression in glioblastoma identifies an actively proliferating population with an aggressive molecular signature // Neuro Oncol. – 2011. – V. 13, № 8. – P. 830-45.
8. Aldape K., Zadeh G., Mansouri S., Reifenberger G., von Deimling A. Glioblastoma: pathology, molecular mechanisms and markers // Acta Neuropathol. – 2015. – V. 129, № 6. – P. 829-48.
9. Appunni S., Anand V., Khandelwal M., Gupta N., Rubens M., Sharma A. Small Leucine Rich Proteoglycans (decorin, biglycan and lumican) in cancer // Clin Chim Acta. – 2019. – V. 491. – P. 1-7.
10. Appunni S., Anand V., Khandelwal M., Seth A., Mathur S., Sharma A. Altered expression of small leucine-rich proteoglycans (Decorin, Biglycan and Lumican): Plausible diagnostic marker in urothelial carcinoma of bladder // Tumor Biology. – 2017. – V. 39, № 5. – P. 101042831769911.

11. Asher R. A., Morgenstern D. A., Shearer M. C., Adcock K. H., Pesheva P., Fawcett J. W. Versican is upregulated in CNS injury and is a product of oligodendrocyte lineage cells // The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience. – 2002. – V. 22, № 6. – P. 2225-2236.
12. Aspberg A., Miura R., Bourdoulous S., Shimonaka M., Heinegârd D., Schachner M., Ruoslahti E., Yamaguchi Y. The C-type lectin domains of lecticans, a family of aggregating chondroitin sulfate proteoglycans, bind tenascin-R by protein-protein interactions independent of carbohydrate moiety // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 1997. – V. 94, № 19. – P. 10116-10121.
13. Basappa, Murugan S., Sugahara K. N., Lee C. M., ten Dam G. B., van Kuppevelt T. H., Miyasaka M., Yamada S., Sugahara K. Involvement of chondroitin sulfate E in the liver tumor focal formation of murine osteosarcoma cells // Glycobiology. – 2009. – V. 19, № 7. – P. 735-742.
14. Berendsen A. D., Fisher L. W., Kilts T. M., Owens R. T., Robey P. G., Gutkind J. S., Young M. F. Modulation of canonical Wnt signaling by the extracellular matrix component biglycan // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2011. – V. 108, № 41. – P. 17022-17027.
15. Bergefall K., Trybala E., Johansson M., Uyama T., Naito S., Yamada S., Kitagawa H., Sugahara K., Bergström T. Chondroitin Sulfate Characterized by the E-disaccharide Unit Is a Potent Inhibitor of Herpes Simplex Virus Infectivity and Provides the Virus Binding Sites on gro2C Cells // Journal of Biological Chemistry. – 2005. – V. 280, № 37. – P. 32193-32199.
16. Bernfield M., Götte M., Park P. W., Reizes O., Fitzgerald M. L., Lincecum J., Zako M. Functions of Cell Surface Heparan Sulfate Proteoglycans // Annual Review of Biochemistry. – 1999. – V. 68, № 1. – P. 729-777.
17. Bezakova G., Ruegg M. A. New insights into the roles of agrin // Nature Reviews Molecular Cell Biology. – 2003. – V. 4, № 4. – P. 295-309.
18. Bhavanandan V. P., Davidson E. A. Mucopolysaccharides associated with nuclei of cultured mammalian cells // Proc Natl Acad Sci U S A. – 1975. – Jun. – V. 72, № 6. – P. 2032-6.
19. Biglari A., Bataille D., Naumann U., Weller M., Zirger J., Castro M. G., Lowenstein P. R. Effects of ectopic decorin in modulating intracranial glioma progression in vivo, in a rat syngeneic model // Cancer Gene Ther. – 2004. – V. 11, № 11. – P. 721-32.
20. Bonnans C., Chou J., Werb Z. Remodelling the extracellular matrix in development and disease // Nat Rev Mol Cell Biol. – 2014. – V. 15, № 12. – P. 786-801.

21. Bork P., Patthy L. The SEA module: a new extracellular domain associated with O-glycosylation // Protein science : a publication of the Protein Society. – 1995. – V. 4, № 7. – P. 1421-1425.
22. Bourguignon L. Y. W., Shiina M., Li J.-J. Hyaluronan-CD44 interaction promotes oncogenic signaling, microRNA functions, chemoresistance, and radiation resistance in cancer stem cells leading to tumor progression // Advances in cancer research. – 2014. – V. 123. – P. 255-275.
23. Bradshaw A., Wickremsekera A., Tan S. T., Peng L., Davis P. F., Itinteang T. Cancer Stem Cell Hierarchy in Glioblastoma Multiforme // Front Surg. – 2016. – V. 3. – P. 21.
24. Brandao M., Simon T., Critchley G., Giamas G. Astrocytes, the rising stars of the glioblastoma microenvironment // Glia. – 2019. – 05. – V. 67, № 5. – P. 779-790.
25. Brown D. V., Daniel P. M., D'Abaco G. M., Gogos A., Ng W., Morokoff A. P., Mantamadiotis T. Coexpression analysis of CD133 and CD44 identifies proneural and mesenchymal subtypes of glioblastoma multiforme // Oncotarget. – 2015. – V. 6, № 8. – P. 6267-80.
26. Burnside E. R., Bradbury E. J. Review: Manipulating the extracellular matrix and its role in brain and spinal cord plasticity and repair // Neuropathology and Applied Neurobiology. – 2014. – V. 40, № 1. – P. 26-59.
27. Capurro M. I., Xiang Y.-Y., Lobe C., Filmus J. Glypican-3 Promotes the Growth of Hepatocellular Carcinoma by Stimulating Canonical Wnt Signaling // Cancer Research. – 2005. – V. 65, № 14. – P. 6245-6254.
28. Carlsson S. K., Brothers S. P., Wahlestedt C. Emerging treatment strategies for glioblastoma multiforme // EMBO Mol Med. – 2014. – V. 6, № 11. – P. 1359-70.
29. Carmeliet P., Jain R. K. Angiogenesis in cancer and other diseases // Nature. – 2000. – V. 407, № 6801. – P. 249-257.
30. Carmeliet P., Jain R. K. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis // Nature. – 2011. – V. 473, № 7347. – P. 298-307.
31. Carulli D., Rhodes K. E., Brown D. J., Bonnert T. P., Pollack S. J., Oliver K., Strata P., Fawcett J. W. Composition of perineuronal nets in the adult rat cerebellum and the cellular origin of their components // The Journal of Comparative Neurology. – 2005. – V. 494, № 4. – P. 559-577.
32. Caterson B., Melrose J. Keratan sulfate, a complex glycosaminoglycan with unique functional capability // Glycobiology. – 2018. – V. 28, № 4. – P. 182-206.
33. Chandran V. I., Welinder C., Mansson A. S., Offer S., Freyhult E., Pernemalm M., Lund S. M., Pedersen S., Lehtio J., Marko-Varga G., Johansson M. C., Englund E., Sundgren P. C.,

Belting M. Ultrasensitive Immunoprofiling of Plasma Extracellular Vesicles Identifies Syndecan-1 as a Potential Tool for Minimally Invasive Diagnosis of Glioma // Clinical Cancer Research. – 2019. – V. 25, № 10. – P. 3115-3127.

34. Charles N. A., Holland E. C., Gilbertson R., Glass R., Kettenmann H. The brain tumor microenvironment // Glia. – 2012. – Mar. – V. 60, № 3. – P. 502-14.
35. Chekenya M., Krakstad C., Svendsen A., Netland I. A., Staalesen V., Tysnes B. B., Selheim F., Wang J., Sakariassen P. Ø., Sandal T., Lønning P. E., Flatmark T., Enger P. Ø., Bjerkvig R., Sioud M., Stallcup W. B. The progenitor cell marker NG2/MPG promotes chemoresistance by activation of integrin-dependent PI3K/Akt signaling // Oncogene. – 2008. – V. 27, № 39. – P. 5182-5194.
36. Chen F., Zhuang X., Lin L., Yu P., Wang Y., Shi Y., Hu G., Sun Y. New horizons in tumor microenvironment biology: challenges and opportunities // BMC medicine. – 2015. – V. 13. – P. 45-45.
37. Chen J., McKay R. M., Parada L. F. Malignant glioma: lessons from genomics, mouse models, and stem cells // Cell. – 2012. – V. 149, № 1. – P. 36-47.
38. Chen X.-D., Fisher L. W., Robey P. G., Young M. F. The small leucine-rich proteoglycan biglycan modulates BMP-4-induced osteoblast differentiation // The FASEB Journal. – 2004. – V. 18, № 9. – P. 948-958.
39. Choi Y., Chung H., Jung H., Couchman J. R., Oh E.-S. Syndecans as cell surface receptors: Unique structure equates with functional diversity // Matrix Biology. – 2011. – V. 30, № 2. – P. 93-99.
40. Chouaib S., Kieda C., Benlalam H., Noman M. Z., Mami-Chouaib F., Rüegg C. Endothelial cells as key determinants of the tumor microenvironment: interaction with tumor cells, extracellular matrix and immune killer cells // Crit Rev Immunol. – 2010. – V. 30, № 6. – P. 529-45.
41. Cirri P., Chiarugi P. Cancer associated fibroblasts: the dark side of the coin // Am J Cancer Res. – 2011. – V. 1, № 4. – P. 482-97.
42. Cohen I. R., Murdoch A. D., Naso M. F., Marchetti D., Berd D., Iozzo R. V. Abnormal expression of perlecan proteoglycan in metastatic melanomas // Cancer Res. – 1994. – V. 54, № 22. – P. 5771-4.
43. Connell B. J., Lortat-Jacob H. Human immunodeficiency virus and heparan sulfate: from attachment to entry inhibition // Frontiers in immunology. – 2013. – V. 4. – P. 385-385.
44. Conti P., Castellani M. L., Kempuraj D., Salini V., Vecchiet J., Tetè S., Mastrangelo F., Perrella A., De Lutiis M. A., Tagen M., Theoharides T. C. Role of mast cells in tumor growth // Ann Clin Lab Sci. – 2007. – V. 37, № 4. – P. 315-22.

45. Davies E. J. Distribution and Clinical Significance of Heparan Sulfate Proteoglycans in Ovarian Cancer // Clinical Cancer Research. – 2004. – V. 10, № 15. – P. 5178-5186.
46. Davis M. E. Glioblastoma: Overview of Disease and Treatment // Clin J Oncol Nurs. – 2016. – V. 20, № 5 Suppl. – P. S2-8.
47. de Visser K. E., Eichten A., Coussens L. M. Paradoxical roles of the immune system during cancer development // Nature Reviews Cancer. – 2006. – V. 6, № 1. – P. 24-37.
48. de Wit M., Carvalho B., Delis-van Diemen P. M., van Alphen C., Beliën J. A. M., Meijer G. A., Fijneman R. J. A. Lumican and versican protein expression are associated with colorectal adenoma-to-carcinoma progression // PloS one. – 2017. – V. 12, № 5. – P. e0174768-e0174768.
49. Denton A. E., Roberts E. W., Fearon D. T. Stromal Cells in the Tumor Microenvironment // Adv Exp Med Biol. – 2018. – V. 1060. – P. 99-114.
50. Djerbal L., Lortat-Jacob H., Kwok J. Chondroitin sulfates and their binding molecules in the central nervous system // Glycoconjugate journal. – 2017. – V. 34, № 3. – P. 363-376.
51. Domowicz M. S., Sanders T. A., Ragsdale C. W., Schwartz N. B. Aggrecan is expressed by embryonic brain glia and regulates astrocyte development // Developmental biology. – 2008. – V. 315, № 1. – P. 114-124.
52. Douaiher J., Succar J., Lancerotto L., Gurish M. F., Orgill D. P., Hamilton M. J., Krilis S. A., Stevens R. L. Development of mast cells and importance of their tryptase and chymase serine proteases in inflammation and wound healing // Advances in immunology. – 2014. – V. 122. – P. 211-252.
53. Dwyer C. A., Bi W. L., Viapiano M. S., Matthews R. T. Brevican knockdown reduces late-stage glioma tumor aggressiveness // Journal of neuro-oncology. – 2014. – V. 120, № 1. – P. 63-72.
54. Erez N., Truitt M., Olson P., Arron S. T., Hanahan D. Cancer-Associated Fibroblasts Are Activated in Incipient Neoplasia to Orchestrate Tumor-Promoting Inflammation in an NF-kappaB-Dependent Manner // Cancer Cell. – 2010. – V. 17, № 2. – P. 135-47.
55. Eshchenko T. Y., Rykova V. I., Chernakov A. E., Sidorov S. V., Grigorieva E. V. Expression of different proteoglycans in human breast tumors // Biochemistry (Mosc). – 2007. – V. 72, № 9. – P. 1016-20.
56. Farace C., Oliver J. A., Melguizo C., Alvarez P., Bandiera P., Rama A. R., Malaguarnera G., Ortiz R., Madeddu R., Prados J. Microenvironmental Modulation of Decorin and Lumican in Temozolomide-Resistant Glioblastoma and Neuroblastoma Cancer Stem-Like Cells // PLoS One. – 2015. – V. 10, № 7. – P. e0134111.

57. Fawcett J. W., Asher R. A. The glial scar and central nervous system repair // Brain Research Bulletin. – 1999. – V. 49, № 6. – P. 377-391.
58. Fawcett J. W., Schwab M. E., Montani L., Brazda N., MÜller H. W. Defeating inhibition of regeneration by scar and myelin components // Handbook of Clinical NeurologyElsevier, 2012. – P. 503-522.
59. Fears C. Y., Gladson C. L., Woods A. Syndecan-2 Is Expressed in the Microvasculature of Gliomas and Regulates Angiogenic Processes in Microvascular Endothelial Cells // Journal of Biological Chemistry. – 2006. – V. 281, № 21. – P. 14533-14536.
60. Filmus J., Capurro M. The role of glypicans in Hedgehog signaling // Matrix Biology. – 2014. – V. 35. – P. 248-252.
61. Filmus J., Capurro M., Rast J. Glypicans // Genome biology. – 2008. – V. 9, № 5. – P. 224-224.
62. Frischknecht R., Seidenbecher C. I. Brevican: A key proteoglycan in the perisynaptic extracellular matrix of the brain // The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. – 2012. – V. 44, № 7. – P. 1051-1054.
63. Galtrey C. M., Kwok J. C. F., Carulli D., Rhodes K. E., Fawcett J. W. Distribution and synthesis of extracellular matrix proteoglycans, hyaluronan, link proteins and tenascin-R in the rat spinal cord // European Journal of Neuroscience. – 2008. – V. 27, № 6. – P. 1373-1390.
64. Gately L., McLachlan S. A., Dowling A., Philip J. Life beyond a diagnosis of glioblastoma: a systematic review of the literature // J Cancer Surviv. – 2017. – V. 11, № 4. – P. 447-452.
65. Gesteira T. F., Coulson-Thomas Y. M., Coulson-Thomas V. J. Anti-inflammatory properties of the glial scar // Neural regeneration research. – 2016. – V. 11, № 11. – P. 1742-1743.
66. Giamanco K. A., Matthews R. T. Deconstructing the perineuronal net: cellular contributions and molecular composition of the neuronal extracellular matrix // Neuroscience. – 2012. – V. 218. – P. 367-384.
67. Goretzki L., Burg M. A., Grako K. A., Stallcup W. B. High-affinity Binding of Basic Fibroblast Growth Factor and Platelet-derived Growth Factor-AA to the Core Protein of the NG2 Proteoglycan // Journal of Biological Chemistry. – 1999. – V. 274, № 24. – P. 16831-16837.
68. Gouma E., Simos Y., Verginadis I., Lykoudis E., Evangelou A., Karkabounas S. A simple procedure for estimation of total body surface area and determination of a new value of Meeh's constant in rats // Lab Anim. – 2012. – V. 46, № 1. – P. 40-5.
69. Gowda D. C. Role of Chondroitin-4-Sulfate in Pregnancy-Associated Malaria // Chondroitin Sulfate: Structure, Role and Pharmacological Activity, Elsevier. 2006. – P. 375-400.

70. Grigorieva E. V., Prudnikova T. Y., Domanitskaya N. V., Mostovich L. A., Pavlova T. V., Kashuba V. I., Zabarovsky E. R. D-glucuronyl C5-epimerase suppresses small-cell lung cancer cell proliferation in vitro and tumour growth in vivo // Br J Cancer. – 2011. – V. 105, № 1. – P. 74-82.
71. Gu X., Ma Y., Xiao J., Zheng H., Song C., Gong Y., Xing X. Up-regulated biglycan expression correlates with the malignancy in human colorectal cancers // Clinical and Experimental Medicine. – 2011. – V. 12, № 3. – P. 195-199.
72. Gupta K., Burns T. C. Radiation-Induced Alterations in the Recurrent Glioblastoma Microenvironment: Therapeutic Implications // Front Oncol. – 2018. – V. 8. – P. 503.
73. Hanahan D., Weinberg Robert A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation // Cell. – 2011. – V. 144, № 5. – P. 646-674.
74. Hayashi Y., Call M. K., Chikama T.-i., Liu H., Carlson E. C., Sun Y., Pearlman E., Funderburgh J. L., Babcock G., Liu C.-Y., Ohashi Y., Kao W. W. Y. Lumican is required for neutrophil extravasation following corneal injury and wound healing // Journal of cell science. – 2010. – V. 123, № Pt 17. – P. 2987-2995.
75. Heinegård D. Fell-Muir Lecture: Proteoglycans and more–from molecules to biology // International journal of experimental pathology. – 2009. – V. 90, № 6. – P. 575-586.
76. Herbener V. J., Burster T., Goreth A., Pruss M., von Bandemer H., Baisch T., Fitzel R., Siegelin M. D., Karpel-Massler G., Debatin K. M., Westhoff M. A., Strobel H. Considering the Experimental use of Temozolomide in Glioblastoma Research // Biomedicines. – 2020. – V. 8, № 6.
77. Hopf M., Göhring W., Kohfeldt E., Yamada Y., Timpl R. Recombinant domain IV of perlecan binds to nidogens, laminin-nidogen complex, fibronectin, fibulin-2 and heparin // Eur J Biochem. – Feb. – V. 259, № 3. – P. 917-25.
78. Hulett M. D., Freeman C., Hamdorf B. J., Baker R. T., Harris M. J., Parish C. R. Cloning of mammalian heparanase, an important enzyme in tumor invasion and metastasis // Nature Medicine. – 1999. – V. 5, № 7. – P. 803-809.
79. Ilhan-Mutlu A., Siehs C., Berghoff A. S., Ricken G., Widhalm G., Wagner L., Preusser M. Expression profiling of angiogenesis-related genes in brain metastases of lung cancer and melanoma // Tumour Biol. – 2016. – V. 37, № 1. – P. 1173-82.
80. Inatani M. Mammalian Brain Morphogenesis and Midline Axon Guidance Require Heparan Sulfate // Science. – 2003. – V. 302, № 5647. – P. 1044-1046.
81. Iozzo R. V. The Family of the Small Leucine-Rich Proteoglycans: Key Regulators of Matrix Assembly and Cellular Growth // Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology. – 1997. – V. 32, № 2. – P. 141-174.

82. Iozzo R. V., San Antonio J. D. Heparan sulfate proteoglycans: heavy hitters in the angiogenesis arena // Journal of Clinical Investigation. – 2001. – V. 108, № 3. – P. 349-355.
83. Iozzo R. V., Schaefer L. Proteoglycan form and function: A comprehensive nomenclature of proteoglycans // Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology. – 2015. – V. 42. – P. 11-55.
84. Ishihara M., Conrad H. E. Correlations between heparan sulfate metabolism and hepatoma growth // J Cell Physiol. – 1989. – V. 138, № 3. – P. 467-76.
85. Ishihara M., Fedarko N. S., Conrad H. E. Transport of heparan sulfate into the nuclei of hepatocytes // J Biol Chem. – 1986. – V. 261, № 29. – P. 13575-80.
86. Ishii S., Ford R., Thomas P., Nachman A., Steele G., Jessup J. M. CD44 participates in the adhesion of human colorectal carcinoma cells to laminin and type IV collagen // Surgical Oncology. – 1993. – V. 2, № 4. – P. 255-264.
87. Izumikawa T., Kanagawa N., Watamoto Y., Okada M., Saeki M., Sakano M., Sugahara K., Sugihara K., Asano M., Kitagawa H. Impairment of embryonic cell division and glycosaminoglycan biosynthesis in glucuronyltransferase-I-deficient mice // The Journal of biological chemistry. – 2010. – V. 285, № 16. – P. 12190-12196.
88. Jen Y.-H. L., Musacchio M., Lander A. D. Glypican-1 controls brain size through regulation of fibroblast growth factor signaling in early neurogenesis // Neural development. – 2009. – V. 4. – P. 33-33.
89. Jiang X., Couchman J. R. Perlecan and tumor angiogenesis // J Histochem Cytochem. – 2003. – Nov. – V. 51, № 11. – P. 1393-410.
90. Johnson D. R., Fogh S. E., Giannini C., Kaufmann T. J., Raghunathan A., Theodosopoulos P. V., Clarke J. L. Case-Based Review: newly diagnosed glioblastoma // Neurooncol Pract. – 2015. – V. 2, № 3. – P. 106-121.
91. Karamanos N. K., Piperigkou Z., Theocharis A. D., Watanabe H., Franchi M., Baud S., Brézillon S., Götte M., Passi A., Vigetti D., Ricard-Blum S., Sanderson R. D., Neill T., Iozzo R. V. Proteoglycan Chemical Diversity Drives Multifunctional Cell Regulation and Therapeutics // Chem Rev. – 2018. – V. 118, № 18. – P. 9152-9232.
92. Kazanskaya G. M., Tsidulko A. Y., Volkov A. M., Kiselev R. S., Suhovskih A. V., Kobozev V. V., Gaytan A. S., Aidagulova S. V., Krivoshapkin A. L., Grigorieva E. V. Heparan sulfate accumulation and perlecan/HSPG2 up-regulation in tumour tissue predict low relapse-free survival for patients with glioblastoma // Histochemistry and Cell Biology. – 2018. – V. 149, № 3. – P. 235-244.
93. Kessenbrock K., Plaks V., Werb Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment // Cell. – 2010. – V. 141, № 1. – P. 52-67.

94. Kiani C., Chen L., Wu Y. J., Yee A. J., Yang B. B. Structure and function of aggrecan // Cell Research. – 2002. – V. 12, № 1. – P. 19-32.

95. Kim H., Xu G.-L., Borczuk A. C., Busch S., Filmus J., Capurro M., Brody J. S., Lange J., D'Armiento J. M., Rothman P. B., Powell C. A. The Heparan Sulfate ProteoglycanGPC3Is a Potential Lung Tumor Suppressor // American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology. – 2003. – V. 29, № 6. – P. 694-701.

96. Kim J., Bae J.-S. Tumor-Associated Macrophages and Neutrophils in Tumor Microenvironment // Mediators of inflammation. – 2016. – V. 2016. – P. 6058147-6058147.

97. Kodama J., Hasengaowa, Kusumoto T., Seki N., Matsuo T., Ojima Y., Nakamura K., Hongo A., Hiramatsu Y. Prognostic significance of stromal versican expression in human endometrial cancer // Annals of Oncology. – 2007. – V. 18, № 2. – P. 269-274.

98. Korpetinou A., Skandalis S. S., Labropoulou V. T., Smirlaki G., Noulas A., Karamanos N. K., Theocharis A. D. Serglycin: at the crossroad of inflammation and malignancy // Front Oncol. – 2014. – V. 3. – P. 327.

99. Kumari S., Ahsan S. M., Kumar J. M., Kondapi A. K., Rao N. M. Overcoming blood brain barrier with a dual purpose Temozolomide loaded Lactoferrin nanoparticles for combating glioma (SERP-17-12433) // Sci Rep. – 2017. – V. 7, № 1. – P. 6602.

100. Lamprecht M. R., Sabatini D. M., Carpenter A. E. CellProfiler: free, versatile software for automated biological image analysis // Biotechniques. – 2007. – V. 42, № 1. – P. 71-5.

101. Lebaron R. G. Versican // Perspect Dev Neurobiol. – 1996. – V. 3, № 4. – P. 261-71.

102. LeBleu V. S. Imaging the Tumor Microenvironment // Cancer J. – 2015. – V. 21, № 3. – P. 174-8.

103. Lee Y. J., Shacter E. Oxidative stress inhibits apoptosis in human lymphoma cells // J Biol Chem. – 1999. – V. 274, № 28. – P. 19792-8.

104. Lemke D., Weiler M., Blaes J., Wiestler B., Jestaedt L., Klein A. C., Löw S., Eisele G., Radlwimmer B., Capper D., Schmieder K., Mittelbronn M., Combs S. E., Bendszus M., Weller M., Platten M., Wick W. Primary glioblastoma cultures: can profiling of stem cell markers predict radiotherapy sensitivity? // J Neurochem. – 2014. – V. 131, № 2. – P. 251-64.

105. Li F., Ten Dam G. B., Murugan S., Yamada S., Hashiguchi T., Mizumoto S., Oguri K., Okayama M., van Kuppevelt T. H., Sugahara K. Involvement of highly sulfated chondroitin sulfate in the metastasis of the Lewis lung carcinoma cells // The Journal of biological chemistry. – 2008. – V. 283, № 49. – P. 34294-34304.

106. Li H., Yamagata T., Mori M., Momoi M. Y. Association of autism in two patients with hereditary multiple exostoses caused by novel deletion mutations of EXT1 // Journal of Human Genetics. – 2002. – V. 47, № 5. – P. 262-265.

107. Li J. P., Kusche-Gullberg M. Heparan Sulfate: Biosynthesis, Structure, and Function // Int Rev Cell Mol Biol. – 2016. – V. 325. – P. 215-73.

108. Li Y., Laue K., Temtamy S., Aglan M., Kotan L. D., Yigit G., Canan H., Pawlik B., Nürnberg G., Wakeling E. L., Quarrell O. W., Baessmann I., Lanktree M. B., Yilmaz M., Hegele R. A., Amr K., May K. W., Nürnberg P., Topaloglu A. K., Hammerschmidt M., Wollnik B. Temtamy preaxial brachydactyly syndrome is caused by loss-of-function mutations in chondroitin synthase 1, a potential target of BMP signaling // American journal of human genetics. – 2010. – V. 87, № 6. – P. 757-767.

109. Liao W. C., Liao C. K., Tseng T. J., Ho Y. J., Chen Y. R., Lin K. H., Lai T. J., Lan C. T., Wei K. C., Liu C. H. Chondroitin sulfate synthase 1 enhances proliferation of glioblastoma by modulating PDGFRA stability // Oncogenesis. – 2020. – V. 9, № 2. – P. 11.

110. Lin H., Huber R., Schlessinger D., Morin P. J. Frequent silencing of the GPC3 gene in ovarian cancer cell lines // Cancer Res. – 1999. – V. 59, № 4. – P. 807-10.

111. Listik E., Toma L. Glypican-1 in human glioblastoma: implications in tumorigenesis and chemotherapy // Oncotarget. – 2020. – V. 11, № 9. – P. 828-845.

112. Loew D., Schuster O., Graul E. H. Dose-dependent pharmacokinetics of dexamethasone // Eur J Clin Pharmacol. – 1986. – V. 30, № 2. – P. 225-30.

113. Logun M. T., Wynens K. E., Simchick G., Zhao W. J., Mao L. D., Zhao Q., Mukherjee S., Brat D. J., Karumbaiah L. Surfen-mediated blockade of extratumoral chondroitin sulfate glycosaminoglycans inhibits glioblastoma invasion // Faseb Journal. – 2019. – V. 33, № 11. – P. 11973-11992.

114. Louis D. N., Perry A., Reifenberger G., von Deimling A., Figarella-Branger D., Cavenee W. K., Ohgaki H., Wiestler O. D., Kleihues P., Ellison D. W. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary // Acta Neuropathol. – 2016. – V. 131, № 6. – P. 803-20.

115. Lu P., Weaver V. M., Werb Z. The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression // The Journal of cell biology. – 2012. – V. 196, № 4. – P. 395-406.

116. Ma H.-I., Hueng D.-Y., Shui H.-A., Han J.-M., Wang C.-H., Lai Y.-H., Cheng S.-Y., Xiao X., Chen M.-T., Yang Y.-P. Intratumoral decorin gene delivery by AAV vector inhibits brain glioblastomas and prolongs survival of animals by inducing cell differentiation // International journal of molecular sciences. – 2014. – V. 15, № 3. – P. 4393-4414.

117. Maccarana M., Kalamajski S., Kongsgaard M., Magnusson S. P., Oldberg A., Malmström A. Dermatan sulfate epimerase 1-deficient mice have reduced content and changed distribution of iduronic acids in dermatan sulfate and an altered collagen structure in skin // Molecular and cellular biology. – 2009. – V. 29, № 20. – P. 5517-5528.

118. Malfait F., Kariminejad A., Van Damme T., Gauche C., Syx D., Merhi-Soussi F., Gulberti S., Symoens S., Vanhauwaert S., Willaert A., Bozorgmehr B., Kariminejad M. H., Ebrahimiadib N., Hausser I., Huysseune A., Fournel-Gigleux S., De Paepe A. Defective initiation of glycosaminoglycan synthesis due to B3GALT6 mutations causes a pleiotropic Ehlers-Danlos-syndrome-like connective tissue disorder // American journal of human genetics. – 2013. – V. 92, № 6. – P. 935-945.

119. Margolis R. K., Crockett C. P., Kiang W. L., Margolis R. U. Glycosaminoglycans and glycoproteins associated with rat brain nuclei // Biochim Biophys Acta. – 1976. – V. 451, № 2. – P. 465-9.

120. Margolis R. U., Margolis R. K. Chondroitin sulfate proteoglycans as mediators of axon growth and pathfinding // Molecular Bases of Axonal Growth and PathfindingSpringer Berlin Heidelberg, 1997. – P. 343-348.

121. Martinez J. R., Dhawan A., Farach-Carson M. C. Modular Proteoglycan Perlecan/HSPG2: Mutations, Phenotypes, and Functions // Genes. – 2018. – V. 9, № 11. – P. 556.

122. Mathiak M., Yenisey C., Grant D. S., Sharma B., Iozzo R. V. A role for perlecan in the suppression of growth and invasion in fibrosarcoma cells // Cancer Res. – 1997. – V. 57, № 11. – P. 2130-6.

123. Merzak A., Koocheckpour S., Pilkington G. J. CD44 mediates human glioma cell adhesion and invasion in vitro // Cancer Res. – 1994. – V. 54, № 15. – P. 3988-92.

124. Mikami T., Kitagawa H. Biosynthesis and function of chondroitin sulfate // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects. – 2013. – V. 1830, № 10. – P. 4719-4733.

125. Miyata S., Kitagawa H. Formation and remodeling of the brain extracellular matrix in neural plasticity: Roles of chondroitin sulfate and hyaluronan // Biochim Biophys Acta Gen Subj. – 2017. – V. 1861, № 10. – P. 2420-2434.

126. Mooney K. L., Choy W., Sidhu S., Pelargos P., Bui T. T., Voth B., Barnette N., Yang I. The role of CD44 in glioblastoma multiforme // Journal of Clinical Neuroscience. – 2016. – V. 34. – P. 1-5.

127. Morath I., Hartmann T. N., Orian-Rousseau V. CD44: More than a mere stem cell marker // The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. – 2016. – V. 81. – P. 166-173.

128. Moreth K., Iozzo R. V., Schaefer L. Small leucine-rich proteoglycans orchestrate receptor crosstalk during inflammation // Cell cycle (Georgetown, Tex.). – 2012. – V. 11, № 11. – P. 2084-2091.

129. Munesue S., Kusano Y., Oguri K., Itano N., Yoshitomi Y., Nakanishi H., Yamashina I., Okayama M. The role of syndecan-2 in regulation of actin-cytoskeletal organization of Lewis lung carcinoma-derived metastatic clones // The Biochemical journal. – 2002. – V. 363, № Pt 2. – P. 201-209.

130. Murayi R., Chittiboina P. Glucocorticoids in the management of peritumoral brain edema: a review of molecular mechanisms // Childs Nerv Syst. – 2016. – V. 32, № 12. – P. 2293-2302.

131. Nackaerts K., Verbeken E., Deneffe G., Vanderschueren B., Demedts M., David G. Heparan sulfate proteoglycan expression in human lung-cancer cells // International Journal of Cancer. – 1997. – V. 74, № 3. – P. 335-345.

132. Nakada M., Miyamori H., Kita D., Takahashi T., Yamashita J., Sato H., Miura R., Yamaguchi Y., Okada Y. Human glioblastomas overexpress ADAMTS-5 that degrades brevican // Acta Neuropathologica. – 2005. – V. 110, № 3. – P. 239-246.

133. Naor D., Sionov R. V., Ish-Shalom D. CD44: Structure, Function and Association with the Malignant Process // Advances in Cancer ResearchElsevier, 1997. – P. 241-319.

134. Naso M. F., Zimmermann D. R., Iozzo R. V. Characterization of the complete genomic structure of the human versican gene and functional analysis of its promoter // J Biol Chem. – 1994. – V. 269, № 52. – P. 32999-3008.

135. Nastase M. V., Young M. F., Schaefer L. Biglycan: a multivalent proteoglycan providing structure and signals // The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society. – 2012. – V. 60, № 12. – P. 963-975.

136. National Research Council Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory A. The National Academies Collection: Reports funded by National Institutes of Health // Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. – Washington (DC): National Academies Press (US) Copyright © 2011, National Academy of Sciences., 2011.

137. Neill T., Schaefer L., Iozzo R. V. Decorin: a guardian from the matrix // Am J Pathol. – 2012. – V. 181, № 2. – P. 380-7.

138. Neill T., Schaefer L., Iozzo R. V. Decorin as a multivalent therapeutic agent against cancer // Advanced drug delivery reviews. – 2016. – V. 97. – P. 174-185.

139. Network T. C. Corrigendum: Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways // Nature. – 2013. – V. 494, № 7438. – P. 506.

140. Nicole S., Davoine C.-S., Topaloglu H., Cattolico L., Barral D., Beighton P., Hamida C. B., Hammouda H., Cruaud C., White P. S., Samson D., Urtizberea J. A., Lehmann-Horn F., Weissenbach J., Hentati F., Fontaine B. Perlecan, the major proteoglycan of basement membranes, is altered in patients with Schwartz-Jampel syndrome (chondrodystrophic myotonia) // Nature Genetics. – 2000. – V. 26, № 4. – P. 480-483.

141. Nieman K. M., Kenny H. A., Penicka C. V., Ladanyi A., Buell-Gutbrod R., Zillhardt M. R., Romero I. L., Carey M. S., Mills G. B., Hotamisligil G. S., Yamada S. D., Peter M. E., Gwin K., Lengyel E. Adipocytes promote ovarian cancer metastasis and provide energy for rapid tumor growth // Nature Medicine. – 2011. – V. 17, № 11. – P. 1498-1503.

142. Nikitovic D., Katonis P., Tsatsakis A., Karamanos N. K., Tzanakakis G. N. Lumican, a small leucine-rich proteoglycan // IUBMB Life. – 2008. – V. 60, № 12. – P. 818-823.

143. Nishiyama A., Dahlin K. J., Prince J. T., Johnstone S. R., Stallcup W. B. The primary structure of NG2, a novel membrane-spanning proteoglycan // The Journal of cell biology. – 1991. – V. 114, № 2. – P. 359-371.

144. Njah K., Chakraborty S., Qiu B., Arumugam S., Raju A., Pobbati A. V., Lakshmanan M., Tergaonkar V., Thibault G., Wang X., Hong W. A Role of Agrin in Maintaining the Stability of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2 during Tumor Angiogenesis // Cell Reports. – 2019. – V. 28, № 4. – P. 949-965.e7.

145. Oda G., Sato T., Ishikawa T., Kawachi H., Nakagawa T., Kuwayama T., Ishiguro M., Iida S., Uetake H., Sugihara K. Significance of stromal decorin expression during the progression of breast cancer // Oncology Reports. – 2012. – V. 28, № 6. – P. 2003-2008.

146. Onken J., Moeckel S., Leukel P., Leidgens V., Baumann F., Bogdahn U., Vollmann-Zwerenz A., Hau P. Versican isoform V1 regulates proliferation and migration in high-grade gliomas // Journal of Neuro-Oncology. – 2014. – V. 120, № 1. – P. 73-83.

147. Oohira A., Katoh-Semba R., Watanabe E., Matsui F. Brain development and multiple molecular species of proteoglycan // Neuroscience Research. – 1994. – V. 20, № 3. – P. 195-207.

148. Opitz-Araya X., Barria A. Organotypic hippocampal slice cultures // J Vis Exp. – 2011. – № 48.

149. Ota S., Hishinuma M., Yamauchi N., Goto A., Morikawa T., Fujimura T., Kitamura T., Kodama T., Aburatani H., Fukayama M. Oncofetal protein glypican-3 in testicular germ-cell tumor // Virchows Archiv. – 2006. – V. 449, № 3. – P. 308-314.

150. Öhlund D., Elyada E., Tuveson D. Fibroblast heterogeneity in the cancer wound // The Journal of experimental medicine. – 2014. – V. 211, № 8. – P. 1503-1523.

151. Parsons D. W., Jones S., Zhang X., Lin J. C., Leary R. J., Angenendt P., Mankoo P., Carter H., Siu I. M., Gallia G. L., Olivi A., McLendon R., Rasheed B. A., Keir S., Nikolskaya T., Nikolsky Y., Busam D. A., Tekleab H., Diaz L. A., Jr., Hartigan J., Smith D. R., Strausberg R. L., Marie S. K., Shinjo S. M., Yan H., Riggins G. J., Bigner D. D., Karchin R., Papadopoulos N., Parmigiani G., Vogelstein B., Velculescu V. E., Kinzler K. W. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme // Science. – 2008. – V. 321, № 5897. – P. 1807-12.

152. Pickup M. W., Mouw J. K., Weaver V. M. The extracellular matrix modulates the hallmarks of cancer // EMBO Rep. – 2014. – V. 15, № 12. – P. 1243-53.

153. Pitter K. L., Tamagno I., Alikhanyan K., Hosni-Ahmed A., Pattwell S. S., Donnola S., Dai C., Ozawa T., Chang M., Chan T. A., Beal K., Bishop A. J., Barker C. A., Jones T. S., Hentschel B., Gorlia T., Schlegel U., Stupp R., Weller M., Holland E. C., Hambardzumyan D. Corticosteroids compromise survival in glioblastoma // Brain. – 2016. – V. 139, № Pt 5. – P. 1458-71.

154. Pomin V. H. Keratan sulfate: An up-to-date review // International Journal of Biological Macromolecules. – 2015. – V. 72. – P. 282-289.

155. Portnow J., Badie B., Chen M., Liu A., Blanchard S., Synold T. W. The neuropharmacokinetics of temozolomide in patients with resectable brain tumors: potential implications for the current approach to chemoradiation // Clin Cancer Res. – 2009. – V. 15, № 22. – P. 7092-8.

156. Price M. A., Colvin Wanshura L. E., Yang J., Carlson J., Xiang B., Li G., Ferrone S., Dudek A. Z., Turley E. A., McCarthy J. B. CSPG4, a potential therapeutic target, facilitates malignant progression of melanoma // Pigment cell & melanoma research. – 2011. – V. 24, № 6. – P. 1148-1157.

157. Prudnikova T. Y., Mostovich L. A., Domanitskaya N. V., Pavlova T. V., Kashuba V. I., Zabarovsky E. R., Grigorieva E. V. Antiproliferative effect of D-glucuronyl C5-epimerase in human breast cancer cells // Cancer Cell Int. – 2010. – V. 10. – P. 27.

158. Purushothaman A., Hurst D. R., Pisano C., Mizumoto S., Sugahara K., Sanderson R. D. Heparanase-mediated loss of nuclear syndecan-1 enhances histone acetyltransferase (HAT) activity to promote expression of genes that drive an aggressive tumor phenotype // J Biol Chem. – 2011. – V. 286, № 35. – P. 30377-83.

159. Purushothaman A., Toole B. P. Serglycin proteoglycan is required for multiple myeloma cell adhesion, in vivo growth, and vascularization // J Biol Chem. – 2014. – V. 289, № 9. – P. 5499-509.

160. Radotra B., McCormick D., Crockard A. CD44 plays a role in adhesive interactions between glioma cells and extracellular matrix components // Neuropathology and Applied Neurobiology. – 1994. – V. 20, № 4. – P. 399-405.

161. Rauch U., Feng K., Zhou X. H. Neurocan: a brain chondroitin sulfate proteoglycan // Cellular and Molecular Life Sciences. – 2001. – V. 58, № 12. – P. 1842-1856.

162. Reategui E. P., Mayolo A. A. d., Das P. M., Astor F. C., Singal R., Hamilton K. L., Goodwin W. J., Carraway K. L., Franzmann E. J. Characterization of CD44v3 containing isoforms in head and neck cancer // Cancer Biology & Therapy. – 2006. – V. 5, № 9. – P. 1163-1168.

163. Reed C. C., Iozzo R. V. The role of decorin in collagen fibrillogenesis and skin homeostasis // Glycoconjugate Journal. – 2002. – V. 19, № 4/5. – P. 249-255.

164. Reese S. P., Underwood C. J., Weiss J. A. Effects of decorin proteoglycan on fibrillogenesis, ultrastructure, and mechanics of type I collagen gels // Matrix Biol. – 2013. – V. 32, № 7-8. – P. 414-23.

165. Reuter M. S., Musante L., Hu H., Diederich S., Sticht H., Ekici A. B., Uebe S., Wienker T. F., Bartsch O., Zechner U., Oppitz C., Keleman K., Jamra R. A., Najmabadi H., Schweiger S., Reis A., Kahrizi K. NDST1 missense mutations in autosomal recessive intellectual disability // Am J Med Genet A. – 2014. – V. 164a, № 11. – P. 2753-63.

166. Ricciardelli C., Mayne K., Sykes P. J., Raymond W. A., McCaul K., Marshall V. R., Horsfall D. J. Elevated levels of versican but not decorin predict disease progression in early-stage prostate cancer // Clin Cancer Res. – 1998. – V. 4, № 4. – P. 963-71.

167. Ricciardelli C., Mayne K., Sykes P. J., Raymond W. A., McCaul K., Marshall V. R., Tilley W. D., Skinner J. M., Horsfall D. J. Elevated stromal chondroitin sulfate glycosaminoglycan predicts progression in early-stage prostate cancer // Clin Cancer Res. – 1997. – V. 3, № 6. – P. 983-92.

168. Rivera C., Zandonadi F. S., Sánchez-Romero C., Soares C. D., Granato D. C., González-Arriagada W. A., Paes Leme A. F. Agrin has a pathological role in the progression of oral cancer // British journal of cancer. – 2018. – V. 118, № 12. – P. 1628-1638.

169. Roberts J., Kahle M. P., Bix G. J. Perlecan and the blood-brain barrier: beneficial proteolysis? // Front Pharmacol. – 2012. – V. 3. – P. 155.

170. Rozario T., DeSimone D. W. The extracellular matrix in development and morphogenesis: a dynamic view // Developmental biology. – 2010. – V. 341, № 1. – P. 126-140.

171. Saito T., Sugiyama K., Hama S., Yamasaki F., Takayasu T., Nosaka R., Onishi S., Muragaki Y., Kawamata T., Kurisu K. High Expression of Glypican-1 Predicts

Dissemination and Poor Prognosis in Glioblastomas // World Neurosurgery. – 2017. – V. 105. – P. 282-288.

172. Santra M., Katakowski M., Zhang R. L., Zhang Z. G., Meng H., Jiang F., Chopp M. Protection of adult mouse progenitor cells and human glioma cells by de novo decorin expression in an oxygen- and glucose-deprived cell culture model system // J Cereb Blood Flow Metab. – 2006. – V. 26, № 10. – P. 1311-22.

173. Savorè C., Zhang C., Muir C., Liu R., Wyrwa J., Shu J., Zhau H. E., Chung L. W. K., Carson D. D., Farach-Carson M. C. Perlecan Knockdown in Metastatic Prostate Cancer Cells Reduces Heparin-binding Growth Factor Responses in vitro and Tumor Growth in vivo // Clinical & Experimental Metastasis. – 2005. – V. 22, № 5. – P. 377-390.

174. Schaefer L., Iozzo R. V. Biological functions of the small leucine-rich proteoglycans: from genetics to signal transduction // The Journal of biological chemistry. – 2008. – V. 283, № 31. – P. 21305-21309.

175. Schaefer L., Tredup C., Gubbiotti M. A., Iozzo R. V. Proteoglycan neofunctions: regulation of inflammation and autophagy in cancer biology // The FEBS journal. – 2017. – V. 284, № 1. – P. 10-26.

176. Schiffer D., Mellai M., Boldorini R., Bisogno I., Grifoni S., Corona C., Bertero L., Cassoni P., Casalone C., Annovazzi L. The Significance of Chondroitin Sulfate Proteoglycan 4 (CSPG4) in Human Gliomas // International Journal of Molecular Sciences. – 2018. – V. 19, № 9. – P. 20.

177. Schmalfeldt M., Dours-Zimmermann M. a. T., Winterhalter K. H., Zimmermann D. R. Versican V2Is a Major Extracellular Matrix Component of the Mature Bovine Brain // Journal of Biological Chemistry. – 1998. – V. 273, № 25. – P. 15758-15764.

178. Schneider C. A., Rasband W. S., Eliceiri K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis // Nat Methods. – 2012. – Jul. – V. 9, № 7. – P. 671-5.

179. Schreml J., Durmaz B., Cogulu O., Keupp K., Beleggia F., Pohl E., Milz E., Coker M., Ucar S. K., Nürnberg G., Nürnberg P., Kuhn J., Ozkinay F. The missing “link”: an autosomal recessive short stature syndrome caused by a hypofunctional XYLT1 mutation // Human Genetics. – 2013. – V. 133, № 1. – P. 29-39.

180. Schwartz N. B., Domowicz M. S. Proteoglycans in brain development and pathogenesis // FEBS Letters. – 2018. – V. 592, № 23. – P. 3791-3805.

181. Scott J. E. Proteoglycan-fibrillar collagen interactions // The Biochemical journal. – 1988. – V. 252, № 2. – P. 313-323.

182. Seidenbecher C. I., Richter K., Rauch U., Fässler R., Garner C. C., Gundelfinger E. D. Brevican, a Chondroitin Sulfate Proteoglycan of Rat Brain, Occurs as Secreted and Cell

Surface Glycosylphosphatidylinositol-anchored Isoforms // Journal of Biological Chemistry. – 1995. – V. 270, № 45. – P. 27206-27212.

183. Shankar A., Kumar S., Iskander A. S., Varma N. R., Janic B., deCarvalho A., Mikkelsen T., Frank J. A., Ali M. M., Knight R. A., Brown S., Arbab A. S. Subcurative radiation significantly increases cell proliferation, invasion, and migration of primary glioblastoma multiforme in vivo // Chin J Cancer. – 2014. – V. 33, № 3. – P. 148-58.

184. Shao C., Shi X., Phillips J. J., Zaia J. Mass spectral profiling of glycosaminoglycans from histological tissue surfaces // Anal Chem. – 2013. – V. 85, № 22. – P. 10984-91.

185. Shchelkunov S. N., Razumov I. A., Kolosova I. V., Romashchenko A. V., Zavjalov E. L. Virotherapy of the Malignant U87 Human Glioblastoma in the Orthotopic Xenotransplantation Mouse SCID Model // Dokl Biochem Biophys. – 2018. – V. 478, № 1. – P. 30-33.

186. Shields L. B., Shelton B. J., Shearer A. J., Chen L., Sun D. A., Parsons S., Bourne T. D., LaRocca R., Spalding A. C. Dexamethasone administration during definitive radiation and temozolomide renders a poor prognosis in a retrospective analysis of newly diagnosed glioblastoma patients // Radiat Oncol. – 2015. – V. 10. – P. 222.

187. Sirko S., Akita K., Von Holst A., Faissner A. Structural and Functional Analysis of Chondroitin Sulfate Proteoglycans in the Neural Stem Cell Niche // Methods in EnzymologyElsevier, 2010. – P. 37-71.

188. Sirko S., von Holst A., Wizenmann A., Gotz M., Faissner A. Chondroitin sulfate glycosaminoglycans control proliferation, radial glia cell differentiation and neurogenesis in neural stem/progenitor cells // Development. – 2007. – V. 134, № 15. – P. 2727-2738.

189. Snigireva A. V., Vrublevskaya V. V., Skarga Y. Y., Morenkov O. S. Cell surface heparan sulfate proteoglycans are involved in the extracellular Hsp90-stimulated migration and invasion of cancer cells // Cell Stress & Chaperones. – 2019. – V. 24, № 2. – P. 309-322.

190. Stallcup W. B., Huang F. J. A role for the NG2 proteoglycan in glioma progression // Cell Adh Migr. – 2008. – V. 2, № 3. – P. 192-201.

191. Steck P. A., Moser R. P., Bruner J. M., Liang L., Freidman A. N., Hwang T. L., Yung W. K. Altered expression and distribution of heparan sulfate proteoglycans in human gliomas // Cancer Res. – 1989. – V. 49, № 8. – P. 2096-103.

192. Stupp R., Mason W. P., van den Bent M. J., Weller M., Fisher B., Taphoorn M. J., Belanger K., Brandes A. A., Marosi C., Bogdahn U., Curschmann J., Janzer R. C., Ludwin S. K., Gorlia T., Allgeier A., Lacombe D., Cairncross J. G., Eisenhauer E., Mirimanoff R. O., Groups E. O. f. R. a. T. o. C. B. T. a. R., Group N. C. I. o. C. C. T. Radiotherapy plus

concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma // N Engl J Med. – 2005. – V. 352, № 10. – P. 987-96.

193. Su Z. D., Kishida S., Tsubota S., Sakamoto K., Cao D., Kiyonari S., Ohira M., Kamijo T., Narita A., Xu Y. Y., Takahashi Y., Kadomatsu K. Neurocan, an extracellular chondroitin sulfate proteoglycan, stimulates neuroblastoma cells to promote malignant phenotypes // Oncotarget. – 2017. – V. 8, № 63. – P. 106296-106310.

194. Sugahara K. Recent advances in the structural biology of chondroitin sulfate and dermatan sulfate // Current Opinion in Structural Biology. – 2003. – V. 13, № 5. – P. 612-620.

195. Sugahara K., Mikami T. Chondroitin/dermatan sulfate in the central nervous system // Current Opinion in Structural Biology. – 2007. – V. 17, № 5. – P. 536-545.

196. Suhovskih A. V., Aidagulova S. V., Kashuba V. I., Grigorieva E. V. Proteoglycans as potential microenvironmental biomarkers for colon cancer // Cell Tissue Res. – 2015. – V. 361, № 3. – P. 833-44.

197. Suhovskih A. V., Kazanskaya G. M., Volkov A. M., Tsidulko A. Y., Aidagulova S. V., Grigorieva E. V. Chemoradiotherapy Increases Intratumor Heterogeneity of HPSE Expression in the Relapsed Glioblastoma Tumors // International Journal of Molecular Sciences. – 2020. – V. 21, № 4. – P. 9.

198. Suhovskih A. V., Mostovich L. A., Kunin I. S., Boboev M. M., Nepomnyashchikh G. I., Aidagulova S. V., Grigorieva E. V. Proteoglycan expression in normal human prostate tissue and prostate cancer // ISRN Oncol. – 2013. – V. 2013. – P. 680136.

199. Suhovskih A. V., Tsidulko A. Y., Kutsenko O. S., Kovner A. V., Aidagulova S. V., Ernberg I., Grigorieva E. V. Transcriptional Activity of Heparan Sulfate Biosynthetic Machinery is Specifically Impaired in Benign Prostate Hyperplasia and Prostate Cancer // Front Oncol. – 2014. – V. 4. – P. 79.

200. Sun D., McAlmon K. R., Davies J. A., Bernfield M., Hay E. D. Simultaneous loss of expression of syndecan-1 and E-cadherin in the embryonic palate during epithelial-mesenchymal transformation // Int J Dev Biol. – 1998. – V. 42, № 5. – P. 733-6.

201. Svendsen A., Verhoeff J. J., Immervoll H., Brøgger J. C., Kmiecik J., Poli A., Netland I. A., Prestegarden L., Planagumà J., Torsvik A., Kjersem A. B., Sakariassen P., Heggdal J. I., Van Furth W. R., Bjerkvig R., Lund-Johansen M., Enger P., Felsberg J., Brons N. H., Tronstad K. J., Waha A., Chekenya M. Expression of the progenitor marker NG2/CSPG4 predicts poor survival and resistance to ionising radiation in glioblastoma // Acta Neuropathol. – 2011. – V. 122, № 4. – P. 495-510.

202. Svensson K. J., Christianson H. C., Kucharzewska P., Fagerström V., Lundstedt L., Borgquist S., Jirström K., Belting M. Chondroitin sulfate expression predicts poor outcome in breast cancer // Int J Oncol. – 2011. – V. 39, № 6. – P. 1421-8.

203. Tamura R., Tanaka T., Morimoto Y., Kuranari Y., Yamamoto Y., Takei J., Murayama Y., Yoshida K., Sasaki H. Alterations of the tumor microenvironment in glioblastoma following radiation and temozolomide with or without bevacizumab // Ann Transl Med. – 2020. – V. 8, № 6. – P. 297.

204. Teng Y. H.-F., Aquino R. S., Park P. W. Molecular functions of syndecan-1 in disease // Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology. – 2012. – V. 31, № 1. – P. 3-16.

205. Thakkar J. P., Dolecek T. A., Horbinski C., Ostrom Q. T., Lightner D. D., Barnholtz-Sloan J. S., Villano J. L. Epidemiologic and molecular prognostic review of glioblastoma // Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. – 2014. – V. 23, № 10. – P. 1985-96.

206. Thelin M. A., Bartolini B., Axelsson J., Gustafsson R., Tykesson E., Pera E., Oldberg Å., Maccarana M., Malmstrom A. Biological functions of iduronic acid in chondroitin/dermatan sulfate // The FEBS journal. – 2013. – V. 280, № 10. – P. 2431-2446.

207. Theocharis A. D., Karamanos N. K. Proteoglycans remodeling in cancer: Underlying molecular mechanisms // Matrix Biol. – 2019. – V. 75-76. – P. 220-259.

208. Theocharis A. D., Skandalis S. S., Tzanakakis G. N., Karamanos N. K. Proteoglycans in health and disease: novel roles for proteoglycans in malignancy and their pharmacological targeting // FEBS Journal. – 2010. – V. 277, № 19. – P. 3904-3923.

209. Theocharis A. D., Tsolakis I., Tzanakakis G. N., Karamanos N. K. Chondroitin Sulfate as a Key Molecule in the Development of Atherosclerosis and Cancer Progression // Chondroitin Sulfate: Structure, Role and Pharmacological ActivityElsevier, 2006. – P. 281-295.

210. Theoharides T. C., Rozniecki J. J., Sahagian G., Jocobson S., Kempuraj D., Conti P., Kalogeromitros D. Impact of stress and mast cells on brain metastases // Journal of Neuroimmunology. – 2008. – V. 205, № 1-2. – P. 1-7.

211. Tiwari V., Maus E., Sigar I. M., Ramsey K. H., Shukla D. Role of heparan sulfate in sexually transmitted infections // Glycobiology. – 2012. – V. 22, № 11. – P. 1402-1412.

212. Traister A., Shi W., Filmus J. Mammalian Notum induces the release of glypicans and other GPI-anchored proteins from the cell surface // Biochemical Journal. – 2008. – V. 410, № 3. – P. 503-511.

213. Tran V. M., Wade A., McKinney A., Chen K., Lindberg O. R., Engler J. R., Persson A. I., Phillips J. J. Heparan Sulfate Glycosaminoglycans in Glioblastoma Promote Tumor Invasion // Molecular Cancer Research. – 2017. – V. 15, № 11. – P. 1623-1633.

214. Trotter J., Karram K., Nishiyama A. NG2 cells: Properties, progeny and origin // Brain research reviews. – 2010. – V. 63, № 1-2. – P. 72-82.

215. Trowbridge J. M., Gallo R. L. Dermatan sulfate: new functions from an old glycosaminoglycan // Glycobiology. – 2002. – V. 12, № 9. – P. 117R-125R.

216. Tsidulko A., Suhovskih A., Kolpakova M., Politko M., Kazanskaya G., Volkov A., Pashkovskaya O., Kuper K., Shevelev O., Zavjalov E., Aidagulova S., Grigorieva E. Radiochemotherapy-induced changes in brain extracellular matrix are associated with tumour development in mouse recurrent glioblastoma model // Annals of Oncology. – 2020. – V. 31. – P. S246-S247.

217. Tsidulko A. Y., Bezier C., de la Bourdonnaye G., Suhovskih A. V., Pankova T. M., Kazanskaya G. M., Aidagulova S. V., Grigorieva E. V. Conventional Anti-glioblastoma Chemotherapy Affects Proteoglycan Composition of Brain Extracellular Matrix in Rat Experimental Model in vivo // Frontiers in Pharmacology. – 2018. – V. 9. – P. 13.

218. Tsidulko A. Y., Kazanskaya G. M., Kostromskaya D. V., Aidagulova S. V., Kiselev R. S., Volkov A. M., Kobozev V. V., Gaitan A. S., Krivoshapkin A. L., Grigorieva E. V. Prognostic relevance of NG2/CSPG4, CD44 and Ki-67 in patients with glioblastoma // Tumour Biol. – 2017. – V. 39, № 9. – P. 1010428317724282.

219. Tsidulko A. Y., Kazanskaya G. M., Volkov A. M., Suhovskih A. V., Kiselev R. S., Kobozev V. V., Gaytan A. S., Krivoshapkin A. L., Aidagulova S. V., Grigorieva E. V. Chondroitin sulfate content and decorin expression in glioblastoma are associated with proliferative activity of glioma cells and disease prognosis // Cell and Tissue Research. – 2020. – V. 379, № 1. – P. 147-155.

220. Uyama T., Kitagawa H., Sugahara K. Biosynthesis of Glycosaminoglycans and Proteoglycans // Comprehensive GlycoscienceElsevier, 2007. – P. 79-104.

221. Vallen M. J., Massuger L. F., ten Dam G. B., Bulten J., van Kuppevelt T. H. Highly sulfated chondroitin sulfates, a novel class of prognostic biomarkers in ovarian cancer tissue // Gynecol Oncol. – 2012. – V. 127, № 1. – P. 202-9.

222. Viapiano M. S., Hockfield S., Matthews R. T. BEHAB/brevican requires ADAMTS-mediated proteolytic cleavage to promote glioma invasion // Journal of neuro-oncology. – 2008. – V. 88, № 3. – P. 261-272.

223. Viapiano M. S., Matthews R. T., Hockfield S. A Novel Membrane-associated Glycovariant of BEHAB/Brevican Is Up-regulated during Rat Brain Development and in a

Rat Model of Invasive Glioma // Journal of Biological Chemistry. – 2003. – V. 278, № 35. – P. 33239-33247.

224. Vlodavsky I., Friedmann Y. Molecular properties and involvement of heparanase in cancer metastasis and angiogenesis // The Journal of clinical investigation. – 2001. – V. 108, № 3. – P. 341-347.

225. Wade A., Robinson A. E., Engler J. R., Petritsch C., James C. D., Phillips J. J. Proteoglycans and their roles in brain cancer // The FEBS journal. – 2013. – V. 280, № 10. – P. 2399-2417.

226. Walker C., Mojares E., Del Río Hernández A. Role of Extracellular Matrix in Development and Cancer Progression // Int J Mol Sci. – 2018. – V. 19, № 10.

227. Wang D., Fawcett J. The perineuronal net and the control of CNS plasticity // Cell and Tissue Research. – 2012. – V. 349, № 1. – P. 147-160.

228. Wang H., Katagiri Y., McCann T. E., Unsworth E., Goldsmith P., Yu Z.-X., Tan F., Santiago L., Mills E. M., Wang Y., Symes A. J., Geller H. M. Chondroitin-4-sulfation negatively regulates axonal guidance and growth // Journal of cell science. – 2008. – V. 121, № Pt 18. – P. 3083-3091.

229. Wei K. C., Huang C. Y., Chen P. Y., Feng L. Y., Wu T. W., Chen S. M., Tsai H. C., Lu Y. J., Tsang N. M., Tseng C. K., Pai P. C., Shin J. W. Evaluation of the prognostic value of CD44 in glioblastoma multiforme // Anticancer Res. – 2010. – V. 30, № 1. – P. 253-9.

230. Weyers A., Yang B., Solakyildirim K., Yee V., Li L., Zhang F., Linhardt R. J. Isolation of bovine corneal keratan sulfate and its growth factor and morphogen binding // The FEBS journal. – 2013. – V. 280, № 10. – P. 2285-2293.

231. Wight T. N., Kinsella M. G., Evanko S. P., Potter-Perigo S., Merrilees M. J. Versican and the regulation of cell phenotype in disease // Biochimica et biophysica acta. – 2014. – V. 1840, № 8. – P. 2441-2451.

232. Wilson D. G., Phamluong K., Lin W. Y., Barck K., Carano R. A. D., Diehl L., Peterson A. S., Martin F., Solloway M. J. Chondroitin sulfate synthase 1 (Chsy1) is required for bone development and digit patterning // Developmental Biology. – 2012. – V. 363, № 2. – P. 413-425.

233. Wilson T. A., Karajannis M. A., Harter D. H. Glioblastoma multiforme: State of the art and future therapeutics // Surg Neurol Int. – 2014. – V. 5. – P. 64.

234. Wu T., Dai Y. Tumor microenvironment and therapeutic response // Cancer Lett. – 2017. – V. 387. – P. 61-68.

235. Wu Y. J., Pierre D. P. L. A., Wu J., Yee A. J., Yang B. B. The interaction of versican with its binding partners // Cell Research. – 2005. – V. 15, № 7. – P. 483-494.

236. Xavier-Magalhães A., Nandhabalan M., Jones C., Costa B. M. Molecular prognostic factors in glioblastoma: state of the art and future challenges // CNS Oncol. – 2013. – V. 2, № 6. – P. 495-510.

237. Xiang Y.-Y., Ladeda V., Filmus J. Glypican-3 expression is silenced in human breast cancer // Oncogene. – 2001. – V. 20, № 50. – P. 7408-7412.

238. Xiong A., Kundu S., Forsberg-Nilsson K. Heparan sulfate in the regulation of neural differentiation and glioma development // FEBS Journal. – 2014. – V. 281, № 22. – P. 4993-5008.

239. Xiong A., Spyrou A., Forsberg-Nilsson K. Involvement of Heparan Sulfate and Heparanase in Neural Development and Pathogenesis of Brain Tumors // Adv Exp Med Biol. – 2020. – V. 1221. – P. 365-403.

240. Xu D., Esko J. D. Demystifying Heparan Sulfate–Protein Interactions // Annual Review of Biochemistry. – 2014. – V. 83, № 1. – P. 129-157.

241. Xu T., Bianco P., Fisher L. W., Longenecker G., Smith E., Goldstein S., Bonadio J., Boskey A., Heegaard A.-M., Sommer B., Satomura K., Dominguez P., Zhao C., Kulkarni A. B., Robey P. G., Young M. F. Targeted disruption of the biglycan gene leads to an osteoporosis-like phenotype in mice // Nature Genetics. – 1998. – V. 20, № 1. – P. 78-82.

242. Yae T., Tsuchihashi K., Ishimoto T., Motohara T., Yoshikawa M., Yoshida G. J., Wada T., Masuko T., Mogushi K., Tanaka H., Osawa T., Kanki Y., Minami T., Aburatani H., Ohmura M., Kubo A., Suematsu M., Takahashi K., Saya H., Nagano O. Alternative splicing of CD44 mRNA by ESRP1 enhances lung colonization of metastatic cancer cell // Nature Communications. – 2012. – V. 3, № 1.

243. Yamaguchi Y., Inatani M., Matsumoto Y., Ogawa J., Irie F. Roles of heparan sulfate in mammalian brain development current views based on the findings from Ext1 conditional knockout studies // Prog Mol Biol Transl Sci. – 2010. – V. 93. – P. 133-52.

244. Yan Y., Zuo X., Wei D. Concise Review: Emerging Role of CD44 in Cancer Stem Cells: A Promising Biomarker and Therapeutic Target // Stem cells translational medicine. – 2015. – V. 4, № 9. – P. 1033-1043.

245. Yoo K. C., Suh Y., An Y., Lee H. J., Jeong Y. J., Uddin N., Cui Y. H., Roh T. H., Shim J. K., Chang J. H., Park J. B., Kim M. J., Kim I. G., Kang S. G., Lee S. J. Proinvasive extracellular matrix remodeling in tumor microenvironment in response to radiation // Oncogene. – 2018. – V. 37, № 24. – P. 3317-3328.

246. Zheng P. S., Wen J., Ang L. C., Sheng W., Viloria-Petit A., Wang Y., Wu Y., Kerbel R. S., Yang B. B. Versican/PG-M G3 domain promotes tumor growth and angiogenesis // The FASEB Journal. – 2004. – V. 18, № 6. – P. 754-756.

247. Zimmermann D. R., Dours-Zimmermann M. T. Extracellular matrix of the central nervous system: from neglect to challenge // Histochemistry and Cell Biology. – 2008. – V. 130, № 4. – P. 635-653.

248. Zoeller J. J., Whitelock J. M., Iozzo R. V. Perlecan regulates developmental angiogenesis by modulating the VEGF-VEGFR2 axis // Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology. – 2009. – V. 28, № 5. – P. 284-291.

249. Zong F., Fthenou E., Wolmer N., Hollósi P., Kovalszky I., Szilák L., Mogler C., Nilsonne G., Tzanakakis G., Dobra K. Syndecan-1 and FGF-2, but not FGF receptor-1, share a common transport route and co-localize with heparanase in the nuclei of mesenchymal tumor cells // PLoS One. – 2009. – V. 4, № 10. – P. e7346.