

**В. І. Цимбалюк, І. Г. Васильєва, А. В. Шаверський, Н. Г. Чопик, О. С. Галанта,
О. І. Цюбко, Н. П. Олексенко, А. Б. Дмитренко, Т. А. Макарова, Н. Д. Сніцар**

Державна установа “Інститут нейрохірургії ім. А. П. Ромоданова НАМН України”, 04050 Київ

ЕКСПРЕСІЯ ГЕНІВ HIF1 α та MMP2 У ПУХЛИНАХ ГОЛОВНОГО МОЗКУ ДІТЕЙ

У 59 зразках пухлин головного мозку (36 медулобластом, 14 анапластичних епендимом, 9 фібрилярно-протоплазматичних астроцитом) дітей віком від 1 місяця до 17 років визначали рівень експресії генів транскрипційного фактора, що індукується гіпоксією, HIF1 α (Hypoxia Inducible Factor) та матричної металопротеїнази 2 (MMP2 — Matrix MetalloProteinase). Показано високий ступень кореляції рівнів мРНК генів HIF1 α та MMP2 у тканині пухлин різного ступеня злоякісності головного мозку дітей ($r = 0,71, P < 0,05$). Об'єм пухлинного вузла не корелював із рівнем експресії гена MMP2.

Ключові слова: пухлина, головний мозок, мРНК, HIF1 α , MMP2.

Однією з найважчих проблем у педіатрії лишається лікування злоякісних новоутворень головного мозку, які займають другу позицію за частотою виявлення після лейкозів. На даний час це лікування відбувається переважно за допомогою хірургічного втручання. Але великий відсоток випадків рецидивів, навіть при максимально тотальній резекції пухлини, вказує на необхідність удосконалення комплексу лікувальних заходів з урахуванням молекулярно-біологічних особливостей злоякісних новоутворень.

Для будь-яких клітин організму тварин зміна концентрації кисню у навколишньому середовищі є стимулом, що запускає механізми, спрямовані на підтримку його внутрішньоклітинної концентрації. Проте для злоякісних новоутворень гіпоксія є не лише наслідком неконтрольованого росту пух-

лини, а й ключовим фактором, що забезпечує її подальшу експансію та інкурабельність.

Універсальною відповіддю як нормальних, так і злоякісних клітин на зниження концентрації кисню є активація транскрипційного фактора, що індукується гіпоксією, HIF1 α (Hypoxia Inducible Factor). Підтвердженням значної ролі цього фактора у підтримці злоякісного фенотипу є втрата інвазивного потенціалу клітин гліобластоми мультиформної після пригнічення експресії HIF1 α за допомогою інгібітору цикліна залежних кіназ SNS032 [5] та блокування метастазування меланоми по лімфосистемі при його інактивації [9].

У свою чергу, інвазивний потенціал ракових клітин реалізується за участю таких протеолітичних ферментів, як матриксні металопротеїнази (MMP — Matrix MetalloProteinases). Однією з найбільш до-

В. І. Цимбалюк — заст. директора з наукової роботи, акад. НАМН України

Відділ нейробіохімії

І. Г. Васильєва — зав. відділом, к.б.н.

Н. Г. Чопик — пров.н.с., к.б.н.

Н. П. Олексенко — с.н.с.

О. С. Галанта — н.с. (lenagalanta@gmail.com)

О. І. Цюбко — н.с.

А. Б. Дмитренко — м.н.с.

Т. А. Макарова — м.н.с.

Н. Д. Сніцар — м.н.с.

А. В. Шаверський — д.м.н., лікар-нейрохірург відділення церебральної нейрохірургії дитячого віку

© В. І. Цимбалюк, І. Г. Васильєва, А. В. Шаверський, Н. Г. Чопик, О. С. Галанта,
О. І. Цюбко, Н. П. Олексенко, А. Б. Дмитренко, Т. А. Макарова, Н. Д. Сніцар, 2015.

сліджуваних металопротеїназ є MMP2, яка разом із MMP9 бере участь у деградації колагену IV типу — основного структурного білка базальної мембрани [7]. Як і всі металопротеїнази, MMP2 вивільняється з клітин у вигляді проензиму, що для активування потребує посттрансляційної модифікації. Відомо, що експресія гена MMP2 регулюється індуктором металопротеїназ EMMPRIN (Extracellular Matrix MetalloProteinase INducer), ростовими факторами, цитокінами та гормонами, а у якості посттрансляційних активаторів виступають інтерлейкіни, TNF α (Tumor Necrosis Factor- α), PDGF (Platelet-Derived Growth Factor), MT1-MMP (матриксна металопротеїназа мембранного типу 1) та сама MMP2 [10]. Але мало відомо про особливості експресії цього гена в умовах гіпоксії. Тому метою роботи стало дослідження кореляції рівнів експресії генів MMP2 та HIF1 α як між собою так і з морфологічними особливостями пухлин головного мозку дітей.

Матеріал та методи. У роботі було досліджено 59 зразків тканин пухлин головного мозку (36 медулобластом, 14 анапластичних епендимом, 9 фібрилярно-протоплазматичних астроцитом), видалених під час планових хірургічних операцій дітей віком від 1 місяця до 17 років. Морфологічну верифікацію пухлини проводили у відділі нейропатоморфології ДУ “Інститут нейрохірургії ім. А. П. Роданова НАМН України”.

Постопераційний зразок тканини пухлини розміщували у пробірці із фізрозчином і протягом однієї години доставляли для дослідження. Тканину відмивали від крові та суспендували у фізрозчині. Кількість клітин підраховували у камері Горяєва. Суспензію клітин розводили фізрозчином до кінцевої концентрації 50 млн/мл, заморожували у рідкому азоті і в такому вигляді зберігали до моменту використання.

Виділення РНК проводили стандартним методом з використанням набору “Рибо-сорб” (“Amplisens”, Росія) відповідно до протоколу.

Реакцію зворотної транскрипції проводили з використанням набору “RevertAidTM First strand cDNA synthesis kit” (“Fermentas”, Литва). В якості контрольного гена було використано ген гліцеральдегід-3-фосфат дегідрогенази (GAPDH) за інструкцією до набору.

Полімеразну ланцюгову реакцію здійснювали з використанням ампліфікатора “Терцик” (“ДНК-технологія”, Росія) та набору для проведення класичної ПЛР “PCR-core” (“Genpaa”, Росія). Для визначення експресії генів використовували такі праймери: для гена HIF-1 α — (for) 5'-TTCACCTGAGCCTAATAGTCC-3', (rev) 5'-CAAGTCTAAATCTGTGCTCCTG-3' — продукт ам-

пліфікації 151 п.н. [12], для гена MMP2 — (for) 5'-TTTCCATTCCGCTTCCAGGGCAC-3' та (rev) 5'-TCGCACACCACATCTTTCCGTCACCT-3' — продукт ампліфікації 253 п.н. [11].

40 циклів ампліфікації було здійснено при температурі відпалу 55 °C — для HIF-1 α та 62 °C — для MMP2.

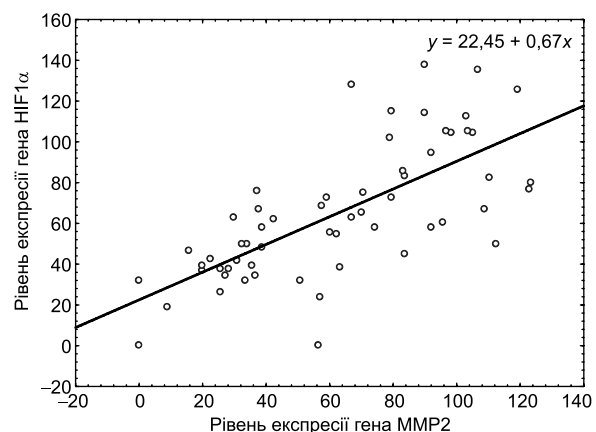
Візуалізацію продуктів ампліфікації проводили за допомогою електрофорезу в 2 % агарозному гелі. Рівень експресії генів оцінювали методом порівняльного аналізу електрофоретичних сигналів досліджуваного та контрольного генів з використанням програмного забезпечення для аналізу зображень “ViTran” (“Біоком”, Росія).

Розмір пухлин визначали на апараті МРТ “MAGNETOM Concerto” (“Siemens”, Німеччина) у трьох площинах та розраховували їх об'єм.

При статистичному аналізі використовували коефіцієнт кореляції Спірмана.

Результати та їх обговорення. Експресія HIF1 α та MMP2 була виявлена в усіх (за виключенням двох) досліджених зразках пухлин головного мозку дітей. При цьому не було виявлено статистично значимої різниці між рівнем експресії цих генів у зразках різного ступеня злоякісності. Ймовірно, рівень іРНК досліджуваних генів залежить не від ступеня злоякісності пухлини, а від її морфологічних особливостей.

Статистичний аналіз виявив високу кореляцію між рівнями експресії генів HIF1 α та MMP2 у тканині пухлин головного мозку дітей різного ступеня злоякісності ($r = 0,71$, $P < 0,05$) (рисунк).



Кореляція експресії генів HIF1 α та MMP2 у пухлинах головного мозку дітей різного ступеня злоякісності.

Аналогічні результати були отримані китайськими вченими при дослідженні експресії генів HIF1 α та MMP2 у тканині пухлин гепатоцелюлярної карциноми різного ступеня злоякісності

($r = 0,63$, $P < 0,05$) [13]. При цьому кореляція спостерігалась як для мРНК цих генів, так і для відповідних білків.

Високий ступінь кореляції експресії генів HIF1 α та MMP2 свідчить про існування зв'язку між гіпоксичним станом, що виникає у тканині пухлини головного мозку дітей та активацією програми метастазування та інвазії за участю металопротеїназ. На сьогодні відомо, що активність HIF1 α регулюється в залежності від концентрації кисню [8]. Активування експресії MMP2 також є наслідком гіпоксії, що виникає в тканині пухлини. Причиною тканинної гіпоксії в пухлинах є порушення балансу між споживанням та постачанням кисню, що, в свою чергу, впливає на концентрацію пероксинітриду, який регулює активність MMP2 [1, 2]. Крім того останні дослідження показали наявність двох сайтів зв'язування із HIF1 α у промоторному регіоні трансмембранного індуктора матриксних металопротеїназ EMPRIN (CD147) [14].

Тим часом кореляції між рівнем експресії гена HIF1 α та об'ємом пухлин, як це можна було очікувати, не виявлено. Також не було залежності між об'ємом пухлини та рівнем експресії гена MMP2, що мало б свідчити про участь металопротеїнази у забезпеченні інвазивного потенціалу пухлини, внаслідок підвищення руйнування екстраклітинного матрикса та полегшення локомоції пухлинних клітин у оточуючі нормальні тканини та метастазування у віддалені. Навпаки, для високо злоякісних пухлин між цими показниками спостерігалась незначна зворотна кореляція ($r = -0,46$).

Клітинна гетерогенність у межах однієї пухлини ускладнює отримання більш високого ступеня кореляції між рівнем експресії гена MMP2 та розміром новоутворення, але порівняльний аналіз по-

казує, що збільшення рівня експресії гена MMP2 не призводить до збільшення об'єму пухлини, що співпадає з даними літератури. Так, у експерименті турецьких вчених було показано, що у пухлинах меншого розміру кількість позитивно фарбованих антитілами до MMP2 клітин значно більше ніж у пухлинах більшого розміру [6]. Схожу залежність спостерігали російські вчені при дослідженні плоскоклітинних карцином голови та шиї. Рівень MMP2 у сироватці крові хворих мав зворотну кореляцію із розміром пухлинного вузла [4].

Можливим поясненням цього явища є поліфункціональність металопротеїназ. Все більше літературних джерел розкривають іншу функцію металопротеїназ (зокрема, MMP2) як регуляторів пухлинного ангиогенезу. Ця функція реалізується за рахунок протеолізу ними антиангіогенних факторів — ангиостатину (походить від плазмінотеніну) та тумстатину (похідного колагену IV типу) [3]. Вочевидь існує певна система внутрішньо- та зовнішньоклітинних сигналів, що зумовлюють пухлинну прогресію та інвазію, і функція MMP2 в умовах тканинної гіпоксії полягає не тільки у забезпеченні метастазування клітин пухлини, а також, у контролі пухлинної васкуляризації. Внаслідок цього розміри пухлини залежать від динамічного балансу між гіпоксією та васкуляризацією.

Таким чином, подальшим напрямом досліджень має стати визначення молекулярних маркерів, які вказують на метаболічні процеси, що забезпечують вихід клітин пухлини зі стану гіпоксії за рахунок подальшої інвазії чи проліферації судин. Це дасть можливість призначати індивідуалізовано мішенньорієнтоване лікування злоякісних новоутворень, особливо при призначенні антиангіогенних препаратів.

Список використаної літератури

1. Аксененко М. Б., Рукша Т. Г. Экспрессия матриксной металлопротеиназы-2 в ядрах опухолевых клеток меланомы кожи // Вестник дерматол. венерол. — 2014. — № 3. — С. 65-71.
2. Андреева А. А., Евсюкова И. И., Опарина Т. И., Арутюнян А. В. Продукция окиси азота и состояние центральной гемодинамики у новорожденных, здоровых и перенесших гипоксию // Педиатрия. — 2004. — № 1. — С. 1-5.
3. Ганусевич И. И. Роль матриксных металлопротеиназ (ММП) при злокачественных новообразованиях. II. Участие ММП в ангиогенезе, инвазии и метастазировании опухолей // Онкология. — 2010. — 12, № 2. — С. 108-117.
4. Клиши Е. В., Кондакова И. В., Чойнозов Е. А. и др. Роль матриксных металлопротеиназ в развитии и прогнозе плоскоклеточных карцином головы и шеи // Сибирский онкол. журн. — 2009. — № 6. — С. 48-53.
5. Ali M. A., Reis A., Ding L. H. et al. SNS-032 prevents hypoxia-mediated glioblastoma cell invasion by inhibiting hypoxia inducible factor 1 α expression // Int. J. Oncol. — 2009. — 34, № 4. — P. 1051-1060.
6. Artas G., Ozercan H. The expression of STAT3, BCL-XL and MMP2 proteins in colon adenocarcinomas and their relationship with prognostic factors // Turk. J. Pathol. — 2014. — 30, № 3. — P. 178-183.
7. Christofori G. New signals from the invasive front // Nature. — 2006. — 441, № 7092. — P. 444-450.
8. Dery M. A., Michoud M. D., Richard D. E. Hypoxia-inducible factor 1: regulation by hypoxic and non hypoxic activators // Int. J. Biochem. Cell Biol. — 2005. — 37, № 3. — P. 535-540.
9. Hanna S. C., Krishnan B., Bailey S. T. et al. HIF1 β and HIF2 β independently activate SRC to promote melanoma metastases // J. Clin. Invest. — 2013. — 123, № 5. — P. 2078-2083.

10. *Jeziarska A., Motyl T.* Matrix metalloproteinase-2 involvement in breast cancer progression: a mini-review // *Med. Sci. Monit.* — 2009. — **15**, № 2. — P. RA32-40.
11. *Köhrmann A., Kammerer U., Kapp M.* et al. Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) in primary human breast cancer and breast cancer cell lines: New findings and review of the literature // *BMC Cancer.* — 2009. — doi: 10.1186/1471-2407-9-188.
12. *Qiu H., Durand K., Rabinovitch-Chable H.* et al. Gene expression of HIF-1 α and XRCC4 measured in human samples by realtime RT-PCR using the sigmoidal curve-fitting method // *BioTechniques.* — 2007. — **42**, № 3. — P. 355-362.
13. *Wang B., Ding Y., Fan P., Wang D.* et al. Expression and significance of MMP2 and HIF1 α in hepatocellular carcinoma // *Oncol. Lett.* — 2014. — **8**, № 2. — P. 539-546.
14. *Zeng W., Su J., Wu L., Yang D.* et al. CD147 promotes melanoma progression through hypoxia-induced MMP2 activation // *Curr. Mol. Med.* — 2014. — **14**, № 1. — P. 163-173.

Одержано 24.10.2015

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ HIF1 α И MMP2 В ОПУХОЛЯХ ГОЛОВНОГО МОЗГА ДЕТЕЙ

**В. И. Цымбалюк, И. Г. Васильева, А. В. Шаверский, Н. Г. Чопик, О. С. Галанта,
О. И. Цюбко, Н. П. Олексенко, А. Б. Дмитренко, Т. А. Макарова, Н. Д. Сницар**

Государственное учреждение “Институт нейрохирургии им. А. П. Ромоданова НАМН Украины”,
04050 Киев

В 59 образцах опухолей головного мозга (36 медуллобластом, 14 анапластических епендимомы, 9 астроцитом фибриллярно-протоплазматических) детей в возрасте от 1 месяца до 17 лет определяли уровень экспрессии генов индуцируемого гипоксией транскрипционного фактора HIF1 α (Hypoxia Inducible Factor) и матричной металлопротеиназы 2 (MMP2 — Matrix MetalloProteinase). Показано высокую степень корреляции уровней иРНК генов HIF1 α и MMP2 в ткани опухолей разной степени злокачественности головного мозга детей ($r = 0,71$, $P < 0,05$). Объем опухолевого узла не коррелировал с уровнем экспрессии гена MMP2.

EXPRESSION OF HIF1 α AND MMP2 GENES IN PEDIATRIC BRAIN TUMORS

**V. I. Tsybaliuk, I. G. Vasilyeva, A. V. Shaversky, N. G. Chopik, O. S. Galanta,
O. I. Tsiubko, N. P. Oleksenko, A. B. Dmitrenko, T. A. Makarova, N. D. Snitsar**

State Institution “A. P. Romodanov Institute of Neurosurgery NAMS Ukraine”, 04050 Kyiv

The level of expression of genes — HIF1 α (Hypoxia Inducible Factor) and MMP2 (Matrix Metallo-Proteinase 2) — was determined in 59 surgery specimens of pediatric brain tumors (36 medulloblastomas, 14 anaplastic ependymomas and 9 fibrillary protoplasmatic astrocitomas) from children aged 1 month-17 years. A strong positive correlation between MMP2 and HIF1 α mRNA levels was shown ($r = 0.71$, $P < 0.05$) in tumor tissue of varying degree of malignancy of children's brain. There was no correlation found between the tumor size and level of expression of MMP2 gene.