

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ МНОЖЕСТВЕННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ У ПАЦИЕНТОВ С РЕЗИСТЕНТНЫМ ТЕЧЕНИЕМ МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМЫ

Черных Ю.Б.¹, Шушанов С.С.²

¹ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского» (МОНИКИ); 129110, г. Москва, ул. Щепкина, 61/2, Российская Федерация

²ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Российской академии медицинских наук; 115478, г. Москва, Каширское ш., 23, Российская Федерация

Актуальность. Множественная лекарственная устойчивость (МЛУ) является закономерным событием в развитии солидных и гематологических опухолей, существенно влияющим на непосредственные и отдаленные результаты лечения. В связи с этим возникает интерес к исследованию этой проблемы при множественной миеломе (ММ), которая характеризуется выраженными клиническими признаками опухолевой прогрессии, главным из которых является отсутствие или потеря ответа на проводимое противоопухолевое лечение.

Цель – определение экспрессии матричной рибонуклеиновой кислоты (мРНК) генов MDR1, MRP1, LRP, BCRP, ответственных за развитие МЛУ в аспирате костного мозга резистентных пациентов до начала бортезомибсодержащей терапии.

Материал и методы. Исследовалась группа из 19 пациентов. Изучение экспрессии генов МЛУ проводили в клетках мононуклеарной фракции костного мозга, содержащей плазмочиты, методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией.

Основные результаты. Экспрессия мРНК генов MDR1, MRP1, BCRP была выявлена у всех пациентов, а гена LRP – у 81%. Уровень экспрессии каждого гена различался. Исходя из этого, было выделено две группы пациентов: с уровнем экспрессии генов МЛУ выше и ниже среднего.

Заключение. Обнаружена 100% экспрессия генов MDR1, MRP1, BCRP у резистентных пациентов с ММ. Медиана выживаемости в группах пациентов с уровнем экспрессии мРНК генов МЛУ выше и ниже среднего существенно и достоверно различается.

Ключевые слова: множественная миелома, костный мозг, множественная лекарственная устойчивость, бортезомибсодержащая терапия.

EXPRESSION OF GENES RESPONSIBLE FOR MULTIDRUG RESISTANCE IN RELAPSED/REFRACTORY MULTIPLE MYELOMA PATIENTS

Chernykh Yu.B.¹, Shushanov S.S.²

¹Moscow Regional Research and Clinical Institute (MONIKI); 61/2 Shchepkina ul., 129110 Moscow, Russian Federation

²N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of RAMS; 23 Kashirskoe shosse, 115478 Moscow, Russian Federation

Background: Multidrug resistance (MDR) is a natural phenomenon in development of solid and hematologic tumors. This phenomenon significantly influences both immediate and remote outcome of treatment. In this connection, an interest arises to studying this problem in multiple myeloma (MM) patients with expressed clinical signs of tumorous progression, the main of them being an absence or loss of the response to antitumor treatment.

Aim: To study the expression of messenger RNA (mRNA) of a series of MDR genes, namely MDR1, MRP1, LRP, BCRP responsible for MDR development in the bone marrow aspirate of resistant patients prior to bortezomib-containing chemotherapy.

Materials and methods: Study group included 19 relapsed/refractory multiple myeloma patients. Investigation of MDR genes expression was carried out on the cells of the bone marrow mononuclear fraction containing plasmocytes. The mRNA level was analyzed by semiquantitative RT-PCR (polymerase chain reaction with reverse transcription). Patients were treated with bortezomib-containing chemotherapy hereafter.

Results: mRNA expression of genes MDR1, MRP1, BCRP was revealed in all (100%) patients, and that of gene LRP – in 81% of myeloma samples. The levels of MDR genes mRNA expression were different. On this basis, two groups of patients were identified: with the levels of MDR genes expression above and beyond the average.

Conclusion: 100%-expression of MDR genes (MDR1, MRP1, BCRP) mRNA was revealed in drug resistant MM patients. The median survival in group of patients with higher levels of MDR genes mRNA expression versus lower levels of MDR genes mRNA expression was statistically significant.

Key words: multiple myeloma, bone marrow, multidrug resistance, bortezomib-containing chemotherapy.

Множественная миелома (ММ) относится к В-лимфоплазмочитарным злокачественным процессам с сохраненной функцией синтеза опухолевой клеткой моноклонального иммуноглобулина – парапротеина. Она составляет 1% от всех онкологических заболеваний и немногим более 10% среди всех гемобластозов [1]. Нестабильность генома и клональная гетерогенность опухоли служат причиной селекции в процессе лечения более агрессивных субклонов злокачественных клеток, ответственных за лекарственную резистентность и прогрессию опухоли. Клинически отчетливо выделяются две фазы течения заболевания – чувствительности опухолевых клеток к лекарственным средствам и резистентности к ним. По данным отделения клинической гематологии и иммунотерапии МОНИКИ, частота ответов на первую линию химиотерапии составляет около 80%, а 20% являются первично резистентными [1, 2]. При первом и последующем рецидивах частота резистентных случаев увеличивается с 50 до 100% [2]. Внедрение в широкую клиническую практику лечения ММ ингибитора протеасом препарата Бортезомиб в сочетании со стандартными применявшимися ранее препаратами (Алкеран, Преднизолон, Циклофосфан) значительно улучшило выживаемость пациентов. Такой эффект обусловлен тем, что Бортезомиб в сочетании с химиотерапевтическими агентами может давать аддитивный или синергический эффект, а также преодолевать множественную лекарственную устойчивость (МЛУ) [3].

Известно несколько молекулярных механизмов развития МЛУ. Повышенная активность Р-гликопротеида (Рgp), кодируемого геном MDR1, является одним из наиболее изученных явлений. Рgp использует энергию аденозинтрифосфата (АТФ) для транспортировки группы различных по структуре веществ из цитозоля и/или плазматической мембраны во внеклеточное пространство [4]. Предварительные исследования показали, что у первичных больных ММ, ранее не получавших лечение, экспрессия Рgp обнаруживается только в 1-2% (по данным различных исследований – до 6%) образцов аспирата костного мозга, тогда как у леченных больных с рецидивными или резистентными формами заболевания экспрессия белка регистрировалась от 40 до 85% случаев [5, 6].

Наряду с Рgp в МЛУ вовлечены и другие известные на сегодняшний день белки: АТФ-зависимые транспортеры MRP1, BCRP, а также белок LRP [7, 8]. MRP1 обеспечивает резистентность примерно к тому же кругу противоопухолевых препаратов, что и Рgp, и также является энергозависимым (использующим энергию АТФ) насосом, выталкивающим из клетки токсические соединения. Однако гомология гена MRP1 и гена MDR1, кодирующего Рgp, невелика (14%), поэтому кодируемые этими двумя генами белки значительно различаются по аминокислотному составу. Функциональная активность MRP1 также отличается от активности Рgp: для функционирования MRP1 необходим глутатион. Многие субстраты MRP1 и Рgp совпадают, однако MRP1 преимущественно переносит органические анионы, тогда как Рgp обладает слабым сродством к таким веществам [4].

BCRP, так же, как Рgp и белки MRP, является транспортным белком, работа которого сопряжена с гидролизом АТФ. Известно, что BCRP может обуславливать резистентность клеток примерно к тому же кругу препаратов, что и Рgp, хотя спектр субстратов и эффективность защиты от них для этих двух белков несколько различаются [4]. LRP, в отличие от вышеописанных белков, локализуется не на клеточной мембране, а в цитоплазме. В последние годы большое количество работ было посвящено исследованию роли LRP в развитии резистентности различных новообразований к химиотерапии. Обнаружены корреляции неблагоприятного течения некоторых опухолевых заболеваний с экспрессией LRP, хотя существуют работы, в которых клиническая значимость экспрессии этого белка клетками не обнаружена [4, 7].

Цель нашего исследования – определение экспрессии матричной рибонуклеиновой кислоты (мРНК) генов, ответственных за развитие МЛУ таких генов, как MDR1, MRP1, LRP, BCRP в аспиратах костного мозга у рецидивных/резистентных пациентов с ММ до начала лечения бортезомибсодержащими схемами полихимиотерапии.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследовался аспират костного мозга 19 резистентных больных ММ 3-й стадии (10 мужчин и 9 женщин) в возрасте от 52 до 78 лет. Иммунохимическая характеристика типа патологического иммуногло-

Черных Юлия Борисовна – науч. сотр. отделения клинической гематологии и иммунотерапии МОНИКИ. **Шушанов Саин Сакенович** – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории генетики опухолевых клеток РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН.

Для корреспонденции: Черных Юлия Борисовна – 129110, г. Москва, ул. Щепкина, 61/2, к. 9, Российская Федерация. Тел.: +7 (495) 631 73 81. E-mail: yulia_chernih@mail.ru

Chernykh Yuliya Borisovna – scientific worker, Department of Clinical Hematology and Immunotherapy of MONIKI. **Shushanov Sain Sakenovich** – PhD, senior scientific worker, Laboratory of tumor cell genetics, Blokhin RCRC.

Correspondence to: Chernykh Yuliya Borisovna – 61/2 s. 9 Shchepkina ul., 129110 Moscow, Russian Federation. Tel.: +7 (495) 631 73 81. E-mail: yulia_chernih@mail.ru

булина распределилась следующим образом: Бенс-Джонс κ диагностирован в пяти случаях, А κ – в пяти, G κ – в четырех, G λ – в трех, Бенс-Джонс λ – в одном, М κ – в одном. Стадирование на момент диагностики проводили по общепринятой системе [9]. Всем пациентам, включенным в исследование, в дальнейшем проводилось лечение бортезомибсодержащими схемами полихимиотерапии.

Выделение рибонуклеиновой кислоты (РНК) из клеток мононуклеарной фракции костного мозга и электрофорез выделенной РНК проводились согласно стандартному протоколу: клетки костного мозга насаивали на 3 мл фиколла и центрифугировали при 1500 об/мин в течение 30 минут, после чего на границе раздела фаз отбирали мононуклеарную фракцию клеток костного мозга, содержащую плазматические клетки. Отобранные клетки переносили в пробирку с 8 мл раствора Эрла и пересаживали центрифугированием при 1500 об/мин в течение 10 минут, затем отмывали в 2-3 мл раствора Эрла. К осадку клеток добавляли 1 мл Тризола (Sigma, США). Электрофорез выделенной РНК проводили в 1% агарозном геле при напряжении 100 вольт в течение 30-40 минут. Качество выделенной РНК оценивали по наличию полос рибосомальной РНК. Концентрацию определяли по оптическому поглощению при длине волны 260 нм.

Экспрессию мРНК исследуемых генов определяли полуколичественным методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). Реакционная смесь для синтеза комплементарной дезоксирибонуклеиновой кислоты (кДНК) содержала 2 мкг тотальной клеточной РНК, 4 мкл «случайных» праймеров (гексануклеотиды) (Ли-

тех, Россия), 2 ммоль смеси dNTP (MBI Fermentas), 2-4 ед. ингибитора рибонуклеаз (MBI Fermentas), 100 ед. обратной транскриптазы М-MuLV (MBI Fermentas). Объем смеси составлял 25 мкл. Синтез кДНК с матрицы РНК проводили на амплификаторе Терцик (ДНК-Технология, Россия) со следующими параметрами: обратная транскрипция – 42 °С, 50 минут; денатурация – 94 °С, 5 секунд. Для наработки продуктов ПЦР составляли реакционную смесь, содержащую: 1 мкл раствора кДНК; 20 пкмоль каждого из праймеров; 2 ммоль смеси dNTP; 2,5 мкл 10-кратного буфера с $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (MBI Fermentas), 25 ммоль MgCl_2 ; 1 ед. Taq-ДНК-полимеразы; H_2O до конечного объема 25 мкл; минерального масла – 30 мкл. Реакцию амплификации проводили на амплификаторе Терцик по следующей схеме: денатурация – 94 °С, 10 секунд; отжиг – T_m , 10 секунд; синтез – 72 °С, 20 секунд. В качестве внутреннего контроля для оценки количества взятой в реакцию РНК определяли экспрессию GAPDH. Продукты реакции ОТ-ПЦР анализировали с помощью электрофореза в 2% агарозном геле с добавлением 0,5 мкг/мл бромистого этидия. Размеры фрагментов оценивали в соответствии с расположением полос маркерной ДНК, а их интенсивность – денситометрированием с использованием компьютерной программы Scion Image. Числовые значения, соответствующие величине экспрессии мРНК каждого из исследуемых генов, представлены как соотношения числового значения экспрессии мРНК каждого гена к числовому значению экспрессии мРНК гена GAPDH, который был использован в качестве внутреннего контроля. Для удобства и наглядности величины экспрессии мРНК исследуемых генов представлены в виде знаков «+» и «-». При этом «-» озна-

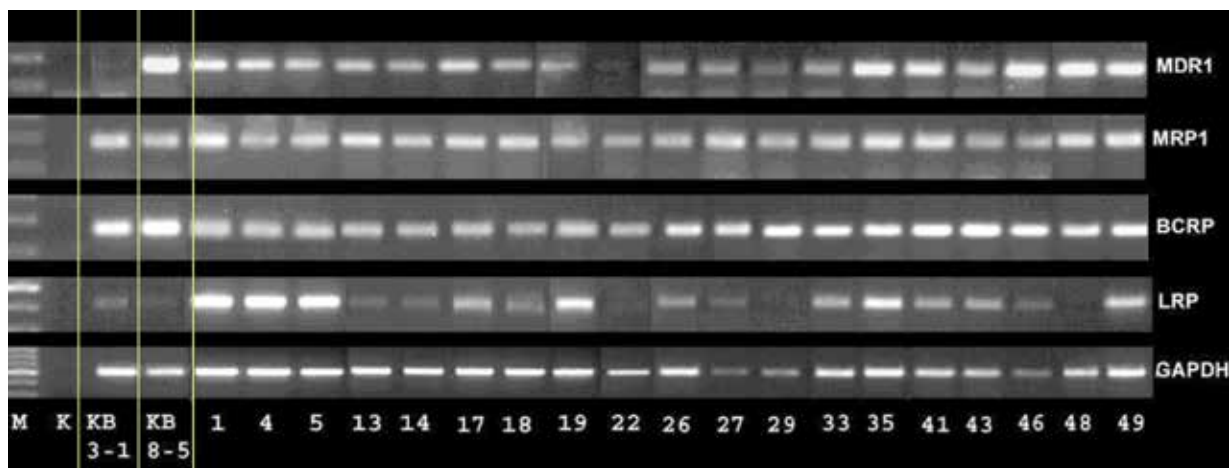


Рис. 1. Гель-электрофорез, результаты ОТ-ПЦР. Экспрессия мРНК генов МЛУ (MDR1, LRP, MRP1, BCRP) в образцах костномозгового пунктата, полученных от леченных больных ММ. В качестве контроля были использованы клетки карциномы полости рта линии KB 8-5, гиперэкспрессирующие мРНК гена MDR1, и клетки линии KB 3-1, в которых мРНК гена MDR1 не экспрессируется

чает, что экспрессия гена отсутствует, «+/-» – экспрессия очень слабая, «+» – экспрессия слабая (отчетливо видимая полоска в агарозном геле), «++++» – экспрессия повышена в 2 раза и более. Гель фотографировали при ультрафиолетовом возбуждении с помощью цифровой камеры Samsung CCTV LENZ [10].

Статистическая обработка полученных данных была выполнена с помощью компьютерной программы GraphPad Prizm. Достоверность различий определялась с использованием непараметрического статистического критерия t-тест, различия считались достоверными при $p < 0,05$. Анализ выживаемости проводился по законченным случаям, поэтому в подсчет вошли 16 из 19 включенных в исследование пациентов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1 представлена общая характеристика амплификатов исследуемых генов по результатам ОТ-ПЦР. По этим данным проводилась визуальная оценка степени экспрессии мРНК. Суммарный анализ представлен в таблице: экспрессия генов MDR1, MRP1, BCRP была выявлена у 100% обследованных пациентов, а мРНК гена LRP обнаружена в 16 случаях из 19, что составляет 84% пациентов. Таким образом, клиническая резистентность обследуемых больных подтверждена фундаментальным исследованием – у всех пациентов экспрессируются мРНК генов, ответственных за развитие МЛУ, но интенсивность экспрессии мРНК этих генов разная.

Анализ экспрессии мРНК гена MDR1 показал, что у 8 (42%) больных уровень экспрессии гена был низким, а у 11 (58%) повышен в 2 раза и более, и это различие статистически достоверно ($p = 0,0355$). На рис. 2а графически представлены средние значения

экспрессии мРНК гена MDR1 в группах А (низкий уровень экспрессии) и В (высокий уровень экспрессии).

Общая характеристика экспрессии генов множественной лекарственной устойчивости

Гены МЛУ	Число пациентов с ММ с экспрессией генов				
	Всего	-	+/-	+	++++
MDR1	19	0	1	7	11
MRP1	19	0	0	14	5
BCRP	19	0	0	11	8
LRP	19	3	2	5	9

Примечание: «-» – экспрессия гена отсутствует; «+/-» – экспрессия гена очень слабая; «+» – нормальная экспрессия гена (отчетливо видимая полоска в агарозном геле); «++++» – экспрессия гена повышена в 2 раза и более.

У 16 (84%) больных была выявлена мРНК гена LRP. Низкий уровень экспрессии мРНК этого гена зарегистрирован у 7 (37%) пациентов, у 9 (47%) он был повышен в 2 раза и более. Средние значения экспрессии мРНК гена LRP в группах С (низкий уровень экспрессии) и D (высокий уровень экспрессии) представлены на рис. 2б. Различие в экспрессии мРНК в этих группах является статистически значимым ($p = 0,0004$).

Достоверное различие обнаружено и при анализе уровня экспрессии мРНК гена MRP1. У 14 (74%) пациентов уровень экспрессии был низким, а у 5 (26%) повышен в 2 раза и более. На рис. 2в представлены средние значения экспрессии мРНК гена MRP1

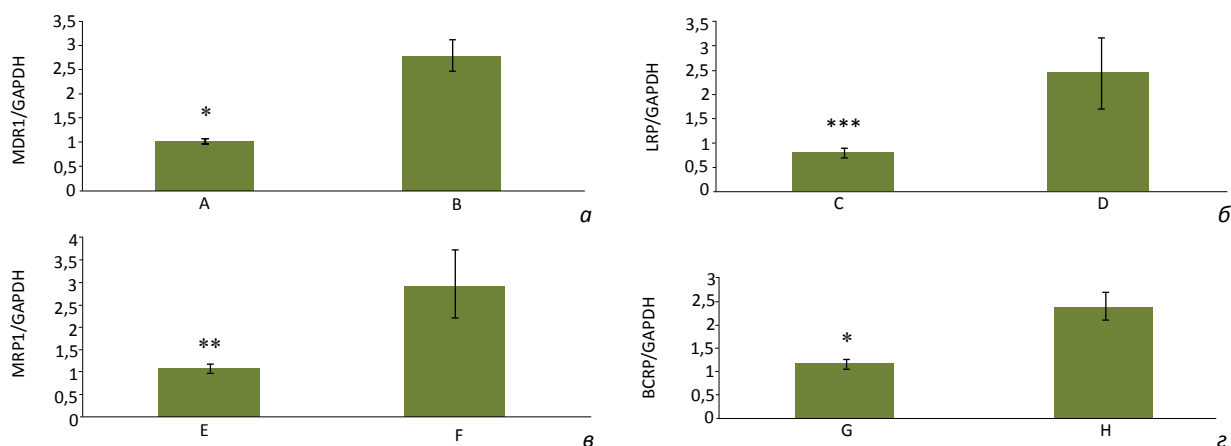


Рис. 2. Среднее значение экспрессии мРНК генов: а – MDR1, б – LRP, в – MRP1, г – BCRP в группах образцов костномозгового пунктата с низким (А, С, Е, Г) и высоким (В, D, F, H) уровнем экспрессии мРНК указанных генов

Примечание: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ – достоверность различий между указанными группами.

в группах E (низкий уровень экспрессии) и F (высокий уровень экспрессии). Разница в экспрессии мРНК в этих группах является статистически значимой ($p=0,0081$).

Уровень экспрессии мРНК гена BCRP был низким у 11 (58%) больных и у 8 (42%) повышен в 2 раза и более. Средние значения экспрессии мРНК гена BCRP в группах G (низкий уровень экспрессии) и H (высокий уровень экспрессии) представлены на рис. 2г. Различия в экспрессии мРНК в этих группах является статистически значимым ($p=0,0128$).

Всем пациентам, включенным в исследование, в дальнейшем проводилось лечение бортезомиб-содержащими схемами полихимиотерапии. Анализ выживаемости выполнялся по законченным случаям (16 из 19). Несмотря на однородность исследуемой группы, в образцах наблюдалась заметная гетерогенность в экспрессии мРНК генов МЛУ. Поскольку уровни экспрессии мРНК каждого из генов МЛУ у всех пациентов заметно различались, мы использовали среднее значение уровня экспрессии по четырем генам суммарно. Исходя из этого, нами было выделено две группы пациентов: с уровнем экспрессии генов МЛУ выше и ниже среднего (5 и 11 наблюдений соответственно). Анализ выживаемости этих пациентов показал, что в группе с уровнем экспрессии выше среднего медиана выживаемости составила 34 месяца, ниже среднего – 63 месяца ($p=0,0004$), рис. 3.

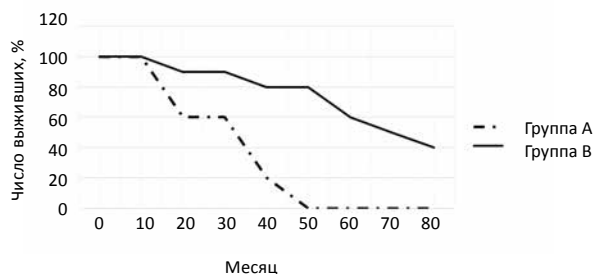


Рис. 3. Кривая выживаемости пациентов с различным уровнем средней экспрессии мРНК генов МЛУ: группа А (5 из 16 – 31%) – уровень экспрессии выше среднего; группа В (11 из 16 – 69%) – уровень экспрессии ниже среднего, $p<0,05$

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, у пациентов, резистентных к стандартной полихимиотерапии, мРНК генов МЛУ MDR1, MRP1, BCRP экспрессировались в 100% случаев, а мРНК гена LRP – в 84% наблюдений.

После проведенного лечения бортезомиб-содержащими схемами полихимиотерапии медиана выживаемости в группах пациентов с уровнем экспрессии мРНК генов МЛУ выше и ниже среднего

достоверно различается. Присоединение бортезомиба к стандартным химиопрепаратам (мелфалан, преднизолон) позволяет преодолеть лекарственную устойчивость опухолевых клеток в случаях с исходно невысоким уровнем экспрессии мРНК генов МЛУ.

Литература

1. Митина Т.А., Голенков А.К., Трифонова Е.В., Луцкая Т.Д., Катаева Е.В., Высоцкая Л.Л., Дудина Г.А., Черных Ю.Б., Захаров С.Г., Клинушкина Е.Ф., Белоусов К.А. Эффективность бортезомиба, мелфалана и преднизолона (ВМП) у пациентов с впервые выявленной множественной миеломой. Биомедицинский журнал Medline.ru 2013;14:1030-50. [Mitina T.A., Golencov A.K., Trifonova E.V., Lutskaia T.D., Kataeva E.V., Vysotskaya L.L., Dudina G.A., Chernykh Yu.B., Zakharov S.G., Klinushkina E.F., Belousov K.A. Efficiency of Bortezomib, Melphalan and Prednisolon (BMP) in patients with primarily revealed multiple myeloma. Biomeditsinskiy zhurnal Medline.ru 2013;14:1030-50 (in Russian)].
2. Голенков А.К., Митина Т.А., Когарко И.Н., Любимова Н.В., Клинушкина Е.Ф., Барышников А.Ю. Фармакодинамическая характеристика эффективности велкейда при резистентной и рецидивной множественной миеломе: определение свободных легких цепей иммуноглобулинов сыворотки крови. Терапевтический архив 2009;81(7):37-41. [Golencov A.K., Mitina T.A., Kogarko I.N., Lyubimova N.V., Klinushkina E.F., Baryshnikov A.Yu. Pharmacodynamic characteristic of Velcade efficiency in resistant and recurrent multiple myeloma: detection of free light chains of serum immunoglobulins. Terapevticheskiy arkhiv 2009;81(7):37-41 (in Russian)].
3. Панищева Л.А., Какпакова Е.С., Рыбалкина Е.Ю., Ставровская А.А. Влияние ингибитора протеасом бортезомиба на экспрессию и активность ABC-транспортеров в опухолевых клетках. Биологические мембраны 2010;27(2):195-201. [Panishcheva L.A., Kakpakova E.S., Rybalkina E.Yu., Stavrovskaya A.A. Effect of inhibitors of bortezomib proteasomes on the expression and activity of ABC-transporters in tumor cells. Biologicheskie membrany 2010;27(2):195-201 (in Russian)].
4. Ставровская А.А. Множественная лекарственная устойчивость, обусловленная активностью транспортных белков клетки: некоторые новые факты и перспективы исследований. Биологические мембраны 2003;20(3):196-205. [Stavrovskaya A.A. Multidrug resistance due to the activity of cellular transport proteins: some new facts and study perspectives. Biologicheskie membrany 2003;20(3):196-205 (in Russian)].
5. Schwarzenbach H. Expression of MDR1/P-glycoprotein, the multidrug resistance protein MRP, and the lung-resistance protein LRP in multiple myeloma. Med Oncol 2002;19(2):87-104.
6. Sonneveld P. Multidrug resistance in haematological malignancies. J Intern Med 2000;247(5):521-34.
7. Ставровская А.А. Опухолевая клетка в обороне. Соросовский образовательный журнал 2001;(7):17-23. [Stavrovskaya A.A. Tumor cell in the defense. Sorosovskiy obrazovatelnyy zhurnal 2001;(7):17-23 (in Russian)].
8. Hatok J., Račay P., Hudeček J., Dobrota D. Genes of multidrug resistance in haematological malignancies. Biologia (Bratislava) 2006;61(3):247-56.
9. Durie B.G., Salmon S.E. A clinical staging system for multiple myeloma. Correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival. Cancer 1975;36(3):842-54.
10. Шушанов С.С., Марьяна Л.Г., Черных Ю.Б., Какпакова Е.С. Коэкспрессия мРНК генов систем IGF/инсулин и множественной лекарственной устойчивости у больных множественной миеломой. Клиническая онкогематология 2010; 3(2):105-113. [Shushanov S.C., Mar'ina L.G., Chernykh Yu.B., Kakpakova E.S. Co-expression of mRNA genes of the systems both IGF/insulin and multidrug resistance in patients with multiple myeloma. Klinicheskaya onkogematologiya 2010;3(2):105-113 (in Russian)].