

ГЕМАТОЛОГІЯ

УДК 616.15-006.448-085.28 (477):575.191.577.2

Н.И. Костюкова, З.И. Россоха, С.В. Выдыборец, Н.Г. Горovenко*

*Национальная медицинская академия последипломного образования
им. П.Л. Шупика, г. Киев*

**Референс-центр по молекулярной диагностике МЗ Украины, г. Киев*

РОЛЬ АЛЛЕЛЬНОГО ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА GSTM1 В РАЗВИТИИ РЕФРАКТЕРНЫХ ФОРМ МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМЫ

Рассмотрено влияние полиморфных вариантов генов GSTT1, GSTM1, GSTP1, MDR1 на риск развития рефрактерных форм множественной миеломы. Выявлено, что аллельный полиморфизм гена GSTM1 ассоциирован с повышенным риском развития рефрактерных форм множественной миеломы, а делеционный полиморфизм гена GSTM1 оказывает протективный эффект, снижает риск развития рефрактерных форм. **Ключевые слова:** *миеломная болезнь, полиморфизм генов GSTT1, GSTM1, GSTP1, MDR1, полимеразная цепная реакция, фенотип рефрактерности.*

Множественная миелома (миеломная болезнь, болезнь Рустицкого–Калера) – злокачественное лимфопролиферативное (в соответствии с классификацией ВОЗ относится к периферическим В-клеточным лимфопролиферативным опухолям) заболевание, характеризующееся инфильтрацией костного мозга плазматическими клетками, наличием моноклонального иммуноглобулина в сыворотке крови и/или моче и остеолитическими поражениями костей [1, 2]. Множественная миелома – это одно из самых прогностически неблагоприятных онкологических заболеваний, при котором ежегодно в Украине на 100 % впервые диагностированных умирает 75 %, получивших лечение [3]. Пятилетняя выживаемость пациентов составляет не более 25–35 %, а неадекватный выбор первой линии стандартной схемы лечения после выявления заболевания способствует развитию рефрактерных форм и рецидивов, что значительно ухудшает прогноз течения заболевания.

На сегодняшний день, несмотря на клинический опыт использования новых лекарственных препаратов – иммуномодулирующих

агентов и ингибиторов протеасом, актуальным остаётся вопрос выбора стандартного протокола в первой линии терапии множественной миеломы [4]. Наиболее широко применяют для лечения больных с множественной миеломой следующие стандартные схемы:

VAD:

винкристин 0,2 мг/м² в 1-й–4-й день (в режиме непрерывной внутривенной инфузии);

адриабластин 9 мг/м² в 1-й–4-й день (в режиме непрерывной внутривенной инфузии);

дексаметазон 40 мг внутрь в 1-й, 4-й, 9-й, 12-й, 17-й–20-й дни (периодичность курса каждые 28 дней).

M2:

винкристин 1,2 мг/м² внутривенно в 1-й день;
кармустин (ломустин) в суточной дозе 80 мг, BCNU 20 мг/м² внутривенно в 1-й день;
циклофосфан 400 мг/м² внутривенно в 1-й день;

мелфалан 8 мг/м² внутрь в 1-й–4-й день;
преднизолон 40 мг/м² внутрь в 1-й–7-й день (периодичность курса каждые 35–42 дня).

© Н.И. Костюкова, З.И. Россоха, С.В. Выдыборец, Н.Г. Горovenко, 2013

MP:

мелфалан 9–12 мг/м² в/в в 1-й – 4-й день;
преднизолон 1 мг/кг внутрь в 1-й – 4-й день
(периодичность курса каждые 28 дней).

Метаболические превращения цитостатических препаратов в организме происходят при участии ферментов системы детоксикации чужеродных соединений и лекарств, а генетические отличия в структуре генов, которые кодируют белки, обуславливают функциональное состояние ферментов. Наиболее важным является семейство генов глутатион-S-трансфераз, которому принадлежат гены GSTT1, GSTM1, GSTP1. Белки, которые они кодируют, играют ключевую роль в обеспечении резистентности клеток к перекисному окислению липидов, алкилированию белков и другим процессам с участием свободных радикалов. Существующие классы глутатион-S-трансфераз различаются субстратной специфичностью и экспрессируются неодинаково в различных органах и тканях. Делеционный полиморфизм гена GSTT1, GSTM1 характеризуется отсутствием фермента-изомера, а при однонуклеотидной замене A313G в 4-м экзоне гена GSTP1 снижается функциональная активность фермента-изомера. В пользу вовлечения GST в создание фенотипа рефрактерности свидетельствует тот факт, что снижение концентрации внутриклеточного глутатиона возвращает резистентным клеткам чувствительность к циклофосфану, мелфалану, доксорубину [2]. Возможным механизмом влияния GSTs на появление фенотипа рефрактерности может быть способность данного фермента ингибировать ковалентное взаимодействие цитостатического агента с ДНК и блокировать его эффект.

Неэффективность лечения множественной миеломы и формирование рефрактерных форм могут быть также обусловлены невосприимчивостью популяции опухолевых клеток к химиотерапевтическим препаратам в связи с изменениями мембранного уровня Р-гликопротеина, уровень которого, в свою очередь, зависит от структуры гена MDR1 [5]. Полиморфизм C3435T гена MDR1 влияет на способность проникновения лекарственных препаратов в клетку. При наличии T3435T полиморфного варианта гена MDR1 проис-

ходит снижение транспорта лекарственного вещества в клетку. Таким образом, на формирование фенотипа рефрактерности влияют цитоплазматический и мембранный компоненты, а поскольку множественную лекарственную устойчивость и неблагоприятный прогноз при химиотерапии связывают с плохим ответом на первую линию терапии множественной миеломы, то целью нашего исследования стало изучение генетической компоненты в формировании неблагоприятного ответа на индукционную терапию у больных множественной миеломой.

Материал и методы. С 2007 по 2011 г. было обследовано 130 пациентов из разных регионов Украины с впервые установленным диагнозом множественная миелома. На проведение этого исследования было получено разрешение этической комиссии НМАПО им. П.Л. Шупика. Все пациенты после ознакомления с информационным листом дали согласие на участие в проведении этого исследования. Среди больных было 60 (43,79 %) лиц мужского пола и 77 (56,21 %) – женского. Средний возраст больных составил (56,28±0,96) лет. Верификация диагноза проводилась в гематологических отделениях на основании клинической картины, рентгенологического исследования, показателей гемограммы, биохимических тестов, иммунохимического, морфологического (миелограммы), гистологического (трепанобиопсия) исследований костного мозга. В клинической картине у обследованных больных преобладали анемический и болевой синдромы, обусловленные плазмоклеточной метаплазией костного мозга. У 30 % больных на фоне указанной симптоматики развивался геморрагический синдром, у 40,4 % – интоксикационный, у 36,5 % клиническая манифестация происходила на фоне снижения массы тела, а у 67,3 % больных наблюдалась бледность кожных покровов. Признаки поражения нервной системы в виде периферической болевой полинейропатии встречались реже – у 13,5 %, гепатомегалия – у 9,6 % больных.

Постановка диагноза проводилась согласно системе диагностических критериев (классификация CRAB, 2003), включающей наличие плазматических клеток в костном мозге, повышенного уровня М-протеина

в сыворотке крови и/или моче, повышенного уровня кальция в сыворотке крови, почечной недостаточности, анемии, литических поражений костей или остеопороза. Стадия заболевания определялась с учётом опухолевой прогрессии и корреляции между массой опухоли, определяемой по продукции парапротеина, клиническими проявлениями и возможным прогнозом у обследуемых больных [5]. Из 130 обследованных больных IA стадия была выявлена у одного (0,76 %) пациента, ПА – у 28 (21,54 %), ПБ – у 18 (13,85 %), ППА – у 73 (56,16 %), ППБ – у 10 (7,69 %) пациентов. Среди 130 обследованных больных со II стадией было 46 (35,38 %), с III – 83 (63,84 %). Общее число больных с отсутствием почечной недостаточности (IA+ПА+ППА) составило 102 (78,46 %), а с почечной недостаточностью (ПБ+ППБ) – 28 (21,53 %).

Из 130 больных 26 (19,11 %) получали лечение по схеме MP, 55 (40,44 %) – по схеме M2, 49 (36,02 %) – по схеме VAD. Оценка ответа у пролеченных нами пациентов проводилась согласно критериям оценки ответа на лечение IMWG [8], в которых выделяют полный ответ, очень хороший частичный ответ, частичный ответ, стабилизацию заболевания. Среди пролеченных больных у 6 (4,61 %) отмечена полная ремиссия, у 72 (55,38 %) – частичная, а у 52 (40,00 %) – отсутствие ответа на лечение. В дальнейшей работе для статистического анализа обследованные больные были разделены на две группы: I – 52 пациента, не ответившие на лечение, II – 78 пациентов, ответивших на проведённое лечение. В группу II включили пациентов с полной и частичной ремиссией. Подобный подход использовали исследователи [6], которые оценивали общий ответ на лечение, суммируя полный, очень хороший ответ и частичный ответ [6]. У 13 (50 %) больных, получавших первичное лечение согласно протоколу MP, ответ был эффективным, а среди получавших M2 он был эффективным у 33 (60 %) больных, среди получавших VAD – у 32 (65 %).

Было проведено молекулярно-генетическое исследование делеционного полиморфизма генов GSTT1, GSTM1 с использованием мультиплексной полимеразной цепной реакции (ПЦР). Полиморфные

варианты A313G, C3435T генов GSTP1, MDR1 определяли с использованием ПЦР и метода полиморфизма длины рестрикционных фрагментов. Статистический анализ в группах сравнения проводили с использованием критериев χ^2 и F И. Фишера. Относительный риск (OR) рассчитывали, пользуясь программой OR-calculator.

Результаты. Базовые характеристики больных и клиническая картина заболевания в обеих группах до начала лечения приведены в табл. 1. Число мужчин и женщин в группах сравнения достоверно не отличалось. Средний возраст больных в группе I составлял (57,00±1,54) года и достоверно не отличался от среднего возраста в группе II – (55,79±1,24) года. Среди обеих групп были пациенты с различными стадиями заболевания, их число достоверно не различалось. При сравнении числа пациентов молодого, зрелого, среднего и пожилого возраста в обеих группах нами также не было выявлено достоверных различий (табл. 1).

Результаты молекулярно-генетического исследования (табл. 2) показали, что у пациентов группы I была достоверно повышена частота делеционного полиморфизма гена GSTM1, а частота аллельного – достоверно снижена. При расчёте показателей соотношения шансов (OR) выявлено, что для носителей аллельного полиморфизма гена GSTM1 риск развития рефрактерных форм (отсутствие ответа на терапию) повышается в 3,5 раза, а наличие делеционного полиморфизма имеет протективный эффект относительно развития рефрактерных форм.

Различий в частотах GSTT1 делеционного полиморфизма и полиморфных вариантов A313G, C3435T генов GSTP1, MDR1 выявлено не было, то есть они не влияли на ответ при проводимой терапии. С учётом полученных результатов было проанализировано влияние полиморфизма гена GSTM1 на ответ при различных схемах терапии (табл. 3).

У пациентов, получавших лечение по схеме M2, были выявлены различия в частоте делеционного полиморфизма гена GSTM1: частота была достоверно выше у пациентов группы II по сравнению с пациентами группы I, а у больных, получавших лечение по схеме MP, таких различий не наблюдалось.

Таблица 1. Базовая и клиническая характеристика больных исследуемых групп

Показатель	Группа I без ответа (n=52)		Группа II с ответом (n=78)	
	n	%	n	%
Женщины (n=72)	30	57,69	42	53,85
Мужчины (n=58)	22	42,31	36	46,15
1А (n=1)	0	0	1	100
ПА (n=28)	12	23,08	16	20,51
ПБ (n=18)	8	15,38	10	12,82
ПА+ПБ (n=46)	20	38,26	26	33,33
ША (n=73)	28	53,85	45	57,69
ПБ (n=10)	4	7,69	6	7,69
ША+ПБ (n=83)	32	61,54	51	65,38
ПА+ША (n=101)	40	76,92	61	78,21
ПБ+ПБ (n=28)	12	23,08	16	20,51
Возраст (лет):				
молодой (20–34) (n=6)	2	3,84	4	5,13
зрелый (35–44) (n=14)	4	7,69	10	12,82
средний (45–59) (n=61)	27	51,92	34	43,59
пожилой (60 и старше) (n=49)	19	36,54	30	38,46

Таблица 2. Частота делеционного полиморфизма генов *GSTT1*, *GSTM1* и полиморфных вариантов *A313G*, *C3435T* генов *GSTP1*, *MDR1* в исследуемых группах

Ген	Генотип	Группа I без ответа (n=52)		Группа II с ответом (n=78)		Результаты статистического анализа			
		n	%	n	%	χ^2	OR	95%-ный CI	p
GSTT1	Deletion	13	25,00	12	15,39	1,86	1,83	0,76-4,41	>0,05
	Allele	39	75,00	66	84,61	1,86	0,55	0,23-1,31	>0,05
GSTM1	Deletion	17	32,70	49	62,82	11,33	0,29	0,14-0,60	<0,001
	Allele	35	67,30	29	37,18	11,33	3,48	1,66-7,29	<0,001
GSTP1 (A3123G)	AA	18	34,61	30	38,46	0,02	0,85	0,41-1,76	>0,05
	AG	29	55,77	41	52,56	0,13	1,14	0,56-2,30	>0,05
	GG	5	9,62	7	8,98	0,02	1,08	0,32-3,60	>0,05
MDR1 (C3435T)	CC	14	26,92	20	25,64	0,03	1,07	0,48-2,37	>0,05
	CT	24	46,16	34	43,59	0,08	1,11	0,55-2,25	>0,05
	TT	14	26,92	24	30,77	0,22	0,83	0,38-1,81	>0,05

Таблица 3. Частота делеционного полиморфизма гена *GSTM1* в исследуемых группах в зависимости от схемы лечения

Схема лечения	Ген	Генотип	Группа I		Группа II		Результаты статистического анализа				
			n	%	n	%	χ^2	OR	95%-ный CI	p	
M2 (n=55)	GSTT1	Deletion	22		33						
		Allele	5	22,73	4	12,12	1,08	2,13	0,50-9,04	>0,05	
	GSTM1	Deletion	17	77,27	29	87,88	1,08	0,47	0,11-1,99	>0,05	
		Allele	3	13,64	25	75,75	20,38	0,05	0,01-0,22	<0,001	
MP (n=26)	GSTT1	Deletion	13		13						
		Allele	4	30,77	2	15,38	0,87	2,44	0,36-16,55	>0,05	
	GSTM1	Deletion	9	69,23	11	84,62	0,00	0,41	0,06-2,77	>0,05	
		Allele	7	53,85	6	46,15	0,15	1,36	0,29-6,36	>0,05	
VAD (n=49)	GSTT1	Deletion	17		32						
		Allele	4	23,53	6	18,75	0,16	1,33	0,32-5,57	>0,05	
	GSTM1	Deletion	13	76,47	26	81,25	0,16	0,75	0,18-3,13	>0,05	
		Allele	7	41,18	18	56,25	3,50	0,54	0,17-0,79	<0,05	
GSTM1	Allele	10	58,82	14	43,75	3,50	2,14	1,56-6,05	<0,05		

Подобные различия были выявлены при анализе влияния данного полиморфизма на результат лечения по схеме VAD. Разницы в частоте делеционного полиморфизма гена *GSTT1* и полиморфных вариантов A313G, C3435T генов *GSTP1*, *MDR1* в группах сравнения в зависимости от схемы лечения не выявлено.

Имеющиеся в литературе данные [7, 8] указывают на то, что вероятность эффективного ответа на проводимую терапию возрастает при отсутствии почечной недостаточности. Как было показано, среди пролеченных пациентов у 28 (21,53 %) перед началом лечения была диагностирована почечная недостаточность. Поскольку для *GSTM1* аллельного полиморфизма нами была выявлена взаимосвязь с развитием рефрактерных форм, формированием неэффективного ответа на проводимую терапию, мы посчитали нужным проанализи-

ровать влияние данного варианта гена на формирование почечной недостаточности. 22 (70,96 %) пациента из 28 с почечной недостаточностью имели аллельный полиморфизм гена. Среди 102 пациентов с нормальной функцией почек данный полиморфизм был выявлен у 47 (46,07 %) пациентов. У пациентов с почечной недостаточностью была достоверно повышена частота *GSTM1* аллельного полиморфизма ($\chi^2 = 6,58$; $p < 0,05$). Следовательно, при наличии аллельного полиморфизма гена *GSTM1* у пациентов развитие множественной миеломы чаще сопровождается почечной недостаточностью.

В работе [9] показано, что при выявлении полиморфного варианта гена *GSTP1*, при котором активность фермента-изомера снижена, наблюдается увеличение длительности безрецидивной выживаемости у пациентов с множественной миеломой. Полученный результат авторы указанной работы свя-

зывают с пониженной детоксикацией препарата, что способствует увеличению продолжительности его воздействия и достижению терапевтического эффекта.

Выводы

Выявлено влияние полиморфных вариантов гена *GSTM1* на формирование фенотипа лекарственного ответа. Это позволяет предположить, что при наличии делеционного полиморфизма гена *GSTM1*, с кото-

рым связывают отсутствие фермента-изомера, не происходит ускоренного метаболизма применяемых цитостатических препаратов, что способствует эффективному ответу на терапию.

Перспектива дальнейших исследований состоит в комплексном анализе генетических и других значимых факторов для разработки индивидуализированного подхода к выбору стандартного протокола лечения у больных с множественной миеломой.

Список литературы

1. World Health Organization of Tumors / E.S. Jaffe, N.L. Harris, H. Stein [et al.] // Pathology and Genetics of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. – Lyon: IARC Press, 2001. – P. 351.
2. Волкова М.А. Клиническая онкогематология. Руководство для врачей / М.А. Волкова. – М.: Медицина, 2007. – С. 847.
3. Бюлетень Національного канцер-реєстру № 13 – «Рак в Україні, 2010–2011».
4. Лікування хворих на множинну мієлому: досвід та перспективи / Н.Я. Серафін, Л.М. Лукавецький, О.М. Цяпка [та ін.] // Онкологія. – 2007. – № 2. – С. 159–163.
5. MDR1 polymorphism influences the outcome of multiple myeloma/ G. Buda, V. Maggini, S. Galimberti [et al.] // Br. J. Haematology. – 2007. – № 135. – С. 454–456.
6. Genetic polymorphisms associated with outcome in multiple myeloma patients receiving high-dose melphalan / C. Dumontet, S. Landi, T. Reimen [et al.] // Bone Marrow Transplantation. – 2010. – № 45. – С. 1316–1324.
7. Крячок І.А. Клініко-лабораторні маркери прогнозу перебігу захворювання та відповіді на комбіноване лікування із включенням високодозової хіміотерапії та трансплантації стовбурових клітин у хворих на множинну мієлому/ І.А. Крячок // Укр. мед. часопис. – 2005. – № 4. – С. 132–138.
8. Крячок І.А. Сучасні стандарти діагностики та лікування хворих на множинну мієлому / І.А. Крячок // Укр. мед. часопис. – 2010. – № 2. – С. 91–97.
9. Dasgupta R.K. Polymorphic variation in *GSTP1* modulates outcome following therapy for multiple myeloma / R. K. Dasgupta, P. J. Adamson, F. E. Davies / Blood. – 2003. – № 7. – С. 2345–2350.

Н.І. Костюкова, З.І. Россоха, С.В. Видиборець, Н.Г. Горovenko

РОЛЬ АЛЕЛЬНОГО ПОЛІМОРФІЗМУ ГЕНА *GSTM1* У РОЗВИТКУ РЕФРАКТЕРНИХ ФОРМ МНОЖИННОЇ МІЄЛОМИ

Досліджено вплив поліморфних варіантів генів *GSTT1*, *GSTM1*, *GSTP1*, *MDR1* на ризик розвитку рефрактерних форм множинної мієломи. Встановлено, що алельний поліморфізм гена *GSTM1* асоційований з підвищеним ризиком розвитку рефрактерних форм множинної мієломи, а делеційний поліморфізм гена *GSTM1* має протективний ефект, знижує ризик розвитку рефрактерних форм.

Ключові слова: мієломна хвороба, поліморфізм генів *GSTT1*, *GSTM1*, *GSTP1*, *MDR1*, полімеразна ланцюгова реакція, фенотип рефрактерності.

N. I. Kostyukova, Z. I. Rossokha, S. V. Vidyborets, N. G. Gorovenko

ROLE OF *GSTM1* GENE ALLELE POLYMORPHISM IN DEVELOPMENT OF REFRACTORY FORMS IN MULTIPLE MYELOMA

There were investigated the influence of *GSTT1*, *GSTM1*, *GSTP1*, *MDR1* gene polymorphic variants on development risk of the refractory forms in multiple myeloma. It was found, that allele polymorphism of the *GSTM1* gene is associated with increased risk of the refractory forms development in multiple myeloma, on other hand deletion polymorphism of the *GSTM1* gene has protective effect, decreases the risk of the refractory forms development.

Key words: multiple myeloma, *GSTT1*, *GSTM1*, *GSTP1*, *MDR1* genes polymorphisms, polymerase chain reaction, refractory forms

Поступила 19.11.12