

Черепанов Сергей Александрович

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

03.01.04 – Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Москва – 2019

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

академик РАН, доктор медицинских наук,
профессор

Чехонин Владимир Павлович

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор,
член-корреспондент РАН

Кушлинский Николай Евгеньевич

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н.Блохина» Министерства Здравоохранения Российской Федерации, Научно-исследовательский институт клинической онкологии им. Н.Н.Трапезникова, лаборатория клинической биохимии, заведующий

доктор биологических наук, профессор РАН

Згода Виктор Гаврилович

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича», лаборатория системной биологии, заведующий

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук

Защита диссертации состоится « » _____ 2019 г. в ____ часов на заседании диссертационного совета Д 208.072.14 на базе ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России по адресу: 117997, г. Москва, ул. Островитянова, д. 1

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России по адресу: 117997, г. Москва, ул. Островитянова, д. 1 и на сайте <http://www.rsmu.ru/>

Автореферат разослан « » _____ 2019 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета

доктор медицинских наук, профессор

Кягова Алла Анатольевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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 [Harder B.G. et al., 2018; Zanders E.D. et al., 2019; Zhang X. et al., 2019].

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-АКТ, Ras, TGF- β -Smad, Wnt, Notch и другим сигнальным путям [Teglund S. et al., 2010; Bazzoni R. et al., 2019; Saito N. et al., 2019]. Все больше появляется исследований, акцентирующих внимание на возможном вовлечении в онкогенез вообще и в глиомагенез в частности сигнального пути Hedgehog (НН) [Xie J. et al., 2013; Mondal S. et al., 2018; Nanta R. et al., 2019].

Интерес исследователей к сигнальному пути НН 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 бесконтрольному размножению и аномальному функционированию клеток, что вызывает развитие онкологического заболевания. Известно, что сигнальный путь НН может активно функционировать в популяциях стволовых опухолевых клеток, а белки сигнального пути НН взаимодействуют с белками других сигнальных путей [Carpenter R.L. et al., 2012; Di Magno L. et al., 2014; Furmanski A.L. et al., 2013; Linder B. et al., 2019].

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 [Linder B. et al., 2019; Carpenter R.L. et al., 2012; Amable L. et al., 2014]. 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 [Xu Q. et al., 2008; Hogenson T.L. et al., 2014]. 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 персонафицированных 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 *GLI1* и *tGLI1* 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 НН 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 НН 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 НН влияет на чувствительность клеток линии U-251 MG к исследуемым химиотерапевтическим препаратам. Было показано, что сигнальный путь НН 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 НН 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 нейрохимии 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.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Клеточные линии и их культивирование

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 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-глутамин, 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).

Препараты ингибирования и активации сигнального пути Hedgehog, химиотерапевтические препараты

В качестве ингибитора HH сигналинга использовали циклопамин (LC Laboratories, США), разведенный в DMSO (Sigma-Aldrich, США) до концентрации 5 mM. 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%. 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, содержавшей 1% ЭБС.

В качестве химиотерапевтических препаратов применяли цисплатин (Sigma-Aldrich, США) и доксорубин (LC Laboratories, США), разведенные в воде (8 mM и 16 mM, соответственно), и темозоломид (Sigma-Aldrich, США), разведенный в среде DMEM с низким содержанием глюкозы (16 mM).

Выделение суммарной РНК, синтез кДНК и проведение полимеразной цепной реакции в реальном времени

Клетки линий U-87 MG, U-251 MG и культуры астроцитов человека снимали с пластика, отмывали 2 раза DPBS (Gibco, США) и удаляли супернатант. С помощью QIAzol Lysis Reagent (Qiagen, Германия) и хлороформа (Химмед, Россия) получали водную фазу, к которой добавляли 95% спирт. На автоматической станции для выделения нуклеиновых кислот и белков QIAcube (Qiagen, Германия) в соответствии с протоколом производителя при помощи одноразовых хроматографических silica spin колонок выделяли суммарную РНК. На спектрофотометре NanoVue Plus (GE, Великобритания) оценивали степень очистки РНК при помощи параметров A260/A280 и A260/A230 и определяли концентрацию РНК. Качество выделенной РНК оценивали при помощи электрофореза в агарозном геле по

соотношению интенсивностей флуоресценции полос от 28S и 18S рибосомальной РНК на цифровой документирующей станции ImageQuant LAS4000 (GE, Великобритания).

Образцы суммарной РНК обрабатывали дезоксирибонуклеазой I (DNase I, RNase-free, 1 ед/мкл (Fermentas, Литва)), после этого фермент инактивировали. Для синтеза кДНК применяли набор MMLV RT kit (Евроген, Россия), где использовали случайные декануклеотидные и олиго(dT) праймеры. 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. Полученные при помощи аналогичных методик анонимизированные кДНК 25-и первичных образцов глиом 3-ей и 4-ой степени злокачественности и 4-х контрольных образцов здоровой ткани мозга после аутопсии, были любезно предоставлены Ф.А. Кошкиным из коллекции лаборатории отдела медицинских нанобиотехнологий МБФ РНИМУ им. Н.И. Пирогова.

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*. Оценивали экспрессию мРНК *GLI1* и *tGLI1*.

Праймеры для *GLI1* были подобраны таким образом, чтобы они отжигались на участок, отсутствующий у *tGLI1* (рис. 1). Для *tGLI1* 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. 1).



Рисунок 1. Схематическое изображение структуры мРНК *GLI1* и сплайсингового варианта *tGLI1*. Стрелками обозначены прямой и обратный праймеры.

ПЦР-ПВ выполняли на приборе StepOnePlus (Applied Biosystems, США) с использованием готовой смеси qPCRMix-HS SYBR+ROX (Евроген, Россия). В каждом эксперименте реакции выполняли в 3-х повторах. Каждый эксперимент выполняли 2 раза. Для оценки специфичности реакции строили кривые плавления для получаемых продуктов 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 $\Delta\Delta C_t$ метода в программе Microsoft Excel 2010 [Livak K.J. et al., 2001].

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

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

где $R_{\text{cell}}(f)$ и $R_0(f)$ являются частотно-зависимыми сопротивлениями золотых микроэлектродов с клетками и без клеток соответственно [Atienzar F.A. et al., 2011].

Прибор помещали в инкубатор. В каждую лунку Е-плашки вносили по 100 мкл ростовой среды. Плашку ставили в прибор, а через 10 минут измерялось сопротивление $R_0(f)$. После измерения начального сопротивления, плашку извлекали из прибора и в лунки вносили 90 мкл суспензии клеток в ростовой среде. Предварительно количество посаженных клеток в лунку подбирали с учетом рекомендаций производителя прибора. 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. 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. 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 Е-плашку извлекали из прибора и отбирали среду из лунок. Затем в эти лунки вносили по 200 мкл среды с определенной концентрацией химиотерапевтического препарата. Подобранная концентрация цисплатина для линии U-251 MG и астроцитов составила 12,5 мкМ и 50 мкМ, соответственно. Концентрация темозоломида для этих клеток составила 5 мМ. Оптимальная концентрация доксорубицина – 8 мкМ и 1 мкМ для линии U-251 MG и астроцитов человека, соответственно. Дополнительно ставили контроль, в котором клетки двое суток росли в среде без циклопамина и DMSO, после чего среду меняли на свежую. Измерения в этой части работы выполняли в 3-х повторях минимум в течение 120 часов. 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.

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) по протоколу производителя. Набор включал в себя 5-Х аннексин-связывающий буфер, йодистый пропиций (PI 1 мг/мл) и Alexa Fluor 488 меченый аннексин V. Так как результаты в данном тесте сравнивались с результатами тестов измерения электрического импеданса, мы воспроизводили аналогичные условия. 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 повторах.

Анализ образцов проводили на клеточном сортере (Beckman MoFlo XDP, США), используемом в качестве проточного цитометра. 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. 2).

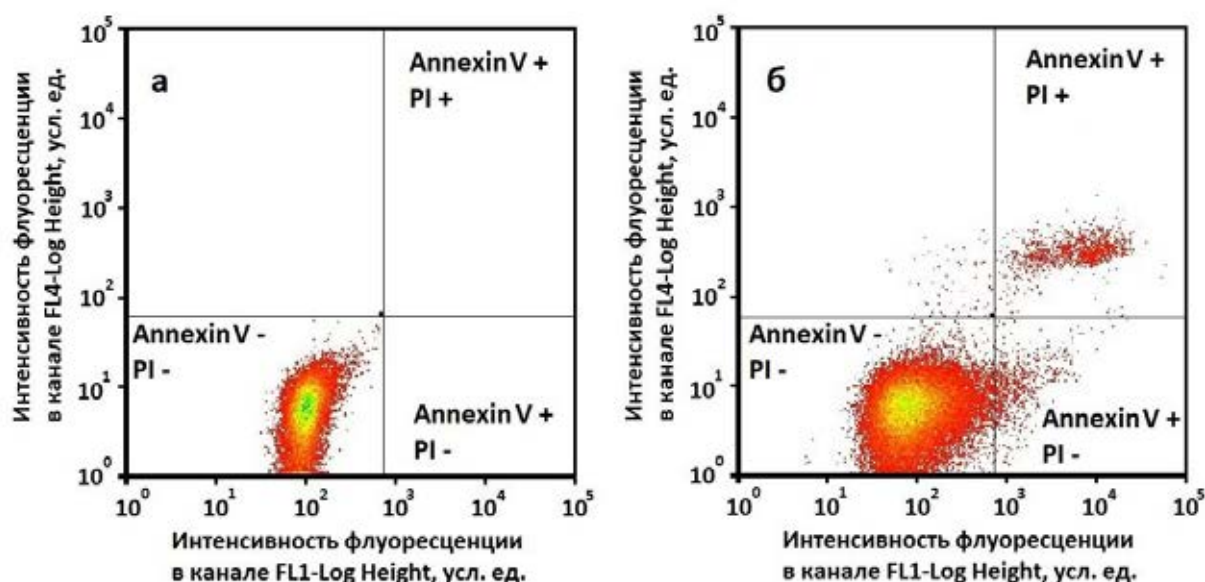


Рисунок 2. Точечные диаграммы, позволяющие определять процент погибших клеток и клеток в состоянии апоптоза. (а) – отрицательный контроль без добавления красителей, (б) – клетки, культивируемые с добавлением 10 мкМ циклопамина и окрашенные при помощи набора Alexa Fluor 488 annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit. Данные представлены для клеток культуры астроцитов человека.

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 [Goodell M.A. et al., 2005; Telford W.G. et al., 2007]. Для определения процента клеток боковой популяции использовали DCV в конечной концентрации 5 мкМ (Vybrant® DyeCycle™ Violet Stain, Invitrogen, США). Контролем служили образцы, к которым за 15 минут до внесения DCV добавляли верапамил до конечной концентрации 50 мкМ (Sigma-Aldrich, США).

Анализ образцов проводили на клеточном сортере (Beckman MoFlo XDP, США), используемом в качестве проточного цитометра. Гейтирование клеток осуществлялось по морфологии и жизнеспособности (выбирались негативные клетки в каналах флуоресценции йодистого пропидия). Границу области боковой популяции устанавливали по контрольным образцам с верапамилем, после чего в опытных образцах определяли процент клеток боковой популяции.

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 для двух сравниваемых групп применяли U-критерий Манна-Уитни и t-критерий Стьюдента с оценкой нормальности распределения значений при помощи критерия Шапиро-Уилка и оценкой равенства дисперсий распределения значений при помощи критерия Левена. Для трех сравниваемых групп использовали метод Краскела-Уоллиса, дополненный парным сравнением групп, и дисперсионный анализ с оценкой нормальности распределения значений при помощи критерия Шапиро-Уилка, дополненный апостериорным сравнением групп, с проверкой гипотезы о равенстве дисперсий распределения значений при помощи критерия Левена. Достоверными считали отличия при $p < 0,05$. Для анализа связи рассчитывали коэффициент корреляции Спирмена r при уровне значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Оценка уровня экспрессии *GLI1* и *tGLI1*

В 2009 году был обнаружен транскрипционный фактор *tGLI1*, мРНК которого является продуктом альтернативного сплайсинга *GLI1*. Есть несколько работ, показывающих, что *tGLI1* в большей степени влияет на процессы химиорезистентности, ангиогенеза, пролиферации, чем фактор *GLI1* [Carpenter R.L. et al., 2012; Cao X. et al., 2012; Zhu H. et al., 2014]. 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.

Экспрессия *tGLI1* была обнаружена только в клетках линии глиобластомы U-87 MG и не обнаружена ни в клетках линии U-251 MG, ни в клетках культуры астроцитов человека,

ни в первичных образцах глиом 3-ей и 4-ой степени злокачественности и здоровой ткани мозга.

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* (рис. 3). 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, как это делают в мировой литературе [Cao X. et al., 2012].

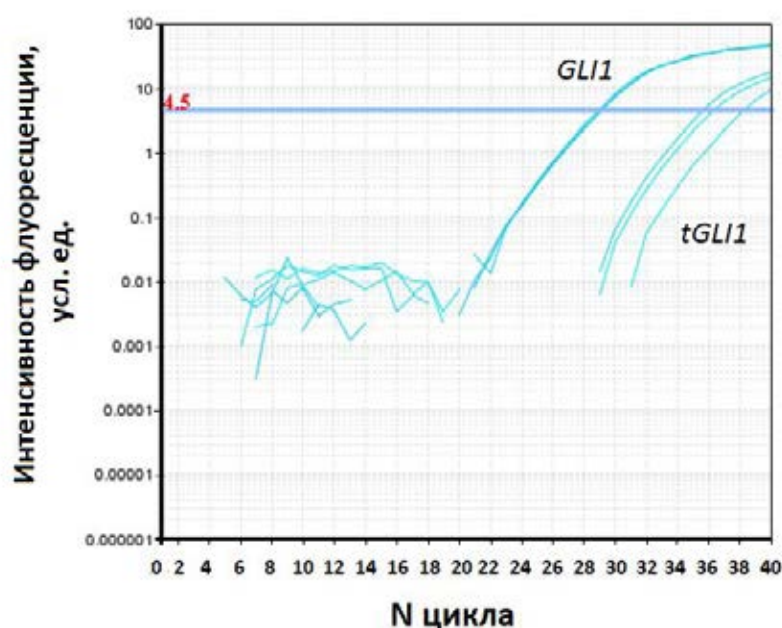


Рисунок 3. Графики накопления продуктов полимеразной цепной реакции для *GLII* и *tGLII*.

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 (рис. 4 а) [Bar E.E. et al., 2007].

При исследовании 25 первичных образцов глиом 3-ей и 4-ой степени злокачественности было обнаружено, что уровень экспрессии *GLII* достоверно не превышает таковой уровень в контрольных образцах здоровой ткани мозга (4 образца) (рис. 4 б). Анализ научной литературы демонстрирует неоднозначность имеющихся данных, касающихся экспрессии *GLII* в первичных образцах глиом [Bar E.E. et al., 2007; Ehtesham M. et al., 2007; Shahi M.H. et al., 2008; Katayam M. et al., 2002; Cui D. et al., 2010].

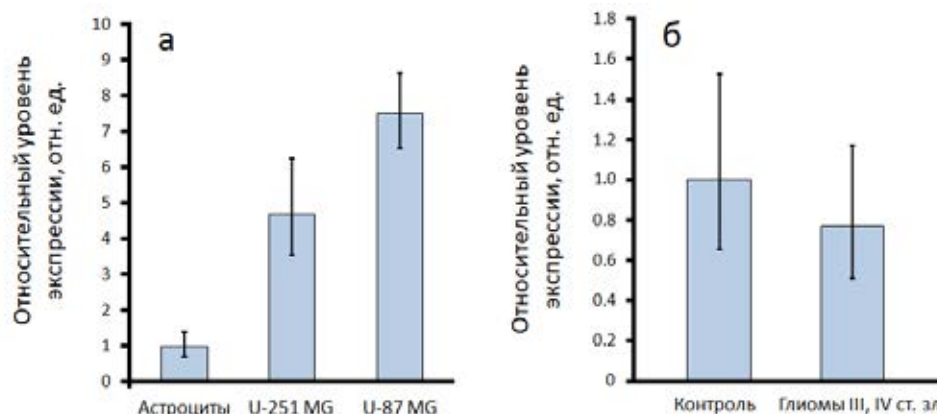


Рисунок 4. Диаграммы, отображающие уровень экспрессии *GLII* в клетках линий U-251 MG и U-87 MG относительно культуры астроцитов (а) и в образцах глиом 3 и 4 степени злокачественности относительно образцов здоровой ткани мозга (б).

Отчетливо прослеживается идея некоторых авторов по экспрессии *GLII* оценивать активность сигнального пути НН в клеточных культурах или первичных образцах [Shahi M.H. et al., 2008; Bar E.E. et al., 2007; Ehtesham M. et al., 2007; Cui D. et al., 2010]. 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 *GLII* на уровне трансляции [Braun S. et al., 2012]. Одними авторами в качестве оптимального метода оценки активности транскрипционного фактора *GLII* в культурах клеток предлагается использовать репортерный ген люциферазы [Braun S. et al., 2012; Becher O.J. et al., 2008]. Другие авторы предлагают иммунофлуоресцентные методы [Wang K. et al., 2010]. 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 клеточные процессы [Clement V. et al., 2007; Das S. et al., 2009; Queiroz K.C. et al., 2010; Chen Y. et al., 2014]. 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.

Изучение влияния сигнального пути Hedgehog на пролиферацию клеток и изучение цитотоксического действия циклопамина

Для оценки влияния сигнального пути на процессы пролиферации, мы решили воздействовать на сигнальный путь НН посредством его стимуляции и ингибирования.

Выбор циклопамина в нашей работе был обусловлен тем, что этот препарат оказывает ингибирующее влияние непосредственно на классический сигнальный путь НН.

Для клеток культуры астроцитов человека на протяжении всего эксперимента не было получено достоверных отличий между образцами, росшими в среде с 5 мкМ и 10 мкМ циклопамина, и контролем с 0,2% DMSO (рис. 5). Также видно, что в контрольном образце в присутствии DMSO клетки пролиферируют активнее, чем клетки, растущие в обычной ростовой среде (рис. 5).

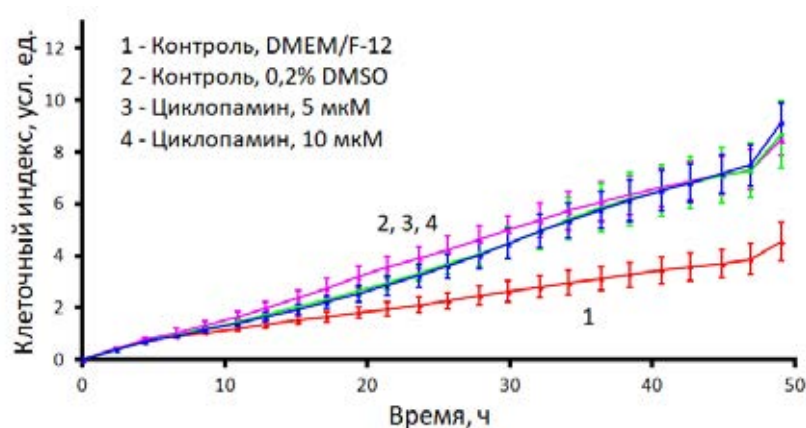


Рисунок 5. Зависимость КИ от времени культивирования с циклопамином для культуры астроцитов человека. Планки погрешностей отображают стандартное отклонение.

Культивирование клеток глиомы линии U-251 MG в присутствии 5 мкМ и 10 мкМ циклопамина приводит к снижению пролиферативной активности клеток. 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. 6). Коэффициент корреляции Спирмена $r = -0,95$.

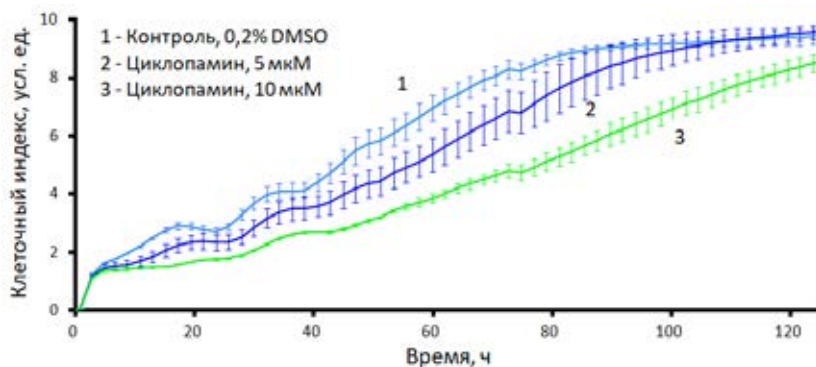


Рисунок 6. Зависимость КИ от времени культивирования с циклопамином для культуры клеток глиомы линии U-251 MG. Планки погрешностей отображают стандартное отклонение.

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 1,6%, при которой клетки начинали быстрее выходить в экспоненциальную фазу роста.

Было показано, что добавление циклопамина к клеткам линии U-87 MG в концентрации 5 мкМ и 10 мкМ снижает пролиферативную активность. 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. 7). Коэффициент корреляции Спирмена $r = -0,95$.

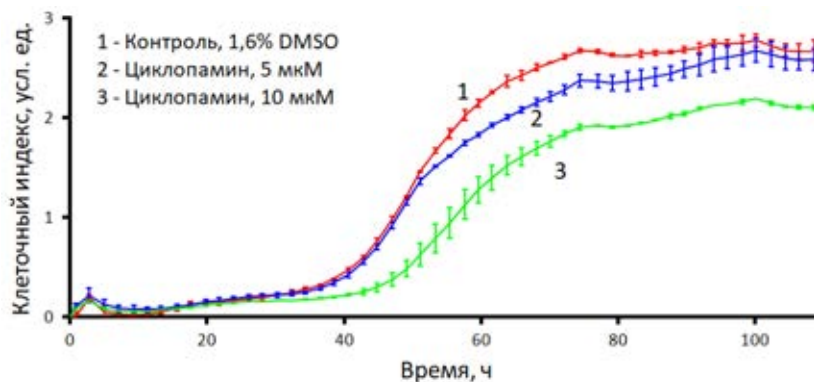


Рисунок 7. Зависимость КИ от времени культивирования с циклопамином для культуры клеток глиомы линии U-87 MG. Планки погрешностей отображают стандартное отклонение.

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. Так как циклопамин в концентрациях 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. 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.

Мы обнаружили, что количество погибших клеток и клеток в состоянии апоптоза для культуры астроцитов при концентрации циклопамина 5 и 10 мкМ не отличалось от контроля с 0,2% DMSO (рис. 8). 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 (рис. 8). 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 [Wang K. et al., 2010].

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 (рис. 8). 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 сигналинг-опосредованным.

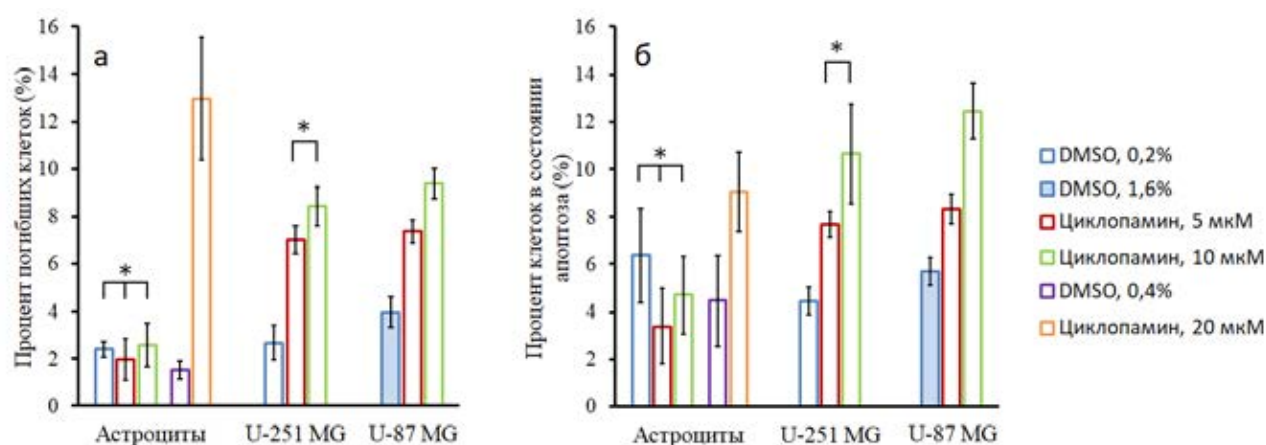


Рисунок 8. Гистограммы, отображающие процент погибших клеток (а) и клеток в состоянии апоптоза (б). Планки погрешностей отображают стандартное отклонение. Звездочкой отмечены не отличающиеся друг от друга выборки.

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. КИ 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 сигналинг-опосредованным цитотоксическим действием циклопамина.

Дополнительную информацию о влиянии сигнального пути НН на процессы пролиферации мы получили из экспериментов с добавлением лиганда Shh. При добавлении лиганда в концентрации 3 мкг/мл отмечается увеличение пролиферации клеток линии U-251 MG (рис. 9 а) и культуры астроцитов (рис. 9 б). Но в сравнении с клетками глиобластомы

U-251 MG у клеток культуры астроцитов наблюдается не столь выраженное увеличение пролиферации, достоверные отличия между образцами начинаются только через 52 часа после начала культивирования и продолжаются до окончания эксперимента.

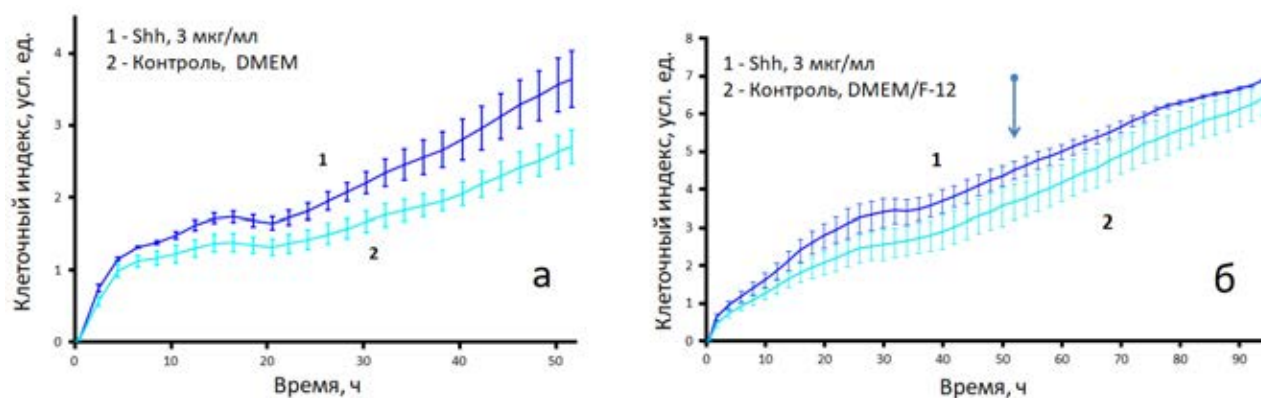


Рисунок 9. Зависимость КИ от времени культивирования с Shh для клеток линии глиомы U-251 MG (а) и культуры астроцитов человека (б). Планки погрешностей отображают стандартное отклонение.

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. 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. 10).

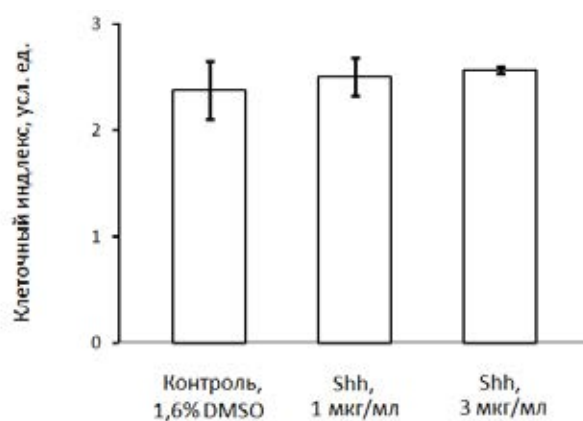


Рисунок 10. Гистограмма, отображающая зависимость КИ от концентрации лиганда Shh для клеток линии глиомы U-87 MG через 60 часов культивирования. Планки погрешностей отображают стандартное отклонение.

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.

Интерпретация полученных данных позволяет сделать предположения об активности сигнального пути. Так, в нашей работе при внесении циклопамина и лиганда Shh отмечается

три варианта поведения клеток. Пролиферация клеток U-251 MG снижалась при добавлении циклопамина, 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 неполностью активном состоянии. Добавление циклопамина 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.

Для наиболее эффективного лечения онкологических заболеваний, в том числе глиом, терапия НН сигналинг-зависимых или НН сигналинг-независимых опухолей должна отличаться [Xu Q. et al., 2008]. Поэтому перед исследователями встает актуальная проблема оценки активности сигнального пути. Как уже было сказано, существующие методы оценки активности 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 как с использованием циклопамина, так и лиганда Shh.

Изучение влияния сигнального пути Hedgehog на химиорезистентность клеток и формирование фенотипа клеток боковой популяции

Наша следующая задача состояла в оценке влияния НН сигнального пути на резистентность (чувствительность) исследуемых культур к химиотерапевтическим препаратам. Для этого мы разработали методику, заключающуюся 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. В отличие от колориметрических методов, наша методика позволяет оценить непосредственное влияние сигнального пути на чувствительность клеток к химиопрепаратам и разграничить влияние сигнального пути в отдельности на пролиферацию и химиорезистентность. В исследовании была взята линия глиомы U-251 MG, в качестве контроля взята культура астроцитов.

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 (рис. 11 а, 12 а, в, д). 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 (рис. 11 б, рис.12 а, д). Но разница отсутствовала для темозоломида (рис. 12 в).

В клетках астроцитов человека внесение циклопамина и лиганда Shh не влияло на время начала гибели клеток в сравнении с контрольными образцами (рис. 11 в, г, 12 б, г, е).

Таким образом, сигнальный путь НН влияет на химиорезистентность клеток глиом.

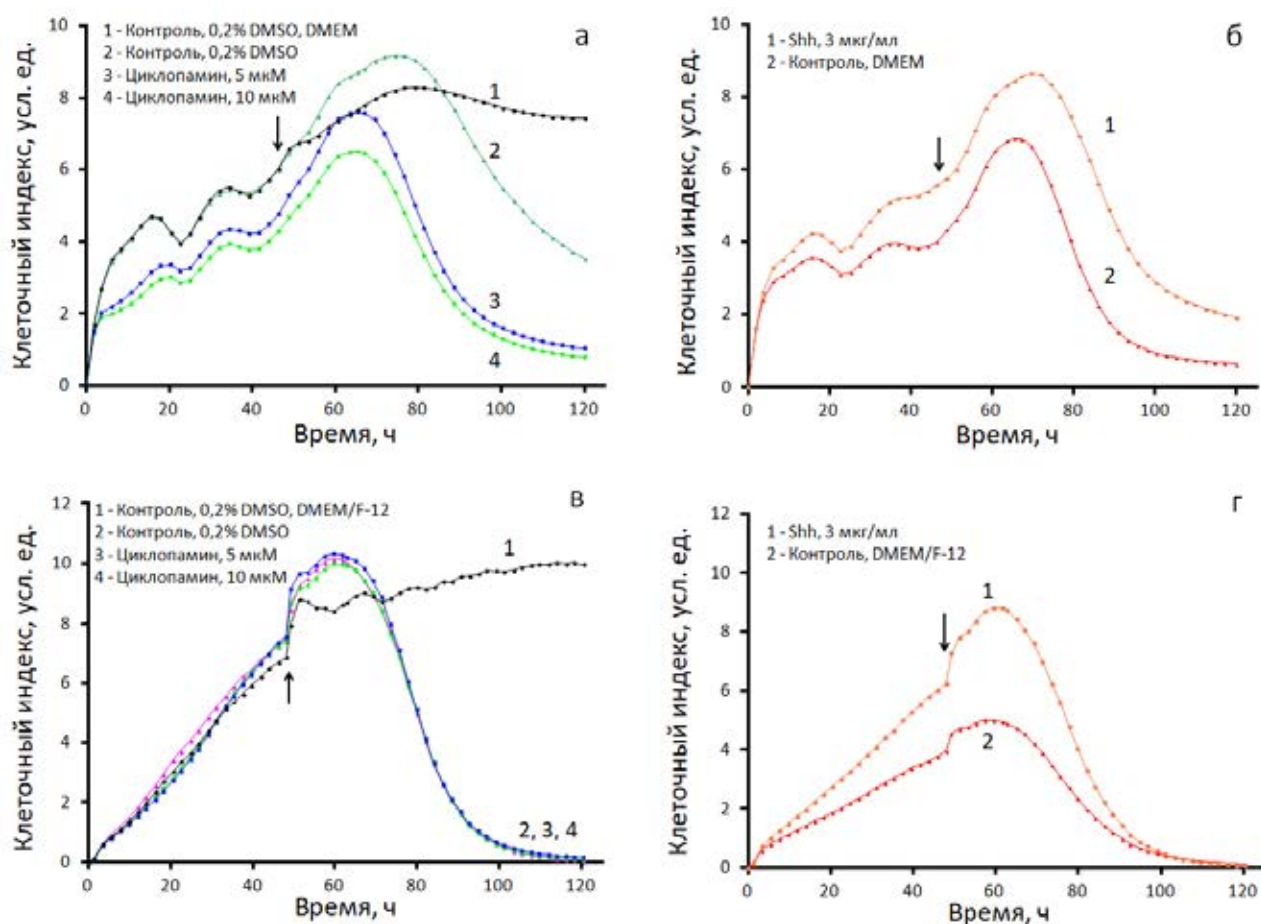


Рисунок 11. Зависимость клеточного индекса от времени до и после внесения цисплатина для клеток линии U-251 MG (12,5 мкМ цисплатина), культивированных с циклопамином (а) и Shh (б) и клеток культуры астроцитов (50 мкМ цисплатина), культивированных с циклопамином (в) и Shh (г). Стрелками указано время внесения цисплатина. Кривые 1 на графиках а, в – контрольные кривые без внесения цисплатина.

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 циклопамином, 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 ABC переносчиков (предотвращают накопление экзогенных препаратов в клетках) на клеточных мембранах опухолевых клеток и увеличивает процессы репарации поврежденной ДНК, что увеличивает химиорезистентность клеток. При ингибировании НН сигнального пути отмечается снижение данных процессов [Mazumdar T. et al., 2011; Chen Y. et al., 2014; Kim H.A. et al., 2015].

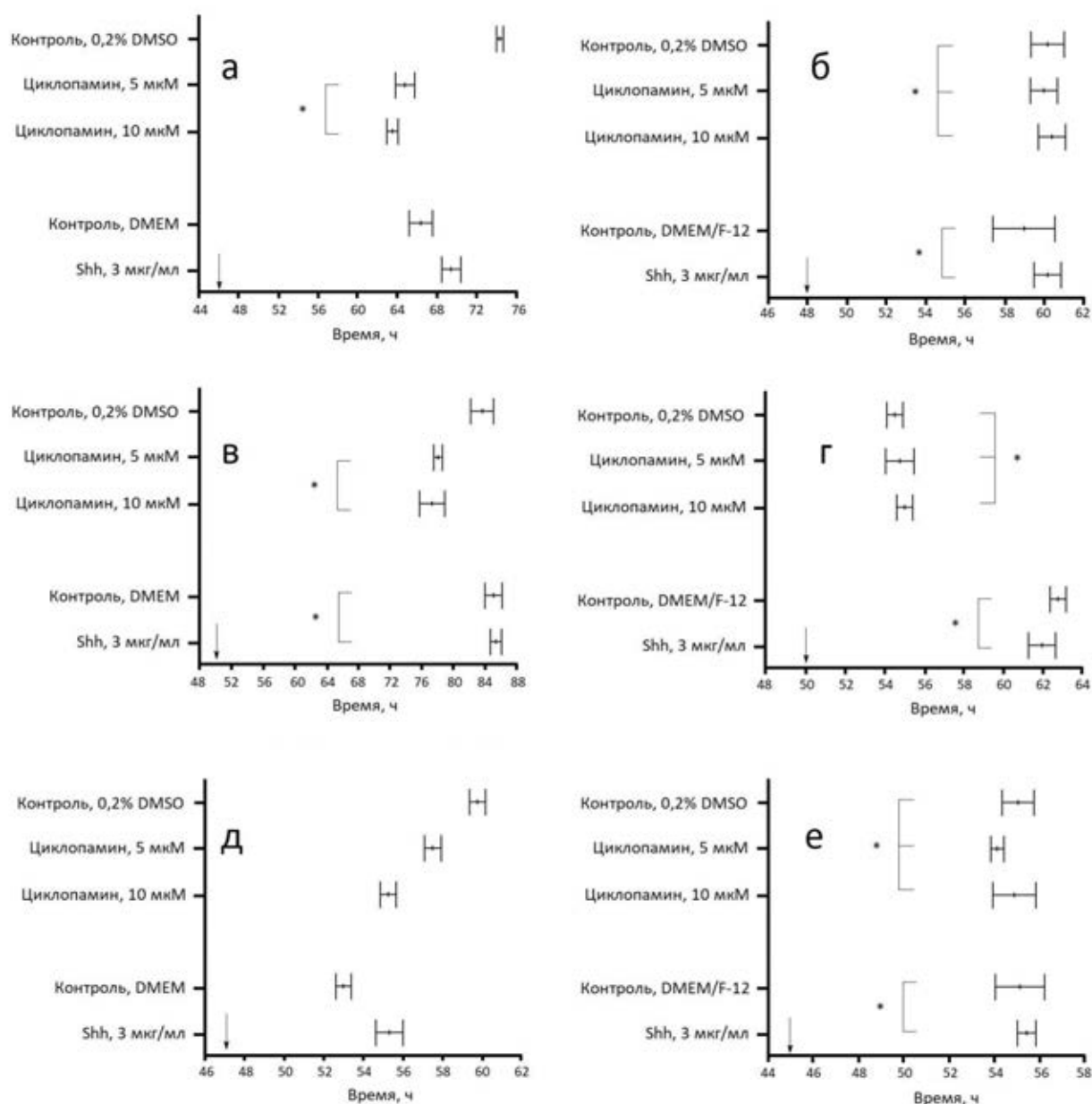


Рисунок 12. Время начала гибели клеток: U-251 MG с цисплатином 12,5 мкМ (а), астроциты с цисплатином 50 мкМ (б), U-251 MG с темозоломидом 5 мМ (в), астроциты с темозоломидом 5 мМ (г), U-251 MG с доксорубицином 8 мкМ (д), астроциты с доксорубицином 1 мкМ (е). Стрелками указано время внесения препарата.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

Одним из показателей, по которому судят о химиорезистентности, является процент клеток боковой популяции. Этот показатель получают при окрашивании клеток флуоресцентными витальными красителями Hoechst 33342 или DCV. Эти красители являются субстратами для АВС 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 [Telford W.G. et al., 2007; Boesch M. et al., 2012]. Название “боковая популяция” происходит от расположения данной популяции

клеток сбоку и ниже от основной популяции клеток на двумерных точечных диаграммах (рис. 13).

Процент клеток боковой популяции для клеточной линии U-87 MG составил $1,51 \pm 0,25\%$. В контрольных образцах культивирование клеток в присутствии 0,2% DMSO приводило к увеличению процента клеток боковой популяции до $5,20 \pm 0,23\%$ (рис. 13 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 (рис. 12 б, в).

Процент клеток боковой популяции для клеточной линии U-251 MG составил $1,41 \pm 0,29\%$. 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 $2,15 \pm 0,27\%$ и $1,43 \pm 0,26\%$, соответственно.

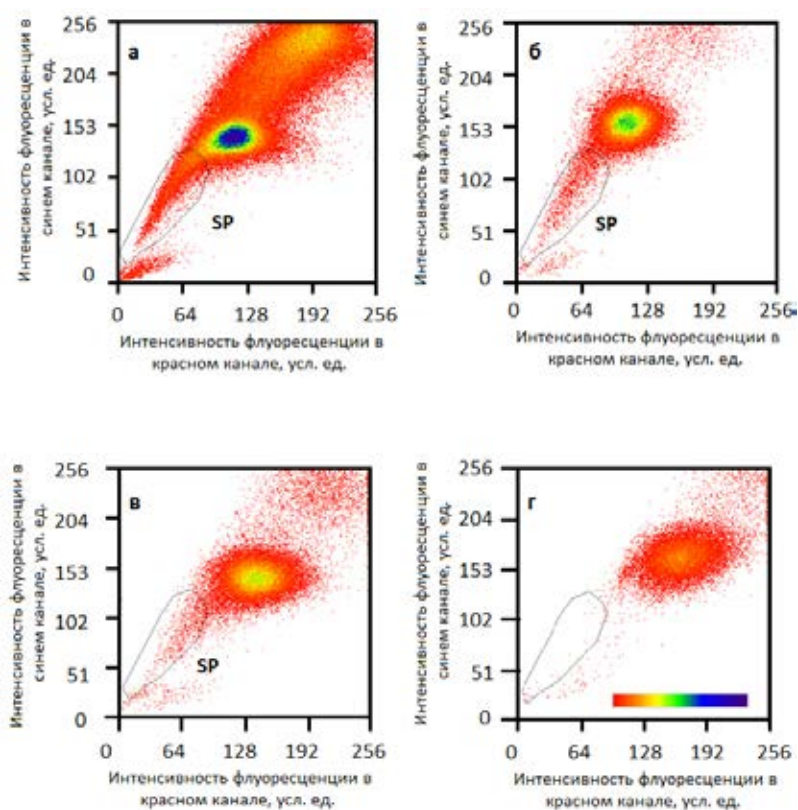


Рисунок 13. Точечные диаграммы, построенные в каналах флуоресценции DCV, позволяющие определить процент боковой популяции в культуре клеток U-87 MG после культивирования клеток с циклопамином. В синий канал попадает флуоресценция с длинами волн 432-482 нм, в красный – 655-685 нм. SP – клетки боковой популяции. (а) – клетки с 0,2% DMSO, (б) – клетки с 5 мкМ циклопамина, (в) – клетки с 10 мкМ циклопамина, (г) ингибиторный контроль с концентрацией верапамила 50 мкМ. Цветовая шкала отображает плотность событий.

Нами было показано, что культивирование клеток линий глиобластом U-87 MG и U-251 MG с циклопамином приводит к достоверному дозозависимому уменьшению процента клеток боковой популяции в сравнении с контролем, где клетки культивировались только в присутствии DMSO. Таким образом сигнальный путь принимает участие в формировании клеток боковой популяции, то есть влияет на мультилекарственную

резистентность, обусловленную ABC переносчиками. Так как HH 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.

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, циклопамина 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 персонализированной терапии пациентов.

ВЫВОДЫ

1. *tGLI1* экспрессируется только в клетках линии U-87 MG. Экспрессия *GLI1* в клетках линий глиом превышает экспрессию в клетках культуры астроцитов человека. Экспрессия *GLI1* в первичных образцах глиом не превышает экспрессию *GLI1* 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 доксорубину. *Shh* увеличивает химиорезистентность клеток линии U-251 MG к цисплатину и доксорубину, 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 РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Черепанов, С. А. Выделение и характеристика химиорезистентных клеток боковой популяции низкодифференцированной глиомы С6 / С. А. Черепанов, В. П. Баклаушев // Вестник РГМУ. Материалы IX Международной (XVIII Всероссийской) Пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых ученых. – 2014. – С. 264.
2. Черепанов, С. А. Функционирование сигнального пути Sonic Hedgehog в химиорезистентных клетках боковой популяции низкодифференцированной глиомы U87 / С. А. Черепанов, В. П. Чехонин // Вестник РГМУ. Материалы X Международной (XIX Всероссийской) Пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых ученых. – 2015. – С. 459-460.
3. Черепанов, С. А. Hedgehog-сигналинг и его роль в патогенезе нейроонкологических заболеваний / С. А. Черепанов, В. П. Баклаушев, А. Н. Габашвили, И. И. Шепелева, В. П. Чехонин // **Биомедицинская химия**. – 2015. – Т. 61. – № 3. – С. 332-342.
4. Габашвили, А. Н. Противоопухолевая активность мезенхимных стволовых клеток крысы при их прямом и непрямом сокультивировании с клетками глиомы С6 / А. Н.

- Габашвили, В. П. Баклаушев, Н. Ф. Гриненко, П. А. Мельников, С. А. Черепанов, А. Б. Левинский, В. П. Чехонин // **Клеточные технологии в биологии и медицине**. – 2015. – № 4. – С. 207-212.
5. Черепанов, С. А. Влияние сигнального пути Hedgehog на пролиферацию низкодифференцированных глиом / С. А. Черепанов, В. П. Чехонин // *Scienceforhealth* 2016. Клинические и теоретические аспекты современной медицины: материалы VII международной конференции. – 2016. – С. 66-67.
6. Черепанов, С. А. Влияние активации сигнального пути Hedgehog на пролиферацию низкодифференцированных глиом / С. А. Черепанов, К. И. Черепанова, Н. Ф. Гриненко, О. М. Антонова, В. П. Чехонин // **Бюллетень экспериментальной биологии и медицины**. – 2016. – Т. 161. – № 5. – С. 615-620.
7. Чехонин, И. В. Сенсibilизированные дендритные клетки для терапии экспериментальной глиомы / И. В. Чехонин, О. И. Гурина, С. А. Черепанов, М. А. Абакумов, К. П. Ионова, Д. К. Жигарев, А. В. Макаров, В. П. Чехонин // **Бюллетень экспериментальной биологии и медицины**. – 2016. – Т. 161. – № 6. – С. 747-752.
8. Мельников, П. А. Интернализация векторизованных липосом, загруженных плазмидной днк, в клетки глиомы С6 / П. А. Мельников, В. П. Баклаушев, А. Н. Габашвили, Н. В. Нуколова, И. И. Кузнецов, С. А. Черепанов, Ф. А. Кошкин, А. В. Леопольд, В. П. Чехонин // **Клеточные технологии в биологии и медицине**. – 2017. – № 1. – С. 3-11.
9. Черепанов, С. А. Влияние сигнального пути Hedgehog на химиорезистентность низкодифференцированных глиом / С. А. Черепанов, Н. Ф. Гриненко, О. М. Антонова, П. Б. Курапов, И. И. Шепелева, В. П. Чехонин // **Бюллетень экспериментальной биологии и медицины**. – 2017. – Т. 164. – № 9. – С. 341-346.
10. Чехонин, И. В. Влияние астроцитарных антигенов на иммуногенность дендритных клеток / И. В. Чехонин, А. А. Чернышева, У. Н. Фомина, С. А. Черепанов, К. Ш. Кардашова, О. И. Гурина // Материалы международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития». – 2019. – С. 204-206.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

КИ – клеточный индекс

ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция в реальном времени

ЭБС – эмбриональная бычья сыворотка

DCV – DyeCycle Violet, флуоресцентный краситель

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

НН – Hedgehog сигнальный путь

MMLV RT – обратная транскриптаза вируса лейкемии мышей