

На правах рукописи

Суховских Анастасия Владимировна

**ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ РОЛЬ ПРОТЕОГЛИКАНОВ
ПРИ РАКЕ ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЧЕЛОВЕКА**

03.01.03 – молекулярная биология

03.01.04 – биохимия

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Кольцово – 2018

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

Научный руководитель: Григорьева Эльвира Витальевна,
кандидат биологических наук,
ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр
фундаментальной и трансляционной медицины»,
лаборатория гликобиологии, руководитель
лаборатории

Официальные оппоненты: Короленко Татьяна Александровна,
доктор медицинских наук, профессор,
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
физиологии и фундаментальной медицины»,
лаборатория экспериментальных моделей
нейродегенеративных процессов, главный
научный сотрудник

Лесовая Екатерина Андреевна,
кандидат биологических наук,
НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии
им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, группа
природных канцерогенов отдела химического
канцерогенеза, старший научный сотрудник

Ведущая организация: ФГБНУ «Томский национальный
исследовательский медицинский центр
Российской академии наук»

Защита состоится «7» сентября 2018 г. в 9.00 часов на заседании диссертационного совета Д 208.020.02 при Федеральном бюджетном учреждении науки Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 630559, р.п. Кольцово, Новосибирская обл., тел. 8 (383) 336-60-10

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора и на интернет-сайте <http://www.vector.nsc.ru>.

Автореферат разослан «__» _____ 2018 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Н.М. Зубавичене

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Одними из основных компонентов внеклеточного матрикса ткани предстательной железы человека являются протеогликаны (ПГ) – сложные белково-углеводные молекулы, состоящие из корового белка и присоединенных к нему одной или нескольких углеводных цепей гликозаминогликанов (ГАГ). Протеогликаны участвуют во взаимодействиях клеток с белками внеклеточного матрикса, факторами роста и хемокинами и регулируют функциональную активность клеток. Благодаря взаимодействию коровых белков протеогликанов и гликозаминогликанов с молекулами внеклеточного матрикса и сигнальными молекулами, протеогликаны участвуют в передаче сигналов между клетками и окружающим их матриксом, что влияет на подвижность, адгезию, рост и апоптоз и другие клеточные процессы.

Состав протеогликанов в ткани является результатом синтетических и деградирующих активностей различных типов клеток. Структура протеогликанов, в особенности паттерн сульфатирования цепей гликозаминогликанов, важен для выполнения протеогликанами своих функций, а в развивающейся опухоли деградирующие ГАГ ферменты могут модифицировать эту структуру и таким образом влиять на функции протеогликанов (Edwards *et al.*, 2012). Известно, что в процессе злокачественной трансформации происходят значительные изменения состава и структуры протеогликанов в опухолевых клетках и тканях – изменение экспрессии их коровых белков, нарушение пост-трансляционной модификации углеводных цепей гликозаминогликанов (ацетилирование, сульфатирование, эпимеризация) и их взаимодействие с лигандами. В литературе описаны изменения экспрессии различных индивидуальных протеогликанов в опухолевых тканях, однако одновременное определение паттерна экспрессии всех основных протеогликанов в одних и тех же клинических образцах и клетках никем ранее не проводилось.

В нашей группе ранее было впервые показано, что паттерн экспрессии протеогликанов в опухолях молочной железы человека отличается от такового в нормальной ткани, что позволило предположить возможность использования протеогликанов в качестве молекулярных маркеров рака молочной железы человека (Ещенко *et al.*, 2007). В других работах нашей группы методами ОТ-ПЦР и Вестерн-блота показано, что в опухолях молочной железы происходит уменьшение экспрессии декорина – основного дерматансульфат протеогликана внеклеточного матрикса (Ryкова *et al.*, 2007). Также работы нашей группы были посвящены изучению паттерна экспрессии основных протеогликанов в опухолях прямой кишки (Suhovskih *et al.*, 2015). Углеводная часть играет важную роль в функционировании молекулы протеогликана, и известно, что в процессе злокачественной трансформации происходят изменения состава и структуры цепей гликозаминогликанов. Поскольку биосинтез гликозаминогликанов осуществляется нематричным способом, происходящие изменения состава и структуры протеогликанов напрямую связаны с нарушениями в их биосинтезе. Ранее в нашей лаборатории была изучена транскрипционная активность генов, участвующих в биосинтезе гепарансульфатов в опухолях молочной железы и прямой кишки (Suhovskih *et al.*, 2015).

Однако в опухолях предстательной железы комплексное исследование как белковой, так и углеводной части сразу нескольких протеогликанов не проводилось, и их роль в канцерогенезе предстательной железы ранее не была изучена. Данная работа посвящена изучению функциональной роли протеогликанов – сложных гликозилированных молекул, в канцерогенезе предстательной железы человека.

Целью данной работы являлось изучение вовлеченности и функциональной роли протеогликанов при раке предстательной железы *in vivo* и в экспериментальной системе *in vitro*.

Задачи:

1. Изучить паттерн экспрессии коровых белков протеогликанов в нормальной ткани предстательной железы человека и его изменения в опухолях *in vivo* и в клеточных линиях рака предстательной железы *in vitro*.
2. Исследовать изменения в содержании и локализации углеводных цепей гепаран- и хондроитинсульфатов в аденокарциномах предстательной железы *in vivo*.
3. Исследовать транскрипционную активность генов, участвующих в метаболизме углеводных цепей гепарансульфатов, в нормальной и опухолевой ткани предстательной железы *in vivo*, нормальных и опухолевых клетках *in vitro* до и после их совместного культивирования с фибробластами.
4. Провести сравнительный анализ влияния нормальных и опухолевых эпителиальных клеток предстательной железы на пролиферативную активность и экспрессию протеогликанов в окружающих их фибробластах в экспериментальной системе совместного культивирования *in vitro*.
5. Изучить потенциальные изменения пролиферативной активности и экспрессии протеогликанов в нормальных и опухолевых эпителиальных клетках предстательной железы в ответ на совместное культивирование этих клеток с фибробластами в экспериментальной системе совместного культивирования *in vitro*.

Научная новизна работы. В данной работе впервые было показано, что:

1. Экспрессия коровых белков основных протеогликанов в опухолевой ткани предстательной железы человека характеризуется снижением экспрессии декорина и люмикана и увеличением экспрессии глипикана-1 и синдекана-1 по сравнению с нормальной тканью и тканью доброкачественной гиперплазии предстательной железы. Клеточные линии рака предстательной железы LNCaP, PC3 и DU145 имеют индивидуальный паттерн экспрессии исследуемых протеогликанов.
2. Содержание углеводных цепей гепарансульфатов в аденокарциномах возрастает в опухолевой строме по сравнению с нормальной тканью предстательной железы.
3. Транскрипционная активность основных генов, вовлеченных в биосинтез гепарансульфатов, снижается в опухолях предстательной железы, за исключением генов *NDST2* и *HS3ST1*, участвующих в пост-синтетической модификации углеводных цепей. В клеточной линии рака предстательной железы LNCaP *in vitro* экспрессия генов *NDST1* и *NDST2*, участвующих биосинтезе гепарансульфатов,

статистически значимо изменяется после совместного культивирования с фибробластами.

4. Совместное культивирование опухолевых клеток предстательной железы с фибробластами *in vitro* приводит к снижению пролиферативной активности фибробластов и изменению паттерна экспрессии протеогликанов – экспрессия корового белка глипикана-1 в фибробластах снижается после совместного культивирования с опухолевыми клетками простаты LNCaP, PC3 и DU145, а экспрессия синдекана-1 повышается после совместного культивирования с клетками LNCaP и PC3, и снижается после – DU145. После совместного культивирования с опухолевыми клетками PC3 в фибробластах также показано увеличение экспрессии α -мышечного актина, что свидетельствует о возможном вкладе протеогликанов в трансформацию нормальных фибробластов в опухоль-ассоциированные фибробласты.
5. Пролиферативная активность культуры нормальных клеток (PNT2) и двух опухолевых клеточных культур LNCaP и PC3 предстательной железы достоверно снижается, а опухолевой клеточной культуры DU145 – не изменяется ($p < 0.05$) после совместного культивирования с фибробластами в системе *in vitro*. Клетки LNCaP реагируют на присутствие фибробластов незначительным изменением экспрессии всех изучаемых протеогликанов, кроме синдекана-1; в клетках PC3 показаны достоверные отличия в экспрессии генов всех изучаемых коровых белков, кроме синдекана-1; в опухолевых клетках линии DU145 статистически значимых отличий в экспрессии коровых белков до и после совместного культивирования с фибробластами не показано.

Научно-практическая значимость. Результаты проведенных исследований носят как фундаментальный характер, так и могут иметь прикладное значение в клинической практике. В ходе выполнения работы было проведено комплексное исследование белковой и углеводной частей молекул основных протеогликанов, изучены изменения состава и структуры протеогликанов в процессе злокачественной трансформации предстательной железы. Данные, полученные в ходе выполнения работы, могут быть использованы для персонализированной диагностики рака предстательной железы человека, что позволит усовершенствовать выбор оптимальной стратегии лечения заболевания и повышения качества жизни пациентов. Также полученные результаты могут быть использованы при разработке таргетных препаратов для лечения рака предстательной железы.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Экспрессия протеогликанов в аденокарциномах предстательной железы изменяется как на уровне мРНК, так и на белковом уровне и гетерогенна внутри индивидуальных опухолей, с общей тенденцией к уменьшению экспрессии декорина и люмикана и увеличению экспрессии глипикана-1 и синдекана-1.
2. Содержание углеводных цепей гепарансульфатов увеличивается в строме опухолей предстательной железы, содержание хондроитинсульфатов в нормальной и опухолевой ткани не изменяется.

3. Общая транскрипционная активность основных генов, участвующих в биосинтезе гепарансульфатов, снижается в доброкачественной гиперплазии предстательной железы в 2,5 раза по сравнению с нормой; в аденокарциномах предстательной железы дополнительно изменяется уровень экспрессии всех изучаемых генов, за исключением NDST2 и HS3ST1, по сравнению с нормальной тканью предстательной железы.
4. Пролиферативная активность фибробластов снижается, экспрессия α -мышечного актина возрастает, общий уровень и паттерн экспрессии коровых белков протеогликанов (за счет снижения экспрессии корового белка глипикана-1 и синдекана-1) изменяется в фибробластах после совместного культивирования с опухолевыми клетками предстательной железы LNCaP, PC3 и DU145.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность полученных результатов подтверждена адекватным статистическим анализом. В качестве методов в работе использовалась обратная транскрипция, полимеразная цепная реакция в реальном времени, иммуноокрашивание, колориметрические методы определения концентрации различных макромолекул, метод совместного культивирования различных типов клеток с целью изучения их взаимного влияния.

Результаты работы были представлены и обсуждены на VIII Конференции молодых ученых-онкологов «Актуальные вопросы экспериментальной и клинической онкологии» (Томск, Россия, 2013); на Конгрессе Федерации Европейских Биохимических Обществ (FEBS congress, Санкт-Петербург, Россия, 2013); на Всероссийской X конференции по фундаментальной онкологии «Петровские чтения – 2014» (Санкт-Петербург, Россия, 2014); Международной конференции «Клеточные и молекулярные механизмы взаимодействий опухоли с микроокружением» («Cellular and molecular mechanisms of tumor-microenvironment crosstalk», Томск, Россия, 2015); на Международной молодежной школе-конференции FEBS Advanced Lecture Course «Matrix Pathobiology, Signaling and Molecular Targets» (Родос, Греция, 2015); на 20-м Международном конгрессе достижений в биологии и 17-м международном симпозиуме по молекулярной медицине (20th World Congress on Advances in Oncology and 18th International Symposium on Molecular Medicine, Афины, Греция, 2015); на XX Российском онкологическом конгрессе (Москва, Россия, 2016); на Медико-биологическом форуме «Биомедицина-2016» (Новосибирск, Россия, 2016); на 22-м Международном конгрессе достижений в биологии и 20-м международном симпозиуме по молекулярной медицине (22th World Congress on Advances in Oncology and 20th International Symposium on Molecular Medicine, Афины, Греция, 2017).

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов, обсуждения, выводов и списка цитированной литературы. Работа изложена на 95 страницах машинописного текста, включает 28 рисунков и 3 таблицы. Библиография включает 160 наименований.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Клинические образцы. В работе были использованы клинические образцы морфологически нормальной предстательной железы, образцы гиперплазии и злокачественных опухолей предстательной железы человека, удаленные в ходе хирургического вмешательства. Большинство исследованных пациентов находились на второй и третьей стадии злокачественного процесса. Операционный материал был получен в Городской Клинической Больнице N1 г. Новосибирска, забор образцов проводили под контролем к.м.н. И.С.Кунина.

Клеточные культуры. Культура нормальных клеток (PNT2), культуры клеток рака предстательной железы (PC3, DU145, LNCaP), BjTERT-иммортиализованные фибробласты кожи человека были получены в Каролинском институте (Стокгольм, Швеция). Клетки культивировали в среде RPMI, содержащей 2мМ L-глутамина, 100ед. пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 10% фетальной бычьей сыворотки, в 5% CO₂ атмосфере при 37°C.

Совместное культивирование фибробластов и эпителиальных клеток, их последующая сортировка, измерение пролиферативной активности. Клетки предстательной железы и фибробласты культивировали совместно в соотношении 1:1 в течение 2-3 дней до плотности 70-80%. Затем клетки были разделены на исходные клеточные типы с помощью OctoMACS Starting Kit (Miltenyi Biotec, Germany). Пролиферативную активность клеток определяли при помощи набора реагентов CyQuantNF Cell Proliferation Assay (Invitrogen, США) согласно инструкции производителя. Данный анализ основан на измерении содержания клеточной ДНК, с которой связывается флуоресцентный краситель. Интенсивность флуоресцентного свечения прямо пропорциональна содержанию клеточной ДНК и числу клеток в культуре.

Выделение РНК и обратная транскрипция. Выделение суммарной клеточной РНК проводили с помощью реагента TRIzol (Thermo Fisher Scientific, США), следуя рекомендациям производителя. кДНК синтезировали с использованием набора реагентов First Strand cDNA Synthesis kit (Fermentas, США) согласно инструкции производителя.

ПЦР в реальном времени. Полуколичественную ПЦР в реальном времени проводили с использованием амплификатора CFX-96 (BioRad, США). В качестве контроля использовался «ген домашнего хозяйства» глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа (GAPDH). Для контроля специфичности ПЦР использовали кривые плавления ПЦР-продуктов. Относительный уровень экспрессии генов оценивали с использованием значений пороговых циклов St по методу 2^{ΔCt}.

Иммуногистохимический и иммуноцитохимический анализ проводили с использованием первичных антител мышиных моноклональных анти-синдекан-1, кроличьих поликлональных анти-глипикан-1, мышиных моноклональных анти-бета актин (Abcam, Великобритания), кроличьих поликлональных анти-люмикан (MaxPab, США), мышиных моноклональных антител анти-декорин (Abnova, США), мышиных

моноклональных антител анти-хондроитинсульфат (Sigma, США), мышинных моноклональных антител анти-гепарансульфат (Millipore, США); вторичных антител: anti-mouse, конъюгированных с FITC и anti-rabbit, конъюгированных с Texas Red (Vector, США). Визуализацию ядер проводили путем нанесения на препараты покровной среды Prolong Gold Antifade reagent с DAPI (Thermo Fisher Scientific, США).

Статистическая обработка результатов. Анализ данных проводили в программе STATISTICA 10. Результаты представлены в виде средней величины и стандартной ошибки среднего (среднее \pm SD). Достоверность отличий между двумя выборками оценивалась с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни. Отличия между выборками считали достоверными при уровне значимости $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Экспрессия коровых белков протеогликанов в клинических образцах предстательной железы *in vivo*

Экспрессия генов основных коровых белков гепарансульфат протеогликанов: глипикана-1 (GPC1), синдекана-1 (SDC1) и перлекана (HSPG2) и хондроитин-/дерматан-/кератансульфат-протеогликанов: агрекана (ACAN), версикана (VCAN), бревикана (BCAN), ХСПГ4/NG2 (CSPG4/NG2), декорина (DCN) и люмикана (LUM) была изучена в образцах нормальной ткани, гиперплазии и в опухолях предстательной железы *in vivo* определяли на уровне мРНК и на белковом уровне.

Было показано, что в нормальной ткани и при доброкачественной гиперплазии предстательной железы экспрессируются следующие коровые белки протеогликанов: версикан, декорин и люмикан (Рисунок 1 А,Б). Экспрессия остальных коровых белков (глипикана-1, перлекана, синдекана-1, агрекана, ХСПГ4/NG2 и бревикана) отсутствует. При доброкачественной гиперплазии наблюдалось достоверное увеличение экспрессии корового белка люмикана в 1,8 раз ($p < 0.05$) по сравнению с нормальной тканью, достоверных различий в экспрессии коровых белков версикана и декорина не наблюдалось.

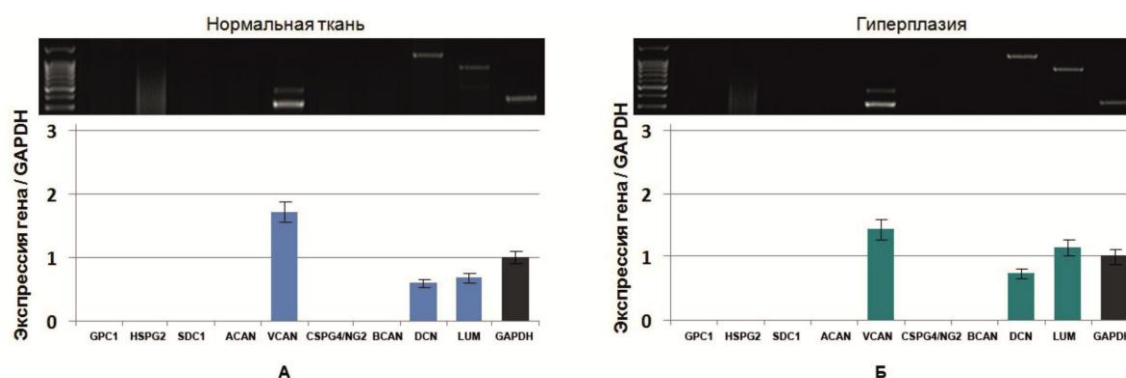


Рисунок 1. Экспрессия коровых белков протеогликанов в нормальной (А) и гиперплазированной (Б) ткани предстательной железы человека. На рисунке представлены результаты трех независимых экспериментов как среднее значение \pm SD.

В опухолях предстательной железы наблюдается снижение экспрессии протеогликанов, характерных для нормальной ткани (декорина в 1,8 раз и люмикана в 2 раза, $p < 0.05$) и увеличение экспрессии не экспрессируемых в нормальной ткани

предстательной железы протеогликанов (глипикана-1, синдекана-1, агрекана и ХСПГ4/NG2) (Рисунок 2).

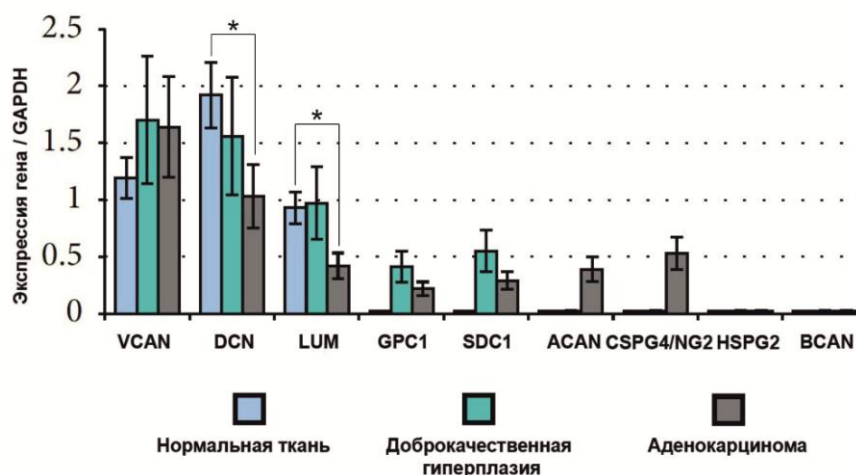


Рисунок 2. Экспрессия коровых белков протеогликанов в нормальной ткани, при гиперплазии и в аденокарциномах предстательной железы человека. На рисунке представлены результаты трех независимых экспериментов как среднее значение \pm SD. * - различия считали статистически достоверными при $p < 0.05$.

Также была исследована экспрессия коровых белков хондроитинсульфат протеогликанов – декорина и люмикана (Рисунок 3). Показано, что коровые белки декорина и люмикана экспрессируются как в нетрансформированной, так и в опухолевой ткани предстательной железы на аналогичном уровне и локализованы главным образом в тканевой строме, а не в эпителиальных клетках предстательной железы.

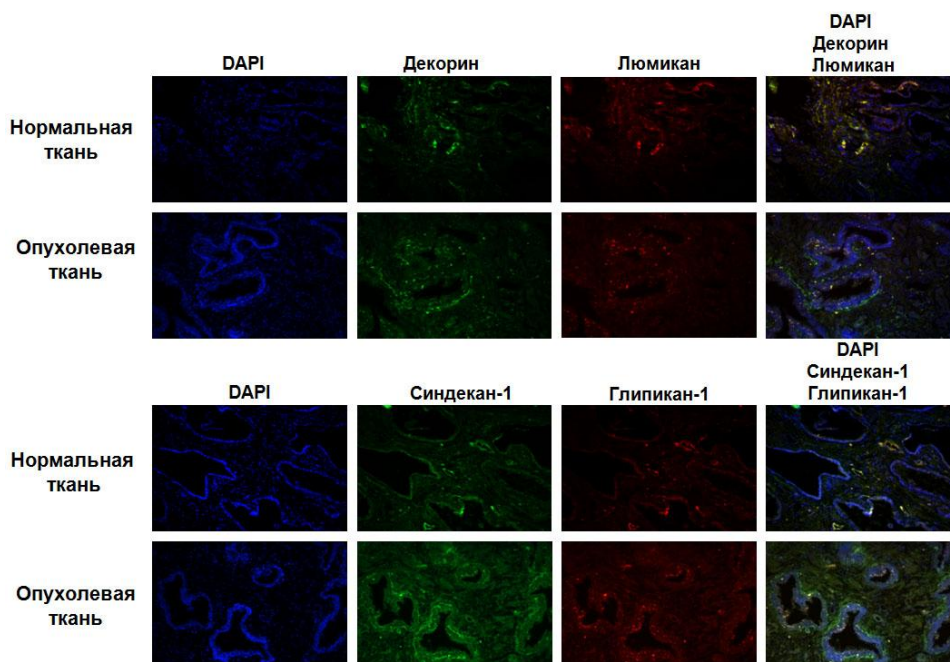


Рисунок 3. Иммуногистохимический анализ коровых белков декорина, люмикана, синдекана-1 и глипикана-1 в нормальной и в опухолевой ткани предстательной железы человека. Ядра клеток визуализированы DAPI. Увеличение $\times 200$.

Таким образом, экспрессия изучаемых протеогликанов в опухолях предстательной железы изменяется, что приводит к появлению нескольких специфических паттернов экспрессии ПГ, характеризующихся стабильной экспрессией версикана, достоверным уменьшением экспрессии декорина и люмикана и увеличением экспрессии коровых белков глипикана-1 и синдекана-1 (Suhovskih *et al.*, 2013).

Экспрессия коровых белков протеогликанов в клеточных линиях предстательной железы человека *in vitro*

Для проверки высказанной гипотезы о возможной природе гетерогенности опухолей предстательной железы в отношении экспрессии коровых белков протеогликанов была сформирована *in vitro* модель, состоящая из клеточных культур фибробластов и четырех культур клеток предстательной железы человека с различными характеристиками:

- FB – культура нормальных фибробластов кожи человека,
- PNT2 – культура нормальных эпителиальных клеток предстательной железы, и клеточные линии аденокарциномы предстательной железы человека:
- LNCaP – гормон-зависимая, неметастазирующая,
- PC3 – гормон-независимая, метастазирующая,
- DU145 – гормон-независимая, метастазирующая.

Экспрессия коровых белков основных протеогликанов внеклеточного матрикса и клеточной поверхности была изучена на уровне мРНК в фибробластах (FB), культуре нормальных эпителиальных клеток предстательной железы человека (PNT2) и различных опухолевых культурах клеток предстательной железы человека (LNCaP, PC3, DU145) – методом ОТ-ПЦР с использованием в качестве контрольного гена GAPDH.

Согласно полученным данным, нормальные клетки различного морфологического происхождения значительно отличаются между собой по набору экспрессируемых коровых белков протеогликанов и общему уровню их экспрессии. Фибробласты, как основные матрикс-продуцирующие клетки стромы, синтезируют широкий набор протеогликанов, основными среди которых являются синдекан-1, ХСПГ4/NG2, декорин, люмикан. Нормальные эпителиальные клетки предстательной железы (PNT2) экспрессируют глипикан-1, синдекан-1 и версикан. Разница в общем уровне экспрессии протеогликанов между фибробластами и нормальными эпителиальными клетками PNT2 составляет 5-6 раз (Рисунок 4).

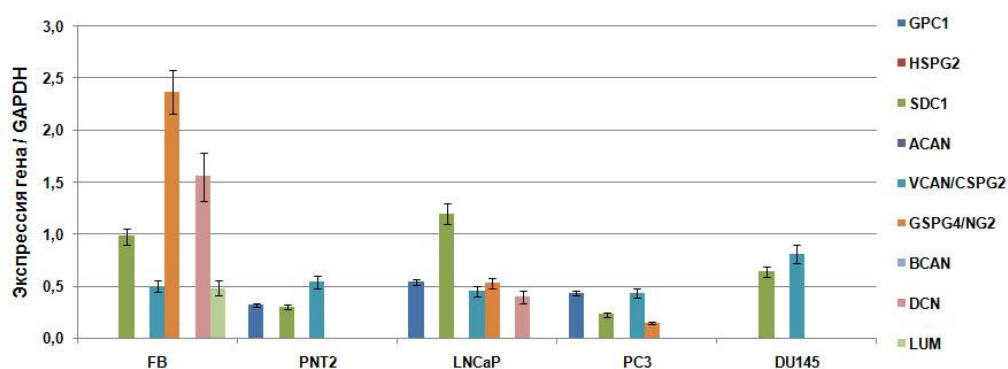


Рисунок 4. Экспрессия генов коровых белков основных протеогликанов в фибробластах (FB), нормальных (FB, PNT2) и опухолевых (LNCaP, PC3, DU145) клеточных линиях предстательной железы человека. На рисунке представлены результаты трех независимых экспериментов как среднее значение \pm SD.

Клеточные культуры рака предстательной железы также отличаются между собой по общей транскрипционной активности генов коровых белков протеогликанов (до 10 раз) и по набору экспрессируемых коровых белков. Во всех клеточных культурах рака предстательной железы экспрессируются два коровых белка – синдекан-1 и версикан. Дополнительно к ним в клетках LNCaP экспрессируются глипикан-1, ХСПГ4/NG2 и декорин; в клетках PC3 – глипикан и ХСПГ4/NG2.

Интересно, что уровень экспрессии синдекана-1 значительно варьирует в клеточных линиях рака предстательной железы с различными функциональными характеристиками (LNCaP - гормон-зависимая, неметастазирующая, PC3 и DU145 - гормон-независимые, метастазирующие). В гормон-независимых клеточных культурах PC3 и DU145 наблюдается достоверное снижение экспрессии коровых белков синдекана-1 (в 4,8 раз в PC3 и в 1,9 раз в DU145), ХСПГ4/NG2 (в 4 раза в PC3 и полностью исчезает в DU145), декорина (в 5 раз в PC3 и полностью снижается в DU145) по сравнению с гормон-зависимой клеточной культурой LNCaP ($p < 0.05$). Полученные данные свидетельствуют о внутриопухолевой гетерогенности клеток по уровню экспрессии коровых белков исследуемых протеогликанов.

Данные иммунофлуоресцентного окрашивания нормальных (PNT2) и опухолевых клеток (LNCaP, PC3, DU145) предстательной железы на коровые белки синдекана-1 и глипикана-1 подтверждают гетерогенность экспрессии исследуемых молекул на белковом уровне в различных клеточных линиях. Показано, что синдекан-1 активно экспрессируется в опухолевых клетках предстательной железы LNCaP, PC3 и слабо в DU145 и нормальных эпителиальных клетках PNT2 (Рисунок 5), а глипикан-1 – активно в LNCaP, PC3, PNT2 и слабо в DU145, что согласуется с данными по их экспрессии на уровне мРНК.

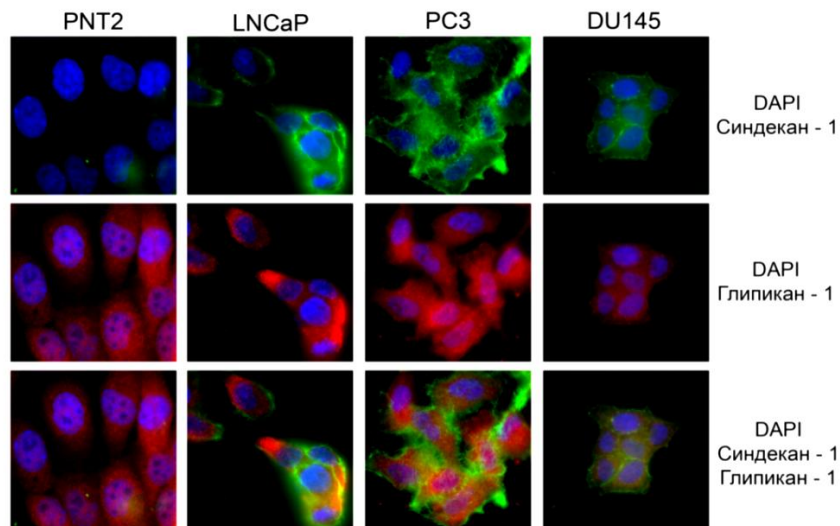


Рисунок 5. Иммунофлуоресцентный анализ коровых белков синдекана-1 и глипикана-1 в культуре нормальных (PNT2) и опухолевых (LNCaP, PC3, DU145) клеточных линий предстательной железы человека. Ядра клеток визуализированы DAPI.

Таким образом, различия в экспрессии протеогликанов наблюдаются также на белковом уровне между клеточными линиями одного морфологического происхождения, что может свидетельствовать о внутриопухолевой гетерогенности клеточного состава в опухоли предстательной железы *in vivo* по этому параметру (Суховских *et al.*, 2016).

Изучение содержания углеводных цепей гликозаминогликанов при раке предстательной железы

В функционировании молекулы протеогликана важную роль играет структура и степень модификации углеводных цепей гликозаминогликанов, ковалентно присоединенных к коровому белку и имеющих высокий отрицательный заряд. Согласно литературным данным, в процессе злокачественной трансформации ткани изменяется состав и структура углеводных цепей гликозаминогликанов в различных опухолях.

Содержание гликозаминогликанов в аденокарциномах предстательной железы человека *in vivo*

Содержание и локализация углеводных цепей гепаран- и хондроитинсульфатов была определена с помощью иммуногистохимического анализа нормальной и опухолевой ткани предстательной железы человека. Показано, что содержание хондроитинсульфатов не отличается в нормальной и опухолевой ткани предстательной железы. Однако содержание гепарансульфатов в опухолях предстательной железы изменяется и осуществляется преимущественно за счет увеличения содержания гепарансульфатов в опухолевой строме. Кроме того наблюдается гетерогенное распределение гепарансульфатов в различных структурах ткани в одном и том же клиническом образце опухоли (Рисунок 6).

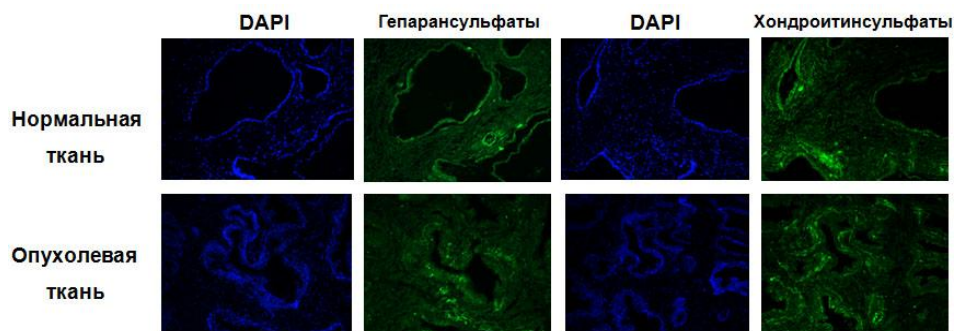


Рисунок 6. Иммуногистохимический анализ содержания гепарансульфатов и хондроитинсульфатов в нормальной и опухолевой ткани предстательной железы человека. Ядра клеток визуализированы DAPI (синий). Увеличение×200.

Изменения в содержании углеводных цепей гликозаминогликанов - хондроитинсульфатов и гепарансульфатов на поверхностях опухолевых клеток играет ключевую роль в злокачественной трансформации и метастазировании опухолей (Basappa *et al.*, 2014). Содержание гликозаминогликанов, принадлежащим к различным классам (гепарансульфаты, хондроитинсульфаты (ХС), дерматансульфаты (ДС), гиалуроновая кислота) ранее было изучено в нормальной ткани предстательной железы и при доброкачественной гиперплазии. Соотношение ХС/ДС было значительно выше в ткани доброкачественной гиперплазии по сравнению с нормальной тканью предстательной железы. Увеличение содержания ХС и снижение содержания ДС в предстательной железе пациентов с ДГПЖ хорошо согласуется с патологическим проявлением повышенной пролиферации клеток в ткани гиперплазии предстательной железы, поскольку, эти молекулы гликозаминогликанов увеличивают и уменьшают пролиферацию клеток, соответственно (Goulas *et al.*, 2000). Наши результаты по содержанию хондроитинсульфатов и его изменению в опухолях предстательной железы не полностью согласуются с литературными данными, что может быть связано с высокой гетерогенностью этих опухолей.

Экспрессия генов, участвующих в биосинтезе гепарансульфатов в аденокарциномах предстательной железы *in vivo*

Поскольку биосинтез гепарансульфатов осуществляется нематрично системой ферментов, причиной гетерогенности в экспрессии гепарансульфатов может служить дисбаланс в транскрипции генов, участвующих в элонгации и модификации углеводной цепи. Для проверки этой гипотезы была изучена экспрессия 9 ключевых ферментов метаболизма гепарансульфатов, участвующих в биосинтезе углеводной цепи (EXT1, EXT2, NDST1, NDST2, GLCE, HS3ST1, SULF1, SULF2, HPSE).

В качестве основного параметра для проведения сравнительного анализа был использован общий уровень транскрипционной активности генов, кодирующих ключевые ферменты биосинтеза гепарансульфатов, полученный суммированием уровней экспрессии индивидуальных ферментов в каждом конкретном клиническом образце. Согласно полученным ОТ-ПЦР анализом данным, общая транскрипционная активность системы биосинтеза гепарансульфатов в образцах доброкачественной

гиперплазии и в опухолях снижена в 2,5-3 раза по сравнению с нормальной тканью (Рисунок 7).

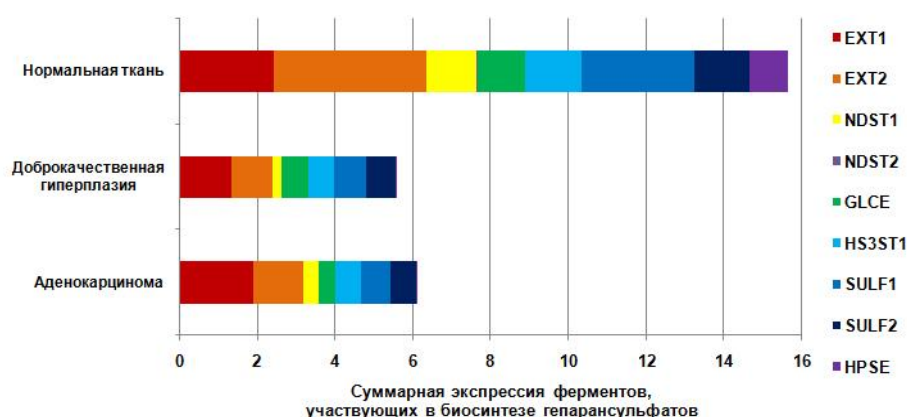


Рисунок 7. Экспрессия генов, участвующих в биосинтезе гепарансульфатов в нормальной ткани, доброкачественной гиперплазии и в аденокарциномах предстательной железы человека. В каждом столбце виден вклад экспрессии индивидуальных ферментов биосинтеза гепарансульфатов в ее общий уровень. Каждое измерение проводилось трижды, приведены средние значения.

Показано, что уровень экспрессии генов, отвечающих за биосинтез углеводных цепей гепарансульфатов, статистически значимо отличается между нормальной тканью и доброкачественной гиперплазией (за исключением *NDST2* и *SULF2*), при этом в 2-5 раз снижается экспрессия генов *EXT1*, *EXT2*, *NDST1*, *GLCE*, *HS3ST1* и *SULF1* и в 27 раз снижается экспрессия *HPSE*. Экспрессия генов, участвующих в биосинтезе гепарансульфатов достоверно отличается между нормальной и опухолевой тканью (за исключением *NDST2* и *HS3ST1*), при этом в 1,5 – 4 раза снижается экспрессия генов *EXT1*, *EXT2*, *NDST1*, *NDST2*, *GLCE*, *HS3ST1* и *SULF1* и в 17 раз снижается экспрессия *HPSE*. Между гиперплазией и опухолями предстательной железы статистически значимых различий в экспрессии генов, вовлеченных в метаболизм гепарансульфатов, не выявлено. Согласно полученным результатам транскрипционная активность системы метаболизма гепарансульфатов изменяется при патологиях предстательной железы, как в доброкачественной гиперплазии, так и в злокачественных опухолях (Suhovskih *et al.*, 2014).

Ранее система биосинтеза в опухолях предстательной железы никем не изучалась. Подобные исследования по одновременному изучению экспрессии различных генов системы биосинтеза гепарансульфатов были проведены для других видов тканей. В нейроэндокринных опухолях изменена экспрессия девяти из 15 генов, участвующих в биосинтезе ГАГ (Yabe *et al.*, 2005). В опухолях молочной железы изменена экспрессия семи из 21 ключевого гена, вовлеченного в систему биосинтеза ГАГ (Fernández-Vega *et al.*, 2013).

Возможно, координированные изменения в транскрипционной активности большинства генов системы биосинтеза гепарансульфатов осуществляются благодаря существованию молекулярного механизма, регулирующего работу этой системы как единого механизма. В литературе несколькими авторами предложены сложные

регуляторные взаимодействия между белками, участвующими в биосинтезе гепарансульфатов (Presto *et al.*, 2008; Lamanna *et al.*, 2008; Fang *et al.*, 2016).

Совместное культивирование эпителиальных клеток предстательной железы и фибробластов *in vitro*

Для исследования взаимного влияния эпителиальных клеток предстательной железы и фибробластов стромы, была сформирована *in vitro* модель совместного культивирования различных типов клеток. Фибробласты и эпителиальные клетки (нормальные PNT2 и опухолевые LNCaP, PC3 или DU145) рассеивали в культуральные флаконы в соотношении 1:1 до конечной плотности 70-80% и культивировали совместно в течение 2-3 суток (Рисунок 8).

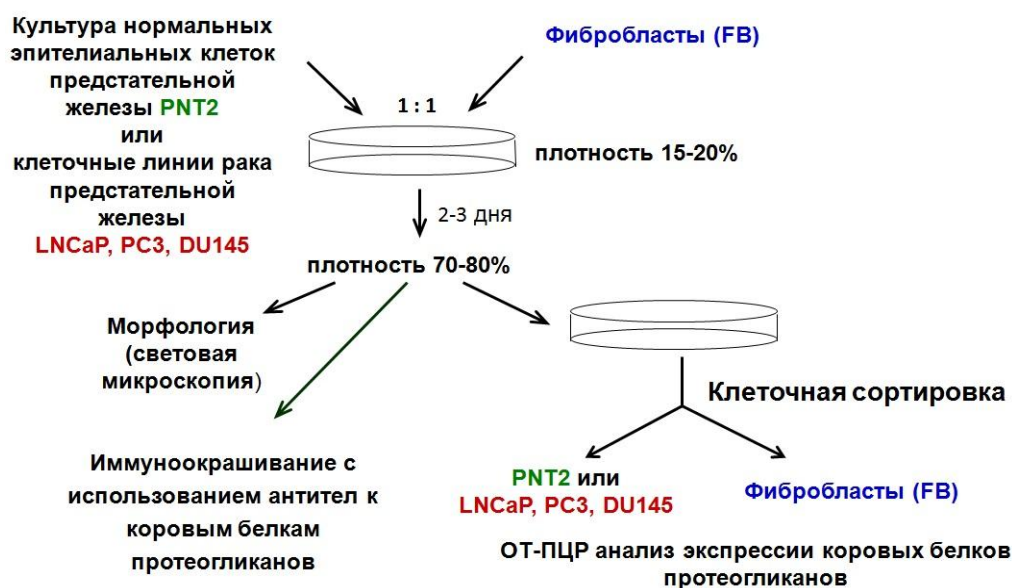


Рисунок 8. Схема проведения эксперимента по совместному культивированию нормальных/опухолевых клеточных культур предстательной железы с фибробластами.

Затем совместную культуру сортировали на исходные клеточные типы с использованием магнитных частиц, к которым присоединены антитела к специфическому белку фибробластов (Milteny Biotec). Влияние клеток в совместной культуре друг на друга оценивали по нескольким параметрам – изменения в пролиферативной активности, изменения в экспрессии протеогликанов, изменения в содержании поверхностных и секретируемых гликозаминогликанов.

Пролиферативная активность эпителиальных клеток предстательной железы и фибробластов

После сортировки совместной культуры, фибробласты и эпителиальные клетки были возвращены в культуру и выращивались в течение нескольких дней. Пролиферативная активность нормальных/опухолевых клеток предстательной железы и фибробластов была определена до и после совместного культивирования с использованием набора CyQuant Cell Proliferation Assay (Life Technologies).

После совместного культивирования с фибробластами скорость пролиферации культуры нормальных клеток предстательной железы PNT2 и двух опухолевых

клеточных культур LNCaP и PC3 достоверно снижается ($p < 0.05$). Статистически значимых отличий в пролиферативной активности культуры наиболее агрессивных клеток рака предстательной железы DU145 после культивирования с фибробластами обнаружено не было (Рисунок 9).

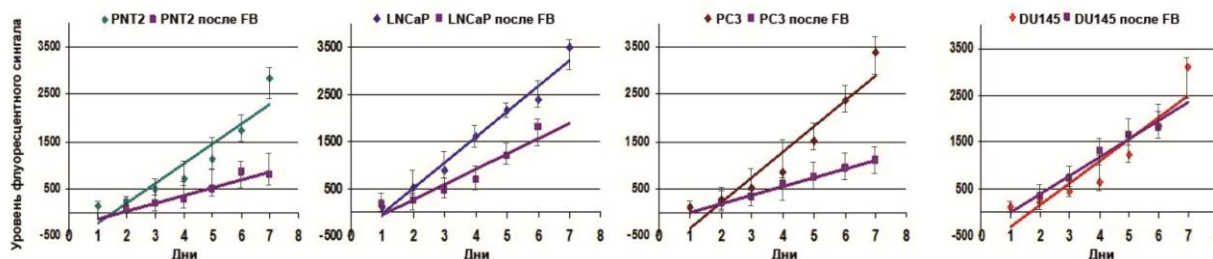


Рисунок 9. Пролиферативная активность клеточных культур предстательной железы до (PNT2, LNCaP, PC3, DU145) и после совместного культивирования с фибробластами (PNT2 после FB, LNCaP после FB, PC3 после FB, DU145 после FB). Данные получены с помощью набора CyQuant NF Cell proliferation assay. На рисунке представлены результаты трех независимых экспериментов как среднее значение.

Было показано, что совместное культивирование фибробластов с нормальными эпителиальными клетками PNT2 и тремя культурами опухолевых клеток предстательной железы (LNCaP, PC3, DU145) приводит к значительному ($p < 0.05$) ингибированию пролиферации фибробластов (Рисунок 10).

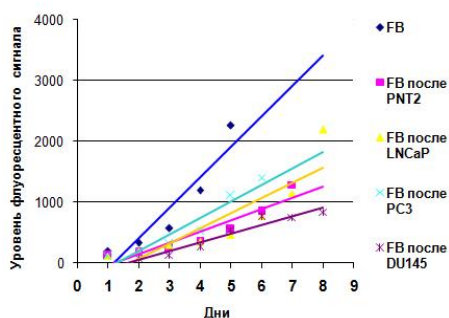


Рисунок 10. Пролиферативная активность фибробластов (FB) до и после совместного культивирования с культурой нормальных клеток предстательной железы (FB после PNT2) и опухолевых клеточных линий предстательной железы человека (FB после LNCaP, FB после PC3, FB после DU145).

Таким образом, показано, что после совместного культивирования фибробласты и эпителиальные клетки предстательной железы оказывают взаимное влияние на пролиферативную активность со-культивируемых клеток.

Экспрессия коровых белков протеогликанов в клеточных линиях предстательной железы и фибробластах

После сортировки совместной культуры фибробластов и эпителиальных клеток предстательной железы методом ОТ-ПЦР была изучена экспрессия коровых белков основных протеогликанов (синдекана-1, глипикана-1, декорина, люмикана, версикана и ХСПГ4/NG2) в фибробластах и эпителиальных клетках предстательной железы.

Статистически достоверные отличия в экспрессии изучаемых коровых белков протеогликанов показаны для клеток PNT2/PNT2 после фибробластов, LNCaP/LNCaP после фибробластов, PC3/PC3 после фибробластов. В экспрессии изучаемых генов в клетках DU145 до и после совместного культивирования с фибробластами значимых отличий не было.

Показано, что уровень экспрессии всех изучаемых генов коровых белков статистически значимо отличается между культурами нормальных клеток предстательной железы PNT2 и клеток PNT2 после совместного культивирования с фибробластами, за исключением синдекана-1 и глипикана-1 (Рисунок 11).

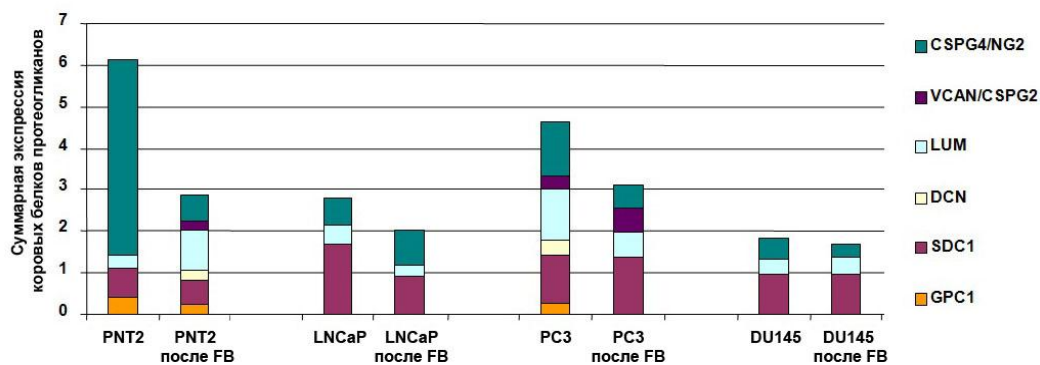


Рисунок 11. Экспрессия коровых белков основных протеогликанов в культуре нормальных (PNT2) и опухолевых клеток (LNCaP, PC3, DU145) предстательной железы человека до и после совместного культивирования с фибробластами (PNT2 после FB, LNCaP после FB, PC3 после FB, DU145 после FB). Каждый столбец отражает суммарную экспрессию коровых белков протеогликанов для каждой клеточной линии.

Было показано, что совместное культивирование фибробластов с нормальными эпителиальными клетками PNT2 приводит к двукратному снижению суммарной экспрессии протеогликанов, снижению экспрессии ХСПГ4/NG2 в 12,5 раз, увеличение экспрессии люмикана в 5 раз, появлению экспрессии декорина и версикана. Изменения в экспрессии коровых белков приводят к приобретению фибробластами иного паттерна экспрессии изучаемых генов, отличного от фибробластов в монокультуре (Рисунок 11).

Гормон-зависимые нематастатические клетки LNCaP реагируют на присутствие фибробластов статистически незначимым изменением экспрессии всех изучаемых протеогликанов, кроме синдекана-1: для него было показано статистически значимое снижение в 1,8 раз уровня экспрессии после инкубации с фибробластами.

В отличие от LNCaP, в опухолевых гормон-независимых клетках предстательной железы PC3 после культивирования с фибробластами показаны достоверные отличия в экспрессии генов всех изучаемых коровых белков, кроме синдекана-1 – исчезновение глипикана-1 и декорина, снижение люмикана в 2,2 раза, снижение ХСПГ4/NG2 в 2,6 раз, увеличение версикана в 2 раза. В отличие от LNCaP и PC3, в клетках гормон-независимой метастатической линии DU145 статистически значимых отличий в экспрессии коровых белков до и после совместного культивирования с фибробластами не показано. При культивировании фибробластов с нормальными эпителиальными клетками предстательной железы PNT2 наблюдается снижение суммарной экспрессии коровых белков протеогликанов в 2,5 раза. Все изучаемые опухолевые клетки

предстательной железы влияют на способность фибробластов экспрессировать коровые белки протеогликанов, но характер влияния отличается (Рисунок 12).

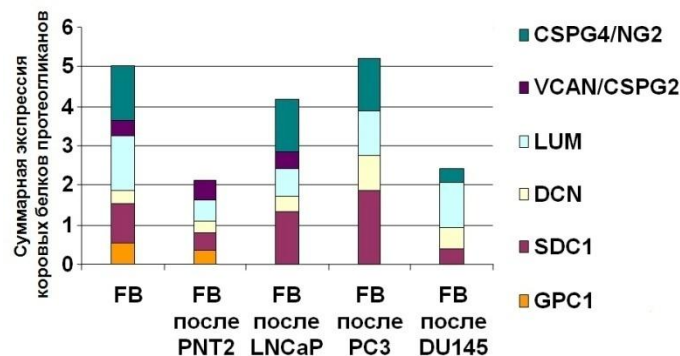


Рисунок 12. Экспрессия коровых белков основных протеогликанов фибробластов (FB) до и после совместного культивирования с культурой нормальных клеток предстательной железы (FB после PNT2) и опухолевых клеточных линий предстательной железы человека (FB после LNCaP, FB после PC3, FB после DU145). Каждый столбец отражает суммарный уровень транскрипционной активности всех изучаемых в работе протеогликанов.

Общим является то, что после совместного культивирования со всеми опухолевыми клетками, в фибробластах наблюдается полное снижение экспрессии корового белка глипикана-1 и достоверное изменение экспрессии синдекана-1 (после LNCaP и PC3 – повышение в 1,2 и 2 раза, соответственно; после DU145 – снижение в 3,3 раза), а также снижается общее разнообразие экспрессируемых протеогликанов. После культивирования с гормон-независимыми клеточными линиями PC3 и DU145 полностью исчезает экспрессия версикана (VCAN/CSPG2) и после DU145 дополнительно снижается экспрессия ХСПГ4/NG2 в 6 раз.

Иммуноокрашивание выращиваемых в одной культуре фибробластов и нормальных эпителиальных клеток предстательной железы PNT2 использованием антител к коровым белкам основных протеогликанов (декорин, люмикан, синдекан-1, глипикан-1) показало, что на белковом уровне происходит реорганизация экспрессии протеогликанов между фибробластами и нормальными эпителиальными клетками предстательной железы. Изменения в экспрессии белковых коров протеогликанов наиболее ярко выражены в совместной культуре нормальных эпителиальных клеток PNT2, в которой увеличивается экспрессия синдекана-1, и снижается экспрессия корового белка декорина (Рисунок 13, 14).

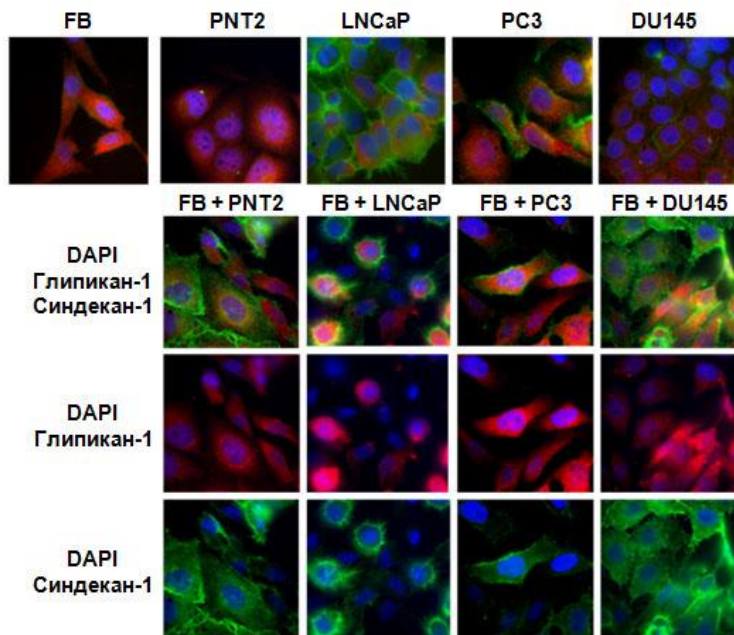


Рисунок 13. Иммунофлуоресцентный анализ коровых белков синдекана-1 и глипикана-1 в культуре нормальных эпителиальных клеток (PNT2) и опухолевых клеточных линий (LNCaP, PC3, DU145) и в совместной культуре с нормальными фибробластами человека. Ядра клеток визуализированы DAPI.

В противоположность к совместно культивированным нормальным эпителиальным клеткам предстательной железы и фибробластов, в совместной культуре опухолевых клеток и фибробластов изменения в экспрессии коровых белков протеогликанов зависят от клеточной линии предстательной железы. Так, в клеточной культуре фибробластов и LNCaP увеличивается экспрессия люмикана, в культуре PC3 дополнительно снижается экспрессии синдекана-1, в DU145 изменения происходят только в экспрессии корового белка синдекана-1.

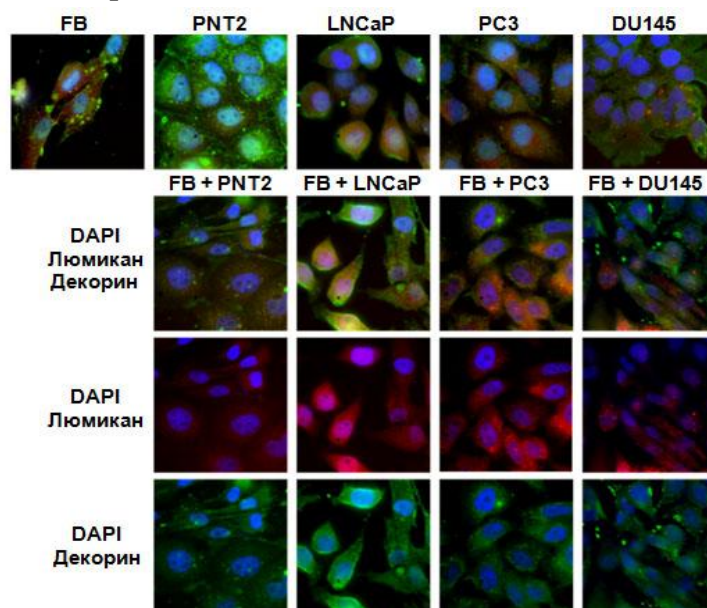


Рисунок 14. Иммунофлуоресцентный анализ коровых белков декорина и люмикана в культуре нормальных эпителиальных клеток (PNT2) и опухолевых клеточных линий (LNCaP, PC3, DU145) и в совместной культуре с нормальными фибробластами человека. Ядра клеток визуализированы DAPI.

Согласно полученным результатам, изменение содержания белковых молекул протеогликанов в фибробластах до и после совместного культивирования с опухолевыми клетками зависят от типа опухолевых клеток, с которыми были культивированы фибробласты. Эти данные согласуются с данными ОТ-ПЦР и подтверждают то, что в зависимости от типа опухолевых клеток, с которыми фибробласты совместно культивировались, в фибробластах наблюдается специфический паттерн экспрессии протеогликанов.

Полученные нами данные позволяют предположить, что протеогликаны вовлечены в процесс трансформации фибробластов в опухоль-ассоциированные фибробласты при контакте с опухолевыми клетками, причем специфический паттерн экспрессии протеогликанов в фибробластах зависит от того типа опухолевых клеток, с которыми они совместно культивировались.

Для подтверждения нашей гипотезы об участии протеогликанов в трансформации нормальных фибробластов в опухоль-ассоциированные, было проведено иммуноокрашивание с использованием антител к α -мышечному актину – одному из маркеров трансформированных фибробластов (Sasaki *et al.* 2017; Kalluri *et al.*, 2017), в фибробластах после совместного культивирования с нормальными (PNT2) и опухолевыми (PC3) клетками предстательной железы (Рисунок 15).

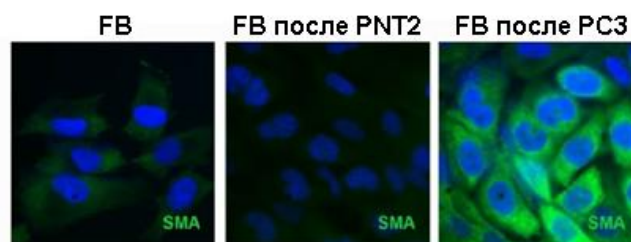


Рисунок 15. Иммунофлуоресцентный анализ α -мышечного актина (SMA) в нормальных фибробластах человека до и после совместного культивирования с культурой нормальных клеток предстательной железы (PNT2) и опухолевой клеточной линией предстательной железы PC3. Ядра клеток визуализированы DAPI.

В экспериментах по иммуноокрашиванию показано, что в фибробластах после совместного культивирования с культурой опухолевых клеток PC3 экспрессия α -мышечного актина заметно увеличивается.

Таким образом, в фибробластах после выращивания в совместной культуре с опухолевыми клетками предстательной железы происходят изменения в экспрессии α -мышечного актина и коровых белков протеогликанов, что служит подтверждением трансформации нормальных фибробластов в опухоль-ассоциированные.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Протеогликаны, как компоненты микроокружения, участвуют во многих путях сигнальной трансдукции. Это в значительной степени связано с углеводными цепями гликозаминогликанов, которые активно взаимодействуют с белками внеклеточного матрикса, макромолекулами адгезии клеток и факторами роста. В данной работе была изучена экспрессия основных протеогликанов и ферментов биосинтеза углеводных цепей гепарансульфатов. Показано, что экспрессия коровых белков протеогликанов в

опухолях предстательной железы изменяется на уровне мРНК и на белковом уровне по сравнению с нормальной тканью предстательной железы. При этом опухоли предстательной железы, как и клеточные линии рака предстательной железы, имеют индивидуальный паттерн экспрессии исследуемых протеогликанов. Содержание углеводных цепей хондроитинсульфатов в нормальной и опухолевой ткани предстательной железы не отличается, однако содержание гепарансульфатов в опухолях изменяется за счет увеличения содержания гепарансульфатов в строме опухолей предстательной железы. Уровень экспрессии генов, отвечающих за биосинтез углеводных цепей гепарансульфатов, статистически значимо отличается между нормальной тканью и аденокарциномой *in vivo*, между нормальными и опухолевыми клетками предстательной железы, а также между различными опухолевыми клеточными линиями *in vitro*. Совместное культивирование фибробластов и опухолевых эпителиальных клеток предстательной железы приводит к достоверному снижению пролиферативной активности фибробластов, изменению общего уровня и паттерна экспрессии, увеличению экспрессии α -мышечного актина. Такие изменения в экспрессии изучаемых генов в фибробластах после совместного культивирования с опухолевыми клетками позволяют предположить их трансформацию в опухоль-ассоциированные фибробласты (CAFs), участвующие в трансформации внеклеточного матрикса в опухолевое микроокружение, поддерживающее рост и развитие опухоли.

ВЫВОДЫ

1. Экспрессия коровых белков протеогликанов в аденокарциномах предстательной железы изменяется как на уровне мРНК, так и на белковом уровне: достоверно снижается экспрессия декорина (в 1,8 раз) и люмикана (в 2 раза) и активируется экспрессия глипикана-1, синдекана-1, ХСПГ4/NG2 и агрекана ($p < 0.05$). Клеточные линии рака предстательной железы LNCaP, PC3 и DU145 имеют индивидуальный паттерн экспрессии исследуемых протеогликанов.
2. Содержание хондроитинсульфатов в нормальной и опухолевой ткани предстательной железы не отличается, содержание гепарансульфатов в опухолях предстательной железы изменяется за счет увеличения содержания гепарансульфатов в строме опухолей предстательной железы.
3. Уровень экспрессии генов, отвечающих за биосинтез углеводных цепей гепарансульфатов, статистически значимо ($p < 0.05$) отличается между нормальной тканью и доброкачественной гиперплазией предстательной железы за исключением генов *NDST2* и *SULF2* (в 2-5 раз снижается экспрессия генов *EXT1*, *EXT2*, *NDST1*, *GLCE*, *HS3ST1* и *SULF1*, и в 27 раз снижается экспрессия *HPSE*), между нормальной тканью и аденокарциномой за исключением генов *NDST2* и *HS3ST1* (в 1,5-4 раза снижается экспрессия генов *EXT1*, *EXT2*, *NDST1*, *NDST2*, *GLCE*, *HS3ST1* и *SULF1*, и в 17 раз снижается экспрессия *HPSE*). Совместное культивирование с фибробластами не приводит к статистически значимым изменениям экспрессии генов, участвующих в биосинтезе гепарансульфатов, в клеточной линии PC3 рака предстательной железы. В клеточной линии рака предстательной железы LNCaP *in vitro* активируется

экспрессия генов *NDST1* и *NDST2* после совместного культивирования с фибробластами.

4. Совместное культивирование опухолевых клеток предстательной железы с фибробластами *in vitro* приводит к снижению пролиферативной активности фибробластов и изменению паттерна экспрессии протеогликанов - экспрессия корового белка глипикана-1 в фибробластах полностью снижается после совместного культивирования с опухолевыми клетками простаты LNCaP, PC3 и DU145, а экспрессия синдекана-1 повышается после совместного культивирования с клетками LNCaP в 1,2 раза и PC3 в 2 раза, и снижается – после DU145 в 3,3 раза. После культивирования с клетками PC3 и DU145 полностью исчезает экспрессия версикана, и после DU145 дополнительно снижается экспрессия ХСПГ4/NG2 в 6 раз. После совместного культивирования с опухолевыми клетками PC3 в фибробластах также показано увеличение экспрессии α -мышечного актина, что свидетельствует о возможном вкладе протеогликанов в трансформацию нормальных фибробластов в опухоль-ассоциированные фибробласты.
5. Пролиферативная активность культур нормальных клеток (PNT2) и двух опухолевых клеточных культур LNCaP и PC3 предстательной железы достоверно снижается, культуры опухолевых клеток DU145 не изменяется ($p < 0.05$) после совместного культивирования с фибробластами в системе *in vitro*. Клетки LNCaP реагируют на присутствие фибробластов незначительным изменением экспрессии всех изучаемых протеогликанов, кроме синдекана-1; в клетках PC3 показаны достоверные отличия в экспрессии генов всех изучаемых коровых белков, кроме синдекана-1; в клетках линии DU145 статистически значимых отличий в экспрессии коровых белков до и после совместного культивирования с фибробластами не показано.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Suhovskih A.V.**, Kashuba V.I., Klein G., Grigorieva E.V. Prostate cancer cells specifically reorganize epithelial cell-fibroblast communication through proteoglycan and junction pathways // Cell Adhesion and Migration. – 2017. – V. 11(1). – P. 39-53.
2. **Suhovskih A.V.**, Grigorieva E.V. Regulation of heparansulfate biosynthesis by transcriptional factors in various human tissues // International Journal of Molecular Medicine. – 2017. – V.38 (Suppl.1). – P. 255.
3. **Суховерхих А.В.**, Григорьева Э.В. Тканеспецифичность экспрессии протеогликанов в различных типах опухолей человека // Успехи молекулярной онкологии. – 2016. – V. 3(1). – P. 53-60.
4. **Суховерхих А.В.**, Григорьева Э.В. Молекулы межклеточных контактов как возможные мишени для диагностики и терапии опухолей предстательной железы человека // Злокачественные опухоли. – 2016. – №4, спецвыпуск 1. – С. 329.
5. **Suhovskih A.V.**, Grigorieva E.V., Kashuba V.I. An important role of proteoglycans in the interactions of normal and cancer prostate cells with fibroblasts // European Journal of Cancer. – 2015. – Suppl. 13 (2015). – P. 58-59.

6. **Suhovskih A.V.**, Tsudulko A.Y., Grigorieva E.V. Changes in cancer cell glycosylation are a potential source for intratumour heterogeneity // International Journal of Molecular Medicine. – 2015. – V.36 (Suppl.1). – P. 404.
7. **Suhovskih A.V.**, Domanitskaya N.V., Tsudulko A.Y., Prudnikova T.Y., Kashuba V.I., Grigorieva E.V. Tissue-specificity of heparan sulfate biosynthetic machinery in cancer // Cell Adhesion and Migration. – 2015. – V. 9(6). – P. 452-459.
8. **Suhovskih A.V.**, Tsidulko A.Y., Kutsenko O.S., Kovner A.V., Aidagulova S.V., Ernberg I. and Grigorieva E.V. Transcriptional activity of heparan sulfate biosynthetic machinery is specifically impaired in benign prostate hyperplasia and prostate cancer // Frontiers in Oncology. – 2014. – V. 4. – P. 79.
9. **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 Oncology. 2013. – 680136.
10. **Suhovskih A.V.**, Mostovich L.A., Grigorieva E.V. Proteoglycans as potential molecular markers in human prostate cancer // FEBS Journal. – 2013. – V. 280 (Suppl. 1). – P.533.
11. **Суховских А.В.** Тканеспецифичность экспрессии протеогликанов в опухолевых клетках человека // Сибирский онкологический журнал. – 2013. – Приложение 1. – С. 87-88.