УДК 616.831–006.04–085:66.095.253:575.113.1

РОЛЬ РЕПАРАТИВНОГО ЕНЗИМУ O^6–МЕТИЛГУАНІН–ДНК МЕТИЛТРАНСФЕРАЗИ У ХІМІОТЕРАПІЇ ЗЛОЯКІСНИХ ГЛІОМ

Л. А. Шапошник; О. Я. Главацький *, Хассан Ахмад *; Є. В. Кузенко**,
Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, м. Київ;
**ДУ «Інститут нейрохірургії ім. акад. А. П. Ромоданова» НАМН України, м. Київ;*
***Медичний інститут Сумського державного університету, м. Суми*

O^6–метилгуанін–ДНК метилтрансфераза (MGMT) відновлює аддукти ДНК O^6–метилгуанін та O^6–хлороетилгуанін, викликані метилювальними і хлороетилювальними протипухлинними препаратами, що застосовуються при лікуванні раку. Ці аддукти цитотоксичні, і, враховуючи неспростовні докази того, що MGMT є ключовим фактором у захисті від них, існують способи за інактивації MGMT. Було показано, що деякі препарати здатні інактивувати MGMT у клітинах, людських пухлинних моделях і у пацієнтів з гліомами. O^6–бензилгуанін був використаний у клінічних випробуваннях. Хоча ці препарати не виявляють побічних ефектів як такі, але вони інактивують MGMT у нормальних тканинах і, отже, підсилюють токсичні побічні ефекти алкілувальних препаратів, що вимагає зниження дози останніх.

Ключові слова: *O^6–метилгуанін–ДНК метилтрансфераза, MGMT, злоякісна гліома, хіміотерапія, алкілувальні препарати.*

O^6–метилгуанин ДНК–метилтрансферазы (MGMT) восстанавливает аддукты ДНК O^6–метилгуанин и O^6–хлороэтилгуанин, вызванные метилирующими и хлороэтилирующими противоопухолевыми препаратами, применяемыми при лечении рака. Эти аддукты цитотоксичны, и, учитывая неопровержимые доказательства того, что MGMT является ключевым фактором в защите от них, были разработаны способы по инактивации MGMT. Было показано, что некоторые препараты способны инактивировать MGMT в клетках, человеческих опухолевых моделях и у пациентов с гліомами. O^6–бензилгуанин был использован в клинических испытаниях. Хотя эти препараты не проявляют побочных эффектов как таковые, но они инактивируют MGMT в нормальных тканях и, следовательно, усиливают токсические побочные эффекты алкилирующих препаратов, что требует снижения дозы.

Ключевые слова*: O^6–метилгуанин–ДНК метилтрансфераза, MGMT, злокачественная глиома, химиотерапия, алкилирующие препараты.*

ВСТУП

Лікування злоякісних гліом залишається в наш час складною проблемою. Хірургічне видалення пухлини поєднують з променевою терапією та хіміотерапією. Незважаючи на це, лише половина хворих живе більше 1 року. Тому зараз у світі проводяться пошуки шляхів оптимізації методів лікування. Увагу дослідників привертають, зокрема, генетичні аспекти чутливості до променевої та хіміотерапії, маркери пухлини. Велика увага приділяється репаративному ензиму O^6–метилгуанін–ДНК метилтрансферазі (MGMT). Він усуває пошкодження ДНК алкілувальними речовинами, нівелюючи їх цитотоксичний ефект. Останній зумовив широке використання цих сполук як хіміопрепаратів для лікування солідних пухлин головного мозку, кишечнику, легень, деяких інших органів, меланоми та онкогематологічних захворювань (лейкози, ходжкінські та неходжкінські лімфоми, мієлома). У терапії злоякісних новоутворень нервової системи алкілувальні препарати займають головне місце, бо вони єдині здатні проникати через гематоенцефалічний бар'єр. Така здатність властива їм через певні, оптимальні для цього, показники активності, ліпофільності та молекулярної маси. Перелічуючи ці хіміопрепарати, потрібно назвати хлороетилувальні (кармустин, ломустин, німустин, семустин, фотемустин), метилювальні (темозоломід, прокарбазин, дакарбазин) та біфункціональні, що утворюють пошкодження, характерні для обох вищеназваних груп (циклофосфамід, вінкристин).

МЕТА ДОСЛІДЖЕННЯ

Завданнями нашого літературного пошуку були аналіз та узагальнення останніх досягнень у хіміотерапії злоякісних гліом з урахуванням експресії ензиму MGMT.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Механізм дії алкілувальних сполук

Під дією алкілувальних агентів відбувається метилювання білків та нуклеїнових кислот. Зокрема, метилювання різних ділянок ДНК призводить до утворення 13 різних аддуктів. Це явище хоч і є небажаним, проте не впливає потім на розпізнавання нуклеотидів ДНК–полімеразою і, таким чином, не змінює сенсу генетичного коду. Але метилювання тільки двох позицій оксигену з усіх (O^6–позиція гуаніну та O^4–позиція тиміну) призводить до хибного розпізнавання цих нуклеотидів під час реплікації і неправильного їх спарювання. Так, O^6–метилгуанін (утворюється лише до 8% серед усіх аддуктів) розпізнається як аденін і спарюється з тиміном замість цитозину. У результаті утворюються транзиції типу $GC \rightarrow AT$ [1]. Крім того, сам O^6–метилгуанін є доволі активною сполукою − він стимулює ферментативне гіпометилювання суміжного цитозину, приєднання транскрипційних факторів, рекомбінантну здатність хромосом, здатен інгібувати реплікацію шляхом порушення роз'єднання ланцюгів ДНК, якщо знаходиться в місцях початку реплікації чи у топоізомеразних сайтах. O^6–хлороетилгуанін, що утворюється під дією хлороетилювальних сполук, синтезується в значно менших кількостях, але має більшу спорідненість до цитозину ДНК і є більш токсичним [2]. Він індукує апоптоз уже після першого поділу клітин (з моменту обробки їх алкілувальною речовиною) під час S–фази клітинного циклу, бо не задіює механізми репарації помилкового спарювання. Створивши пару з цитозином, O^6–хлороетилгуанін поступово перебудовується, втрачає радикал і формує з ним міжланцюгове зшивання. Якщо цей дефект ДНК не буде усунуто репаративною системою поперечних зшивань, відбудеться реплікація з подальшим утворенням на місці зшивання дволанцюгового розриву. Такі розриви відновлюються різними репараційними системами (головним чином, ексцизійною та рекомбінантною) або індукують апоптоз [3]. Уже після реплікації пошкодження метилювальними сполуками активує механізми репарації помилкового спарювання, які коригують лише дочірній ланцюг і видаляють тимін у сформованих парах O^6–метилгуанін−тимін [4]. Про важливу роль у видаленні алкільних аддуктів репараційної системи помилкового спарювання свідчить те, що її інактивація у пухлинних клітинах (наприклад, через мутації або втрату експресії гена білка MSH6) на порядок підвищує їх чутливість до алкілувальних агентів [5]. Після подальшої реплікації у місцях пострепаративних помилок, що залишилися, формуються дволанцюгові розриви. При цитогенетичному дослідженні у таких пошкоджених клітинах виявляється збільшена кількість крос–лінкерних зв'язків та хромосомних аберацій [6]. Вищезгадані репаративні системи можуть бути активовані тільки за умови передування їм реплікації ДНК. Тому метилювальні сполуки індукують апоптоз лише після другого, третього і навіть четвертого клітинних поділів [7]. Доречно буде зауважити, що MGMT видаляє алкільні групи з O^6–позиції гуаніну на будь–якому етапі клітинного циклу між подвоєнням ДНК, але не одночасно з іншими репаративними механізмами.

Структура та функція MGMT

У людини ген *MGMT* знаходиться на теломерному кінці довгого плеча 10–ї хромосоми (хромосомна позиція 10q26). Він займає доволі велику ділянку розміром близько 170 кб, але транскрибується лише 950 нуклеотидами. Ген складається з п'яти екзонів (чотирьох кодуючих та одного некодуючого) і двох великих інтронів, що оточують третій екзон [8]. Промотер охоплює перший екзон та частину першого інтрона. У ньому мало TATA– і CAAT–боксів, багато CpG–ділянок,

є два глюкокортикоїдрозпізнавальних елементи [9]. Період напіврозпаду мРНК–транскриптів (довжина 0,95 кб) близько 10 годин. Сам фермент має молекулярну масу 24 кДа і складається з 207 амінокислот. Він доволі стабільний (період напіврозпаду більший ніж 24 години) [10]. Ензим має два домени, один з яких (N–термінальний) має істотне значення для стабільності та правильної орієнтації іншого (С–термінального) домену [11]. Людська MGMT несе три відкриті цистеїнові залишки на своїй поверхні: Цистеїн 5 і Цистеїн 24 приєднують йони цинку Zn^{2+}, а Цистеїн 150 знаходиться на з'єднувальній поверхні [12]. Розпізнавальна послідовність знаходиться у меншій канавці. Вона поєднується з пошкодженою нуклеїновою кислотою і, не змінюючи структуру останньої, забирає алкільний залишок. Швидкість реакції – 1 секунда при температурі +37^{o}C і оптимальному pH 7,8–8,5. Йони металів, таких, як Cd^{2+}, Cu^{2+}, Hg^{2+}, Zn^{2+}, Ag^{2+} та Pb^{2+}, інгібують активність MGMT. Подібну дію має і фосфорилювання ензиму, а дефосфорилювання лужними фосфатами, навпаки, підвищує його активність [13]. Одна молекула ензиму забирає один залишок без потреби у будь–якому кофакторі. При цьому сам білок незворотно інактивується, бо S–алкілцистеїн не здатен знову перетворюватися на цистеїн [14]. Інактивований ензим потім зв'язується з убіквітином і підлягає протеосомно–опосередкованій деградації. Цей протеоліз є енергозалежним, тому стимулюється АТФ та йонами Mg^{2+} [15]. Є дані, що саме інактивована людська MGMT зв'язується з естрогеновими рецепторами, які через активацію транскрипції стимулюють проліферацію клітин, і пригнічує їх функцію [16].

MGMT переносить алкільний залишок від O^6–позиції гуаніну ДНК на свій активний 145–й цистеїновий акцепторний сайт [17]. Алкільним залишком можуть бути метил–, етил–, бензил–, н–пропіл–, н–бутил–, ізо–пропіл–, ізо–бутил–, 2–хлороетил–, 2–гідроксіетил–, піридилоксибутил– [18]. Швидкість реакції зменшується із розміром алкільного залишку [19]. Також є дані щодо активності ензиму стосовно аналогічних пошкоджень O^4–позиції тиміну ДНК, який під час реплікації розпізнається як цитозин і спарюється з гуаніном замість аденіну. У результаті утворюються транзиції типу TA→CG [20]. Швидкість реакції відновлення тиміну значно менша за швидкість реакції з гуаніном [21], хоча O^4–метилтимін (як і всі метильовані піримідини взагалі) вважають більшим індуктором мутацій, ніж O^6–метилгуанін [22].

Рівень MGMT у різних типах клітин

У нормальних клітинах рівень експресії MGMT залежить від їх типу [23]. Залежно від наявності чи відсутності ензиму клітини прийнято ділити на Mer+ та Mer− відповідно. У ссавців найвищі рівні ензиму спостерігаються в гепатоцитах, дещо нижчі – у клітинах легень та нирок. Особливо низька експресія MGMT виявляється у тканинах головного мозку [24] та кісткового мозку [25]. Саме з цим пов'язана висока чутливість гемопоетичних клітин до алкілувальних хіміопрепаратів, що проявляється значною мієлосупресією. Хоч рівень MGMT обумовлений типом тканин та клітин, експресія цього ензиму не є стабільним показником та варіює у різних індивідів і навіть у однієї особи у різний час. Під час дослідження довгоживучих клітин периферичної крові було встановлено, що рівень MGMT коливався у різних людей та впродовж тривалого часу в декілька разів [26]. Аналогічні дані з індивідуальної варіабельності рівня ензиму отримані при вивченні інших тканин (легені, кишечник) [27]. Не встановлено залежності між рівнем MGMT у тканинах, статтю чи віком. Єдиним органом, де така кореляція відмічається, є мозок. При дослідженні гістологічно нормальних тканин головного мозку дорослих пацієнтів відсутність експресії MGMT виявлена у більшості з них (60 –63 %). У дітей, навпаки, нормальні клітини головного мозку зазвичай експресують MGMT [28].

Під час онкотрансформації у клітині часто змінюється рівень експресії гена MGMT, як правило, у бік збільшення [29]. Так, підвищення активності MGMT

порівняно з нормальними тканинами відмічається у пухлинах легень, мозку та кишечнику. Наприклад, у пухлинах мозку середній рівень ензиму значно вищий за середній рівень його у нормальній тканині, а відсоток клітин, що не експресують MGMT, − удвічі нижчий [30, 31]. У пухлинах рівень MGMT відрізняється надзвичайною варіабельністю між окремими пухлинами та порівняно з нормальними тканинами. Імуногістохімічними дослідженнями можна виявити відмінності у рівні ензиму різних ділянок однієї пухлини, первинної пухлини та її метастазів [32]. Вікових особливостей не відмічається для більшості типів пухлин. Винятком, як і в разі нормальної тканини, є мозок. Найбільш високі рівні активності ензиму у злоякісних гліомах спостерігаються у дітей 3 –12 років [33]. Деякі автори зазначаютьють, що пухлини з високим ступенем злоякісності мають вищі рівні ензиму, ніж із низьким [34].

Існує чітка кореляція між рівнем MGMT у клітині та її чутливістю до цитотоксичного ефекту алкілувальних агентів [35]. Це підтверджено на клітинних лініях, ксенографтах пухлин, нокаутних лініях мишей та пухлинах людини. Хворі на гліому та меланому з Mer− фенотипом клітин пухлини зазвичай мали кращі результати хіміотерапії, ніж хворі з Mer+ фенотипом пухлин [36]. У пацієнтів, які мали гліобластому з високою активністю MGMT (більше 30 фмоль/мг), ефективність лікування алкілувальними хіміопрепаратами була низькою [37]. Те саме можна сказати про нейроендокринні пухлини, Mer+ фенотип яких асоціювався з поганими результатами терапії темозоломідом [38]. На жаль, лише третина пухлин є Mer−, і тому терапія онкозахворювань залишається складною проблемою.

Гіперметилювання промотору MGMT – механізм епігенетичної регуляції експресії

Дослідження показують, що ген MGMT не схильний до мутацій та делецій, тому стабільні зміни його експресії здебільшого пов’язані з епігенетичними механізмами регуляції функції геному. У людини серед таких механізмів головним вважається метилювання цитозину ДНК. Метилювання в нормі неметильованих CpG ділянок промоторів генів–онкосупресорів та ДНК–репаруючих генів призводить до втрати їх експресії через блокування транскрипції та підвищення частоти онкогенної трансформації клітин. Подібні генетичні зміни виявлені як у клітинах первинних пухлин, так і в клітинах стабільних пухлинних ліній [39]. Таким чином, відзначається наявність кореляції між статусом метилювання промотору гена MGMT, відсутністю мРНК та білка [40]. Це підтверджується тим фактом, що лікування з використанням деметилювальних препаратів відновлює експресію гена в Mer− клітинах [41]. Разом із тим метилювання кодуючої послідовності гена MGMT підвищує його експресію [42]. Незалежно від методу лікування хворі з гіперметилюванням промотору у клітинах пухлини мали більшу тривалість життя, ніж хворі з неметильованим промотором гена MGMT при однаковому лікуванні [43, 44]. Саме тому статус метилювання промотору MGMT пухлинних клітин при лікуванні хіміопрепаратами вважається головним прогностичним фактором. Він не пов’язаний із попереднім лікуванням [45] і є більш важливим, ніж вік, стать пацієнта, тип пухлини та стадія захворювання [46, 47]. При аналізі середньої тривалості життя хворих на гліобластому після лікування лише променевою терапією та променевою терапією в комбінації з темозоломідом з’ясувалося, що при Mer− фенотипі пухлини комбінована терапія давала медіану тривалості життя 21,7 місяця проти 15,3 місяця монотерапії. У хворих із Mer+ фенотипом пухлини істотної різниці між середньою тривалістю життя цих двох груп не спостерігалося [48].

Проте відсутність експресії гена MGMT та гіперметилювання його промотору не є тотожними поняттями. Деякі дослідники навіть вважають їх зовсім не пов’язаними один з одним. Так, кореляції між метилюванням та експресією не виявлено при вивченні зразків гліом [49] та меланом [50]. За результатами інших праць серед Mer–позитивних пухлин 10 % мають гіперметилювання промотору MGMT [51]. Є

праці, в яких зазначається важливість рівня метилювання CpG–острівців [52]. Проте більшість авторів вважають статус метилювання промотору достовірним показником відсутності експресії MGMT і прогнозу лікування. Однак не слід думати, що метилювання MGMT є єдиним фактором успішності хіміотерапії. Частина гліом із гіперметилюванням промотору MGMT та фенотипом Mer– резистентні до алкілувальних препаратів [53]. При лікуванні рецидивів гліобластоми кореляції між метилюванням промотору MGMT та позитивним ефектом лікування темозоломідом чи прокарбазином не виявлено [54]. Пояснюється це тим, що при епігенетичній інактивації цього репаративного ензиму накопичується критична кількість мутацій в генах–онкосупресорах. Це, у свою чергу, впливає на проліферативні якості пухлинних клітин [55]. MGMT–дефіцитні пухлини часто більш чутливі до лікування і без використання алкілувальних сполук [56]. Крім того, стійкість до цих препаратів обумовлюється декількома репаративними механізмами, і висока активність будь–якого з них приводить до однакових наслідків [57].

Інгібітори активності ензиму

Як спроба подолати хіміорезистентність пухлин із фенотипом Mer+ було запропоновано використовувати різні похідні гуаніну, що мають більшу спорідненість з MGMT, ніж O^6–метилгуанін. Такі сполуки називаються інгібіторами зв'язування, або псевдосубстратами MGMT. Вони взаємодіють з ензимом за типом конкурентного зв'язування і незворотно інактивують його. Клітині потрібен певний час, щоб синтезувати активний фермент de novo, і на цей період вона стає чутливою до алкілувальних агентів. Доцільність такого підходу пояснюється тим, що MGMT не діє вибірково на O^6–метилгуанін, включений у ДНК, а так само добре поєднується і з вільним O^6–метилгуаніном [58], але він виявився неефективним вже на перших стадіях клінічних випробувань (на пухлинах *in vitro*) [59]. Він має досить низьку спорідненість з MGMT, тому повільно інактивує його і тільки у дуже високих концентраціях. Зважаючи на погану розчинність, це робить практичне використання цього інгібітора недоцільним.

O^6–бензилгуанін виявився ефективнішим за О6–метилгуанін приблизно у 2000 разів. Бензольна група краще вступає у міжмолекулярні реакції через стабілізацію електронної щільності фенольним кільцем у перехідному стані. O^6–бензилгуанін майже повністю інактивує цитоплазматичну і ядерну MGMT усього за декілька хвилин, а рівень ферменту починає відновлюватися лише за 48 годин. Швидкість реакції пропорційна концентрації O^6–бензилгуаніну і збільшується у наявності ДНК [60]. Реакція відбувається повільніше, ніж із метильованою ДНК через те, що O^6–бензилгуанін має знижену здатність до взаємодії з ДНК–зв'язувальним доменом MGMT і утворює слабкий водневий зв'язок на активному сайті ензиму. Зв'язування з гідрофобними кишенями навколо активного сайта MGMT лімітує швидкість реакції інактивації [61].

O^6–бензилгуанін створює високі концентрації у плазмі крові. Він добре проходить через гематоенцефалічний бар'єр і накопичується у високих концентраціях у ліквор, що обумовлює його ефективність в оптимізації лікування внутрішньомозкових пухлин. Метаболізується за участі печінки та нирок. У печінці приблизно третина речовини окиснюється альдегідоксидазою та двома ізоформами цитохрому P450 (CYP1A2, CYP3A4) у О6–бензил–8–оксигуанін, який теж здатен накопичуватися у тканині забар'єрних органів та інгібувати MGMT. А він, у свою чергу, розкладається ізоформами CYP1A1 та CYP1A2 цитохрому P450 до 8–оксигуаніну. Усі ці три речовини виводяться нирками із сечею [62]. При вивченні фармакокінетики O^6–бензилгуаніну та O^6–бензил–8–оксигуаніну у щурів, нелюдиноподібних мавп, дорослих людей та дітей виявлені деякі відмінності. Загалом період напіврозпаду O^6–бензилгуаніну при внутрішньовенному введенні становить близько 1 –1,6 години і суттєво довший, ніж при інтравентрикулярному введенні. O^6–бензил–8–оксигуанін довше зберігає високі концентрації у плазмі крові та ліквор. У дорослих

O^6–бензилгуанін і його похідні метаболізуються значно швидше, ніж у дітей [63].

Висока ефективність O^6–бензилгуаніну була доведена на ксенографтних моделях пухлин. Модель із ксенотрансплантатом гліоми SF767 показала високу чутливість до кармустину (15 мг/кг) у комбінації з O^6–бензилгуаніном (80 мг/кг). Останній вводився за 12 годин до кармустину [64]. Аналогічні результати дала ця комбінація препаратів на ксенографтах медулобластоми [65] і карциноми підшлункової залози [66]. У крис із MGMT–позитивним мозковим ксенотрансплантатом гліоми F98 значне пригнічення росту пухлини спостерігалося при поєднанні кармустину з O^6–бензилгуаніном (50 мг/кг) порівняно з введенням кожного препарату окремо чи зовсім без них [67]. Цікаво, що інгібітор підвищував чутливість до алкілувальних препаратів MGMT–дефіцитних ксенотрансплантатів. Так, гліомні моделі D–54 MG та D–245 MG ставали більш чутливими до кармустину [68]. На тваринах проводилися експерименти з локальним введенням O^6–бензилгуаніну як варіант подолання його побічних ефектів. Безтимусним щурам із мозковим трансплантатом гліоми D–456 MG інтракраніально вводили інгібітор у низьких дозах (2,5 –10 мг/кг) у поєднанні з високими дозами кармустину (25 мг/кг). У результаті тварини мали вдвічі довшу тривалість життя, ніж при пероральному способі введення O^6–бензилгуаніну [69].

Клінічні випробування O^6–бензилгуаніну

O^6–бензилгуанін уже пройшов велику кількість клінічних випробувань I та II фаз на людях. Метою I фази випробувань був підбір терапевтичних доз. Виявилося, що повна інактивація MGMT у пухлинних клітинах відбувалася при введенні 100 –120 мг/м^2 [70]. При цьому знижувалися максимальні переносні дози хіміопрепаратів: кармустину – в 3 рази (до 40 мг/кг) [71], а темозоломіду – незначно. Гарний ефект показали схеми з болюсним введенням інгібітора 30 мг/м^2 на день безперервно впродовж двох днів [72]. У дітей із внутрішньомозковими пухлинами дози O^6–бензилгуаніну були ідентичними дозам у дорослих, але відрізнялися дози хіміопрепаратів. Максимально толерантною дозою кармустину була 58 мг/м^2, а темозоломіду – 400 –560 мг/м^2 [73] і 55 мг/м^2 на день при болюсному введенні [74]. В усіх випадках обмеження доз було пов'язане зі значною мієлосупресією [75], тому у деяких випадках проводилася генна терапія. Під час II фази клінічних випробувань оцінювалася безпечність комбінованої терапії. У хворих із рецидивом гліобластоми при лікуванні кармустином з інгібітором 6–місячна виживаність становила 82 %, річна – 74 % і дворічна – 10 % [76]. Схема з темозоломідом замість кармустину дала подібні результати [77]. Незважаючи на зменшення доз алкілувальних препаратів, у половини пацієнтів спостерігалося пригнічення гемопоезу III ступеня. При болюсному введенні O^6–бензилгуаніну мієлосупресія виражена дещо менше [78]. Локальне введення препарату є більш перспективним варіантом. Інтрацеребральна інфузія інгібітора у комбінації з прийманням темозоломіду перорально продовжувала тривалість життя хворих, але схема виявилася непридатною для довготривалого лікування [79]. II фазу випробувань з гарними результатами вже пройшла комбінація системного введення O^6–бензилгуаніну з гліаделом (поліфепросаном 20). Це внутрішньомозковий імплант кармустину, який не дає значного пригнічення гемопоезу, але часто має місцеві побічні ефекти у вигляді інфекцій та запалень мозкової тканини [76].

Використання O^6–бензилгуаніну при лікуванні онкологічних хворих має суттєвий побічний ефект. Відомо, що через низький рівень MGMT у гемопоетичних клітинах вони дуже чутливі до дії алкілувальних сполук. Пригнічення гемопоезу (лейкопоезу і, меншою мірою, тромбоцитопоезу) є індивідуальним, але дозозалежним і посилюється з підвищенням доз хіміопрепаратів. У перспективі можуть з'явитися віддалені ускладнення лікування − вторинні лейкози і мієлодисплазії [80]. Використання O^6–бензилгуаніну посилює ступінь пригнічення кровотворення і збільшує частоту вторинних пухлин. Мутантні форми MGMT, що резистентні до O^6–бензилгуаніну, використовуються в таких випадках як генна терапія. За

допомогою ретровірусних та лентивірусних векторів мутантні гени (G156, P140/G156) вводяться у гемопоетичні клітини, які потім пересаджуються пацієнту незадовго до використання інгібітора [81]. Пригнічення гемопоезу у такому випадку не спостерігається, а власні нетрансдуковані клітини потім відновлюються [82].

ВИСНОВКИ

Ензим MGMT має велике значення у захисті клітини від дії алкілувальних агентів. Доведено, що він відіграє важливу роль у чутливості пухлини до хіміопрепаратів і, зрештою, результатах лікування. Уже показано, що потрібно визначати рівень MGMT у пухлинних клітинах для підбору ефективної схеми лікування. Розроблені методи впливу на рівень цього ензиму. Великі надії покладаються на O^6–бензилгуанін, незважаючи на складність у його використанні. Є всі підстави вважати, що за допомогою цього інгібітора вдасться подолати резистентність багатьох гліом до хіміопрепаратів. Без сумніву, це не вирішить повністю проблему лікування злоякісних гліом, але дозволить наблизитися до цього.

SUMMARY

THE ROLE OF REPARATIVE ENZYME O^6–METYLGUANINE–DNA METYLTRANSFERASE IN CHEMOTHERAPY OF MALIGNANT GLIOMAS"

Shaposhnyk L. A., Glavatskiy A. Ya., Ahmad Hassan, Kuzenko Y. V.

O^6–methylguanine–DNA methyltransferase (MGMT) repairs the cancer chemotherapy–relevant DNA adducts of O^6–methylguanine and O6–chloroethylguanine, induced by methylating and chloroethylating anticancer drugs, respectively. These adducts are cytotoxic, and given the overwhelming evidence that MGMT is a key factor in resistance to them, strategies for inactivating MGMT have been pursued. A number of drugs have been shown to inactivate MGMT in cells, human tumour models and patients with gliomas, O^6–benzylguanine have been used in clinical trials. While these agents show no side effects per se, they also inactivate MGMT in normal tissues and hence exacerbate the toxic side effects of the alkylating drugs, requiring dose reduction.

Key words: *O^6–methylguanine–DNA methyltransferase, MGMT, malignant glioma, chemoteraphy, alkylating drugs.*

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Kaina B. Mechanisms and consequences of methylating agent–induced SCEs and chromosomal aberrations: a long road traveled and still a far way to go / B. Kaina // Cytogenet. Genome Res. – 2004. – N 104. – P. 77–86.
2. DNA cross–linking and monoadduct repair in nitrosourea–treated human tumour cells / L. S. Erickson, G. Laurent, N. A. Sharkey [et al.] // Nature (Lond.). – 1980. – N 288. – P. 727 –729.
3. Differential sensitivity of malignant glioma cells to methylating and chloroethylating anticancer drugs: p53 determines the switch by regulating xpc, ddb2, and DNA doublestrand breaks / L. F. Batista, W. P. Roos, M. Christmann [et al.] // Cancer Res. – 2007. – N 67. – P. 11886–11895.
4. Mechanisms of human DNA repair: an update / M. Christmann, M. T. Tomicic, W. P. Roos [et al.] // Toxicology. – 2003. – N 193. – P. 3–34.
5. Loss of the mismatch repair protein MSH6 in human glioblastomas is associated with tumor progression during temozolomide treatment / D. P. Cahill, K. K. Levine, R. A. Betensky [et al.] // Clin. Cancer Res. – 2007. – Vol. 13(7). – 2038–2045.
6. Chromosomal instability, reproductive cell death and apoptosis induced by O6–methylguanine in Mex–, Mex+ and methylation–tolerant mismatch repair compromised cells: facts and models / B. Kaina, A. Ziouta, K. Ochs [et al.] // Mutat. Res. – 1997. – Vol. 381(2). – P. 227–241.
7. Quiros S. Processing of O^6–methylguanine into DNA double–strand breaks requires two rounds of replication whereas apoptosis is also induced in subsequent cell cycles / S. Quiros, W. P. Roos, B. Kaina. // Cell Cycle. – 2010. – N 9. – P. 168–178.
8. Organization and expression of the human gene for O6–methylguanine–DNA methyltransferase/ Y. Nakatsu, K. Hattori, H. Hayakawa [et al.] // Mutat. Res. – 1993. – N 293(2). – P. 119–132.
9. Characterization of the promoter region of the human O6–methylguanine–DNA methyltransferase gene / L. C. Harris, P. M. Potter, K. Tano [et al.] // Nucleic Acids Res. – 1991. – N 19. – P. 6163–6167.
10. Inducibility of the DNA repair gene encoding O6–methylguanine–DNA methyltransferase in mammalian cells by DNA–damaging treatments / G. Fritz, K. Tano, S. Mitra // Mol. Cell. Biol. – 1991. – N 11. – P. 4660–4668.
11. Kanugula S. Alkylation damage repair protein O6–alkylguanine–DNA alkyltransferase from the hyperthermophiles Aquifex aeolicus and Archaeoglobus fulgidus / S. Kanugula, A. E. Pegg // Biochem J. – 2003. – Vol. 375 (9, Pt. 2). – P. 449–455.

12. Active and alkylated human AGT structures: a novel zinc site, inhibitor and extrahelical base binding / D. S. Daniels, C. D. Mol, A. S. Arvai [et al.] // EMBO J. – 2000. – Vol. 19 (7). – P. 1719–1730.
13. Protein phosphorylation is a regulatory mechanism for O^6–alkylguanine–DNA alkyltransferase in human brain tumor cell / K. S. Srivenugopal, S. R. S. Mullapudi, J. Shou [et al.] // Cancer Res.– 2000.– Vol. 60 (2).– P. 282–287.
14. Pegg A. E. Structure, function and inhibition of *O*^{6}–alkylguanine–DNA alkyltransferase / A. E. Pegg, M. E. Dolan, R. C.Moschel // Progr. Nucleic Acid Res. Mol. Biol. – 1995. – N 51. – P. 167–223.
15. Ubiquitination–dependent proteolysis of O6–methylguanine–DNA methyltransferase in human and murine tumor cells following inactivation with O^6–benzylguanine or 1,3–bis(2–chloroethyl)–1–nitrosourea / K. S. Srivenugopal, X. H. Yuan, H. S. Friedman [et al.] // Biochemistry. – 1996. – Vol. 35 (4). – P. 1328–1334.
16. The modified human DNA repair enzyme O(6)–methylguanine–DNA methyltransferase is a negative regulator of estrogen receptor–mediated transcription upon alkylation DNA damage / A. K. Teo, H. K. Oh, R. B. Ali [et al.] // Mol. Cell. Biol. – 2001. – N 21. – P. 7105–7114.
17. Molecular analysis of O^6–substituted guanine–induced mutagenesis of ras oncogenes / G. Mitra, G. T. Pauly, R. Kurman [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.–1989.– N 86 (28).–P. 8650–8654.
18. Synthesis of DNA oligonucleotides containing site–specifically incorporated O^6–[4–oxo–4–(3–pyridyl)butyl]guanine and their reaction with O^6–alkylguanine–DNA alkyltransferase / L.Wang, T. E. Spratt, A. E.Pegg // Chem. Res. Toxicol. – 1999. – N 12. – P. 127–131.
19. Pegg A. E. Mammalian O^6–alkylguanine–DNA alkyltransferase: regulation and importance in response to alkylation carcinogenic and therapeutic agents / A. E. Pegg // Canser Res.– 1990. – Vol. 50 (25).–P. 6119–6122.
20. Repair of *O*4–Alkylthymine by *O*6–Alkylguanine–DNA Alkyltransferases / Q. Fang, S. Kanugula, J. L. Tubbs [et al.]// J. Biol. Chem. – 2010. – N 285 (11). – P. 8185–8195.
21. Dolan M. E. Use of a dodecadeoxynucleotide to study of the O^4–methylthymine lesion / M. E. Dolan, M. Oplinger, A. E. Pegg // Mutation Res. – 1988. – Vol. 193 (2). – P. 131–137.
22. Pauly G. T. Mutagenesis by O(6)–methyl–, O(6)–ethyl–, and O(6)–benzylguanine and O(4)–methylthymine in human cells: effects of O(6)–alkylguanine–DNA alkyltransferase and mismatch repair / G. T. Pauly, R. C. Moschel // Chem. Res. Toxicol. – 2001. – Vol. 14 (7). – P. 894–900.
23. O^6–Alkylguanine–DNA Alkyltransferase activity in normal human tissues and cells / R. C. Grafstrom, A. E. Pegg, B. F. Trump [et al.] // Cancer Res. – 1984. – N 44. – P. 2855–2857.
24. Wiestler O. O6–Alkylguanine–DNA alkyltransferase activity in human brain and brain tumors / O. Wiestler, P. Kleihues, A. E. Pegg // Carcinogenesis. – 1984. – N 5. – P. 121 – 124.
25. Long–time expression of DNA repair enzymes MGMT and APE in human peripheral blood mononuclear cells / K. Janssen, U. Eichhorn–Grombacher, K. Schlink [et al.] // Arch Toxicol. – 2001. – N 75. – P. 306–312.
26. Variability and regulation of O(6)–alkylguanine–DNA alkyltransferase / G. P. Margison, A. C. Povey, B. Kaina [et al.] // Carcinogenesis. – 2003. – N 24. – P. 625–635.
27. Determinants of O6–alkylguanine–DNA alkyltransferase activity in normal and tumour tissue from human colon and rectum /A. C. Povey, C. N. Hall, D. P. Cooper [et al.] //Int. J. Cancer.– 2000. – N 85. – P. 68–72.
28. O^6–methylguanine–DNA methyltransferase in pediatric primary brain tumors / M. S. Bobola, M. S. Berger, R. G. Ellenbogen [et al.] // Clin. Cancer Research. – 2001. – N 7. – P. 613–619.
29. Activity of the DNA repair protein O^6–methylguanine–DNA methyltransferase in human tumor and corresponding normal tissue / I. Preuss, S. Haas, U. Eichhorn [et al.] // Cancer Detect. Prev. – 1996. – N 20. – P. 130–136.
30. O^6–metylguanine–DNA metyltransferase–deficient phenotype in human gliomas: Frequency and time to tumor progression after alkylating agent–based chemotherapy/ J. R. Silber, A. Blank, M. S. Bobola [et al.] // Clin. Cancer Res. – 1999. – N 5. – P. 807–814.
31. Lack of the DNA repair protein O6–metylguanine–DNA metyltransferase in histologically normal brain adjancent to primary human brain tumor / J. R. Silber, A. Blank, M. S. Bobola [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1996. – N 93. – P. 6941–6946.
32. Heterogeneity of O6–alkylguanine DNA–alkyltransferase expression in human breast tumours / M. J. Clemons, M. C. Bibby, H. El Teraifi [et al.] // Br. J. Cancer. – 2002. – N 86. – P. 1797–1802.
33. O^6–methylguanine–DNA methyltransferase in pediatric primary brain tumors: relation to patient and tumor characteristics / M. S. Bobola, M. S. Berger, R. G. Ellenbogen [et al.] // Clin. Cancer Res. – 2001. – N 7. – P. 613–619.
34. Floridi A. Modulation of gli\ycolysis in neoroepithelial tumors / A. Floridi, M. G. Paggi, M. Fanciulli // J. Neurosurg. Sci. – 1989. – N 33. – P. 55–64.
35. Correlation between O^6–methylguanine–DNA methyltransferase and survival in inoperable newly diagnosed glioblastoma patients treated with neoadjuvant temozolomide / O. L. Chinot, M. Barriy, S. Fuentes, [et al.] // J. Clin. Oncol. – 2007. – N 25. – P. 1470–1475.
36. MGMT in primary and recurrent human glioblastomas after radiation and chemotherapy and comparison with p53 status and clinical outcome / D. Wiewrodt, G. Nagel, N. Dreimuller [et al.] // Int. J. Cancer. – 2008. – N 122. – P. 1391–1399.
37. O^6–methylguanine DNA Methyltransferase deficiency and response to temozolomide–basedtherapy in patients with neuroendocrine tumors / M. H. Kulke, J. L. Hornick, C. Frauenhoffer [et al.] // Clin. Cancer Res. – 2009. – Vol.15(1). – P. 338–345.

38. Baylin S. B. DNA hypermethylation in tumorogenesis: epigenetics joins genetics / S. B. Baylin, J. G. Herman // Trends Genet. – 2000. – N 16. – P. 168–174.
39. DNA repair gene O^6–methylguanine–DNA methyltransferase: Promoter hypermethylation associated with decreased expression and G:C to A:T mutations of *p53* in brain tumors / D. Yin, D. Xie, W. K. Hofmann [et al.] // Mol. Carcinogen. – 2003. – Vol. 36(1). – P. 23–31.
40. Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours / M. Esteller, G. Gaidano, S. N. Goodman [et al.] // J. Natl. Cancer Inst. – 2002. – Vol. 94 (1).– P. 26–32.
41. Acquired resistance of melanoma cells to the antineoplastic agent fotemustine is caused by reactivation of the DNA repair gene MGMT/ M. Christmann, M. Pick, H. Lage [et al.] // Int. J. Cancer. – 2001. – N 92. – P. 123–129.
42. Correlation of O^6–Methylguanine Methyltransferase (MGMT) promoter methylation with clinical outcomes in glioblastoma and clinical strategies to modulate MGMT activity/ M. E. Heri, L. Kiu, J. G. Herman, [et al.] // J. Clin. Oncol. – 2008. – Vol. 26 (25). – P. 4189–4199.
43. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma / M. E. Hegi, A. C. Diserens, T. Gorlia [et al.] // N. Engl. J. Med. – 2005. – N 352. – P. 997–1003.
44. O6–methylguanine–DNA methyltransferase methylation in serum and tumor DNA predicts response to 1,3–Bis (2–chloroethyl)–1–nitrosourea but not to temozolamide plus cisplatin in glioblastoma multiforme / C. Balana, J. L. Ramirez, M. Taron [et al.] // Clinical Cancer Research. – 2003. – N 9. – P. 1461–1468.
45. Inactivation of the DNA–repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents / M. Esteller, J. Garcia–Foncillas, E. Andion [et al.] // N. Engl. J. Med. – 2000. – Vol. 343 (19). – P. 1350–1354.
46. Correlation of tumor O^6–methylguanine–DNA methyltransferase levels with survival of malignant astrocytoma patients treated with bis–chloroethylnitrosourea: a southwest oncology group study / Jaeckle K. A., Eyre H. J., Townsend J. J., Schulman S., Knudson H. M., Belanich M., Yarosh D. B., Bearman S. I., Giroux D. J., Schold S. C. // J. Clin. Oncol. – 1998. – Vol. 16 (10). – P. 3310–3315.
47. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma / M. E. Heri, A. C. Diserens, T. Gorlia [et al.] // N. Engl. J. Med. – 2005. – Vol. 352 (10). – P. 997–1003.
48. O^6–Methylguanine DNA methyltransferase protein expression in tumor cells predicts outcome of temozolomide therapy in glioblastoma patients / S. Spiegl–Kreinecker, C. Pirker, M. Filipits [et al.] // Neuro Oncol. – 2010. – N 12. – P. 28–36.
49. Genomic and molecular profiling predicts response to temozolomide in melanoma / C. K. Augustine, J. S. Yoo, A. Potti, [et al.] // Clin Cancer Res. – 2009. – N 15. – P. 502–510.
50. Promoter methylation and polymorphisms of the MGMT gene in glioblastomas: A population–based study / I. Zawlik, S. Vaccarellaa, D. Kitaa [et al.] // Neuroepidemiology. – 2009.– N 32.– P. 21–29.
51. Promoter methylation analysis of O^6–methylguanine–DNA methyltransferase in glioblastoma: detection by locked nucleic acid based quantitative PCR using an imprinted gene (SNURF) as a reference / L. Morandi, E. Franceschi, D. de Biase [et al.] // BMC Cancer. – 2010. – 10:48.
52. Quantitative analysis of O6–alkylguanine–DNA alkyltransferase in malignant glioma/ J. A. Maxwell, S. P. Johnson, J. A. Quinn [et al.] // Mol. Cancer Ther. – 2006. – Vol. 5 (10). – P. 2531–2539.
53. CpG island hypermethylation of the DNA repair enzyme methyltransferase predicts response to temozolomide in primary gliomas / M. F. Paz, R. Yaya–Tur, I. Rojas–Marcos [et al.] // Clinical Cancer Research. – 2004. – N10. – P. 4933–4938.
54. Esteller M. Generating mutations but providing chemosensitivity: the role of O^6–methylguanine DNA methyltransferase in human cancer / M. Esteller, J. G. Herman // Oncogene. – 2004. – N 23. – P. 1–8.
55. Promoter hypermethylation of the DNA repair gene O^6–methylguanine–DNA methyltransferase is an independent predictor of shortened progression free survival in patients with low–grade diffuse astrocytomas / C. Komine, T. Watanabe, Y. Katayama, [et al.] // Brain Pathol.– 2003. – N 13. – P. 176–184.
56. Frosina G. DNA repair and resistance of gliomas to chemotherapy and radiotherapy/ G. Frosina // Mol. Cancer Res. – 2009. – Vol. 7 (7). – P. 989–999.
57. Lips J. Repair of O^6–methylguanine is not affected by thymine base pairing and the presence of MMR protein / J.Lips, B.Kaina // Mutat. Res. – 2001. – N 487. – P. 59–66.
58. Depletion of O^6–alkylguanine–DNA alkyltransferase activity in mammalian tissues and human tumor xenografts in nude mice by treatment with O^6–methylguanine / M. E. Dolan, G. L. Larkin, H. F. English [et al.] // Cancer Chemotherapy and Pharmacology. – 1989. – Vol. 25 (2). – P. 103–108.
59. Prolonged depletion of O^6–methylguanine DNA methyltransferase activity following exposure to O^6–benzylguanine with or without streptozotocin enhances 1,3–bis(2–chloroethyl)–1–nitrosourea sensitivity in vitro / U. K. Marathi, R. A. Kroes, M. E.Dolan [et al.] // Cancer Res. – 1993. – Vol. 53 (18). – P. 4281–4286.
60. Mutations in human O^6–alkylguanine–DNA alkyltransferase imparting resistance to O6–benzylguanine / T. M. Crone, K. Goodtzova, S. Edara, A. E. Pegg [et al.] // Cancer Res. – 1994.– Vol. 54 (23) – P. 6221–6227.
61. Mechanism of inactivation of human O^6–alkylguanine–DNA alkyltransferase by O6–benzylguanine / A. E. Pegg, M. Boosalis, L. Samson [et al.] // Biochemistry. – 1993. – Vol. 32 (45). – P. 11998–12006.
62. Plasma and cerebrospinal fluid pharmacokinetics of O^6–benzylguanine and time course of peripheral blood mononuclear cell O^6–methylguanine–DNA methyltransferase inhibition in the nonhuman primate / S. L. Berg, S. L. Gerson, K. Godwin [et al.] //Cancer Res. – 1995. – Vol. 55 (20). – P. 4606–4610.
63. O6–benzylguanine in humans: metabolic, pharmacokinetic, and pharmacodynamic findings / M. E. Dolan, S. K. Roy, A. A. Fasanmade [et al.] // J. Clin. Oncol. – 1998. – N 16. – P. 1803–1810.
64. Marathi U. K. Anti–neoplastic activity of sequenced administration of O6–benzylguanine, streptozotocin, and

1,3–bis(2–chloroethyl)–1–nitrosourea in vitro and in vivo / U. K. Marathi, M. E. Dolan, L. C. Erickson // Biochem. Pharmacol. – 1994. – N 48. – P. 2127–2134.
65. Treatment of subcutaneous and intracranial brain tumor xenografts with O6–benzylguanine and 1,3–bis (2–chloroethyl)–1–nitrosourea / G. M. Felker, H. S. Friedman, M. E. Dolan [et al.] // Cancer Chemother Pharmacol. – 1993. – N 32. – P. 471–476.
66. Sensitization of pancreatic tumor xenografts to carmustine and temozolomide by inactivation of their O^6–methylguanine–DNA methyltransferase with O^6–benzylguanine or O^6–benzyl–20–deoxyguanosine / D. M. Kokkinakis, M. M. Ahmed, D. Chendil [et al.] // Clin. Cancer Res. –2003. – N 9. – P. 3801–3807.
67. O^6–benzylguanine potentiates the antitumoreffect of locally delivered carmustine against an intracranial rat glioma / L. D. Rhines, P. Sampath, M. E. Dolan [et al.] // Cancer Res. – 2000.– N 60. – P. 6307–6310.
68. O^6–benzylguanine–mediated enhancement of nitrosourea activity in Mer—central nervous system tumor xenografts—implications for clinical trials. / S. T. Keir, M. E. Dolan, A. E. Pegg [et al.] // Cancer Chemother Pharmacol. – 2000. – N 45. – P. 437–440.
69. Intraarterial O^6–benzylguanine enables the specific therapy of nitrosourearesistant intracranial human glioma xenografts in athymic rats with 1,3–bis (2–chloroethyl)–1–nitrosourea / S. N. Kurpad, M. E Dolan, R. E. McLendon [et al.] // Cancer Chemother. Pharmacol. – 1997. –N 39. – P. 307–316.
70. Phase I trial of polifeprosan 20 with carmustine implant plus continuous infusion of intravenous O^6–benzylguanine in adults with recurrent malignant glioma: new approaches to brain tumor therapy CNS consortium trial / J. Weingart, S. A. Grossman, K. A. Carson [et al.] // J. Clin. Oncol. – 2007. – N 25. – P. 399–404.
71. Phase I trial of carmustine plus O6–benzylguanine for patients with recurrent or progressive malignant glioma / H. S. Friedman, J. Pluda, J. A. Quinn, [et al.] // J. Clin. Oncol. – 2000. – N 18. – P. 3522–3528.
72. Phase I trial of temozolomide plus O6–benzylguanine for patients with recurrent or progressive malignant glioma / J. A. Quinn, A. Desjardins, J. Weingart. [et al.] // J. Clin. Oncol. – 2005. – N 23. – P. 7178–7187.
73. Phase 1 trial of O^6–benzylguanine and BCNU in children with CNS tumors: a Children's Oncology Group study / D. M. Adams, T. Zhou, S. L.Berg [et al.] // Pediatr Blood Cancer. – 2008. – N 50. – P. 549–553.
74. Phase I trial of singledose temozolomide and continuous administration of O^6–benzylguanine in children with brain tumors: a pediatric brain tumor consortium report / A. Broniscer, S. Gururangan, T. J. Mac Donald [et al.] // Clin. Cancer Res. – 2007. – N 13. – P. 6712–6718.
75. Phase I trial of temozolomide plus O6–benzylguanine 5–day regimen with recurrent malignant glioma / J. A. Quinn, S. X. Jiang, D. A. Reardon // Neuro. Oncol. – 2009. – N 11. – P. 556–561.
76. Phase II trial of Gliadel plus O6–benzylguanine in adults with recurrent glioblastoma multiforme / J. A. Quinn, S. X. Jiang, J. Carter // Clin. Cancer Res. – 2009. – N 15. – P. 1064–1068.
77. Phase II trial of temozolomide plus O6–benzylguanine in adults with recurrent, temozolomide–resistant malignant glioma / J. A. Quinn, S. X. Jiang, D. A. Reardon, [et al.] // J. Clin. Oncol. – 2009. – Vol. 27(8). – P. 1262–1267.
78. Warren K. Phase I study of O^6–benzylguanine and temozolomide administered daily for 5 days to pediatric patients with solid tumors / K. Warren, A. A. Aikin, M. Libucha // J. Clin. Oncol. – 2005. – N 23. – P. 7647–7653.
79. Koch D. Local intracerebral administration of O(6)–benzylguanine combined with systemic chemotherapy with temozolomide of a patient suffering from a recurrent glioblastoma / D. Koch, T. Hundsberger, S. Boos // J. Neurooncol. – 2007. – N 82. – P. 85–89.
80. Human CD34+ hemopoietic progenitors have low, cytokine–unresponsive O6–alkylguanine–DNA alkyltransferase and are sensitive to O^6–benzylguanine plus BCNU / S. L. Gerson W. Phillips, M. Kastan [et al.] // Blood. – 1996. – 88 (5). – P. 1649–1655.
81. Chemoprotection of human hematopoietic stem cells by simultaneous lentiviral overexpression of multidrug resistance 1 and O^6–methylguanine–DNA methyltransferase P140K / P. Maier, I. Spier, S. Laufs, [et al.] // Gene Therapy. – 2010. – N 17. – P. 389–399.
82. High–level transduction and gene expression in hematopoietic repopulating cells using a human immunodeficiency [correction of imunodeficiency] virus type 1–based lentiviral vector containing an internal spleen focus forming virus promoter / C. Demaison, K. Parsley, G. Brouns [et al.] // Hum. Gene Ther. – 2002. – N 13.– P. 803–813.

Надійшла до редакції 22 лютого 2012 р.