



Транскрипционная активность *CSPG4/NG2* как прогностический маркер послеоперационного течения глиобластом

Цидулко А.Ю.¹, Кобозев В.В.², Волков А.М.², Костромская Д.В.², Айдагулова С.В.³, Киселев Р.С.³, Прудникова Т.Ю.¹, Кривошапкин А.Л.^{2,4}

¹ ФГБНУ «Научно-исследовательский молекулярной биологии и биофизики», 630117, Россия, Новосибирск, ул. Тимакова, 2/12; ² ФГБУ «Новосибирский научно-исследовательский институт имени академика Е.Н. Мешалкина» Минздрава России, Россия, 630055, Новосибирск, ул. Речкуновская, 15;

³ ГБОУ ВПО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, 630091, Россия, Новосибирск, Красный проспект, 52; ⁴ Европейский медицинский центр, 129090, Россия, Москва, ул. Щепкина, 35

УДК 616.8-089

Поступила в редакцию 15 июня 2015 г. Принята к печати 27 июля 2015 г.

Введение

Глиобластома – злокачественная опухоль головного мозга, характеризующаяся выраженным инвазивным ростом и неблагоприятным прогнозом. В опухолях происходит изменение экспрессии многих генов, в частности гена *CSPG4/NG2*, играющего значительную роль в пролиферации опухолевых клеток глиобластомы и неоваскуляризации опухоли. До сих пор остается неясной возможность его использования как маркера прогноза лечения новообразования.

Материал и методы

Проведено клиническое и молекулярно-биологическое исследование 8 пациентов с диагнозом «Глиобластома». Образцы опухолей фиксировали в растворе RNA-later (Life Technologies, США). Экспрессии *CSPG4/NG2* и *CD44* оценивали с помощью метода полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в реальном времени; в качестве контрольного гена использовали *GAPDH*. Пациентов разделили на две группы по показателю послеоперационной выживаемости: группа 1 – выживаемость менее 1 года, группа 2 – выживаемость более 1 года после удаления опухоли.

Результаты

Молекулярно-биологические исследования показали значительное увеличение уровня экспрессии *CSPG4/NG2* в опухолях пациентов 1-й группы (в среднем в 4 раза) по сравнению с уровнем экспрессии в опухолях 2-й группы. Также продемонстрировано, что повышение экспрессии *CSPG4/NG2* в опухолях с плохим прогнозом положительно коррелирует (коэффициент Пирсона 0,9514) с увеличением уровня маркера раковых стволовых клеток *CD44* в тех же клинических образцах.

Выводы

Полученные данные демонстрируют перспективу использования *CSPG4/NG2* для определения оптимального послеоперационного лечения пациентов с глиобластомой.

Ключевые слова

Глиобластома • Ген *CSPG4/NG2* • Хондроитинсульфат протеогликан • Прогноз заболевания

Глиобластома – наиболее злокачественная из глиальных опухолей головного мозга со средней продолжительностью жизни после оперативного лечения 4–12 мес. [1, 4]. В злокачественных опухолях головного мозга происходит изменение экспрессии большого числа генов. Ранее исследователи продемонстрировали использование *CSPG4/NG2* для прогноза течения заболевания других видов злокачественных новообразований. Установлено, что *CSPG4/NG2* ассоциирован с плохим прогнозом острого миелоидного лейкоза [5],

рака молочной железы [3] и меланомы [7]. Однако для опухолей мозга этот вопрос остается малоизученным.

Для различных видов рака известно, что агрессивность опухоли зачастую определяется содержанием в ее составе опухолевых стволовых клеток. Авторы высказывали гипотезу, что и для глиобластом повышенная агрессивность также может быть связана с содержанием стволовых клеток в опухоли [6]. Известный молекулярный маркер стволовых клеток различных опухолей – хондроитинсульфат протеогликан *CD44* – рецептор

Таблица 1 Праймеры, использованные для полимеразной цепной реакции

Ген	Последовательность	Температура плавления, °C
<i>CSPG4/NG2</i>	F 5'-TATGTTGGCCAGACTTGCAT-3'	59
	R 5'-TGCAGGTCTATGTCGGTCAG-3'	59
<i>CD44</i>	F 5'-GACAAGTTTTGGTGGCACG-3'	59
	R 5'-CACGTGGAATACACCTGCAA-3'	59
<i>GAPDH</i>	F 5'-AAGGTGAAGGTCGGAGTCAA-3'	59
	R 5'-AATGAAGGGGTCATTGATGG-3'	59

гиалуроновой кислоты, а также, возможно, некоторых других лигандов. Поэтому определение уровня *CD44* может характеризовать содержание стволовых клеток в конкретной опухоли.

Целью исследования являлось изучение уровня экспрессии гена *CSPG4/NG2* в глиобластоме на транскрипционном уровне, его взаимосвязи с содержанием *CD44*, тяжестью течения заболевания и возможности использования в качестве прогностического маркера для оптимизации послеоперационного лечения пациентов с такой патологией.

Материал и методы

В центре ангионеврологии и нейрохирургии ФГБУ «Новосибирский научно-исследовательский институт имени академика Е.Н. Мешалкина» Минздрава России прооперировали 8 пациентов по поводу глиобластомы головного мозга – Gr.4. Пациентов разделили на две группы по показателю послеоперационной выживаемости: 5 пациентов (группа 1) – выживаемость менее 1 года и 3 пациента (группа 2) с выживаемостью более 1 года после удаления опухоли [4]. От каждого пациента получено по одному образцу ткани опухоли. Образцы фиксировали в растворе RNA-later (LifeTechnologies, США) согласно инструкции производителя и хранили при температуре –20 °C.

Для выделения суммарной РНК образцы замораживали в жидком азоте и гомогенизировали. Выделение РНК проводили с использованием реагента TRIzol (LifeTechnologies, США) с дальнейшей дополнительной очисткой с помощью набора PureLink (Invitrogen, США) согласно прилагаемому протоколу. кДНК получали из 1–2 мкг РНК при помощи First Strand cDNA Synthesis kit (Fermentas, США) и в дальнейшем анализировали методом полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Для ПЦР использовали праймеры, представленные в табл. 1.

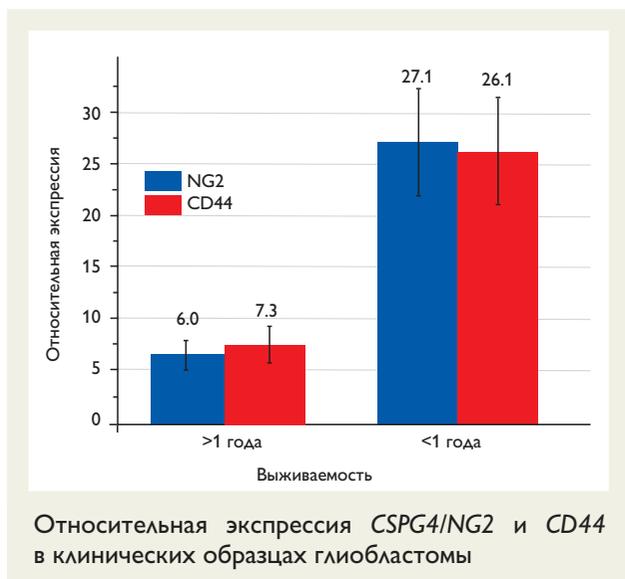
Количественную ПЦР в реальном времени с использованием красителя SYBR Green I (Biolink, Москва) и Taq-полимеразы (Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск) проводили при помощи амплификатора CFX96 (BioRad, США) в режиме: 3 мин 95 °C, 20 с 95 °C, 15 с 59 °C, 50 с 72 °C. Общий объем реакции составил 25 мкл. Амплификацию проводили в течение 40 циклов. В качестве контрольного гена выбрали ген *GAPDH*. Продукты ПЦР проверяли на специфичность методом кривой плавления. Анализ результатов проводили методом определения относительной экспрессии с использованием программного обеспечения Origin 8.5 (OriginLab, США).

Статистический анализ

Данные экспрессии генов представляли как среднее арифметическое и стандартное отклонение. Различия

Таблица 2 Характеристика образцов глиобластом

Образец	Пол	Возраст, лет	Клинический диагноз	Длительность жизни после операции, мес.
GB17	Ж	57	Глиобластома	4
GB18	М	55		13
GB36	М	52		36
GB37	Ж	36		13
GB40	М	28		7
GB43	М	42		9
GB45	М	53		8
GB46	Ж	53		10



сравнимых параметров считали значимыми, если вероятность ошибки p была меньше 0,05. Для оценки корреляции уровня экспрессии генов использовали коэффициент Пирсона. Статистическую обработку результатов проводили с использованием программного обеспечения Origin 8.5 (OriginLab, США).

Результаты

С учетом катмнеза заболевания пациентов образцы опухоли разделили на две группы. В первую группу вошли образцы глиобластом пациентов с выживаемостью менее 1 года после операции, во вторую – более 1 года (табл. 2).

При помощи метода ОТ-ПЦР в реальном времени с использованием *GAPDH* в качестве контрольного гена оценивали уровень экспрессии *CSPG4/NG2* в клинических образцах глиобластомы пациентов с различной выживаемостью после операции (рисунок).

Обнаружено, что уровень экспрессии *CSPG4/NG2* достоверно различается в группах пациентов с выживаемостью до года и после и составляет $27,1 \pm 4,8$ и $6,0 \pm 1,1$. Такая ассоциация уровня экспрессии *CSPG4/NG2* с выживаемостью пациентов позволяет предположить о возможности его использования в качестве прогностического маркера агрессивности опухолей головного мозга.

Уровень экспрессии *CD44*, определенный в тех же образцах опухолей, для которых проанализировали экспрессию *CSPG4/NG2*, показан на рисунке. В опухолях пациентов с выживаемостью до года уровень экспрессии *CD44* выше по сравнению с опухолями пациентов с выживаемостью более 1 года и составляет $26,1 \pm 5,1$ и $7,3 \pm 1,9$. Это коррелирует с экспрессией *CSPG4/NG2* в этих же клинических образцах (коэффициент Пирсона

0,9514) и подтверждает высказанное предположение, что низкая выживаемость может быть связана с высоким содержанием стволовых клеток, экспрессирующих *CSPG4/NG2* и *CD44*.

Обсуждение

Полученные результаты свидетельствуют о достоверной разнице в уровне экспрессии *CSPG4/NG2* в глиобlastомах пациентов с продолжительностью жизни после операции до года и более. Аналогичные показатели получили авторы, показавшие, что высокий уровень *CSPG4/NG2* играет роль в пролиферации опухолевых клеток глиобластомы [8]. На фоне повышения экспрессии этого гена также происходит усиление пролиферативной активности элементов сосудистого русла опухоли, уровень которой характеризует степень ее агрессивности, что было показано при совместном изучении ангиогенеза в глиобlastомах и меланомах на доклинических моделях [10].

Авторы немногочисленных работ показали, что повышенное содержание *CSPG4/NG2* в опухоли способно приводить к возникновению лекарственной устойчивости [2] или устойчивости к радиотерапии [9]. В исследовании мы продемонстрировали повышение в опухолях пациентов с плохим прогнозом выживаемости уровня хондроитинсульфат протеогликана *CD44* – маркера стволовых клеток. При различных видах рака агрессивность опухоли зачастую определяется содержанием в ее составе стволовых клеток [6], поэтому увеличение экспрессии *CD44* также может быть сопряжено с высокой толерантностью глиобlastом к химио- и радиотерапии.

В совокупности полученные результаты открывают перспективу для использования *CSPG4/NG2* как прогностического маркера при выборе стратегии постоперационного лечения пациентов. В частности, могут быть пересмотрены очередность применения методов химио- и радиотерапии, а также соотношение времени их воздействия и дозы под контролем возможного рецидива методами нейровизуализации.

Несомненно, конкретные предложения могут быть сформулированы только после проведения дополнительных уточняющих исследований с привлечением иммуногистохимических методов и распространения данного подхода на другие глиальные новообразования.

Заключение

Низкая выживаемость больных в постоперационном периоде может быть связана с повышенным уровнем экспрессии гена *CSPG4/NG2* и высоким содержанием в опухоли стволовых клеток, экспрессирующих *CSPG4/NG2* и *CD44*.

Оценки экспрессии гена *CSPG4/NG2* в качестве прогностического маркера агрессивности опухоли в стандартную процедуру гистоморфологического анализа глиальных новообразований позволит оптимизировать ведение пациентов с глиобластомой в постоперационном периоде.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Работа поддержана грантом Российского фонда фундаментальных исследований № 14-04-01283.

Список литературы

1. Гайтан А.С., Кривошапкин А.Л., Каныгин В.В. Результаты резекции глиобластом головного мозга с применением комбинированной флуоресцентной навигации // Патология кровообращения и кардиохирургия. 2014. Т. 2. С. 37–41.
2. Chekenya M., Krakstad C., Svendsen A. et al. // *Oncogene*. 2008. Vol. 27. № 39. P. 5182–5194.
3. Hsu N.C., Nien P.Y., Yokoyama K.K. et al. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2013. Vol. 441. № 2. P. 514–518.
4. Karsy M., Neil J.A., Guan J. et al. // *Neurosurg. Focus*. 2015. Vol. 38. № 3. P. E4. doi: 10.3171/2015.1.FOCUS14755.
5. Petrovici K., Graf M., Hecht K. et al. // *Cancer Genomics Proteomics*. 2010. Vol. 7. № 4. P. 173–180.
6. Pointer K.B., Clark P.A., Zorniak M. et al. // *Neurochem. Int.* 2014. Vol. 71. P. 1–7.
7. Price M.A., Colvin Wanshura L.E., Yang J. et al. // *Pigment Cell Melanoma Res.* 2011. Vol. 24. № 6. P. 1148–1157.
8. Stallcup W.B., Huang F.-J. // *Cell Adh. Migr.* 2008. Vol. 2. № 3. P. 192–201.
9. Svendsen A., Verhoeff J.J., Immervoll H. et al. // *Acta Neuropathol.* 2011. Vol. 122. № 4. P. 495–510.
10. Wang J., Svendsen A., Kmiecik J. et al. // *PLoS One*. 2011. Vol. 6. № 7. P. e23062. doi:10.1371/journal.pone.0023062

Сведения об авторах

Цидулко Александра Юрьевна – младший научный сотрудник лаборатории молекулярных механизмов канцерогенеза ФГБНУ «Научно-исследовательский молекулярной биологии и биофизики» (Новосибирск, Россия)

Кобозев Вячеслав Витальевич – канд. мед. наук, зав. отделением нейрохирургии центра ангионеврологии и нейрохирургии ФГБУ «Новосибирский научно-исследовательский институт имени академика Е.Н. Мешалкина» Минздрава России (Новосибирск, Россия)

Волков Александр Михайлович – д-р мед. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории экспериментальной хирургии и морфологии центра новых технологий ФГБУ «Новосибирский научно-исследовательский институт имени академика Е.Н. Мешалкина» Минздрава России (Новосибирск, Россия)

Костромская Диана Владимировна – канд. мед. наук, старший научный сотрудник лаборатории экспериментальной хирургии и морфологии центра новых технологий ФГБУ «Новосибирский научно-исследовательский институт имени академика Е.Н. Мешалкина» Минздрава России (Новосибирск, Россия)

Айдагулова Светлана Владимировна – д-р мед. наук, проф., зав. лабораторией клеточной биологии и фундаментальных основ репродукции ГБОУ ВПО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России (Новосибирск, Россия)

Киселёв Роман Сергеевич – клинический ординатор кафедры нейрохирургии ГБОУ ВПО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России (Новосибирск, Россия)

Прудникова Татьяна Юрьевна – канд. биол. наук, младший научный сотрудник лаборатории молекулярных механизмов канцерогенеза ФГБНУ «Научно-исследовательский молекулярной биологии и биофизики» (Новосибирск, Россия)

Кривошапкин Алексей Леонидович – д-р мед. наук, проф., зав. отделением нейрохирургии Европейского медицинского центра, зав. кафедрой нейрохирургии ГБОУ ВПО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России (Москва, Новосибирск, Россия)

CSPG4/NG2 transcriptional activity as a prognostic marker of the postoperative clinical course of glioblastoma

Tsidulko A.Yu.^{1*}, Kobozev V.V.², Volkov A.M.³, Kostromskaya D.V.³, Aidagulova S.V.³, Kiseliov R.S.³, Prudnikova T.Yu.¹, Krivoshapkin A.L.^{2,4}

¹ Institute of Molecular Biology and Biophysics, 2/12 Timakova St., 630117 Novosibirsk, Russian Federation; ² Academician Ye. Meshalkin Novosibirsk Research Institute of Circulation Pathology Ministry of Health Care of Russian Federation, 15 Rechkunovskaya St., 630055 Novosibirsk, Russian Federation; ³ Novosibirsk State Medical University Ministry of Health Care of Russian Federation, 52 Krasniy Prospect, 630091 Novosibirsk, Russian Federation; ⁴ European Medical Center, 35 Schepkina St., 129090 Moscow, Russian Federation

* Corresponding author. Email: alexandra.tsidulko@gmail.com

Objective. Glioblastoma is a malignant brain tumor characterized by severe invasive growth and poor prognosis. The expression of different genes is changed in tumors, including gene *CSPG4/NG2*, which plays a significant role in the proliferation of glioblastoma cells and tumor neovascularization. The objective of our study was to evaluate the possibility of using the above gene as a prognostic marker for glioblastoma.

Methods. 8 patients with a diagnosis "glioblastoma" underwent clinical and molecular-biological examination. The tumor samples were fixed in RNA-later (Life Technologies, USA). *CSPG4/NG2* and *CD44* expression was evaluated by real-time RT-PCR with GAPDH as a reference gene. The patients were divided into two groups according to the postoperative survival rate: Group 1 – less than 1 year, and Group 2 – over 1 year after surgery.

Results. Molecular biological studies showed a significant 4-fold increase of *CSPG4/NG2* expression level in tumors from group 1 as compared to that of group 2 patients. It was also found out that increased *CSPG4/NG2* expression in galloping tumors is in positive correlation with an increase in cancer stem-cell marker *CD44* expression (Pearson coefficient 0.9514).

Conclusion. The data obtained suggest that *CSPG4/NG2* is a promising prognostic marker to determine optimal postoperative treatment of patients with glioblastoma.

Key words: glioblastoma; *CSPG4/NG2* gene; chondroitin sulfate proteoglycan; prognosis

Received 15 June 2015. Accepted 27 July 2015.