На правах рукописи

Цидулко Александра Юрьевна

ПРОТЕОГЛИКАНЫ КАК ПРОГНОСТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ГЛИОБЛАСТОМЫ И ИХ РОЛЬ В РАЗВИТИИ РЕЦИДИВА ЗАБОЛЕВАНИЯ

03.00.04 – биохимия

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Новосибирск – 2021

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины»

Научный руководитель
доктор биологических наук **Григорьева Эльвира Витальевна**

Официальные оппоненты:
Калинина Татьяна Сергеевна, доктор биологических наук, доцент, старший научный сотрудник лаборатории функциональной нейрогеномики федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук»
Коваль Ольга Александровна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории биотехнологии федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук

Ведущая организация:
Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «___» _____2021 г. в _____часов на заседании диссертационного совета Д 001.048.04 на базе федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» по адресу: 630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» и на сайте http://ficftm.ru

Автореферат разослан «__» _____ 2021 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук Русских Галина Сергеевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

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).

Степень разработанности темы исследования

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.

Цели и задачи исследования

Целью данного исследования 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

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.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Клинические образцы. Образцы тканей (n=40) были получены от пациентов с опухолями головного мозга во время хирургического удаления опухоли в НМИЦ им. Акад. Е.Н. Мешалкина (НИИПК, г. Новосибирск). Диагноз глиобластома (Grade IV) был установлен патоморфологами НИИПК согласно классификации опухолей головного мозга ВОЗ.

Выделение РНК. Выделение общей РНК из ткани головного мозга проводили с помощью реагента TRIzol (ThermoFisher Scientific, США) с последующей доочисткой набором RNeasy Plus mini kit (Qiagen, Германия); из клеток с использованием набора RNeasy Plus

mini kit (Qiagen, Германия). Для измерения концентрации РНК использовали флуориметр Qubit 3.0 и набор реактивов Qubit RNA BR Assay Kit (ThermoFisher Scientific, США).

ОТ-ПЦР анализ. кДНК синтезировали с использованием набора реагентов RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (ThermoFisher Scientific, США). Уровень экспрессии генов определяли методом полуколичественной ПЦР в реальном времени с использованием амплификатора CFX-96 (BioRad, США).

Содержание и локализацию коровых белков ПГ и углеводных молекул ГАГ определяли методами иммуногистохимического и иммунофлуоресцентного анализа с соответствующими первичными антителами: anti-Ki-67 (RTU, Thermo Scientific, США); anti-NG2, anti-Syndecan-1, anti-Decorin (все - Abcam, Великобритания), anti-Heparan Sulfate (Millipore, США), anti-Chondroitin Sulfate (Sigma, США) с использованием Lab Vision™ Autostainer 720-2D и набора UltraVisionQuanto HRP DAB Protocol (Thermo Scientific, США) или вторичных антител, конъюгированных с флуоресцентными метками: AlexaFluor 488 и AlexaFluor 647 (Abcam, Великобритания), соответственно. Препараты анализировали на световом микроскопе Axiostar Plus с камерой AxioCam (Carl Zeiss, Германия) или лазерном конфокальном сканирующем микроскопе Fluoview FV1000 (Olympus, США).

Количественное содержание ГАГ определяли методом дот-блот на PVDF мембране Immobilon-P (Millipore, США) с использованием антител anti-Heparan Sulfate (Millipore, США) и anti-Chondroitin Sulfate (Sigma, США). Хемилюминесцентный сигнал фиксировали при помощи ChemiDoc (BioRad, США) и содержание ГАГ оценивали денситометрически при помощи программного обеспечения ImageJ.

Культивирование клеток *in vitro*. Культура клеток глиобластомы человека U87, а также культура клеток U87, стабильно экспрессирующих красный флуоресцентный белок RFP, были получены в Каролинском институте (Стокгольм, Швеция). Обработку клеток проводили темозоломидом (MSD, Финляндия) и/или дексаметазоном (KRKA, Словения). Жизнеспособность клеток U87, их апоптоз и пролиферацию оценивали окрашиванием Hoechst 33342/PI и анализировали при помощи системы высокопроизводительного анализа клеток IN Cell Analyzer 2200 (GE Healthcare, UK).

Изучение влияния химиотерапевтических препаратов на головной мозг крыс *in vivo*. Для экспериментов *in vivo* использовали самцов крыс линии Wistar (возраст 2 месяца, n=35), которые получали ТМЗ и/или ДКС в различных дозах и режимах введения. Животных выводили из эксперимента через 24 или 48 часов, образцы ткани головного мозга помещали в раствор RNAlater или 10% нейтральный забуференный формалин (для приготовления парафиновых блоков).

Органотипическая культура срезов гиппокампа крысы *ex vivo*. Для органотипических культур *ex vivo* были использованы крысята Wistar возрастом 7-9 дней, срезы гиппокампа культивировали на культуральных вставках Millicell (Millipore, США) в среде IMDM с 30% HBSS, 10% FBS, 2 мМ L-глютамина, 100 ед. пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (Gibco, США). Обработку срезов ТМЗ и/или ДКС проводили на 7 день в течение 24ч. Для разрушения эндогенных ГАГ использовали ферменты хондроитиназу АС (ЕС 4.2.2.5) и хондроитиназу В (ЕС 4.2.2.19), для увеличения количества ГАГ в культуральную среду добавляли ХСА/С или ХСВ и поддерживали содержание экзогенных ГАГ в среде при совместном культивировании с клетками глиобластомы.

Совместное культивирование клеток глиобластомы с органотипическими срезами. Клетки глиобластомы человека U87-RFP ресуспендировали в нейробазальной среде (Gibco, США), наносили на поверхность органотипического среза и инкубировали 2 часа (для определения адгезии) или в течение 7 дней (для оценки пролиферации и инвазии опухолевых клеток в органотипический срез). После фиксации препараты закрывали покровным стеклом с использованием покровной среды SlowFade Gold (ThermoFisher Scientific, США), содержащей ядерный краситель DAPI и визуализировали при помощи лазерного конфокального сканирующего микроскопа LSM 710 (Carl Zeiss, Германия).

Изучение влияния химиотерапевтических препаратов на рост экспериментальных опухолей в модели рецидива глиобластомы *in vivo*. Для изучения влияния ТМЗ и ДКС на рост экспериментальных опухолей *in vivo* использовали бестимусных мышей линии SCID (SCID Hairless Outbred SHO-*Prkdc*^{scid}*Hr*^{hr} Mouse) (10 недель), работа проводилась на базе ЦКП «SPF-виварий» ИЦиГ СО РАН (г. Новосибирск). Животные получали воду (контроль), ТМЗ и/или ДКС в течение 40 дней 3 циклами по 5 дней, затем мышам из экспериментальных групп ортотопически вводили опухолевые клетки глиобластомы U87. Динамику роста ксенографтных опухолей определяли с помощью МРТ на высокопольном томографе BioSpec 117/16 USR (Bruker, Германия), 11.7 Т, размеры опухолей оценивали с помощью Т2-взвешенных изображений методом TurboRARE (Rapid Imaging with Refocused Echoes) и пакета программ Paravision 5.0 (Bruker, Германия).

Статистическая обработка результатов проводилась при помощи программы ORIGIN Pro 8.5. Результаты представляли 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. 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).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Экспрессия протеогликанов в глиомах различной степени злокачественности

Для изучения вовлеченности протеогликанов в канцерогенез опухолей головного мозга человека была определена экспрессия генов коровых белков 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. Было показано, что паттерн экспрессии ПГ значительно изменяется с повышением уровня злокачественности опухоли и становится гетерогенным в глиобластомах (Grade IV). Экспрессия практически всех исследованных ПГ повышена в опухолях с «плохим прогнозом» (выживаемость<12мес) по сравнению с опухолями с «хорошим прогнозом» (выживаемость>12мес): перлекан в 14 раз ($p < 0,05$), CSPG4/NG2 в 2,5 раза ($p < 0,05$), CD44 в 2,7 раза ($p < 0,05$), декорин в 6 раз ($p < 0,05$) и бигликан в 5,8 раз ($p < 0,05$) (Рис. 1).

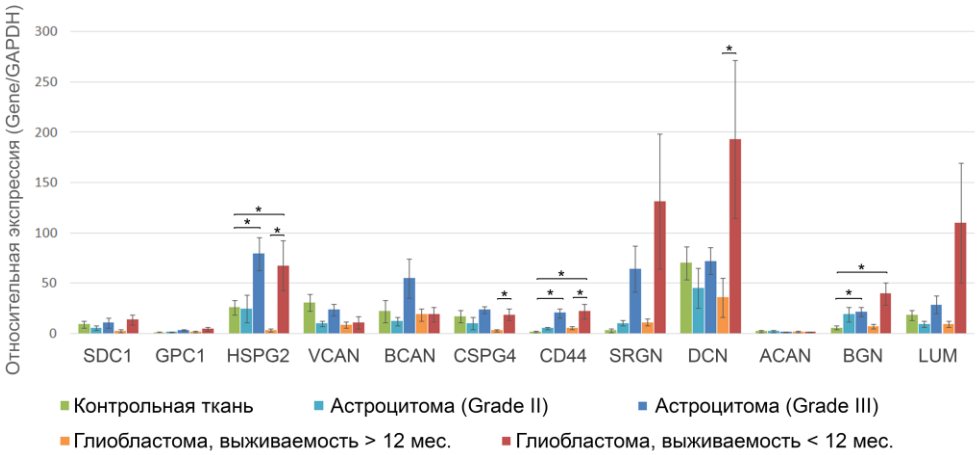

Рисунок 1. Экспрессия ПГ в астроцитарных опухолях головного мозга человека. Результаты ОТ-ПЦР в реальном времени. Приведены средние значения для группы ± SD, * - p <0,05.

Для определения клинической значимости показанных изменений данные об экспрессии ПГ были проанализированы в сочетании с клиническими данными пациентов (возраст, пол, локализация опухоли, общая выживаемость). Высокий уровень экспрессии CSPG4/NG2 (p =0,036), декорина (p =0,049) и перлекана (p =0,024), но не бигликана или CD44 был ассоциирован с низкой выживаемостью пациентов с глиобластомой (Рис. 2).

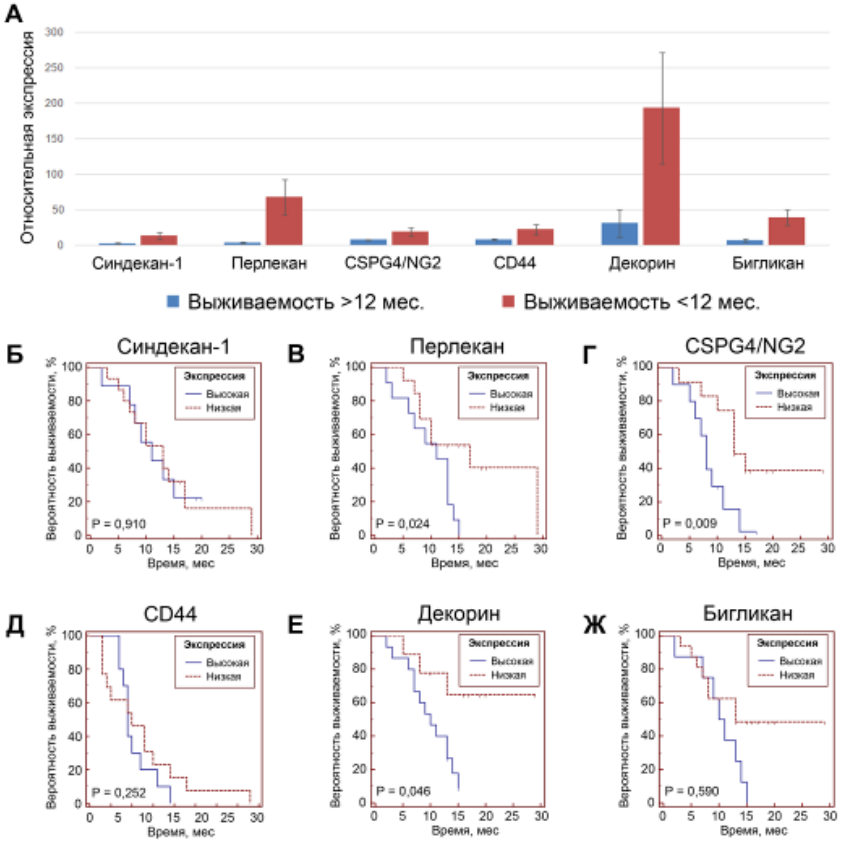

Рисунок 2. Ассоциация экспрессии ПГ с выживаемостью пациентов. А – результаты ОТ-ПЦР в реальном времени, данные представлены в виде среднего значения ±SD. Б-Ж – анализ выживаемости Каплана-Мейера для пациентов с высокой или низкой экспрессией протеогликанов в опухоли: Б – синдекана-1, В – перлекана, 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 (ИГХ) (Рис. 3).

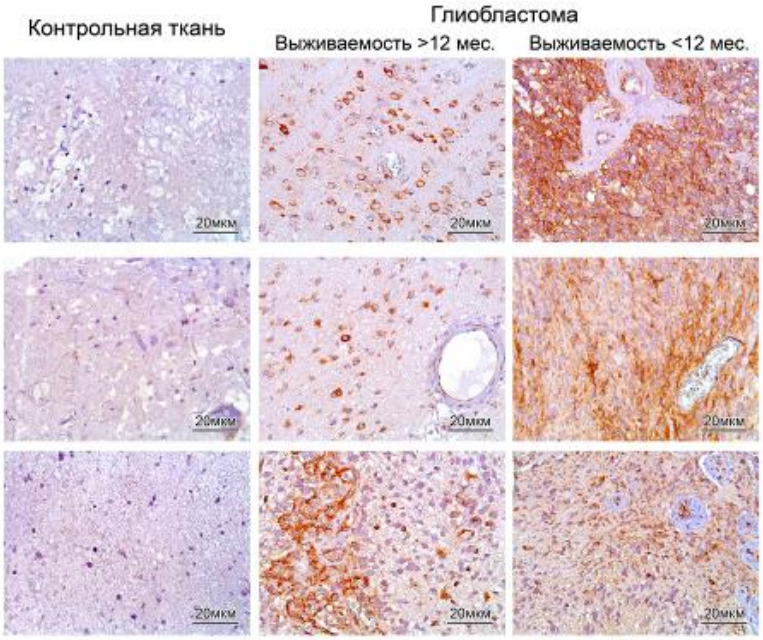

Рисунок 3. Экспрессия CSPG4/NG2 в глиобластоме. Иммуногистохимическое окрашивание с использованием антител, специфичных к CSPG4/NG2, в условно нормальной и опухолевой ткани головного мозга; увеличение 400x.

Таким образом, показано, что уровень экспрессии коровых белков CSPG4/NG2, декорина и перлекана в опухоли ассоциирован с выживаемостью пациентов с глиобластомой, что позволяет предложить данные молекулы в качестве биомаркеров для прогнозирования течения заболевания.

Содержание гликозаминогликанов в опухолях головного мозга человека

Поскольку функции ПГ определяются не только свойствами коровых белков, но и составом цепей ГАГ, было изучено содержание углеводных цепей гепарансульфата (ГС) и хондроитинсульфата (ХС) в глиобластомах методом ИГХ с использованием специфичных антител к углеводным эпитопам ГАГ. Было показано, что содержание ХС в глиобластоме повышено по сравнению с нормальной тканью головного мозга, и его распределение характеризуется высокой внутриопухолевой гетерогенностью. ИГХ 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, однако анализ выживаемости Каплана-Мейера не выявил достоверных отличий в выживаемости пациентов с высоким или низким содержанием ХС как в опухолевых клетках, так и в ВКМ опухоли.

Содержание ГС в глиобластомах было повышено в 50-55% изученных опухолей по сравнению с околоопухолевой тканью и характеризовалось высокой внутриопухолевой и межопухолевой гетерогенностью. Одновременное определение Ki-67 в тех же образцах опухолей не выявило ассоциации между содержанием ГС в опухолевых клетках и их пролиферативной активностью. Однако согласно анализу выживаемости Каплана-Мейера, содержание ГС в ткани опухоли было ассоциировано с безрецидивной выживаемостью пациентов - медиана безрецидивной выживаемости пациентов с низким содержанием ГС в опухоли была выше, чем для пациентов с высоким содержанием ГС в опухоли (13 месяцев против 9 месяцев, $p = 0.0424$) (Рис. 4).

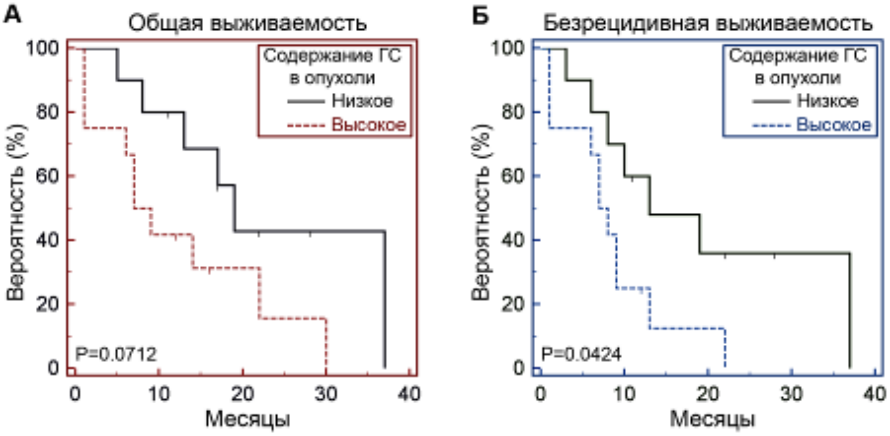

Рисунок 4. Анализ выживаемости Каплана-Мейера в группах пациентов с высоким и низким содержанием ГС в опухоли. А. Общая выживаемость. Б. Безрецидивная выживаемость.

Сравнительный анализ содержания ГС в образцах ткани первичной и рецидивирующей глиобластомы, полученных от одних и тех же пациентов (1 и 2 операция, соответственно) выявил значительное повышение содержания ГС в рецидивирующей глиобластоме по сравнению с первичной опухолью того же пациента (Рис. 5).

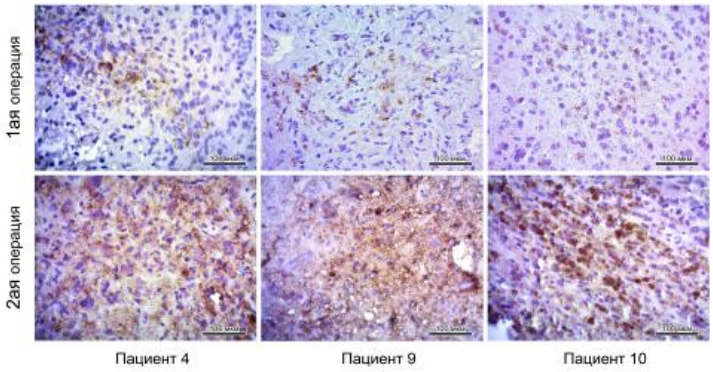

Рисунок 5. Содержание ГС в первичной и рецидивирующей глиобластоме. Иммуногистохимический анализ с использованием антител к гепарансульфату. Увеличение 400х.

Таким образом, было показано, что содержание углеводных цепей ГАГ 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 данные молекулы в качестве биомаркеров агрессивности опухоли и прогноза течения заболевания.

На основании полученных данных 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 химиотерапевтического препарата темозоломида и препарата сопровождающей терапии дексаметазона на рост экспериментальных опухолей и вовлеченность ПГ клеток глиобластомы и нормальной ткани головного мозга в эти процессы.

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

Для изучения влияния химиотерапевтических препаратов на клетки глиобластомы человека *in vitro* была использована клеточная линия U87. Клетки U87 были инкубированы с различными концентрациями ТМЗ (63-2000 мкМ) или ДКС (1-125 мкМ) или комбинации ТМЗ+ДКС (125, 250 или 500 мкМ + 1 или 25 мкМ, соответственно), и была оценена их скорость пролиферации, жизнеспособность и процент мертвых клеток с использованием автоматической системы визуализации клеток IN Cell Analyzer (Рис. 6).

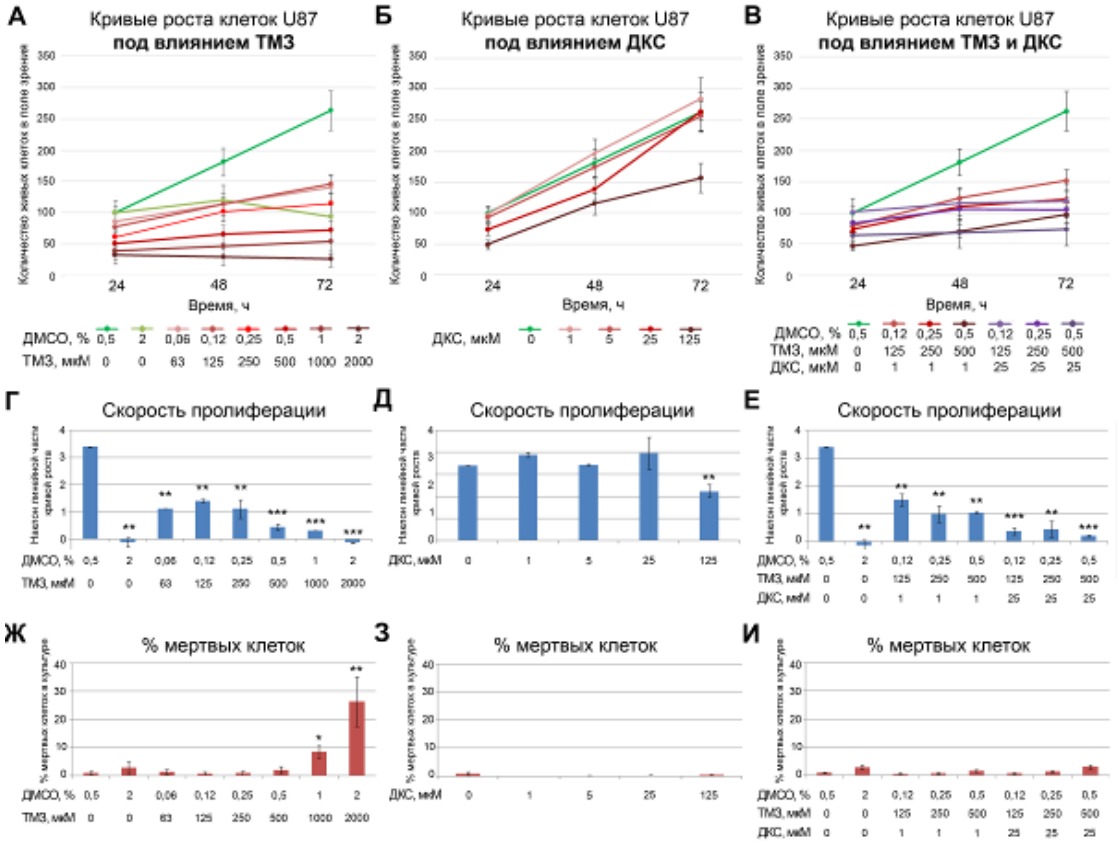

Рисунок 6. Влияние химиотерапевтических препаратов на пролиферацию и жизнеспособность клеток U87 *in vitro*. А, Г, Ж – влияние ТМЗ; Б, Д, З – влияние ДКС; В, Е, И – влияние комбинации ТМЗ+ДКС. А-В – кривые роста клеток; Г-Е – скорость пролиферации клеток, оцененная как наклон линейной части кривой роста; Ж-И - % мертвых клеток в культуре после инкубации в течение 72 часов.

Было показано, что под действием ТМЗ происходило дозозависимое снижение скорости пролиферации клеток U87 в 3-7-10,8 раз по сравнению с контрольными клетками ($p < 0{,}01$) и увеличение количества мертвых клеток в 8,1-8,9 раза ($p < 0{,}05$). Однако, несмотря на значительное подавление пролиферации и снижение жизнеспособности клеток U87, даже при использовании максимальной концентрации ТМЗ количество мертвых клеток через 72 часа после добавления препарата в среду не превышало 35% от их общего числа. ДКС не влиял на жизнеспособность клеток U87, и приводил к снижению скорости их пролиферации в 1,5 раза ($p < 0{,}05$) только в концентрации 125 мкМ. Применение комбинации ТМЗ и ДКС не оказывало значительного влияния на скорость пролиферации и жизнеспособность клеток U87 по сравнению с применением только ТМЗ.

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.

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

Наряду с изменением пролиферативной активности и жизнеспособности под действием ТМЗ и ДКС, в выживших клетках глиобластомы может изменяться экспрессия множества генов, в том числе генов коровых белков ПГ. Для проверки этой гипотезы клетки U87 были инкубированы с 250 мкМ ТМЗ и/или 1 мкМ ДКС в течение 24 часов, затем экспрессия ПГ в этих клетках была определена методом ОТ-ПЦР в реальном времени (Рис. 7).

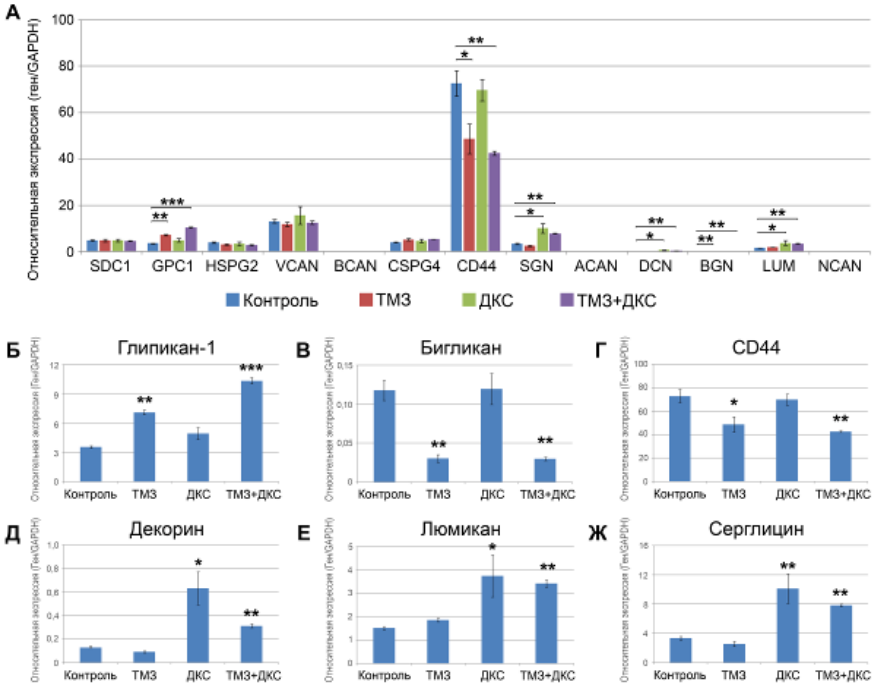

Рисунок 7. Влияние темозоломида и дексаметазона на экспрессию протеогликанов в клетках U87 глиобластомы человека *in vitro*. Результаты ОТ-ПЦР в реальном времени. А – относительная экспрессия всех изученных ПГ; Б-Ж – Относительная экспрессия индивидуальных ПГ. Приведены средние значения для группы ± SD. * - p <0,05; ** - p <0,01; *** - p <0,001 по сравнению с контролем.

Инкубация клеток U87 с ТМЗ приводила к изменению уровня экспрессии глипикана-1 (+2 раза), CD44 (-1,5 раза), бигликан (-3,8 раза), а ДКС - серглицина (+3 раза), декорина (+4,8 раза) и люмикана (+2,5 раза) по сравнению с контрольными клетками (p <0,05). Такие значительные изменения общего паттерна и уровня экспрессии ПГ в клетках глиобластомы под действием химиотерапевтических препаратов может свидетельствовать об изменении фенотипа опухолевых клеток в сторону большей агрессивности и устойчивости к терапии, что может вносить свой вклад в развитие рецидива заболевания.

Влияние химиотерапии на ВКМ нормальной ткани головного мозга

Системное введение химиотерапевтических препаратов влияет не только непосредственно на опухолевые клетки, но и на окружающую их нормальную ткань головного мозга. Для определения влияния ТМЗ и ДКС на ткань головного мозга экспериментальных животных самцам крыс Wistar вводили ТМЗ перорально (30 мг/кг ежедневно в течение 5 дней) или ДКС (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). Экспрессию ПГ анализировали методом ОТ-ПЦР в реальном времени в коре головного мозга и в гиппокампе (Рис. 8).

Введение ТМЗ в течение 5 дней не приводило к статистически значимым изменениям экспрессии коровых белков ПГ в мозге экспериментальных животных. ДКС оказывал дозозависимый эффект, повышая уровень экспрессии ПГ в гиппокампе (синдекана-1, глипикан-1, бревикан, CSPG4/NG2, люмикан, версикан – до 3-5 раз), а в больших дозах также и в коре головного мозга (синдекан-1, глипикан-1, бревикан, CSPG4/NG2, бигликан, люмикан) по сравнению с контрольными животными. Применение комбинации ТМЗ и ДКС приводило к увеличению экспрессии глипикана-1 и снижению экспрессии люмикана в гиппокампе и увеличению экспрессии перлекана и CSPG4/NG2 в коре головного мозга.

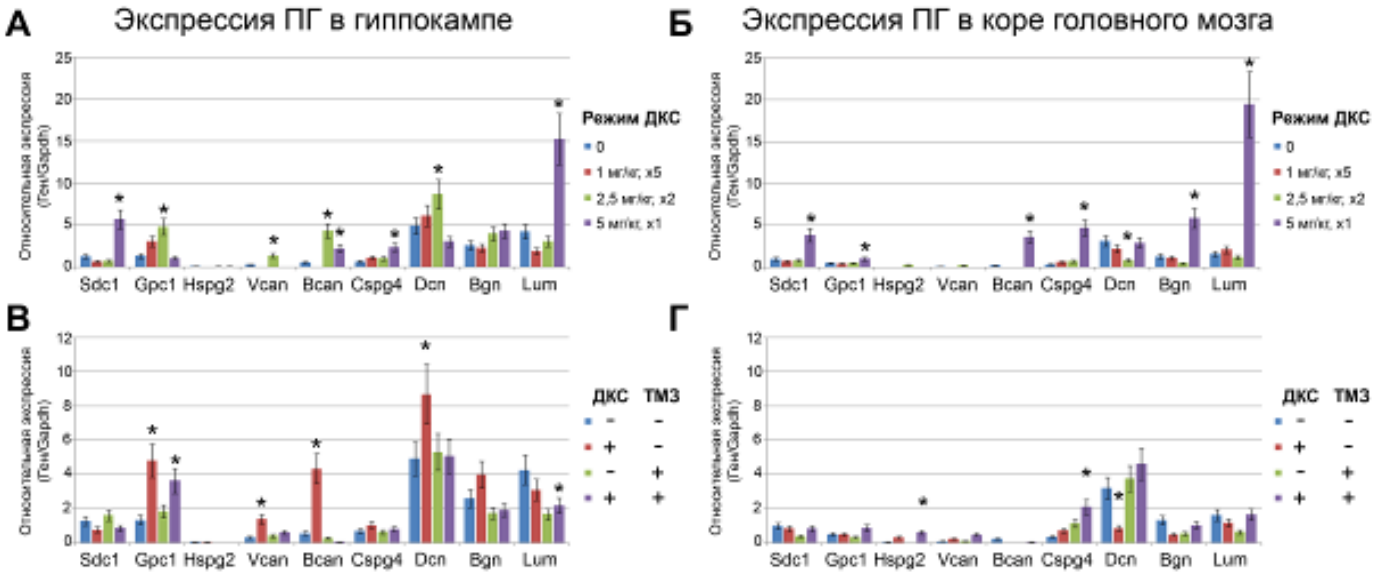

Рисунок 8. Влияние темозоломида и дексаметазона на экспрессию протеогликанов в гиппокампе (А, В) и коре головного мозга (Б, Г) крыс Wistar *in vivo*. Результаты ОТ-ПЦР в реальном времени. А, Б – влияние различных режимов введния ДКС; В, Г – влияние введения 150 мг/м^2 ТМЗ в течение 5 дней и/или 2,5 мг/кг ДКС на 2 и 4 дни эксперимента. Приведены средние значения для группы ± SD; * - p <0,05.

Для подтверждения полученных результатов на уровне белковых молекул ПГ был использован иммунофлуоресцентный анализ содержания синдекана-1, CSPG4/NG2 и декорина. Было показано, что ТМЗ и ДКС оказывают различное влияние на содержание коровых белков ПГ в разных зонах мозга. Так в гиппокампе ТМЗ значительно увеличивал содержание синдекана-1 (+3 раза), а ДКС - снижал содержание декорина (-5 раз). В коре головного мозга и ТМЗ и ДКС приводили к снижению содержания декорина (-2-4,5 раза) и синдекана-1 (-2 раза) по сравнению с контрольной тканью коры головного мозга. Наиболее выраженные эффекты показаны для комбинации препаратов ТМЗ+ДКС - в гиппокампе наблюдается значительное снижение содержания декорина (-3-4 раза) и увеличение содержания CSPG4/NG2 (+1,5 раза). В коре головного мозга увеличивается содержание коровых белков CSPG4/NG2 и синдекана-1 (+2 раза), но не декорина (Рис. 9).

Полученные данные о нарушении содержания коровых белков ПГ в нормальной ткани головного мозга под действием ТМЗ и/или ДКС согласуются с данными об изменении уровня мРНК, полученными при помощи ОТ-ПЦР. Препараты темозоломид и дексаметазон, используемые при терапии глиобластомы, оказывают значительное влияние на экспрессию ПГ не только в клетках глиобластомы, но также и в нормальной ткани головного мозга. Однако функциональная значимость изменений ВКМ окружающей опухоль нормальной ткани головного мозга не ясна.

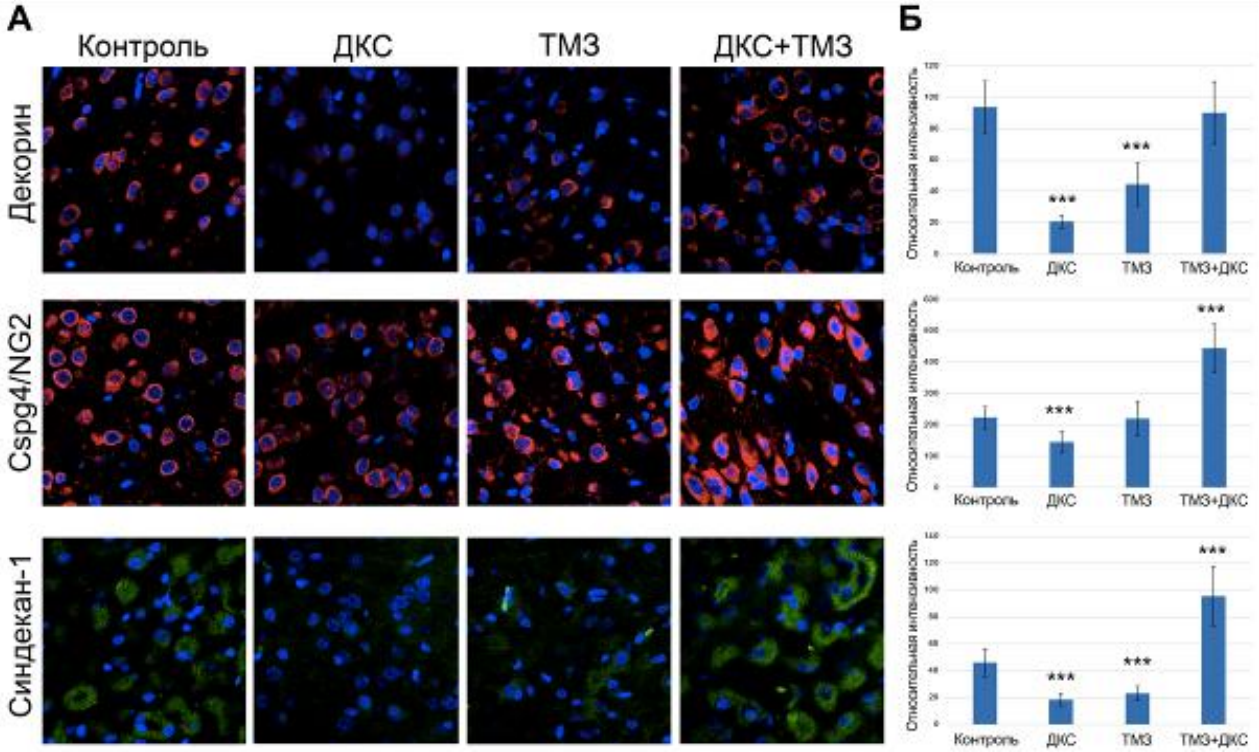

Рисунок 9. Иммунофлуоресцентный анализ содержания коровых белков ПГ в коре головного мозга крыс под действием ТМЗ и ДКС. А - иммуноокрашивание на декорин, Cspg4/NG2 и синдекан-1. Визуализация с использованием вторичных антител, конъюгированных AlexaFluor 647 (красный, для декорина и Cspg4/NG2) или AlexaFluor 488 (зеленый, для синдекана-1). Увеличение x400. Б - Количественный анализ содержания коровых белков ПГ (CellProfiler 2.2.0). * - $p < 0.05$, ** - $p < 0.01$ *** - $p < 0.001$.

Следующей задачей данного исследования было изучить влияние нарушения состава ПГ нормальной ткани головного мозга, происходящего под действием ТМЗ и ДКС, на пролиферацию, адгезию и инвазию клеток глиобластомы в системе *ex vivo*, а также на скорость роста экспериментальных опухолей *in vivo*.

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 органотипическими срезами гиппокампа крысы (которые являются полноценной 3D культурой *ex vivo* и содержат 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, а затем на них была нанесена суспензия клеток глиобластомы U87-RFP. Для оценки адгезии опухолевых клеток к поверхности среза, совместная культура была инкубирована в течение 2 часов, а для оценки пролиферации и инвазии опухолевых клеток – 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 - как процент объема среза, занятый опухолевыми клетками; инвазия опухолевых клеток - как процент площади среза, занятый опухолевыми клетками на глубине 25 мкм от поверхности среза (Рис. 10).

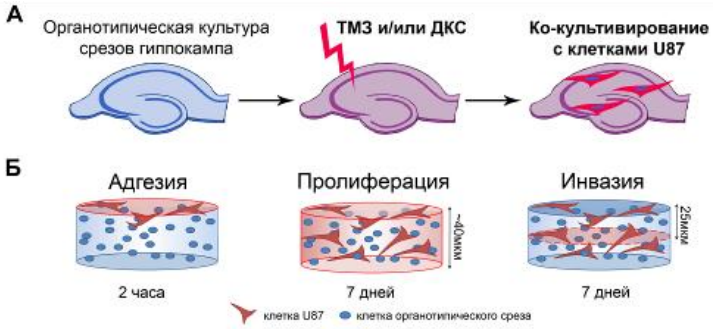

Рисунок 10. Схема эксперимента по совместному культивированию клеток глиобластомы и органотипических срезов гиппокампа. А – дизайн эксперимента; Б – схема анализа адгезии, пролиферации и инвазии опухолевых клеток. Красным выделены зоны, учтенные при анализе каждого параметра.

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. 11). Обработка срезов ТМЗ приводила к значительному усилению пролиферации клеток глиобластомы в совместной культуре (+7,8 раз, $p < 0{,}001$). Обработка срезов ДКС приводила к усилению адгезии клеток U87 к срезу в 10,8 раз ($p < 0{,}05$), но не изменяла пролиферацию или инвазию опухолевых клеток по сравнению с контрольными срезами.

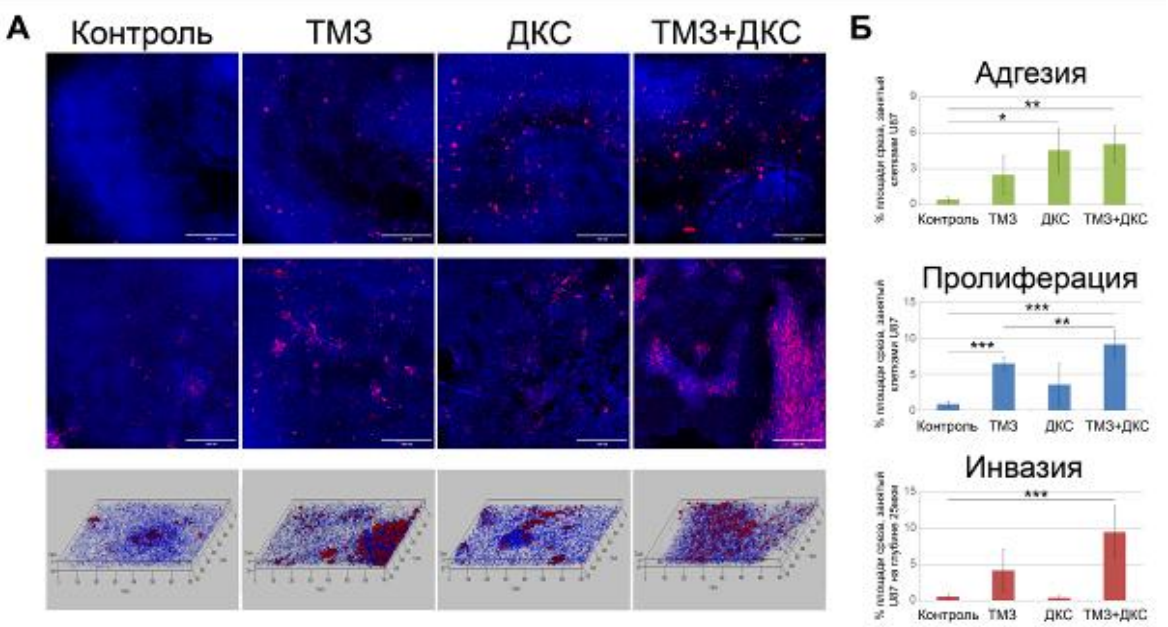

Рисунок 11. Совместная культура опухолевых клеток глиобластомы U87 и органотипических срезов гиппокампа крысы, обработанных или необработанных ТМЗ и/или ДКС. А – флуоресцентные микрофотографии срезов и 3D-реконструкция фрагмента совместной культуры (конфокальная микроскопия в режиме Z-stack). Красным цветом отображены клетки U87, ядра всех клеток подкрашены DAPI. Увеличение 200x; Б – Количественный анализ содержания клеток U87 в совместной культуре, приведены средние значения ±SD. * - $p < 0{,}05$, ** - $p < 0{,}01$ *** - $p < 0{,}001$.

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.

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

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

Поскольку изменение содержания ПГ и ГАГ в ткани головного мозга под воздействием ТМЗ и ДКС может не оказывать прямого влияния на скорость роста опухолей, был проведен эксперимент для подтверждения функциональной роли ГАГ в данном процессе. Содержание углеводных цепей ГАГ в органотипических срезах гиппокампа крысы было экспериментально повышено (добавление экзогенных ХС-АС или ХС-В) или снижено (ферментативное разрушение эндогенных цепей ГАГ с помощью хондроитиназы-АС или хондроитиназы-В, расщепляющих ХС-АС и ХС-В, соответственно).

Клетки глиобластомы человека U87 культивировали с обработанными срезами гиппокампа и анализировали их адгезию, пролиферацию и инвазию. Деградация ХС-АС в органотипических срезах гиппокампа хондроитиназой АС приводила к значительному усилению адгезии (в 7,1 раз, $p < 0,05$) опухолевых клеток U87 к поверхности среза и их инвазии (в 2,9 раз, $p < 0,05$) вглубь среза по сравнению с контролем, при этом добавление к совместной культуре экзогенного ХС-АС не приводило к достоверным изменениям исследованных характеристик опухолевых клеток. В отношении ХС-В был показан противоположный эффект. Деградация ХС-В в органотипических срезах не приводила к статистически значимым изменениям адгезии, инвазии или пролиферации клеток U87 в совместной культуре, однако добавление экзогенного ХС-В значительно увеличивало адгезию клеток U87 к поверхности среза (+3,4 раза, $p < 0,05$), их пролиферацию (+2,7 раз, $p < 0,05$), и инвазию вглубь среза (+2,6 раз, $p < 0,01$) по сравнению с контролем (Рис. 12).

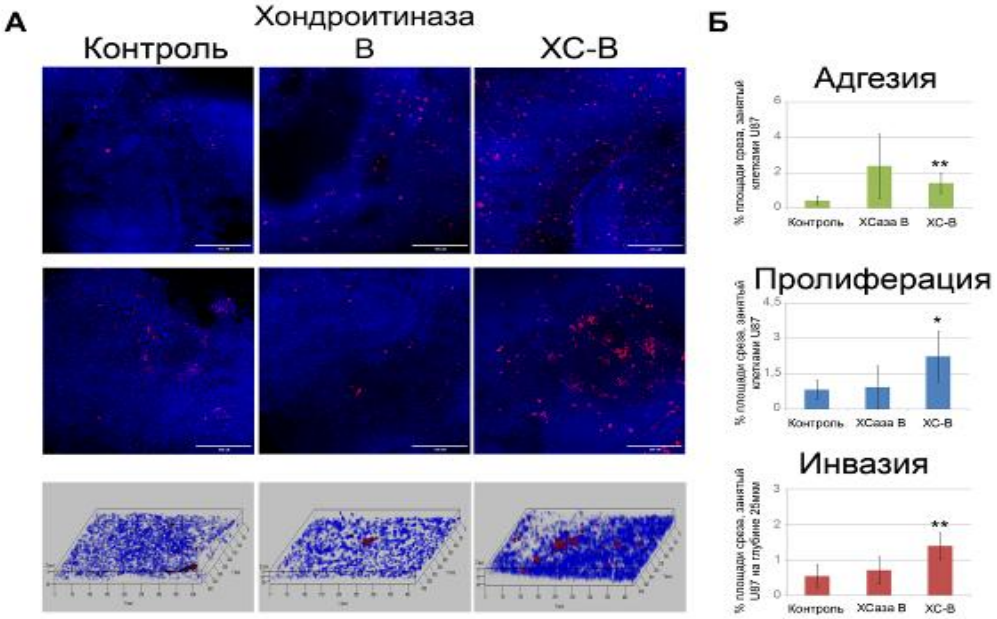

Рисунок 12. Влияние дерматансульфата (ХС-В) на рост клеток глиобластомы U87 в совместной культуре с органотипическими срезами гиппокампа крысы. А – флуоресцентные микрофотографии срезов и 3D-реконструкция фрагмента совместной культуры (конфокальная микроскопия в режиме Z-stack), красным цветом отображены 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, содержание и структура углеводных цепей ГАГ в нормальной ткани головного мозга, оказывает значительное влияние на адгезию, пролиферацию и инвазию клеток глиобластомы.

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 общепринятой схемы лечения глиобластомы на рост экспериментальных опухолей в модели рецидива глиобластомы *in vivo*.

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 (схема эксперимента на Рис. 13).

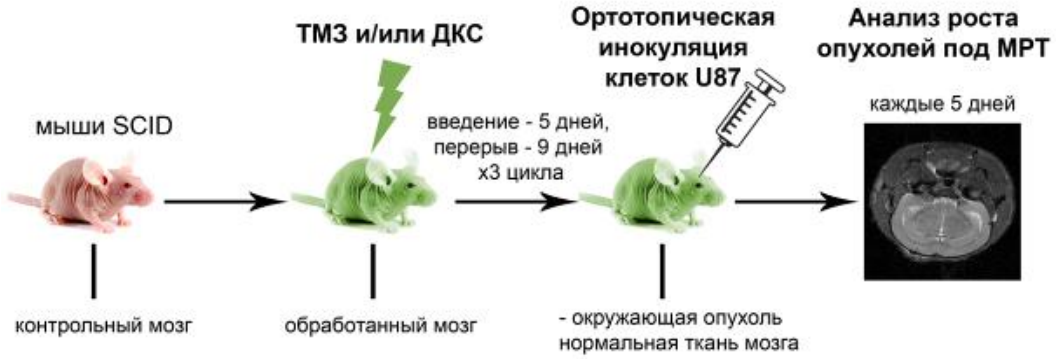

Рисунок 13. Схема эксперимента по моделированию рецидива глиобластомы на иммунодефицитных мышах линии SCID.

Экспрессия ПГ была определена в коре и внекорковых структурах головного мозга интактных мышей и мышей, получавших ТМЗ и/или ДКС до и после инокуляции опухоли. Было показано, что ТМЗ не оказывал значительного влияния на экспрессию коровых белков ПГ, а ДКС влиял на уровень экспрессии ПГ в коре (бигликан) и внекорковых структурах головного мозга (синдекан-1, глипикан-1, версикан). Введение комбинации ТМЗ+ДКС приводило к наиболее значительным изменениям экспрессии ПГ - CD44 (+6,3 раза), декорина (+3,6 раз), бигликана (+4,3 раза) в коре головного мозга мышей и глипикана-1 (+3,2 раза,), версикана (+3,7 раз) во внекорковых структурах головного мозга.

Содержание углеводных цепей ХС-АС в ткани головного мозга было оценено с помощью методов ИГХ и dot-blot с использованием специфических антител (Рис. 14).

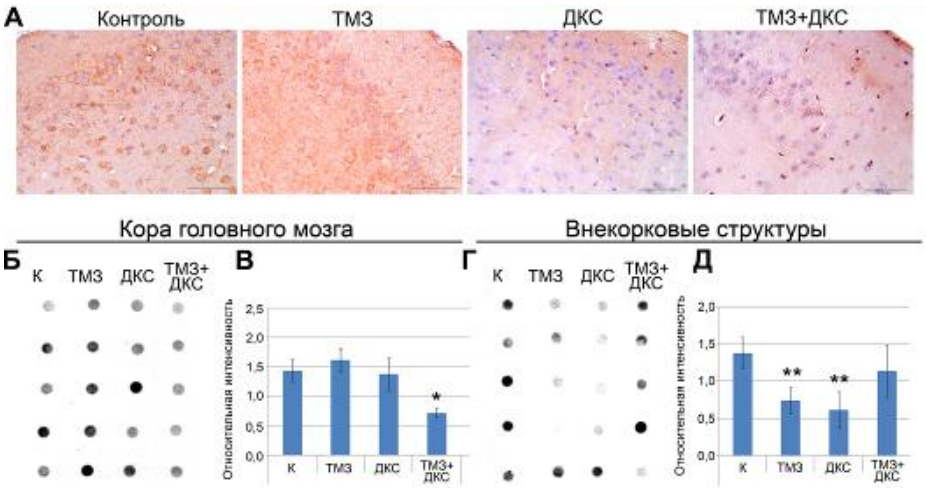

Рисунок 14. Анализ влияния ТМЗ и ДКС на содержание углеводных цепей ХС-АС в ткани головного мозга мышей SCID. А – ИГХ окрашивание с использованием антител, специфичных к ХС-АС; увеличение 400х. Б, Г – dot-blot анализ с использованием антител к ХС-АС; В, Д – денситометрический анализ dot-blot. Приведены средние значения ±SD. * - p <0,05; ** - p <0,01.

Содержание ХС-АС в нормальной ткани головного мозга мышей под действием ТМЗ снижалось во внекорковых структурах в 1,9 раз (p <0,01), а под действием ДКС - в 2,2 раза. Введение мышам комбинации ТМЗ+ДКС снижало содержание ХС в коре головного мозга в 2 раза (p <0,01) по сравнению с контролем. Эти данные показали, что ТМЗ и ДКС 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 (моделирующих химиотерапию) экспериментальным животным были инокулированы клетки U87 и развитие ортотопических опухолей U87 определяли при помощи магнитно-резонансной томографии. Было показано, что скорость роста опухолей, а также их финальный объем были достоверно больше у животных, получавших ТМЗ и/или ДКС (+2,7 – 3,4 раза, p <0,05) по сравнению с контрольными животными (Рис. 15).

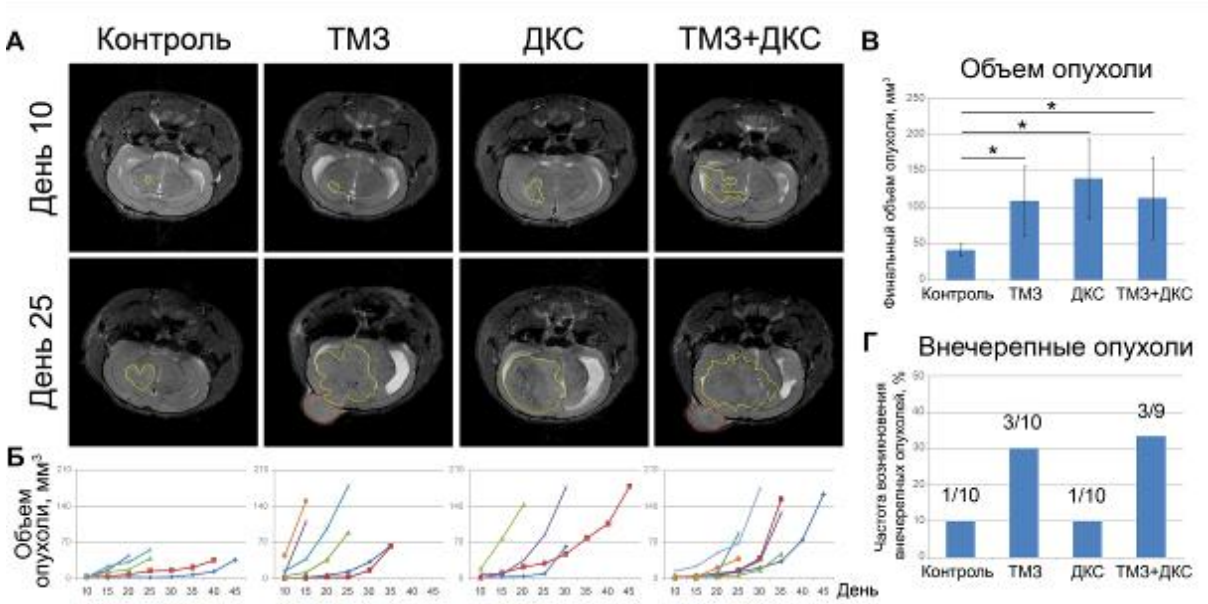

Рисунок 15. Влияние темозоломида и дексаметазона на рост экспериментальных опухолей *in vivo*. А – результаты МРТ на 10 и 25 дни после инокуляции опухолевых клеток U87. Репрезентативное изображение одного животного из группы. Желтым обозначен контур опухоли, красным – контур внечерепного образования; 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 прорастает за пределы черепа. Такие экстракраниальные опухоли 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, они были обнаружены у 30% животных. Этот эффект может свидетельствовать о повышенной инвазивности ксенографтных опухолей, развивающихся в мозге животных, получавших химиотерапию.

Ассоциация экспрессии ПГ с размером экспериментальных опухолей

Также была исследована ассоциация экспрессии ПГ 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.

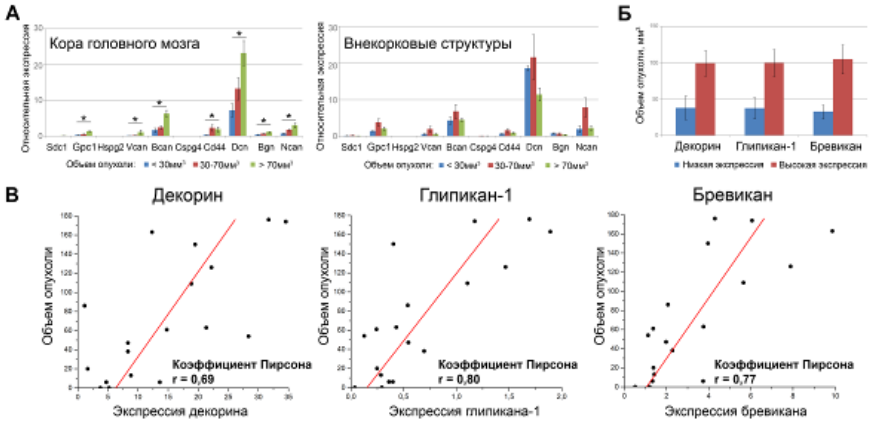

Рисунок 16. Ассоциация экспрессии ПГ в нормальной ткани головного мозга с размером опухоли. А – Относительная экспрессия ПГ в коре и внекорковых структурах головного мозга мышей SCID с различным размером развившихся опухолей. Данные ОТ-ПЦР, приведены средние значения ±SD. Б – Объем опухолей у животных с условно низкой или высокой экспрессией отдельных ПГ в коре головного мозга. В – корреляция экспрессии отдельных ПГ в коре головного мозга с объемом опухоли.

Экспрессия ряда ПГ в коре головного мозга животных с большими опухолями была значительно выше таковой у животных с маленькими опухолями (Рис. 16). Разделение экспериментальных животных на группы по уровню экпрессии ПГ (животные с условно низкой и высокой экспрессией) с последующим анализом объемов опухолей в полученных группах показало высокую позитивную корреляцию уровней экспрессии декорина (r = 0,69), глипикана-1 (r = 0,80) и бревикана (r = 0,77) с размером опухоли (Рис. 16).

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

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 ПГ 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 мозга мышей SCID и увеличению скорости роста и размера экспериментальных опухолей U87 *in vivo*.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи

1. **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 Tissue Res. - 2020. - V. 379. - № 1. - P. 147-155.
2. 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. // Int J Mol Sci. – 2020. – V. 21. - № 4. - 1301.
3. **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*. // Front Pharmacol. - 2018. - V. 9. - P. 1104-1117.
4. 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. // Histochem Cell Biol. - 2018. - V. 149. - № 3. - P. 235-244.
5. **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. 1-8.
6. **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.

Тезисы конференций

7. Kolpakova M.A., **Tsidulko A.Y.**, Shevelev O.B., Dotsenko A.S., Suhovskih A.V., Zavjalov E.L., Grigorieva E.V. Changes in normal brain ECM upon anti-glioblastoma chemotherapy are associated with experimental tumour growth *in vivo*. // Int J Mol Med. - 2019. - V. 44. (Suppl. 1). - P. S16.
8. **Tsidulko A.Y.**, Bezier C., de La Bourdannaye G., Suhovskih A.V., Kazanskaya G.M., Aidagulova S.V., Grigorieva E.V. Combination of temolozomide with dexamethasone reinforces the changes in normal brain tissue structure and composition. // Int J Mol Med. - 2018. - V. 42. (Suppl. 1). - P. 23.
9. **Tsidulko A.Y.**, Bezier C., de La Bourdannaye G., Suhovskih A.V., Kazanskaya G.M., Aidagulova S.V., Grigorieva E.V. Extracellular matrix of normal brain tissue is affected by temozolomide during anti-glioblastoma treatment. // Ann Oncol. - 2018. - V. 29. (Suppl. 8). - P. vii12.
10. Колпакова М.А., **Цидулко А.Ю.**, Доценко А.С., Шевелев О.Б., Завьялов Е.Л., Григорьева Э.В. Влияние противоопухолевой терапии на внеклеточный матрикс ткани головного мозга в

модели рецидивирующей глиобластомы in vivo. // Злокачественные опухоли. - 2018. - Т. 8. - № 3. - Спецвыпуск 1. - С. 282.

11. **Tsidulko A.Y.**, Pankova T.M., Bezier C., de La Bourdannaye G., Suhovskih A.V., Kazanskaya G.M., Aidagulova S.V., Grigorieva E.V. Dose- and regimen-dependent effects of dexamethasone on extracellular matrix of brain tissue. // Ann Oncol. - 2017. - V. 28. (Suppl. 5). - P. v1-v21.
12. Казанская Г.М., Волков А.М., **Цидулко А.Ю.**, Киселев Р.С., Суховских А.В., Костромская Д.В., Кобозев В.В., Гайтан А.С., Айдагулова С.В., Кривошапкин А.Л., Григорьева Э.В. Появление углеводных молекул гепарансульфата в клетках глиобластомы как фактор негативного прогноза течения заболевания. // Злокачественные опухоли. - 2017. - Т. 7. - № 3 (Спецвыпуск 1). - С. 200.
13. **Цидулко А.Ю.**, Казанская Г.М., Костромская Д.В., Киселев Р.С., Кобозев В.В., Волков А.М., Гайтан А.С., Айдагулова С.В., Кривошапкин А.Л., Прудникова Т.Ю., Григорьева Э.В. Поиск прогностических биомаркеров злокачественных опухолей головного мозга человека. // Acta Naturae. - 2016. - Спецвыпуск. - Т. 2. - С. 174-175.
14. **Tsidulko A.Y.**, Kazanskaya G.M., Kostromskaya D.V., Kiselev R.S., Volkov A.M., Gaitan A.S., Krivoshapkin A.L., de la Bourdonnaye G., Aidagulova S.V., Grigorieva E.V. Proteoglycans of brain extracellular matrix as potential molecular targets of dexamethasone side-effects during anti-glioma therapy. // Int J Mol Med. - 2016. - V. 38. - Suppl. 1. - P. S50.
15. **Цидулко А.Ю.**, Айдагулова С.В., Григорьева Э.В. Негативное воздействие темозоломида на нормальную ткань головного мозга в экспериментальной модели in vivo. // Злокачественные опухоли. - 2016. - Т. 21. - Н. 4. - Спецвыпуск 1. - Р. 302-303.
16. **Tsidulko A.Y.**, Kazanskaya G.M., Kostromskaya D.V., Aidagulova S.V., Kiselev R.S., Volkov A.M., Kobozev V.V., Gaitan A.S., Prudnikova T.Y., Krivoshapkin A.L., Grigorieva E.V. Upregulation of CSPG4/NG2 confers poor prognosis in patients with glioblastoma. // Int J Mol Med. - 2015. - V. 36. - Suppl. 1. - P. S78.
17. **Цидулко А.Ю.**, Киселев Р.С., Прудникова Т.Ю. CSPG4/NG2 как молекулярный маркер определения агрессивности глиобластом и оптимизации их постоперационного лечения. // Сибирский онкологический журнал. - 2015. - Прил. 1. - С. 87.