

УДК 577.29

АТОРВАСТАТИН БЛОКИРУЕТ РОСТ МЕДУЛЛОБЛАСТОМЫ ТИПА SONIC HEDGEHOG ПУТЕМ АПОПТОЗА

Р.Э. Гордон^{1,2}, З.И. Абрамова¹

¹*Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, 420008, Россия*

²*Онкологический центр Фокс Чейз, г. Филадельфия, 19111, США*

Аннотация

Чрезмерная активация сигнального каскада Sonic Hedgehog является причиной развития медуллобластомы – наиболее распространенной злокачественной опухоли головного мозга у детей. Ранее нами было показано, что эндогенный холестерин выступает непосредственным активатором каскада Sonic Hedgehog и является перспективной мишенью для таргетной терапии медуллобластомы. В настоящем исследовании гистохимический анализ эффекта аторвастатина, широко применяемого в клинической практике ингибитора биосинтеза холестерина, выявил высокий уровень клеточной гибели в ткани опухоли путём апоптоза. Полученные данные указывают на перспективу использования статинов для терапии медуллобластомы, а также других злокачественных новообразований, в основе онкогенеза которых лежит активация сигнального пути Sonic Hedgehog.

Ключевые слова: медуллобластома, Sonic Hedgehog, статины, аторвастатин, холестерин, апоптоз

Введение

Медуллобластома (МБ) является наиболее распространенной злокачественной опухолью головного мозга у детей [1]. МБ развивается из гранулярных нейрональных клеток-предшественников на поверхности мозжечка, редко может метастазировать в другие отделы центральной нервной системы (ЦНС) с потоком цереброспинальной жидкости [2]. Традиционные методы лечения в клинической практике включают в себя хирургическое удаление опухоли, химио- и лучевую терапии [3]. Несмотря на прогресс в нашем понимании онкогенеза МБ, а также успехи стандартной терапии, значительная часть пациентов имеет выживаемость не более 5 лет. Кроме того, пациенты страдают от множества серьезных побочных эффектов терапии, включающих когнитивные нарушения и эндокринные расстройства [4]. Таким образом, менее токсичные и более эффективные подходы к лечению МБ являются ключевым направлением исследований в данной области.

Одним из наиболее привлекательных подходов к терапии раковых заболеваний является индукция апоптоза – программируемой клеточной гибели – в опухолевых клетках. Данный подход позволяет направленно элиминировать онкотрансформированные клетки, не повреждая здоровые ткани организма,

и особенно актуален для терапии МБ у детей, поскольку гибель здоровых клеток в развивающемся организме приводит к серьезным нарушениям развития.

На основании молекулярно-генетических характеристик МБ классифицированы на четыре группы: WNT, Sonic Hedgehog, группа 3 и группа 4 [5]. Известно, что группа Sonic Hedgehog (Shh), поражающая треть пациентов с МБ, характеризуется агрессивным течением заболевания и плохим прогнозом выживаемости и наблюдается главным образом у младенцев и детей до 14 лет [6].

Сигнальный каскад Shh играет важную роль в ходе эмбриогенеза, а также является ключевым путем, обеспечивающим развитие и функционирование головного мозга [7]. В отсутствие лиганда Shh, антагонизирующий рецептор Patched1 (Ptc1), подавляет активность 7-трансмембранного G-белка Smoothened (Smo), тем самым блокируя передачу сигнала в каскаде (рис. 1). Ковалентное взаимодействие между лигандом Shh и его рецептором Ptc1 уменьшает ингибирование Smo, в результате чего происходит запуск каскада событий, кульминацией которых является активация транскрипционных факторов Gli1 и Gli2 (глиома-ассоциированных онкопротеинов 1 и 2) [8]. Gli-белки транслоцируются в ядро клетки, где они способствуют транскрипции генов *Ptc1* и *Gli1*, являющихся ключевыми регуляторами пролиферации и дифференцировки клеток в ходе эмбрионального развития организма, а также в ходе онкогенеза [9]. Нарушения в передаче сигнала Shh в клетке могут привести к врожденным дефектам, в то время как чрезмерная активность каскада Shh является причиной развития онкологических заболеваний человека, из числа которых МБ является наиболее агрессивным недугом [10]. Поскольку рецептор Ptc1 является обратным регулятором каскада Shh, удаление данного белка из клетки путем генно-инженерных манипуляций приведет к непрерывной активации Shh-пути и, как следствие, к развитию МБ.

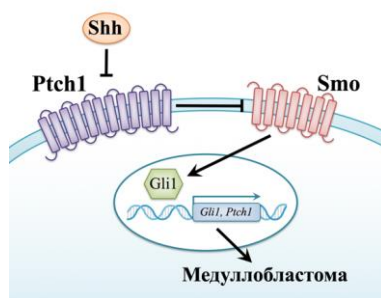


Рис. 1. Схема передачи сигнала Shh в клетке

Холестерин является основным структурным компонентом клеточных мембран, а также выполняет роль сигнальной молекулы в клетке [11]. Известно, что холестерин играет ключевую роль в передаче сигнала Shh [12]. Так, молекула холестерина играет ключевую роль в передаче сигнала Shh [12]. Так, молекула холестерина, ковалентно связанная с предшественником Shh, обеспечивает секрецию липофильного лиганда Shh во внеклеточное пространство [13]. Недавние исследования, посвященные механизму регуляции онкопротеина Smo рецептором Ptc1, выявили, что молекула холестерина через ковалентное взаимодействие с Smo приводит к конформационным изменениям онкопротеина и, как следствие, активирует Shh-путь при интактном рецепторе Ptc1 [14–16].

В головном мозге потребность в холестерине особенно высока, так как данная молекула является основным структурным компонентом миелиновых оболочек [17]. Поскольку гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) предотвращает проникновение холестерина и липопротеинов из кровотока позвоночных в головной мозг, потребность в холестерине обеспечивается за счет его биосинтеза *de novo* [18]. Биосинтез холестерина начинается с синтеза ацетоацетил-КоА из двух молекул ацетил-КоА в цитозоле. Реакция образования мевалоната, катализируемая ферментом гидроксиметилглутарил-КоА-редуктазой (ГМГ-КоА-редуктазой), проходит в эндоплазматическом ретикулуме и является лимитирующей стадией биосинтеза холестерина. Фермент ГМГ-КоА-редуктаза является мишенью статинов – широко применяемых в клинической практике ингибиторов биосинтеза холестерина [19]. Статины являются привлекательными гиполипидемическими препаратами ввиду высокой эффективности, низкой токсичности и доступности. Побочные продукты реакции превращения мевалоната быстро метаболизируются в клетке, поэтому побочные эффекты статинов остаются минимальными [20].

Ранее несколькими исследовательскими группами было показано, что статины ингибируют рост, а также оказывают апоптотический эффект на клетки МБ [21–23]. Следует отметить, что данные исследования были проведены в клеточных линиях, в которых, как было показано позднее [24], активность сигнального каскада Shh в условиях *in vitro* не сохраняется. Несмотря на то что подавляющий эффект статинов на рост клеток МБ был отмечен несколькими исследователями, апоптотический эффект статинов в вивальных моделях МБ ранее описан не был. В настоящей работе нами было оценено влияние статина третьего поколения аторвастатина на рост, пролиферацию и апоптоз клеток и тканей МБ, полученных из мышей, нокаутных по гену *Ptch1*. Было обнаружено, что аторвастатин оказывает ингибирующий эффект на рост и пролиферацию первичной культуры МБ типа Shh. В экспериментах *in vivo* было показано, что снижение роста подкожного аллотрансплантата МБ связано с увеличением уровня апоптоза в тканях МБ. Таким образом, аторвастатин может быть использован для подавления роста МБ.

1. Материалы и методы

1.1. Получение первичной культуры клеток медуллобластомы методом сепарации в перколле. Для исследований были использованы *Ptch1*-нокаутные мыши. Все эксперименты проводили в соответствии с протоколом, одобренным Комитетом по содержанию и использованию лабораторных животных (IACUC) в Онкологическом центре Фокс Чейз (г. Филадельфия, США).

Первичные клетки МБ выделяли по ранее описанной методике [2] из опухолей *Ptch1*-нокаутных мышинных МБ. Мышь, имеющая опухоль в мозжечке, подвергалась эвтаназии в CO₂-камере (Airgas, США). С использованием хирургических инструментов головной мозг извлекался из черепа в стерильных условиях. Мозжечок, отделенный от большого мозга, измельчали скальпелем и инкубировали в растворе ФСБ с 10 МЕ/мл папаина (Worthington, США), 200 мг/мл L-цистеина (Sigma-Aldrich, США) и 250 МЕ/мл ДНКазы I (Sigma-Aldrich, США) в течение 30 мин при 37 °С. По окончании инкубации остатки

ткани измельчалась пипетированием до гомогенной клеточной суспензии в растворе ФСБ (Life Technologies, США) с содержанием 5 мг/мл ингибитора трипсина (Gibco, США) и 250 МЕ/мл ДНКазы I (Sigma-Aldrich, США). Для получения чистой популяции клеток МБ полученная клеточная суспензия была центрифугирована в градиенте 35% и 65% перколла (GE Health, США) при центробежном ускорении 800 g в течение 12 мин.

Интерфазу, содержащую клетки МБ, отмывали в растворе ФСБ с последующим центрифугированием 300 g в течение 10 мин. Полученная клеточная популяция была собрана для дальнейшей оценки жизнеспособности и подсчета клеток в камере Горяева методом исключения трипанового синего. Полученные клетки сажали на покровное стекло (Fisher Scientific, США), предварительно инкубированное в растворе 0.1 мг/мл поли-D-лизина ($M_w > 300$ кДа) (Millipore, США), и культивировали в питательной среде для нейронов (Gibco, США), содержащей 2% нейрональной добавки B-27 (Gibco, США), 1 ммоль пирувата Na, 1% L-глутамина, 1% пенициллина и стрептомицина в атмосфере 5%-ного CO_2 при 37 °C. Аторвастатин (Сауман Chemicals, США) разводили в ДМСО. Методом серийных разведений готовили конечную смесь питательной среды с аторвастатином, которую инкубировали с клетками МБ в течение 48 ч в атмосфере 5%-ного CO_2 при 37 °C.

По истечении инкубации образцы клеток МБ фиксировали в 4%-ном растворе параформальдегида (ПФА) на ФСБ в течение 15 мин для дальнейшего иммунофлуоресцентного анализа.

1.2. Подкожная трансплантация клеток медуллобластомы иммунокомпетентным мышам. Первичные клетки МБ выделяли из мозжечка *Ptch1*-нокаутных мышей. Полученные клетки суспендировали в растворе Matrigel с пониженным содержанием ростовых факторов и вводили $2 \cdot 10^6/100$ мкл подкожно мышам линии CB57/SCID. Администрирование аторвастатина в растворе ФСБ осуществляли методом *per os*.

1.3. Приготовление замороженных срезов ткани медуллобластомы. Для приготовления замороженных образцов ткань аллотрансплантата МБ, извлеченную хирургическим путем из-под кожи мыши, фиксировали в 4%-ном растворе ПФА в течение 12 ч, после чего помещали ткань в раствор 30%-ной сахарозы (Fisherbrand, США) на дополнительные 12 ч для криопротекции, после чего заливали образец раствором Optimal Cutting Temperature (OCT) (Fisherbrand, США) и замораживали на сухом льду. Полученный блок использовали для приготовления замороженных срезов толщиной 12 мкм на криостате CM-3050 S (Leica, Германия) при температуре -20 °C. Ткань высушивали на воздухе и хранили при температуре -20 °C.

1.4. Иммунофлуоресцентный анализ. Иммунофлуоресцентный (ИФ) анализ проводили в соответствии со стандартными протоколами производителей антител. В частности, клеточный монослой или ткань отмывали от остатков раствора ПФА или OCT соответственно в растворе ФСБ-Т (20%-ный Тритон X-100) (Fisherbrand, США), после чего блокировали в 10%-ном растворе нормальной козьей сыворотки (Cell Signaling, США) на ФСБ в течение 1 ч при комнатной

температуре. Ткань инкубировали с раствором первичных антител (концентрации антител в 10%-ном растворе нормальной козьей сыворотки на ФСБ: *бром-дезоксигуанидин* (БрдУ) 1:200; каспаза-3 1:500) в течение 12–16 ч при 4 °С. Ткань отмывали от первичных антител в растворе ФСБ-Т 3 раза по 10 мин. Инкубацию со вторичными антителами и ДАФИ (Roche, Швейцария) в 10%-ном растворе нормальной козьей сыворотки на ФСБ проводили при комнатной температуре в течение 2 ч в темноте. Ткань отмывали от вторичных антител в растворе ФСБ-Т 3 раза по 10 мин. Готовые ИФ-срезы заливали раствором Fluogomount-G (Fisherbrand, США) и накрывали покровным стеклом для долгосрочного хранения.

ИФ-анализ проводили с использованием световой микроскопии на микроскопе Nikon Eclipse Ti (Nikon, Германия). Подсчет клеток осуществляли с использованием программы ImageJ.

1.5. Вестерн-блот. Для оценки уровня экспрессии белков методом вестерн-блот были подготовлены клеточные лизаты. Клеточный монослой лизировали с использованием буфера RIPA (Thermo Scientific, США) с добавлением ингибиторов протеаз (Thermo Scientific, США) и фосфатаз (Roche, Швейцария) при 4 °С. Лизат тщательно пипетировали и инкубировали на льду в течение 30 мин для достижения полного лизиса. Во избежание загрязнения образца клеточным дебрисом образцы центрифугировали при центробежном ускорении 15000 g в течение 15 мин при 4 °С. Полученный супернатант отбирали в чистую пробирку и измеряли концентрацию белка с помощью набора Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, США) в соответствии с прилагаемой инструкцией. Считывание данных проводили с помощью спектрофотометра Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, США). Полученные белковые лизаты денатурировали с добавлением шестикратного буфера, содержащего 0.375 моль Tris pH 6.8, 12% додецилсульфата натрия, 60% глицерина, 0.6 моль дитиотреитол, 0.06% красителя бромфенолового синего при 100 °С в течение 10 мин.

Полиакриламидный гель (ПААГ) был приготовлен с использованием раствора акриламид – бисакриламид 30:1 (Bio-Rad, США), 0.5 моль и 1.5 моль буферов Tris-HCl pH 6.8 и 8.8 соответственно, ГЕМЕД (Bio-Rad, США), дистиллированной воды и свежего раствора персульфата аммония (Bio-Rad, США). Клеточные лизаты разгоняли в вертикальном 10%-ном ПААГ, в буфере, содержащем: 25 ммоль Tris-HCl, 190 ммоль глицина, 1% додецилсульфата натрия (pH 8.3) при напряжении 80–120 В в течение 2 ч. В качестве протеинового стандарта использовали маркер WesternC (Bio-Rad, США). Перенос на PVDF-мембрану осуществляли в буфере, содержащем 25 ммоль Tris-HCl, 190 ммоль глицина, 20% метанола, pH 8.3 при 100 В в течение 3 ч. Мембрану блокировали в растворе 0.5%-ного обезжиренного сухого молока на TBS-T в течение 1 ч. Инкубация с первичными антителами (1:1 000) в растворе 0.5%-ного обезжиренного сухого молока на TBS-T осуществлялась в течение 16–18 ч при 4 °С. После инкубации с первичными антителами мембрану отмывали в растворе TBS-T 3 раза по 10 мин, после чего инкубировали со вторичными HRP-мечеными антителами в течение 1 ч при комнатной температуре. Мембрану отмывали в растворе TBS-T 3 раза по 10 мин и инкубировали в растворе для проявления антител, меченных пероксидазой хрена SuperSignal West Pico Chemoluminescent

Substrate (Thermo Scientific, США). Хемилюмениценцию фиксировали на фотопленке, которую проявляли с помощью проявителя (Abnova, США). Полученные фотопленки сканировали при помощи фотосканера (Canon, США).

2. Результаты и их обсуждение

2.1. Аторвастатин ингибирует пролиферацию клеток медуллобластомы *in vitro*. Для того чтобы оценить эффект аторвастатина на выживаемость клеток МБ *in vitro*, первичную культуру клеток МБ, выделенную из мозжечка *Ptch1*-нокаутных мышей по описанной ранее методике [2], культивировали в свободной от холестерина питательной среде для нейронов с добавлением аторвастатина в концентрации 10 и 50 нмоль. Раствор ДМСО был использован в качестве контрольного варианта. После 72-часовой инкубации в контрольном образце был обнаружен плотный монослой клеток (рис. 2, а), состоящий из делящихся нейронов, в то время как в образцах, содержащих аторвастатин, наблюдалось дозозависимое снижение количества жизнеспособных клеток (рис. 2, б, в). В образце, содержащем 50 нмоль аторвастатина, было отмечено увеличение количества погибших клеток (рис. 2, в).

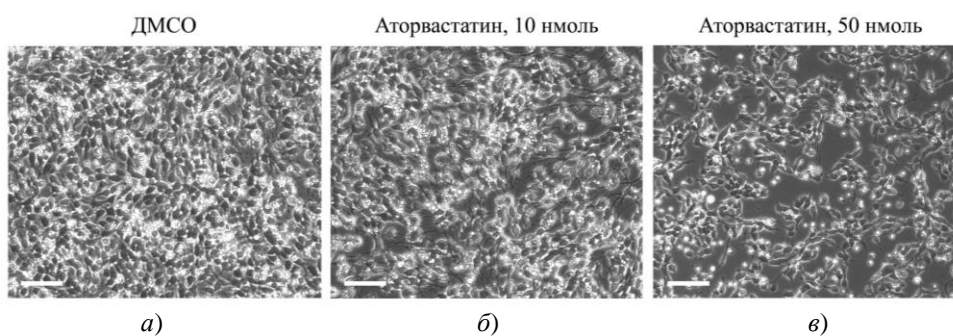


Рис. 2. Первичная культура клеток МБ мыши после 72-часовой инкубации: а – контрольный образец (ДМСО), б – аторвастатин (10 нмоль), в – аторвастатин (50 нмоль) (дозозависимое снижение количества жизнеспособных клеток, определяется по пониженному количеству клеток в поле зрения микроскопа). Масштаб 10 мкм

Для определения причины снижения количества жизнеспособных клеток был проведен анализ пролиферации в первичной культуре *Ptch1*-нокаутных клеток МБ. Клетки МБ были мечены интеркалирующим агентом БрдУ, селективно проникающим в клетки, находящиеся в S-фазе митоза. После 70-часовой выдержки в культуральной среде клетки МБ инкубировали в присутствии БрдУ в течение 2 ч, после чего фиксировали образцы и проводили ИФ-анализ экспрессии БрдУ. Клеточные ядра были окрашены ДАФИ.

Как показано на рис. 3, а и 4, контрольный образец содержал около 23% активно делящихся клеток. Добавление аторвастатина в культуру приводило к снижению количества БрдУ-положительных клеток, а также к снижению общего количества жизнеспособных клеток (рис. 3, б, в). Например, в образце, содержащем 10 нмоль аторвастатина, количество делящихся клеток снижалось до 25%, в то время как в образце, содержащем 50 нмоль аторвастатина, общее количество БрдУ-положительных клеток не превышало 5% (рис. 4).

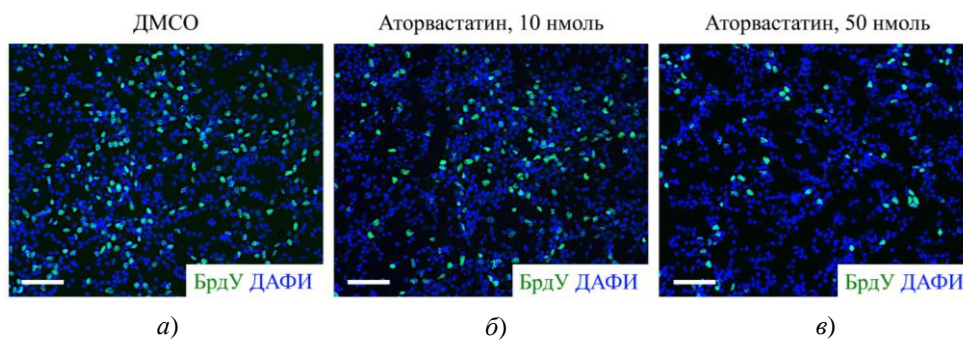


Рис. 3. Оценка уровня пролиферации (БрдУ-положительные клетки) в первичной культуре клеток МБ мыши после 72-часовой инкубации с помощью ИФ-анализа: *a* – контрольный образец (ДМСО), *б* – аторвастатин 10 нмоль, *в* – аторвастатин 50 нмоль. Масштаб 10 мкм

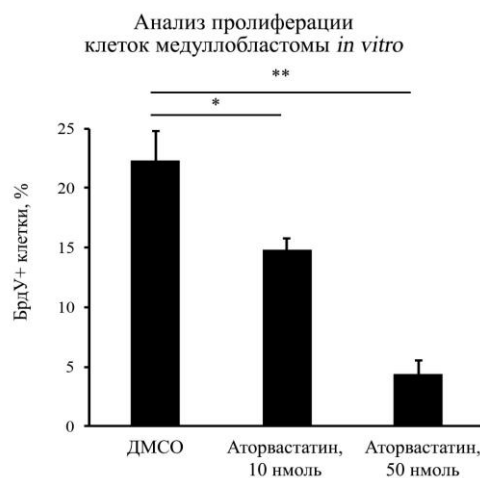


Рис. 4. Количественный анализ пролиферации (БрдУ-положительные клетки, %) в первичной культуре клеток МБ мыши после 72-часовой инкубации. * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.005$

Ранее в литературе [21–23] сообщалось о подавляющем эффекте статинов на пролиферацию клеток МБ *in vitro*, однако авторами были использованы высокие концентрации статинов (5–10 мкмоль), которые приводили к неспецифичному, токсичному эффекту, вызывающему гибель клеток МБ. В экспериментах, проведенных нами, были использованы концентрации статина на порядок ниже, чем в ранее опубликованных исследованиях. Следует отметить, что около 5% клеток продолжали делиться, что указывает на то, что нами были использованы физиологически допустимые концентрации аторвастатина.

В ранее описанных в литературе исследованиях было показано, что первичная культура клеток *Ptch1^{+/-}p53^{-/-}* МБ характеризуется высоким уровнем экспрессии транскрипционного фактора Gli1, являющегося ключевым маркером активации сигнального каскада Shh. Интересно, что высокая экспрессия Gli1 не наблюдалась в тех первичных образцах МБ, которые были помещены в культуру *in vitro* [24]. Для того чтобы проверить, применим ли данный феномен к нашей системе, нами был проведен следующий эксперимент. Первичные клетки МБ из *Ptch1*-нокаутных мышей были помещены в культуру клеток.

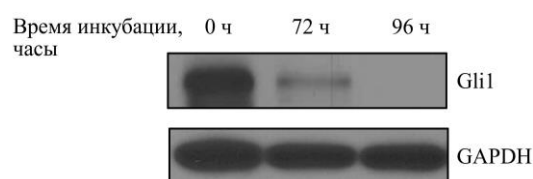


Рис. 5. Анализ экспрессии белка Gli1 в первичной культуре клеток *Ptch1^{+/-}* МБ методом вестерн-блот. Анализ экспрессии белка GAPDH использован в качестве контрольного варианта

После 72-и 96-часовой инкубации клетки МБ были использованы для приготовления клеточных лизатов и дальнейшего анализа экспрессии Gli1 методом вестерн-блот. В качестве контроля нами были использованы свежеприготовленные клетки МБ, которые не были помещены в культуру клеток.

Как показано на рис. 5, свежеприготовленные клетки МБ, как и ожидалось, характеризовались высокой экспрессией белка Gli1. Однако образец клеток МБ, культивированный в течение 72 ч, характеризовался пониженной экспрессией белка Gli1. К 96-му часу инкубации экспрессии Gli1 в образце клеток МБ обнаружено не было. Полученные данные указывают на то, что сигнальный каскад Shh ослабевает в культуре клеток, в то время как его активность в образцах *in vivo* сохраняется. Таким образом, использование моделей культуры МБ *in vitro* обоснованно лишь в пределах 72 ч в культуре с обязательным использованием соответствующих контрольных образцов. Эти данные также свидетельствуют о важности верификации полученных на моделях *in vitro* данных в системе *in vivo*.

2.2. Аторвастатин вызывает апоптоз в клетках медуллобластомы *in vivo*.

Для того чтобы оценить эффект статинов на рост опухолей МБ *in vivo*, нами были использованы подкожные аллотрансплантаты МБ *Ptch1*-нокаутных мышей. Полученные в результате трансплантации опухоли МБ подверглись лечению аторвастатином в дозе 10 и 40 мг/кг/сут в течение 3 недель. По предварительным данным нами было обнаружено, что использование аторвастатина в дозе 40 мг/кг/сут эффективно блокирует рост подкожных аллотрансплантантов медуллобластом.

В настоящей работе нами был проведен ИФ-анализ экспрессии каспазы-3 как маркера апоптоза [25] в полученных тканях МБ. Как показано на рис. 6, *a*, в контрольной ткани количество апоптотических каспаза-3-положительных клеток минимально и равно приблизительно 1% (рис. 7). Было обнаружено, что аторвастатин в дозировке 10 мг/кг/сут приводит к увеличению количества каспаза-3-положительных клеток до 2% (рис. 6, *б* и 7). Доза аторвастатина 40 мг/кг/сут привела к еще большему количеству апоптотических клеток, достигнув показателя 4% (рис. 6, *в* и 7).

Полученные данные свидетельствуют о том, что аторвастатин подавляет выживаемость, пролиферацию и рост МБ, что обусловлено повышением показателя программируемой клеточной гибели. Описанные нами данные указывают на то, что статины, в частности аторвастатин, могут быть использованы для подавления пролиферации и роста клеток МБ типа Shh.

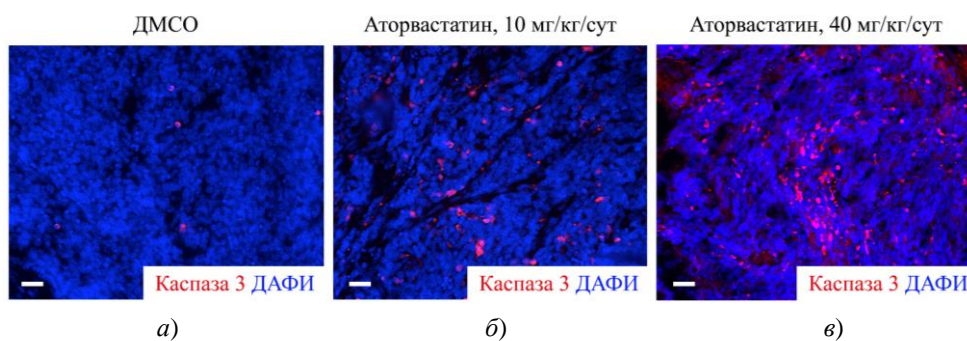


Рис. 6. ИФ-анализ уровня апоптоза (каспаза-3-положительные клетки) в ткани *Ptch1^{+/-}* МБ мыши после 3 недель администрирования аторвастатина: а – контрольный образец (ДМСО), б – аторвастатин 10 мг/кг/сут, в – аторвастатин 40 мг/кг/сут. Масштаб 10 мкм

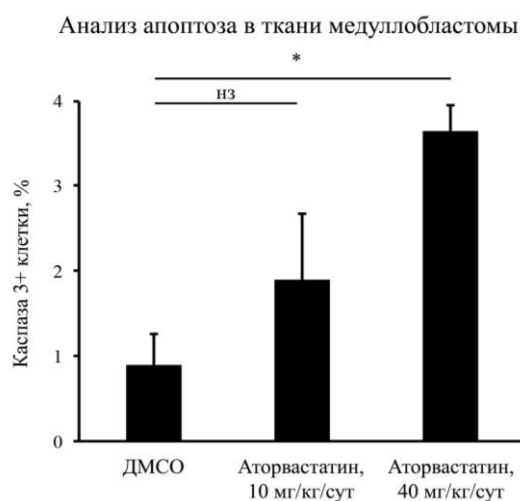


Рис. 7. Количественный анализ уровня апоптоза (каспаза-3-положительные клетки, %) в тканях аллотрансплантата МБ мыши после 3 недель лечения аторвастатином. * – $p < 0.05$, нз – $p > 0.05$

Заклучение

Дисрегуляция сигнального каскада Shh является ведущей причиной онкогенеза медуллобластомы, базальной клеточной карциномы, рабдомиосаркомы, а также сопряжена с патогенезом многих других солидных опухолей [27], поэтому Shh-путь продолжает оставаться привлекательной мишенью для таргетной терапии ряда онкологических заболеваний. К настоящему времени были разработаны и одобрены для применения в клинической практике два аналогичных селективных ингибитора онкопротеина Smo – висмодегиб и сонидегиб. Однако висмодегиб высоко токсичен, он вызывает нарушения развития костной ткани у молодых мышей [28], поэтому данный препарат не был одобрен для лечения медуллобластомы у детей.

В отличие от ингибиторов Smo, статины широко применяются для терапии некоторых детских заболеваний, например при дислипидемии [29]. Учитывая это, следует подчеркнуть, что проведенные нами исследования выявили важное

свойство статинов, в частности, нами показано, что подавление биосинтеза холестерина приводит к снижению пролиферации и усилению апоптоза в клетках МБ типа Shh на моделях *in vitro* и *in vivo*, подчеркивая особую роль холестерина в онкогенезе медуллобластомы.

Поскольку статины хорошо изучены и обладают низкой токсичностью и минимальными побочными эффектами, применение данной группы лекарственных препаратов представляет многообещающий подход для лечения медуллобластомы типа Shh, а также других новообразований, ассоциированных с повышенной активацией каскада Shh.

Благодарности. Работа выполнена при поддержке Программы Правительства Российской Федерации повышения конкурентоспособности Казанского федерального университета.

Литература

1. *Klesse L.J., Bowers D.C.* Childhood medulloblastoma: current status of biology and treatment // *CNS Drugs*. – 2010. – V. 24, No 4. – P. 285–301. – doi: 10.2165/11530140-000000000-00000.
2. *Yang Z.J., Ellis T., Markant S.L., Read T.A., Kessler J.D., Bourbonoulas M., Schuller U., Machold R., Fishell G., Rowitch D.H., Wainwright B.J., Wechsler-Reya R.J.* Medulloblastoma can be initiated by deletion of Patched in lineage-restricted progenitors or stem cells // *Cancer Cell*. – 2008. – V. 14, No 2. – P. 135–145. – doi: 10.1016/j.ccr.2008.07.003.
3. *Packer R.J., Zhou T., Holmes E., Vezina G., Gajjar A.* Survival and secondary tumors in children with medulloblastoma receiving radiotherapy and adjuvant chemotherapy: Results of Children's Oncology Group trial A9961 // *Neuro Oncol*. – 2013. – V. 15, No 1. – P. 97–103. – doi: 10.1093/neuonc/nos267.
4. *Roussel M.F., Robinson G.* Medulloblastoma: advances and challenges // *F1000 Biol Rep*. – 2011. – V. 3, No 5. – P. 1–3. – doi: 10.3410/B3-5.
5. *Taylor M.D., Northcott P.A., Korshunov A., Remke M., Cho Y.J., Clifford S.C., Eberhart C.G., Parsons D.W., Rutkowski S., Gajjar A., Ellison D.W., Lichter P., Gilbertson R.J., Pomeroy S.L., Kool M., Pfister S.M.* Molecular subgroups of medulloblastoma: the current consensus // *Acta Neuropathol*. – 2012. – V. 123, No 4. – P. 465–472. – doi: 10.1007/s00401-011-0922-z.
6. *Gajjar A.J., Robinson G.W.* Medulloblastoma-translating discoveries from the bench to the bedside // *Nat. Rev. Clin. Oncol*. – 2014. – V. 11, No 12. – P. 714–722. – doi: 10.1038/nrclinonc.2014.181.
7. *Marti E., Bovolenta P.* Sonic hedgehog in CNS development: one signal, multiple outputs // *Trends Neurosci*. – 2002. – V. 25, No 2. – P. 89–96.
8. *Hui C.C., Angers S.* Gli proteins in development and disease // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol*. – 2011. – V. 27. – P. 513–537. – doi: 10.1146/annurev-cellbio-092910-154048.
9. *Fuse N., Maiti T., Wang B., Porter J.A., Hall T.M., Leahy D.J., Beachy P.A.* Sonic hedgehog protein signals not as a hydrolytic enzyme but as an apparent ligand for patched // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 1999. – V. 96, No 20. – P. 10992–10999.
10. *Ruiz i Altaba A., Sanchez P., Dahmane N.* Gli and hedgehog in cancer: tumours, embryos and stem cells // *Nat. Rev. Cancer*. – 2002. – V. 2, No 5. – P. 361–372. – doi: 10.1038/nrc796.
11. *Orth M., Bellosta S.* Cholesterol: its regulation and role in central nervous system disorders // *Cholesterol*. – 2012. – V. 2012. – Art. 292598, P. 1–19. – doi: 10.1155/2012/292598.

12. *Riobo N.A.* Cholesterol and its derivatives in Sonic Hedgehog signaling and cancer // *Curr. Opin. Pharmacol.* – 2012. – V. 12, No 6. – P. 736–741. – doi: 10.1016/j.coph.2012.07.002.
13. *Ryan K.E., Chiang C.* Hedgehog secretion and signal transduction in vertebrates // *J. Biol. Chem.* – 2012. – V. 287, No 22. – P. 17905–17913. – doi: 10.1074/jbc.R112.356006.
14. *Byrne E.F.X., Sircar R., Miller P.S., Hedger G., Luchetti G., Nachtergaele S., Tully M.D., Mydock-McGrane L., Covey D.F., Rambo R.P., Sansom M.S.P., Newstead S., Rohatgi R., Siebold C.* Structural basis of Smoothed regulation by its extracellular domains // *Nature.* – 2016. – V. 535, No 7613. – P. 517–522. – doi: 10.1038/nature18934.
15. *Huang P., Nedelcu D., Watanabe M., Jao C., Kim Y., Liu J., Salic A.* Cellular cholesterol directly activates Smoothed in Hedgehog signaling // *Cell.* – 2016. – V. 166, No 5. – P. 1176–1187. – doi: 10.1016/j.cell.2016.08.003.
16. *Luchetti G., Sircar R., Kong J.H., Nachtergaele S., Sagner A., Byrne E.F., Covey D.F., Siebold C., Rohatgi R.* Cholesterol activates the G-protein coupled receptor Smoothed to promote Hedgehog signaling // *eLife.* – 2016. – V. 5. – Art. e20304, P. 1–22. – doi: 10.7554/eLife.20304.
17. *Zhang J., Liu Q.* Cholesterol metabolism and homeostasis in the brain // *Protein Cell.* – 2015. – V. 6, No 4. – P. 254–264. – doi: 10.1007/s13238-014-0131-3.
18. *Dietschy J.M., Turley S.D.* Cholesterol metabolism in the brain // *Curr. Opin. Lipidol.* – 2001. – V. 12, No 2. – P. 105–112.
19. *Goldstein J.L., Brown M.S.* Regulation of the mevalonate pathway // *Nature.* – 1990. – V. 343, No 6257. – P. 425–430. – doi: 10.1038/343425a0.
20. *Collins R., Reith C., Emberson J., Armitage J., Baigent C., Blackwell L., Blumenthal R., Danesh J., Smith G.D., DeMets D., Evans S., Law M., MacMahon S., Martin S., Neal B., Poulter N., Preiss D., Ridker P., Roberts I., Rodgers A., Sandercock P., Schulz K., Sever P., Simes J., Smeeth L., Wald N., Yusuf S., Peto R.* Interpretation of the evidence for the efficacy and safety of statin therapy // *Lancet.* – 2016. – V. 388, No 10059. – P. 2532–2561. – doi: 10.1016/S0140-6736(16)31357-5.
21. *Dimitroulakos J., Ye L.Y., Benzaquen M., Moore M.J., Kamel-Reid S., Freedman M.H., Yeager H., Penn L.Z.* Differential sensitivity of various pediatric cancers and squamous cell carcinomas to lovastatin-induced apoptosis: Therapeutic implications // *Clin. Cancer Res.* – 2001. – V. 7, No 1. – P. 158–167.
22. *Macaulay R.J., Wang W., Dimitroulakos J., Becker L.E., Yeager H.* Lovastatin-induced apoptosis of human medulloblastoma cell lines in vitro // *J. Neurooncol.* – 1999. – V. 42, No 1. – P. 1–11.
23. *Wang W., Macaulay R.J.* Mevalonate prevents lovastatin-induced apoptosis in medulloblastoma cell lines // *Can. J. Neurol. Sci.* – 1999. – V. 26, No 4. – P. 305–310.
24. *Sasai K., Romer J.T., Lee Y., Finkelstein D., Fuller C., McKinnon P.J., Curran T.* Shh pathway activity is down-regulated in cultured medulloblastoma cells: implications for preclinical studies // *Cancer Res.* – 2006. – V. 66, No 8. – P. 4215–4222. – doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-4505.
25. *Gage G.J., Kipke D.R., Shain W.* Whole animal perfusion fixation for rodents // *J. Visualized Exp.* – 2012. – V. 65. – Art. e3564, P. 1–9. – doi: 10.3791/3564.
26. *Porter A.G., Janicke R.U.* Emerging roles of caspase-3 in apoptosis // *Cell Death Differ.* – 1999. – V. 6, No 2. – P. 99–104. – doi: 10.1038/sj.cdd.4400476.

Гордон Рената Эмилевна, аспирант кафедры биохимии и биотехнологии; аспирант

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
Онкологический центр Фокс Чейз
Коттман авеню, 333, г. Филадельфия, 19111, США
E-mail: renata.e.gordon@gmail.com

Абрамова Зинаида Ивановна, доктор биологических наук, профессор кафедры биохимии и биотехнологии

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: ziabramova@mail.ru

ISSN 2542-064X (Print)
ISSN 2500-218X (Online)

UCHENYE ZAPISKI KAZANSKOGO UNIVERSITETA. SERIYA ESTESTVENNYE NAUKI
(Proceedings of Kazan University. Natural Sciences Series)

2017, vol. 159, no. 4, pp. 550–563

Atorvastatin Blocks Sonic Hedgehog Medulloblastoma Progression through Apoptosis

R.E. Gordon^{a,b*}, Z.I. Abramova^{a**}

^aKazan Federal University, Kazan, 420008 Russia

^bFox Chase Cancer Center, Philadelphia, 19111 USA

E-mail: ^{*}renata.e.gordon@gmail.com, ^{**}ziabramova@mail.ru

Received July 25, 2017

Abstract

Aberrant activation of Sonic Hedgehog signaling transduction leads to formation of numerous malignancies, including medulloblastoma (MB) – the most common malignant pediatric tumor. Earlier, we have shown that endogenous cholesterol acts as a direct activator of the Sonic Hedgehog signaling and is a promising target for treating MB. Histochemical analysis of the effect of atorvastatin, which is widely used in clinical practice as a cholesterol biosynthesis inhibitor, revealed a high level of cell death in the tumor tissue via apoptosis. These data show the potential of using statins for the targeted therapy of medulloblastoma, as well as other Sonic Hedgehog-driven malignancies.

Keywords: medulloblastoma, Sonic Hedgehog, statins, atorvastatin, cholesterol, apoptosis

Acknowledgments. The study was supported by the Russian Government Program of Competitive Growth of Kazan Federal University.

Figure Captions

Fig. 1. The scheme of Shh signal transduction in the cell.

Fig. 2. The primary cell culture of mouse MB cells after 72-h incubation: *a* – control sample (DMSO), *b* – atorvastatin (10 nmol), *c* – atorvastatin (50 nmol). (dose-dependent decrease in the number of viable cells, identified by the low number of cells per visual field). Scale: 10 μ m.

Fig. 3. The assessment of the proliferation level (BrdU-positive cells) in the primary mouse MB cell culture after 72-h incubation using IF-analysis: *a* – control sample (DMSO), *b* – atorvastatin (10 nmol), *c* – atorvastatin (50 nmol). Scale: 10 μ m.

Fig. 4. The quantitative analysis of proliferation (BrdU-positive cells, %) in the primary mouse MB cell culture after 72-h incubation. * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.005$.

Fig. 5. The analysis of Gli1 protein expression in the primary culture of *Ptch1*^{+/-} MB cell culture by Western blotting. GAPDH protein analysis was used as a control variant.

Fig. 6. The IF-analysis of apoptosis level (caspase3-positive cells) in the tissue of *Ptch1*^{+/-} MB mice after three weeks of atorvastatin administration: *a* – control sample (DMSO), *b* – atorvastatin (10 mg/kg/day), *c* – atorvastatin (40 mg/kg/day). Scale: 10 μ m.

Fig. 7. The quantitative analysis of apoptosis level (caspase3-positive cells, %) in mouse MB allograft tissues after three weeks of treatment with atorvastatin. * – $p < 0.05$, ns – $p > 0.05$.

References

1. Klesse L.J., Bowers D.C. Childhood medulloblastoma: Current status of biology and treatment. *CNS Drugs*, 2010, vol. 24, no. 4, pp 285–301. doi: 10.2165/11530140-000000000-00000.
2. Yang Z.J., Ellis T., Markant S.L., Read T.A., Kessler J.D., Bourbonlous M., Schuller U., Machold R., Fishell G., Rowitch D.H., Wainwright B.J., Wechsler-Reya R.J. Medulloblastoma can be initiated by deletion of Patched in lineage-restricted progenitors or stem cells. *Cancer Cell*, 2008, vol. 14, no. 2, pp. 135–145. doi: 10.1016/j.ccr.2008.07.003.
3. Packer R.J., Zhou T., Holmes E., Vezina G., Gajjar A. Survival and secondary tumors in children with medulloblastoma receiving radiotherapy and adjuvant chemotherapy: Results of Children's Oncology Group trial A9961. *Neuro Oncol.*, 2013, vol. 15, no. 1, pp. 97–103. doi: 10.1093/neuonc/nos267.
4. Roussel M.F., Robinson G. Medulloblastoma: Advances and challenges. *F1000 Biol. Rep.*, 2011, vol. 3, no. 5, pp. 1–3. doi: 10.3410/B3-5.
5. Taylor M.D., Northcott P.A., Korshunov A., Remke M., Cho Y.J., Clifford S.C., Eberhart C.G., Parsons D.W., Rutkowski S., Gajjar A., Ellison D.W., Lichter P., Gilbertson R.J., Pomeroy S.L., Kool M., Pfister S.M. Molecular subgroups of medulloblastoma: The current consensus. *Acta Neuropathol.*, 2012, vol. 123, no. 4, pp. 465–472. doi: 10.1007/s00401-011-0922-z.
6. Gajjar A.J., Robinson G.W. Medulloblastoma-translating discoveries from the bench to the bedside. *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, 2014, vol. 11, no. 12, pp. 714–722. doi: 10.1038/nrclinonc.2014.181.
7. Marti E., Bovolenta P. Sonic hedgehog in CNS development: One signal, multiple outputs. *Trends Neurosci.*, 2002, vol. 25, no. 2, pp. 89–96.
8. Hui C.C., Angers S. Gli proteins in development and disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 2011, vol. 27, pp. 513–537. doi: 10.1146/annurev-cellbio-092910-154048.
9. Fuse N., Maiti T., Wang B., Porter J.A., Hall T.M., Leahy D.J., Beachy P.A. Sonic hedgehog protein signals not as a hydrolytic enzyme but as an apparent ligand for patched. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1999, vol. 96, no. 20, pp. 10992–10999.
10. Ruiz i Altaba A., Sanchez P., Dahmane N. Gli and hedgehog in cancer: tumours, embryos and stem cells. *Nat. Rev. Cancer*, 2002, vol. 2, no. 5, pp. 361–372. doi: 10.1038/nrc796.
11. Orth M., Bellosta S. Cholesterol: Its regulation and role in central nervous system disorders. *Cholesterol*, 2012, vol. 2012, art. 292598, pp. 1–19. doi: 10.1155/2012/292598.
12. Riobo N.A. Cholesterol and its derivatives in Sonic Hedgehog signaling and cancer. *Curr. Opin. Pharmacol.*, 2012, vol. 12, no. 6, pp. 736–741. doi: 10.1016/j.coph.2012.07.002.
13. Ryan K.E., Chiang C. Hedgehog secretion and signal transduction in vertebrates. *J. Biol. Chem.*, 2012, vol. 287, no. 22, pp. 17905–17913. doi: 10.1074/jbc.R112.356006.
14. Byrne E.F.X., Sircar R., Miller P.S., Hedger G., Luchetti G., Nachtergaele S., Tully M.D., Mydock-McGrane L., Covey D.F., Rambo R.P., Sansom M.S.P., Newstead S., Rohatgi R., Siebold C. Structural basis of Smoothened regulation by its extracellular domains. *Nature*, 2016, vol. 535, no. 7613, pp. 517–522. doi: 10.1038/nature18934.
15. Huang P., Nedelcu D., Watanabe M., Jao C., Kim Y., Liu J., Salic A. Cellular cholesterol directly activates Smoothened in Hedgehog signaling. *Cell*, 2016, vol. 166, no. 5, pp. 1176–1187. doi: 10.1016/j.cell.2016.08.003.
16. Luchetti G., Sircar R., Kong J.H., Nachtergaele S., Sagner A., Byrne E.F., Covey D.F., Siebold C., Rohatgi R. Cholesterol activates the G-protein coupled receptor Smoothened to promote Hedgehog signaling. *eLife*, 2016, vol. 5, art. e20304, pp. 1–22. doi: 10.7554/eLife.20304.
17. Zhang J., Liu Q. Cholesterol metabolism and homeostasis in the brain. *Protein Cell*, 2015, vol. 6, no. 4, pp. 254–264. doi: 10.1007/s13238-014-0131-3.

18. Dietschy J.M., Turley S.D. Cholesterol metabolism in the brain. *Curr. Opin. Lipidol.*, 2001, vol. 12, no. 2, pp. 105–112.
19. Goldstein J.L., Brown M.S. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature*, 1990, vol. 343, no. 6257, pp. 425–430. doi: 10.1038/343425a0.
20. Collins R., Reith C., Emberson J., Armitage J., Baigent C., Blackwell L., Blumenthal R., Danesh J., Smith G.D., DeMets D., Evans S., Law M., MacMahon S., Martin S., Neal B., Poulter N., Preiss D., Ridker P., Roberts I., Rodgers A., Sandercock P., Schulz K., Sever P., Simes J., Smeeth L., Wald N., Yusuf S., Peto R. Interpretation of the evidence for the efficacy and safety of statin therapy. *Lancet*, 2016, vol. 388, no. 10059, pp. 2532–2561. doi: 10.1016/S0140-6736(16)31357-5.
21. Dimitroulakos J., Ye L.Y., Benzaquen M., Moore M.J., Kamel-Reid S., Freedman M.H., Yeger H., Penn L.Z. Differential sensitivity of various pediatric cancers and squamous cell carcinomas to lovastatin-induced apoptosis: Therapeutic implications. *Clin. Cancer Res.*, 2001, vol. 7, no. 1, pp. 158–167.
22. Macaulay R.J., Wang W., Dimitroulakos J., Becker L.E., Yeger H. Lovastatin-induced apoptosis of human medulloblastoma cell lines in vitro. *J. Neurooncol.*, 1999, vol. 42, no. 1, pp. 1–11.
23. Wang W., Macaulay R.J. Mevalonate prevents lovastatin-induced apoptosis in medulloblastoma cell lines. *Can. J. Neurol. Sci.*, 1999, vol. 26, no. 4, pp. 305–310.
24. Sasai K., Romer J.T., Lee Y., Finkelstein D., Fuller C., McKinnon P.J., Curran T. Shh pathway activity is down-regulated in cultured medulloblastoma cells: Implications for preclinical studies. *Cancer Res.*, 2006, vol. 66, no. 8, pp. 4215–4222. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-4505.
25. Gage G.J., Kipke D.R., Shain W. Whole animal perfusion fixation for rodents. *J. Visualized Exp.*, 2012, vol. 65, art. e3564, pp. 1–9. doi: 10.3791/3564.
26. Porter A.G., Janicke R.U. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ.*, 1999, vol. 6, no. 2, pp. 99–104. doi: 10.1038/sj.cdd.4400476.

Для цитирования: Гордон Р.Э., Абрамова З.И. Аторвастатин блокирует рост медуллобластомы типа Sonic Hedgehog путем апоптоза // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. – 2017. – Т. 159, кн. 4. – С. 550–563.

For citation: Gordon R.E., Abramova Z.I. Atorvastatin blocks Sonic Hedgehog medulloblastoma progression through apoptosis. *Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennye Nauki*, 2017, vol. 159, no. 4, pp. 550–563. (In Russian)