

УДК 616.831-006:615.015-08:615.28

©Л.А.Шапошник<sup>1</sup>, І.Г.Васильєва<sup>2</sup>, О.Я.Главацький<sup>2</sup>, О.В.Маркова<sup>2</sup>, І.М.Шуба<sup>2</sup>,  
В.В.Лило<sup>1</sup>, О.О.Півень<sup>1</sup>

## ВИЗНАЧЕННЯ РІВНЯ ЕКСПРЕСІЇ РЕПАРАТИВНОГО ЕНЗИМУ O<sup>6</sup>-АЛКІЛГУАНІН-ДНК АЛКІЛТРАНСФЕРАЗИ У ПУХЛИНАХ ГОЛОВНОГО МОЗКУ ЛЮДИНИ З МЕТОЮ ПОДАЛЬШОЇ ОПТИМІЗАЦІЇ ХІМІОТЕРАПІЇ

<sup>1</sup>ДУ „Інститут молекулярної біології і генетики НАН України”, Київ, Україна<sup>2</sup>ДУ „Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П.Ромоданова АМН України”, Київ, Україна

**Реферат.** Алкілюючі сполуки мають важливе значення для лікування пухлин мозку. Вони стимулюють утворення Об-метилгуаніну, який викликає подвійні розриви ДНК та індукують апоптоз. O<sup>6</sup>-алкілгуанін-ДНК алкілтрансфераза (АГТ або MGMT) відновлює ці пошкодження. Тому рівень експресії АГТ у пухлинних клітинах впливає на їх чутливість до алкілюючих хіміопрепаратів. Рівень АГТ коливається в широких межах у різних типах пухлин та у різних пухлинах одного типу. Метою цієї роботи було дослідження особливостей експресії АГТ у пухлинних (гліома) клітинах. Аналіз експресії АГТ на рівні білка ми проводили методом Вестерн блот аналізу. Зразки пухлин взяті від хворих, що лікувалися в ДУ „Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П.Ромоданова АМН України”, 7 із 16 пухлин мали обидві форми ензиму (стандартна – 24 кДа та «важка» – 50 кДа), 7 – тільки «важку». 1 пухлина мала тільки стандартну форму і 1 не мала АГТ взагалі.

**Ключові слова:** гліоми, алкілюючі хіміопрепарати, АГТ, MGMT.

**Вступ.** Лікування хворих на пухлини головного мозку лишається невирішеною проблемою. Комбіноване лікування пухлин (із застосуванням хіміотерапії) є найбільш доцільним, але подовження тривалості життя має місце лише у частини пацієнтів. Для хіміотерапії деяких форм пухлин широко використовуються алкілюючі агенти, на жаль їх застосування не завжди є ефективним. Однією з причин низької ефективності такого лікування може бути високий рівень ферментів, які забезпечують відновлення (репарацію) ДНК після впливу хіміотерапевтичних агентів.

Дослідження репарації ДНК є надзвичайно актуальними як з точки зору фундаментальної біології, так і з точки зору прикладної медицини. У поновленні ушкоджень ДНК, котрі викликані алкілюючими сполуками в Об-позиції гуаніну, вирішальну роль відіграє репаративний фермент O<sup>6</sup>-алкілгуанін-ДНК алкілтрансфераза (алкілтрансфераза, АГТ або MGMT), який експресують практично всі типи людських клітин [1]. Рівень експресії АГТ є різним у різних тканинах одного й того ж організму. АГТ відіграє дуже важливу, але суперечливу роль при онкологічних хворобах. Позитивне значення трансферази

при профілактиці онкозахворювань змінюється на протилежне при їх лікуванні. Високий рівень експресії ферменту АГТ захищає ракову клітину від несумісних з життям мутагенних ушкоджень ДНК, спричинених хіміотерапією. У пухлинах людини найвищий рівень активності АГТ виявлено у пухлинах прямої кишки, меланомах, панкреатичній карциномі та гліальних пухлинах мозку.

**Мета роботи:** дослідити особливості експресії гена репаративного ферменту O<sup>6</sup>-алкілгуанін-ДНК алкілтрансферази (алкілтрансфераза, АГТ або MGMT) у пухлинах головного мозку хворих для оптимізації хіміотерапії та поліпшення стану пацієнта після проведення лікування.

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Матеріалом досліджень були біоптати пухлин 17 хворих, прооперованих з приводу гліом головного мозку супратенторіальної локалізації. Ступінь анаплазії гліом визначений згідно з сучасною класифікацією на основі гістологічних досліджень біоптатів: гліобластома – 10 спостережень, анапластична астроцитом – 2 спостереження, анапластична олігодендрогліома – 2 спостереження,

астроцитомі фібрілярно-протоплазматична – 1 спостереження, гліосаркома – 1 спостереження, кавернозна ангиома – 1 спостереження). Хворі, віком до 50 років, склали 8 спостережень, після 50 років – 6 спостережень. Співвідношення чоловіків і жінок було 8 : 6.

Білок зі зразків виділявся згідно з протоколом [2]. Концентрацію загального білка у клітинному екстракті вимірювали за методом Бредфорд [3]. SDS-електрофорез білків проводили у 12% поліакриламідному гелі за Леммлі [4]. Ідентифікацію MGMT у клітинному екстракті проводили за допомогою Вестерн блот аналізу. Для цього використовували моноклональні антитіла проти MGMT виробництва «Novus Biologicals Littleton, Co» (США). За вторинні використовували видоспецифічні кон'юговані з пероксидазою хрому антитіла виробництва «Jackson ImmunoResearch» (США). Ідентифікацію MGMT проводили за рекомендацією фірми-виробника [5].

Дослідження *in vitro* чутливості до препарату фотемустин проводили на ізольованих клітинах пухлин. Виділення клітин проводили згідно з протоколом [6], дослідження впливу препарату мюстофоран (фотемустин) проводили *in vitro* [7]. Препарат вносили у кількості згідно з рекомендованими дозами, враховуючи коефіцієнт 1,7 м<sup>2</sup> площі поверхні тіла при вазі 70 кг. В інкубаційне середовище вносили 1,4 мкг препарату на 10<sup>7</sup> кл/мл, що відповідає інструкції для медичного застосування препарату. Чутливість клітин до дії препарату оцінювали як кількість живих клітин після 24-48 годин інкубації у досліді відносно контролю у відсотках.

Цитотоксичну дію фотемустину оцінювали, порівнюючи кількість живих клітин у контролі (застосування поживного середовища без додавання фотемустину) та досліді (застосування поживного середовища з додаванням різних доз фотемустину). Високу кількість мертвих та гинучих клітин усували методом згідно з протоколом [8]. Дослідження передбачало застосування таких доз фотемустину: 0,1μM; 1,0μM; 1,7μM; 15μM. Після завершення інкубації за допомогою вітального барвника (0,2% розчину трипанового синього) визначали як загальну кількість клітин у пробі, так і питому вагу життєздатних клітин у контрольних та дослідних пробах. Цитотоксичний індекс розраховували згідно з Лісяним М.І.

та співав. (2011) [9]. Додатково порівнювали кількість живих клітин у контролі (застосування поживного середовища без додавання фотемустину) та досліді (застосування поживного середовища з додаванням різних доз фотемустину) за допомогою МТТ-реактиву згідно з протоколом Лісяного М.І. та співав. (2011). Цитотоксичну активність фотемустину рахували за формулою [9]. Цитотоксичною дією вважали спостереження, де цитотоксична активність була ≥ 50%.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Проведено дослідження експресії гена MGMT на рівні білка у тканині біоптатів пухлин хворих, прооперованих з приводу гліом. Проаналізовано результати досліджень 15 зразків пухлин. Встановлено існування легкої та важкої форм MGMT у тканинах хворих на гліоми. Серед зразків біоптатів злоякісних гліом переважали зразки з важкою формою (7 спостережень) та обома формами MGMT (7 спостережень). Один зразок мав лише легку форму білка та ще один – жодної. Отримані результати свідчать на користь того, що різні тканини однієї людини різняться за ступенем експресії гена MGMT на рівні білка так само, як однакові тканини різних осіб.

Чутливість клітин до фотемустину визначена у 15 зразках пухлинної тканини. За присутності двох форм ензиму MGMT незначна чутливість спостерігалася лише в одному з двох випадків. В умовах відсутності стандартної форми білка MGMT у двох із 5 випадків нами зафіксовано збільшення чутливості щодо дії фотемустину.

Дослідження *in vitro* цитотоксичної дії препарату фотемустин на клітини пухлин проведені у зразках біоптатів 13 хворих. У 2 випадках отримати клітинну суспензію з біоптату не вдалося, бо фрагмент складався з щільної тканини, яка різалася ножицями, але не переходила у клітинну суспензію. Цитотоксична дія фотемустину виявлена у 6-и з 13-ти хворих (з них у 2-х хворих – обома методами). Морфологічний тест (за допомогою трипанового синього) визначення чутливості клітин гліом головного мозку до цитотоксичної дії фотемустину був більш показовим, у порівнянні з МТТ-тестом.

Комбіноване лікування хворих на злоякісні гліоми головного мозку є на сьогодні найбільш ефективним [10]. Вважають, що зараз людство

## ЛІТЕРАТУРА

переживає еру алкілюючих протипухлинних хіміопрепаратів. 2-річне виживання хворих на мультиформні гліобластоми при лікуванні темозоломідом спостерігається у 17% хворих, а у хворих, віком 20-44 років, тривалість життя 24 місяці має місце у 39% хворих. Такі результати викликають підвищену увагу до досліджень саме у цьому напрямку.

Для дослідження були використані сучасні методи. Це дозволило виявити присутність двох форм репаративного ензиму АГТ на рівні білка (методом Вестерн блот аналізу) у біоптатах пухлин головного мозку. Показано, що серед злякисних гліом переважали зразки з важкою формою ферменту (7 спост.) та обома (7 спост.) формами ферменту. Один зразок мав лише легку форму та ще один – жодної.

Отримані результати ми розглядаємо як попередні, але можемо стверджувати, що дуже перспективними є наукові дані про присутність двох форм репаративного ензиму АГТ, виявлені методом Вестерн блот аналізу у біоптатах пухлин головного мозку. Проведені дослідження дозволяють підвищити точність визначення чутливості до цитотоксичної дії антибластичних хіміопрепаратів клітин злякисних гліом головного мозку *in vitro* при короткостроковому культивуванні.

Подальший розвиток цього напрямку може стати дуже продуктивним як у теоретичному, так і прикладному сенсі. Проведення цих досліджень дозволить визначити нові критерії, які можуть бути використані для прогнозування ефективності лікування хворих з пухлинами головного мозку протипухлинними препаратами з алкілюючим механізмом дії, краще зрозуміти природу злякисних пухлин.

**ВИСНОВКИ:**

Досліджені пухлини різняться за наявності стандартної (24 кДа) та „важкої” (50 кДа) форм ензиму MGMT.

Урахування рівня експресії гена репаративного ферменту АГТ у пухлині головного мозку дозволить розробити методи індивідуального підбору алкілюючих цитостатиків у хворих із злякисними гліомами, тобто запропонувати для використання найбільш оптимальний варіант диференційованого лікування в кожному конкретному випадку.

1. Fabarius A., Nehlmann R., Duesberg P.H. Instability of chromosome structure in cancer cells increases exponentially with degree of aneuploidy // Cancer Genet.Cytogenet. - 2003. - Vol. 143, № 1. - P. 59-72.

2. Шапошник Л. А., Лыло В. В., Лукаш Л. Л. Некоторые особенности белкового спектра нормальных и опухолевых клеток человека // Фактори експериментальної еволюції організмів. – 2011. - Т. 11. – С. 554-557.

3. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein-dye binding // Anal. Biochim. – m1976. – 72, N 1-2. – P. 248-254. <http://www.novusbio.com/support/protocols/protocol-specific-for-mgmt-antibody-nb100-168.html>.

4. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4 // Nature. – 1970 – 227, N 5259. – P. 680-685.

5. Культура животных клеток. Методы. Под ред. Фрешни Р. – М.: Мир. – 1989. – 302 с.

6. Божкова В.П., Брежестовский Л.А., Буравлев В.М. и др. Руководство по культивированию нервной ткани. – М. – Наука. – 1988. – 315 с.

7. Маркова О.В. Состояние естественной киллерной активности у больных с опухолями головного мозга // Дисс. На соиск.... канд.мед.н., Киев. – 1990. – 225 с.

8. Лісяний М.І., Бельська Л.М., Ключникова А.І. Імуномодулююча та протипухлинна дія препаратів чистотілу на пухлини головного мозку // Укр. Нейрохірург. Журн. – 2011. – № 1. – С.19-24.

9. Главацький О.Я. Диференційоване лікування гліом супратенторіальної локалізації та прогнозування його результатів. Автореферат дисертації на здобуття наукового ступеня доктора медичних наук. Київ. – 2001. – 476 с.

*Л.А.Шапошник<sup>1</sup>, И.Г.Васильева<sup>2</sup>,  
О.Я.Главацкий<sup>2</sup>, О.В.Маркова<sup>2</sup>,  
И.М.Шуба<sup>2</sup>, В.В.Лило<sup>1</sup>, О.О.Пивень<sup>1</sup>*

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ УРОВНЯ  
ЭКСПРЕССИИ РЕПАРАТИВНОГО  
ЭНЗИМА O<sup>6</sup>-АЛКИЛГУАНИН-  
ДНК АЛКИЛТРАНСФЕРАЗЫ В  
ОПУХОЛЯХ ГОЛОВНОГО МОЗГА  
ЧЕЛОВЕКА С ЦЕЛЬЮ ДАЛЬНЕЙШЕЙ  
ОПТИМИЗАЦИИ ХИМИОТЕРАПИИ**

<sup>1</sup>ГУ „Институт молекулярной биологии и

генетики НАН України”, Киев, Украина  
<sup>2</sup>ГУ „Институт нейрохирургии им. акад.  
А.П.Ромоданова АМН Украины”, Киев,  
Украина

**Реферат.** Алкилирующие вещества важны для лечения опухолей мозга. Они стимулируют образование Об-метилгуанина, который вызывает поперечные разрывы ДНК и индуцирует апоптоз. O<sup>6</sup>-алкилгуанин-ДНК алкилтрансфераза (АГТ або MGMT) восстанавливает эти повреждения. Поэтому, уровень экспрессии АГТ в опухолевых клетках влияет на их чувствительность к алкилирующим химиопрепаратам. Уровень АГТ варьирует в широких пределах в разных типах опухолей и в разных опухолях одного типа. Целью данной работы было исследование особенностей экспрессии АГТ в опухолевых (глиома) клетках. Анализ экспрессии АГТ на уровне белка мы проводили методом Вестерн блот анализа. Образцы опухолей взяты у больных, проходивших лечение в Институте нейрохирургии НАМН Украины. 7 из 15 опухолей имели обе формы энзима (стандартная – 24 кДа и «тяжелая» – 50 кДа), 7 – только «тяжелую». 1 опухоль имела только стандартную форму и 1 не имела АГТ вообще.

**Ключевые слова:** глиомы, алкилирующие химиопрепараты, АГТ, MGMT.

*L.A. Shaposhnik<sup>1</sup>, I.G. Vasilieva<sup>2</sup>, O.Y. Glavatskiy<sup>2</sup>, O.V. Markova<sup>2</sup>, I.M. Schuba<sup>2</sup>, V.V. Lilo<sup>1</sup>, O.O. Piven<sup>1</sup>*

**DETERMINE THE LEVEL OF  
EXPRESSION OF REPARATION  
ENZYME O<sup>6</sup>-ALKYLGUANINE-DNA  
ALKYLTRANSFERASE IN HUMAN  
BRAIN TUMORS FOR FURTHER  
OPTIMIZATION OF CHEMOTHERAPY**

<sup>1</sup> *G.E. „Institute of Molecular Biology*

*and Genetics NAS of Ukraine”, Kiev,  
Ukraine*

<sup>2</sup> *G.E. „Institute Neurohyrurhyy  
named acad. A.P. Romodanova NAS of  
Ukraine”, Kiev, Ukraine*

**Abstract.** Alkylating drugs are impotent for the treatment of brain tumors. They form persistent O<sup>6</sup>-methylguanine adducts, which causes DNA double-strand breaks and induction of apoptosis. O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) removes methylation lesions. Therefore, MGMT expression in tumor cells results in resistance to chemotherapeutic alkylating agents. The level of MGMT varies widely according to the type of tumor and different tumors of the same types. The objective of this project is to research the peculiarity of MGMT expression in cancer (glioma) and normal (leukocytes) human cells. We analyzed the MGMT expression in malignant glioma tissues and leukocytes of peripheral blood by Western blotting. The gliomas and blood were obtained from patients who had treated in the Institute of Neurosurgery. 7 of 15 tumors had regular (24 kDa) and “heavy” (50 kDa) forms of MGMT in glioma tissues, 7 patients had only “heavy” (50 kDa) form. These samples had high level of total MGMT. We didn't detected MGMT in tumor of one patient and detected only regular (24 kDa) form in one tumor.

**Key words:** glioma, alkylating agents, DNA, MGMT.