

І.Г. Васильєва
О.Я. Главацький
Н.Г. Чопик
Н.П. Олексенко
О.С. Галанта
О.І. Цюбка

ФАКТОРИ ХІМІОРЕЗИСТЕНТНОСТІ ГЛІОМ ГОЛОВНОГО МОЗКУ

Резюме. Проведено дослідження генотипів глутатіонтрансфераз класів м'яо та тета, рівня експресії генів *MDR1*, *MRP*, *LRP*, *GSTP1*, *MGMT* з використанням методу ПЛР, а також здійснена оцінка життєздатності пухлинних клітин гліом головного мозку на основі підрахунку кількості живих клітин у короткостроковій культурі. Отримані результати вказують на зростання рівня експресії досліджуваних генів у гліальних пухлинах з високим ступенем анаплазії порівняно з низькозлоякісними гліомами, а саме: генів *MDR1*, *MRP*, *LRP* та *GST-P* — в анапластичних астроцитомах, гена *MGMT* — в гліобластомах. Застосування ряду хіміопрепаратів для дослідження життєздатності клітин пухлин головного мозку на основі підрахунку кількості живих клітин у короткостроковій культурі встановило більш високу чутливість низькозлоякісних пухлин до хіміопрепаратів порівняно з високозлоякісними, хоча, резистентні та чутливі зразки виявлені в усіх досліджених групах. Таким чином, ефективність застосування хіміотерапії при лікуванні гліом головного мозку залежить від детального урахування всіх можливих механізмів резистентності індивідуально для кожного пацієнта.

ДУ «Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України», Київ, Україна

Ключові слова: хіміотерапія, хіміорезистентність, гліоми, генотипування, експресія генів.

Додатково до таких традиційних прийомів, як хірургічне втручання та радіотерапія, хіміотерапія (ХТ) є важливим методом у лікуванні злоякісних пухлин головного мозку. Загибель пухлинної клітини під дією протипухлинних препаратів контролюється її певними регуляторними системами. У зв'язку з цим рівень експресії того чи іншого гена може бути визначальним у формуванні чутливості пухлинної клітини до ушкоджуючого агента. Феномен клітинної резистентності до хіміопрепаратів включає: зміни транспорту препарату через плазматичну мембрану, що призводить до зменшення накопичення цитостатика у клітині (здіяні АТФ-залежні транспортні білки: Р-глікопротеїд (Р-gp, Р-170) — продукт гена *MDR1*; протеїн із молекулярною масою 190 кД, асоційований із множинною стійкістю до ліків — продукт гена *MRP*; а також білок із молекулярною масою 11 кД, асоційований з множинною стійкістю до ліків пухлин легені (*LRP*); підвищену активність детоксуючих систем (зокрема ферменти глутатіонтрансферази *GST*); посилену репарацію ДНК (ензим репарації O^6 -метилгуанін-ДНК-метилтрансфераза (*MGMT*)); зміни рівня експресії генів апоптозу та інше. Щодо перелічених чинників, то показано не лише їх наявність в пухлинах мозку, але й залежність резистентності цих пухлин до хіміопрепаратів та клінічного результату від рівня експресії відповідних генів [1–6].

Таким чином, численні дані про механізми формування стійкості пухлинних клітин до ліків свідчать про складність та багатогранність цієї проблеми. Враховуючи це, ми вважали за доцільне вивчити стан основних факторів хіміорезистентності в гліомах головного мозку (ГГМ) (рівень експресії

генів *MDR1*, *MRP*, *LRP*, *GST-P1*, *MGMT*, а також генотипи *GSTM1*, *GSTT1*) та оцінити ефективність застосування хіміопрепаратів у терапії гліом на основі підрахунку життєздатності пухлинних клітин з метою вдосконалення лікування хворих з даною патологією.

ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Тканину пухлини (81 зразок: 10 астроцитом фібрилярно-протоплазматичних (АФП), 21 астроцитом анапластична (АА), 39 гліобластом (ГБ), 11 олигодендроастроцитом анапластичних (ОДА)) безпосередньо після видалення заморожували у рідкому азоті і у такому вигляді зберігали до моменту дослідження.

Геномну ДНК виділяли зі зразків пухлин із використанням наборів «ДНК-сорб В» («Амплісенс», Росія). Екстракцію РНК здійснювали фенольною обробкою гомогенату в присутності детергентів та інгібіторів нуклеаз [7]. Розчиняли нуклеїнові кислоти у воді або буфері і зберігали за температури 70 °С. Вихід та чистоту препарату РНК оцінювали за поглинанням проби при 260 та 280 нм.

кДНК синтезували з використанням 1–2 мкг РНК та 100 нг олиго(дТ)_{12–18}, а також 200 од M-Mlv зворотної транскриптази (рекомбінантної). 5–10 мкл кДНК використовували в реакції ампліфікації.

Генотипування *GSTM1* та *GSTT1* здійснювали шляхом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з використанням праймерів (5'-GAGATGAAGTCCTTCAGA-3' та 5'-GCTTCACGTGTTATGGAGGTT-3') для *GSTM1*, (5'-ATGTGACCCTGCAGTTGC-3' та 5'-GAGATGTGAGCACCAGTAAGGAA-3') для *GSTT1* [8]. 40 циклів ампліфікації було здійснено за температури відпалу 58 °С. Візуалізація продуктів (151 п.н. для *GSTM1* та 70 п.н. для *GSTT1*) проводилася за допо-

могою електрофорезу в 2% агарозному гелі. Відсутність амплікону свідчила про делецію досліджуваного гена.

ПЛР-реакція зі зворотною транскрипцією для визначення експресії *MDR1* була виконана з використанням праймерів 5'-CCCATCATTGCAATAGCAGG-3' та 5'-GTTCAAACCTTCTGCTCCTGA-3' [9], для *MRP* — 5'-TGGGACTGGAATGTCACG-3' та 5'-AGGAATATGCCCGACTTC-3', *LRP* — 5'-GTCTTCGGGCGCTGAGCTGGTGTGCG-3' та 5'-CTTGGCCGTCTCTTGGGGGTCCTT-3' [10], *GST-P* — 5'-GGGCAGTGCCTTCACATAGT-3' та 5'-GGAGACCTCACCTGTACCA-3' [11], *MGMT* — 5'-GCCGGCTCTTCACCATCCCCG-3' та 5'-GCTGCAGACCCTCTGTGGCAGC-3' [12]. Ампліфікація здійснювалася за температури відпалу 55 °С для *MDR1*, 53 °С для *MRP* та *LRP*, 60 °С для *GSTP1* та 50 °С для *MGMT*. Продукти ампліфікації становили відповідно 167 п.н., 240 п.н., 260 п.н., 198 п.н. та 210 п.н. Експресію визначали за інтенсивністю світлості полос, обробка даних здійснювалася з використанням програмного забезпечення ViTran та MS-Excel.

Оцінку життєздатності пухлинних клітин при застосуванні хіміопрепаратів здійснювали наступним чином. Матеріал для дослідження забирали безпосередньо під час операції. Протягом 1 год після видалення тканини відмивали від крові та суспендували в середовищі Ігла. В отриману суспензію, що містила 1–4 × 10⁶ клітин в 1 мл, вносили хіміопрепарат та інкубували протягом 24 год, після чого здійснювали підрахунок живих клітин. Концентрацію препаратів у живильному середовищі розраховували із максимально можливого їх вмісту в плазмі крові [13, 14]. Підрахунок кількості клітин здійснювали за допомогою світлового мікроскопа та камери Горяєва [15].

Статистичну обробку даних проводили з використанням U-критерію Манна — Уїтні.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Визначення експресії *MDR1*, *MRP* та *LRP* в ГГМ. Дослідження наявності експресії *MDR1*, *MRP* та *LRP* генів у пухлинах головного мозку (51 зразок) дали позитивний результат для більшості вивчених зразків за виключенням небагатьох із них (табл. 1). Як свідчать отримані дані, серед груп гістологічно різних пухлин найбільш високий рівень експресії всіх трьох генів: *MDR1*, *MRP* та *LRP* — виявлено у АА (III). Для АФП із низьким рівнем анаплазії (I–II) і навіть ГБ (IV) рівень експресії цих генів був значно нижчий (в 1,5–4,0 раза). ОДА (III) теж виявляли значно нижчий (в 1,5–2,0 раза) рівень експресії *MDR1*, *MRP* та *LRP* порівняно з АА того ж ступеня анаплазії.

Повна відсутність експресії генів, які кодують транспортні протеїни, вказує на очікувану високу проникність певних препаратів (які є субстратами *MDR1*, *MRP* чи *LRP*) через мембрани пухлинних клітин. Проте зразків із відсутністю експресії того чи іншого із досліджуваних генів виявлялася незначна кількість (менше 32%), при цьому жодного зраз-

ка із повною відсутністю експресії всіх трьох генів, що експресують АТФ-залежні транспортні білки, серед ГГМ нами виявлено не було.

Таблиця 1

Рівень експресії генів *MDR1*, *MRP* та *LRP* (у.о./млн. клітин) в ГГМ

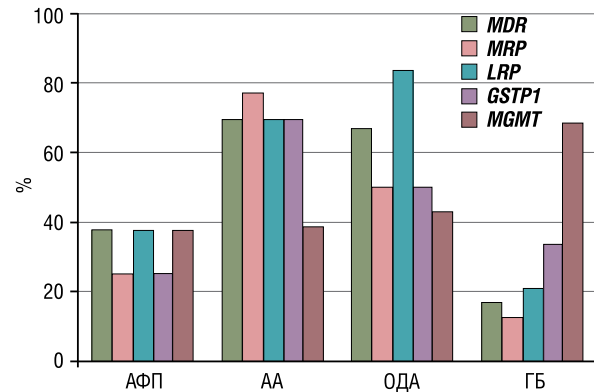
Тип пухлини	<i>MDR1</i>	<i>MRP</i>	<i>LRP</i>
АФП з атипією (I–II) (n = 8)	0,2–14,0 (6,1 ± 5,1)	0,0–4,5 (1,5 ± 1,4)	0,1–8,2 (4,4 ± 3,3)
АА (III) (n = 13)	0,3–21,5 (9,9 ± 5,9)	0,0–14,3 (6,1 ± 3,7)*	0,9–27,1 (10,4 ± 6,4)
ГБ (IV) (n = 24)	0,0–7,5 (2,5 ± 2,4)	0,0–9,5 (1,5 ± 1,5)	0,4–10,1 (4,7 ± 2,1)
ОДА (III) (n = 6)	0,5–16,4 (6,4 ± 3,9)	0,0–8,6 (3,4 ± 2,5)	0,0–20,6 (8,7 ± 4,9)
Всього (n = 51)	0,0–21,5 (5,4 ± 4,5)	0,0–14,3 (2,8 ± 2,7)	0,1–27,1 (6,6 ± 4,1)

* p = 0,05 (тест Манна — Уїтні) порівняно з АФП та ГБ.

Про зазначені відмінності щодо експресії генів *MDR1*, *MRP* та *LRP* пухлинами різного ступеня анаплазії можна говорити лише як про тенденцію, оскільки в усіх досліджених групах ГГМ мали місце зразки як з низьким рівнем експресії даних генів (навіть з повною її відсутністю), так і з високим рівнем. Тому нами було використано ще один критерій розподілу досліджуваних зразків на групи з високим та низьким рівнем експресії *MDR1*, *MRP* та *LRP* в залежності від середніх значень, що визначалися для цих генів [10]. Пухлини, для яких значення досліджуваних показників були нижчі за середні (у цілому серед ГГМ), розглядалися як зразки з низькою експресією, а пухлини зі значеннями, що перевищували медіану, як зразки з високим рівнем експресії генів. Згідно з цим критерієм, гліоми різного ступеня злоякісності були розподілені наступним чином (рисунок): серед пухлин АФП (I–II) та ГБ (IV) переважали зразки з низьким рівнем експресії генів *MDR1*, *MRP* та *LRP*, у той же час серед АА (III) та ОДА (III) значно переважала кількість пухлин із високим рівнем експресії досліджуваних генів. Зразки з низьким рівнем експресії всіх трьох генів АТФ-транспортерів відмічалися у 50% випадків серед АФП (I–II ступінь анаплазії), в 23% АА та в 62% ГБ. Той факт, що більш злоякісні гліоми (ГБ) мають нижчі рівні експресії досліджуваних генів порівняно з АА (III), може пояснити, по-перше, широкою варіабельністю експресії того чи іншого гена в різних ділянках пухлини внаслідок її біологічної гетерогенності та особливостями генетичних механізмів формування новоутворень (в первинних та вторинних ГБ наявні генетичні зміни, що залучають різні сигнальні шляхи). По-друге, продукти досліджуваних генів — не єдиний фактор захисту клітини. Пухлинні клітини, що пройшли відбір в організмі на здатність «обходити» контроль проліферації та диференціювання, накопичують численні механізми, які сприяють їх виживанню.

При порівнянні ефективності лікування хворих (за тривалістю їх життя та відсутністю/наявністю продовженого росту пухлини) у випадках, коли це було можливо, встановлено позитивну кореляцію (відсутність продовженого росту через 2 роки і біль-

ше) для 3 зразків АФП (I–II) із 4 досліджених, які демонстрували низький рівень експресії генів, що кодують білки, відповідальні за видалення ліків із клітини; і навпаки, серед 7 гліом (5 АА та 2 ОДА) із високим рівнем експресії усіх трьох генів (*MDR1*, *MRP*, *LRP*) у 4 випадках відмічався значний продовжений рост пухлини вже через 2–4 міс після її видалення.



Рисунки. Процентне співвідношення зразків із високим рівнем експресії генів *MDR1*, *MRP*, *LRP*, *GSTP1* та *MGMT* серед ГГМ різної гістоструктури та ступеня злоякісності: АФП — астроцитома фібрилярно-протоплазматична, АА — астроцитома анапластична, ОДА — олигодендроастроцитома анапластична, ГБ — гліобластома

Дослідження глутатіонтрансфераз в ГГМ. Отримані результати з генотипування тканини пухлин за генами *GSTM1* та *GSTT1* (75 зразків) виявили нульовий генотип хоча б за одним із цих генів у 48 випадках (64%); з них — *GSTM1* «0»-генотип у 34 (45,3%), *GSTT1* «0»-генотип у 14 (18,7%), *GST*-«дубль нуль»-генотип — у 7 (9,3%) пацієнтів (табл. 2). Порівняння генотипів *GSTM1* та *GSTT1* у гліомах різної гістоструктури та ступеня анаплазії вказує на те, що наявність *GSTM1* «0»-генотипу частіше відмічається як в низько-, так і високозлоякісних астроцитомах: а саме, в 60 та 63,2% відповідно, що також значно перевищує цей показник у контрольних групах. Для ГБ та ОДА відмічається переважання частоти випадків із нульовим *GSTT1*, а також «дубль 0»-генотипами порівняно з АФП та АА.

Крім глутатіонтрансфераз класів м'ю та тета, значний внесок у загальну ензиматичну активність вносить глутатіонтрансфераза класу пі (*GSTP1*). Щодо ГГМ вважається, що саме *GSTP1* є осно-

вною ізоформою цих ферментів [16]. Серед досліджених груп ГГМ (див. табл. 2) найвищий рівень експресії *GSTP1* відзначали серед АА (III), найнижчий — серед АФП (I–II). Звертають на себе увагу досить низькі середні значення рівня експресії *GSTP1* в ГБ (IV) порівняно з АА (III), незважаючи на більш високий ступінь анаплазії перших. Однією з імовірних причин відмінності досліджених показників в астроцитомах та гліобластомах може бути наявність різниці щодо провідних генетичних порушень в цих видах ГГМ. Порівняння кількості гліом із високими рівнями експресії *GSTP1* у групах пухлин різного ступеня злоякісності виявило значну перевагу кількості злоякісних пухлин III та IV ступеня анаплазії з високим рівнем даного показника порівняно з пухлинами низькозлоякісними (див. рисунок).

Серед досліджених нами зразків, для яких існувала можливість клінічного спостереження за хворими, пухлини з низькою експресією гена *GSTP1* не демонстрували продовженого росту при застосуванні комбінованого лікування (ПТ та ХТ переважно алкілувальними агентами або поліХТ); для зразків із високою активністю усіх ізоформ *GST*, навпаки, відмічається значний продовжений ріст вже через 2–10 міс після видалення. Проте виявлялися також і зразки з відсутністю кореляції активності в них даної групи ферментів та клінічним перебігом захворювання. Імовірно, в цих зразках провідну роль відіграють інші системи детоксикації хіміопрепаратів та репарації ДНК.

Таким чином, аналізуючи отримані нами дані та зіставляючи їх із даними інших дослідників, слід зазначити, що відмічається чітка тенденція до зростання рівня експресії генів глутатіонтрансфераз при високому ступені анаплазії порівняно з низьким. Уваги також заслуговує і той факт, що при наявності у хворих однакових за клініко-морфологічними характеристиками пухлин, ми відмічали прямо протилежні генотипи *GSTM1* та *GSTT1*, а також рівень експресії *GSTP1*.

Визначення експресії MGMT в ГГМ. Дослідження експресії гена *MGMT* в ГГМ (див. табл. 2) виявили її відсутність у 12% із них. Тенденція до зростання експресії цього гена в гліальних пухлинах відмічається з підвищенням рівня анаплазії останніх, проте про статистично значимі відмінності не йдеться

Таблиця 2

Дослідження генотипів *GSTM1* та *GSTT1* та рівня експресії генів *GST-P* та *MGMT* в ГГМ

Тип пухлини	Частота <i>GSTT1</i> «0»-генотипу, %	Частота <i>GSTM1</i> «0»-генотипу, %	Частота дубль «0»-генотипу, %	Рівень експресії (у.о/млн клітин)	
				<i>GSTP1</i>	<i>MGMT</i>
#Контроль					
Різні етнічні групи	13–30	35–60	-		
Європеїдні популяції	16–25	40–45	-		
АФП (I–II) (n = 10)	0	60	0	0,5–155,5 (44,7 ± 38,2)	0,0–189,9 (123,3 ± 42,4)
АА (III) (n = 19)	15,8	63,2	5,3	15,5–343,4 (123,5 ± 72,6)*	0,0–242,4 (123,8 ± 70,1)
ГБ (IV) (n = 37)	21,6	35,1	10,8	0,1–202,0 (45,0 ± 42,0)	0,0–244,1 (146,4 ± 60,4)**
ОДА (III) (n = 9)	33,3	33,3	22,2	18,4–147,8 (79,5 ± 38,5)	0,0–150,8 (98,6 ± 35,6)
Всього (n = 75)	18,7	45,3	9,3	0,1–343,4 (68,0 ± 56,3)	0,0–244,1 (131,8 ± 61,8)

* p = 0,05 (тест Манна – Уїтні) порівняно з АФП та ГБ; ** p = 0,05 (тест Манна – Уїтні) порівняно з АФП; # в якості контрольних даних подані показники представників різних етнічних груп [17, 18].

ся, імовірно, через наявність зразків із високим та низьким рівнем експресії в усіх досліджених групах. Найвищий рівень експресії гена *MGMT* серед гліом різного ступеня анаплазії виявлено в групі ГБ (IV), що і пояснює високу резистентність цих пухлин до хіміотерапевтичних препаратів.

При порівнянні співвідношення кількості зразків ГГМ із високим та низьким рівнями експресії *MGMT* (див. рисунок) було виявлено значну перевагу кількості ГБ із високим рівнем цього показника (68,2% зразків) порівняно з ОДА (42,9%), АА (38,5%) та АФП (37,5%).

Клінічно у більшості випадків, для яких була можлива оцінка виживаності та відповіді на застосування алкілувальних агентів, була виявлена позитивна кореляція з рівнем експресії *MGMT*. Так, серед 10 зразків із низькими значеннями цього показника для 8 випадків відмічалася ремісія протягом 12–25 міс (спостереження продовжуються) при застосуванні ХТ алкілувальними препаратами. Проте в двох випадках, що також увійшли до групи низькоекспресуючих *MGMT* пухлин, вже через 6 міс після операції відмічали значний продовжений ріст. Серед 14 пухлин із високими значеннями експресії *MGMT* 50% зразків мали позитивну кореляцію клінічного перебігу хвороби (інтенсивний продовжений ріст пухлини вже через 3–11 міс після операції). Серед іншої половини зразків із високим рівнем експресії даного гена були випадки ремісії протягом 18–25 міс, що можна розцінювати як негативну кореляцію значень експресії *MGMT* та відповіді пухлини на застосування хіміопрепаратів, однак ці зразки, як правило, характеризувалися низькими показниками інших детоксуючих систем.

Дослідження цитотоксичності хіміопрепаратів у короткостроковій культурі пухлинних клітин. При дослідженні цитотоксичності хіміопрепаратів у короткостроковій культурі суспензії пухлинних клітин зразки було умовно поділено на чутливі (зменшення кількості живих клітин більше ніж на 20% за добу при дії цитостатика) та стійкі (зменшення кількості живих клітин менше ніж на 20% за добу). Застосування ряду хіміопрепаратів для дослідження життєздатності клітин ГГМ (табл. 3) виявило високу стійкість більшості досліджених культур до дії нуклеоплату, дакарбазину, доксорубіцину, цисплатину та метотрексату (81–92% зразків), дещо меншу — до таксотеру (71% зразків). Найбільшу чутливість культури ГГМ мали до ломус-

тину (64% досліджених зразків були стійкими до дії препарату, 36% — чутливими).

При дослідженні пухлин різної гістоструктури найбільшу чутливість до хіміопрепаратів було виявлено серед ОДА. Оцінюючи ефективність дії хіміопрепаратів на ГГМ в залежності від ступеня анаплазії, у цілому можна зробити висновок про більш високу чутливість низькозлоякісних пухлин (I–II ступінь анаплазії) порівняно з високозлоякісними (III–IV ступінь анаплазії), хоча резистентні та чутливі зразки наявні в усіх досліджених групах.

При підборі хіміопрепаратів важливе значення має врахування механізму їх дії у співставленні з механізмами функціонування систем захисту клітини. Серед досліджуваних нами препаратів — алкілувальні сполуки, антиметаболіти, антибіотики. Резистентність до алкілувальних агентів, а також сполук платини розвивається при високому вмісті речовин, які багаті на сульфгідрильні групи, зокрема глутатіону, а також при високій активності ферментів глутатіонтрансфераз. За нашими даними, у більшості випадків відмічається позитивна кореляція цих показників: при наявності високого рівня експресії глутатіонтрансфераз пухлина залишається резистентною до дії зазначених препаратів. У випадках із низькою активністю цих ферментів виявляються як чутливі, так і резистентні зразки; в останніх, очевидно, провідним є функціонування інших систем детоксикації та/або наявність високої активності систем репарації.

Порівнюючи результати експериментальних досліджень з оцінкою життєздатності пухлинних клітин у короткостроковій культурі під дією хіміопрепаратів та ефективності застосування даних препаратів при лікуванні пацієнтів, ми відмічали позитивну кореляцію у 8 випадках із 10 обстежених (відсутність продовженого росту протягом більше 25 міс для АФП та протягом 9–21 міс — для АА та ГБ).

Таким чином, аналізуючи дані експериментальних та клінічних даних щодо відносної кореляції показників клітинної резистентності та застосування тих чи інших хіміопрепаратів [3, 5, 6, 19] та отримані нами результати, слід відмітити, що напруженість роботи детоксикаційних ферментативних систем захисту організму в кожному окремому випадку буває різною; імовірно, це пов'язано, перш за все, з індивідуальними особливостями організму. Саме тому успіх у проведенні ХТ при лікуванні пацієнтів зі злоякісними ГГМ залежить від детального індивідуального урахування всіх можливих механізмів резис-

Таблиця 3

Цитотоксичність хіміопрепаратів у короткостроковій культурі пухлин різної гістологічної структури

Тип пухлини	Відношення кількості зразків, чутливих до дії хіміопрепарату* до загальної кількості досліджених зразків						
	Доксорубіцин	Цисплатин	Дакарбазин	Метотрексат	Таксотер	Ломустин	Нуклеоплат
ГБ	4/39 10%	4/38 11%	2/36 6%	5/37 14%	10/37 27%	12/35 34%	2/34 6%
АА	4/21 19%	4/21 19%	2/21 10%	7/21 33%	8/21 38%	6/17 35%	1/19 5%
АФП	3/10 30%	2/10 20%	1/9 11%	1/8 13%	2/9 22%	3/9 33%	1/9 11%
ОДА	3/11 27%	2/11 18%	1/11 9%	2/11 18%	3/11 27%	4/9 44%	1/10 10%
Всього	14/81 15%	12/80 15%	6/77 8%	15/77 19%	23/78 44%	25/70 36%	5/72 7%

* зниження кількості живих клітин більше ніж на 20%/добу.

тентності організму для кожного пацієнта та включає: вивчення експресії генів та активності білків, що відповідають за «нейтралізацію» хіміопрепарату в пухлинній клітині (MDR1, MRP, LRP, GSTT1, GSTM1, GSTP1), а також за репарацію ушкоджень ДНК (MGMT); вивчення експресії генів апоптозу. Для покращання результатів лікування шляхом удосконалення підбору більш ефективного хіміопрепарату, на наш погляд, корисним є здійснення оцінки життєздатності пухлинних клітин під дією хіміопрепаратів у культурі клітин.

ВИСНОВКИ

1. Результати проведених досліджень не виявили чіткої залежності генотипів глутатіонтрансфераз M1 та T1 від гістологічних особливостей та ступеня анаплазії ГГМ, проте встановлена тенденція переважання GSTM1«0»-генотипу в астроцитоммах, GSTT1«0»-генотипу — в гліобlastомах.
2. Рівень експресії генів *MDR1*, *MRP*, *LRP*, *GST-P* та *MGMT* в тканинах ГГМ був значно вищим у пухлинах із високим ступенем злоякісності, а саме: генів *MDR1*, *MRP*, *LRP* та *GST-P* — в АА, гена *MGMT* — в ГБ — порівняно з низькозлоякісними гліомами.
3. Застосування ряду хіміопрепаратів для дослідження життєздатності клітин ГГМ на основі підрахунку кількості живих клітин у короткостроковій культурі встановило більш високу чутливість низькозлоякісних пухлин до хіміопрепаратів порівняно з високозлоякісними, хоча резистентні та чутливі зразки виявлені в усіх досліджених групах.
4. Ефективність застосування ХТ при лікуванні пацієнтів із ГГМ залежить від детального урахування всіх можливих механізмів резистентності організму індивідуально для кожного пацієнта.

ЛІТЕРАТУРА

1. Чехун ВФ, Шишова ЮВ. Современные взгляды на механизмы формирования лекарственной устойчивости опухолей. Онкология 2000; 2 (1): 11–5.
2. Seelig A, Blatter XL, Wohnsland F. Substrate recognition by P-glycoprotein and the multidrug resistance-associated protein MRP1, a comparison. Int J Clin Pharmacol 2000; 38: 11–21.
3. Andersson U, Malmer B, Bergenheim AT, et al. Heterogeneity in the expression of markers for drug resistance in brain tumors. Clin Neuropathol 2004; 23 (1): 21–7.
4. Mukanganyama S, Widersten M, Naik ES, et al. Inhibition of glutathione S-transferases by antimalarial drugs possible implications for circumventing anticancer drug resistance. Int J Cancer 2002; 97 (5): 700–5.
5. Nakagawa T, Ido K, Sakuma T, et al. Prognostic significance of the immunohistochemical expression of O6-methylguanine-DNA methyltransferase, P-glycoprotein, and multidrug resistance protein-1 in glioblastomas. Neuropathology 2009; 29 (4): 379–488.
6. Sun YH, Zhang YZ, Wang ZC, et al. Relationship between the expression of O6-methylguanine-DNA methyltransferase in glioma and the survival time of patients. Ai Zheng 2004; 23 (9): 1052–5.
7. Robertson N, Leek R. Isolation of RNA from tumor samples: single-step guanidinium acid-phenol method. Methods Mol Med 2006; 120: 55–9.
8. Stella MD. Glutathione S-Transferase Polymorphisms in Children with Myeloid Leukemia: A Children's Cancer Group Study. Cancer Epidemiol Biomark 2000; 19: 563–6.

9. Noonan KE, Beck C, Holzmayer TA, et al. Quantitative Analysis of MDR1 (Multidrug Resistance) Gene Expression in Human Tumors by Polymerase Chain Reaction. PNAS 1990; 87: 7160–4.

10. Valera ET, Scrideli CA, Queiroz RGP, et al. Multiple drug resistance protein (MDR1), multidrug resistance-related protein (MRP) and lung resistance protein (LRP) gene expression in childhood acute lymphoblastic leukemia. Sao Paulo Med J 2004; 122 (4): 166–71.

11. Bakker J, Lin X, Nelson WG. Methyl-CpG binding domain protein 2 represses transcription from hypermethylated pi-class glutathione S-transferase gene promoters in hepatocellular carcinoma cells. J Biol Chem 2002; 277 (25): 22573–80.

12. Zambrano P, Segura-Pacheco B, Perez-Cardenas E, et al. A phase I study of hydralazine to demethylate and reactivate the expression of tumor suppressor genes. BMC Cancer 2005; 5 (1): 44–56.

13. Ищенко ПВ. Методика капельно-плазменного культивирования рнхолоевой ткани для экспресс-определения индивидуальной чувствительности к химиопрепаратам. Онкология 2002; 4 (1): 15–7.

14. Олійниченко ПИ, Булкина ЗП, Синиборова ТИ. Справочник по химиотерапии опухолей. Київ: Здоров'я, 2000. 295 с.

15. Божкова ВП, Брежестовский ПД, Буравлев ВП и др. Руководство по культивированию нервной ткани. Москва: Наука, 1988. 315с.

16. Hara A, Sakai N, Yamada H, et al. Expression of the placental form of glutathione S-transferase in pediatric gliomas. Childs Nerv Syst 1993; 9 (3): 142–6.

17. Kelsey KT, Wrensch M, Zuo ZF, et al. A population-based case-control study of the CYP2D6 and GSTT1 polymorphisms and malignant brain tumors. Pharmacogenetics 1997; 17: 463–8.

18. Wrensch M, Kelsey KT, Liu M, et al. Glutathione-S-transferase variants and adult glioma. Cancer Epidemiol Biomark Prev 2004; 13 (3): 461–7.

19. Calatuzzolo C, Gelati M, Ciusani E, et al. Expression of drug resistance proteins Pgp, MRP1, MRP3, MRP5 and GST-pi in human glioma. J Neurooncol 2005; 74 (2): 113–21.

CHEMORESISTANCE GENE EXPRESSION IN BRAIN GLIOMAS AND THEIR CORRELATION WITH SENSITIVENESS TO CHEMOTHERAPEUTIC AGENTS

I.G. Vasilyeva, A.Y. Glavatsky, N.G. Chopik, N.P. Olexenko, E.S. Galanta, O.I. Tsyubko

Summary. *The genotype of glutathione transferases mu and theta, the level of MDR1, MRP, LRP, GSTP1, MGMT genes expression with the use of PCR method is researched, and also the estimation of viability of tumor cells in brain gliomas on the basis of count of living cells amount in the short-term culture is carried out. Obtained results testify to the increase of level of MDR1, MRP, LRP, GST-P and MGMT genes expression in glial tumors with the high degree of malignancy as compared to glial tumors with the low degree of malignancy. Most high level of MDR1, MRP, LRP and GST-P expression was found for anaplastic astrocytomas, of MGMT expression — for glioblastomas. Application of chemotherapy agents for research of viability of tumor cells on the basis of count of living cells amount in the short-term culture set the higher sensitiveness of glial tumors with the low degree of malignancy as compared to glial tumors with the high degree of malignancy,*

although, resistant and sensible samples are discovered in all explored groups. Thus, success in conducting of chemotherapy at treatment of brain gliomas depends on the detailed account of all possible mechanisms of organism resistance individually for every patient.

Key Words: chemotherapy, chemoresistance, glioma, genotype, gene expression.

Адреса для переписки:

Чопик Наталя Григорівна
04050 м. Київ, вул. Платона Майбороди
(Мануїльського), 32
Інститут нейрохірургії,
відділ нейробіохімії
Тел., факс: 483-35-92
E-mail: pcr07@mail.ru