

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи

Черепанов

Сергей Александрович

**ВЛИЯНИЕ КОМПОНЕНТОВ СИГНАЛЬНОГО ПУТИ HEDGEHOG НА
ПРОЛИФЕРАЦИЮ И ХИМИОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ
НИЗКОДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫХ ГЛИОМ**

Специальность: 03.01.04 – Биохимия

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:
академик РАН, профессор,
доктор медицинских наук
Чехонин Владимир Павлович

Москва 2019

Оглавление

Оглавление	2
Введение	4
Глава 1. Обзор литературы	10
1.1 Опухоли головного мозга.....	10
1.2 Сигнальный путь Hedgehog	13
1.2.1 Классический сигнальный путь Hedgehog.....	14
1.2.2 Неканонический сигнальный путь Hedgehog	18
1.3 Заболевания, связанные с нарушениями сигнального пути Hedgehog.....	19
1.4 Особенности функционирования сигнального пути Hedgehog при глиомах	20
1.5 Ингибирование и активация сигнального пути Hedgehog	23
1.6 Влияние сигнального пути Hedgehog на ключевые процессы онкогенеза	25
1.6.1 Влияние сигнального пути Hedgehog на пролиферацию клеток.....	26
1.6.2 Влияние сигнального пути Hedgehog на эпителиально-мезенхимальный переход, миграционную и инвазивную активность, метастазирование и стволовые опухолевые клетки.....	28
1.6.3 Влияние сигнального пути Hedgehog на процессы ангиогенеза	30
1.6.4 Влияние сигнального пути Hedgehog на процессы сопротивления клеточной гибели.....	32
1.6.5 Влияние сигнального пути Hedgehog на другие процессы канцерогенеза.....	38
Глава 2. Материалы и методы	43
2.1 Реактивы, расходные материалы, клеточные линии и их культивирование.....	43
2.2 Препараты ингибирования и активации сигнального пути Hedgehog.....	44
2.3 Химиотерапевтические препараты.....	44
2.4 Выделение суммарной РНК и синтез кДНК.....	45
2.5 Проведение полимеразной цепной реакции в реальном времени.....	47
2.6 Анализ пролиферации и жизнеспособности клеток с использованием технологии измерения электрического импеданса.....	49

2.7 Оценка жизнеспособности клеток при помощи проточной цитофлуориметрии	51
2.8 Определение процента клеток боковой популяции.....	53
2.9 Работа с литературой	55
2.10 Статистическая обработка полученных результатов	55
Глава 3. Результаты	57
3.1 Оценка уровня экспрессии <i>GLII</i> и <i>tGLII</i>	57
3.2 Изучение влияния сигнального пути Hedgehog на пролиферацию клеток.....	58
3.3 Изучение цитотоксического действия циклопамина.....	64
3.4 Изучение влияния сигнального пути Hedgehog на химиорезистентность клеток.....	67
3.5 Изучение влияния сигнального пути Hedgehog на формирование фенотипа клеток боковой популяции.....	73
Глава 4. Обсуждение	76
Заключение	93
Выводы	95
Список сокращений и условных обозначений.....	96
Список литературы	102

Введение

Актуальность

Мультиформная глиобластома – самая злокачественная из первичных нейроэпителиальных опухолей головного мозга. Средняя продолжительность жизни после постановки диагноза не превышает 12 – 15 месяцев. Рецидивы заболевания возникают практически в 100 % случаев после лечения. Из-за высокой инвазивности опухоли, локализации в жизненно важных областях головного мозга и гетерогенности ее клеточной популяции существующие методы терапии, такие как резекция опухоли и радиотерапия малоэффективны. Терапия темозоломидом и другими химиотерапевтическими препаратами также малоэффективна, так как мигрирующие клетки перестраивают свой клеточный цикл и становятся нечувствительными к данным препаратам, оказывающим цитотоксический эффект на активно пролиферирующие клетки [1-3].

Для создания более результативных и специфичных методов терапии требуется ясное понимание частных механизмов онкогенеза, поиск конкретных мишеней среди белков сигнальных путей, принимающих участие в возникновении и развитии опухоли. Сигнальные пути, задействованные в эмбриональном развитии, регуляции пролиферации и миграции, почти все так или иначе задействованы в онкогенезе и глиомагенезе в частности. Большое количество исследований посвящено проонкогенным свойствам таких путей, как: PI3K-AKT, Ras, TGF- β -Smad, Wnt, Notch и другим сигнальным путям [4-6]. Все больше появляется исследований, акцентирующих внимание на возможном вовлечении в онкогенез вообще и в глиомагенез в частности сигнального пути Hedgehog (HH) [7-9].

Интерес исследователей к сигнальному пути HH обусловлен, прежде всего, тем, что итоговые компоненты сигнального пути, к которым относят семейство транскрипционных факторов GLI, наиболее важным из которых является GLI1, влияют на множество клеточных процессов. К этим процессам относят пролиферативную, миграционную и инвазивную активность, ангиогенез, нарушение клеточного метаболизма, антигенная мимикрия и другие. Дисбаланс в работе этих процессов приводит к неконтрольному размножению и аномальному функционированию клеток, что вызывает развитие онкологического заболевания. Известно, что сигнальный путь HH может активно функционировать в популяциях стволовых опухолевых клеток, а белки сигнального пути HH взаимодействуют с белками других сигнальных путей [10-13].

До сих пор окончательно не ясна роль некоторых основных компонентов сигнального пути НН. В процессе исследования обнаруживают новые изоформы компонентов НН пути, которые присутствуют не во всех опухолевых клетках и не при всех опухолевых заболеваниях [13-15]. НН сигналинг по-разному влияет на клеточные процессы при разных онкологических заболеваниях. Кроме того, сигнальный путь НН не одинаково функционирует при одних и тех же злокачественных заболеваниях. Исследователи допускают существование НН сигналинг-зависимых и независимых глиобластом, отличающихся активностью сигнального пути [16, 17]. Все эти факторы указывают на многообразие уровней функционирования сигнального пути и сложность его изучения.

Неоспоримо, что модулирование активности НН сигнального пути при помощи специфических ингибиторов, поиском которых занимаются различные фармакологические компании, будет способствовать созданию новых средств терапии как глиом, так и других злокачественных новообразований. Однако применение ингибиторов НН сигнального пути в подгруппе НН-независимых опухолей, в том числе и глиом может дискредитировать это перспективное направление разработки новых противоопухолевых препаратов. Тема оценки активности сигнального пути НН не до конца проработана. Поэтому необходима разработка критериев, по которым можно было бы оценить активность НН пути в клеточных линиях и первичных образцах опухолей, полученных после оперативного лечения. А изучение влияния сигнального пути на те или иные клеточные процессы, что также малоизученно, в первую очередь на пролиферативную активность и химиорезистентность, позволит оптимально подбирать соответствующую терапию. Развитие данного направления будет способствовать созданию персонифицированных подходов в терапии как глиом, так и других онкологических заболеваний.

Цель работы:

Изучение влияния сигнального пути Hedgehog на пролиферацию и химиорезистентность низкодифференцированных глиом на модели клеточных линий мультиформной глиобластомы человека U-251 MG и U-87 MG.

Задачи:

1. Оценить экспрессию генов транскрипционных факторов *GLII* и *tGLII* в клетках глиом человека линий U-251 MG, U-87 MG, клетках культуры астроцитов человека, в первичных

послеоперационных образцах глиом и образцах здоровой ткани мозга. Оценить возможности ПЦР в реальном времени для потенциального анализа влияния транскрипционных факторов GLI1 и tGLI1 на процессы пролиферации и химиорезистентности.

2. Оценить влияние Shh и циклопамина на пролиферацию клеток глиом человека линий U-251 MG, U-87 MG и клеток культуры астроцитов человека.
3. Оценить цитотоксическое действие циклопамина на клетки глиом человека линий U-251 MG, U-87 MG и на клетки культуры астроцитов человека.
4. Качественно оценить активность сигнального пути Hedgehog в клетках глиом человека линий U-251 MG, U-87 MG и в клетках культуры астроцитов человека.
5. Оценить влияние Shh и циклопамина на химиорезистентность клеток к цисплатину, темозоломиду и доксорубину.
6. Оценить влияние сигнального пути Hedgehog на формирование фенотипа клеток боковой популяции.

Научная новизна

Впервые для оценки влияния сигнального пути HH на пролиферацию клеток глиобластом человека линий U-87 MG и U-251 MG был использован метод измерения электрического импеданса. Предложенное нами сочетание применения методов измерения электрического импеданса и анализа процента погибших и апоптотических клеток с помощью проточной цитофлуориметрии позволило дифференцировать HH сигналинг-опосредованное цитотоксическое действие ингибитора сигнального пути циклопамина и его действие на пролиферацию клеток низкодифференцированных глиом. Полученные данные были применены для качественной оценки активности сигнального пути. Впервые при помощи методики измерения электрического импеданса показано, что ингибирование и стимулирование сигнального пути HH влияет на чувствительность клеток линии U-251 MG к исследуемым химиотерапевтическим препаратам. Было показано, что сигнальный путь HH влияет на мультилекарственную резистентность клеток опухолевых линий U-251 MG и U-87 MG, принимая участие в формировании фенотипа клеток боковой популяции.

Теоретическая и практическая значимость

Было показано, что сигнальный путь HH влияет на пролиферацию и химиорезистентность клеток низкодифференцированных глиом. Таким образом, этот сигнальный путь может

рассматриваться в качестве мишени при лечении низкодифференцированных глиом, но только в подгруппе Hedgehog сигналинг-зависимых глиом. Разработанный подход качественной оценки активности сигнального пути является предпосылкой для разработки количественных критериев оценки активности сигнального пути НН как в стандартных клеточных линиях, так и в первичных культурах опухолевых клеток, полученных после оперативного вмешательства. Метод измерения электрического импеданса может быть использован для оценки влияния других ингибиторов сигнального пути и оценки влияния НН сигнального пути на чувствительность клеток к различным химиотерапевтическим препаратам. Это будет способствовать подбору комбинаций ингибиторов НН сигнального пути и наиболее эффективных цитотоксических препаратов, что, в свою очередь, будет способствовать развитию персонализированных подходов в терапии низкодифференцированных глиом.

Положения, выносимые на защиту:

1. Экспрессия *GLII* в клетках линий глиом превышает экспрессию в клетках культуры астроцитов человека. Оценивать эффекты воздействия транскрипционных факторов *GLI1* и *tGLI1* на процессы пролиферации и химиорезистентности только при помощи ПЦР в реальном времени невозможно.
2. Компоненты сигнального пути Hedgehog способны оказывать влияние на клеточную пролиферацию низкодифференцированных глиом.
3. Предложенное сочетание методов измерения электрического импеданса и проточной цитофлуориметрии позволяет оценить влияние циклопамина на пролиферацию и НН сигналинг-опосредованное цитотоксическое действие в отдельности.
4. Предложенный подход качественной оценки активности сигнального пути Hedgehog может применяться дополнительно к описанным в литературе методам оценки его активности.
5. Компоненты сигнального пути Hedgehog способны оказывать влияние на мультилекарственную резистентность низкодифференцированных глиом, в том числе и на формирование фенотипа клеток боковой популяции.

Личный вклад автора

Автором самостоятельно были проведены: анализ научной литературы, все описанные ниже исследования, а также статистический анализ полученных результатов.

Методология и методы исследования

В работе применяли современные молекулярно-биологические методы (выделение суммарной РНК, синтез кДНК и проведение полимеразной цепной реакции в реальном времени), методы проточной цитофлуориметрии на клеточном сортере Beckman MoFlo XDP и технологию измерения электрического импеданса для анализа пролиферации и жизнеспособности клеток на приборе xCELLigence.

Степень достоверности

Достоверность полученных данных основана на выполнении работы в соответствии с принятыми стандартами проводимых исследований, а также в соответствии с рекомендациями производителей оборудования, реактивов и расходных материалов. Работа выполнена на достаточном экспериментальном материале. Статистическая обработка полученных данных осуществлялась с помощью пакета прикладных программ Statistica 7.0 и Microsoft Excel 2010.

Апробация, внедрение, публикации

Материалы диссертации были представлены на IX – X Международных (XVIII – XIX Всероссийских) Пироговских научных медицинских конференциях студентов и молодых ученых (Москва, 2014 – 2015), VIII Московском международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2015), VII Международной научной конференции Science4Health (Москва, 2016), Международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2019).

Результаты диссертационной работы были внедрены в научно-исследовательскую деятельность лаборатории нейробиологии ФГБУ «НМИЦПН им. В.П. Сербского» Минздрава России и лаборатории клеточных технологий ФГБУ «ФНКЦ ФМБА России».

По материалам работы опубликовано 10 печатных работ, в том числе 6 статей в ведущих российских рецензируемых журналах и 4 тезиса докладов.

Апробация диссертации была проведена на совместном заседании кафедры и отдела медицинских нанобиотехнологий МБФ ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России и отдела фундаментальной и прикладной нейробиологии ФГБУ «НМИЦПН им. В.П. Сербского» Минздрава России.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 123 машинописных страницах. Состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов, обсуждения, заключения, выводов, списка сокращений и условных обозначений и списка литературы. Диссертация иллюстрирована 23 рисунками и 1 таблицей. Список литературы включает 271 источник, в том числе 5 отечественных и 266 зарубежных.

Глава 1. Обзор литературы

1.1 Опухоли головного мозга

В 2007 году ВОЗ выпустила 4-ое издание классификации опухолей головного мозга, основанное на гистологических особенностях опухолей. Было выделено несколько групп: опухоли нейроэпителиального происхождения, опухоли черепных и спинномозговых нервов, опухоли мозговых оболочек, лимфомы и гематологические опухоли, дизэмбриогенетические опухоли, опухоли в области турецкого седла и метастатические опухоли [18].

К опухолям нейроэпителиального происхождения относят такие группы заболеваний как: астроцитарные, олигоастроцитарные, олигодендроглиальные, эпендимальные опухоли, опухоли хориоидного сплетения, нейрональные и смешанные нейронально-глиальные опухоли, опухоли шишковидной железы, эмбриональные опухоли и другие нейроэпителиальные опухоли [18].

Непосредственно под глиомами понимают астроцитарные, олигоастроцитарные, олигодендроглиальные, эпендимальные опухоли, некоторые смешанные нейронально-глиальные опухоли и астробластома, ангиоцентрическую глиому и хордоидную глиому третьего желудочка, относящиеся к другим нейроэпителиальным опухолям [18, 19].

В свою очередь, среди астроцитарных нейроэпителиальных опухолей выделяют следующие опухоли: пилоцитарная астроцитома, пиломиксоидная астроцитома, субэпендимальная гигантоклеточная астроцитома, плеоморфная ксантоастроцитома, диффузная астроцитома, анапластическая астроцитома, глиобластома (гигантоклеточная глиобластома и глиосаркома) и глиоматоз головного мозга [18].

Среди олигоастроцитарных опухолей выделяют олигоастроцитому и анапластическую олигоастроцитому. Среди олигодендроглиальных опухолей выделяют олигодендроглиому и анапластическую олигодендроглиому. К эпендимальным опухолям относят эпендимому, субэпендимому, миксопапиллярную эпендимому и анапластическую эпендимому [18].

Опухоли головного мозга классифицируются по четырем степеням злокачественности. Степень злокачественности является ключевым фактором при выборе стратегии лечения и при определении прогноза заболевания [18, 20].

К 1-ой степени относят как правило доброкачественные новообразования с низкой пролиферативной активностью. Достаточной стратегией лечения является хирургическая

резекция. К данным новообразованиям относят субэпендимальную гигантоклеточную астроцитому, пилоцитарную астроцитому, субэпендимому, миксопапиллярную эпендимому, ангиоцентрическую глиому и ганглиоглиому, табл. 1 [18].

Ко 2-ой степени злокачественности относят заболевания с низкой пролиферативной активностью, для которых характерна клеточная атипия. Это такие опухоли, как диффузная астроцитома, пилотомиксоидная астроцитома, плеоморфная ксантоастроцитома, олигодендроглиома, олигоастроцитома, эпендимомы и хордоидная глиома третьего желудочка. Заболевания второй степени злокачественности часто рецидивируют и способны переходить к следующей степени злокачественности. Так диффузная астроцитома может трансформироваться в анапластическую астроцитому и глиобластому. Трансформации могут наблюдаться при олигодендроглиоме и олигоастроцитоме, табл. 1 [18].

Для опухолей третьей степени злокачественности характерны клеточная анаплазия и высокая пролиферативная активность. К данным опухолям относят анапластическую астроцитому, анапластическую олигодендроглиому, анапластическую олигоастроцитому, анапластическую эпендимому и анапластическую ганглиоглиому, табл. 1 [18].

К 4-ой степени злокачественности относят наиболее агрессивные опухоли, для которых характерно обязательное наличие некроза и признаки предыдущих степеней злокачественности. Также может наблюдаться микрососудистая пролиферация и микропролиферация эндотелия. К таким опухолям относят гигантоклеточную глиобластому и глиосаркому, табл. 1 [18]. К 4-ой степени злокачественности также относят и медуллобластому – эмбриональную опухоль, которая чаще встречается в детском возрасте. Чаще всего медуллобластома возникает в задней черепной ямке на уровне четвертого желудочка. [4, 18].

Биологическое поведение астробластомы варьирует, что не позволяет отнести данный тип глиом к конкретной степени злокачественности [18, 19].

Таблица 1. Классификация глиом по степеням злокачественности [18].

Опухоль	Степень злокачественности			
	I	II	III	IV
Астроцитарные опухоли				
• Субэпендимальная гигантоклеточная астроцитома	*			
• Пилоцитарная астроцитома	*			
• Диффузная астроцитома		*		

• Пиломиксоидная астроцитома		*		
• Плеоморфная ксантоастроцитома		*		
• Анапластическая астроцитома			*	
• Гигантоклеточная глиобластома				*
• Глиосаркома				*
Олигодендроглиальные опухоли				
• Олигодендроглиома		*		
• Анапластическая олигодендроглиома			*	
Олигоастроцитарные опухоли				
• Олигоастроцитома		*		
• Анапластическая олигоастроцитома			*	
Эпендимальные опухоли				
• Миксопапиллярная эпендимома	*			
• Субэпендимома	*			
• Эпендимома		*		
• Анапластическая эпендимома			*	
Другие нейроэпителиальные опухоли				
• Ангиоцентрическая глиома	*			
• Хордоидная глиома третьего желудочка		*		
Смешанные нейронально-глиальные опухоли				
• Ганглиоглиома	*			
• Анапластическая ганглиоглиома			*	

В 2016 году ВОЗ выпустила пересмотренное 4-ое издание классификации опухолей головного мозга. Отныне классификация опухолей головного мозга ориентируется не только на гистологические, но и на молекулярно-генетические особенности опухолей. Было показано, что прогноз заболевания в большей степени зависит от молекулярного профиля, чем от степени злокачественности опухоли. Соблюдение данного подхода способно улучшить диагностику и повысить эффективность лечения [19].

Наибольшие изменения затронули диффузные глиомы, медуллобластомы и другие эмбриональные опухоли. Свой вклад в классификацию внесли несколько генетических

нарушений. К ним относится коделеция 1p19q, встречающаяся при олигодендроглиомах и анапластических олигодендроглиомах. Мутации в генах *IDH1* и *IDH2* вносят вклад в классификацию астроцитарных и олигодендроглиальных опухолей. Вовлечение активных HH и Wnt сигналингов, а также мутации в *TP53* имеют прогностическое значение при медуллобластомах [19, 21].

Среди злокачественных (3-ья и 4-ая степень злокачественности) глиом от 60% до 70% приходится на долю глиобластом, от 10% до 15% - на долю анапластических астроцитом, около 10% - анапластических олигодендроглиом и олигоастроцитом. Другие злокачественные глиомы встречаются реже. Часто в литературе встречается такое название, как мультиформная глиобластома. Данное название отражает высокую гетерогенность на цитопатологическом, транскрипционном и геномном уровнях как в пределах одного случая заболевания, так и между разными больными. Встречается как первичная глиобластома, так и вторичная, которая является результатом прогрессирования глиом 2-ой и 3-ей степени злокачественности. Несмотря на лечение, медиана выживаемости для пациентов с глиобластомой составляет 12-15 месяцев, а для пациентов с анапластическими глиомами от 2 до 5 лет. Наиболее популярной стратегией лечения злокачественных глиом является резекция опухоли с последующей радиотерапией и химиотерапией темозоломидом. В большинстве случаев после проведенного лечения возникает рецидив [1-3, 18-20, 22].

1.2 Сигнальный путь Hedgehog

В последнее время появляется все больше работ, свидетельствующих о причастности сигнального пути Hedgehog к процессам онкогенеза вообще и глиомогенеза в частности [4, 7, 23]. Впервые ген полипептида Hedgehog был обнаружен у *D.melanogaster* и было показано, что данный ген регулирует процессы эмбриогенеза и морфогенеза. От данного полипептида и пошло название сигнального пути [24, 25]. Позже данный ген был обнаружен у позвоночных. У млекопитающих обнаружено три гена гомолога *Desert hedgehog (Dhh)*, *Indian hedgehog (Ihh)* и *Sonic hedgehog (Shh)*. Ген *Dhh* ближе всего к гену *Hedgehog* плодовой мушки *D.melanogaster*. Все гомологи принимают участие в развитии организма млекопитающих, но наиболее изученными в настоящее время является ген и полипептид *Sonic hedgehog*, давший название сигнальному пути HH [26]. Сигнальный путь HH принимает участие в процессах эмбриогенеза и развитии головного мозга [27]. В экспериментах с нокаутом генов пути HH было показано

нарушение развития нервной, опорно-двигательной, пищеварительной и дыхательной систем [28-30].

Сигнальный путь НН запускается, когда лиганд Shh взаимодействует с трансмембранным рецептором PTCH1, в результате чего последний становится неактивным и не оказывает ингибирующий эффект на трансмембранный рецептор SMO. SMO, в свою очередь, активирует семейство транскрипционных факторов GLI – GLI1, GLI2 и GLI3, которые проникают в ядро и регулируют экспрессию целевых генов (рис. 1) [24].

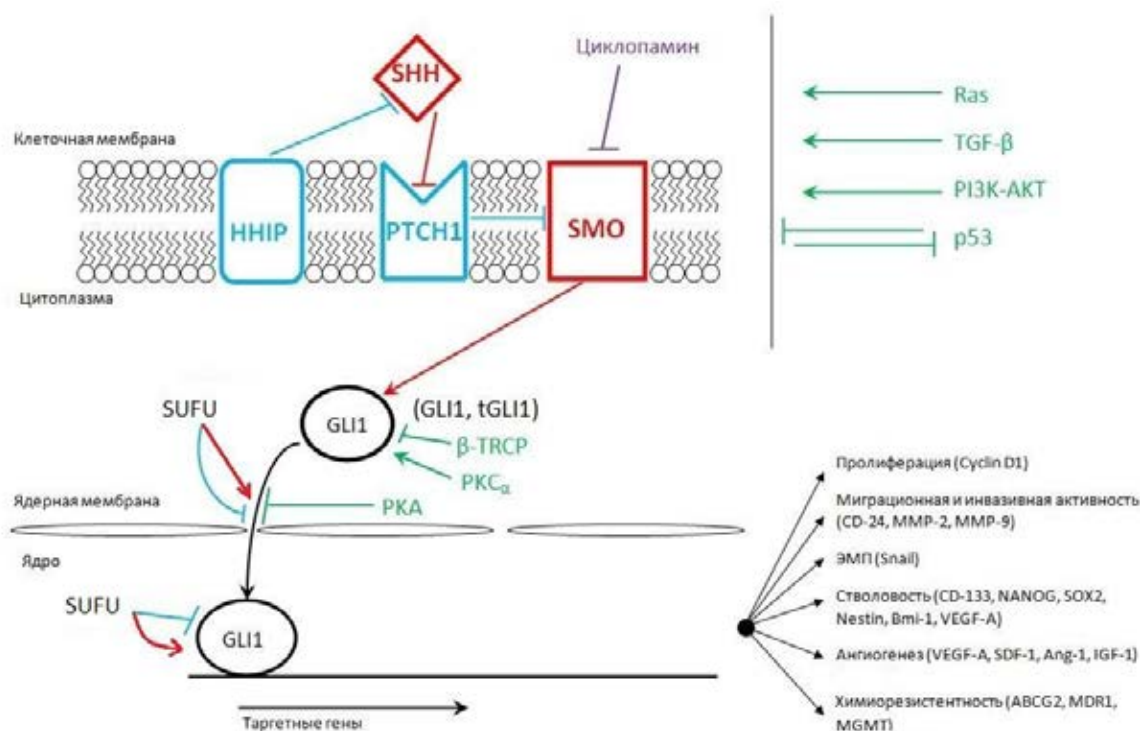


Рисунок 1. Схема функционирования основных компонентов сигнального пути Hedgehog. Синим цветом обозначены факторы, ингибирующие сигнальный путь, красным – активаторы сигнального пути. Зеленым цветом обозначены компоненты других сигнальных путей, оказывающих влияние на регуляцию НН пути. → означает активирующее влияние, ⊥ означает ингибирующее влияние.

1.2.1 Классический сигнальный путь Hedgehog

Действие полипептида Shh, являющегося паракринным и аутокринным лигандом позвоночных, зависит от его концентрации. Увеличение концентрации лиганда приводит к

аномальной трансформации стволовых клеток в опухолевые стволовые клетки и их неконтролируемой пролиферации, что в итоге ведет к возникновению онкологических заболеваний [24].

При упоминании лиганда Shh подразумевается N-терминальный Shh массой 19 кДа, образующийся в результате аутокаталитической активности предшественника массой 46 кДа. При этом роль образующегося С-терминального Shh с массой 27 кДа неизвестна [31]. Перед тем как клетка секретирует лиганд, он проходит модификацию, в результате которой к С-концу присоединяется молекула холестерина [23, 32]. Далее лиганд Shh взаимодействует с 12-трансмембранным рецептором PTCH1, который в отсутствие Shh ингибирует G-белок сопряженный рецептор SMO. Механизм ингибирования SMO заключается в том, что PTCH1 «накачивает» 3 β -гидроксистероид провитамин D3, являющийся сильным ингибитором рецептора SMO [33]. В результате же взаимодействия Shh с PTCH1 происходит ингибирование последнего, а рецептор SMO активно функционирует, активируя семейство транскрипционных факторов GLI, имеющих в своем составе “цинковые пальцы”. GLI1 функционирует как активатор сигнального пути, GLI2 в основном функционирует как активатор, в то время как GLI3 может являться как транскрипционным репрессором, так и активатором [24, 27, 34, 35].

SMO является онкогеном и в большинстве клеточных линий астроцитомы, медуллобластомы и глиобластомы экспрессия *SMO* оказывается выше, чем в нормальных тканях мозга. Данный факт рассматривается как один из критериев активного функционирования сигнального пути. Напротив, PTCH1 является супрессором HH пути [24, 36]. Также *PTCH1* служит мишенью для транскрипционного фактора GLI1, который понижает его экспрессию, что отмечалось в половине клеточных линий астроцитомы, медуллобластомы и первичных образцов [36]. Аналогичный механизм понижения экспрессии *PTCH1* отмечается и при других онкологических заболеваниях, в том числе при базально-клеточной карциноме и остеосаркоме [34, 37].

Гликопротеин HHIP (Hedgehog interacting protein) служит антагонистом как для лиганда Shh, так и для Ihh и Dhh, [38, 39]. Инактивированный Shh не связывается с PTCH1, в результате чего сигнальный путь не активен. Ген *HHIP*, как и *PTCH1* является мишенью HH пути [38]. Экспрессия *HHIP* снижена при онкологических заболеваниях пищеварительной системы, дыхательной системы, головного мозга (астроцитомы и медуллобластомы) в сравнении с нормальными клетками [39-41].

SUFU (Suppressor of fused) на протяжении долгого времени считался антагонистом для семейства транскрипционных факторов GLI, препятствуя их прохождению через ядерную

мембрану и транспортируя их из ядра в цитоплазму. Предполагалось, что в результате преимущественного цитоплазматического расположения (при повышении экспрессии *SUFU*) транскрипционные факторы GLI не изменяют уровень экспрессии целевых генов [24, 42, 43]. Кроме этого, существует предположение, что при ядерной локализации *SUFU* играет роль транскрипционного корепрессора факторов GLI через свое взаимодействие с SAP18 – mSin3A – гистон деацетилазным комплексом [44, 45]. Однако были исследования, в которых показано, что *SUFU* способен повышать связывание факторов GLI с ДНК [46]. Не смотря на это, *SUFU* считался антагонистом HH сигнального пути. Последние исследования показывают, что роль *SUFU* неоднозначна, что его количество повышается при активно функционирующем сигнальном пути HH, а сам *SUFU* может ингибировать действие GLI2/3 репрессоров и увеличивать способность GLI2/3 активаторов и GLI1 связываться с ДНК. А отсутствие *SUFU* приводило к отсутствию ядерной локализации GLI1 [35]. В регуляции HH пути принимает участие несколько изоформ *SUFU*, мРНК которых является продуктом альтернативного сплайсинга гена *SUFU* [47, 48]. Уменьшение количества *SUFU*, его полное отсутствие или мутации способствуют развитию медуллобластомы [49, 50]. Уменьшение экспрессии *SUFU* наблюдается в первичных образцах и клеточных линиях астроцитомы и медуллобластомы и рассматривается авторами как один из критериев активации сигнального пути, что в сфере новых исследований о роли *SUFU* спорно [24]. В настоящее время еще не выяснено, способен ли сигнальный путь HH подавлять экспрессию *SUFU*. Ген *SUFU* локализован в участке 10q24.3, в котором наблюдаются потери гетерозиготности при раке легкого, простаты, молочных желез и при медуллобластоме [24, 51].

Работа, в которой впервые обнаружили *GLI1* и показали, что он высоко экспрессирован при глиоме, была опубликована в 1987 году. Отсюда данный транскрипционный фактор и получил свое название – глиома-ассоциированный онкоген [52, 53]. Ген, состоящий из 3318 п.н., кодирует белок массой 150 кДа, являющийся транскрипционным фактором, регулирующим экспрессию целевых для сигнального пути HH генов. В составе белковой последовательности GLI1 имеются пять цинковых пальцев. Все они, кроме первого цинкового пальца, могут присоединяться к 5'-GACCACCCA-3' последовательности нуклеотидов целевых генов [54]. В сигнальном пути HH функционирует семейство факторов GLI, но GLI1 является наиболее изученным транскрипционным фактором на данный момент. GLI2/3 также являются транскрипционными факторами сигнального пути, но могут быть как активаторами, так и репрессорами HH сигнального пути. Что касается GLI1, то в настоящее время в литературе встречается информация, в соответствии с которой GLI1 функционирует только как активатор

сигнального пути [35]. Мутации в факторах GLI, ассоциированные с нарушением структуры цинковых пальцев, сказываются на функционировании сигнального пути [24].

В 2008 году был открыт транскрипционный фактор GLI1ΔN, мРНК которого является продуктом альтернативного сплайсинга гена *GLI1*. Такое название фактор получил из-за отсутствия 128 а.о. в N-конце. Отсутствие 128 а.о. приводит к отсутствию SUFU-связывающего домена (рис. 2). По мнению авторов работы, это не должно препятствовать проникновению данного транскрипционного фактора в ядро. Однако авторы отмечают низкую вероятность перемещения в ядро и запуска транскрипции целевых для HH сигнального пути генов [55]. Возвращаясь к новым работам по SUFU, можно предположить, что это связано с тем что SUFU принимает участие в транспортировке GLI факторов в ядро [35]. И низкая ядерная локализация GLI1ΔN может быть обусловлена именно отсутствием SUFU-связывающего участка, что еще раз показывает неоднозначную роль SUFU в функционировании сигнального пути HH. Транскрипционный фактор GLI1ΔN присутствует в нормальных и опухолевых линиях [55]. Однако в линии U-87 MG данный вариант транскрипционного фактора не обнаружен [56].

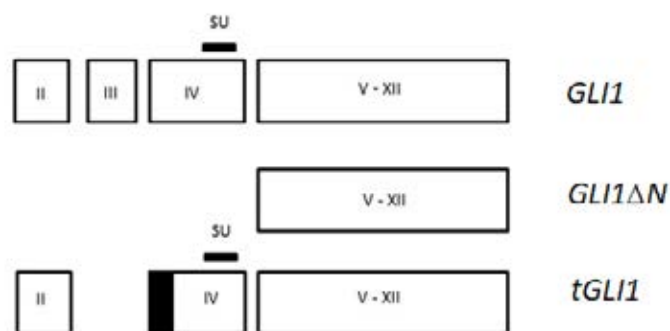


Рисунок 2. Структура мРНК *GLI1* и сплайсинговых вариантов, кодирующих соответствующие факторы транскрипции. Ген *GLI1* включает 12 экзонов (экзоны обозначены арабскими цифрами). Транскрипционный фактор GLI1 кодируют 2-12 экзоны, GLI1ΔN - 5-12 экзоны (отсутствуют 128 а.о. по сравнению с GLI1), tGLI1 кодируют экзоны с 2 по 12 (отсутствуют третий и часть четвёртого экзона, закрашенная чёрным цветом; отсутствуют 41 а.о.). SU обозначает SUFU-связывающий домен.

Годом позже открыли еще одну изоформу транскрипционного фактора GLI1 – транскрипционный фактор tGLI1, в составе которого отсутствует 41 а.о.. мРНК транскрипционного фактора tGLI1 также является продуктом альтернативного сплайсинга гена *GLI1* [14, 56]. Если в GLI1ΔN отмечалось отсутствие SUFU-связывающего домена, то здесь он присутствует, как и другие домены транскрипционного фактора GLI1: домены с цинковыми пальцами, домены трансактивации и деградации, NLS-домен (домен сигнала ядерной

локализации). *tGLI1*, как и *GLI1*, обнаруживается в ядре и обладает возможностью регулировать экспрессию целевых генов [56]. Экспрессия *tGLI1* отмечается в клеточных линиях и первичных образцах рака молочной железы и глиобластомы и почти не отмечается в нормальных тканях [56, 57].

Масса *tGLI1* составляет 146 кДа, в отличие от 150 кДа *GLI1*. Поэтому при помощи современных методов иммуноблоттинга различить две изоформы крайне сложно. А имеющиеся антитела не специфичны по отношению только к *GLI1* [56, 57]. Так как белок *tGLI1* был открыт более чем 20 лет спустя начала исследований сигнального пути, то, вероятно, что часть функций *GLI1* может относиться к фактору *tGLI1* [10].

1.2.2 Неканонический сигнальный путь Hedgehog

Повышение активности сигнального пути вследствие различных причин, связанных с нарушениями на разных уровнях сигнального пути – это один из возможных ключевых факторов, приводящих к развитию онкологических заболеваний головного мозга, лёгких, кожи, молочных желез, простаты, яичников и других органов [58-63]. Но кроме самих факторов, сигнальный путь регулируется извне за счет других белков, других транскрипционных факторов и других сигнальных путей, которые воздействуют на сигнальный путь НН на разных уровнях.

Опухолевый супрессор *p53* способен подавлять экспрессию *GLI1*, однако отмечается и возможность подавления экспрессии *p53*, опосредованная транскрипционным фактором *GLI1* [64]. РКСα и сигнальные пути TGF-β-Smad, PI3K-AKT, Ras и другие способны оказывать стимулирующее влияние на НН сигнальный путь, в том числе стимулировать проникновение транскрипционного фактора *GLI1* в ядро [65-70]. Сигнальный путь НН пересекается с сигнальным путем Notch и Wnt [40, 69, 71]. Онкогенный белок C-MYC способен связываться с промоторной областью *GLI1* и повышать его экспрессию [72]. Аналогичное влияние оказывает и транскрипционный фактор EWS-FL1 [73].

С другой стороны, РКСδ и РКА негативно влияют на *GLI1* [66, 74]. РКА удерживает *GLI1* в цитоплазме, препятствуя проникновению его в ядро клетки [74]. В процессах деградации и ацетилирования *GLI1* принимает участие отдельный механизм, включающий убиквитин-лигазу β-TRCP и убиквитин-лигазу BTP-Cul3 [75-78]. β-TRCP E3 лигаза может модифицировать транскрипционный фактор *GLI3* из онкогена в супрессор НН пути [75].

1.3 Заболевания, связанные с нарушениями сигнального пути Hedgehog

Нормальный эмбриогенез регулируется каскадом сигнальных взаимодействий. Исключением не является и НН сигнальный путь. А нарушения в функционировании на отдельных уровнях сигнального пути может приводить как к нарушению эмбриогенеза, так и к возникновению онкологических заболеваний [79].

Мутации в *Shh* приводят к возникновению такого заболевания, как голопрозэнцефалия новорожденных, при котором у плода отсутствует разделение переднего мозга на полушария. Для таких новорожденных характерны аномалии строения лицевого скелета (цебоцефалия) и частичное или полное сращение глазных яблок (циклопия) [80, 81].

Помимо мутаций в гене данного лиганда, к нарушению его функционирования приводят и нарушения в процессе модификации холестерина, которой подвергается N-терминальный Shh. Нарушения биосинтеза холестерина сказываются на функционировании сигнального пути и приводят к развитию синдрома Смит-Лемли-Опица. Развитию более тяжелых вариантов заболевания способствуют сопутствующие нарушения в НН пути. Наиболее часто встречающимися проявлениями при данном синдроме являются: микроцефалия, аутизм, сердечные и почечные пороки, слабый мышечный тонус, эндокринные нарушения, син- и полидактилия, птоз, крипторхизм, катаракта [82, 83].

Мутации, приводящие к инактивации PTCH1, способствуют развитию трихоэпителиомы, плоскоклеточному раку пищевода, карциноме мочевого пузыря и множественной эндокринной неоплазии (синдрому Горлина). Мутации, инактивирующие PTCH1, PTCH2 и SMO, выявляют при базально-клеточной карциноме и медуллобластоме [79, 84, 85].

Повышенная экспрессия гена *GLI1* наблюдается при таких заболеваниях, как В-клеточная лимфома, рабдомиосаркома, остеосаркома, базально-клеточная карцинома, глиома. При этом для сарком была показана корреляция между уровнем экспрессии и степенью злокачественности [4, 53, 79, 86].

Мутации в гене, кодирующем транскрипционный фактор GLI3, ассоциируют с рядом врожденных дефектов: синдром Паллистера-Холла, синдром цефалополисиндактилии Грейга, постаксиальная полидактилия типов А, В, преаксиальная полидактилия четвертого типа [79, 87, 88]. Мутации *SUFU* способствуют развитию медуллобластомы [49, 50].

1.4 Особенности функционирования сигнального пути Hedgehog при глиомах

Если для медуллобластом выделяется подгруппа в которой развитие опухоли связано с мутациями в *PTCH1*, *SMO*, *SUFU* и амплификациями в *GLII/2*, то роль сигнального пути в развитии глиом не столь очевидна [84]. Для глиом достоверно показана только амплификация *GLII*, выявляющаяся в малом проценте случаев [4, 53, 89, 90].

Эксперименты с ингибитором циклопамином позволяют сделать вывод о причастности НН пути к развитию глиом. Циклопамин способствует снижению экспрессии гена транскрипционного фактора *GLI1* в клеточных линиях глиом U-87 MG, U-251 MG и SHG44. В его присутствии в клетках индуцируются процессы апоптоза, а также наблюдается уменьшение способности к инвазивному росту и миграционной активности [91, 92]. При этом эффект зависит от дозы и времени культивирования клеток с препаратом [91]. При концентрациях от 2.5 μ M до 10 μ M циклопамин функционирует как ингибитор НН сигнального пути [91, 93]. Интересен тот факт, что эксперименты с циклопамином на линии A172, для которой было показано отсутствие экспрессии *GLII* и *Shh*, не уменьшали жизнеспособность клеток, миграционную и инвазивную активность и не ингибировали процессы клеточного роста [91-93].

Кроме оценки экспрессии гена транскрипционного фактора *GLI1*, в ряде исследований оценивается количество самого белка при помощи иммуногистохимических методов. При помощи данной методики было обнаружено, что в глиомах IV степени злокачественности процент *GLI1* положительных клеток больше, чем в глиомах III степени [91]. Активность транскрипционного фактора *GLI1* было предложено оценивать по его локализации в клеточном ядре [91, 93]. Считается, что методика ПЦР-РВ является более точной, чем менее достоверные иммунофлуоресцентные методы, однако при изучении первичных образцов глиом в литературе отмечаются неоднозначные результаты относительно экспрессии *GLII*. По результатам одних исследований при глиомах III и IV степени злокачественности наблюдается значительное увеличение экспрессии *GLII* [93]. По результатам других авторов экспрессия транскрипционного фактора при IV степени злокачественности достоверно не отличается от таковой в контрольных образцах от пациентов, оперированных по поводу эпилепсии [94]. Одновременно с этими данными в научных работах описывается увеличение экспрессии транскрипционного фактора во многих клеточных линиях глиом, в то время как экспрессия в первичных образцах находится на уровне контроля [36, 58, 93].

Ориентируясь на данные экспрессии *GLII*, некоторые исследователи отмечают, что сигнальный путь НН инактивирован при глиомах IV степени злокачественности, но активно функционирует при астроцитомах, анапластических астроцитомах и олигодендроглиомах (глиомы II и III степени злокачественности) [94]. А при рецидивах глиобластомы после терапии химиотерапевтическими препаратами наблюдалась гиперэкспрессия *GLII* [95].

Существует предположение, что среди глиобластом встречаются как НН-зависимые, так и НН-независимые опухоли. Для НН-зависимых глиобластом характерна повышенная активность Notch и PDGFR сигнальных путей. Для второй группы характерно понижение экспрессии *PTEN* (фосфатаза с двойной субстратной специфичностью) с увеличением активности PI3K-АКТ сигналинга [16]. Возвращаясь к результатам рассмотренного выше исследования, можно предположить, что отсутствие экспрессии *GLII* в глиомах IV степени злокачественности могло быть обусловлено наличием НН-независимых глиобластом [16]. Повышение активности PI3K-АКТ сигналинга и уменьшение экспрессии *PTEN*, что отмечается при НН-независимых глиобластомах, связывают с неблагоприятным прогнозом и более инвазивным ростом опухоли [96].

Активный сигнальный путь НН характерен для *PTEN*-позитивных глиобластом, где отмечается повышение экспрессии генов *GLII* и *Shh*, в сравнении с глиобластомами без экспрессии *PTEN*. В случае отсутствия экспрессии *PTEN*, как правило, активен PI3K-АКТ-mTOR сигнальный путь, что в силу невыясненных механизмов может способствовать инактивации НН сигнального пути [16].

В случае глиом IV степени злокачественности экспрессия гена *PTCH1* не превышает таковую в норме, в то время как сам ген является целевым для транскрипционного фактора *GLI1* [36, 94]. В случае глиом I, II, III степени злокачественности наблюдается увеличение экспрессии *PTCH1* до 2, 6 и 9 раз, соответственно, что также подтверждено при помощи методики вестерн-блоттинг. Более 87% *PTCH1* позитивных клеток также оказались *Vmi-1*-позитивными, что указывает на то, что *PTCH1* может являться маркером прогениторных клеток глиом [94]. Помимо глиобластомы уменьшение уровня экспрессии *PTCH1* наблюдается в линиях медуллобластомы [36].

Другой коллектив исследователей обращает внимание на неоднозначность результатов, полученных как при помощи ПЦР-РВ, так и иммунофлуоресцентных методик, и предлагает в качестве метода оценки активности сигнального пути и *GLI1* анализировать в сравнении экспрессию репортерного гена люциферазы. Авторы обнаружили отсутствие корреляции между экспрессией *GLII* и активностью репортерного гена в клеточных линиях глиобластом. Кроме

того, уровень активности репортерного гена был максимальным в линии T98, где уровень экспрессии *GLII* соответствует первичным образцам и ниже, чем в U-87 MG. В качестве возможной причины такого несоответствия авторы предполагают ингибирование синтеза *GLII* на уровне трансляции. Таким образом, высокая экспрессия транскрипционного фактора еще не означает большое количество самого фактора и высокую активность HH сигнального пути [97]. Следовательно, не всегда верно оценивать активность HH сигналинга по экспрессии транскрипционного фактора *GLII*.

В исследованиях с мышинной PDGF-индуцированной глиомой, растущей в среде с сывороткой, функционирование *GLII/2* оценивалось по активности репортерного гена люциферазы. Культивирование клеток с лигандом Shh не повышало продукцию люциферазы. Это оценивалось как неактивное состояние HH сигналинга. Если же опухолевые клетки культивировали в условиях образования нейросфер в среде с добавлением EGF и bFGF, наблюдалась высокая активность *GLII/2* [98]. Следовательно, культивирование клеточных линий в среде, содержащей сыворотку, может способствовать инактивации HH сигналинга [93, 94, 98]. Аналогичные результаты представлены и для культур медуллобластомы, где в клетках отмечалось уменьшение активности фактора *GLII* [99].

Результаты активации HH сигналинга при добавлении факторов EGF, FGF, LIF способствовали изучению HH сигналинга в CD133-позитивных клетках и туморосферах, где повышен синтез Shh и увеличен уровень *SMO* [93, 100]. Добавление циклопamina и других ингибиторов HH сигналинга приводило к снижению сферообразования, пролиферации и снижению *GLII* [59, 93, 101]. Дополнительное внесение Shh сказывалось на увеличении сферообразования, повышении экспрессии генов *GLII/2* и *SMO* [59, 102]. Все эти данные свидетельствуют о вовлечении HH сигналинга в процессы формирования стволовых опухолевых клеток и онкогенеза при глиобластомах.

Любопытные данные были продемонстрированы в исследованиях на мышах с PDGF-индуцированной глиомой, где было показано, что лиганд Shh определяется не в самих опухолевых клетках, а преимущественно в эндотелиоцитах и астроцитах, окружающих опухоль. Но в нормальных эндотелиоцитах мозга зрелой мыши не отмечается экспрессия *Shh*. Такие же данные были получены и при анализе первичных образцов человеческой олигодендроглиомы и глиобластомы. Авторы предполагают, что за счет паракринной регуляции лигандом Shh клетки, окружающие опухоль, влияют на активность HH сигналинга в клетках самой опухоли [4, 98]. Многие авторы предполагают, что дополнительно в перитуморальном пространстве источником паракринной регуляции Shh могут служить нейрональные и неопластические клетки [59, 93-95, 98, 103]. При этом в самих клетках

опухоли, лиганд *Shh* отсутствует или его количество снижено [104]. Однако есть данные, что клетки глиомы способны к самостоятельному синтезу лиганда [93].

Интересные данные были получены и при совместном культивировании клеточных культур глиобластомы GL261 и эндотелиоцитов b.END3. Кокультивирование клеток GL261 и b.END3. приводило к тому, что в эндотелиальных клетках повышалась экспрессия *Shh* и *GLII* и понижалась экспрессия *HHIP* [105]. Одновременно с этим в клетках глиобластомы GL261 наблюдалось увеличение количества CD133-позитивных клеток, повышение способности образовывать сферы и увеличение уровня экспрессии *GLII* и генов, связанных с процессами стволовости. Похожие результаты были получены и при совместном культивировании клеток глиобластомы U-251 MG с эндотелиальными клетками HUVEC. При этом ингибирование HH сигналинга как в клетках глиобластом, так и в эндотелиоцитах нивелировало вышеописанные эффекты [105, 106].

Можно предположить, что клетки глиобластомы способны запускать синтез лиганда *Shh* в эндотелиальных клетках, что ведет к активации HH сигнального пути в клетках опухоли. По одной из версий, влияние GL261 на эндотелиальные клетки происходит через VEGF-опосредованную стимуляцию [105, 106].

1.5 Ингибирование и активация сигнального пути Hedgehog

Обнаружено более 200 веществ, способных ингибировать сигнальный путь HH [7]. Соединения можно разделить в зависимости от механизма действия (ингибирование SMO, GLI1 или *Shh* и т.д.) и от природы соединения (натуральные природные вещества, синтетические продукты и другие вещества, к которым можно отнести витамин D3 и антитела к компонентам HH пути) [7, 107].

Особенность ингибиторов SMO заключается в том, что, ингибируя рецептор SMO, они уменьшают активность классического сигнального пути HH. При этом транскрипционные факторы GLI могут регулироваться посредством влияния других сигнальных путей [108]. К ингибиторам SMO относится наиболее популярный ингибитор циклопамин, его производные и другие вещества [7]. Циклопамин является алкалоидом, выделенным из ядовитого растения *V. californicum*, способным ингибировать сигнальный путь HH за счет связывания с одним из доменов SMO [109].

Во множестве исследований на мышах моделей человеческой глиомы, меланомы, рака простаты, прямой кишки и поджелудочной железы циклопамин показал свою эффективность ингибирования роста опухоли [67, 110-112]. Несмотря на это, циклопамин из-за своей токсичности и побочных эффектов не будет применяться в терапии онкологических заболеваний [113]. Поэтому в настоящее время ведутся работы по созданию производных циклопамина, которые будут лишены этих недостатков. Некоторые соединения хорошо зарекомендовали себя в исследованиях *in vitro*, однако по исследованиям *in vivo* нельзя дать однозначную оценку этим ингибиторам [108, 114, 115].

Вторым по применению ингибитором трансмембранного рецептора SMO является висмодегиб, или GDC-0449, относящийся ко второму поколению производных циклопамина. Данный препарат в настоящее время применяется для лечения метастатической формы базальноклеточной карциномы [116]. Однако после применения висмодегиба в течение нескольких месяцев в клетках опухоли возникали мутации в SMO, которые приводили к неэффективности терапии. Аналогичные наблюдения были отмечены и при медуллобластоме [117, 118]. В связи с этим идет поиск молекул, которые связывались бы со множеством сайтов на SMO, что позволит преодолеть развивающуюся в процессе терапии резистентность к висмодегибу. Одним из таких веществ является MRT-92 [119]. В настоящее время применение висмодегиба в качестве монотерапии или в комбинации с другими химиотерапевтическими препаратами применяется в клинических исследованиях при лечении медуллобластомы, мелкоклеточного рака легкого, метастатического рака поджелудочной железы, менингиомы, глиобластомы и острого миелоидного лейкоза [108]. Увеличивается количество исследований ряда других ингибиторов SMO: эрисмодегиб, саридегиб, гласдегиб, таладегиб, CUR61414 [108].

Ингибиторы транскрипционных факторов GLI инактивируют как сам сигнальный путь HH, так и нивелируют влияние на транскрипционные факторы GLI других сигнальных путей. Наиболее популярным ингибитором данного типа является GANT-61, для которого в исследованиях на клеточных линиях рабдомиосаркомы, остеосаркомы, нейробластомы и рака яичников была показана возможность ингибировать GLI1 и GLI2, препятствуя их связыванию с молекулами ДНК [34, 120-122]. В то время как ингибиторы SMO уже проходят клинические испытания, GANT-61 используется только в экспериментальных работах.

Другим популярным ингибитором GLI1/2 факторов является триоксид мышьяка. Он применяется в терапии острого промиелоцитарного лейкоза и проходит клинические испытания для лечения солидных опухолей и гематологических опухолей [108, 123]. Свою эффективность триоксид мышьяка показал в исследованиях *in vitro* и *in vivo* на клетках рабдомиосаркомы, рака простаты, поджелудочной железы и прямой кишки [108].

В экспериментальных исследованиях применяют также ингибиторы лиганда Shh. Наиболее популярными являются RU-SKI 43, нарушающий процессы синтеза лиганда, и антитела 5E1 к Shh [108]. В экспериментах на животных данные вещества показали эффективность при терапии рака молочной железы, карциномы простаты и медуллобластомы [108, 124, 125]. Клинические испытания этих препаратов в настоящее время не проводятся [108].

Активация HH-пути в экспериментальных исследованиях возможна при трансфекции онкогенов, принимающих участие в его функционировании, либо за счет ингибирования супрессоров HH сигналинга [7, 126].

1.6 Влияние сигнального пути Hedgehog на ключевые процессы онкогенеза

В мировой литературе общепризнанной является точка зрения Hanahan и Weinberg, в соответствии с которой большинству опухолей присущи основные процессы канцерогенеза (hallmarks в англоязычной литературе). Если в 2000 г. авторами отмечалось только 6 таковых процессов, то уже с 2011 г. считается, что развитие онкологического заболевания сопряжено с 10 ключевыми процессами (рис. 3) [127, 128]. К данным процессам относят:

- повышение пролиферативной активности
- повышение миграционной и инвазивной активности
- повышение ангиогенеза
- сопротивление гибели клеток
- изменение клеточного метаболизма
- воспалительные реакции
- уклонение от иммунной системы
- геномную нестабильность
- уклонение от подавления роста (от аутофагии)
- теломеразную активность

Далее мы разберем влияние HH сигнального пути на вышеуказанные процессы.



Рисунок 3. Схема, отображающая влияние сигнального пути Hedgehog на ключевые процессы онкогенеза.

1.6.1 Влияние сигнального пути Hedgehog на пролиферацию клеток

Наиболее выраженная особенность опухолевого новообразования – это неконтролируемая клеточная пролиферация. Так как НН сигналинг принимает участие в процессах эмбрионального развития, то ожидаемо, что сигналинг способен оказывать влияние на процессы пролиферации в клетках опухоли.

Есть данные, указывающие на то, что транскрипционный фактор GLI1 стимулирует клеточную пролиферацию во время эмбрионального развития и при онкологических процессах. На мышах было показано, что мутации в *Shh* приводят к неполноценному развитию головного мозга, а введение в клетки головастика мРНК *GLI1* приводило к развитию гиперплазий по ходу нервной трубки. Аналогичным образом развитие гиперплазий наблюдалось в экспериментах на мышах [10, 64, 129, 130]. Пороки развития, в том числе голопроэнцефалия новорожденных, связанная с мутацией гена *Shh* и других генов сигнального пути,

подтверждают, что НН сигналинг влияет на процессы пролиферации [79]. Это доказывает и тот факт, что ингибирование *GLI1* сказывалось на уменьшение степени пролиферации и размеров новообразований [59].

Повышение экспрессии *GLI1* в эпидермальных клетках влияло на появление гиперплазии кожи мышей в экспериментах *in vivo* [131]. В аналогичных экспериментах на мышах с направленным повышением экспрессии *GLI1* в эпителиальных клетках молочных желез наблюдались гиперплазия и опухолевый рост [132]. Также имеются данные, в соответствии с которыми применение малых интерферирующих РНК к мРНК *GLI1* приводило к снижению клеточной пролиферации и повышению апоптоза в тканях метастазирующей карциномы молочной железы [133]. Также показано, что активный НН сигнальный путь влияет на клеточную пролиферацию в некоторых клеточных линиях глиом, в то время как использование ингибиторов приводит к ее уменьшению [91]. При медуллобластоме НН сигналинг стимулировал пролиферацию клеток через активацию гистондеацетилаз, модифицирующих гистоны, что приводит к изменению конформации хроматина, влияющему на изменение транскрипционной активности. При ингибировании гистондеацетилаз при помощи трихостатина А сигнальный путь НН не оказывал влияние на пролиферацию [134]. Данные результаты наводят на мысли, что НН сигналинг принимает участие в эпигенетических процессах. Также для медуллобластомы и нейробластомы было показано, что сигнальный путь НН повышает уровень циклина D1, что приводит к нарушениям в координации клеточного цикла, что в свою очередь сказывается на чрезмерной пролиферации клеток [122, 135].

Имплантация неопухолевых клеток простаты с повышенным уровнем экспрессии *SMO* мышам приводила к повышению пролиферации в тканях простаты. Параллельно с этим отмечалось повышение экспрессии генов факторов, ответственных за клеточный рост – *FGF5* и *IGFBP* [136].

С одной стороны, одними авторами отмечается, что ингибирование *SMO* в клетках рака поджелудочной железы приводит к уменьшению пролиферации и снижению формирования колоний [137, 138]. Но в других работах в экспериментах *in vivo* отмечалось, что ингибирование сигнального пути НН в стромальных клетках поджелудочной железы приводило к увеличению размеров опухоли за счет эпителиального компонента и уменьшению общей выживаемости. Эти данные еще раз подчеркивают значимость микроокружения в функционировании сигнального пути [139].

Транскрипционный фактор *tGLI1* в экспериментах на клетках карциномы молочной железы *MDA-MB-231* повышал клеточную пролиферацию в большей степени, чем *GLI1*.

Эффекты данных изоформ на пролиферацию сравнивали после трансфекции плазмидных ДНК с *GLII* и *tGLII* [57]. Необходимо отметить, что непосредственное влияние изоформы tGLI1 на таргетные гены в клеточных линиях и культурах первичных образцов еще не изучено. Аналогичные эксперименты с трансфекцией плазмидных ДНК в клетки U-87 MG не оказывали влияние на пролиферацию при исследованиях *in vitro*. Но в исследованиях *in vivo* большее влияние на пролиферацию оказывала изоформа tGLI1. Авторы объясняют данный феномен влиянием микроокружения в опухоли [10, 56].

1.6.2 Влияние сигнального пути Hedgehog на эпителиально-мезенхимальный переход, миграционную и инвазивную активность, метастазирование и стволовые опухолевые клетки

Эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) – это процесс трансформации эпителиальных клеток под действием разных факторов в мезенхимальные клетки, фенотип которых характеризуется повышенной способностью к миграции, инвазии и сопротивлению апоптозу, что повышает способность опухолевых клеток к метастазированию. Первичным транскрипционным фактором, регулирующим ЭМП, является Snail1 [140]. GLI1 увеличивает экспрессию *Snail1*, стимулируя ЭМП, что сопровождается подавлением экспрессии гена Е-кадгерина [131]. Также при ЭМП отмечается EGFR-сигналинг-опосредованное повышение экспрессии транскрипционного фактора Twist [141]. При подкожном введении мышам эпителиальных клеток, трансфецированных плазмидной *GLII*, наряду с гиперпролиферативными поражениями кожи отмечалось повышение *Snail1* [131]. А добавление ингибитора к SMO в экспериментах на клетках рака яичников приводило к уменьшению экспрессии *Snail1* и экспрессии генов, кодирующих Е-кадгерин, цитокератин 7, кальретинин, виментин, Bcl-2, каспазы, b1 интегрин, MT1-MMP и VEGF, участвующих в процессах миграции, инвазии и метастазирования при раке яичников [142].

Для транскрипционного фактора Snail1 на клетках гепатоцеллюлярной карциномы была показана его роль в увеличении экспрессии гена *CtBP2*, являющегося транскрипционным корепрессором, стимулирующим процессы миграции и инвазии за счет ингибирования множества генов, тормозящих данные процессы [143]. Потеря клетками Е-кадгерина приводит к миграции β-катенина в ядро, где данный транскрипционный фактор, являющийся компонентом сигнального пути Wnt, начинает транскрипцию генов, ассоциированных с клеточной трансформацией при раке эндометрия [144, 145]. Трансплантация *GLII* overэкспрессирующих клеток рака поджелудочной железы бестимусным мышам приводила к

метастазированию в печень и селезенку. При этом было показано, что GLI1 регулирует ЭМП стимулирующие факторы: факторы сигнальных путей TGF β , Ras, Wnt, PI3K/AKT, ростовые факторы и рецепторы сигнальных путей, интегрины, TM4SF (суперсемейство белков тетраспанинов) и S100A4 (стимулирует экспрессию *Twist* и *Snail*) [146, 147].

Влияние сигнального пути HH на процессы миграции, инвазивности и метастазирования показано при ретинобластоме, почечно-клеточной карциноме, раке простаты и эстроген позитивном раке молочной железы [62, 148-150]. На клеточных линиях меланомы было показано, что снижение экспрессии GLI1 сказывается на миграционной, инвазивной и метастатической активности клеток [67, 151]. HH сигналинг в метастатических клетках меланомы и карциномы молочной железы способен изменять активность остеобластов и остеокластов, что приводит к остеолитической деструкции костной ткани и способствует росту метастатических очагов [151, 152].

В экспериментах с культурами метастазирующей карциномы молочной железы гиперэкспрессия *GLI1* стимулировала миграционную активность клеток [133]. Отмечалась также положительная корреляция экспрессии *GLI1* со стадией опухоли и наличием метастазов в лимфатические узлы. Гиперэкспрессия *GLI1* характерна для наименее благоприятного прогноза заболевания [153]. В работах по изучению изоформы tGLI1 на культурах клеток рака молочной железы MDA-MB-231 и культуре мультиформной глиобластомы U-87 MG показано, что транскрипционный фактор tGLI1 в большей степени влияет на процессы миграции и инвазии, чем транскрипционный фактор GLI1. В клетках, трансфицированных *tGLI1* было обнаружено повышение продукции белка CD24 и экспрессии генов матриксных металлопротеиназ MMP-2 и MMP-9, ассоциированных со способностью к инвазии, миграции и метастазированию [56, 57, 154].

В последнее время все чаще встречаются исследования, посвященные опухолевым стволовым клеткам, способным контролировать канцерогенез. Одним из основных маркеров таких клеток считается маркер CD133. В первичных культурах клеток глиобластом были обнаружены CD133-позитивные клетки, в которых была повышена экспрессия гена *NANOG*, белок которого является транскрипционным фактором, регулирующим самообновление стволовых опухолевых клеток. При культивировании, эти клетки были способны образовывать сферы [155].

Существует ряд работ, свидетельствующих о вовлечении HH сигнального пути в процессы формирования фенотипа стволовых опухолевых клеток. Так ингибирование транскрипционного фактора NANOG приводило к снижению количества GLI1 и маркеров

стволовости OCT4 и нестина в клетках, что сказывалось на уменьшении способности клеток к сферообразованию и образованию опухоли. Интересно, что при увеличении количества GLI1, опосредованного ингибированием трансмембранного рецептора PTCH1, наблюдалось повышение количества NANOG [155]. Работы других авторов также демонстрируют вовлечение HH сигнального пути в формирование фенотипа стволовых опухолевых клеток [59, 102]. В клетках мозга мышей гиперэкспрессия *GLI1* стимулировала повышение маркеров стволовости CD133, SOX2, нестина и Bmi-1 [64, 156].

В туморосферах рака молочной железы содержание GLI1 в 20 раз превышало таковое в дифференцированных клетках карциномы. Добавление лиганда Shh стимулировало сферообразование, в то время как добавление циклопина ингибировало образование сфер, что свидетельствует в пользу вовлеченности HH сигналинга в формирование фенотипа стволовых опухолевых клеток при карциноме молочной железы. Также было обнаружено, что способность к образованию туморосфер повышается при гиперэкспрессии GLI1/2 [157].

Что касается разницы влияния GLI1 и tGLI1, то в литературе имеются сведения только о том, что tGLI1 способен сильнее увеличивать экспрессию гена *VEGF-A*, белок которого гиперпродуцирован в стволовых опухолевых клетках [57, 158, 159].

Влияние HH сигналинга на фенотип стволовых опухолевых клеток отмечается при раке желудка, прямой кишки и поджелудочной железы [139, 160, 161].

1.6.3 Влияние сигнального пути Hedgehog на процессы ангиогенеза

Процессы ангиогенеза регулируются как проангиогенными факторами (Ang-1, IGF-1, SDF-1, семействами VEGF и FGF и т.д.), так и антиангиогенными (Tsp-1 и др.). Без кровеносных сосудов опухоли не смогут увеличиваться в размерах и метастазировать. В опухолевых клетках нормальный ангиогенез нарушается за счет повышенного синтеза проангиогенных факторов, увеличивающих рост и проницаемость неопластических микрососудов, что напрямую влияет на рост новообразования [10, 162, 163].

На клетках аденокарциномы поджелудочной железы было показано, что добавление циклопина приводило к уменьшению GLI1, что сказывалось на снижении ангиогенеза в тканях опухоли. При имплантации опухолевых клеток бестимусным мышам и последующем лечении их циклопином отмечалось уменьшение роста сосудов и снижение экспрессии генов проангиогенных факторов [164]. Также в исследованиях *in vivo* фибробластов поджелудочной

железы было показано, что ингибирование трех корцепторов HH сигналинга (*Gas1*, *Wsc* и *Cdon*) приводило к уменьшению ангиогенеза в опухоли. Наличие этих корцепторов, способных взаимодействовать с лигандом *Shh*, отмечается в процессе развития нервной трубки у мышей и было обнаружено в фибробластах стромы поджелудочной железы. При раке стромы поджелудочной железы отмечается увеличение экспрессии генов данных корцепторов [165, 166].

На клетках карциномы молочной железы было показано, что *GLI1* стимулирует экспрессию гена проангиогенного фактора *CYR61* независимо от факторов *VEGF*, а также, что *tGLI1* в большей степени увеличивает экспрессию *VEGF-A*, чем *GLI1* [57, 167]. Аналогичные данные о повышении экспрессии *VEGF-C* и *TEM7* (отмечается прямая корреляция между экспрессией данных проангиогенных факторов и васкуляризованностью сосудов) были продемонстрированы при глиомах. Кроме того *tGLI1* может связываться с промоторной областью и увеличивать экспрессию гена гепараназы, что не отмечается для *GLI1*. Гепараназа относится к эндогликозидазам и способна повреждать компоненты клеточного матрикса, способствуя процессам ангиогенеза, инвазии и метастазирования [168, 169]. О проангиогенном эффекте *GLI1* при глиомах свидетельствуют и эксперименты на клетках, полученных из первичных образцов, где ингибирование *GLI1* приводило к уменьшению *VEGF* и снижению роста неопластических сосудов [170].

Влияние *GLI1* на проангиогенные факторы было показано на клетках гепатоцеллюлярной карциномы, где применение висмодегиба в экспериментах *in vivo* приводило к уменьшению кровеносных сосудов в опухоли [171]. Анализ первичных образцов колоректального рака показал наличие прямой корреляции между количеством *GLI1*, *VEGF-C* и *VEGFR3* [172].

Эти данные убедительно свидетельствуют о том, что HH сигнальный путь оказывает ключевое влияние на процессы ангиогенеза в опухолях, что способствует росту опухоли и ее метастазированию. Кроме того, при разных онкологических процессах HH сигналинг может модулироваться посредством специфических для данных клеток корцепторов, что делает функционирование сигнального пути и его влияние на разные патологические процессы уникальными. В исследованиях на мышинной модели рака поджелудочной железы было показано, что при ингибировании HH сигналинга в стромальных клетках поджелудочной железы отмечается повышение васкуляризации в тканях опухоли [173-175].

1.6.4 Влияние сигнального пути Hedgehog на процессы сопротивления клеточной гибели

К процессам сопротивления клеточной гибели можно отнести репарацию поврежденной ДНК, апоптоз, изменение аккумуляции и метаболизма химиотерапевтических препаратов и радиорезистентность.

Влияние сигнального пути Hedgehog на репарацию ДНК

В настоящее время существует множество работ, демонстрирующих вовлечение HH сигналинга в процессы, позволяющие клетке преодолевать летальные повреждения ДНК вследствие действия химиотерапии или ионизирующей радиации. Резистентность к терапии в целом обусловлена процессами репарации поврежденной ДНК и процессами клеточной аккумуляции и метаболизма химиотерапевтических препаратов, следовательно, может быть понижена как за счет агентов, ингибирующих репарацию ДНК, так и за счет агентов, стимулирующих накопление химиотерапевтических препаратов в клетках [176].

Известно пять основных путей, по которым выполняется репарация поврежденной ДНК: исправление ошибок спаривания нуклеотидов (mismatch repair), репарация вырезанием нуклеотидов (nucleotide excision repair), прямая репарация ДНК (direct repair), репарация вырезанием оснований (base excision repair) и репарация двухцепочечных разрывов (в нее входят: репарация негомологичного соединения концов (non-homologous end joining) и гомологичная рекомбинационная репарация (homologous recombinant repair)) [176].

Репарация ошибочно спаренных нуклеотидов направлена на исправление нарушений, вызванных следующими веществами: темозоломид, дакарбазин, цисплатин, карбоплатин, тиопурины, флуоропиримидины и другие [177]. На культуре клеток рака толстой кишки HT29 было показано, что добавление GANT61 приводит к уменьшению экспрессии генов *MSH6* и *EXO1*, участвующих в данном типе репарации [178]. С другой стороны, на клетках аденокарциномы протоков поджелудочной железы было показано, что GLI1 ингибирует процесс мисмэтч-репарации. Ингибирование было опосредованно, через активацию транскрипционным фактором GLI1 супрессора BHLHE41, непосредственно влияющего на ингибирование процессов репарации данного типа [179].

Использование GANT61 и генетическое ингибирование GLI3 на клетках той же культуры HT29 также приводило к уменьшению экспрессии генов белка ДНК лигазы-1 (*LIG1*) и гена

KIAA0101, кодирующего фактор, связывающий ядерный антиген пролиферирующих клеток (PCNA) [178]. Данные факторы участвуют в репарации вырезанием нуклеотидов. При помощи данного типа репарации восстанавливаются массивные повреждения, вызванные ацетиламинофлуоренами, нитрозаминами и сшивающими агентами (цисплатин). Этот тип репарации эффективен также при восстановлении оксидативных поражений ДНК и повреждений под действием ультрафиолетового облучения [176, 180]. В то же время на цисплатин-резистентных клетках яичников человека было показано, что ингибирование GLI1 при помощи трансфекции малых РНК, образующих шпильки (shRNA), приводит к уменьшению экспрессии генов *ERCC1* и *XPB*, белки которых принимают участие в данном типе репарации [180]. Но в этом случае влияние GLI1 является опосредованным через связывание GLI1 с промоторной областью гена другого транскрипционного фактора c-JUN [180, 181]. По одной из версий в клетках рака яичников за связывание с промоторной областью c-JUN ответственен не сам GLI1, а его изоформа C'ΔGLI1 массой 130 кДа, которая не встречается в нормальных клетках яичников. В клетках, резистентных к цисплатину, количество C'ΔGLI1 было больше, чем в других вариантах клеточных линий рака яичников [15].

Прямая репарация осуществляется при участии фермента MGMT (О6-Метилгуанин-ДНК-метилтрансфераза), удаляющего алкильные группы с гуанина в О6 положении и тимина в О4 положении [176]. Метилирующий эффект на гуанин в О6 положении оказывает темозоломид [182, 183]. Было обнаружено, что транскрипционный фактор GLI1 способен влиять на экспрессию *MGMT* в глиомах, взаимодействуя с GLI1-связывающим сайтом в его промоторной области [95, 184].

В репарации вырезанием оснований принимает участие множество ферментов. Как минимум шесть ДНК-гликозилаз обнаруживают и удаляют видоизмененные основания ДНК. После этого апуриновая- или апириимидиновая-эндонуклеаза совместно с фосфодиэстеразой вырезает сахарофосфат, а ДНК-полимераза совместно с ДНК-лигазой заделывают образовавшуюся брешь [185]. На культуре клеток рака толстой кишки HT29 и на цисплатин-резистентных клетках яичников человека было показано, что ингибирование GLI1 приводило к уменьшению экспрессии генов, ответственных за репарацию вырезанием оснований (*FEN1*, *UNG*, *LIG1*, *KIAA0101*, *XRCC1*) [178, 180].

Наиболее серьезными повреждениями ДНК является разрыв обеих цепей двойной спирали в результате действия ионизирующего излучения, ошибок репликации, окислителей и продуктов метаболизма [185]. В клетках млекопитающих существует два механизма репарации двухцепочечных разрывов: нехомологичного соединения концов и гомологичная рекомбинационная репарация [176]. В клетках человека преобладающим механизмом является

негомологичное соединение концов, а гомологичная рекомбинационная репарация запускается во время репликации ДНК. При негомологичном соединении концы сводятся лигированием ДНК, что сопровождается потерей нескольких нуклеотидов в месте соединения. Эти потери в большинстве своем не являются критическими в силу того, что белки кодирует лишь малая доля генома [176, 185]. Гомологичная рекомбинационная репарация новореплицированной ДНК является более точной, так как в качестве матрицы используется сестринская хроматида [176, 185].

В репарации двухцепочечных разрывов принимает участие множество белков, как уникальных, так и задействованных в других типах репарации поврежденной ДНК. Множество исследований демонстрирует, что ингибирование НН сигналинга на разных уровнях влияет на репарацию двухцепочечных разрывов по обоим типам. Так использование GANT61 понижает экспрессию гена *FEN1* (принимает участие в негомологичном соединении концов) [186] и генов *RAD51*, *RAD51C*, *RAD54B*, *RAD54L* (гомологичная рекомбинационная репарация) в клетках рака толстой кишки [178, 187]. А в клеточных линиях рака поджелудочной железы циклопамин снижает экспрессию генов, кодирующих белки Ku70, p-ATM и каталитическую субъединицу ДНК-зависимой протеинкиназы, устраняющие двухцепочечных разрывы после действия ионизирующего излучения [188]. Кроме того, циклопамин увеличивает радиочувствительность клеточных линий рака поджелудочной железы через ингибирование EGFR-зависимого пути [188].

Пациенты с синдромом Горлина имеют герминальную мутацию в гене *PTCH1*, что приводит к активации НН-пути и предрасположенности к спонтанным новообразованиям. У таких пациентов риск развития онкологического заболевания связан с воздействием ультрафиолетового и ионизирующего излучения, что также указывает на роль сигнального пути НН в ингибировании механизмов репарации поврежденной ДНК [176]. В эксперименте на $Ptc^{+/-}$ мышах отмечалось повышение экспрессии *GLII* с накоплением индуцированных ионизирующим излучением хромосомных aberrаций [189].

Влияние сигнального пути Hedgehog на процессы апоптоза в опухолевых клетках

Несмотря на то, что НН сигналинг и иные механизмы в опухолевых клетках стимулируют процессы репарации поврежденной ДНК, мутации в клетках с течением времени все равно могут накапливаться. К факторам, влияющим на накопление неустраненных мутаций можно отнести химическое строение терапевтического препарата (повреждения одними веществами могут устраняться с меньшей эффективностью, чем повреждения другими веществами, а

некоторые повреждения не подлежат устранению), концентрация химиотерапевтического препарата (при высоких концентрациях химиотерапевтического препарата клетка может не успевать устранять все повреждения ДНК) и активность репарационных систем, что в свою очередь зависит от влияния множества факторов. Аналогичные рассуждения справедливы и для ионизирующего излучения – тип излучения и доза излучения влияют на динамику накопления мутаций.

Накопленные мутации через запуск механизмов апоптоза должны приводить к клеточной гибели. В случае если гибель не наступает, такие клетки с мутациями продолжают неконтролируемо делиться, что вносит свою роль в течение онкологического заболевания, его прогрессию, метастазирование и отсутствие ответа на дальнейшую терапию [176, 190]. Существуют работы, демонстрирующие влияние сигнального пути HH на процессы апоптоза в опухолевых клетках

Апоптоз запускается за счет внутренних и внешних механизмов, которые в конечном итоге влияют на активацию каспазы 3, приводящей к деградации ДНК и образованию апоптотических телец. Апоптоз регулируется посредством семейства Bcl-2 белков, регулирующих проапоптотические и антиапоптотические факторы [190]. В исследованиях по ингибированию SMO и GLI1 (ингибирование осуществлялось при помощи малых интерферирующих РНК, висмодегиба и IPI-926) при раке поджелудочной железы наблюдалось повышение апоптоза путем регулирования каспазы 3 [137, 174, 191]. При помощи малых интерферирующих РНК к мРНК *GLI1* отмечалось увеличение апоптоза в клетках карциномы молочной железы [133]. При раке яичников обнаружена связь между функционированием HH сигналинга и уровнем Bcl-2, являющегося антиапоптотическим регулятором, и показано, что ингибирование HH сигналинга циклопамином вызывало апоптоз [142, 192]. Ингибирование HH сигналинга циклопамином при глиомах приводило к увеличению апоптоза [91, 193]. В кератиноцитах при базальноклеточной карциноме было показано, что GLI1 является транскрипционным фактором для гена *Bcl-2* и повышает его экспрессию, в то время как GLI3 ингибирует экспрессию *Bcl-2* через инактивацию GLI1 [194].

Влияние сигнального пути Hedgehog на химиорезистентность, обусловленную изменением аккумуляции и метаболизмом химиотерапевтических препаратов

ABC белки, получившие свое название благодаря наличию высокомолекулярных АТФ-связывающих доменов, составляют белковое суперсемейство и присутствуют у всех живых организмов [195]. Одной из функций ABC переносчиков является предотвращение накопления

экзогенных препаратов в клетках. В опухолевых клетках повышенное количество ABC переносчиков способствует мультилекарственной резистентности к доксорубину, темозоломиду, цисплатину, этопозиду, винкристину, метотрексату, эпирубину, колхицину, паклитакселу и другим химиопрепаратам [195-197]. За предотвращение накопления доксорубина, темозоломида и цисплатина в клетках в большей степени ответственны ABCB1 (Р-гликопротеин), ABCC1 и ABCC2 переносчики [196, 197].

Эти переносчики в своей структуре имеют субстрат-связывающие сайты, с которыми взаимодействуют экзогенные препараты после проникновения в клеточную мембрану [198]. Таким образом, ABC переносчики не выкачивают препараты из клеток, а предотвращают их проникновение из клеточной мембраны в цитоплазму.

Громоздкие амфифильные соединения за счет гидрофобной части быстро проникают в клеточную мембрану, в то время как гидрофильная часть препятствует быстрому проникновению в цитоплазму. Необходимого для этого времени оказывается достаточным для взаимодействия вещества с субстрат-связывающим сайтом ABC переносчика, после чего осуществляется транспортировка вещества из клеточной мембраны в окружающую среду. Механизм взаимодействия ингибиторов с ABC переносчиками обусловлен их эффективным конкурированием с химиопрепаратами за транспорт и благоприятными биофизическими свойствами. В присутствии большого количества ингибитора, активно взаимодействующего с субстрат-связывающим сайтом, ABC переносчики будут не успевать выкачивать громоздкие химиопрепараты и времени оказывается достаточно для проникновения части молекул химиопрепарат внутрь клетки [195, 199, 200]. Было продемонстрировано, что ABC переносчики эффективно выкачивает только те соединения, которые медленно проникают через мембрану, в то время как активно проникающие соединения полностью выкачивать не удается [200, 201].

Было показано, что GLI1 оказывает влияние на мультилекарственную резистентность, повышая экспрессию генов суперсемейства ABC: *MDR1* (он же *ABCB1*) и *BCRP* (он же *ABCG2*), белки которых активно выводят химиотерапевтические препараты из клетки [202]. На химиорезистентной культуре клеток лейкемии было показано, что ингибирование сигнального пути способствует снижению экспрессии *ABCB1* [203]. Аналогичные данные о влиянии HH сигнального пути на мультилекарственную резистентность, опосредованную повышением экспрессии *ABCG2*, получены в клетках В-клеточной лимфомы [204]. А ингибирование активности GLI1 приводило к снижению *ABCG2* в клетках В-клеточной лимфомы и опухолях рака поджелудочной железы [204, 205]. Влияние на Р-гликопротеин и *ABCG2* HH сигналинг оказывает также в эпителиальных клетках рака яичников и простаты [206, 207]. А комбинированное применение ингибитора HH сигналинга висмодегиба и доцетаксела

значительно увеличивало ответ на терапию, в сравнении с контролем, где клетки культивировали только в присутствии доцетаксела [208].

Помимо того, что НН сигналинг способен активировать процессы репарации ДНК, поврежденной цисплатином и другими платиносодержащими химиотерапевтическими препаратами, GLI1 также способен влиять на транспортеры накапливающие (OCT1/2/3, CTR1) платиносодержащие вещества в клетках и способствующие выведению (ATP7B) их из клеток. А ингибирование GLI1 приводит к накоплению цисплатина в ядре клетки. Эта регуляция осуществляется посредством связывания с GLI1-промоторной областью в 5' нетранслируемых регионах генов данных транспортеров. Также в генах этих транспортеров есть c-jun-промоторная область, следовательно, кроме прямого эффекта НН сигналинг может оказывать опосредованное влияние на их транскрипцию [209, 210].

На клетках карциномы молочной железы MCF7 было показано, что остеопонтин стимулирует мультилекарственную резистентность к цисплатину, доксорубину и паклитакселу. Данное влияние остеопонтина оказывает опосредованно, повышая активность НН пути, что сказывается на повышении транскрипции *ABCB1* и *ABCG2*. Также GLI1 оказывает стимулирующее влияние на экспрессию остеопонтина [211].

На клетках глиобластомы было показано, что применение микроРНК 9 способствует повышению экспрессии *ABCB1* и *ABCG2*. Такая регуляция скорее всего является опосредованной сигнальным путем НН, так как микро РНК 9 способна связываться с мРНК *PTCH1*, в результате чего активность сигнального пути НН повышается [212-214]. *ABCB1* способен связывать темозоломид и уменьшать его количество в клетках [197, 212]. Именно этим может быть обусловлено существование химиорезистентных к темозоломиду линий глиом [212]. Применение ингибитора SMO висмодегиба способствовало уменьшению химиорезистентности к темозоломиду [212]. При этом висмодегиб в концентрации более 3 мкМ помимо ингибирования SMO (концентрация менее 3 нМ), возможно, способствует ингибированию и самих переносчиков *ABCB1* и *ABCG2* [212, 215]. При медулобластомах и базальноклеточной карциноме некоторые мутации в *SMO* приводят к тому, что висмодегиб не способен взаимодействовать с SMO, что обуславливает резистентность к висмодегибу [117, 118, 216]. Было показано, что резистентность к висмодегибу можно преодолеть, применяя соединение NL-103, содержащее структурные элементы висмодегиба и вориностата (ингибитор гистондеацетилазы) [216].

Кроме регуляции процессов репарации, мультилекарственной резистентности и апоптоза, есть данные, что НН сигналинг способен модифицировать активность химиотерапевтических

препаратов. Так у пациентов с острым миелоидным лейкозом было показано, что НН сигналинг влияет на УДФ-глюкуронилтрансферазу 1А, что обуславливает глюкуронизацию рибоверина и цитарабина (Ara-C), терапия которыми оказывается неэффективной. УДФ-глюкуронилтрансфераза 1А способна присоединять глюкуроновую кислоту ко множеству лекарственных веществ, что также может способствовать резистентности к химиотерапии данными препаратами, что еще требует изучения [217].

Таким образом, сигнальный путь Hedgehog может рассматриваться в качестве терапевтической цели для преодоления множественной лекарственной резистентности.

Влияние сигнального пути Hedgehog на резистентность к радиотерапии

Помимо влияния на химиорезистентность, НН сигналинг вовлечен и в процессы уменьшения чувствительности к радиотерапии и в первую очередь за счет активации процессов репарации ДНК, поврежденной воздействием ионизирующего излучения, что рассмотрено выше.

На клетках гепатоцеллюлярной карциномы было показано, что НН сигналинг способствует уменьшению чувствительности клеток к ионизирующему излучению, где ингибирование Shh и GLI1 снижало радиопротекторное действие сигнального пути [218]. А на клетках глиомы было показано, что НН сигналинг может становиться активнее после воздействия на клетки ионизирующего излучения [219].

1.6.5 Влияние сигнального пути Hedgehog на другие процессы канцерогенеза

Изменение клеточного метаболизма

Несмотря на активный ангиогенез, в ткани опухоли вследствие активной пролиферации клеток могут возникать участки с недостаточным кровоснабжением и гипоксией. Известно, что опухоли адаптируются к условиям гипоксии за счет повышения экспрессии генов, стимулирующих анаэробный метаболизм, таких как *HIF-1α* [220]. Этот фактор позволяет опухолевым клеткам перестраивать метаболизм с окислительного фосфорилирования на процессы гликолиза [221]. Также известен тот факт, что отсутствие достаточного кровоснабжения в опухоли препятствует доставке химиотерапевтических препаратов, что повышает резистентность опухолевых клеток к проводимой терапии. Гипоксия приостанавливает процессы пролиферации, в то время как химиотерапевтические препараты

повреждают преимущественно активно пролиферирующие клетки [222, 223]. При гипоксии снижается эффективность радиотерапии, так как за счет сниженного содержания кислорода образуется меньше активных форм кислорода, оказывающих повреждающее действие на клетки [182]. Помимо изменения метаболизма HIF-1 α стимулирует процессы ангиогенеза и пролиферации опухолевых клеток. Также гипоксия приводит к нестабильности генома и повышенному накоплению мутаций [222].

При медуллобластоме активированный HH сигналинг запускает гликолиз через повышение транскрипции генов гексокиназы 2 и пируваткиназы M2. Применение циклоамина приводит к уменьшению процессов гликолиза и продукции лактата, в то время как применение ингибиторов пируваткиназы уменьшает HH сигналинг-опосредованную пролиферацию в экспериментах *in vitro* и рост медуллобластомы *in vivo* [11].

В исследованиях на культурах протоковой аденокарциномы поджелудочной железы было показано, что в условиях гипоксии повышается транскрипция *Shh*, *SMO*, *GLI1* и *MMP9*, а также увеличивается инвазивность клеток. Примечательно, что добавление рекомбинантного Shh или малых интерферирующих РНК к *Shh* не приводило к аналогичным или обратным эффектам. Но ингибирование трансмембранного рецептора SMO при помощи малых интерферирующих РНК приводило к уменьшению транскрипции *GLI1* и *MMP9* и уменьшению инвазивности. Применение малых интерферирующих РНК к *GLI1* и *MMP9* также уменьшало инвазивность клеток аденокарциномы. Эти данные свидетельствуют о влиянии гипоксии на активацию сигнального пути HH путем повышения экспрессии SMO [224]. Ингибирование HIF-1 α и *GLI1* в условиях гипоксии также приводило к уменьшению пролиферации и инвазивности клеток протоковой аденокарциномы поджелудочной железы [225].

В экспериментах на мышах с трансплантированной опухолью шейки матки было показано, что гипоксия приводит к уменьшению роста опухоли, но увеличению ее метастазирования, в то время как ингибирование сигнального пути HH приводило к уменьшению размеров опухоли и уменьшению метастазирования в лимфатические узлы до контрольного уровня (мышь с трансплантированной опухолью в условиях нормоксии) [226].

Эти данные свидетельствуют о том, что HH сигналинг принимает участие в адаптации клеток к гипоксии за счет перестройки клеточного метаболизма. А это в свою очередь приводит к уменьшению чувствительности опухолевых клеток к химиопрепаратам, повышению их миграционной и инвазивной активности и возможным другим процессам.

Воспалительные реакции

Воспалительные реакции в опухолевом микроокружении запускают ряд процессов, в том числе пролиферацию, ЭМП, ангиогенез, метастазирование, нарушение действия иммунного ответа, изменение реагирования на гормональные и химиотерапевтические препараты через воздействие на сигнальные пути NF- κ B, TGF- β , HH [128, 227-229]. NOD2 сигналинг, принимающий участие в запуске воспалительных реакций при воспалительных заболеваниях кишечника, может повышать функционирование HH сигналинга, что приводит к дальнейшему усилению воспалительного ответа [229]. Использование циклопамина в экспериментах на крысах, страдающих артритом, приводило к уменьшению экспрессии генов провоспалительных факторов IL-1 β , IL-6, TNF- α [230]. Снижение провоспалительных факторов наблюдалось и в эксперименте по применению висмодегиба на мышинных клетках гепатоцеллюлярной карциномы [231]. Также было показано, что у пациентов с *Helicobacter pylori*-ассоциированным гастритом перешедшим в метаплазию желудка GLI1 принимает участие в синтезе провоспалительных факторов и дифференцировке миелоидных клеток [232]. Эти факты могут свидетельствовать в пользу того, что HH сигналинг играет активную роль в процессах трансформации нормальных клеток в опухолевые, одним из механизмов при этом является запуск воспалительных процессов.

Уклонение от иммунного ответа

Опухолевые клетки способны уклоняться от иммунной системы посредством нескольких механизмов среди которых и иммунные супрессорные клетки, и лиганды с супрессорными свойствами, а в некоторых случаях иммунная система может даже способствовать развитию опухоли [233]. Опухолевые клетки могут предотвращать пролиферацию Т-клеток посредством увеличения количества толл-подобных рецепторов и уменьшению молекул главного комплекса гистосовместимости и других антигенов на своей клеточной мембране [234, 235]. Это приводит к активации регуляторных Т-клеток и супрессорных клеток миелоидного происхождения, которые подавляют противоопухолевый иммунитет [236]. В последние годы несколько групп исследователей отмечали связь между HH сигналингом и способностью опухоли подавлять иммунную систему. Так применение висмодегиба у пациентов с базально-клеточным раком кожи приводило к инфильтрации опухоли CD4 и CD8 Т-клетками, а также к повышению молекул главного комплекса гистосовместимости 1-го класса на поверхности опухолевых клеток [237]. В Т-клетках HH сигналинг активирует IL-4 – цитокин, способствующий приобретению Т-клетками Th2 фенотипа, благодаря которому иммунные клетки повышают

аллергические реакции и супрессируют иммунную систему, что способствует росту опухоли [12]. Также имеются и противоположные данные, в соответствии с которыми НН сигналинг приводит к активации клеток Т-киллеров, в то время как ингибирование сигналинга приводит к уменьшению цитотоксичности данных клеток [238]. Такая двойная активность сигнального пути свидетельствуют о сложных процессах регуляции иммунных функций посредством НН сигналинга [239].

Геномная нестабильность

Перед началом репликации клетка во множестве контрольных точек (т.н. checkpoints) проверяется на наличие химического или физического стресса или повреждения ДНК. Пока эти нарушения не будут устранены, клетка не способна приступить к репликации и делению. В случае невозможности устранения нарушений клетка подвергается апоптозу. Несмотря на то, что опухолевые клетки дефектны по своей природе и функциям, они стараются обойти контрольные точки, используя для этого различные сигнальные пути, в том числе и НН сигналинг [128, 240].

На клетках рака толстой кишки было продемонстрировано, что ингибирование GLI1 при помощи GANT61 или малых интерферирующих РНК приводило к аресту клеточного цикла в G1/S, ранней S фазе и G2/M контрольных точках. При этом наблюдалось понижение экспрессии генов, способствующих прохождению контрольных точек: *E2F2*, гена циклина E2, *Cdc25a*, *Cdk2*, для G1/S контрольной точки и генов циклина A2 и циклина B2, *Cdc25c*, *Cdc20*, *Cdc2* для G2/M контрольной точки [186, 187].

Мутации в *PTCH1* при базально-клеточной карциноме ассоциированы с аномальным входом клеток в клеточный цикл, аномальным синтезом циклинов D типа (белки, регулирующие клеточный цикл), сниженной экспрессией *p53* и повреждением ДНК. Также было показано, что мутации в *SUFU* могут приводить к блоку в G2/M фазе клеточного цикла, что может свидетельствовать о роли *SUFU* в преодолении G2/M контрольной точки [241].

Было показано, что GLI1 через регуляцию (ATR)/Chk1 сигналинга способен ингибировать процессы репликативного стресса и влиять на преодоление контрольной точки S-фазы клеточного цикла и резистентности к химиотерапии, что способствует увеличению геномной нестабильности в клетках опухоли. А применение ингибиторов НН сигналинга повышает чувствительность клеток рака легкого, прямой кишки и яичников к ингибиторам Топоизомеразы 1 (например, кампотецин, иринотекан и топотекан), что может рассматриваться как эффективная терапевтическая тактика при лечении этих онкологических заболеваний [242].

Гиперэкспрессия *GLI2-β* в человеческих кератиноцитах приводила к появлению хромосомных аномалий, таких как хромосомные транслокации, анеуплоидия и тетраплоидия, а также приводила к уклонению клеток от апоптоза и преодолению контрольных точек клеточного цикла [243].

Уклонение от подавления роста

Одним из механизмов опухолевых клеток, позволяющих им уклоняться от подавления роста является способность регулировать процессы аутофагии. Аутофагия запускается в результате клеточного стресса или действий инфекционных агентов. В процессе аутофагии наблюдается секвестрация клеточных элементов, их транспорт в лизосомы, деградация и последующая утилизация продуктов деградации [244].

Было показано, что НН сигналинг способен ингибировать процессы аутофагии при разных патологических процессах, в том числе и онкологических. А микобактерии, шигеллы и листерии способны ингибировать аутофагию путем активации сигнального пути НН через активацию mTOR [245]. Ингибирование SMO и GLI1 при немелкоклеточном раке легкого стимулировало процессы аутофагии и апоптоза [246]. В экспериментах на клеточных линиях протоковой аденокарциномы поджелудочной железы использование GANT-61 приводило к аутофагии клеток [247]. Аналогичный ответ на GANT-61 наблюдался и в клеточных линиях гепатоцеллюлярной карциномы [248]. Также есть данные об ингибировании аутофагии НН сигналингом при хондросаркоме [249]. Таким образом, уклонение клеток от аутофагии является одним из путей дальнейшего прогрессирования опухолевого процесса.

Теломеразная активность

Для опухолевых клеток характерна неограниченная способность репликации ДНК, что достигается путем повышения теломеразной активности. На клетках рака прямой кишки, простаты и глиобластомы было показано, что НН сигналинг регулирует теломеразную обратную транскриптазу, которая в комплексе с теломеразной РНК и двумя молекулами дискерина принимает участие в удлинении теломер [250, 251]. Ингибирование GLI1 при помощи GANT-61 приводило к снижению теломеразной активности [251]. При медуллобластоме были обнаружены мутации в промоторе *TERT*, повышающие теломеразную активность [252].

Глава 2. Материалы и методы

2.1 Реактивы, расходные материалы, клеточные линии и их культивирование

Работа с культурами клеток проводилась в ламинаре Esco SC2 Class II BSCc (Esco, Сингапур) в стерильных хирургических перчатках (SFM, Германия). Перед работой в ламинаре на 1 час включали ультрафиолетовую лампу. Ежедневно на ночь в культуральной комнате автоматически включались 3 ультрафиолетовые лампы.

Клетки выращивали на ростовых средах DMEM, DMEM/F-12 (Gibco, США) с добавлением GlutaMAX (Gibco, США) или L-глутамина (Gibco, США), раствора антибиотиков-антимикотиков (пенициллин, стрептомицин) (Gibco, США) и ЭБС (Biovest, Франция).

Среды и растворы готовили в стерильных полипропиленовых пробирках 50 мл и 15 мл (Corning, США). Приготовление растворов осуществлялось с помощью дозаторов (HTL SWIFT PET+, Польша) и стерильных серологических пипеток на 2, 5, 10 мл (Cellstar, США). Для внесения различных веществ использовали механические пипетки с переменным объемом (HTL Discovery Comfort, Польша) и наконечники на 1000, 200 и 10 мкл (OmniTip, США). Используемый стерильный пластик был одноразовым. Нестерильный пластик перед работой автоклавировался (Sanyo MLS3781L, Япония).

Клетки глиобластомы человека линии U-87 MG получены из Американского Банка клеточных культур (ATCC® Number: HTB-14™). Культура клеток глиобластомы человека U-251 MG была любезно предоставлена А.С. Халанским, руководителем лаборатории экспериментальной гистопатологии центральной нервной системы Научно-исследовательского института морфологии человека, Москва. Культура астроцитов человека была получена в отделе фундаментальной и прикладной нейробиологии “Национального медицинского исследовательского центра психиатрии и наркологии имени В.П. Сербского”. Клетки заморожены на втором пассаже и хранятся в жидком азоте в клеточном банке лаборатории.

Клетки глиобластомы человека линии U-87 MG культивировали в среде DMEM с низким содержанием глюкозы, с добавлением 10% ЭБС, 2 mM GlutaMAX, 100 ед/мл пеницилина, 100 мкг/мл стрептомицина. Клетки глиобластомы человека линии U-251 MG культивировали в среде DMEM с 4,5 г/л глюкозы, 10% ЭБС, 4 mM L-глутамина, 100 ед/мл пеницилина, 100 мкг/мл стрептомицина. Астроциты человека культивировали в среде DMEM/F-12 с 10% ЭБС, пенициллином (100 ед/мл) и стрептомицином (100 мкг/мл).

Клетки росли в культуральных флаконах 25 см² (Corning, США) при 37°C во влажной атмосфере с 5% CO₂ в CO₂ инкубаторе (Sanyo, Япония). Состояние культур и рост клеток контролировали с помощью микроскопии на инвертированном микроскопе Leica DMI 3000B (Leica, Германия).

При образовании монослоя культуры пассировали с коэффициентом рассева 1:3-1:10 и брали в эксперименты. При пассажах клеток ростовую среду удаляли, монослой промывали DPBS (Gibco, США). Для снятия клеток с пластика и получения суспензии клеток использовали 0,25% или 0,125% раствор Trypsin-EDTA (Gibco, США). К полученной суспензии клеток добавляли питательную среду и переносили в 2,0 или 1,7 мл пробирки (SSI, США). Клетки осаждали при 400g (Eppendorf centrifuge 5810R, Германия), отбирали супернатант и осадок клеток суспендировали в 1 мл ростовой среды. Подсчет клеток проводили в камере Горяева.

2.2 Препараты ингибирования и активации сигнального пути Hedgehog

В качестве ингибитора HH сигналинга использовали циклопамин (LC Laboratories, США), разведенный в DMSO (Sigma-Aldrich, США) до концентрации 5 мМ. При инкубации с клетками использовали концентрации препарата 5 и 10 мкМ. Концентрация DMSO в культуральной среде при этом составляла 0,2%. В части экспериментов с линией U-87 MG концентрация DMSO в культуральной среде составляла 1,6%. Для получения концентрации препарата 10 мкМ к 100 мкл клеточной суспензии добавляли 0,2 мкл 5 мМ раствора циклопамина. Для получения конечной концентрации препарата 5 мкМ к 100 мкл клеточной суспензии добавляли 0,1 мкл 5 мМ раствора циклопамина и 0,1 мкл растворителя (DMSO).

В качестве активатора сигнального пути применяли рекомбинантный человеческий N-концевой полипептид Shh (PeproTech, США). Лиофилизат препарата разводили до концентрации 100 мкг/мл в среде DMEM с низким содержанием глюкозы, содержащей 1% ЭБС.

2.3 Химиотерапевтические препараты

В качестве химиотерапевтических препаратов применяли цисплатин (Sigma-Aldrich, США) и доксорубин (LC Laboratories, США), разведенные в воде (8 мМ и 16 мМ,

соответственно), и темозоломид (Sigma-Aldrich, США), разведенный в среде DMEM с низким содержанием глюкозы (16 mM).

2.4 Выделение суммарной РНК и синтез кДНК

Клетки линий U-87 MG, U-251 MG и культуры астроцитов человека снимали с пластика, отмывали 2 раза DPBS (Gibco, США) и удаляли супернатант. К оставшейся массе клеток добавляли 700 мкл QIAzol Lysis Reagent (Qiagen, Германия), охлаждали на льду, добавляли 140 мкл хлороформа (Химмед, Россия) и центрифугировали 15 минут со скоростью 12000 оборотов в минуту при температуре 4 °C. 350 мкл верхней фазы отбирали при помощи пипетки на 1000 мкл, переносили в пробирку на 2 мл и добавляли 525 мкл 95% спирта. Пробирки помещали в автоматическую станцию для выделения нуклеиновых кислот и белков QIAcube (Qiagen, Германия). Далее на приборе при помощи одноразовых хроматографических silica spin колонок, RWT и RPE буферов и деионизированной воды выделяли суммарную РНК. 20 мкл отбирали для последующего анализа, а оставшуюся часть пробы помещали в кельвинатор (Sanyo, Япония) на -80 °C [253].

На спектрофотометре NanoVue Plus (GE, Великобритания) оценивали степень очистки РНК при помощи параметров A260/A280 и A260/A230, где A260, A280 и A230 – это поглощение света соответствующей длины волны. A260/A280 при качественной очистке должен находиться в пределах от 1,9 до 2,1 единиц, а A260/A230 в пределах от 2,0 до 2,2 единиц. Также на спектрофотометре определяли концентрацию РНК [253].

Далее 1500 нг РНК, предварительно смешанной в соотношении 5:1 с буфером внесения (10 mM Трис-НСl (pH7,6), 0,03% бромфеноловый синий, 60% глицерин, 60 mM ЭДТА), вносили в кювету с агарозным гелем, помещенную в электрофорезную камеру, содержащую необходимое количество 1x TBE буфера с бромистым этидием 0,5 мкг/мл. Агарозный гель также готовили на данном буфере (1 г агарозы добавляли к 100 мл 1x TBE буфера с бромистым этидием 0,5 мкг/мл). Электрофорез проводили в течение 30 минут при градиенте напряженности 3 В. После этого качество РНК оценивали на цифровой документирующей станции ImageQuant LAS4000 (GE, Великобритания). Качество выделенной РНК оценивали по соотношению интенсивностей флуоресценции полос от 28S и 18S рибосомальной РНК. Соотношение интенсивностей флуоресценции должно находиться в пределах от 1,5 до 2,5 единиц, в этом случае РНК является нераспавшейся [253].

Перед синтезом кДНК образцы выделенной РНК доставали из кельвинатора, помещали на лед и ставили в холодильник на 4 °С для постепенного оттаивания. Данная процедура проводилась для замороженных образцов. Часть образцов сразу после выделения обрабатывались дезоксирибонуклеазой I, после чего проводили синтез кДНК [253].

Брали 1000 нг РНК, доводили объем до 8 мкл, добавляли 1 мкл 10x буфера (100 мМ Tris-HCl (pH 7,5) 25 мМ MgCl₂, 1мМ CaCl₂) и 1 мкл раствора дезоксирибонуклеазы I (DNase I, RNase-free, 1 ед/мкл (Fermentas, Литва)). Смесь помещали в амплификатор GeneAmp System 9700 (Applied Biosystems, США) на 30 минут при температуре 37 °С. Для инактивации фермента дезоксирибонуклеазы I вносили 1 мкл 50 мМ ЭДТА и смесь нагревали до температуры 65 °С в течение 10 минут [253].

Для синтеза кДНК применяли набор MMLV RT kit (Евроген, Россия). Первоначально для расплавления вторичных структур РНК смесь нагревали в амплификаторе до 70 °С и охлаждали на льду. Для приготовления смеси к 10 мкл раствора суммарной РНК, обработанной дезоксирибонуклеазой I, добавляли 2 мкл раствора dNTP (по 10 мМ каждого нуклеозидтрифосфата), 2 мкл DTT (20 мМ), 1 мкл случайных декануклеотидных (20 мМ) и 1 мкл олиго(dT) праймеров (20 мМ), 4 мкл 5x буфера для синтеза первой цепи (280 мМ Tris-HCl (pH8,7), 375 мМ KCl, 30 мМ MgCl₂). В последнюю очередь вносили 1 мкл обратной транскриптазы вируса лейкемии мышей (MMLV RT). Готовую смесь помещали в амплификатор, где проводили инкубацию при температуре 37 °С в течение 60 минут, а затем при температуре 70 °С в течение 20 минут. Приготовленные образцы разводили в 100 мкл свободной от ферментов деионизированной воде и хранили при температуре -25 °С [253].

Полимеразную цепную реакцию в реальном времени проводили для кДНК клеток линий U-87 MG, U-251 MG, культуры астроцитов человека, 25-и первичных образцов глиом 3-ей и 4-ой степени злокачественности и 4-х контрольных образцов здоровой ткани мозга после аутопсии. Последние 29 образцов были любезно предоставлены Ф.А. Кошкиным из коллекции лаборатории отдела медицинских нанобиотехнологий МБФ РНИМУ им. Н.И. Пирогова. Образцы опухолей были получены в НИИ нейрохирургии им. академика Н.Н. Бурденко в 2012-2014 годах. Все пациенты подписали информированное согласие. Коллекция состоит из образцов первичных опухолей, не подвергавшихся химио- и радиотерапии, и контрольных образцов. Гистологический диагноз (в том числе и степень злокачественности) устанавливался в НИИ нейрохирургии им. академика Н.Н. Бурденко. Образцы были анонимизированы, гистологический диагноз выдавался пронумерованным в соответствии с номером пробирки. В качестве контрольных образцов использовали образцы аутопсии мозга, которые забирали в

течение 7-10 часов после наступления смерти. Пациенты не страдали онкологическими и неонкологическими заболеваниями центральной нервной системы [253].

После получения, образцы измельчали и помещали в полипропиленовые 15 мл пробирки (Corning, США) и добавляли 3 мл буфера RNeasy Lysis Reagent (Qiagen, Германия). Образцы хранились в холодильнике при температуре +4 °C от 1 до 7 дней, после чего буфер забирали, а образцы помещали в криопробирки 1,2 мл (Corning, США) и хранили при температуре от -70 до -80 °C [253].

Из данных образцов Ф.А. Кошкиным была выделена суммарная РНК и получена кДНК по методикам, аналогичным применявшимся в нашей работе. Для выделения суммарной РНК ткани измельчали в лабораторном гомогенизаторе TissueLyser LT (Qiagen, Германия) с добавлением 700 мкл RNeasy Lysis Reagent (Qiagen, Германия) [253].

2.5 Проведение полимеразной цепной реакции в реальном времени

Нуклеотидные последовательности исследуемых мРНК брали с ресурса NCBI Gene (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>). Праймеры подбирали при помощи программы Beacon Designer 8 (Premier Biosoft International, США). В качестве гена “домашнего хозяйства” был выбран *GAPDH* (*GAPDH*-F TTGGTATCGTGGAAGGACTCA и *GAPDH*-R AGTAGAGGCAGGGATGATGTT). Оценивали экспрессию мРНК *GLI1* (*GLI1*-F GCCACCAAGCTAACCTCATGTC и *GLI1*-R CTGCACTCCGGGGAGAAGAAAAG) и *tGLI1* (*tGLI1*-F TGGGGACAGAAGTCAAGTTG и *tGLI1*-R AATGGAGAGATGACCGTAGGA).

Праймеры для *GLI1* были подобраны таким образом, чтобы они отжигались на участок, отсутствующий у *tGLI1* (рис. 4). Задача по подбору праймеров к *tGLI1* оказалась сложнее. Праймеры подбирали так, чтобы они не отжигались на *GLI1*. Для этого было необходимо, чтобы один из праймеров отжигался на участке соединения второго и четвертого экзонов (рис. 4). Испытывали праймеры на клетках глиобластомы человека U-87 MG. Первые 4 пары с дополнительными комбинациями праймеров между собой оказались нерабочими, так как не визуализировался однородный пик на кривой плавления и не было одной полосы на электрофореze. Успешно отжигалась только пятая пара подобранных праймеров (5'-TGGGGACAGAAGTCAAGTTG-3' и 5'-AATGGAGAGATGACCGTAGGA-3'). Специфический продукт на электрофореze визуализировался только при температуре отжига праймеров от 62 °C и выше (рис. 5).



Рисунок 4. Схематическое изображение структуры мРНК *GLI1* и сплайсингового варианта *tGLI1*. Стрелками обозначены прямой и обратный праймеры.

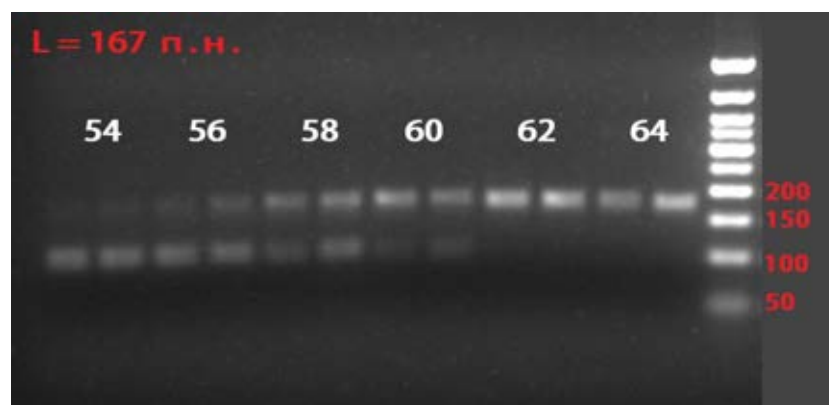


Рисунок 5. Электрофорез в агарозном геле, выполненный для продуктов кДНК *tGLI1* из клеток U-87 MG. Длина продукта (L) равна 167 п.н. Крайняя правая полоса – коммерческий ДНК маркер (Сиб-энзим, Россия).

Полимеразную цепную реакцию в реальном времени выполняли на приборе StepOnePlus (Applied Biosystems, США) с использованием готовой смеси qPCRmix-HS SYBR+ROX (Евроген, Россия), содержащей интеркалирующий краситель SYBR Green I. Для приготовления реакционной смеси брали 5 мкл деионизированной воды, 2 мкл готовой смеси qPCRmix-HS SYBR+ROX, по 1 мкл обоих праймеров и 1 мкл кДНК [253].

Амплификатор настраивали следующим образом: денатурация 5 минут при температуре 95°C, после этого выполнялось 40 циклов (денатурация 20 секунд при 95 °C и отжиг 30 секунд при 63°C). В каждом эксперименте реакции выполняли в 3-х повторах. Каждый эксперимент выполняли 2 раза [253].

Для оценки специфичности реакции строили кривые плавления для получаемых продуктов полимеразной цепной реакции и проводили электрофорез продуктов в 1% агарозном

геле с последующей детекцией на цифровой документирующей станции ImageQuant LAS4000 (GE, Великобритания). Относительный уровень экспрессии рассчитывали при помощи $\Delta\Delta Ct$ метода в программе Microsoft Excel 2010. Ct – пороговый цикл реакции. $\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{ген интереса в опыте}} - Ct_{\text{ген "домашнего хозяйства" в опыте}}) - (Ct_{\text{ген интереса в контроле}} - Ct_{\text{ген "домашнего хозяйства" в контроле}})$ [253, 254].

2.6 Анализ пролиферации и жизнеспособности клеток с использованием технологии измерения электрического импеданса

Работа по изучению пролиферации клеток и их гибели под действием химиотерапевтических препаратов выполнялась на приборе xCELLigence (Roche Diagnostics, Швейцария). Клетки культивировали в 16-луночных Е-плашках, помещенных в прибор, на дне которых расположены золотые микроэлектроды. С помощью электродов прибор автоматически измеряет электрическое сопротивление клеточной популяции в каждой лунке через заданные промежутки времени, представляя информацию в реальном времени. Это позволяет контролировать жизнеспособность культивируемых клеток.

О клеточном статусе можно судить по клеточному индексу – количественному показателю, который рассчитывается по формуле:

$$КИ = \left(\frac{R_{\text{cell}}(f)}{R_0(f)} - 1 \right),$$

где $R_{\text{cell}}(f)$ и $R_0(f)$ являются частотно-зависимыми сопротивлениями золотых микроэлектродов с клетками и без клеток соответственно [255]. Таким образом, чем больше клеток расположено на золотом микроэлектроде, тем больше значение $R_{\text{cell}}(f)$, тем большим оказывается значение КИ, что наблюдается при пролиферации клеток. При гибели клеток, например при старении культуры или при воздействии различных цитотоксических агентов наблюдается обратный эффект и отмечается уменьшение КИ.

На одной Е-плашке размещено 16 лунок. Прибор может измерять сопротивление с трех Е-плашек, то есть с 48 лунок. Плашки могут анализироваться как отдельно, в случае 3-х независимых экспериментов, так и вместе, если объединены в рамках одного эксперимента. При необходимости использования более 16 лунок брали вторую Е-плашку.

Для того, чтобы к началу эксперимента температура прибора составляла 37°C его помещали в инкубатор. В каждую лунку Е-плашки вносили по 100 мкл ростовой среды. Плашку ставили в прибор, а через 10 минут измерялось сопротивление $R_0(f)$. Это время

необходимо, чтобы температура плашки и среды достигла 37°C. После измерения начального сопротивления, плашку извлекали из прибора и в лунки вносили 90 мкл суспензии клеток в ростовой среде. Количество клеток подбиралось отдельно для каждой культуры, что будет описано в главе результаты. После этого к 190 мкл, содержащимся в лунке, вносили 10 мкл 20-и кратного раствора соответствующей испытуемой концентрации препарата (лиганд Shh или ингибитор сигнального пути циклопамин). В случае контрольных образцов вносили 10 мкл культуральной среды или культуральной среды с DMSO. Для уменьшения испарения в лунках пространства между ними заполняли DPBS. Буфер вносили аккуратно, избегая попадания капель в лунки. В качестве контроля на изменение начального сопротивления, связанного с испарением, две лунки заполняли только 200 мкл ростовой среды. Результаты первых серий опытов показали, что значимого изменения сопротивления, вызванного испарением не наблюдается, после чего данный контроль был исключен из экспериментов. Заполненная плашка помещалась в прибор. Через 15 минут, когда температура в лунках достигала 37°C, а большинство клеток оседало на дно, начинали измерения. Измерения выполнялись каждые 15 минут минимум в течение 50 часов. На приведенных диаграммах результаты измерения для наглядности отображаются через каждые 120 минут. Все измерения выполняли в 3-х повторях. Данные влияния лиганда Shh и циклопамина представлены в виде среднего с планками погрешностей, отображающими стандартное отклонение.

Вторая часть работы на приборе xCELLigence была посвящена изучению влияния циклопамина и лиганда Shh на гибель клеток при воздействии химиотерапевтических препаратов. В соответствии с описанным выше протоколом, клетки культивировали в течение двух суток в присутствии активатора или ингибитора HH пути. Для клеток, которые культивировали в присутствии циклопамина, контролем служили клетки, растущие в среде с добавлением 0,2% DMSO. Для клеток с лигандом Shh использовался контроль с внесением культуральной среды.

Через 2 дня E-плашку извлекали из прибора, переносили в ламинар и пипеткой на 200 мкл отбирали среду из лунок. Носик пипетки при этом ни в коем случае не должен касаться дна лунки с нанесенными золотыми микроэлектродами. Последовательно удаляли среду из трех параллельных лунок, являющихся одной точкой эксперимента. При такой манипуляции исключался шанс контаминации клетками, культивированными при других условиях, и высыхание клеток. Затем в эти лунки вносили по 200 мкл среды с определенной концентрацией химиотерапевтического препарата. Внесение среды производили с небольшой скоростью пипеткой на 200 мкл на стенку лунки, тем самым мы предотвращали смывание клеток со дна лунки, что способствовало бы уменьшению сопротивления при продолжении эксперимента.

Дополнительно ставили контроль, в котором клетки двое суток росли в среде без циклопана и DMSO, после чего среду меняли на свежую.

Измерения в этой части работы выполняли в 3-х повторах минимум в течение 120 часов. Кривые скорости пролиферации клеток до внесения химиотерапевтического препарата полностью соответствуют результатам, полученным в первой части работы, поэтому, значения клеточного индекса на графиках представлены в виде среднего без планок погрешностей со стандартным отклонением. Влияние ингибитора или активатора на химиорезистентность оценивали по времени, когда начиналась гибель клеток после внесения химиотерапевтического препарата, то есть в то время, когда КИ имел максимальное значение.

2.7 Оценка жизнеспособности клеток при помощи проточной цитофлуориметрии

Оценка жизнеспособности клеток с определением процента погибших клеток и клеток в состоянии апоптоза проводилась при помощи набора Alexa Fluor 488 annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit (Thermo Fisher Scientific, США), который включал в себя 5-Х аннексин-связывающий буфер, йодистый пропиций (PI 1 мг/мл) и Alexa Fluor 488 меченый аннексин V. В работе применяли 1-Х аннексин-связывающий буфер (5-Х аннексин-связывающий буфер разводили в 5 раз в деионизированной воде) и рабочий раствор йодистого пропиция (1 мг/мл йодистого пропиция разводили 1-Х аннексин-связывающим буфером до 100 мкг/мл). При помощи йодистого пропиция, являющегося интеркалирующим красителем возможно определение погибших клеток. Аннексин V способен связываться с фосфатидилсерином, присутствующим на мембранах клеток, находящихся в состоянии апоптоза.

Клетки высаживали в 12-луночные плашки (Costar, США). Так как результаты в данном тесте сравнивались с результатами тестов измерения электрического импеданса, мы воспроизводили аналогичные условия. Поскольку площадь дна лунки в 12-луночной плашке в 20 раз больше площади дна лунки в Е-плашке, мы высаживали в 20 раз больше клеток ($0,1 \cdot 10^6$ клеток астроцитов человека, $0,2 \cdot 10^6$ клеток линии U-251 MG, $0,4 \cdot 10^6$ клеток линии U-87 MG) и, соответственно, увеличивали объем среды (4 мл/лунку). Для клеток культуры астроцитов человека использовали концентрацию циклопана 5 мкМ, 10 мкМ и 20 мкМ. При этом количество препарата на число клеток соответствовало таковому в Е-плашках. Клетки астроцитов человека и U-251 MG росли 50 часов, а клетки U-87 MG – 60 часов, что соответствовало времени анализа КИ в экспериментах с измерением электрического импеданса. В контроле клетки астроцитов человека и U-251 MG культивировали с 0,2% DMSO (контроль

для образцов с 5 и 10 мкМ циклопамина) и с 0,4% DMSO (контроль для образцов с 20 мкМ циклопамина). Клетки U-87 MG в контроле культивировали в присутствии 1,6% DMSO (контроль для образцов с 5 и 10 мкМ циклопамина). Все измерения выполняли в 3-х повторях.

По окончании времени культивирования среду отбирали, клетки промывали DPBS (Gibco, США), снимали с пластика, используя Trypsin-EDTA (Gibco, США). Клетки центрифугировали при 400g (Eppendorf centrifuge 5810R, Германия) в течение 5 минут, после чего супернатант отбирали и клетки ресуспендировали в 1 мл холодного DPBS. Суспензию переносили в пробирки на 1,5 мл.

После этого клетки повторно центрифугировали, супернатант отбирали и вносили 100 мкл 1-Х аннексин-связывающего буфера комнатной температуры. Клетки подсчитывали в камере Горяева, после чего готовили образцы, содержащие $0,1 \cdot 10^6$ клеток в 100 мкл 1-Х аннексин-связывающего буфера. К 100 мкл клеточной суспензии вносили 5 мкл Alexa Fluor 488 меченый аннексин V и 1 мкл рабочего раствора йодистого пропидия. Клетки инкубировали при комнатной температуре 15 минут, после чего вносили 400 мкл 1-Х аннексин-связывающего буфера и помещали образцы на лед. Анализ образцов проводили на клеточном сортере (Beckman MoFlo XDP, США), используемом в качестве проточного цитометра.

Предварительно проводилась настройка лазеров и оптических систем клеточного сортера (Beckman MoFlo XDP, США). Синий лазер (длина волны 488 нм) и соответствующие светофильтры настраивали с помощью калибровочных частиц (Beckman Flow-Check Fluorospheres, США). Для оценки флуоресценции Alexa Fluor 488 использовали канал FL-1 с диапазоном пропускаемых длин волн 515-543 нм. Для оценки флуоресценции йодистого пропидия использовали канал FL-4 с диапазоном длин волн 655-685 нм. Использовать канал FL-3 с диапазоном пропускаемых длин волн 606-635 нм не стали, так как интенсивность флуоресценции в каналах FL-3 и FL-4 была сопоставимой, но в канал FL-4 в отличие от канала FL-3 не попадала флуоресценция от Alexa Fluor 488.

Предварительно по отрицательному контролю, которым служили неокрашенные клетки, в точечной диаграмме выставляли границы. После этого проводили анализ экспериментальных образцов с подсчетом количества погибших клеток (PI+, Alexa Fluor 488 меченый аннексин V +) и клеток в состоянии апоптоза (PI-, Alexa Fluor 488 меченый аннексин V +) (рис. 6).

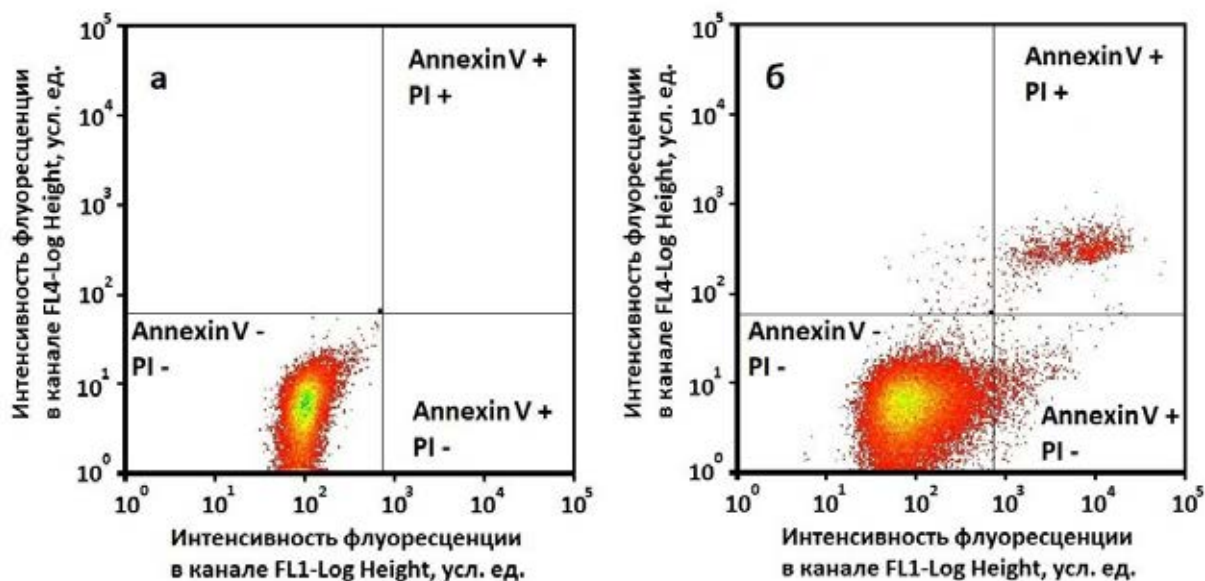


Рисунок 6. Точечные диаграммы, позволяющие определять процент погибших клеток и клеток в состоянии апоптоза. (а) – отрицательный контроль без добавления красителей, (б) – клетки, культивируемые с добавлением 10 мкМ циклопamina и окрашенные при помощи набора Alexa Fluor 488 annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit. Данные представлены для клеток культуры астроцитов человека.

2.8 Определение процента клеток боковой популяции

Оценка процента клеток, составляющих боковую популяцию, сначала проводилась на клетках, культивируемых при обычных условиях. После этого в течение 2-х суток клетки культивировали в присутствии 5 и 10 мкМ циклопamina с концентрацией DMSO 0,2%. В контроле клетки культивировали в ростовой среде с 0,2% DMSO.

Работа выполнялась в соответствии с протоколом, предложенным разработчиками метода [256-260]. После снятия клеток их дважды отмывали в растворе HBSS+ (HBSS (Gibco, США), 2% FBS, 2 mM HEPES (Gibco, США)). Клетки ресуспендировали в DMEM+ (среда DMEM для культур клеток без фенолового красного, с 2% ЭБС, 2mM HEPES). Для каждой пробы (клетки с 5 и 10 мкМ циклопamina и контрольные клетки) готовили 5-6 образцов по 500 мкл с $1 \cdot 10^6$ клеток/мл. В два образца добавляли верапамил до конечной концентрации 50 мкМ (Sigma-Aldrich, США). Все образцы помещали на водяную баню с температурой 37 C°. Через 15 минут во все образцы добавляли краситель DCV до конечной концентрации 5 мкМ (0,5 мкл красителя Vybrant® DyeCycle™ Violet Stain, Invitrogen, США на 500 мкл образца) и оставляли образцы на

водяной бане в темноте на 90 минут. Для предотвращения оседания клеток на дно пробирок, их регулярно перемешивали при помощи пипетки на 200 мкл.

Во время заключительного этапа подготовки образцов проводилась настройка лазеров и оптических систем клеточного сортера, использовавшегося в качестве проточного цитометра (Beckman MoFlo XDP, США). Синий лазер (длина волны 488 нм) и светофильтры, регистрирующее прямое и боковое светорассеяние настраивали с помощью калибровочных частиц (Beckman Flow-Check Fluorospheres, США). Фиолетовый лазер (405 нм) с соответствующими фильтрами настраивали по другим калибровочным частицам (Beckman Flow-Check Pro Fluorospheres, США).

По окончании инкубации образцы помещались на лед; в пробирки добавлялся DMEM+ (4°C) до 2 мл. Образцы центрифугировали (Eppendorf centrifuge 5810R, Германия) при 400g 7 минут при температуре 4°C, отбирали супернатант и добавляли по 300 мкл DMEM+ (4°C). После этого все образцы помещали в холодильник.

Начиная с контрольных образцов с ингибитором (образцы с верапамилом), образцы поочередно инкубировали 5 минут с йодистым пропидием в конечной концентрации 2 мкг/мл (Propidium Iodide Nucleic Acid Stain Solution, Invitrogen, США) и анализировали на клеточном сортере.

Флуоресценцию от йодистого пропидия, окрашивающего погибшие клетки, регистрировали в двух каналах флуоресценции синего лазера (FL₃ с диапазоном длин волн 605-635 нм и FL₄ с диапазоном длин волн 655-685 нм). Флуоресценцию от DCV регистрировали в каналах фиолетового лазера (FL₆ с диапазоном длин волн 432-482 нм, FL₇ с диапазоном длин волн 655-685 нм). Для разделения флуоресценции на каналы между ними был установлен дихроичный фильтр (пропускает свет с длинами волн более 506 нм и отражает свет с меньшими длинами волн).

Гейтирование клеток осуществлялось по морфологии и жизнеспособности (выбирались негативные клетки в каналах флуоресценции йодистого пропидия). По контрольным образцам с ингибитором устанавливали границу области боковой популяции, после чего в опытных образцах определяли процент клеток боковой популяции. Визуализация данных осуществлялась в программе Summit V5.2.0.7477 (Beckman Coulter, США).

2.9 Работа с литературой

Для поиска литературных источников была использована поисковая система Pubmed базы данных Medline и научная электронная библиотека eLibrary.ru. Для научных публикаций в автоматическом режиме или вручную создавалась библиографическая ссылка с информацией по данной публикации. Управление библиографической информацией осуществлялось с помощью программы EndNote X6 (Thomson Reuters, Канада). Программа использовалась для цитирования и оформления списка использованной литературы. Кроме того, аппаратные средства программы позволяли создавать группы из публикаций, прикреплять pdf-версии статей и делать пометки, что упрощало работу с литературой.

2.10 Статистическая обработка полученных результатов

Статистическую обработку полученных результатов проводили при помощи пакета прикладных программ Statistica 7.0 и Microsoft Excel 2010. Данные представлены в виде $M \pm \sigma$, где M – среднее или математическое ожидание, σ – стандартное отклонение.

В экспериментах по оценке влияния лиганда Shh на пролиферацию клеток использовали попарное сравнение значений КИ в каждой временной точке с помощью U-критерия Манна-Уитни. Сравнение значений КИ в определенное время проводили с помощью t-критерия Стьюдента. При этом в каждой группе оценивали нормальность распределения значений КИ при помощи критерия Шапиро-Уилка и равенство дисперсий распределения значений КИ при помощи критерия Левена. После этого рассчитывали t-критерий Стьюдента и сравнивали с табличным при $\alpha=0,05$, а также рассчитывали значение уровня значимости p . При $p<0,05$ принимали гипотезу о существовании различий средних значений КИ с уровнем статистической значимости p [261, 262].

В экспериментах по оценке влияния циклопамина на пролиферацию клеток использовали попарное сравнение значений КИ в каждой временной точке в образцах, росших с добавлением 5 и 10 мкМ циклопамина, и контролем с помощью U-критерия Манна-Уитни. Сравнение значений КИ в определенное время проводили с помощью метода Краскела-Уоллиса. Определяли значение уровня значимости p , в случае $p<0,05$ принимали гипотезу, что группы получены из разных генеральных совокупностей, после чего проводили парное сравнение групп. Дополнительно значения сравнивали при помощи дисперсионного анализа, сначала

проверяли гипотезу о равенстве дисперсий распределения значений КИ при помощи критерия Левена, после чего проводили дисперсионный анализ. В случае $p < 0,05$ переходили к апостериорному сравнению групп. Для анализа связи КИ и концентрации циклопамина (отсутствие циклопамина, 5 и 10 мкМ) использовали оценку корреляции при помощи метода Спирмена. Рассчитывали коэффициент корреляции Спирмена r при уровне значимости $p < 0,05$ [261, 262].

В экспериментах по оценке цитотоксического действия циклопамина применяли t -критерий Стьюдента в случае двух сравниваемых групп и дисперсионный анализ для трех сравниваемых групп с проведением предварительных оценок гипотез о нормальности распределений значений и равенстве дисперсий распределения значений, как это описано выше. Достоверными считали отличия при $p < 0,05$. Для анализа связи процента погибших клеток и клеток в состоянии апоптоза с концентрацией циклопамина (отсутствие циклопамина, 5 и 10 мкМ) использовали оценку корреляции при помощи метода Спирмена при уровне значимости $p < 0,05$ [261, 262]. Аналогичным образом проводили статистическую обработку данных в экспериментах по определению процента клеток боковой популяции.

В экспериментах по оценке времени начала гибели клеток применяли t -критерий Стьюдента в случае двух сравниваемых групп и дисперсионный анализ для трех сравниваемых групп с проведением предварительных оценок гипотез о нормальности распределений значений и равенстве дисперсий распределения значений, как это описано выше. Дополнительно применяли U -критерий Манна-Уитни и метод Краскела-Уоллиса, дополненный парным сравнением групп. Достоверными считали отличия при $p < 0,05$. Для анализа связи времени начала гибели клеток с концентрацией циклопамина (отсутствие циклопамина, 5 и 10 мкМ) использовали оценку корреляции при помощи метода Спирмена при уровне значимости $p < 0,05$ [261, 262].

В экспериментах по оценке уровня экспрессии *GLII* применяли U -критерий Манна-Уитни и метод Краскела-Уоллиса, дополненный парным сравнением групп. Достоверными считали отличия при $p < 0,05$ [261, 262].

Глава 3. Результаты

3.1 Оценка уровня экспрессии *GLI1* и *tGLI1*

Экспрессию *tGLI1* оценивали в клетках линий U-87 MG, U-251 MG, клетках культуры астроцитов, 25 первичных образцах глиом 3 и 4 степени злокачественности и 4-х образцах здоровой ткани мозга (образцы кДНК были любезно предоставлены Ф.А. Кошкиным). Экспрессия *tGLI1* была обнаружена только в культуре глиобластомы человека U-87 MG.

Количество *tGLI1* в клетках линии U-87 MG значительно меньше, чем *GLI1*. Одинакового уровня флуоресценции продукты ПЦР для мРНК *GLI1* и *tGLI1* достигают с разницей в 7,5 циклов (рис. 7). По грубым подсчетам, пренебрегая эффективностью ПЦР и длиной образуемых продуктов, получается, что количество мРНК *tGLI1* примерно в 180 раз меньше ($2^{7.5}$), чем *GLI1*. В отличие от кривых накопления для мРНК *GLI1*, кривые накопления для мРНК *tGLI1* не совпадают друг с другом, следовательно при сравнении данные по количеству мРНК *tGLI1* будут иметь большую стандартную ошибку среднего арифметического и большое стандартное отклонение.

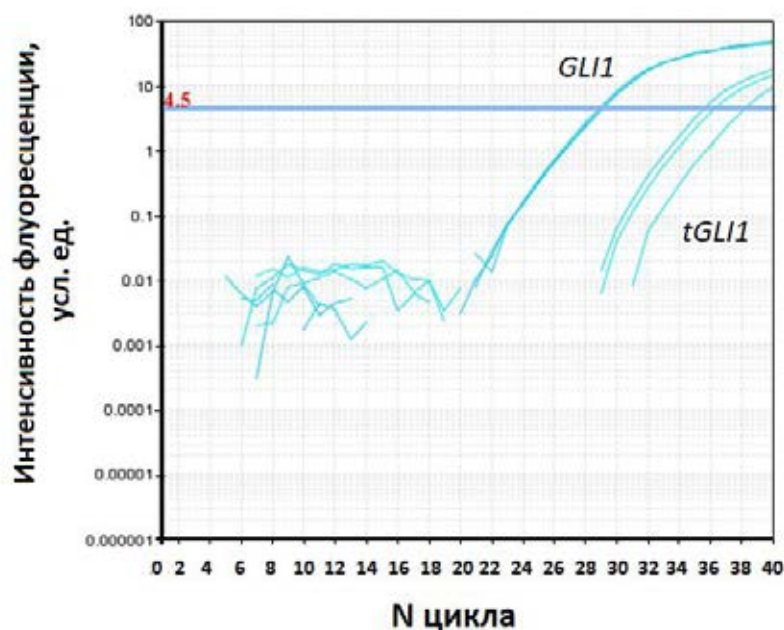


Рисунок 7. Графики накопления продуктов полимеразной цепной реакции для *GLI1* и *tGLI1*.

Экспрессию *GLI1* оценивали в клеточных линиях и первичных образцах глиом. В культуре клеток U-87 MG было обнаружено повышение уровня мРНК *GLI1* в 7,5 раз по

сравнению с клетками астроцитов человека, что достоверно отличается (рис. 8 а). В клетках линии U-251 MG уровень экспрессии *GLII* был в 4,7 раза выше, чем в астроцитах, что достоверно отличается (рис. 8 а). При исследовании первичных образцов глиом было обнаружено, что уровень экспрессии *GLII* достоверно не превышает таковой уровень в контрольных образцах здоровой ткани мозга (рис. 8 б).

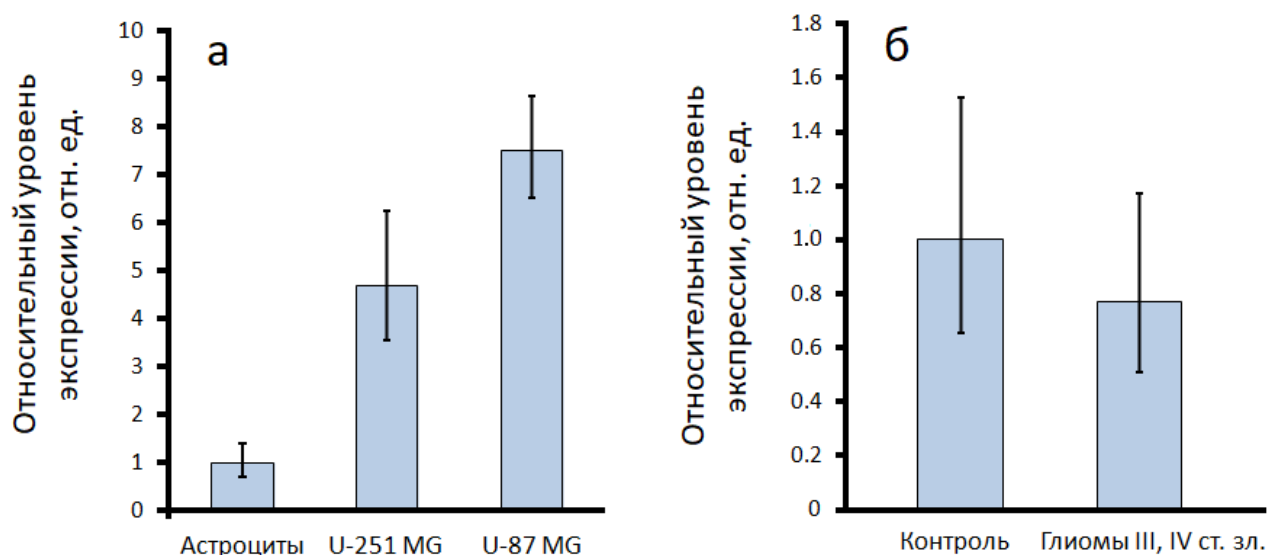


Рисунок 8. Диаграммы, отображающие уровень экспрессии *GLII* в клетках линий U-251 MG и U-87 MG относительно культуры астроцитов (а) и в образцах глиом 3 и 4 степени злокачественности относительно образцов здоровой ткани мозга (б).

3.2 Изучение влияния сигнального пути Hedgehog на пролиферацию клеток

Определение оптимального количества клеток в титрационном тесте

Культуры клеток отличаются скоростью роста, поэтому в первую очередь нами был выполнен тест, где оценивалась зависимость пролиферации от количества посаженных клеток для каждой исследуемой культуры. Отталкиваясь от рекомендаций производителя (Roche Diagnostics), мы пришли к выводу, что оптимальным является такое количество клеток при засеве культуры, при котором значение КИ через 10 часов культивирования будет находиться в пределах от 0,5 до 1,0 усл. ед.. Таким образом, количество посаженных клеток на лунку соответствовало 5000 для культуры астроцитов человека (рис. 9), 20000 – для линии глиомы U-87 MG, 10000 – для линии глиомы U-251 MG (данные не представлены).

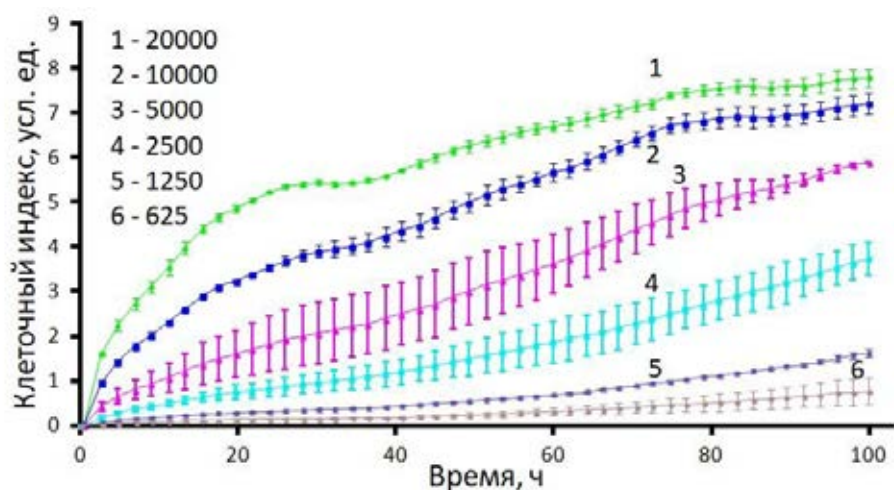


Рисунок 9. Зависимость КИ культуры астроцитов человека от времени культивирования и количества посаженных клеток. Планки погрешностей отображают стандартное отклонение.

Изучение эффекта лиганда Shh на пролиферацию клеток

После определения оптимального количества засева клеток мы изучили влияние лиганда SHH и циклопамина на процессы клеточной пролиферации исследуемых культур. Добавление Shh в конечной концентрации 3 мкг/мл к клеткам линии глиобластомы U-251 MG приводило к увеличению пролиферации клеток (рис. 10).

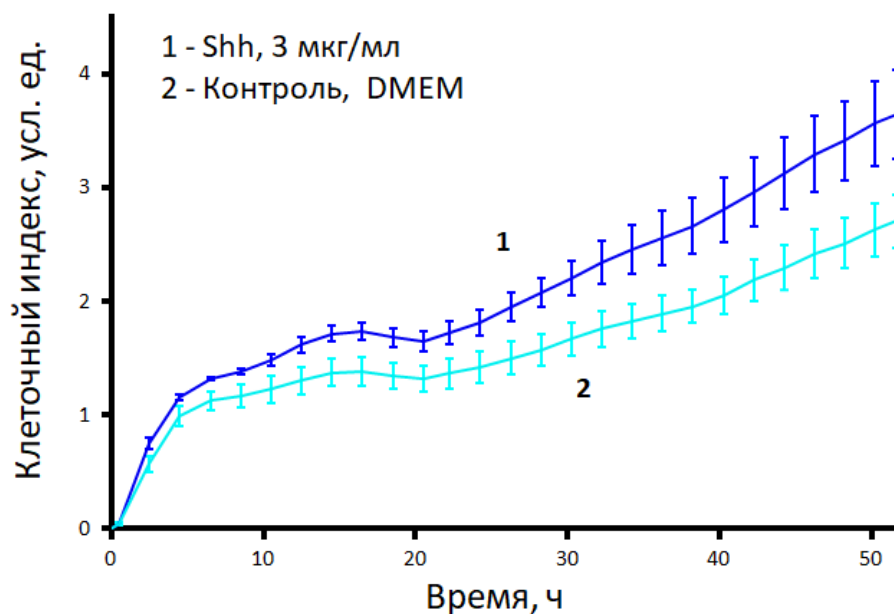


Рисунок 10. Зависимость КИ от времени культивирования с Shh для клеток линии глиомы U-251 MG. Планки погрешностей отображают стандартное отклонение.

Попарное сравнение значений КИ с помощью U-критерия Манна-Уитни показало достоверное различие между образцами с добавлением и без добавления лиганда (контроль с добавлением ростовой среды вместо лиганда). Оценивая количественные изменения, мы наблюдали, что значение КИ через 50 часов увеличивается по сравнению с контролем в 1,35 раз - с 2,63 усл. ед. до 3,56 усл. ед.. Также с помощью *t*-критерия Стьюдента было показано, что значения КИ достоверно отличаются ($p < 0,05$). В дополнительном эксперименте нами было показано отсутствие дозозависимого эффекта между концентрациями лиганда Shh 1 мкг/мл и 3 мкг/мл (данные не представлены).

Добавление лиганда Shh в конечной концентрации 3 мкг/мл к культуре астроцитов человека также увеличивает пролиферацию клеток. Но в сравнении с клетками глиобластомы U-251 MG в этом случае наблюдается не столь выраженное увеличение пролиферации. Достоверные отличия между образцами начинаются только через 52 часа после начала культивирования и продолжаются до окончания эксперимента (рис. 11). В присутствии Shh увеличение пролиферации астроцитов по сравнению с контролем отмечается в 1,23 раза при значениях КИ 4,51 и 3,68 усл. ед., соответственно (сравнение было выполнено на 52-ой час культивирования). С помощью *t*-критерия Стьюдента было показано, что значения КИ достоверно отличаются ($p < 0,05$). В дополнительном эксперименте нами было показано отсутствие дозозависимого эффекта между концентрациями лиганда Shh 1 мкг/мл и 3 мкг/мл (данные не представлены).

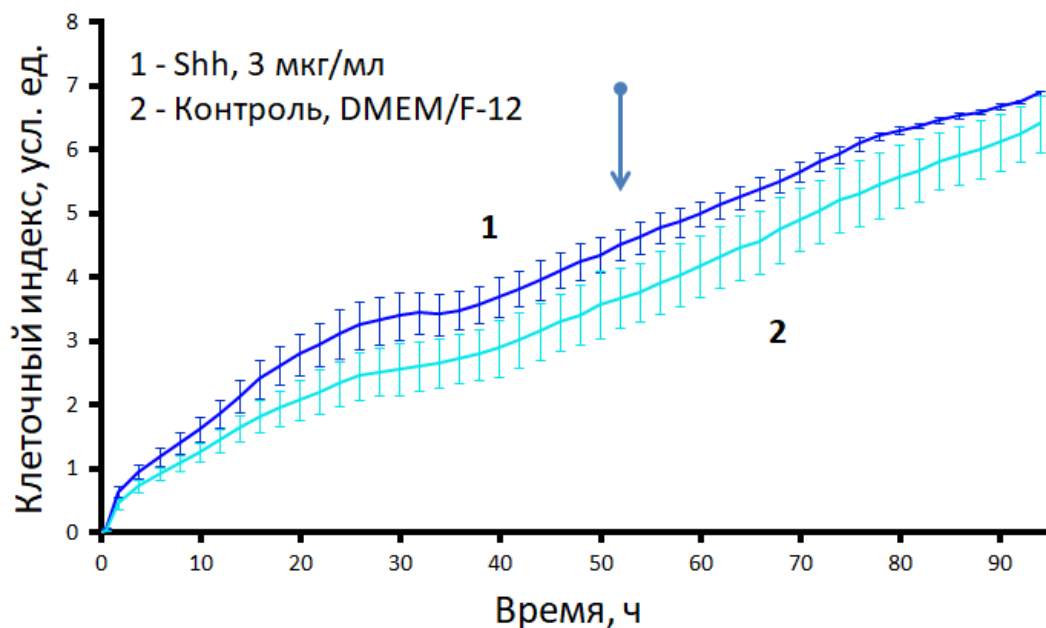


Рисунок 11. Зависимость КИ от времени культивирования с Shh для культуры астроцитов человека. Планки погрешностей отображают стандартное отклонение. Стрелкой отмечен момент начала достоверных отличий.

В эксперименте с культивированием клеток линии глиомы U-87 MG в присутствии Shh (конечная концентрация 3 мкг/мл и 1 мкг/мл) на протяжении всего эксперимента не было получено достоверных отличий от контроля. При этом контрольные и экспериментальные клетки росли в присутствии 1,6% DMSO. Внесение DMSO обусловлено тем, что его добавление способствует более быстрому выходу клеток на экспоненциальную фазу роста, что будет описано в экспериментах с ингибитором сигнального пути. Так как графики зависимости КИ от времени в данном случае не являются наглядными и представляют собой три пересекающиеся линии с пересекающимися планками погрешностей, мы представили данные в виде гистограммы, отображающей значение КИ через 60 часов после начала эксперимента (рис. 12).

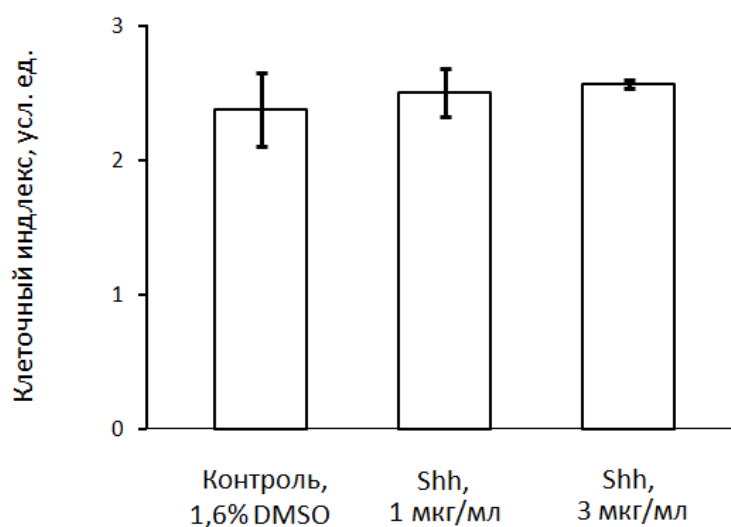


Рисунок 12. Гистограмма, отображающая зависимость КИ от концентрации лиганда Shh для клеток линии глиомы U-87 MG через 60 часов культивирования. Планки погрешностей отображают стандартное отклонение.

Таким образом, добавление лиганда Shh приводит к увеличению пролиферации в большей степени клеток линии глиомы U-251 MG и в меньшей степени клеток культуры астроцитов человека. При этом на пролиферацию клеток линии глиомы U-87 MG лиганд Shh не оказывает никакого эффекта.

Изучение эффекта циклопана на пролиферацию клеток

Как было сказано выше, 5 мМ стоковый раствор циклопана был разведен в DMSO. При добавлении в ростовую среду для клеток стоковый раствор циклопана разводится в 1000 и 500 раз, до конечной концентрации 5 мкМ и 10 мкМ. При этом концентрация DMSO в среде составляла 0,1% и 0,2% соответственно. Ранее нами было замечено, что добавление DMSO способствует повышению пролиферации клеток. Поэтому, чтобы оценить эффект циклопана

на пролиферацию, контрольные клетки также выращивали в присутствии DMSO. Изначально использовали 2 контрольных образца ростовой среды – с добавлением 0,1% и 0,2% DMSO для экспериментальных образцов с 5 мкМ и 10 мкМ циклопамина соответственно. Но между собой эти данные оказалось неудобно сравнивать, поэтому мы оставили контроль только с добавлением 0,2% DMSO, а в экспериментах с 5 мкМ циклопамина концентрацию DMSO увеличили с 0,1% до 0,2%.

В экспериментальных образцах клеток культуры астроцитов человека, растущих в среде с 5 мкМ и 10 мкМ циклопамина и 0,2% DMSO, на протяжении всего эксперимента не было получено достоверных отличий от контрольного образца с добавлением в ростовую среду 0,2% DMSO. Также видно, что в контрольном образце в присутствии DMSO клетки пролиферируют активнее, чем клетки, растущие в обычной ростовой среде (рис. 13). Таким образом, в концентрациях 5 мкМ и 10 мкМ циклопамин не влияет на скорость пролиферации клеток культуры астроцитов человека.

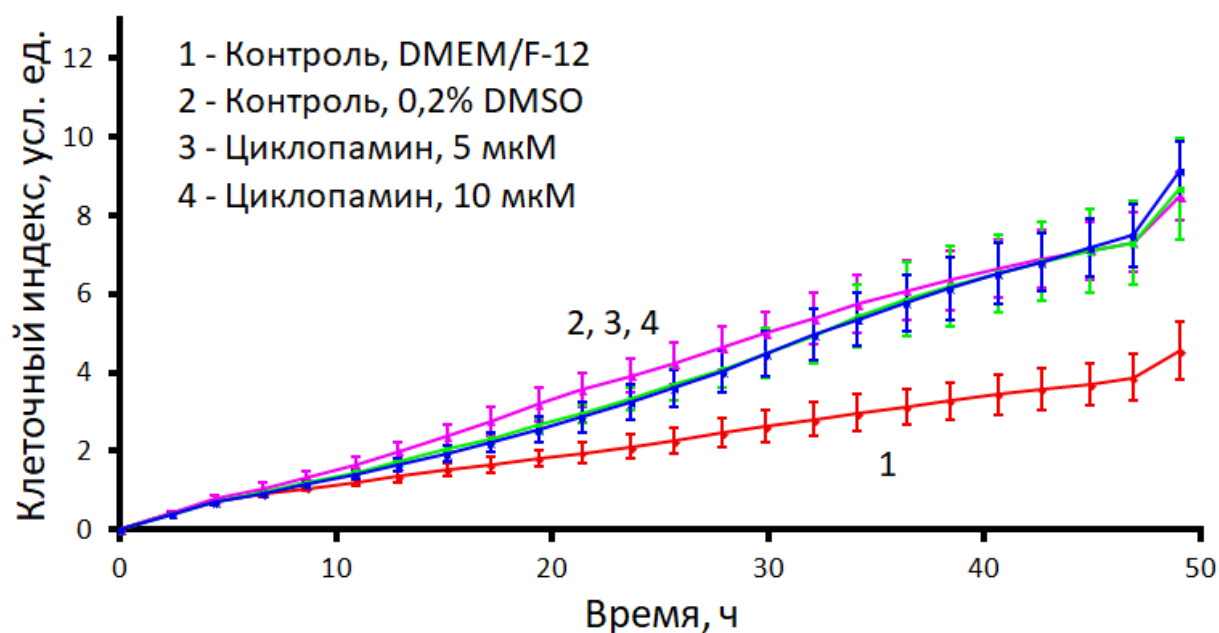


Рисунок 13. Зависимость КИ от времени культивирования с циклопамином для культуры астроцитов человека. Планки погрешностей отображают стандартное отклонение.

Культивирование клеток глиомы линии U-251 MG в присутствии 5 мкМ и 10 мкМ циклопамина приводит к снижению пролиферативной активности клеток. При концентрации 5 мкМ достоверные отличия отмечаются в период с 40 до 83 часов после начала культивирования (рис. 14). Далее отмечается сближение кривых роста контрольного и экспериментальной образцов. Но в контрольном образце значение КИ перестает меняться – рост клеток выходит на

плато, в то время как КИ экспериментального образца продолжает увеличиваться, следовательно, культура находится в фазе роста. При концентрации циклопамина 10 мкМ достоверные отличия от контроля отмечаются с третьего часа после начала культивирования и наблюдаются до конца эксперимента. Через 50 часов инкубации клеток с циклопамином КИ оказался в 1,32 (5 мкМ) и 1,88 (10 мкМ) раза меньше, чем в контроле, и достоверно различается в этих группах (рис. 14). Коэффициент корреляции Спирмена $r = -0,95$.

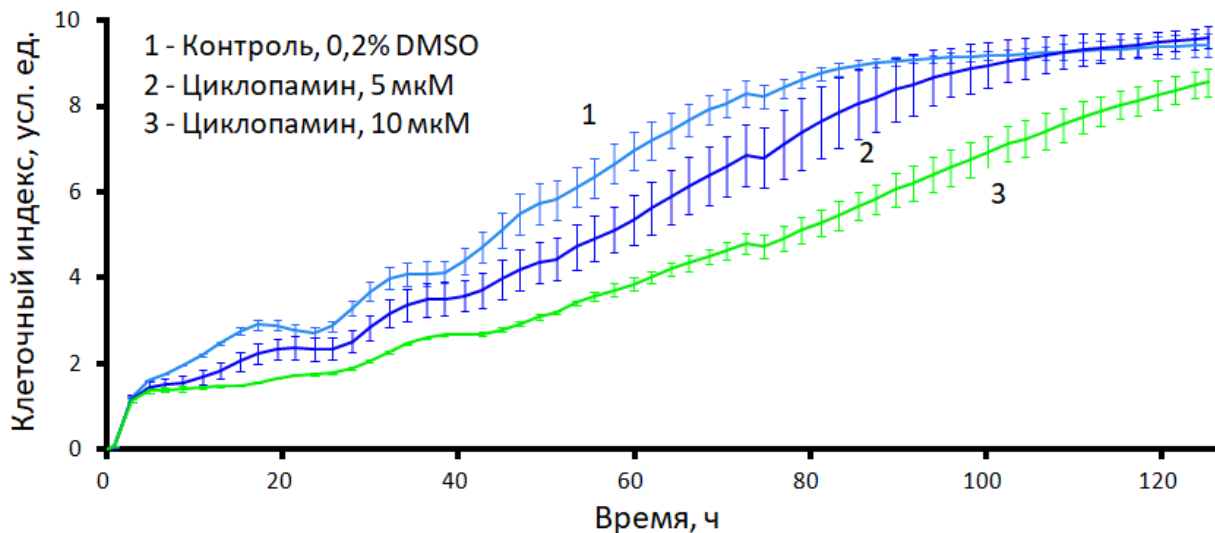


Рисунок 14. Зависимость КИ от времени культивирования с циклопамином для культуры клеток глиомы линии U-251 MG. Планки погрешностей отображают стандартное отклонение.

Нами было замечено, что в зависимости от концентрации DMSO в ростовой среде клетки глиомы линии U-87 MG в разное время выходят в экспоненциальную фазу роста. Поскольку культура клеток U-87 MG обладает относительно слабой пролиферативной активностью, нами была выбрана оптимальная концентрация DMSO, при которой клетки начинали быстрее выходить в экспоненциальную фазу роста. Концентрация DMSO в экспериментальных и контрольных образцах составила 1,6%.

Было показано, что добавление циклопамина к клеткам линии U-87 MG в концентрации 5 мкМ и 10 мкМ снижает пролиферативную активность. При концентрации циклопамина 5 мкМ достоверные отличия продолжаются с 51 часа до 92 часов от начала эксперимента, где отмечается выход кривой контрольных клеток на плато. Для концентрации 10 мкМ достоверные отличия начинаются с 30 часов и продолжаются до окончания эксперимента (рис. 15).

Для количественной оценки изменения пролиферации была выбрана точка 60 часов вместо 50 часов от начала эксперимента. Это связано с тем, что клетки линии U-87 MG позже

других культур выходят в экспоненциальную фазу роста. КИ в этой точке для клеток с 5 мкМ и 10 мкМ циклопамина оказался в 1,16 и 1,65 раза меньше, чем в контроле и достоверно различается в этих группах (рис. 15). Коэффициент корреляции Спирмена $r = -0,95$.

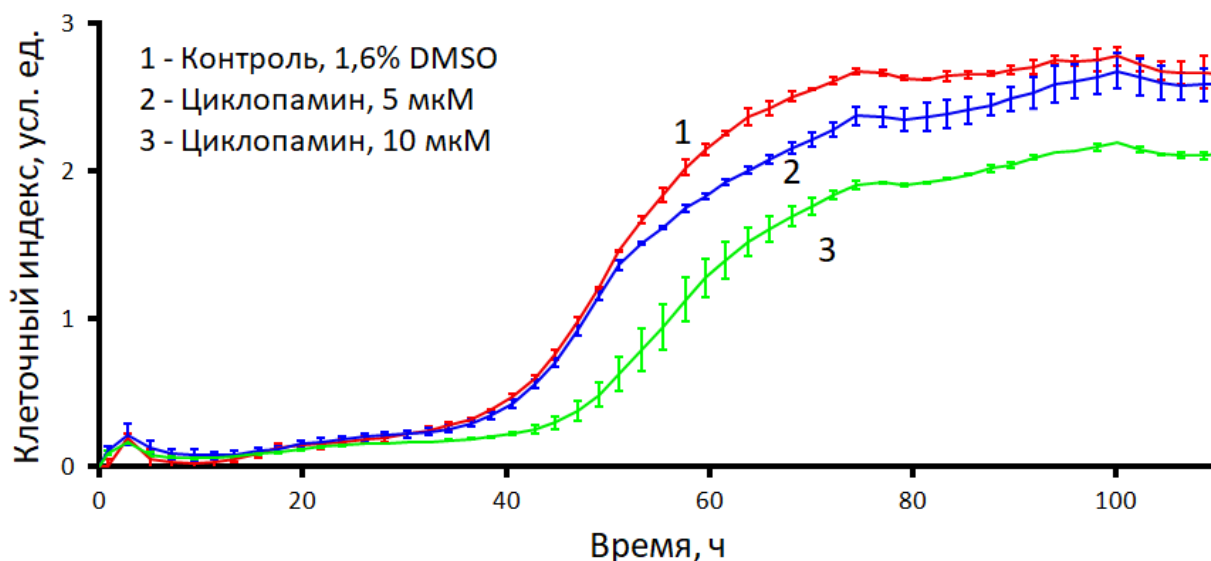


Рисунок 15. Зависимость КИ от времени культивирования с циклопамином для культуры клеток глиомы линии U-87 MG. Планки погрешностей отображают стандартное отклонение.

Таким образом, циклопамин в концентрациях 5 мкМ и 10 мкМ через сигнальный путь НН оказывает ингибирующее влияние на пролиферацию клеток линий глиом U-87 MG и U-251 MG и не оказывает влияния на клетки культуры астроцитов человека.

3.3 Изучение цитотоксического действия циклопамина

Следует отметить, что используемые концентрации циклопамина 5 мкМ и 10 мкМ были выбраны потому, что как показано в литературе, при этих концентрациях препарат ингибирует сигнальный путь, в то время как при больших концентрациях наблюдается его цитотоксический эффект [93].

В первую очередь мы решили изучить зависимость КИ от времени культивирования астроцитов с добавлением 20 мкМ циклопамина. Культуру астроцитов человека выбрали, так как при добавлении циклопамина 5 мкМ и 10 мкМ в ней не наблюдалось уменьшение пролиферации клеток вследствие ингибирования сигнального пути НН (рис. 13). При добавлении 20 мкМ циклопамина, концентрация DMSO в ростовой среде составляет 0,4%. Такая концентрация DMSO была взята в контрольном исследовании. При добавлении

циклопамина в концентрации 20 мкМ было отмечено достоверное уменьшение клеточного индекса в сравнении с контролем (рис. 16).

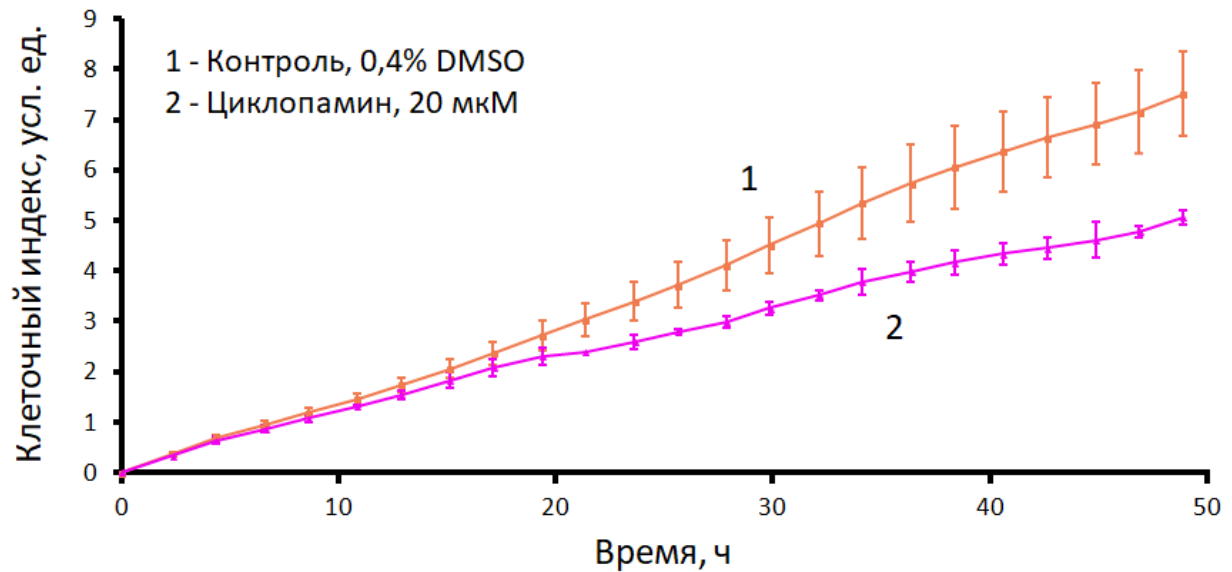


Рисунок 16. Зависимость КИ от времени культивирования с циклопамином для культуры астроцитов человека. Планки погрешностей отображают стандартное отклонение.

Как видно, при концентрации циклопамина 20 мкМ в отличие от концентраций 5 мкМ и 10 мкМ, кривые экспериментального и контрольных образцов не совпадают. Кривая зависимости КИ от времени экспериментального образца расположена ниже кривой контрольного образца. Сравнивая кривые в этом опыте, мы не можем сделать однозначный вывод о влиянии циклопамина на клетки: происходит ли уменьшение КИ в результате ингибирующего эффекта такой дозы циклопамина на сигнальный путь клеток, или наблюдается цитотоксический эффект, который приводит к уменьшению клеточного индекса вследствие гибели клеток и их открепления от подложки.

Для ответа на этот вопрос мы применили проточную цитометрию с использованием теста определения жизнеспособности клеток. Перед внесением реактивов клетки культуры астроцитов человека и линии U-251 MG росли в течение 50 часов, а клетки линии U-87 MG в течение 60 часов. Это обусловлено тем, что значения КИ при использовании методики измерения электрического импеданса для клеток линии U-87 MG оценивали на 60-ый час исследования.

Для культуры клеток астроцитов человека в контрольном образце с добавлением 0,2% DMSO количество погибших клеток составило $2,41 \pm 0,32\%$, а количество апоптотических клеток $6,37 \pm 1,99\%$. В присутствии 5 мкМ циклопамина процент погибших и апоптотических

клеток составил $1,97 \pm 0,87\%$ и $3,39 \pm 1,59\%$, соответственно, что достоверно не отличается от контроля с DMSO. В присутствии 10 мкМ циклопана процент погибших и апоптотических клеток составил $2,58 \pm 0,93\%$ и $4,70 \pm 1,63\%$, соответственно, что также достоверно не отличается от контроля с DMSO и образцами с 5 мкМ циклопана (рис. 17).

В присутствии 20 мкМ циклопана только на 30-40% площади лунок визуально отмечались клетки, прикрепленные к пластику (визуально сравнивалось с контролем с 0,4% DMSO). В снятых с пластика клетках (без погибших клеток, плавающих в культуральной среде) процент погибших и апоптотических клеток составил $12,96 \pm 2,59\%$ и $9,06 \pm 1,67\%$, соответственно, что достоверно отличается от контроля с 0,4% DMSO ($1,52 \pm 0,38\%$ и $4,46 \pm 1,91\%$) (рис. 17).

Таким образом, циклопан в концентрации 20 мкМ оказывает цитотоксическое действие на клетки культуры астроцитов человека; в концентрации 5 и 10 мкМ циклопан не токсичен для этих клеток.

Для клеток линии U-251 MG в контрольном образце с добавлением 0,2% DMSO процент погибших клеток составил $2,68 \pm 0,72\%$, а процент апоптотических клеток $4,45 \pm 0,57\%$. В присутствии 5 мкМ циклопана процент погибших и апоптотических клеток составил $7,01 \pm 0,60\%$ и $7,70 \pm 0,55\%$, соответственно, что достоверно отличается от контроля с DMSO. В присутствии 10 мкМ циклопана процент погибших и апоптотических клеток составил $8,43 \pm 0,82\%$ и $10,64 \pm 2,10\%$, соответственно, что также достоверно отличается от контроля с DMSO. Однако достоверные различия процентов погибших и апоптотических клеток между образцами с 5 и 10 мкМ циклопана отсутствуют (рис. 17). Коэффициент корреляции Спирмена r для процента погибших клеток = 0,90. Коэффициент корреляции Спирмена r для процента апоптотических клеток = 0,95.

Для клеток линии U-87 MG в контрольном образце с добавлением 1,6% DMSO процент погибших клеток составил $3,95 \pm 0,64\%$, а процент апоптотических клеток $5,68 \pm 0,58\%$. В присутствии 5 мкМ циклопана процент погибших и апоптотических клеток составил $7,37 \pm 0,50\%$ и $8,33 \pm 0,63\%$, соответственно, что достоверно отличается от контроля с DMSO. В присутствии 10 мкМ циклопана процент погибших и апоптотических клеток составил $9,38 \pm 0,64\%$ и $12,45 \pm 1,18\%$, соответственно, что также достоверно отличается от контроля с DMSO и образцами с 5 мкМ циклопана (рис. 17). Коэффициент корреляции Спирмена r для процента погибших клеток = 0,95. Коэффициент корреляции Спирмена r для процента апоптотических клеток = 0,95.

Таким образом, добавление 5 и 10 мкМ циклопамина оказывает цитотоксическое действие на клетки линии U-251 MG и U-87 MG.

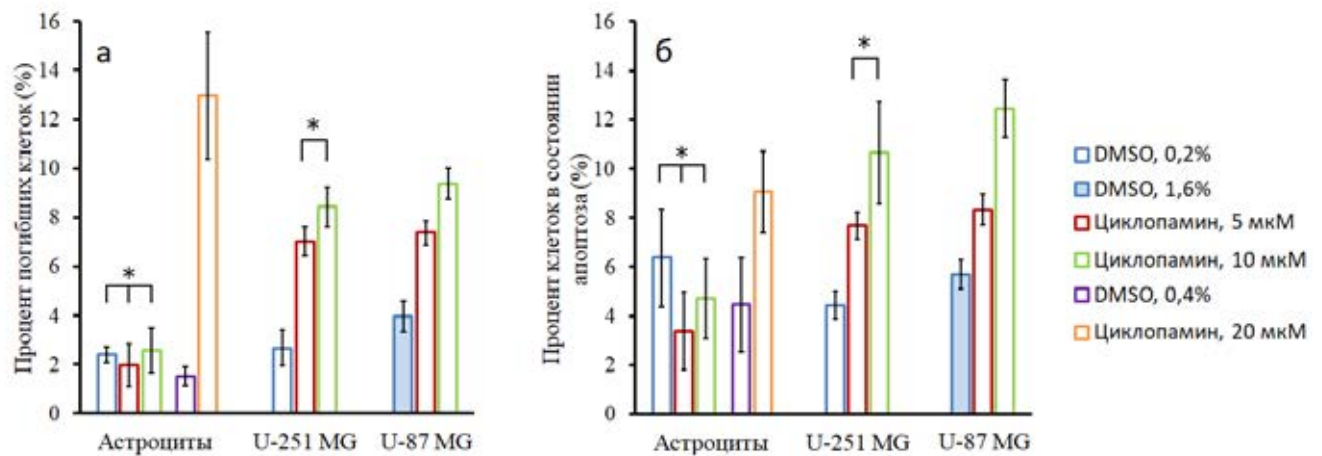


Рисунок 17. Гистограммы, отображающие процент погибших клеток (а) и клеток в состоянии апоптоза (б). Планки погрешностей отображают стандартное отклонение. Звездочкой отмечены не отличающиеся друг от друга выборки.

3.4 Изучение влияния сигнального пути Hedgehog на химиорезистентность клеток

Подбор оптимальной концентрации химиотерапевтических препаратов

Известно, что химиотерапевтические препараты имеют индивидуальный спектр токсичности по отношению как к разным типам клеток живого организма, так и к разным культурам клеток. Для каждой культуры клеток, оценивая зависимость цитотоксичности от концентрации исследуемых веществ, были подобраны оптимальные концентрации химиотерапевтических препаратов. Под оптимальной концентрацией мы понимали такую, при которой значение КИ уменьшалось не сразу, а через некоторое время после внесения препарата, что также определялось индивидуально для препарата и культуры клеток. Нам было необходимо, чтобы от момента внесения препарата до начала гибели клеток проходило достаточно времени, чтобы достоверно определять влияет ли активация или ингибирование сигнального пути на чувствительность клеток к химиотерапевтическим препаратам. В случае высоких концентраций используемых препаратов, когда клетки начинают погибать очень быстро, нам бы было сложнее выявлять достоверные отличия между экспериментальными и контрольными образцами.

Цисплатин в конечных концентрациях от 3,13 мкМ до 200 мкМ вносили на вторые сутки от начала эксперимента (43 часа). При концентрации 12,5 мкМ гибель клеток наступает через 16 часов после внесения препарата, по сравнению с 1,5 часами при концентрации 200 мкМ. Для линии глиобластомы U-251 MG для дальнейших исследований выбрали концентрацию цисплатина 12,5 мкМ (рис. 18).

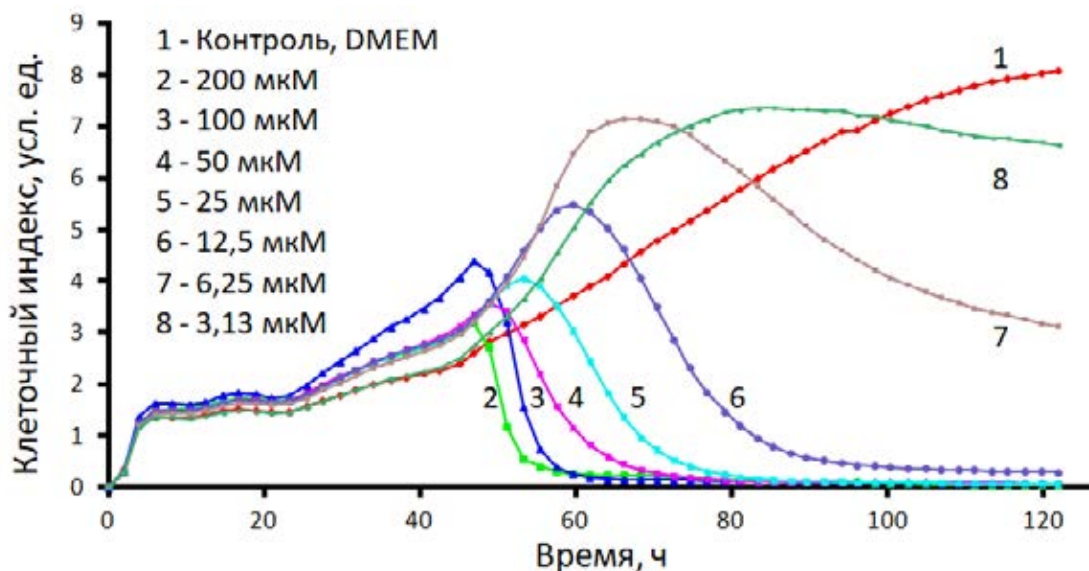


Рисунок 18. Зависимость КИ от времени культивирования и концентрации цисплатина для культуры клеток глиомы линии U-251 MG.

Выбранная концентрация цисплатина для астроцитов составила 50 мкМ. Для темозоломида концентрация составила 5 мМ для линии U-251 MG и астроцитов человека. Оптимальная концентрация доксорубицина – 8 мкМ и 1 мкМ для линии U-251 MG и астроцитов человека, соответственно (данные не представлены).

Изучение цитотоксического действия цисплатина на клетки после их предварительного культивирования с циклопамином и лигандом Shh

Постановка эксперимента подробно описана в разделе материалы и методы, здесь же мы напоминаем, что клетки в течение 2-х суток предварительно культивировались с циклопамином или лигандом Shh, после чего среду меняли на среду с химиотерапевтическим препаратом, и оценивали время начала гибели клеток в сравнении с контрольными образцами.

При внесении (на 47-ой час) 12,5 мкМ цисплатина к клеткам глиобластомы человека линии U-251 MG, прединкубированных на среде с 5 и 10 мкМ циклопamina, гибель клеток начиналась через $64,82 \pm 1,01$ и $63,57 \pm 0,58$ часа после начала культивирования, соответственно, что достоверно не отличается. Гибель клеток в контроле (0,2% DMSO) начиналась с $74,41 \pm 0,35$

часа эксперимента, что достоверно отличается от данных, полученных для клеток, предварительно культивированных с циклопамином (рис. 19 а, 20 а). Коэффициент корреляции Спирмена r для времени начала гибели клеток = -0,85. В экспериментальных образцах, где клетки предварительно культивировали с 10 мкМ циклопamina, гибель клеток начиналась на 16,57 час после внесения цисплатина, что в 1,65 раза меньше чем в контроле (27,41 час от момента внесения цисплатина). Гибель клеток, предварительно культивированных с 3 мкг/мл Shh начиналась через $69,49 \pm 1,01$ часов, что достоверно отличается от контроля, где клетки культивировались только на ростовой среде ($66,41 \pm 1,26$ час от начала эксперимента) (рис. 19 б, 20 а).

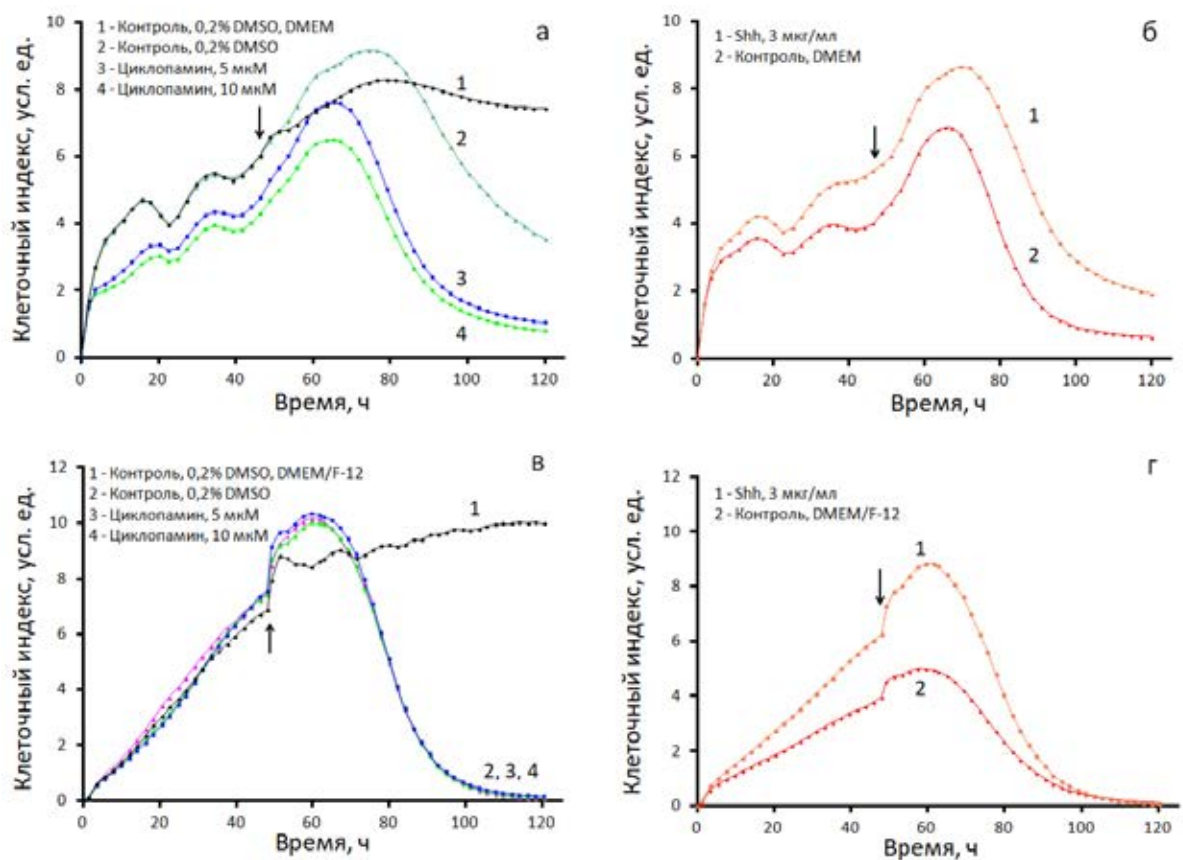


Рисунок 19. Зависимость клеточного индекса от времени до и после внесения цисплатина для клеток линии U-251 MG (12,5 мкМ цисплатина), культивированных с циклопамином (а) и Shh (б) и клеток культуры астроцитов (50 мкМ цисплатина), культивированных с циклопамином (в) и Shh (г). Стрелками указано время внесения цисплатина. Кривые 1 на графиках а, в – контрольные кривые без внесения цисплатина.

При внесении (на 48-ой час) 50 мкМ цисплатина к клеткам культуры астроцитов, предварительно растущим на среде с 5 и 10 мкМ циклопamina, гибель клеток начиналась через $59,97 \pm 0,72$ и $60,38 \pm 0,72$ часа после начала культивирования, соответственно, что достоверно не

отличается. Гибель клеток в контроле (0,2% DMSO) начиналась через $60,17 \pm 0,90$ час, что достоверно не отличается от данных, полученных для клеток, предварительно культивированных с ингибитором сигнального пути циклопамином (рис. 19 в, 20 б). Предварительное культивирование астроцитов с 3 мкг/мл Shh не привело к достоверному изменению времени начала гибели клеток по сравнению с контрольными образцами ($60,18 \pm 0,72$ и $58,97 \pm 1,66$ час, соответственно) (рис. 19 г, 20 б).

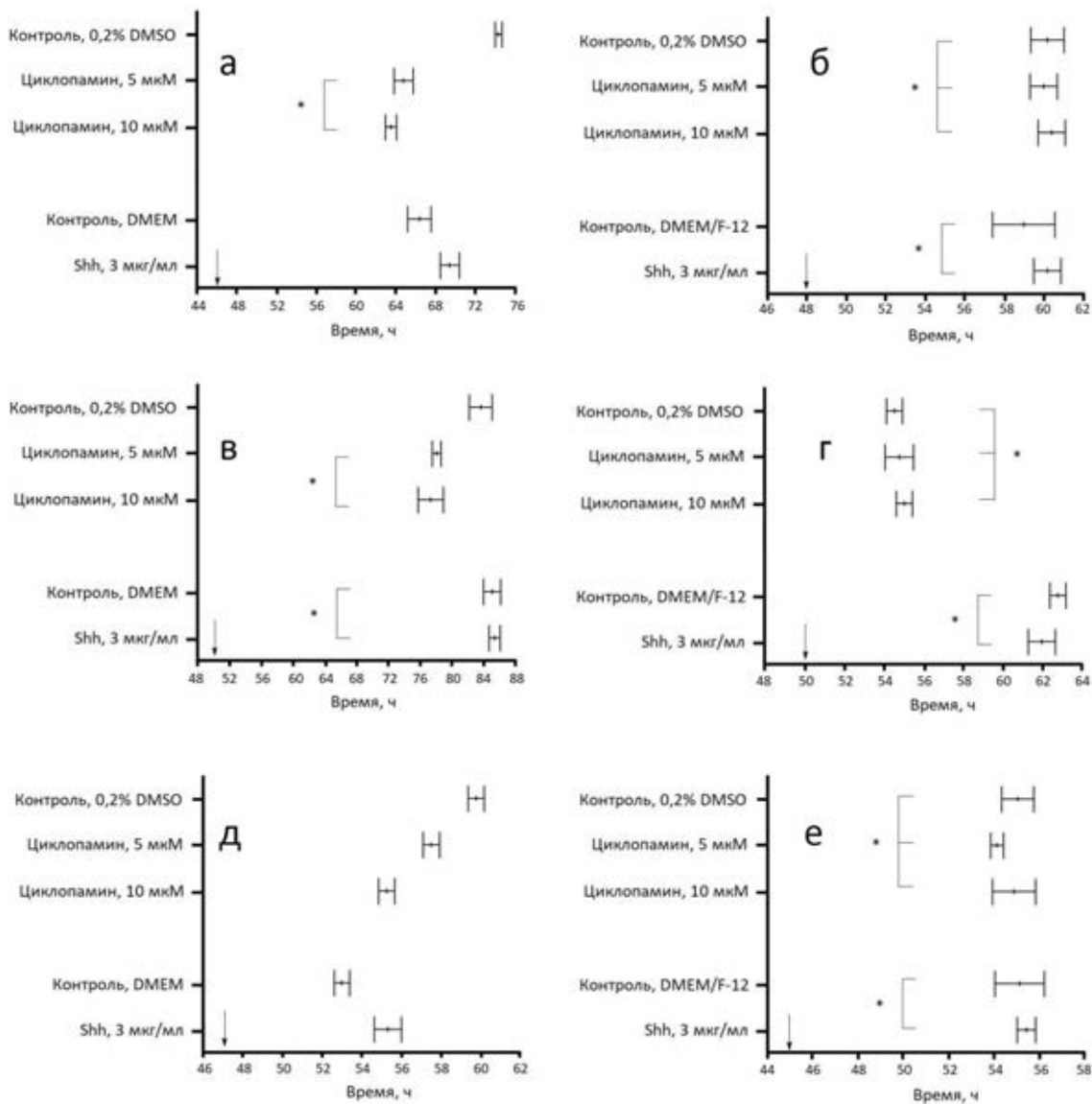


Рисунок 20. Время начала гибели клеток: U-251 MG с цисплатином 12,5 мкМ (а), астроциты с цисплатином 50 мкМ (б), U-251 MG с темозоломидом 5 мМ (в), астроциты с темозоломидом 5 мМ (г), U-251 MG с доксорубицином 8 мкМ (д), астроциты с доксорубицином 1 мкМ (е). Стрелками указано время внесения препарата. Значения представлены в виде среднего с планками погрешностей, отображающими стандартное отклонение. Звездочкой отмечены не отличающиеся друг от друга выборки.

Изучение цитотоксического действия темозоломида на клетки после их предварительного культивирования с циклопамином и лигандом Shh

При внесении (на 50-ый час) 5 мМ темозоломида к клеткам линии U-251 MG, растущим на среде с 5 и 10 мкМ циклопамина, гибель клеток начиналась через $78,04 \pm 0,58$ и $77,29 \pm 1,66$ часа после начала культивирования, соответственно, что достоверно не отличается. Гибель клеток в контроле начиналась через $83,63 \pm 1,53$ часа от начала эксперимента, что достоверно отличается от времени начала гибели клеток, предварительно культивированных с циклопамином (рис. 20 в). Коэффициент корреляции Спирмена r для времени начала гибели клеток = $-0,78$. В образцах с 10 мкМ циклопамина гибель клеток начиналась через 27,29 часов после внесения темозоломида, что в 1,23 раза меньше чем в контрольных образцах (33,63 часа). Гибель клеток, предварительно культивированных с 3 мкг/мл Shh начиналась через $85,38 \pm 0,73$ часов, что достоверно не отличается от контроля ($85,05 \pm 1,13$ час от начала эксперимента) (рис. 20 в).

При внесении (на 50-ый час) 5 мМ темозоломида к клеткам культуры астроцитов, растущим на среде с 5 и 10 мкМ циклопамина, гибель клеток начиналась через $54,76 \pm 0,75$ и $55,01 \pm 0,43$ часа после начала культивирования, соответственно, что достоверно не отличается. Гибель клеток в контроле (0,2% DMSO) начиналась через $54,51 \pm 0,43$ час, что достоверно не отличается от данных, полученных для клеток, предварительно культивированных с ингибитором сигнального пути (рис. 20 г). Предварительное культивирование астроцитов с 3 мкг/мл Shh не привело к достоверному изменению времени начала гибели клеток по сравнению с контрольными образцами ($61,95 \pm 0,72$ и $62,76 \pm 0,43$ час, соответственно) (рис. 20 г).

Изучение цитотоксического действия доксорубицина на клетки после их предварительного культивирования с циклопамином и лигандом Shh

Внесение 8 мкМ доксорубицина (на 47-ой час) к клеткам линии U-251 MG, растущим в присутствии 5 и 10 мкМ циклопамина, приводило к тому, что гибель клеток начиналась на $57,50 \pm 0,43$ и $55,25 \pm 0,43$ час после начала культивирования, соответственно, что достоверно отличается. Гибель клеток в контроле начиналась через $59,76 \pm 0,43$ часа от начала эксперимента, что достоверно отличается от времени начала гибели клеток, предварительно культивированных с циклопамином (рис. 20 д). Коэффициент корреляции Спирмена r для времени начала гибели клеток = $-0,96$. В образцах с 10 мкМ циклопамина гибель клеток начиналась через 10,25 часов после внесения темозоломида, что в 1,44 раза меньше чем в контрольных образцах. Гибель клеток, предварительно культивированных с 3 мкг/мл Shh

начиналась через $55,31 \pm 0,72$ часов, что достоверно отличается от контроля ($52,99 \pm 0,42$ час) (рис. 20 д).

Внесение 1 мкМ доксорубина (на 45-ый час) к астроцитам, растущим в присутствии 5 и 10 мкМ циклопана, приводило к гибели клеток через $54,14 \pm 0,29$ и $54,89 \pm 1,01$ часа после начала культивирования, соответственно, что достоверно не отличается. Гибель клеток в контрольных образцах начиналась через $55,06 \pm 0,76$ часов, что достоверно не отличается от результатов, полученных для клеток, предварительно культивированных с циклопанином (рис. 20 е). Предварительное культивирование астроцитов с 3 мкг/мл Shh не привело к достоверному изменению времени начала гибели клеток по сравнению с контрольными образцами ($55,44 \pm 0,43$ и $55,14 \pm 1,15$ час, соответственно) (рис. 20 е).

Таким образом, предварительное культивирование клеток глиомы человека линии U-251 MG в присутствии циклопана приводит к более раннему началу гибели опухолевых клеток при воздействии выбранных химиотерапевтических препаратов. Напротив, активация сигнального пути при помощи лиганда Shh приводит к уменьшению чувствительности клеток к химиотерапевтическим препаратам (цисплатин и доксорубин). В клетках астроцитов человека внесение циклопана и лиганда Shh не влияло на время начала гибели клеток в сравнении с контрольными образцами.

Изучение поведения клеток при изменении состава ростовой среды

Для анализа влияния DMSO и циклопана на поведения клеток был проведен дополнительный контрольный эксперимент с клетками линии U-251 MG. Первоначально клетки выращивали двое суток в присутствии 0,2% DMSO (кривая 1) и циклопана в концентрации 5 и 10 мкМ (кривая 4) (рис. 21; для удобства восприятия представлена только кривая для концентрации циклопана 10 мкМ). После этого часть клеток продолжила расти в присутствии 0,2% DMSO (кривая 2), а в части лунок среду сменили на свежую (кривая 3). Аналогично часть клеток продолжила расти в присутствии циклопана (кривая 5), а в части лунок среду сменили (кривая 6).

После смены среды с DMSO на свежую среду наблюдалось дальнейшее увеличение КИ, но скорость роста клеток была несколько ниже, чем в контроле, где клетки продолжали расти без смены среды (кривые 3 и 2, соответственно (рис. 21)). Удаление из среды циклопана в культурах, растущих первоначально в его присутствии, приводило как к увеличению КИ, так и к увеличению скорости роста клеток при сравнении с контролем, где среду не меняли (кривые 6 и 5 (рис. 21)).

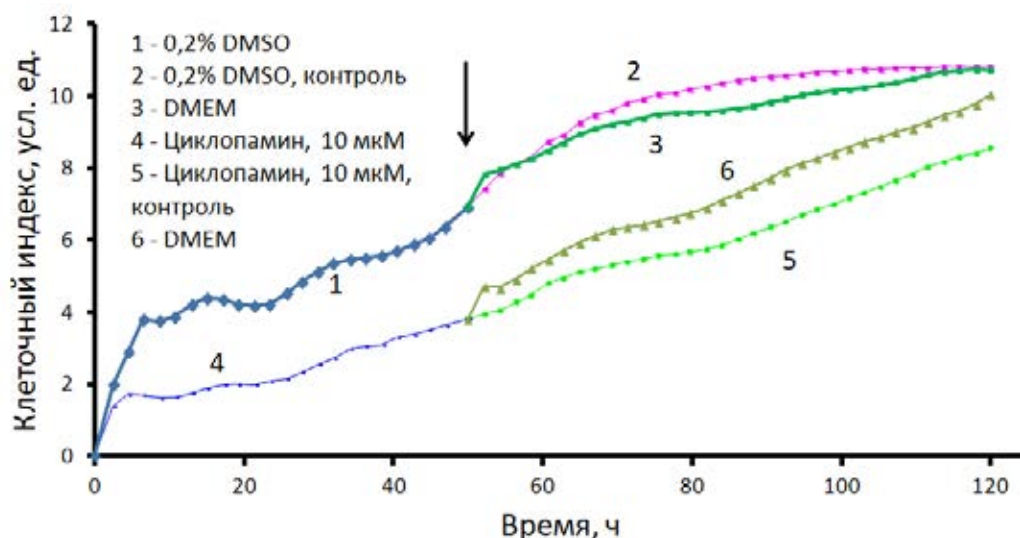


Рисунок 21. Изменение клеточного индекса для клеток линии U-251 MG при смене условий культивирования. В течение двух суток клетки выращивали в ростовой среде с 0,2% DMSO (кривая 1) и 10 мкМ циклопamina (кривая 4), после чего в половине лунок отбирали среду и заменяли свежей ростовой средой (кривые 3 и 6, соответственно). В остальных лунках смену среды не проводили (кривые 2 и 5, соответственно). Стрелкой указано время внесения свежей среды. Кривые 2 и 5 являются продолжением кривых 1 и 4, соответственно.

3.5 Изучение влияния сигнального пути Hedgehog на формирование фенотипа клеток боковой популяции

Для количественного определения процента клеток боковой популяции (SP) использовался ингибиторный контроль с верапамилом в концентрации 50 мкМ. Верапамил является конкурентным ингибитором DCV, вследствие чего молекулы DCV проникают внутрь клетки и не экспортируются ABC транспортерами из клетки. Граница боковой популяции выставлялась по ингибиторному контролю с верапамилом, а для точности измерений было принято решение, чтобы в эту область попадало не более 0,05% событий в контроле.

Процент клеток боковой популяции для клеточной линии U-87 MG составил $1,51 \pm 0,25\%$ (рис. 22). 0,05% событий, которые попадали в аналогичную область в ингибиторном контроле не вычитались из процента клеток боковой популяции. Так делают в мировой литературе и пока еще не точно ясна природа этих событий. Это могут быть клетки, не относящиеся к боковой популяции, но, в силу статистического распределения, попавшие в этот регион, либо клетки с

каналами, которые менее эффективно или вовсе не ингибируются, но принимают участие в транспорте DCV из клетки.

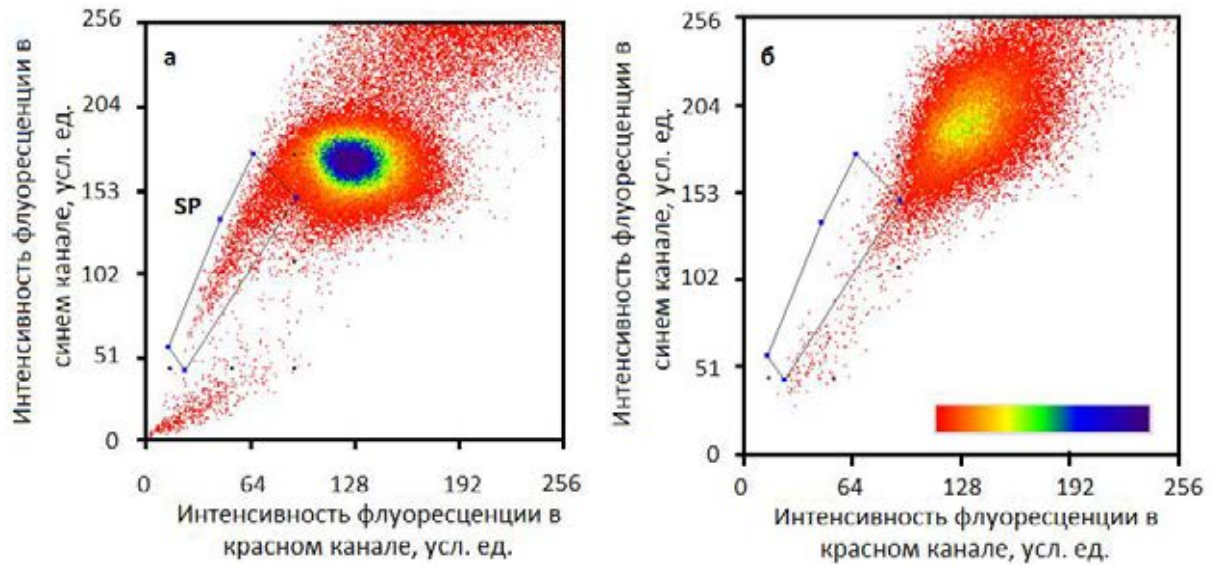


Рисунок 22. Точечные диаграммы, построенные в каналах флуоресценции DCV, позволяющие определить процент боковой популяции в культуре клеток U-87 MG. В синий канал попадает флуоресценция с длинами волн 432-482 нм, в красный – 655-685 нм. (а) SP – клетки боковой популяции. (б) - ингибиторный контроль с концентрацией верапамила 50 мкМ. Границей установлен уровень боковой популяции на диаграмме (а). В аналогичную область на диаграмме (б) попадает не более 0,05% клеток. Цветовая шкала отображает плотность событий.

Процент клеток боковой популяции для клеточной линии U-251 MG составил $1,41 \pm 0,29\%$. В культуре астроцитов человека клеток боковой популяции не было обнаружено, поэтому оценка влияния циклопамина на процент клеток боковой популяции не осуществлялась.

Было обнаружено, что культивирование клеток в присутствии 0,2% DMSO приводило к увеличению процента клеток боковой популяции. Так для линии U-87 MG при тех же условиях проведения эксперимента процент боковой популяции увеличился до $5,20 \pm 0,23\%$ – процент клеток боковой популяции в контроле, (рис. 23 а). Процент боковой популяции для клеток U-87 MG, росших в присутствии 5 и 10 мкМ циклопамина, составил $3,84 \pm 0,62\%$ и $1,70 \pm 0,47\%$, соответственно. Три группы достоверно отличаются между собой (рис. 23 б, в). Коэффициент корреляции Спирмена r для процента клеток боковой популяции = -0,95.

Аналогично культивирование клеток линии U-251 MG в присутствии 0,2% DMSO приводило к увеличению процента клеток боковой популяции до $3,69 \pm 0,39\%$. Процент боковой популяции для клеток U-251 MG, росших в присутствии 5 и 10 мкМ циклопамина, составил

2,15±0,27% и 1,43±0,26%, соответственно, что достоверно не отличается между собой, но достоверно отличается от контроля. Коэффициент корреляции Спирмена r для процента клеток боковой популяции = -0,95. Необходимо напомнить, что ингибиторный контроль с верапамилом выполнялся для каждой серии экспериментов (рис. 23 г).

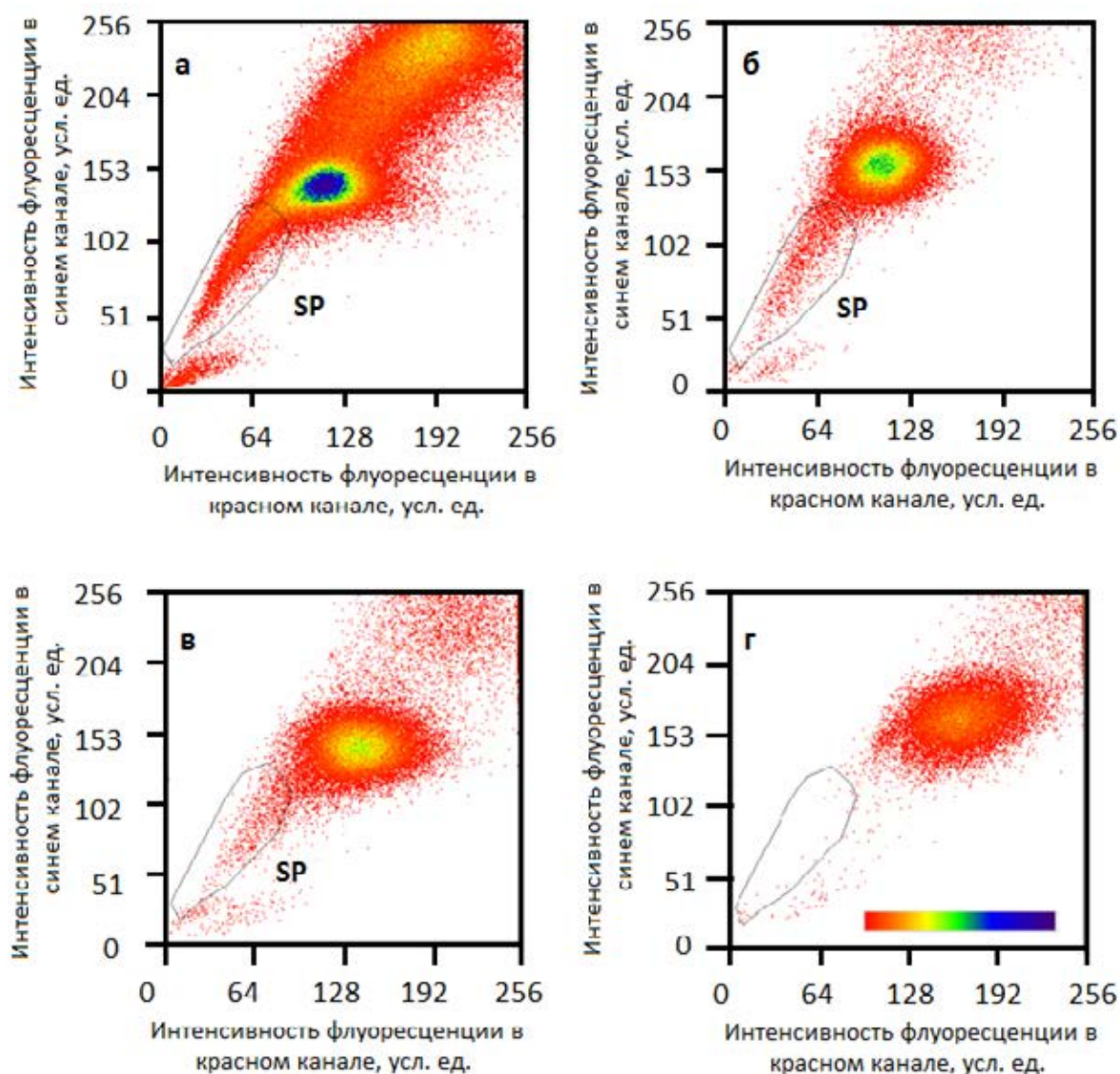


Рисунок 23. Точечные диаграммы, построенные в каналах флуоресценции DCV, позволяющие определить процент боковой популяции в культуре клеток U-87 MG после культивирования клеток с циклопамином. В синий канал попадает флуоресценция с длинами волн 432-482 нм, в красный – 655-685 нм. SP – клетки боковой популяции. (а) – клетки с 0,2% DMSO, (б) – клетки с 5 мкМ циклопamina, (в) – клетки с 10 мкМ циклопamina, (г) ингибиторный контроль с концентрацией верапамила 50 мкМ. Цветовая шкала отображает плотность событий.

Глава 4. Обсуждение

В последнее время НН сигналинг активно изучается, и наблюдается тенденция к постоянному росту количества публикуемых работ, согласно данным NCBI Pubmed. О значимости сигнального пути говорит и тот факт, что в пересмотренном 4-ом издании классификации опухолей головного мозга, основанной не только на гистологических, но и на молекулярно-генетических особенностях опухолей, выделяют медуллобластомы с вовлечением и без вовлечения НН сигнального пути [19]. Показано, что сигнальный путь НН вовлечен в процессы эмбриогенеза, стволовости и канцерогенеза [7, 14, 24, 27]. Сложность изучения сигнального пути подтверждает тот факт, что только недавно было обнаружено, что один из главных компонентов сигнального пути – SUFU по неизвестным причинам может выступать не только ингибитором сигналинга, но и активатором, увеличивая способность транскрипционных факторов семейства GLI связываться с ДНК [35]. Также открыто уже несколько изоформ транскрипционного фактора GLI1, которые присутствуют в разных клетках и роль которых до конца не изучена [15, 55, 56].

В 2009 году был обнаружен транскрипционный фактор tGLI1, мРНК которого является продуктом альтернативного сплайсинга *GLII*. В ферменте отсутствует 41 а.к. Это соответствует исключению полностью 3-го и частично 4-го экзона в мРНК *GLII* [56]. Есть несколько работ, показывающих, что tGLI1 в большей степени влияет на процессы химиорезистентности, ангиогенеза, пролиферации, чем фактор GLI1 [10, 14, 57, 154, 169]. Это было продемонстрировано только при помощи трансфекции отдельно *tGLII* и *GLII* в клетки с последующим изучением данных процессов.

Перед нами стояла задача выяснить, возможно ли оценивать экспрессию двух изоформ в отдельности. Далее в случае положительного результата необходимо было оценить уровень их экспрессии. После этого необходимо было проверить, способны ли мы методом ПЦР-РВ оценить влияние двух изоформ на процессы пролиферации и химиорезистентности.

Нам впервые удалось подобрать праймеры таким образом, чтобы независимо друг от друга оценивать экспрессию как *GLII*, так и *tGLII*. Подбор праймеров к *GLII* не вызвал труда, так как праймеры были подобраны к участку, отсутствующему у сплайсингового варианта *tGLII*. Успешно подобрать праймеры к сплайсинговому варианту *tGLII* было довольно сложно, из-за того, что в *tGLII* единственным уникальным регионом, который отсутствует в *GLII*, является место соединения второго экзона и остатка четвертого экзона. Именно к этому участку мы подбирали один из праймеров.

Методом ПЦР-РВ нами было обнаружено, что *tGLII* определяется только в клетках линии глиобластомы U-87 MG и не обнаруживается ни в клетках линии U-251 MG, ни в клетках культуры астроцитов человека, ни в первичных образцах глиом и здоровой ткани мозга (25 первичных образцов глиом 3-ей и 4-ой степени злокачественности и 4 образца здоровой ткани мозга). В литературе отмечается, что *tGLII* встречается в некоторых клеточных линиях глиобластомы (U-87 MG и U-251 MG не анализировались) и в первичных образцах (представлены данные только по трем образцам), но не встречается в здоровых тканях мозга и других органов. Также отмечается, что экспрессия *tGLII* наблюдается в первичных образцах рака молочной железы [56]. Несмотря на то, что наши данные расходятся с данными литературы, мы не считаем, что они противоречат друг другу. Во-первых, рассмотренная работа была выполнена только одним коллективом авторов при помощи аналитического метода ПЦР с последующим гелем электрофорезом. Во-вторых, зачастую авторы не сходятся во мнении по экспрессии генов HH сигналинга. Так отмечается неоднозначность результатов экспрессии более изученного *GLII* при глиомах 3-ей и 4-ой степени злокачественности [36, 58, 93, 94].

Нами было показано, что по грубым подсчетам количество мРНК *tGLII* в клетках линии U-87 MG примерно в 180 раз меньше, чем количество мРНК *GLII*. Кроме того, кривые накопления для мРНК *tGLII* не совпадают друг с другом, вследствие чего данные по количеству мРНК *tGLII* имеют большую стандартную ошибку среднего арифметического и большое стандартное отклонение. Таким образом, методика количественной ПЦР-РВ не позволит получать достоверные данные по экспрессии *tGLII* и в последующем оценивать корреляцию между экспрессией *tGLII* и генами, ассоциированными с процессами пролиферации и химиорезистентности. Для такой задачи больше подойдет либо методика цифровой ПЦР, либо трансфекция *tGLII* и *GLII* в клетки разных культур с последующей оценкой экспрессии генов интереса. Стоит отметить, что низкая экспрессия *tGLII* не снижает возможного влияния данной изоформы транскрипционного фактора на процессы пролиферации и химиорезистентности. Кроме того, отсутствие *tGLII* в культуре U-251 MG и в проанализированных первичных образцах глиом 3-ей и 4-ой степени злокачественности не отрицает тот факт, что данная изоформа может быть выявлена методом цифровой ПЦР или может быть гиперэкспрессирована в других образцах, например, полученных после удаления рецидивирующих опухолей, как это наблюдалось в некоторых работах на примере гиперэкспрессии *GLII* [95].

При оценке экспрессии *GLII* в клеточных линиях, было показано, что по сравнению с культурой клеток астроцитов, в клетках линии глиомы U-87 MG экспрессия *GLII* повышена в

7,5 раз, а в клетках линии U-251 MG – в 4,7 раз, что соответствует литературным данным с повышенным уровнем экспрессии *GLII* в опухолевых клеточных линиях [36, 58, 93].

При исследовании 25 образцов глиомы 3-ей и 4-ой степени злокачественности было обнаружено, что уровень экспрессии *GLII* не превышает таковой уровень в контрольных образцах здоровой ткани мозга (4 образца). Анализ научной литературы демонстрирует неоднозначность имеющихся данных, касающихся экспрессии *GLII* в первичных образцах глиом. Кроме того, отчетливо прослеживается идея некоторых авторов, в соответствии с которой по наличию или отсутствию экспрессии *GLII* делаются выводы об активности сигнального пути НН в клеточных культурах или первичных образцах [36, 93-95].

С одной стороны, авторы отмечают гиперэкспрессию *GLII* при глиомах 3-ей и 4-ой степеней злокачественности (не во всех первичных образцах) [93]. С другой стороны, есть данные, что экспрессия *GLII* в глиобластомах не превышает уровня в контрольных образцах, полученных из височной доли пациентов с эпилепсией, в то время как гиперэкспрессия *GLII* отмечается при глиомах 2-ой и 3-ей степеней злокачественности [94]. Вместе с тем, в литературе неоднократно отмечается повышение уровня экспрессии *GLII* в большинстве клеточных линий глиобластом и низкий уровень экспрессии *GLII*, сопоставимый с контрольным в клеточных линиях, полученных из первичных образцов опухолей [36, 58, 94]. Аналогичные результаты по уровню экспрессии *GLII* были получены и в нашем исследовании. По некоторым данным, активация (повышение экспрессии *GLII*) сигнального пути НН происходит при рецидивирующих глиобластомах, возникающих после курсов химиотерапии [94, 95].

Однако, по данным, полученным при помощи ПЦР-РВ, не верно делать предположение об активности сигнального пути НН, так как не всегда высокий уровень экспрессии *GLII* связан с повышенной активностью сигнального пути, а низкий уровень *GLII* с его низкой активностью. Причина данного несоответствия может заключаться в ингибировании синтеза *GLI1* на уровне трансляции, что требует дополнительного изучения [97]. Таким образом, исследование экспрессии *GLII*, как основного показателя активности сигнального пути НН не совсем верно.

Одними авторами в качестве оптимального метода оценки активности транскрипционного фактора *GLI1* в культурах клеток предлагается использовать репортерный ген люциферазы [97, 98]. Другие авторы предлагают иммунофлуоресцентные методы [91]. Таким образом перед исследователями встает актуальная проблема оценки активности сигнального пути при глиомах, потому что в настоящее время нет однозначной стратегии.

Некоторые авторы не стараются оценивать непосредственно активность сигнального пути, а просто выясняют его влияние на процессы ангиогенеза, пролиферации, химиорезистентности и процессы стволовости [59, 151, 203, 206]. При таких экспериментальных подходах по этим параметрам можно судить об активности пути, не останавливаясь на различных механизмах ингибирования, действующих после синтеза мРНК, что нами и было сделано.

Получив данные о том, что уровень *GLII* в первичных послеоперационных образцах не отличается от контрольных, и приняв во внимание тот факт, что не всегда уровень экспрессии *GLII* связан с активностью сигнального пути из-за возможных механизмов ингибирования, мы пришли к выводу, что оценивать экспрессию *GLII* и генов, ассоциированных с пролиферацией и химиорезистентностью с изучением их корреляции будет недостоверно. Поэтому мы перешли к следующей части нашей работы, основанной на изучении непосредственного влияния сигнального пути на процессы пролиферации и химиорезистентности.

Для оценки влияния сигнального пути на процессы пролиферации, мы решили воздействовать на сигнальный путь НН посредством его стимуляции и ингибирования. После данных воздействий мы анализировали как изменилась клеточная пролиферация.

В качестве активатора был взят рекомбинантный человеческий N-концевой полипептид Shh (PeproTech). Этот способ повышения активности сигнального пути является прямым, наиболее простым и используемым [59, 102]. Прямым он является в силу того, что лиганд Shh – главный активатор НН сигналинга в клетках человека. Другими потенциальными способами повысить активность сигнального пути является ингибирование супрессоров НН сигналинга, к которым относятся NHP, PTCH1 и SUFU. Это само по себе является целой работой, направленной на изучение роли данных факторов в функционировании НН сигнального пути в тех или иных клеточных линиях, где необходим подбор ингибиторов, их концентраций и определение количества как мРНК, так и самих интересующих нас белков. Особенно интересно было бы оценить роль неоднозначно влияющего на сигнальный путь НН фактора SUFU. Не разобравшись в этих аспектах, использовать данный подход для повышения активности сигнального пути было бы не правильно.

Согласно данным мировой литературы, циклопамин и GANT-61 являются наиболее часто используемыми ингибиторами сигнального пути. Выбор циклопамина в нашей работе был обусловлен тем, что этот препарат оказывает ингибирующее влияние непосредственно на классический сигнальный путь НН. Это и оказалось необходимым в нашей работе. В то время как GANT-61 ингибирует транскрипционный фактор GLI1, то есть ингибирует как классический, так и неканонический сигналинг, обусловленный влиянием других молекул и

сигнальных путей на HH сигналинг. В большинстве исследований, посвященных глиомам, также применялся циклопамин [92, 93].

В качестве растворителя циклопамина допускается использовать этанол (2% раствор), метанол (0,7% раствор) и DMSO (0,4% раствор). Несмотря на более высокую растворимость в этаноле и метаноле, производители рекомендуют растворять циклопамин в DMSO. При растворении в метаноле и этаноле возможно постепенное увеличение концентрации препарата за счет испарения растворителя. 0,4% циклопамин соответствует концентрации раствора 9,72 мМ. Для удобства была взята концентрация 5 мМ. Как показали первые эксперименты, внесение DMSO приводило к достоверному дозозависимому увеличению клеточной пролиферации по сравнению с клетками без DMSO. При растворении циклопамина в этаноле удалось добиться концентрации 40 мМ, что позволило снизить концентрацию растворителя (этанола по сравнению с DMSO) в 8 раз. Однако, в экспериментах (данные не представлены) также наблюдалось достоверное дозозависимое увеличение клеточной пролиферации. Такое влияние растворителей может быть обусловлено изменением свойств мембраны клеток, в результате чего в клетки поступает больше питательных веществ. Учитывая данные наблюдения и рекомендации производителя циклопамина, в качестве растворителя мы применяли DMSO.

Мы выяснили, что при внесении циклопамина наблюдается дозозависимое снижение пролиферации клеточных линий глиобластомы U-251 MG и U-87 MG, но не наблюдалось уменьшение пролиферации в культуре астроцитов человека. Эти данные демонстрируют, что циклопамин, посредством ингибирования сигнального пути HH, уменьшает пролиферацию клеток глиомы, где сигнальный путь активен. Это обусловлено тем, что при ингибировании SMO снижается экспрессия гена транскрипционного фактора *GLI1*, что напрямую сказывается на транскрипции целевых генов [91, 93]. Отсутствие эффекта циклопамина на культуру астроцитов человека свидетельствует в пользу того, что в нормальных астроцитах HH сигналинг не активен и не влияет на процессы клеточной пролиферации.

Похожие результаты отмечаются в некоторых других исследованиях. Но в качестве контроля использовалась не культура астроцитов, а линия глиомы A172, в которой экспрессия *GLI1* значительно ниже, чем в линиях U-87 MG и U-251 MG [91]. Так при внесении циклопамина (5 и 10 мкМ) к клеточным линиям U-87 MG, U-251 MG и SHG44 отмечалось снижение клеточной пролиферации, однако данный эффект не отмечался для линии глиомы A172. Эти данные были получены при помощи колориметрического метода с использованием реагента ХТТ [91].

Так как циклопамин в концентрации 5 и 10 мкМ не снижает рост клеток культуры астроцитов, то справедливо отметить, что циклопамин в данных концентрациях не оказывает цитотоксический эффект (прямой и НН сигналинг-опосредованный) и не снижает пролиферацию клеток культуры астроцитов человека. Следовательно, справедливо утверждение, что циклопамин в данных концентрациях не оказывает прямого цитотоксического действия на линии U-87 MG и U-251 MG. А наблюдаемое снижение клеточного роста этих культур может быть обусловлено как действием циклопамина на пролиферацию, так и на НН сигналинг-опосредованную гибель клеток. К сожалению, при помощи технологии измерения электрического импеданса в реальном времени или колориметрических методов, выяснить отдельный вклад пролиферации и гибели клеток в уменьшение клеточного роста невозможно.

Для выяснения вклада НН сигналинг-опосредованной гибели клеток в снижение роста клеток мы провели тест на определение количества погибших клеток и клеток в состоянии апоптоза. Для того, чтобы наши данные можно было сопоставить с данными, полученными в экспериментах по измерению электрического импеданса, мы выращивали клетки в максимально похожих условиях, то есть брали одинаковое количество клеток на единицу площади и кроме одинаковой концентрации циклопамина брали и нормированное количество циклопамина на число клеток.

В первую очередь мы провели данный тест на клетках культуры астроцитов человека. Здесь стоит вернуться к экспериментам по изучению роста клеток и отметить, что добавление 20 мкМ циклопамина, в отличие от 5 и 10 мкМ, снижало рост клеток (рис. 16). Но выяснить причины данного снижения при помощи метода измерения электрического импеданса не представлялось возможным. При оценке жизнеспособности клеток мы обнаружили, что количество погибших клеток и клеток в состоянии апоптоза при концентрации циклопамина 5 и 10 мкМ и культивировании в течение 50 часов не отличалось от контроля с 0,2% DMSO. Однако при добавлении к клеткам 20 мкМ циклопамина в световой микроскоп было видно, что примерно на 30-40% площади поверхности лунок клетки оставались прикрепленными к пластику (визуально сравнивалось с контролем с 0,4% DMSO). Среди клеток, снятых с пластика, увеличилось количество погибших и апоптотических клеток. Эти данные подтверждают данные литературы о том, что в концентрации более 10 мкМ циклопамин оказывает цитотоксический эффект на клетки вне зависимости от функционирования НН сигналинга [91].

Необходимо отметить, что в нашу задачу не входило определение концентраций, при которых начинается прямое цитотоксическое действие препарата. Мы показали, что в рабочих

концентрациях 5 и 10 мкМ прямого цитотоксического действия циклопамина на клетки не наблюдается.

В экспериментах с добавлением 5 и 10 мкМ циклопамина к клеткам глиом линий U-251 MG и U-87 MG наблюдалось дозозависимое увеличение процента погибших и апоптотических клеток, то есть наблюдалось цитотоксическое действие циклопамина на клетки глиом. Учитывая тот факт, что циклопамин в концентрации 5 и 10 мкМ не оказывал цитотоксического действия на клетки астроцитов, мы предполагаем, что механизм цитотоксического действия циклопамина на клетки глиом является НН сигналингопосредованным. Аналогичные рассуждения встречаются и в литературе, где вместо астроцитов используется линия глиомы A172 [91].

Возвращаясь к оценке КИ линий глиом U-251 MG и U-87 MG, справедливо возникает вопрос, связано ли снижение КИ с уменьшением пролиферации, или это наблюдается в связи с цитотоксическим действием циклопамина на клетки. Для того, чтобы разобраться в этом вопросе, вернемся к количественным показателям изменения КИ при внесении циклопамина.

Клеточный индекс зависит от количества жизнеспособных клеток, прикрепленных ко дну лунки. Эти данные мы сравниваем с изменением количества жизнеспособных клеток в экспериментах по оценке жизнеспособности клеток. При этом клетки в состоянии апоптоза мы тоже будем учитывать, так как в экспериментах с измерением электрического импеданса клетки в состоянии апоптоза еще прикреплены ко дну лунок и вносят вклад в общее сопротивление. Для клеток линии U-251 MG через 50 часов инкубации клеток с циклопамином КИ уменьшился в 1,32 (5 мкМ) и 1,88 (10 мкМ) раз по сравнению с контролем. Количество жизнеспособных клеток в экспериментах по оценке жизнеспособности клеток уменьшилось в 1,05 и 1,06 раз для клеток с добавлением 5 мкМ и 10 мкМ циклопамина, соответственно.

Для клеток линии U-87 MG через 60 часов инкубации с циклопамином КИ уменьшился в 1,16 (5 мкМ) и 1,65 (10 мкМ) раз по сравнению с контролем. Количество жизнеспособных клеток в экспериментах по оценке жизнеспособности клеток уменьшилось в 1,04 и 1,06 раз для клеток с добавлением 5 мкМ и 10 мкМ циклопамина, соответственно.

Таким образом, видно, что снижение КИ в клеточных линиях глиом обусловлено в большей степени уменьшением клеточной пролиферации и в меньшей степени НН сигналингопосредованным цитотоксическим действием циклопамина.

Дополнительную информацию о влиянии сигнального пути НН на процессы пролиферации мы получили из экспериментов с добавлением лиганда Shh. Так при добавлении

лиганда в концентрации 3 мкг/мл отмечается увеличение пролиферации клеток линии U-251 MG и культуры астроцитов. Однако, данный эффект не наблюдался для клеток линии U-87 MG.

С одной стороны, полученные данные не соответствуют ожидаемым данным, по аналогии с циклопамином, что отсутствие эффекта будет отмечаться для астроцитов. С другой стороны, интерпретация этих данных позволяет сделать предположения об активности сигнального пути. Так, в нашей работе при внесении циклопamina и лиганда Shh отмечается три варианта поведения клеток.

Пролиферация клеток U-251 MG снижалась при добавлении циклопamina, в то время как внесение Shh приводило к ее увеличению. Справедливо предположить, что НН сигнальный путь находится в активном состоянии, но так как внесение Shh ведет к дополнительному увеличению пролиферативной способности клеток, то НН сигнальный путь в этих клетках находится в не полностью активном состоянии. Добавление циклопamina снижает пролиферацию клеток глиомы U-87 MG, но внесение Shh не оказывает дополнительного эффекта. Мы предположили, что НН сигнальный путь в клетках U-87 MG функционирует максимально активно. Циклопамин не влияет на пролиферацию клеток культуры астроцитов человека, но лиганд Shh оказывает стимулирующее влияние на процессы пролиферации. Таким образом, можно предположить, что в астроцитах сигнальный путь не активен, но находится в молчащем состоянии, когда при внешнем воздействии сигналинг может стать активным. Эти данные наводят на мысли о влиянии паракринной регуляции на запуск процессов онкогенеза в здоровых клетках. Так, в литературе отмечается, что кокультивирование клеток глиобластомы и эндотелиоцитов приводит к обоюдному увеличению активности сигнального пути [105, 106].

Наша следующая задача состояла в оценке влияния НН сигнального пути на резистентность (чувствительность) исследуемых культур к химиотерапевтическим препаратам. Мы выбрали цисплатин, темозоломид и доксорубицин. Темозоломид был выбран из соображений, что данное вещество в настоящее время применяется в комплексной терапии глиом 3-ей и 4-ой степеней злокачественности [20]. Цисплатин и доксорубицин были выбраны, так как относятся к разным классам химиопрепаратов, для которых отличаются механизмы химиорезистентности.

Мы решили отказаться от использования колориметрических тестов, так как после предварительного внесения активатора или ингибитора сигнального пути изменяется пролиферативная активность клеток, вследствие чего на момент внесения химиопрепарата в разных лунках будет разное количество клеток, что затрудняет интерпретацию данных

колориметрических тестов. По аналогичным соображениям оценивать изменения КИ после внесения химиопрепарата также не совсем верно.

Для оценки влияния НН сигналинга на химиочувствительность клеток глиом мы разработали собственную методику. Суть методики заключается в том, что после культивирования клеток в течение 2-х суток с циклопамином или лигандом Shh мы вносили химиотерапевтические препараты в заранее выбранных концентрациях и определяли время, через которое клетки начинали погибать. Необходимо отметить, что химиотерапевтические препараты мы вносили вместе со свежей средой, предварительно отобрав среду с циклопамином, Shh и DMSO.

Возвращаясь к методике измерения электрического импеданса, необходимо отметить, что прибор измеряет электрическое сопротивление, которое зависит от количества жизнеспособных клеток, прикрепленных ко дну лунки, и площади их контакта, и выдает нам результат в виде значения КИ. Прибор не может оценивать сколько клеток погибает, а сколько новых клеток вырастает в выбранный промежуток времени. Вместо этого прибор оценивает совокупность данных процессов.

Пока клетки растут без химиопрепарата, процессы пролиферации преобладают над процессами естественной гибели клеток. Мы наблюдаем дальнейший рост кривой зависимости КИ от времени. После внесения химиопрепарата начинают погибать первые клетки, возможно, дополнительно снижается пролиферативная активность клеток. Некоторое время процессы пролиферации еще преобладают над процессами гибели клеток. В это время на кривой мы наблюдаем снижение $\frac{dKI}{dt}$, то есть снижение скорости изменения КИ по времени. Но $\frac{dKI}{dt} > 0$.

В какой-то момент времени процессы пролиферации сравниваются с процессами гибели клеток. Мы наблюдаем, что кривая зависимости КИ от времени достигла максимума. В это время $\frac{dKI}{dt} = 0$.

После этого процессы гибели клеток преобладают над процессами пролиферации. Значение КИ будет постепенно уменьшаться, $\frac{dKI}{dt} < 0$.

Таким образом, под “временем, через которое клетки начинают погибать” мы понимаем не время начала гибели первых клеток, что не является важной информацией, а время, когда наступает баланс между процессами гибели клеток и пролиферации клеток, после чего процессы гибели клеток начинают преобладать над процессами пролиферации.

Данные рассуждения помогают объяснить необходимость замены среды на свежую при добавлении химиопрепаратов. Если этого не делать, то оставшийся в среде Shh или DMSO мог оказывать дополнительное стимулирующее воздействие на пролиферацию, что изменило бы время, когда процессы пролиферации и гибели клеток сравниваются. А оставшийся в среде циклопамин оказывал бы дополнительный цитотоксический НН сигналинг-опосредованный эффект, что уменьшило бы интервал времени, когда процессы гибели клеток и пролиферации сравниваются.

В отличие от работ, описанных в мировой литературе, наша методика позволяет оценить непосредственное влияние сигнального пути на чувствительность клеток к химиопрепаратам. В то время как применение колориметрических методов не позволяет разграничить влияние сигнального пути в отдельности на пролиферацию и химиорезистентность [95].

Помимо оценки времени, через которое начинали погибать клетки, мы предположили, что скорость гибели клеток (параметр $\frac{dKI}{dt}$, когда процессы гибели начинают преобладать над процессами пролиферации) также может оказаться информативным. Но мы пришли к выводу, что на данный параметр влияет концентрация химиопрепарата (рис. 18), но не предварительное культивирование клеток с ингибитором или активатором НН сигнального пути.

В исследовании была взята линия глиомы U-251 MG, в качестве контроля взята культура астроцитов. Линия глиомы U-87 MG была исключена из исследования, так как при добавлении химиотерапевтических препаратов наблюдалось аномальное изменение КИ, возможно, обусловленное изменением клеточной морфологии и, как следствие, изменением площади соприкосновения клеток и поверхности микроэлектродов.

Мы показали, что добавление циклопамина приводит к тому, что клетки глиомы линии U-251 MG после внесения химиотерапевтических препаратов (цисплатин, темозоломид и доксорубицин) начинают погибать раньше, чем контрольные клетки, предварительно культивированные только с растворителем DMSO. Другими словами, культивирование клеток с циклопамином приводит к увеличению химиочувствительности или уменьшению химиорезистентности к используемым препаратам.

Клетки линии U-251 MG, предварительно культивируемые с циклопамином, начинали погибать через 16,57 часов после внесения цисплатина, что в 1,65 раза меньше чем контрольные клетки, предварительно культивированные с DMSO (27,41 часов). При внесении темозоломида и доксорубицина время, через которое начинали погибать клетки оказалось в 1,23 и 1,44 раз меньше, соответственно. Разное время начала гибели клеток объясняется как различием

механизмов химиорезистентности к разным препаратам, так и влиянием НН пути на эти механизмы.

Внесение лиганда Shh увеличивало период времени, через который начинали погибать клетки линии U-251 MG после внесения цисплатина и доксорубицина, при сравнении с контрольными клетками. Но разница отсутствовала для темозоломида. Это можно объяснить тем, что НН сигналинг в разной степени влияет на механизмы резистентности к разным химиотерапевтическим препаратам и механизмы репарации поврежденной ДНК [176].

На клетки культуры астроцитов человека предварительное культивирование с циклопамином и Shh не оказывало аналогичных эффектов.

При анализе полученных результатов могут появиться мысли, что разное время гибели клеток линии U-251 MG, предварительно культивированных с циклопамином и DMSO или Shh и культуральной средой, может быть обусловлено тем, что после смены среды на свежую без данных веществ сохраняется эффект от первоначального культивирования клеток с данными веществами. То есть после устранения циклопamina, молекулярные изменения в клетках не устраняются так быстро и продолжают влиять на снижение пролиферации. А после устранения DMSO или Shh какое-то время процессы пролиферации повышены.

В дополнительных экспериментах было показано, что замена среды у клеток линии U-251 MG, росших в присутствии 0,2% DMSO, на среду без DMSO приводила к дальнейшему увеличению КИ (к дальнейшему росту клеток), но скорость клеточной пролиферации ($\frac{dKI}{dt}$) была ниже, чем в контроле, где клетки продолжали расти без замены среды с 0,2% DMSO (рис. 21). А замена среды у клеток U-251 MG, росших при концентрации циклопamina 5 мкМ и 10 мкМ, на среду без циклопamina приводила к последующему увеличению КИ и увеличению скорости изменения КИ по времени ($\frac{dKI}{dt}$) в сравнении с контролем, где клетки продолжали расти без замены среды (рис. 21). В первой серии экспериментов мы вправе под параметром $\frac{dKI}{dt}$ подразумевать скорость клеточной пролиферации. В экспериментах с циклопамином правильно писать скорость изменения КИ по времени, так как циклопамин влияет на пролиферацию и оказывает НН сигналинг-опосредованный цитотоксический эффект (пусть и в меньшей степени), что влияет на $\frac{dKI}{dt}$.

Так как циклопамин разведен в DMSO, то при смене среды с циклопамином на свежую среду наблюдается два процесса. Первый процесс связан с устранением DMSO. Из первого эксперимента понятно, что устранение DMSO приводит к дальнейшему росту клеток с

увеличением КИ, но скорость роста оказывается ниже, чем в контроле, где не производилась замена DMSO. Из второго дополнительного эксперимента становится ясно, что устранение циклопамина вместе с DMSO приводит как к дальнейшему увеличению КИ, так и увеличению скорости изменения КИ по времени ($\frac{dKI}{dt}$). Несмотря на ожидаемое снижение $\frac{dKI}{dt}$ из-за устранения DMSO, мы наблюдаем увеличение $\frac{dKI}{dt}$. То есть устранение циклопамина приводит к увеличению $\frac{dKI}{dt}$, которое даже нивелирует наблюдаемое снижение $\frac{dKI}{dt}$ вследствие устранения DMSO. Все это свидетельствует в пользу того, что при смене среды первоначальный эффект циклопамина на клетки не сохраняется. В отсутствие циклопамина наблюдается увеличение КИ и $\frac{dKI}{dt}$, которое может быть связано, как с увеличением пролиферации, так и с уменьшением НН сигналинг-опосредованного цитотоксического действия циклопамина.

Вернемся к экспериментам с оценкой времени начала гибели клеток. С одной стороны, мы исследуем клетки, предварительно культивированные с циклопамином, разведенным в DMSO, с другой стороны, контрольные клетки, предварительно культивированные с DMSO. При замене среды на свежую с химиотерапевтическим препаратом мы вносим изменения. К одинаковым изменениям относится то, что испытываемые и контрольные клетки получают новую среду, что стимулирует процессы пролиферации за счет появления свежей сыворотки и свежих компонентов среды. Также испытываемые и контрольные клетки перестают расти в присутствии DMSO, что сказывается на некотором общем снижении $\frac{dKI}{dt}$. И наконец, отличие заключается в том, что только испытываемые клетки перестают расти в присутствии циклопамина, что должно приводить к повышению $\frac{dKI}{dt}$, в отличие от контроля. Также испытываемые и контрольные клетки получают одинаковую концентрацию химиотерапевтического препарата.

Как было описано выше, на изменение КИ с одной стороны влияют процессы пролиферации, а с другой стороны влияют процессы гибели клеток. Так как единственным отличием, влияющим на пролиферацию, является устранение циклопамина в испытываемых клетках, что приводит к увеличению КИ и $\frac{dKI}{dt}$, то ожидаемо, что процессы пролиферации должны сравняться с процессами гибели клеток позже, чем в контрольных образцах, что приведет к позднему началу гибели клеток. Однако, мы наблюдаем обратный эффект, когда клетки, росшие в присутствии циклопамина начинают погибать раньше, чем контрольные клетки, росшие в присутствии DMSO. Данное несоответствие объясняется тем, что циклопамин повышает чувствительность клеток к химиотерапевтическим препаратам, вследствие чего, клетки, росшие в присутствии циклопамина, начинают погибать раньше, чем контрольные клетки.

Мы считаем, что смена среды на новую без циклопана и DMSO в меньшей степени влияет на изменение КИ, чем внесение химиотерапевтического препарата. При добавлении химиотерапевтического препарата, последний практически сразу начинает проникать в клетки и оказывать повреждающее воздействие на ДНК. Повреждение ДНК в свою очередь ведет как к явлениям апоптоза и клеточной гибели, так и к замедлениям процессов клеточной пролиферации. Как уже было сказано, так как в случае предварительного культивирования клеток с циклопанами гибель начинается раньше, чем в контроле, мы сделали вывод о вовлечении НН сигналинга в процессы химиорезистентности.

Для того, чтобы понять, как сигнальный путь НН оказывает воздействие на чувствительность клеток к химиотерапевтическим препаратам, мы рассмотрим от чего зависит повреждающий эффект химиотерапевтических препаратов. Повреждающий эффект зависит от концентрации внесенного препарата, времени культивирования с препаратом, скорости проникновения препарата в клетки и от механизмов повреждения ДНК и способов их устранения. Чем больше препарата внесено, чем выше скорость проникновения в клетки, чем активнее препарат осуществляет повреждающее действие и чем медленнее работают механизмы репарации, тем быстрее наблюдается цитотоксический эффект, тем быстрее погибают клетки. Чем быстрее погибают клетки, тем быстрее процессы пролиферации сравниваются с процессам клеточной гибели, и тем раньше наступит момент, когда $\frac{dKI}{dt} = 0$.

В испытуемых и контрольных клетках применялась одинаковая концентрация препаратов. Различия могли наблюдаться только в скорости проникновения препаратов в клетки и скорости репарации поврежденных молекул ДНК. Гибель клеток, предварительно культивированных с циклопанами, могла начинаться раньше из-за того, что химиотерапевтические препараты активнее проникали в клетки, а репарация повреждений ДНК осуществлялась медленнее, что связано с ингибированием сигнального пути НН.

В литературе отмечается, что НН сигналинг стимулирует появление АВС переносчиков на клеточных мембранах опухолевых клеток и увеличивает процессы репарации поврежденной ДНК, что увеличивает химиорезистентность клеток. При ингибировании НН сигнального пути отмечается снижение данных процессов [186, 206, 263].

Другая часть экспериментов по изучению влияния НН сигнального пути на химиорезистентность была связана с предварительной активацией сигналинга при помощи лиганда Shh. Мы не стали в дополнительных исследованиях выяснять, как на КИ влияет смена среды с Shh на свежую среду. Нам бы пришлось проводить дополнительные эксперименты с повторным добавлением Shh как к клеткам росшим с лигандом, так и без него. Это потребовало

бы дополнительной траты лиганда Shh и плашек с золотыми микроэлектродами. К тому же Shh является лигандом и по истечении двух суток он либо истощится, либо деградирует, поэтому мы предположили, что влияние лиганда Shh на дальнейшую пролиферацию после смены среды минимальное.

Это только наши предположения. Реальное доказательство того, что после смены среды влияние Shh на дальнейшую пролиферацию клеток незначительно, мы получили при проведении экспериментов с клетками культуры астроцитов человека.

При предварительном культивировании клеток культуры астроцитов с Shh наблюдалось повышение клеточной пролиферации в сравнении с контролем, но при этом время начала гибели клеток при добавлении испытуемых химиотерапевтических препаратов достоверно не отличалось (рис. 19 г, 20 б, г, е). Таким образом, предварительное культивирование астроцитов с Shh не приводило ни к изменению времени начала гибели клеток, ни к увеличению клеточной пролиферации после смены среды. В противном случае, период времени до начала гибели клеток при предварительном культивировании с Shh оказался бы больше. Также данный эксперимент свидетельствует в пользу того, что на время, через которое начинают погибать клетки не влияет количество клеток в момент замены среды на среду с химиотерапевтическим препаратом.

Любопытно, что при предварительном культивировании астроцитов с лигандом Shh не отмечалось разницы во времени начала гибели клеток. Из этого следует, что активация сигнального пути приводит к стимуляции пролиферации, но не влияет на чувствительность клеток к химиотерапевтическим препаратам. Что касается предварительного культивирования астроцитов с циклопамином в концентрации 5 и 10 мкМ, то оказалось, что циклопамин не влияет ни на процессы пролиферации, ни на чувствительность клеток к химиотерапевтическим препаратам.

Таким образом, ингибирование сигнального пути в клетках глиом повышает химиочувствительность клеток, в то время как внесение активатора НН сигнального пути снижает химиочувствительность. Следовательно сигнальный путь НН влияет на химиорезистентность клеток глиом.

Одним из показателей, по которому судят о химиорезистентности тех или иных культур клеток и клеточных линий, является процент клеток боковой популяции. Этот показатель получают при окрашивании клеток флуоресцентными витальными красителями Hoechst 33342 или DCV. Первоначально методика была разработана для красителя Hoechst 33342, и лишь в последние годы в лабораториях стал активно использоваться краситель DCV (первые статьи с

его использованием индексированы в Pubmed в 2007 году). Дело в том, что эти красители являются субстратами для ABC переносчиков, в результате чего клетки, отличающиеся повышенной презентацией данных транспортеров, активно выкачивают красители из мембраны и при цитофлуориметрическом анализе характеризуются меньшим уровнем флуоресценции, чем остальная популяция клеток [260, 264, 265]. Название “боковая популяция” происходит от расположения данной популяции клеток сбоку и ниже от основной популяции клеток на двумерных точечных диаграммах (рис. 22).

В нашей работе для определения процента клеток боковой популяции мы использовали DCV, так как на приборе был установлен фиолетовый лазер (с длиной волны 407 нм), а не ультрафиолетовый, необходимый для красителя Hoechst 33342, чаще применяющийся в таких экспериментах. Нашей задачей не являлось сравнение данных процента клеток боковой популяции с данными мировой литературы при использовании Hoechst 33342. Мы изучали влияние сигнального пути на мультилекарственную резистентность.

Нами было показано, что культивирование клеток линий глиобластом U-87 MG и U-251 MG с циклопамином приводит к дозозависимому уменьшению процента клеток боковой популяции в сравнении с контролем, где клетки культивировались только в присутствии DMSO. Мы не проводили тест по оценке влияния лиганда Shh на боковую популяцию из-за ограниченной возможности использования данного препарата в необходимом количестве. Таким образом, из результатов, полученных с применением ингибитора сигнального пути циклопamina следует, что сигнальный путь принимает участие в формировании клеток боковой популяции, то есть влияет на мультилекарственную резистентность, обусловленную ABC переносчиками.

Так как разные белки семейства ABC могут препятствовать проникновению красителя DCV в клетку, то мы не можем судить о том, на какие конкретно ABC переносчики влияет HH сигналинг, а на какие не влияет. Для более прицельного выяснения влияния сигнального пути на конкретные переносчики необходимо применение либо молекулярно генетических методов, либо применение специфических к конкретному переносчику ингибиторов другого класса [195, 256]. Но в мировой литературе отмечается, что большой вклад в формирование боковой популяции вносят ABCG2 переносчик. Также вклад могут вносить ABCB1 (P-гликопротеин), ABCC1 (MRP-1), ABCC3, ABCA2 и другие переносчики [266, 267].

О влиянии HH пути на формирование фенотипа боковой популяции при раке яичников, желудка, легких, саркомах, мезотелиоме и других онкологических заболеваниях свидетельствует ряд работ [206, 263, 268-270]. А для назофарингеальной карциномы было

показано, что в клетках боковой популяции повышена экспрессия *GLI1*, *GLI2* и *PTCH1* генов, а также генов сигнальных путей Notch, TGF β и Wnt [271].

Так как НН сигналинг влияет на фенотип клеток боковой популяции, то можно предположить, что активность сигнального пути отличается не только между клеточными линиями и первичными культурами клеток, но может отличаться и между клетками одной культуры.

Не возникает сомнений в том, что активный сигнальный путь Hedgehog может рассматриваться в качестве терапевтической цели при лечении низкодифференцированных глиом. Это будет способствовать как снижению роста опухоли, так и преодолению множественной лекарственной резистентности.

Для наиболее эффективного лечения онкологических заболеваний, в том числе глиом, терапия НН сигналинг-зависимых или НН сигналинг-независимых опухолей должна отличаться [16]. Поэтому перед исследователями встает актуальная проблема оценки активности сигнального пути. Оценка экспрессии *GLI1*, использование репортерного гена люциферазы, иммунофлуоресцентные методики по определению ядерной локализации *GLI1* дают противоречащие друг другу результаты. Мы предлагаем оценивать активность сигнального пути не по количеству и локализации *GLI1* или экспрессии его гена и его сплайсинговых вариантов, а по влиянию сигнального пути на клеточную пролиферацию, то есть на тот процесс, на который активный сигнальный путь оказывает влияние.

В настоящий момент мы предложили только качественную оценку активности сигнального пути. При этом мы отталкивались от результатов не только с использованием циклопамина, но и лиганда Shh, что позволило нам сделать предположение о большей или меньшей активности сигнального пути в клеточных линиях U-87 MG и U-251 MG, соответственно. Отсутствие эффекта на внесение циклопамина, но увеличение пролиферации при добавлении Shh было расценено нами как неактивное молчащее состояние сигнального пути в клетках культуры астроцитов. Возможно, клетки других культур человека будут находиться в неактивном состоянии, при котором не будет отмечаться эффект ни от циклопамина, ни от лиганда Shh.

Необходимо отметить несомненное преимущество методики измерения электрического импеданса перед классическими колориметрическими методами. В отличие от колориметрических методов, метод измерения электрического импеданса не оказывает негативного воздействия на клетки, позволяет получать данные в реальном времени и для большого количества временных точек, что дает возможность делать более достоверные

выводы о клеточных процессах. В случае использования классических колориметрических методов, оценка пролиферации в разные временные точки была бы более трудоемкой и ресурсозатратной.

Дальнейшие эксперименты с применением Shh и циклопамина, а также методики оценки жизнеспособности клеток как стандартных линий глиом, так и первичных культур, для которых пока не существует однозначной стратегии оценки НН сигналинга, позволят как усовершенствовать качественные критерии, так и разработать количественные критерии оценки активности сигнального пути. Применение антител и ингибиторов к различным компонентам сигнального пути позволит точнее установить влияние данных компонентов на активность и функционирование сигнального пути НН. Это позволит более полно понять роль сигнального пути в глиоматогенезе и выделить НН-зависимые и НН-независимые популяции опухолей, что будет способствовать подбору адекватной индивидуальной терапии.

Мы впервые при помощи методики измерения электрического импеданса оценили влияние сигнального пути НН на химиорезистентность клеток глиом. По влиянию НН сигналинга на химиорезистентность сложнее делать предположение об активности пути, чем по оценке пролиферации. Но при помощи данных экспериментов можно будет получать дополнительную информацию об активности сигнального пути и изучать механизмы влияния сигнального пути на процессы химиорезистентности к тем или иным химиотерапевтическим препаратам. Так, отсутствие влияния циклопамина и лиганда Shh на клетки астроцитов подтверждало предположение о неактивном молчащем состоянии НН сигналинга. Влияние же данных веществ на клетки U-251 MG, напротив, подтверждало активность сигнального пути.

Дальнейшие эксперименты с клетками первичных культур позволят выявлять наиболее эффективную комбинацию цитостатического препарата и ингибитора сигнального пути как на клетках глиом, так и на клетках других опухолей, что будет способствовать совершенствованию персонализированной медицины с индивидуальным подходом к каждому конкретному пациенту. Это в свою очередь будет способствовать увеличению продолжительности жизни, а возможно и полному выздоровлению от таких сложных онкологических заболеваний, которыми являются низкодифференцированные глиомы.

Заключение

Не вызывает сомнений участие сигнального пути Hedgehog в развитии ряда онкологических заболеваний, в том числе и злокачественных опухолей головного мозга. Об активности сигнального пути не всегда верно судить по экспрессии *GLII* – гена основного компонента сигнального пути. В то время как одни авторы пытаются подобрать оптимальный метод для оценки активности сигнального пути, другие авторы оценивают его непосредственное влияние на клеточные процессы. В работе мы показали, что компоненты сигнального пути Hedgehog достоверно влияют на пролиферацию и химиорезистентность клеток низкодифференцированных глиом. Нет сомнений в том, что компоненты сигнального пути могут рассматриваться в качестве патогенетических мишеней при терапии низкодифференцированных глиом, но только в подгруппе Hedgehog сигналинг-зависимых глиом. Для выявления глиом с активным сигнальным путем дополнительно к применяющимся методам можно использовать предложенный нами подход качественной оценки активности сигнального пути.

Для оценки участия компонентов сигнального пути Hedgehog в процессах пролиферации мы впервые применили метод измерения электрического импеданса. В отличие от колориметрических методов, метод измерения электрического импеданса не оказывает негативного воздействия на клетки, позволяет получать данные в реальном времени и для большого количества временных точек, что дает возможность более достоверно оценивать участие компонентов сигнального пути Hedgehog в процессах клеточной пролиферации. Дополнительное применение проточной цитофлуориметрии показало, что циклопамин не оказывает прямого цитотоксического действия, но уменьшает пролиферативную активность клеток глиом и оказывает Hedgehog сигналинг-опосредованное цитотоксическое действие. Предложенное нами сочетание методов измерения электрического импеданса и проточной цитофлуориметрии позволяет оценить влияние циклопамина на данные процессы в отдельности.

Впервые применение метода измерения электрического импеданса дало возможность продемонстрировать, что ингибирование и стимулирование сигнального пути Hedgehog способно оказывать влияние на чувствительность клеток линии U-251 MG к исследуемым химиотерапевтическим препаратам. Данный эффект не наблюдался в клетках культуры астроцитов человека. Также был показан эффект участия компонентов сигнального пути

Hedgehog в процессах формирования мультилекарственной резистентности опухолевых клеток, а также отношение к образованию клеток боковой популяции.

Таким образом, есть основания сделать вывод о том, что эксперименты с использованием Shh, циклопamina и химиотерапевтических препаратов позволяют получать как дополнительную информацию об активности сигнального пути, так и применяться для изучения механизмов влияния компонентов сигнального пути на пролиферацию и процессы химиорезистентности к тем или иным химиотерапевтическим препаратам. Нет сомнений в том, что дальнейшая разработка методов количественной оценки активности сигнального пути Hedgehog и оценки влияния его компонентов на химиорезистентность опухолевых клеток к различным препаратам поможет в разработке эффективной комбинации его ингибиторов и традиционных схем химиотерапии, что будет способствовать развитию персонифицированной терапии пациентов.

Выводы

1. *tGLII* экспрессируется только в клетках линии U-87 MG. Экспрессия *GLII* в клетках линий глиом превышает экспрессию в клетках культуры астроцитов человека. Экспрессия *GLII* в первичных образцах глиом не превышает экспрессию *GLII* в первичных образцах здоровой ткани мозга. Судить о влиянии транскрипционных факторов *GLI1* и *tGLI1* на процессы пролиферации и химиорезистентности только при помощи ПЦР в реальном времени невозможно.
2. *Shh* стимулирует пролиферацию клеток линии U-251 MG и культуры астроцитов человека, но не оказывает влияния на клетки линии U-87 MG. Циклопамин уменьшает пролиферацию клеток линий U-251 MG и U-87 MG, но не влияет на пролиферацию клеток культуры астроцитов человека.
3. Циклопамин в концентрациях 5 и 10 мкМ не оказывает прямого цитотоксического действия на клетки линий глиом и культуры астроциты человека, но оказывает Hedgehog сигналинг-опосредованное цитотоксическое действие на клетки линий глиом.
4. Качественная оценка активности сигнального пути Hedgehog в клетках линий глиом и клетках культуры астроцитов человека позволяет продемонстрировать активацию сигнального пути в клетках линий глиом и неактивное состояние в клетках культуры астроцитов человека.
5. Компоненты сигнального пути Hedgehog способны оказывать влияние на процессы формирования химиорезистентности. Циклопамин снижает химиорезистентность клеток линии U-251 MG к цисплатину, темозоломиду и доксорубицину. *Shh* увеличивает химиорезистентность клеток линии U-251 MG к цисплатину и доксорубицину, но не темозоломиду. Циклопамин и *Shh* не оказывают влияния на химиорезистентность клеток культуры астроцитов человека.
6. Сигнальный путь Hedgehog принимает участие в формировании фенотипа клеток боковой популяции линий U-251 MG и U-87 MG.

Список сокращений и условных обозначений

ABC – белковое суперсемейство переносчиков, содержащих АТФ-связывающий домен (ABCB1 – он же Р-гликопротеин, ABCC1 – он же MRP1 – белок множественной лекарственной резистентности 1, ABCC2, ABCG2, ABCC3, ABCA2)

Ang-1 – ангиопоэтин 1

Ara-C – цитозин арабинозид, он же цитарабин

ATP7B – бета-полипептид медь-переносящей АТФ-азы

ATR/Chk1 – сигнальный путь, где ATR – атаксия-телеангиэктазия и Rad3-родственный белок, серин-треониновая протеинкиназа, Chk1 – чекпойнт-киназа 1

Bcl-2 – семейство регуляторов апоптоза (от B-cell lymphoma 2)

BCRP – ген, кодирующий ABCG2 переносчик

bFGF – основной фактор роста фибробластов, он же FGF-2

BHLHE41 – димеризующийся фактор транскрипции E41

Bmi-1 – белок группы polycomb, кодируемый геном *BM11* (B cell-specific Moloney murine leukemia virus integration site 1)

Boc – трансмембранный рецептор (Brother of Cdo), кодируемый геном *Boc*

BTP-Cul3 - убиквитин-лигаза BTP-Cul3, BTP – 2,6-бис (1,2,3-триазол-4-ил) пиридин, Cul3 – cullin3

C'ΔGLI1 – транскрипционный фактор, мРНК которого является продуктом альтернативного сплайсинга гена *GLI1*

CD133 – проминин-1

CD24 – кластер дифференцировки 24

Cdc2 – ген, кодирующий циклинзависимую киназу 1

Cdc20 – ген, кодирующий белок цикла клеточного деления 20

Cdc25a – ген, кодирующий фосфатазу, обладающую двойной специфичностью (белок цикла клеточного деления 25a)

Cdc25c – ген, кодирующий фосфатазу Cdc25c (белок цикла клеточного деления 25с)

Cdk2 – ген, кодирующий циклинзависимую киназу 2

Cdon – трансмембранный рецептор, кодируемый геном *Cdon*

c-JUN – транскрипционный фактор, кодируемый геном *JUN*

C-MYC – транскрипционный фактор семейства Мус

CtBP2 – ген, кодирующий С-концевой связывающий белок 2 (C-terminal binding protein 2)

CTR1 – транспортер меди 1

CYR61 – богатый цистеином белок 61

DCV – DyeCycle Violet, флуоресцентный краситель

Dhh – ген полипептида Desert hedgehog

DMEM – среда Игла, модифицированная Дульбекко

DMEM/F-12 – среда DMEM и F-12 в соотношении 1:1

DMSO - диметилсульфоксид

DPBS – фосфатно-солевой буферный раствор Дульбекко

DTT – дитиотреитол

E2F2 – ген, кодирующий транскрипционный фактор E2F2 семейства E2F

EGF – эпидермальный ростовой фактор

EGFR – рецептор эпидермального ростового фактора

ERCC1 – ген, кодирующий белок ERCC1, принимающий участие в репарации ДНК

EWS/FL1 – транскрипционный фактор семейства саркомы Юинга

EXO1 – ген, кодирующий экзонуклеазу 1

FEN1 – ген, кодирующий флэп(шлепающую)-эндонуклеазу 1

FGF – семейство факторов роста фибробластов

GAPDH – ген, кодирующий глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу

Gas1 – блокирующий рост специфический белок 1

GLI – семейство транскрипционных факторов GLI (глиома-ассоциированный онкоген)и одноименных генов, существуют GLI1, GLI2, GLI3 транскрипционные факторы

GLI1ΔN – транскрипционный фактор, мРНК которого является продуктом альтернативного сплайсинга гена *GLI1*

HBSS – сбалансированный солевой раствор Хэнкса

HEPES – 4-(2-Гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота

HH – Hedgehog сигнальный путь

HHIP - гликопротеин Hedgehog interacting protein, кодируемый геном *HHIP*

HIF-1α – ген, кодирующий фактор, индуцируемый гипоксией 1-альфа (HIF-1α)

IDH1 и IDH2 – изоцетратдегидрогеназа 1 и 2, кодируемые одноименными генами

IGF-1 – инсулиноподобный фактор роста 1

IGFBP – семейство белков, связывающих инсулиноподобный фактор роста

Ihh – ген полипептида Indian hedgehog

IL-1β – интерлейкин-1β

IL-4 – интерлейкин 4

IL-6 – интерлейкин-6

KIAA0101 – ген, кодирующий фактор, связывающий ядерный антиген пролиферирующих клеток (PCNA)

Ku70 – белок, участвующий в репарации ДНК

LIF – ингибирующий фактор лейкемии

LIG1 – ген, кодирующий ДНК лигазу 1

MDR1 – ген, кодирующий ABCB1 переносчик

MGMT – O6-Метилгуанин-ДНК-метилтрансфераза

MMLV RT – обратная транскриптаза вируса лейкемии мышей

MMP-2, MMP-9 – матриксные металлопротеиназы 2 и 9

MSH6 – ген, кодирующий белок MSH6, участвующий в репарации

mSin3A – белок, регулятор транскрипции, взаимодействующий с SAP18

MT1-MMP – мембрано-связанная матриксная металлопротеиназа

mTOR – протеинкиназа, мишень рапамицина млекопитающих (mamalian target of rapamycin)

NANOG – ген, белок которого является транскрипционным фактором, регулирующим самообновление стволовых опухолевых клеток

NCBI – национальный центр биотехнологической информации

NF- κ B – транскрипционный фактор и одноименный сигнальный путь

NOD2 – внутриклеточный рецептор и одноименный сигнальный путь

Notch – сигнальный путь и семейство трансмембранных белков человека Notch

OCT1/2/3 – органические транспортеры катиона 1/2/3

OCT4 – транскрипционный фактор

p53 – транскрипционный фактор, регулирующий клеточный цикл

p-ATM – серин-треониновая протеинкиназа, активированная двунитевыми разрывами ДНК

PCNA – ядерный антиген пролиферирующих клеток

PDGF – тромбоцитарный фактор роста

PDGFR – рецептор тромбоцитарного фактора роста и одноименный сигнальный путь

PI – йодистый пропидий

PI3K-AKT – сигнальный путь, где основные компоненты PI3K (фосфоинозитид-3-киназа) и AKT-киназы (протеинкиназы B, кодируемые генами *AKT*)

PKA – протеинкиназа A

PKC α – протеинкиназа C альфа

PKC δ – протеинкиназа C дельта

PTCH1 – трансмембранный рецептор Patched 1

PTCH2 – трансмембранный рецептор Patched 2

PTEN – фосфатаза с двойной субстратной специфичностью (phosphatase and tensin homolog)

RAD51/51C – гены, кодирующие белки семейства RAD51, участвующие в репарации ДНК

RAD54B/L – гены, кодирующие белки RAD54B/L, участвующие в репарации ДНК

Ras – сигнальный путь и семейство малых G-белков и их генов, впервые обнаруженных у крыс с саркомой (Rat sarcoma)

RPE – буфер для элюции фирмы Qiagen

RWT – буфер для промывки фирмы Qiagen

S100A4 – S100 кальций связывающий белок A4

SAP18 — гистон деацетилазный комплекс

SDF-1 – фактор стромальных клеток 1 (Stromal cell-derived factor 1)

Shh – ген, кодирующий полипептид Sonic hedgehog (Shh)

SMO - трансмембранный рецептор Smoothened

Snail1 – транскрипционный фактор семейства Snail, регулирует эпителиально-мезенхимальный переход

SOX2 –транскрипционный фактор (sex determining region Y-box 2)

SP – клетки боковой популяции

SUFU – белок, кодируемый геном *SUFU* (Supressor of fused)

TBE – буфер, содержащий трис, борат и ЭДТА

TEM7 – ген, кодирующий опухолевый эндотелиальный маркер 7

TERT – ген, кодирующий теломеразную обратную транскриптазу TERT

TGF- β -Smad – сигнальный путь (TGF- β – трансформирующий ростовой фактор β , активирующий белки семейства Smad – гомологи протеинов Sma (от small - малый) и MAD (mothers against decapentaplegic))

tGLI1 – транскрипционный фактор, мРНК которого является продуктом альтернативного сплайсинга гена *GLI1*

TM4SF – суперсемейство белков тетраспанинов (transmembrane 4 superfamily)

TNF- α – фактор некроза опухоли- α

TP53 – ген, кодирующий белок p53

Tsp-1 – тромбоспондин-1

Twist – транскрипционный фактор, кодируемый геном *TWIST1*

UNG – ген, кодирующий урацил-ДНК-гликозилазу

VEGF – семейство факторов роста эндотелия сосудов

VEGF-C – ген, кодирующий фактор роста эндотелия сосудов C

VEGFR3 – рецептор 3 фактора роста эндотелия сосудов

VEGF-A – ген, кодирующий фактор роста эндотелия сосудов A

Wnt – группа сигнальных путей и семейство белков, (комбинация Wingless (бескрылый) и Int)

XPB – ген, кодирующий XPB хеликазу, участвующую в репарации ДНК

XRCC1 – ген, кодирующий белок XRCC1, участвующий в репарации ДНК

ХТТ – 2,3-бис-(2-метокси-4-нитро-5-сульфофенил)-2Н-тетразолиум-5-карбоксанилид

β -TRCP – убиквитин-лигаза β -TRCP (beta-transducin repeat containing protein), β -TRCP E3 – разновидность убиквитин-лигазы

ВОЗ – Всемирная организации здравоохранения

КИ – клеточный индекс

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция в реальном времени

ЭБС – эмбриональная бычья сыворотка

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

ЭМП – эпителиально-мезенхимальный переход

Список литературы

1. Harder, B. G. Developments in Blood-Brain Barrier Penetrance and Drug Repurposing for Improved Treatment of Glioblastoma / B. G. Harder, M. R. Blomquist, J. Wang et al. // *Front Oncol.* – 2018. – Vol. 8. – P. 462.
2. Zanders, E. D. Therapy for glioblastoma: is it working? / E. D. Zanders, F. Svensson, D. S. Bailey // *Drug Discov Today.* – 2019.
3. Zhang, X. Chemoresistance caused by the microenvironment of glioblastoma and the corresponding solutions / X. Zhang, K. Ding, J. Wang et al. // *Biomed Pharmacother.* – 2019. – Vol. 109. – P. 39-46.
4. Teglund, S. Hedgehog beyond medulloblastoma and basal cell carcinoma / S. Teglund, R. Toftgard // *Biochim Biophys Acta.* – 2010. – Vol. 1805. – № 2. – P. 181-208.
5. Bazzoni, R. Role of Notch Signaling Pathway in Glioblastoma Pathogenesis / R. Bazzoni, A. Bentivegna // *Cancers (Basel).* – 2019. – Vol. 11. – № 3.
6. Saito, N. The Oncogene Addiction Switch from NOTCH to PI3K Requires Simultaneous Targeting of NOTCH and PI3K Pathway Inhibition in Glioblastoma / N. Saito, N. Hirai, K. Aoki et al. // *Cancers (Basel).* – 2019. – Vol. 11. – № 1.
7. Xie, J. Targeting hedgehog signaling in cancer: research and clinical developments / J. Xie, C. M. Bartels, S. W. Barton et al. // *Onco Targets Ther.* – 2013. – Vol. 6. – P. 1425-1435.
8. Mondal, S. Nutritional stress reprograms dedifferentiation in glioblastoma multiforme driven by PTEN/Wnt/Hedgehog axis: a stochastic model of cancer stem cells / S. Mondal, K. Bhattacharya, C. Mandal // *Cell Death Discov.* – 2018. – Vol. 4. – P. 110.
9. Nanta, R. Inhibition of sonic hedgehog and PI3K/Akt/mTOR pathways cooperate in suppressing survival, self-renewal and tumorigenic potential of glioblastoma-initiating cells / R. Nanta, A. Shrivastava, J. Sharma et al. // *Mol Cell Biochem.* – 2019. – Vol. 454. – № 1-2. – P. 11-23.
10. Carpenter, R. L. Identification, functional characterization, and pathobiological significance of GLI1 isoforms in human cancers / R. L. Carpenter, H. W. Lo // *Vitam Horm.* – 2012. – Vol. 88. – P. 115-40.
11. Di Magno, L. Druggable glycolytic requirement for Hedgehog-dependent neuronal and medulloblastoma growth / L. Di Magno, D. Manzi, D. D'Amico et al. // *Cell Cycle.* – 2014. – Vol. 13. – № 21. – P. 3404-13.
12. Furmanski, A. L. Tissue-derived hedgehog proteins modulate Th differentiation and disease / A. L. Furmanski, J. I. Saldana, M. Ono et al. // *J Immunol.* – 2013. – Vol. 190. – № 6. – P. 2641-9.

13. Linder, B. Arsenic Trioxide and (-)-Gossypol Synergistically Target Glioma Stem-Like Cells via Inhibition of Hedgehog and Notch Signaling / B. Linder, A. Wehle, S. Hehlhans et al. // *Cancers (Basel)*. – 2019. – Vol. 11. – № 3.
14. Carpenter, R. L. Hedgehog pathway and GLI1 isoforms in human cancer / R. L. Carpenter, H. W. Lo // *Discov Med*. – 2012. – Vol. 13. – № 69. – P. 105-13.
15. Amable, L. GLI1 upregulates C-JUN through a specific 130-kDa isoform / L. Amable, E. Gavin, K. Kudo et al. // *Int J Oncol*. – 2014. – Vol. 44. – № 3. – P. 655-61.
16. Xu, Q. Hedgehog signaling regulates brain tumor-initiating cell proliferation and portends shorter survival for patients with PTEN-coexpressing glioblastomas / Q. Xu, X. Yuan, G. Liu et al. // *Stem Cells*. – 2008. – Vol. 26. – № 12. – P. 3018-26.
17. Hogenson, T. L. Back to the drawing board: Re-thinking the role of GLI1 in pancreatic carcinogenesis / T. L. Hogenson, M. Lauth, M. Pasca diMagliano et al. // *F1000Res*. – 2014. – Vol. 3. – P. 238.
18. Louis, D. N. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system / D. N. Louis, H. Ohgaki, O. D. Wiestler et al. // *Acta Neuropathol*. – 2007. – Vol. 114. – № 2. – P. 97-109.
19. Komori, T. The 2016 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System: The Major Points of Revision / T. Komori // *Neurol Med Chir (Tokyo)*. – 2017. – Vol. 57. – № 7. – P. 301-311.
20. Wen, P. Y. Malignant gliomas in adults / P. Y. Wen, S. Kesari // *N Engl J Med*. – 2008. – Vol. 359. – № 5. – P. 492-507.21.
21. Wesseling, P. WHO 2016 Classification of gliomas / P. Wesseling, D. Capper // *Neuropathol Appl Neurobiol*. – 2018. – Vol. 44. – № 2. – P. 139-150.
22. Furnari, F. B. Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment / F. B. Furnari, T. Fenton, R. M. Bachoo et al. // *Genes Dev*. – 2007. – Vol. 21. – № 21. – P. 2683-710.
23. Черепанов, С. А. Hedgehog-сигналинг и его роль в патогенезе нейроонкологических заболеваний / С. А. Черепанов, В. П. Баклаушев, А. Н. Габашвили и соавт. // *Биомедицинская химия*. – 2015. – Т. 61. – № 3. – С. 332-342.
24. Shahi, M. H. The sonic hedgehog-GLI1 signaling pathway in brain tumor development / M. H. Shahi, J. A. Rey, J. S. Castresana // *Expert Opin Ther Targets*. – 2012. – Vol. 16. – № 12. – P. 1227-38.
25. Nusslein-Volhard, C. Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila* / C. Nusslein-Volhard, E. Wieschaus // *Nature*. – 1980. – Vol. 287. – № 5785. – P. 795-801.
26. Ingham, P. W. Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles / P. W. Ingham, A. P. McMahon // *Genes Dev*. – 2001. – Vol. 15. – № 23. – P. 3059-87.

27. Ruiz i Altaba, A. Hedgehog-Gli signalling and the growth of the brain / A. Ruiz i Altaba, V. Palma, N. Dahmane // *Nat Rev Neurosci.* – 2002. – Vol. 3. – № 1. – P. 24-33.
28. Ekker, S. C. Patterning activities of vertebrate hedgehog proteins in the developing eye and brain / S. C. Ekker, A. R. Ungar, P. Greenstein et al. // *Curr Biol.* – 1995. – Vol. 5. – № 8. – P. 944-55.
29. Ramalho-Santos, M. Hedgehog signals regulate multiple aspects of gastrointestinal development / M. Ramalho-Santos, D. A. Melton, A. P. McMahon // *Development.* – 2000. – Vol. 127. – № 12. – P. 2763-72.
30. Motoyama, J. Essential function of Gli2 and Gli3 in the formation of lung, trachea and oesophagus / J. Motoyama, J. Liu, R. Mo et al. // *Nat Genet.* – 1998. – Vol. 20. – № 1. – P. 54-7.
31. Bumcrot, D. A. Proteolytic processing yields two secreted forms of sonic hedgehog / D. A. Bumcrot, R. Takada, A. P. McMahon // *Mol Cell Biol.* – 1995. – Vol. 15. – № 4. – P. 2294-303.
32. Porter, J. A. Cholesterol modification of hedgehog signaling proteins in animal development / J. A. Porter, K. E. Young, P. A. Beachy // *Science.* – 1996. – Vol. 274. – № 5285. – P. 255-9.
33. Bijlsma, M. F. Repression of smoothened by patched-dependent (pro-)vitamin D3 secretion / M. F. Bijlsma, C. A. Spek, D. Zivkovic et al. // *PLoS Biol.* – 2006. – Vol. 4. – № 8. – P. e232.
34. Shahi, M. H. Blocking Signaling at the Level of GLI Regulates Downstream Gene Expression and Inhibits Proliferation of Canine Osteosarcoma Cells / M. H. Shahi, R. Holt, R. B. Rebhun // *PLoS One.* – 2014. – Vol. 9. – № 5. – P. e96593.
35. Zhang, Z. Suppressor of Fused Chaperones Gli Proteins To Generate Transcriptional Responses to Sonic Hedgehog Signaling / Z. Zhang, L. Shen, K. Law et al. // *Mol Cell Biol.* – 2017. – Vol. 37. – № 3.
36. Shahi, M. H. Hedgehog signalling in medulloblastoma, glioblastoma and neuroblastoma / M. H. Shahi, A. Lorente, J. S. Castresana // *Oncol Rep.* – 2008. – Vol. 19. – № 3. – P. 681-8.
37. Zedan, W. Expression of the Sonic Hedgehog receptor "PATCHED" in basal cell carcinomas and odontogenic keratocysts / W. Zedan, P. A. Robinson, A. F. Markham et al. // *J Pathol.* – 2001. – Vol. 194. – № 4. – P. 473-7.
38. Chuang, P. T. Vertebrate Hedgehog signalling modulated by induction of a Hedgehog-binding protein / P. T. Chuang, A. P. McMahon // *Nature.* – 1999. – Vol. 397. – № 6720. – P. 617-21.
39. Olsen, C. L. Hedgehog-interacting protein is highly expressed in endothelial cells but down-regulated during angiogenesis and in several human tumors / C. L. Olsen, P. P. Hsu, J. Glienke et al. // *BMC Cancer.* – 2004. – Vol. 4. – P. 43.
40. Shahi, M. H. Expression and epigenetic modulation of sonic hedgehog-Gli1 pathway genes in neuroblastoma cell lines and tumors / M. H. Shahi, P. Schiapparelli, M. Afzal et al. // *Tumour Biol.* – 2011. – Vol. 32. – № 1. – P. 113-27.

41. Martin, S. T. Aberrant methylation of the Human Hedgehog interacting protein (HHIP) gene in pancreatic neoplasms / S. T. Martin, N. Sato, S. Dhara et al. // *Cancer Biol Ther.* – 2005. – Vol. 4. – № 7. – P. 728-33.
42. Kogerman, P. Mammalian suppressor-of-fused modulates nuclear-cytoplasmic shuttling of Gli-1 / P. Kogerman, T. Grimm, L. Kogerman et al. // *Nat Cell Biol.* – 1999. – Vol. 1. – № 5. – P. 312-9.
43. Cheng, S. Y. Role and regulation of human tumor suppressor SUFU in Hedgehog signaling / S. Y. Cheng, S. Yue // *Adv Cancer Res.* – 2008. – Vol. 101. – P. 29-43.
44. Cheng, S. Y. Suppressor of Fused represses Gli-mediated transcription by recruiting the SAP18-mSin3 corepressor complex / S. Y. Cheng, J. M. Bishop // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2002. – Vol. 99. – № 8. – P. 5442-7.
45. Zhang, Y. Histone deacetylases and SAP18, a novel polypeptide, are components of a human Sin3 complex / Y. Zhang, R. Iratni, H. Erdjument-Bromage et al. // *Cell.* – 1997. – Vol. 89. – № 3. – P. 357-64.
46. Pearse II, R. V. Vertebrate homologs of Drosophila suppressor of fused interact with the gli family of transcriptional regulators / R. V. Pearse II, L. S. Collier, M. P. Scott et al. // *Dev Biol.* – 1999. – Vol. 212. – № 2. – P. 323-36.
47. Stone, D. M. Characterization of the human suppressor of fused, a negative regulator of the zinc-finger transcription factor Gli / D. M. Stone, M. Murone, S. Luoh et al. // *J Cell Sci.* – 1999. – Vol. 112 (Pt 23). – P. 4437-48.
48. Dunaeva, M. Characterization of the physical interaction of Gli proteins with SUFU proteins / M. Dunaeva, P. Michelson, P. Kogerman et al. // *J Biol Chem.* – 2003. – Vol. 278. – № 7. – P. 5116-22.
49. Taylor, M. D. Mutations in SUFU predispose to medulloblastoma / M. D. Taylor, L. Liu, C. Raffel // *Nat Genet.* – 2002. – Vol. 31. – № 3. – P. 306-10.
50. Lee, Y. Loss of suppressor-of-fused function promotes tumorigenesis / Y. Lee, R. Kawagoe, K. Sasai et al. // *Oncogene.* – 2007. – Vol. 26. – № 44. – P. 6442-7.
51. Latini, J. M. Loss of heterozygosity and microsatellite instability at chromosomal sites 1Q and 10Q in morphologically distinct regions of late stage prostate lesions / J. M. Latini, K. M. Rieger-Christ, D. S. Wang et al. // *J Urol.* – 2001. – Vol. 166. – № 5. – P. 1931-6.
52. Arheden, K. In situ hybridization localizes the human putative oncogene GLI to chromosome subbands 12q13.3-14.1 / K. Arheden, M. Ronne, N. Mandahl et al. // *Hum Genet.* – 1989. – Vol. 82. – № 1. – P. 1-2.
53. Kinzler, K. W. Identification of an amplified, highly expressed gene in a human glioma / K. W. Kinzler, S. H. Bigner, D. D. Bigner et al. // *Science.* – 1987. – Vol. 236. – № 4797. – P. 70-3.

54. Kinzler, K. W. The GLI gene encodes a nuclear protein which binds specific sequences in the human genome / K. W. Kinzler, B. Vogelstein // *Mol Cell Biol.* – 1990. – Vol. 10. – № 2. – P. 634-42.
55. Shimokawa, T. Novel human glioma-associated oncogene 1 (GLI1) splice variants reveal distinct mechanisms in the terminal transduction of the hedgehog signal / T. Shimokawa, U. Tostar, M. Lauth et al. // *J Biol Chem.* – 2008. – Vol. 283. – № 21. – P. 14345-54.
56. Lo, H. W. A novel splice variant of GLI1 that promotes glioblastoma cell migration and invasion / H. W. Lo, H. Zhu, X. Cao et al. // *Cancer Res.* – 2009. – Vol. 69. – № 17. – P. 6790-8.
57. Cao, X. Upregulation of VEGF-A and CD24 gene expression by the tGLI1 transcription factor contributes to the aggressive behavior of breast cancer cells / X. Cao, J. Geradts, M. W. Dewhirst et al. // *Oncogene.* – 2012. – Vol. 31. – № 1. – P. 104-15.
58. Katayam, M. Patched and smoothened mRNA expression in human astrocytic tumors inversely correlates with histological malignancy / M. Katayam, K. Yoshida, H. Ishimori et al. // *J Neurooncol.* – 2002. – Vol. 59. – № 2. – P. 107-15.
59. Clement, V. HEDGEHOG-GLI1 signaling regulates human glioma growth, cancer stem cell self-renewal, and tumorigenicity / V. Clement, P. Sanchez, N. de Tribolet et al. // *Curr Biol.* – 2007. – Vol. 17. – № 2. – P. 165-72.
60. Watkins, D. N. Hedgehog signalling within airway epithelial progenitors and in small-cell lung cancer / D. N. Watkins, D. M. Berman, S. G. Burkholder et al. // *Nature.* – 2003. – Vol. 422. – № 6929. – P. 313-7.
61. Kubo, M. Hedgehog signaling pathway is a new therapeutic target for patients with breast cancer / M. Kubo, M. Nakamura, A. Tasaki et al. // *Cancer Res.* – 2004. – Vol. 64. – № 17. – P. 6071-4.
62. Sheng, T. Activation of the hedgehog pathway in advanced prostate cancer / T. Sheng, C. Li, X. Zhang et al. // *Mol Cancer.* – 2004. – Vol. 3. – P. 29.
63. Xie, J. Activating Smoothened mutations in sporadic basal-cell carcinoma / J. Xie, M. Murone, S. M. Luoh et al. // *Nature.* – 1998. – Vol. 391. – № 6662. – P. 90-2.
64. Stecca, B. A GLI1-p53 inhibitory loop controls neural stem cell and tumour cell numbers / B. Stecca, A. Ruiz i Altaba // *EMBO J.* – 2009. – Vol. 28. – № 6. – P. 663-76.
65. Dennler, S. Induction of sonic hedgehog mediators by transforming growth factor-beta: Smad3-dependent activation of Gli2 and Gli1 expression in vitro and in vivo / S. Dennler, J. Andre, I. Alexaki et al. // *Cancer Res.* – 2007. – Vol. 67. – № 14. – P. 6981-6.
66. Cai, Q. Protein kinase Cdelta negatively regulates hedgehog signaling by inhibition of Gli1 activity / Q. Cai, J. Li, T. Gao et al. // *J Biol Chem.* – 2009. – Vol. 284. – № 4. – P. 2150-8.

67. Stecca, B. Melanomas require HEDGEHOG-Gli signaling regulated by interactions between Gli1 and the RAS-MEK/AKT pathways / B. Stecca, C. Mas, V. Clement et al. // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2007. – Vol. 104. – № 14. – P. 5895-900.
68. Ji, Z. Oncogenic KRAS activates hedgehog signaling pathway in pancreatic cancer cells / Z. Ji, F. C. Mei, J. Xie et al. // *J Biol Chem*. – 2007. – Vol. 282. – № 19. – P. 14048-55.
69. Brechbiel, J. Crosstalk between hedgehog and other signaling pathways as a basis for combination therapies in cancer / J. Brechbiel, K. Miller-Moslin, A. A. Adjei // *Cancer Treat Rev*. – 2014. – Vol. 40. – № 6. – P. 750-9.
70. Li, X. SDF-1/CXCR4 signaling induces pancreatic cancer cell invasion and epithelial-mesenchymal transition in vitro through non-canonical activation of Hedgehog pathway / X. Li, Q. Ma, Q. Xu et al. // *Cancer Lett*. – 2012. – Vol. 322. – № 2. – P. 169-76.
71. Schreck, K. C. The Notch target Hes1 directly modulates Gli1 expression and Hedgehog signaling: a potential mechanism of therapeutic resistance / K. C. Schreck, P. Taylor, L. Marchionni et al. // *Clin Cancer Res*. – 2010. – Vol. 16. – № 24. – P. 6060-70.
72. Yoon, J. W. Noncanonical regulation of the Hedgehog mediator Gli1 by c-MYC in Burkitt lymphoma / J. W. Yoon, M. Gallant, M. L. Lamm et al. // *Mol Cancer Res*. – 2013. – Vol. 11. – № 6. – P. 604-15.
73. Beauchamp, E. Gli1 is a direct transcriptional target of EWS-FLI1 oncoprotein / E. Beauchamp, G. Bulut, O. Abaan et al. // *J Biol Chem*. – 2009. – Vol. 284. – № 14. – P. 9074-82.
74. Sheng, T. Regulation of Gli1 localization by the cAMP/protein kinase A signaling axis through a site near the nuclear localization signal / T. Sheng, S. Chi, X. Zhang et al. // *J Biol Chem*. – 2006. – Vol. 281. – № 1. – P. 9-12.
75. Wang, B. Evidence for the direct involvement of β TrCP in Gli3 protein processing / B. Wang, Y. Li // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2006. – Vol. 103. – № 1. – P. 33-8.
76. Huntzicker, E. G. Dual degradation signals control Gli protein stability and tumor formation / E. G. Huntzicker, I. S. Estay, H. Zhen et al. // *Genes Dev*. – 2006. – Vol. 20. – № 3. – P. 276-81.
77. Di Marcotullio, L. Numb is a suppressor of Hedgehog signalling and targets Gli1 for Itch-dependent ubiquitination / L. Di Marcotullio, E. Ferretti, A. Greco et al. // *Nat Cell Biol*. – 2006. – Vol. 8. – № 12. – P. 1415-23.
78. Canettieri, G. Histone deacetylase and Cullin3-REN(KCTD11) ubiquitin ligase interplay regulates Hedgehog signalling through Gli acetylation / G. Canettieri, L. Di Marcotullio, A. Greco et al. // *Nat Cell Biol*. – 2010. – Vol. 12. – № 2. – P. 132-42.
79. Villavicencio, E. H. The sonic hedgehog-patched-gli pathway in human development and disease / E. H. Villavicencio, D. O. Walterhouse, P. M. Iannaccone // *Am J Hum Genet*. – 2000. – Vol. 67. – № 5. – P. 1047-54.

80. Belloni, E. Identification of Sonic hedgehog as a candidate gene responsible for holoprosencephaly / E. Belloni, M. Muenke, E. Roessler et al. // *Nat Genet.* – 1996. – Vol. 14. – № 3. – P. 353-6.
81. Nanni, L. The mutational spectrum of the sonic hedgehog gene in holoprosencephaly: SHH mutations cause a significant proportion of autosomal dominant holoprosencephaly / L. Nanni, J. E. Ming, M. Bocian et al. // *Hum Mol Genet.* – 1999. – Vol. 8. – № 13. – P. 2479-88.
82. Kelley, R. L. Holoprosencephaly in RSH/Smith-Lemli-Opitz syndrome: does abnormal cholesterol metabolism affect the function of Sonic Hedgehog? / R. L. Kelley, E. Roessler, R. C. Hennekam et al. // *Am J Med Genet.* – 1996. – Vol. 66. – № 4. – P. 478-84.
83. Tint, G. S. Defective cholesterol biosynthesis associated with the Smith-Lemli-Opitz syndrome / G. S. Tint, M. Irons, E. R. Elias et al. // *N Engl J Med.* – 1994. – Vol. 330. – № 2. – P. 107-13.
84. Taylor, M. D. Molecular subgroups of medulloblastoma: the current consensus / M. D. Taylor, P. A. Northcott, A. Korshunov et al. // *Acta Neuropathol.* – 2012. – Vol. 123. – № 4. – P. 465-72.
85. McGarvey, T. W. PTCH gene mutations in invasive transitional cell carcinoma of the bladder / T. W. McGarvey, Y. Maruta, J. E. Tomaszewski et al. // *Oncogene.* – 1998. – Vol. 17. – № 9. – P. 1167-72.
86. Roberts, W. M. Amplification of the gli gene in childhood sarcomas / W. M. Roberts, E. C. Douglass, S. C. Peiper et al. // *Cancer Res.* – 1989. – Vol. 49. – № 19. – P. 5407-13.
87. Kalff-Suske, M. Point mutations throughout the GLI3 gene cause Greig cephalopolysyndactyly syndrome / M. Kalff-Suske, A. Wild, J. Topp et al. // *Hum Mol Genet.* – 1999. – Vol. 8. – № 9. – P. 1769-77.
88. Vortkamp, A. GLI3 zinc-finger gene interrupted by translocations in Greig syndrome families / A. Vortkamp, M. Gessler, K. H. Grzeschik // *Nature.* – 1991. – Vol. 352. – № 6335. – P. 539-40.
89. Mao, X. Molecular and cytogenetic analysis of glioblastoma multiforme / X. Mao, R. A. Hamoudi // *Cancer Genet Cytogenet.* – 2000. – Vol. 122. – № 2. – P. 87-92.
90. Hui, A. B. Detection of multiple gene amplifications in glioblastoma multiforme using array-based comparative genomic hybridization / A. B. Hui, K. W. Lo, X. L. Yin et al. // *Lab Invest.* – 2001. – Vol. 81. – № 5. – P. 717-23.
91. Wang, K. Gli1 inhibition induces cell-cycle arrest and enhanced apoptosis in brain glioma cell lines / K. Wang, L. Pan, X. Che et al. // *J Neurooncol.* – 2010. – Vol. 98. – № 3. – P. 319-27.
92. Wang, K. Sonic Hedgehog/GLI(1) signaling pathway inhibition restricts cell migration and invasion in human gliomas / K. Wang, L. Pan, X. Che et al. // *Neurol Res.* – 2010. – Vol. 32. – № 9. – P. 975-80.

93. Bar, E. E. Cyclopamine-mediated hedgehog pathway inhibition depletes stem-like cancer cells in glioblastoma / E. E. Bar, A. Chaudhry, A. Lin et al. // *Stem Cells*. – 2007. – Vol. 25. – № 10. – P. 2524-33.
94. Ehtesham, M. Ligand-dependent activation of the hedgehog pathway in glioma progenitor cells / M. Ehtesham, A. Sarangi, J. G. Valadez et al. // *Oncogene*. – 2007. – Vol. 26. – № 39. – P. 5752-61.
95. Cui, D. Gli1 is a potential target for alleviating multidrug resistance of gliomas / D. Cui, Q. Xu, K. Wang, X. Che // *J Neurol Sci*. – 2010. – Vol. 288. – № 1-2. – P. 156-66.
96. Phillips, H. S. Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis / H. S. Phillips, S. Kharbanda, R. Chen et al. // *Cancer Cell*. – 2006. – Vol. 9. – № 3. – P. 157-73.
97. Braun, S. Hedgehog signaling in glioblastoma multiforme / S. Braun, H. Oppermann, A. Mueller et al. // *Cancer Biol Ther*. – 2012. – Vol. 13. – № 7. – P. 487-95.
98. Becher, O. J. Gli activity correlates with tumor grade in platelet-derived growth factor-induced gliomas / O. J. Becher, D. Hambardzumyan, E. I. Fomchenko et al. // *Cancer Res*. – 2008. – Vol. 68. – № 7. – P. 2241-9.
99. Sasai, K. Shh pathway activity is down-regulated in cultured medulloblastoma cells: implications for preclinical studies / K. Sasai, J. T. Romer, Y. Lee et al. // *Cancer Res*. – 2006. – Vol. 66. – № 8. – P. 4215-22.
100. Ulasov, I. V. Inhibition of Sonic hedgehog and Notch pathways enhances sensitivity of CD133(+) glioma stem cells to temozolomide therapy / I. V. Ulasov, S. Nandi, M. Dey et al. // *Mol Med*. – 2011. – Vol. 17. – № 1-2. – P. 103-12.
101. Takezaki, T. Essential role of the Hedgehog signaling pathway in human glioma-initiating cells / T. Takezaki, T. Hide, H. Takanaga et al. // *Cancer Sci*. – 2011. – Vol. 102. – № 7. – P. 1306-12.
102. Uchida, H. Role of sonic hedgehog signaling in migration of cell lines established from CD133-positive malignant glioma cells / H. Uchida, K. Arita, S. Yunoue et al. // *J Neurooncol*. – 2011. – Vol. 104. – № 3. – P. 697-704.
103. Sarangi, A. Targeted inhibition of the Hedgehog pathway in established malignant glioma xenografts enhances survival / A. Sarangi, J. G. Valadez, S. Rush et al. // *Oncogene*. – 2009. – Vol. 28. – № 39. – P. 3468-76.
104. Abiria, S. A. Expression of Hedgehog ligand and signal transduction components in mutually distinct isocitrate dehydrogenase mutant glioma cells supports a role for paracrine signaling / S. A. Abiria, T. V. Williams, A. L. Munden et al. // *J Neurooncol*. – 2014. – Vol. 119. – № 2. – P. 243-251.

105. Yan, G. N. Glioma stem cells enhance endothelial cell migration and proliferation via the Hedgehog pathway / G. N. Yan, Y. F. Lv, L. Yang et al. // *Oncol Lett.* – 2013. – Vol. 6. – № 5. – P. 1524-1530.
106. Yan, G. N. Endothelial cells promote stem-like phenotype of glioma cells through activating the Hedgehog pathway / G. N. Yan, L. Yang, Y. F. Lv et al. // *J Pathol.* – 2014. – Vol. 234. – № 1. – P. 11-22.
107. Yang, L. Activation of the hedgehog-signaling pathway in human cancer and the clinical implications / L. Yang, G. Xie, Q. Fan et al. // *Oncogene.* – 2010. – Vol. 29. – № 4. – P. 469-81.
108. Rimkus, T. K. Targeting the Sonic Hedgehog Signaling Pathway: Review of Smoothed and GLI Inhibitors / T. K. Rimkus, R. L. Carpenter, S. Qasem et al. // *Cancers (Basel).* – 2016. – Vol. 8. – № 2.
109. Incardona, J. P. The teratogenic Veratrum alkaloid cyclopamine inhibits sonic hedgehog signal transduction / J. P. Incardona, W. Gaffield, R. P. Kapur et al. // *Development.* – 1998. – Vol. 125. – № 18. – P. 3553-62.
110. Sanchez, P. In vivo inhibition of endogenous brain tumors through systemic interference of Hedgehog signaling in mice / P. Sanchez, A. Ruiz i Altaba // *Mech Dev.* – 2005. – Vol. 122. – № 2. – P. 223-30.
111. Karhadkar, S. S. Hedgehog signalling in prostate regeneration, neoplasia and metastasis / S. S. Karhadkar, G. S. Bova, N. Abdallah et al. // *Nature.* – 2004. – Vol. 431. – № 7009. – P. 707-12.
112. Feldmann, G. Blockade of hedgehog signaling inhibits pancreatic cancer invasion and metastases: a new paradigm for combination therapy in solid cancers / G. Feldmann, S. Dhara, V. Fendrich et al. // *Cancer Res.* – 2007. – Vol. 67. – № 5. – P. 2187-96.
113. Hirotsu, M. Smoothed as a new therapeutic target for human osteosarcoma / M. Hirotsu, T. Setoguchi, H. Sasaki et al. // *Mol Cancer.* – 2010. – Vol. 9. – № 5.
114. Zhang, J. Synthesis and anticancer activity studies of cyclopamine derivatives / J. Zhang, M. Garrossian, D. Gardner et al. // *Bioorg Med Chem Lett.* – 2008. – Vol. 18. – № 4. – P. 1359-63.
115. Kumar, S. K. Targeted inhibition of hedgehog signaling by cyclopamine prodrugs for advanced prostate cancer / S. K. Kumar, I. Roy, R. K. Anchoori et al. // *Bioorg Med Chem.* – 2008. – Vol. 16. – № 6. – P. 2764-8.
116. Sekulic, A. Efficacy and safety of vismodegib in advanced basal-cell carcinoma / A. Sekulic, M. R. Migden, A. E. Oro et al. // *N Engl J Med.* – 2012. – Vol. 366. – № 23. – P. 2171-9.
117. Yauch, R. L. Smoothed mutation confers resistance to a Hedgehog pathway inhibitor in medulloblastoma / R. L. Yauch, G. J. Dijkgraaf, B. Alicke et al. // *Science.* – 2009. – Vol. 326. – № 5952. – P. 572-4.

118. Metcalfe, C. Hedgehog fights back: mechanisms of acquired resistance against Smoothed antagonists / C. Metcalfe, F. J. de Sauvage // *Cancer Res.* – 2011. – Vol. 71. – № 15. – P. 5057-61.
119. Hoch, L. MRT-92 inhibits Hedgehog signaling by blocking overlapping binding sites in the transmembrane domain of the Smoothed receptor / L. Hoch, H. Faure, H. Roudaut et al. // *FASEB J.* – 2015. – Vol. 29. – № 5. – P. 1817-29.
120. Chen, Q. Down-regulation of Gli transcription factor leads to the inhibition of migration and invasion of ovarian cancer cells via integrin beta4-mediated FAK signaling / Q. Chen, R. Xu, C. Zeng et al. // *PLoS One.* – 2014. – Vol. 9. – № 2. – P. e88386.
121. Srivastava, R. K. GLI inhibitor GANT-61 diminishes embryonal and alveolar rhabdomyosarcoma growth by inhibiting Shh/AKT-mTOR axis / R. K. Srivastava, S. Z. Kaylani, N. Edrees et al. // *Oncotarget.* – 2014. – Vol. 5. – № 23. – P. 12151-65.
122. Wickstrom, M. Targeting the hedgehog signal transduction pathway at the level of GLI inhibits neuroblastoma cell growth in vitro and in vivo / M. Wickstrom, C. Dyberg, T. Shimokawa et al. // *Int J Cancer.* – 2013. – Vol. 132. – № 7. – P. 1516-24.
123. List, A. Opportunities for Trisenox (arsenic trioxide) in the treatment of myelodysplastic syndromes / A. List, M. Beran, J. DiPersio et al. // *Leukemia.* – 2003. – Vol. 17. – № 8. – P. 1499-507.
124. Coon, V. Molecular therapy targeting Sonic hedgehog and hepatocyte growth factor signaling in a mouse model of medulloblastoma / V. Coon, T. Laukert, C. A. Pedone et al. // *Mol Cancer Ther.* – 2010. – Vol. 9. – № 9. – P. 2627-36.
125. Petrova, E. Hedgehog acyltransferase as a target in pancreatic ductal adenocarcinoma / E. Petrova, A. Matevossian, M. D. Resh // *Oncogene.* – 2015. – Vol. 34. – № 2. – P. 263-8.
126. Marini, K. D. Mechanisms of Hedgehog signalling in cancer / K. D. Marini, B. J. Payne, D. N. Watkins et al. // *Growth Factors.* – 2011. – Vol. 29. – № 6. – P. 221-34.
127. Hanahan, D. The hallmarks of cancer / D. Hanahan, R. A. Weinberg // *Cell.* – 2000. – Vol. 100. – № 1. – P. 57-70.
128. Hanahan, D. Hallmarks of cancer: the next generation / D. Hanahan, R. A. Weinberg // *Cell.* – 2011. – Vol. 144. – № 5. – P. 646-74.
129. Dahmane, N. The Sonic Hedgehog-Gli pathway regulates dorsal brain growth and tumorigenesis / N. Dahmane, P. Sanchez, Y. Gitton et al. // *Development.* – 2001. – Vol. 128. – № 24. – P. 5201-12.
130. Hynes, M. Control of cell pattern in the neural tube by the zinc finger transcription factor and oncogene Gli-1 / M. Hynes, D. M. Stone, M. Dowd et al. // *Neuron.* – 1997. – Vol. 19. – № 1. – P. 15-26.

131. Li, X. Snail induction is an early response to Gli1 that determines the efficiency of epithelial transformation / X. Li, W. Deng, C. D. Nail et al. // *Oncogene*. – 2006. – Vol. 25. – № 4. – P. 609-21.
132. Fiaschi, M. Development of mammary tumors by conditional expression of GLI1 / M. Fiaschi, B. Rozell, A. Bergstrom et al. // *Cancer Res*. – 2009. – Vol. 69. – № 11. – P. 4810-7.
133. Thomas, Z. I. Targeting GLI1 expression in human inflammatory breast cancer cells enhances apoptosis and attenuates migration / Z. I. Thomas, W. Gibson, J. Z. Sexton et al. // *Br J Cancer*. – 2011. – Vol. 104. – № 10. – P. 1575-86.
134. Lee, S. J. Sonic hedgehog-induced histone deacetylase activation is required for cerebellar granule precursor hyperplasia in medulloblastoma / S. J. Lee, S. Lindsey, B. Graves et al. // *PLoS One*. – 2013. – Vol. 8. – № 8. – P. e71455.
135. Mille, F. The Shh receptor Boc promotes progression of early medulloblastoma to advanced tumors / F. Mille, L. Tamayo-Orrego, M. Levesque et al. // *Dev Cell*. – 2014. – Vol. 31. – № 1. – P. 34-47.
136. Wilkinson, S. E. Hedgehog signaling is active in human prostate cancer stroma and regulates proliferation and differentiation of adjacent epithelium / S. E. Wilkinson, L. Furic, G. Buchanan et al. // *Prostate*. – 2013. – Vol. 73. – № 16. – P. 1810-23.
137. Singh, B. N. Hedgehog signaling antagonist GDC-0449 (Vismodegib) inhibits pancreatic cancer stem cell characteristics: molecular mechanisms / B. N. Singh, J. Fu, R. K. Srivastava et al. // *PLoS One*. – 2011. – Vol. 6. – № 11. – P. e27306.
138. Hao, K. Hedgehog signaling pathway regulates human pancreatic cancer cell proliferation and metastasis / K. Hao, X. D. Tian, C. F. Qin et al. // *Oncol Rep*. – 2013. – Vol. 29. – № 3. – P. 1124-32.
139. Lee, J. J. Stromal response to Hedgehog signaling restrains pancreatic cancer progression / J. J. Lee, R. M. Perera, H. Wang et al. // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2014. – Vol. 111. – № 30. – P. E3091-100.
140. Wang, Y. The Role of Snail in EMT and Tumorigenesis / Y. Wang, J. Shi, K. Chai et al. // *Curr Cancer Drug Targets*. – 2013. – Vol. 13. – № 9. – P. 963-972.
141. Lo, H. W. Epidermal growth factor receptor cooperates with signal transducer and activator of transcription 3 to induce epithelial-mesenchymal transition in cancer cells via up-regulation of TWIST gene expression / H. W. Lo, S. C. Hsu, W. Xia et al. // *Cancer Res*. – 2007. – Vol. 67. – № 19. – P. 9066-76.
142. Liao, X. Aberrant activation of hedgehog signaling pathway in ovarian cancers: effect on prognosis, cell invasion and differentiation / X. Liao, M. K. Siu, C. W. Au et al. // *Carcinogenesis*. – 2009. – Vol. 30. – № 1. – P. 131-40.

143. Zheng, X. CtBP2 is an independent prognostic marker that promotes GLI1 induced epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma / X. Zheng, T. Song, C. Dou et al. // *Oncotarget*. – 2015. – Vol. 6. – № 6. – P. 3752-69.
144. Li, X. Gli1 acts through Snail and E-cadherin to promote nuclear signaling by beta-catenin / X. Li, W. Deng, S. M. Lobo-Ruppert et al. // *Oncogene*. – 2007. – Vol. 26. – № 31. – P. 4489-98.
145. Liao, X. Aberrant activation of hedgehog signaling pathway contributes to endometrial carcinogenesis through beta-catenin / X. Liao, M. K. Siu, C. W. Au et al. // *Mod Pathol*. – 2009. – Vol. 22. – № 6. – P. 839-47.
146. Xu, X. Genome-wide screening reveals an EMT molecular network mediated by Sonic hedgehog-Gli1 signaling in pancreatic cancer cells / X. Xu, Y. Zhou, C. Xie et al. // *PLoS One*. – 2012. – Vol. 7. – № 8. – P. e43119.
147. Xu, X. Sonic hedgehog-Gli1 signaling pathway regulates the epithelial mesenchymal transition (EMT) by mediating a new target gene, S100A4, in pancreatic cancer cells / X. Xu, B. Su, C. Xie et al. // *PLoS One*. – 2014. – Vol. 9. – № 7. – P. e96441.
148. Choe, J. Y. Sonic hedgehog signalling proteins are frequently expressed in retinoblastoma and are associated with aggressive clinicopathological features / J. Y. Choe, J. Y. Yun, Y. K. Jeon et al. // *J Clin Pathol*. – 2015. – Vol. 68. – № 1. – P. 6-11.
149. D'Amato, C. Inhibition of Hedgehog signalling by NVP-LDE225 (Erismodegib) interferes with growth and invasion of human renal cell carcinoma cells / C. D'Amato, R. Rosa, R. Marciano et al. // *Br J Cancer*. – 2014. – Vol. 111. – № 6. – P. 1168-79.
150. Sun, Y. Estrogen promotes stemness and invasiveness of ER-positive breast cancer cells through Gli1 activation / Y. Sun, Y. Wang, C. Fan et al. // *Mol Cancer*. – 2014. – Vol. 13. – P. 137.
151. Das, S. The hedgehog pathway transcription factor GLI1 promotes malignant behavior of cancer cells by up-regulating osteopontin / S. Das, L. G. Harris, B. J. Metge et al. // *J Biol Chem*. – 2009. – Vol. 284. – № 34. – P. 22888-97.
152. Das, S. Hedgehog signaling in tumor cells facilitates osteoblast-enhanced osteolytic metastases / S. Das, J. A. Tucker, S. Khullar et al. // *PLoS One*. – 2012. – Vol. 7. – № 3. – P. e34374.
153. Ten Haaf, A. Expression of the glioma-associated oncogene homolog (GLI) 1 in human breast cancer is associated with unfavourable overall survival / A. ten Haaf, N. Bektas, S. von Sereniyi et al. // *BMC Cancer*. – 2009. – Vol. 9. – P. 298.
154. Zhu, H. The Human Glioma-Associated Oncogene Homolog 1 (GLI1) Family of Transcription Factors in Gene Regulation and Diseases / H. Zhu, H. W. Lo // *Curr Genomics*. – 2010. – Vol. 11. – № 4. – P. 238-45.

155. Zbinden, M. NANOG regulates glioma stem cells and is essential in vivo acting in a cross-functional network with GLI1 and p53 / M. Zbinden, A. Duquet, A. Lorente-Trigos et al. // EMBO J. – 2010. – Vol. 29. – № 15. – P. 2659-74.
156. Stecca, B. Brain as a paradigm of organ growth: Hedgehog-Gli signaling in neural stem cells and brain tumors / B. Stecca, A. Ruiz i Altaba // J Neurobiol. – 2005. – Vol. 64. – № 4. – P. 476-90.
157. Liu, S. Hedgehog signaling and Bmi-1 regulate self-renewal of normal and malignant human mammary stem cells / S. Liu, G. Dontu, I. D. Mantle et al. // Cancer Res. – 2006. – Vol. 66. – № 12. – P. 6063-71.
158. Oka, N. VEGF promotes tumorigenesis and angiogenesis of human glioblastoma stem cells / N. Oka, A. Soeda, A. Inagaki et al. // Biochem Biophys Res Commun. – 2007. – Vol. 360. – № 3. – P. 553-9.
159. Ricci-Vitiani, L. Tumour vascularization via endothelial differentiation of glioblastoma stem-like cells / L. Ricci-Vitiani, R. Pallini, M. Biffoni et al. // Nature. – 2010. – Vol. 468. – № 7325. – P. 824-8.
160. Yoon, C. CD44 expression denotes a subpopulation of gastric cancer cells in which Hedgehog signaling promotes chemotherapy resistance / C. Yoon, D. J. Park, B. Schmidt et al. // Clin Cancer Res. – 2014. – Vol. 20. – № 15. – P. 3974-88.
161. Batsaikhan, B. E. Cyclopamine decreased the expression of Sonic Hedgehog and its downstream genes in colon cancer stem cells / B. E. Batsaikhan, K. Yoshikawa, N. Kurita et al. // Anticancer Res. – 2014. – Vol. 34. – № 11. – P. 6339-44.
162. Carmeliet, P. Angiogenesis in cancer and other diseases / P. Carmeliet, R. K. Jain // Nature. – 2000. – Vol. 407. – № 6801. – P. 249-57.
163. Hanna, A. Hedgehog signaling: modulation of cancer properties and tumor microenvironment / A. Hanna, L. A. Shevde // Mol Cancer. – 2016. – Vol. 15. – P. 24.
164. Nakamura, K. Hedgehog promotes neovascularization in pancreatic cancers by regulating Ang-1 and IGF-1 expression in bone-marrow derived pro-angiogenic cells / K. Nakamura, J. Sasajima, Y. Mizukami et al. // PLoS One. – 2010. – Vol. 5. – № 1. – P. e8824.
165. Mathew, E. Dosage-dependent regulation of pancreatic cancer growth and angiogenesis by hedgehog signaling / E. Mathew, Y. Zhang, A. M. Holtz et al. // Cell Rep. – 2014. – Vol. 9. – № 2. – P. 484-94.
166. Allen, B. L. The Hedgehog-binding proteins Gas1 and Cdo cooperate to positively regulate Shh signaling during mouse development / B. L. Allen, T. Tenzen, A. P. McMahon // Genes Dev. – 2007. – Vol. 21. – № 10. – P. 1244-57.

167. Harris, L. G. Increased vascularity and spontaneous metastasis of breast cancer by hedgehog signaling mediated upregulation of *cyr61* / L. G. Harris, L. K. Pannell, S. Singh et al. // *Oncogene*. – 2012. – Vol. 31. – № 28. – P. 3370-80.
168. Carpenter, R. L. The gain-of-function *GLI1* transcription factor *TGLI1* enhances expression of *VEGF-C* and *TEM7* to promote glioblastoma angiogenesis / R. L. Carpenter, I. Paw, H. Zhu et al. // *Oncotarget*. – 2015. – Vol. 6. – № 26. – P. 22653-65.
169. Zhu, H. The *GLI1* splice variant *TGLI1* promotes glioblastoma angiogenesis and growth / H. Zhu, R. L. Carpenter, W. Han et al. // *Cancer Lett*. – 2014. – Vol. 343. – № 1. – P. 51-61.
170. Hsieh, A. Hedgehog/*GLI1* regulates IGF dependent malignant behaviors in glioma stem cells / A. Hsieh, R. Ellsworth, D. Hsieh // *J Cell Physiol*. – 2011. – Vol. 226. – № 4. – P. 1118-27.
171. Pinter, M. Hedgehog inhibition reduces angiogenesis by downregulation of tumoral *VEGF-A* expression in hepatocellular carcinoma / M. Pinter, W. Sieghart, M. Schmid et al. // *United European Gastroenterol J*. – 2013. – Vol. 1. – № 4. – P. 265-75.
172. Hong, K. D. Expression of *GLI1* correlates with expression of lymphangiogenesis proteins, vascular endothelial growth factor C and vascular endothelial growth factor receptor 3, in colorectal cancer / K. D. Hong, Y. Lee, B. H. Kim et al. // *Am Surg*. – 2013. – Vol. 79. – № 2. – P. 198-204.
173. Rhim, A. D. Stromal elements act to restrain, rather than support, pancreatic ductal adenocarcinoma / A. D. Rhim, P. E. Oberstein, D. H. Thomas et al. // *Cancer Cell*. – 2014. – Vol. 25. – № 6. – P. 735-47.
174. Olive, K. P. Inhibition of Hedgehog signaling enhances delivery of chemotherapy in a mouse model of pancreatic cancer / K. P. Olive, M. A. Jacobetz, C. J. Davidson et al. // *Science*. – 2009. – Vol. 324. – № 5933. – P. 1457-61.
175. Hwang, R. F. Inhibition of the hedgehog pathway targets the tumor-associated stroma in pancreatic cancer / R. F. Hwang, T. T. Moore, M. M. Hattersley et al. // *Mol Cancer Res*. – 2012. – Vol. 10. – № 9. – P. 1147-57.
176. Meng, E. The Impact of Hedgehog Signaling Pathway on DNA Repair Mechanisms in Human Cancer / E. Meng, A. Hanna, R. S. Samant et al. // *Cancers (Basel)*. – 2015. – Vol. 7. – № 3. – P. 1333-48.
177. Kinsella, T. J. Coordination of DNA mismatch repair and base excision repair processing of chemotherapy and radiation damage for targeting resistant cancers / T. J. Kinsella // *Clin Cancer Res*. – 2009. – Vol. 15. – № 6. – P. 1853-9.
178. Mazumdar, T. The *GLI* genes as the molecular switch in disrupting Hedgehog signaling in colon cancer / T. Mazumdar, J. DeVecchio, A. Agyeman et al. // *Oncotarget*. – 2011. – Vol. 2. – № 8. – P. 638-45.

179. Inaguma, S. GLI1 interferes with the DNA mismatch repair system in pancreatic cancer through BHLHE41-mediated suppression of MLH1 / S. Inaguma, M. Riku, M. Hashimoto et al. // *Cancer Res.* – 2013. – Vol. 73. – № 24. – P. 7313-23.
180. Kudo, K. Inhibition of Gli1 results in altered c-Jun activation, inhibition of cisplatin-induced upregulation of ERCC1, XPD and XRCC1, and inhibition of platinum-DNA adduct repair / K. Kudo, E. Gavin, S. Das et al. // *Oncogene.* – 2012. – Vol. 31. – № 44. – P. 4718-24.
181. Laner-Plamberger, S. Cooperation between GLI and JUN enhances transcription of JUN and selected GLI target genes / S. Laner-Plamberger, A. Kaser, M. Paulischta et al. // *Oncogene.* – 2009. – Vol. 28. – № 13. – P. 1639-51.
182. Haar, C. P. Drug resistance in glioblastoma: a mini review / C. P. Haar, P. Hebbar, G. C. t. Wallace et al. // *Neurochem Res.* – 2012. – Vol. 37. – № 6. – P. 1192-200.
183. Johannessen, T. C. Molecular mechanisms of temozolomide resistance in glioblastoma multiforme / T. C. Johannessen, R. Bjerkvig // *Expert Rev Anticancer Ther.* – 2012. – Vol. 12. – № 5. – P. 635-42.
184. Yoon, J. W. Defining a role for Sonic hedgehog pathway activation in desmoplastic medulloblastoma by identifying GLI1 target genes / J. W. Yoon, R. Gilbertson, S. Iannaccone et al. // *Int J Cancer.* – 2009. – Vol. 124. – № 1. – P. 109-19.
185. Альбертс, Б. Молекулярная биология клетки: в 3-х томах. Т. 1 / Б. Альбертс, А. Джонсон, Д. Льюис и др. – Ижевск : НИЦ «Регулярная и хаотическая динамика», Институт компьютерных исследований, 2013. – 808 с.
186. Mazumdar, T. Blocking Hedgehog survival signaling at the level of the GLI genes induces DNA damage and extensive cell death in human colon carcinoma cells / T. Mazumdar, J. Devecchio, A. Agyeman et al. // *Cancer Res.* – 2011. – Vol. 71. – № 17. – P. 5904-14.
187. Shi, T. cDNA microarray gene expression profiling of hedgehog signaling pathway inhibition in human colon cancer cells / T. Shi, T. Mazumdar, J. Devecchio et al. // *PLoS One.* – 2010. – Vol. 5. – № 10. – P. e13054.
188. Wu, X. Y. Cyclopamine increases the radiosensitivity of human pancreatic cancer cells by regulating the DNA repair signal pathway through an epidermal growth factor receptor-dependent pathway / X. Y. Wu, J. Che, K. K. Sun et al. // *Mol Med Rep.* – 2013. – Vol. 8. – № 4. – P. 979-83.
189. Leonard, J. M. Sonic Hedgehog signaling impairs ionizing radiation-induced checkpoint activation and induces genomic instability / J. M. Leonard, H. Ye, C. Wetmore et al. // *J Cell Biol.* – 2008. – Vol. 183. – № 3. – P. 385-91.
190. Elmore, S. Apoptosis: a review of programmed cell death / S. Elmore // *Toxicol Pathol.* – 2007. – Vol. 35. – № 4. – P. 495-516.

191. Nolan-Stevaux, O. GLI1 is regulated through Smoothened-independent mechanisms in neoplastic pancreatic ducts and mediates PDAC cell survival and transformation / O. Nolan-Stevaux, J. Lau, M. L. Truitt et al. // *Genes Dev.* – 2009. – Vol. 23. – № 1. – P. 24-36.
192. Chen, X. Hedgehog signal pathway is activated in ovarian carcinomas, correlating with cell proliferation: it's inhibition leads to growth suppression and apoptosis / X. Chen, A. Horiuchi, N. Kikuchi et al. // *Cancer Sci.* – 2007. – Vol. 98. – № 1. – P. 68-76.
193. Chandra, V. Hedgehog signaling pathway is active in GBM with GLI1 mRNA expression showing a single continuous distribution rather than discrete high/low clusters / V. Chandra, T. Das, P. Gulati et al. // *PLoS One.* – 2015. – Vol. 10. – № 3. – P. e0116390.
194. Bigelow, R. L. Transcriptional regulation of bcl-2 mediated by the sonic hedgehog signaling pathway through gli-1 / R. L. Bigelow, N. S. Chari, A. B. Uden et al. // *J Biol Chem.* – 2004. – Vol. 279. – № 2. – P. 1197-205.
195. Hennessy, M. A primer on the mechanics of P-glycoprotein the multidrug transporter / M. Hennessy, J. P. Spiers // *Pharmacol Res.* – 2007. – Vol. 55. – № 1. – P. 1-15.
196. Dean, M. Tumour stem cells and drug resistance / M. Dean, T. Fojo, S. Bates // *Nat Rev Cancer.* – 2005. – Vol. 5. – № 4. – P. 275-84.
197. Munoz, J. L. Temozolomide competes for P-glycoprotein and contributes to chemoresistance in glioblastoma cells / J. L. Munoz, N. D. Walker, K. W. Scotto et al. // *Cancer Lett.* – 2015. – Vol. 367. – № 1. – P. 69-75.
198. Loo, T. W. Do drug substrates enter the common drug-binding pocket of P-glycoprotein through "gates"? / T. W. Loo, D. M. Clarke // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2005. – Vol. 329. – № 2. – P. 419-22.
199. Borgnia, M. J. Competition of hydrophobic peptides, cytotoxic drugs, and chemosensitizers on a common P-glycoprotein pharmacophore as revealed by its ATPase activity / M. J. Borgnia, G. D. Eytan, Y. G. Assaraf // *J Biol Chem.* – 1996. – Vol. 271. – № 6. – P. 3163-71.
200. Eytan, G. D. The role of passive transbilayer drug movement in multidrug resistance and its modulation / G. D. Eytan, R. Regev, G. Oren et al. // *J Biol Chem.* – 1996. – Vol. 271. – № 22. – P. 12897-902.
201. Eytan, G. D. Efficiency of P-glycoprotein-mediated exclusion of rhodamine dyes from multidrug-resistant cells is determined by their passive transmembrane movement rate / G. D. Eytan, R. Regev, G. Oren et al. // *Eur J Biochem.* – 1997. – Vol. 248. – № 1. – P. 104-12.
202. Sims-Mourtada, J. Sonic Hedgehog promotes multiple drug resistance by regulation of drug transport / J. Sims-Mourtada, J. G. Izzo, J. Ajani et al. // *Oncogene.* – 2007. – Vol. 26. – № 38. – P. 5674-9.

203. Queiroz, K. C. Hedgehog signaling maintains chemoresistance in myeloid leukemic cells / K. C. Queiroz, R. R. Ruela-de-Sousa, G. M. Fuhler et al. // *Oncogene*. – 2010. – Vol. 29. – № 48. – P. 6314-22.
204. Singh, R. R. ABCG2 is a direct transcriptional target of hedgehog signaling and involved in stroma-induced drug tolerance in diffuse large B-cell lymphoma / R. R. Singh, K. Kunkalla, C. Qu et al. // *Oncogene*. – 2011. – Vol. 30. – № 49. – P. 4874-86.
205. Huang, F. T. Inhibition of hedgehog signaling depresses self-renewal of pancreatic cancer stem cells and reverses chemoresistance / F. T. Huang, Y. X. Zhuan-Sun, Y. Y. Zhuang et al. // *Int J Oncol*. – 2012. – Vol. 41. – № 5. – P. 1707-14.
206. Chen, Y. Hedgehog signaling regulates drug sensitivity by targeting ABC transporters ABCB1 and ABCG2 in epithelial ovarian cancer / Y. Chen, M. M. Bieber, N. N. Teng // *Mol Carcinog*. – 2014. – Vol. 53. – № 8. – P. 625-34.
207. Statkiewicz, M. The role of the SHH gene in prostate cancer cell resistance to paclitaxel / M. Statkiewicz, N. Maryan, A. Lipiec et al. // *Prostate*. – 2014. – Vol. 74. – № 11. – P. 1142-52.
208. Mimeault, M. Inhibition of hedgehog signaling improves the anti-carcinogenic effects of docetaxel in prostate cancer / M. Mimeault, S. Rachagani, S. Muniyan et al. // *Oncotarget*. – 2015. – Vol. 6. – № 6. – P. 3887-903.
209. Amable, L. Gli1 contributes to cellular resistance to cisplatin through altered cellular accumulation of the drug / L. Amable, J. Fain, E. Gavin et al. // *Oncol Rep*. – 2014. – Vol. 32. – № 2. – P. 469-74.
210. Hall, M. D. The role of cellular accumulation in determining sensitivity to platinum-based chemotherapy / M. D. Hall, M. Okabe, D. W. Shen et al. // *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. – 2008. – Vol. 48. – P. 495-535.
211. Das, S. Nonclassical activation of Hedgehog signaling enhances multidrug resistance and makes cancer cells refractory to Smoothed-targeting Hedgehog inhibition / S. Das, R. S. Samant, L. A. Shevde // *J Biol Chem*. – 2013. – Vol. 288. – № 17. – P. 11824-33.
212. Munoz, J. L. Temozolomide resistance in glioblastoma occurs by miRNA-9-targeted PTCH1, independent of sonic hedgehog level / J. L. Munoz, V. Rodriguez-Cruz, S. H. Ramkissoon et al. // *Oncotarget*. – 2015. – Vol. 6. – № 2. – P. 1190-201.
213. Munoz, J. L. High expression of miR-9 in CD133+ glioblastoma cells in chemoresistance to temozolomide / J. L. Munoz, V. Rodriguez-Cruz, P. Rameshwar // *J Cancer Stem Cell Res*. – 2015. – Vol. 3.
214. Munoz, J. L. Temozolomide resistance and tumor recurrence: Halting the Hedgehog / J. L. Munoz, V. Rodriguez-Cruz, N. D. Walker et al. // *Cancer Cell Microenviron*. – 2015. – Vol. 2. – № 2.

215. Zhang, Y. Hedgehog pathway inhibitor HhAntag691 is a potent inhibitor of ABCG2/BCRP and ABCB1/Pgp / Y. Zhang, J. Laterra, M. G. Pomper // *Neoplasia*. – 2009. – Vol. 11. – № 1. – P. 96-101.
216. Zhao, J. NL-103, a novel dual-targeted inhibitor of histone deacetylases and hedgehog pathway, effectively overcomes vismodegib resistance conferred by Smo mutations / J. Zhao, H. Quan, C. Xie et al. // *Pharmacol Res Perspect*. – 2014. – Vol. 2. – № 3. – P. e00043.
217. Zahreddine, H. A. The sonic hedgehog factor GLI1 imparts drug resistance through inducible glucuronidation / H. A. Zahreddine, B. Culjkovic-Kraljacic, S. Assouline et al. // *Nature*. – 2014. – Vol. 511. – № 7507. – P. 90-3.
218. Chen, Y. J. Sonic hedgehog signaling protects human hepatocellular carcinoma cells against ionizing radiation in an autocrine manner / Y. J. Chen, C. P. Lin, M. L. Hsu et al. // *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. – 2011. – Vol. 80. – № 3. – P. 851-9.
219. Chiang, M. F. Modulation of Sonic hedgehog signaling and WW domain containing oxidoreductase WOX1 expression enhances radiosensitivity of human glioblastoma cells / M. F. Chiang, H. H. Chen, C. W. Chi et al. // *Exp Biol Med (Maywood)*. – 2015. – Vol. 240. – № 3. – P. 392-9.
220. Denko, N. C. Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour / N. C. Denko // *Nat Rev Cancer*. – 2008. – Vol. 8. – № 9. – P. 705-13.
221. Vander Heiden, M. G. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation / M. G. Vander Heiden, L. C. Cantley, C. B. Thompson // *Science*. – 2009. – Vol. 324. – № 5930. – P. 1029-33.
222. Vaupel, P. The role of hypoxia-induced factors in tumor progression / P. Vaupel // *Oncologist*. – 2004. – Vol. 9 Suppl 5. – P. 10-7.
223. Rohwer, N. Hypoxia-mediated drug resistance: novel insights on the functional interaction of HIFs and cell death pathways / N. Rohwer, T. Cramer // *Drug Resist Updat*. – 2011. – Vol. 14. – № 3. – P. 191-201.
224. Onishi, H. Hypoxia activates the hedgehog signaling pathway in a ligand-independent manner by upregulation of Smo transcription in pancreatic cancer / H. Onishi, M. Kai, S. Odate et al. // *Cancer Sci*. – 2011. – Vol. 102. – № 6. – P. 1144-50.
225. Onishi, H. Protein-bound polysaccharide decreases invasiveness and proliferation in pancreatic cancer by inhibition of hedgehog signaling and HIF-1 α pathways under hypoxia / H. Onishi, T. Morisaki, F. Nakao et al. // *Cancer Lett*. – 2013. – Vol. 335. – № 2. – P. 289-98.
226. Chaudary, N. Hypoxia and metastasis in an orthotopic cervix cancer xenograft model / N. Chaudary, H. Mujcic, B. G. Wouters et al. // *Radiother Oncol*. – 2013. – Vol. 108. – № 3. – P. 506-10.

227. Mantovani, A. Cancer-related inflammation / A. Mantovani, P. Allavena, A. Sica et al. // *Nature*. – 2008. – Vol. 454. – № 7203. – P. 436-44.
228. Elinav, E. Inflammation-induced cancer: crosstalk between tumours, immune cells and microorganisms / E. Elinav, R. Nowarski, C. A. Thaiss et al. // *Nat Rev Cancer*. – 2013. – Vol. 13. – № 11. – P. 759-71.
229. Ghorpade, D. S. NOD2-nitric oxide-responsive microRNA-146a activates Sonic hedgehog signaling to orchestrate inflammatory responses in murine model of inflammatory bowel disease / D. S. Ghorpade, A. Y. Sinha, S. Holla et al. // *J Biol Chem*. – 2013. – Vol. 288. – № 46. – P. 33037-48.
230. Li, R. Inhibition of hedgehog signal pathway by cyclopamine attenuates inflammation and articular cartilage damage in rats with adjuvant-induced arthritis / R. Li, L. Cai, J. Ding et al. // *J Pharm Pharmacol*. – 2015. – Vol. 67. – № 7. – P. 963-71.
231. Hirsova, P. Vismodegib suppresses TRAIL-mediated liver injury in a mouse model of nonalcoholic steatohepatitis / P. Hirsova, S. H. Ibrahim, S. F. Bronk et al. // *PLoS One*. – 2013. – Vol. 8. – № 7. – P. e70599.
232. El-Zaatari, M. Gli1 deletion prevents Helicobacter-induced gastric metaplasia and expansion of myeloid cell subsets / M. El-Zaatari, J. Y. Kao, A. Tessier et al. // *PLoS One*. – 2013. – Vol. 8. – № 3. – P. e58935.
233. Vesely, M. D. Natural innate and adaptive immunity to cancer / M. D. Vesely, M. H. Kershaw, R. D. Schreiber et al. // *Annu Rev Immunol*. – 2011. – Vol. 29. – P. 235-71.
234. Huang, B. Toll-like receptors on tumor cells facilitate evasion of immune surveillance / B. Huang, J. Zhao, H. Li et al. // *Cancer Res*. – 2005. – Vol. 65. – № 12. – P. 5009-14.
235. Igney, F. H. Immune escape of tumors: apoptosis resistance and tumor counterattack / F. H. Igney, P. H. Krammer // *J Leukoc Biol*. – 2002. – Vol. 71. – № 6. – P. 907-20.
236. Curiel, T. J. Tregs and rethinking cancer immunotherapy / T. J. Curiel // *J Clin Invest*. – 2007. – Vol. 117. – № 5. – P. 1167-74.
237. Otsuka, A. Hedgehog pathway inhibitors promote adaptive immune responses in basal cell carcinoma / A. Otsuka, J. Dreier, P. F. Cheng et al. // *Clin Cancer Res*. – 2015. – Vol. 21. – № 6. – P. 1289-97.
238. de la Roche, M. Hedgehog signaling controls T cell killing at the immunological synapse / M. de la Roche, A. T. Ritter, K. L. Angus et al. // *Science*. – 2013. – Vol. 342. – № 6163. – P. 1247-50.
239. Crompton, T. Sonic hedgehog signalling in T-cell development and activation / T. Crompton, S. V. Outram, A. L. Hager-Theodorides // *Nat Rev Immunol*. – 2007. – Vol. 7. – № 9. – P. 726-35.
240. Kastan, M. B. Cell-cycle checkpoints and cancer / M. B. Kastan, J. Bartek // *Nature*. – 2004. – Vol. 432. – № 7015. – P. 316-23.

241. Li, Z. J. Evasion of p53 and G2/M checkpoints are characteristic of Hh-driven basal cell carcinoma / Z. J. Li, S. C. Mack, T. H. Mak et al. // *Oncogene*. – 2014. – Vol. 33. – № 20. – P. 2674-80.
242. Tripathi, K. Gli1 protein regulates the S-phase checkpoint in tumor cells via Bid protein, and its inhibition sensitizes to DNA topoisomerase 1 inhibitors / K. Tripathi, C. Mani, R. Barnett et al. // *J Biol Chem*. – 2014. – Vol. 289. – № 45. – P. 31513-25.
243. Pantazi, E. GLI2 induces genomic instability in human keratinocytes by inhibiting apoptosis / E. Pantazi, E. Gemenetzidis, G. Trigiante et al. *Cell Death Dis*. – 2014. – Vol. 5. – P. e1028.
244. Mizushima N. Autophagy: process and function / N. Mizushima // *Genes Dev*. – 2007. – Vol. 21. – № 22. – P. 2861-73.
245. Holla, S. Selective inhibition of IFNG-induced autophagy by Mir155- and Mir31-responsive WNT5A and SHH signaling / S. Holla, M. Kurowska-Stolarska, J. Bayry et al. // *Autophagy*. – 2014. – Vol. 10. – № 2. – P. 311-30.
246. Xu, J. H. Autophagy Accompanied with Bisdemethoxycurcumin-induced Apoptosis in Non-small Cell Lung Cancer Cells / J. H. Xu, H. P. Yang, X. D. Zhou et al. // *Biomed Environ Sci*. – 2015. – Vol. 28. – № 2. – P. 105-15.
247. Xu, Y. Inhibition of the Hedgehog pathway induces autophagy in pancreatic ductal adenocarcinoma cells / Y. Xu, Y. An, X. Wang et al. // *Oncol Rep*. – 2014. – Vol. 31. – № 2. – P. 707-12.
248. Wang, Y. Hedgehog signaling pathway regulates autophagy in human hepatocellular carcinoma cells / Y. Wang, C. Han, L. Lu et al. // *Hepatology*. – 2013. – Vol. 58. – № 3. – P. 995-1010.
249. Sun, Y. Gli1 inhibition suppressed cell growth and cell cycle progression and induced apoptosis as well as autophagy depending on ERK1/2 activity in human chondrosarcoma cells / Y. Sun, W. Guo, T. Ren et al. // *Cell Death Dis*. – 2014. – Vol. 5. – P. e979.
250. Martinez, P. Telomeric and extra-telomeric roles for telomerase and the telomere-binding proteins / P. Martinez, M. A. Blasco // *Nat Rev Cancer*. – 2011. – Vol. 11. – № 3. – P. 161-76.
251. Mazumdar, T. Hedgehog signaling regulates telomerase reverse transcriptase in human cancer cells / T. Mazumdar, R. Sandhu, M. Qadan et al. // *PLoS One*. – 2013. – Vol. 8. – № 9. – P. e75253.
252. Kool, M. Genome sequencing of SHH medulloblastoma predicts genotype-related response to smoothened inhibition / M. Kool, D. T. Jones, N. Jager et al. // *Cancer Cell*. – 2014. – Vol. 25. – № 3. – P. 393-405.
253. Кошкин, Ф.А. Экспрессия микроРНК и генов внутриклеточных сигнальных белков в глиомах различной степени злокачественности : дисс. на соискание учен. степ. канд. биол. наук : 03.01.04 / Кошкин Филипп Александрович. – М., 2016. – 131 с.

254. Livak, K. J. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method / K. J. Livak, T. D. Schmittgen // *Methods*. – 2001. – Vol. 25. – № 4. – P. 402-8.
255. Atienzar, F. A. The use of real-time cell analyzer technology in drug discovery: defining optimal cell culture conditions and assay reproducibility with different adherent cellular models / F. A. Atienzar, K. Tilmant, H. H. Gerets et al. // *J Biomol Screen*. – 2011. – Vol. 16. – № 6. – P. 575-87.
256. Goodell, M. A. Stem cell identification and sorting using the Hoechst 33342 side population (SP) / M. A. Goodell // *Curr Protoc Cytom*. – 2005. – Vol. Chapter 9. – P. Unit 9.18.
257. Goodell, M. A. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo / M. A. Goodell, K. Brose, G. Paradis et al. // *J Exp Med*. – 1996. – Vol. 183. – № 4. – P. 1797-806.
258. Telford, W. G. Stem cell side population analysis and sorting using DyeCycle violet / W. G. Telford // *Curr Protoc Cytom*. – 2010. – Vol. Chapter 9. – P. Unit 9.30.
259. Telford, W. G. Stem cell identification by DyeCycle Violet side population analysis / W. G. Telford // *Methods Mol Biol*. – 2013. – Vol. 946. – P. 163-79.
260. Telford, W. G. Side population analysis using a violet-excited cell-permeable DNA binding dye / W. G. Telford, J. Bradford, W. Godfrey et al. // *Stem Cells*. – 2007. – Vol. 25. – № 4. – P. 1029-36.
261. Реброва, О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О. Ю. Реброва. – М. : МедиаСфера, 2002. – 312 с.
262. Гланц, С. Медико-биологическая статистика / С. Гланц. – Пер. с англ. – М. : Практика, 1998. – 459 с.
263. Kim, H. A. Inhibition of hedgehog signaling reduces the side population in human malignant mesothelioma cell lines / H. A. Kim, M. C. Kim, N. Y. Kim et al. // *Cancer Gene Ther*. – 2015. – Vol. 22. – № 8. – P. 387-95.
264. Boesch, M. DyeCycle Violet used for side population detection is a substrate of P-glycoprotein / M. Boesch, D. Reimer, H. Rumpold et al. // *Cytometry A*. – 2012. – Vol. 81. – № 6. – P. 517-22.
265. Petriz, J. Flow cytometry of the side population (SP) / J. Petriz // *Curr Protoc Cytom*. – 2013. – Vol. Chapter 9. – P. Unit 9.23.
266. Chua, C. Characterization of a side population of astrocytoma cells in response to temozolomide / C. Chua, N. Zaiden, K. H. Chong et al. // *J Neurosurg*. – 2008. – Vol. 109. – № 5. – P. 856-66.
267. Patrawala, L. Side population is enriched in tumorigenic, stem-like cancer cells, whereas ABCG2+ and ABCG2- cancer cells are similarly tumorigenic / L. Patrawala, T. Calhoun, R. Schneider-Broussard et al. // *Cancer Res*. – 2005. – Vol. 65. – № 14. – P. 6207-19.

268. Wang, C. Y. Hedgehog and Notch signaling regulate self-renewal of undifferentiated pleomorphic sarcomas / C. Y. Wang, Q. Wei, I. Han et al. // *Cancer Res.* – 2012. – Vol. 72. – № 4. – P. 1013-22.
269. Yu, B. GLI1-mediated regulation of side population is responsible for drug resistance in gastric cancer / B. Yu, D. Gu, X. Zhang et al. // *Oncotarget.* – 2017. – Vol. 8. – № 16. – P. 27412-27427.
270. Zhang, S. Inhibition of CK2alpha down-regulates Hedgehog/Gli signaling leading to a reduction of a stem-like side population in human lung cancer cells / S. Zhang, Y. Wang, J. H. Mao et al. // *PLoS One.* – 2012. – Vol. 7. – № 6. – P. e38996.
271. Hoe, S. L. Evaluation of stem-like side population cells in a recurrent nasopharyngeal carcinoma cell line / S. L. Hoe, L. P. Tan, J. Jamal et al. // *Cancer Cell Int.* – 2014. – Vol. 14. – № 1. – P. 101.