

- individual BCR-ABL decline in the first three months of treatment to achieve MMR in patients with chronic myelogenous leukemia in chronic phase. *Journal Medical Genetics (Meditsinskaya genetika)*. 2015; 14 (4, Issue 154): 31–2. (in Russian)
19. Fominykh M., Shuvaev V., Martynkevich I., Tsaur G., Bederak N., Chelysheva E., et al. The rate of BCR-ABL decline as an optimized predictor of outcome for patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase on treatment with tyrosine kinase inhibitors. *Haematologica*. 2015; 100 (Suppl. 1): 444.
 20. Khoury J., Guilhot F., Hughes T., Kim D., Cortes J. Dasatinib treatment for Philadelphia chromosome-positive leukemias practical considerations. *Cancer*. 2009; 115(7): 1381–4.
 21. Quintás-Cardama A., Pires De Souza Santos F., Kantarjian H., O'Brien S., Faderl S., Awai A., et al. Dynamics and management of cytopenias associated with dasatinib therapy in patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase after imatinib failure cancer. *Cancer*. 2009; 115(17): 3935–43.
 22. Jabbour E., Deininger M., Hochhaus A. Management of adverse events associated with tyrosine kinase inhibitors in the treatment of chronic myeloid leukemia. *Leukemia*. 2011; 25(2): 201–10.
 23. Quintás-Cardama A., Kantarjian H., O'Brien S., Borthakur G., Bruzzi J., Munden R., et al. Effusion in patients with chronic myelogenous leukemia treated with dasatinib after imatinib failure. *J. Clin. Oncol.* 2007; 25(25): 136–40.
 24. Jabbour E., Cortes J., Kantarjian H. Long-term outcomes in the second-line treatment of chronic myeloid leukemia. *Cancer*. 2011; 117(5): 897–906.
 25. Nicolini F.E., Turkina A., Shen Z.-X., Gallagher N., Jootar S., Powell B.L., et al. Expanding Nilotinib Access in Clinical Trials (ENACT). *Cancer*. 2012; 118(1): 118–26.
 26. Kantarjian H.M., Shah N.P., Cortes J.E., Baccarani M., Agarwal M.B., Undurraga M.S., et al. Dasatinib or imatinib in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia: 2-year follow-up from a randomized phase 3 trial (DASISION). *Blood*. 2012; 119(5): 1123–9.
 27. Shah N.P., Kantarjian H.M., Kim D.W., Rea D., Dorlhiac-Llacer P.E., Milone J.H., et al. Intermittent target inhibition with dasatinib 100 mg once daily preserves efficacy and improves tolerability in imatinib-resistant and -intolerant chronic-phase chronic myeloid leukemia. *J. Clin. Oncol.* 2008; 26(19): 3204–12. doi: 10.1200/JCO.2007.14.9260.
 28. Murai K., Yamaguchi K., Ito S., Akagi T., Ogawa K., Mitsue I., et al. Velocity of Early BCR-ABL Transcript Elimination as an Optimized Predictor of Deep Molecular Response in Chronic Myeloid Leukemia patients in Chronic Phase on Treatment with Dasatinib. (57th ASH Annual Meeting. Abstracts), *Blood*. 2015; Abstract 4052. <https://ash.confex.com/ash/2015/webprogram/Paper84000.html>

Поступила 18.11.15

Принята к печати 11.02.16

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 616-006.448-085.844-036.8

Нарейко М.В., Менделеева Л.П., Сурин В.Л., Демидова Е.Ю., Покровская О.С.,
Кузьмина Л.А., Грибанова Е.О., Гальцева И.В., Урнова Е.С., Дроков М.Ю., Фирсова М.В.,
Соловьев М.В., Макунина Э.А., Паровичникова Е.Н., Савченко В.Г.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИНДУКЦИОННОЙ ТЕРАПИИ У ПЕРВИЧНЫХ БОЛЬНЫХ МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМОЙ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА С-МЫС В ДЕБЮТЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ

ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России, 125167, г. Москва, Россия

Настоящая работа посвящена определению зависимости характера противоопухолевого ответа на индукционную терапию больных множественной миеломой (ММ) и/или моноклональной гаммапатией неутонченного генеза (МГНГ) от уровня экспрессии гена *c-MYC* на момент диагностики заболевания. Экспрессию *c-MYC* определяли в клетках костного мозга методом мультиплексной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (qRT-PCR). Среднее значение уровня экспрессии гена *c-MYC* в CD138⁺-клетках у больных ММ/МГНГ выше, чем у доноров ($p = 0,011$). Выявлена взаимосвязь между глубиной противоопухолевого ответа и уровнем экспрессии *c-MYC* в CD138⁺-клетках.

Ключевые слова: множественная миелома; ген *c-MYC*; CD138⁺-клетки.

Для цитирования: Нарейко М.В., Менделеева Л.П., Сурин В.Л., Демидова Е.Ю., Покровская О.С., Кузьмина Л.А., Грибанова Е.О., Гальцева И.В., Урнова Е.С., Дроков М.Ю., Фирсова М.В., Соловьев М.В., Макунина Э.А., Паровичникова Е.Н., Савченко В.Г. Эффективность индукционной терапии у первичных больных множественной миеломой в зависимости от уровня экспрессии гена *c-MYC* в дебюте заболевания. *Гематология и трансфузиология*. 2016; 61(1): 10–16. DOI 10.18821/0234-5730-2016-61-1-10-16

Nareiko M.V., Mendeleeva L.P., Surin V.L., Demidova E.Yu., Pokrovskaya O.S., Kuzmina L.A., Gribanova E.O., Galtseva I.V.,
Urnova E.S., Drovkov M.Yu., Firsova M.V., Solovyov M.V., Makunina E.A., Parovichnikova E.N., Savchenko V.G.

EFFICACY OF INDUCTION THERAPY IN PATIENTS WITH DE NOVO DIAGNOSED MULTIPLE MYELOMA DEPENDS ON C-MYC GENE EXPRESSION AT THE DEBUT OF DISEASE

National Research Center for Hematology, Moscow, 125167, Russian Federation

The relationship between the type of antitumor response to induction therapy in patients with multiple myeloma (MM) and/or monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and the level of *c-MYC* gene expression at the moment of disease diagnosis is studied. The expression of *c-MYC* in bone marrow cells was evaluated by multiplex RT-PCR. The mean levels of *c-MYC* gene expression in CD138⁺ cells of patients with MM/MGUS are higher than in donors ($p = 0.011$). Relationship between the depth of antitumor response and level of *C-myc* expression in CD138⁺ cells is detected.

Key words: multiple myeloma; *c-MYC* gene; CD138⁺ cells.

For citation: Nareiko M.V., Mendeleeva L.P., Surin V.L., Demidova E.Yu., Pokrovskaya O.S., Kuzmina L.A., Gribanova E.O., Galtseva I.V., Urnova E.S., Drovkov M.Yu., Firsova M.V., Solovyov M.V., Makunina E.A., Parovichnikova E.N., Savchenko V.G. Efficiency of induction therapy in primary patients with multiple myeloma depends on *c-MYC* gene expression at the debut of disease. *Hematology and Transfusion. Russian journal (Gematologiya i transfuziologiya)*. 2016; 61(1): 10–16. (in Russian). DOI 10.18821/0234-5730-2016-61-1-10-16

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Funding. The work was supported by Russian Foundation for Basic Research (grant No. 15-04-02568).

Received 13 October 2015

Accepted 11 December 2015

В настоящее время множественная миелома (ММ) определяется как клональное лимфопротопластическое заболевание, возникающее на уровне пре-В-клеточных стадий моноклонального развития, в предшественниках, сохраняющих способность к дифференцировке до плазмочита [1–5].

ММ составляет 1% от всех онкологических заболеваний и 10–15% от гемобластозов. Заболевают ММ преимущественно люди старшей возрастной группы. Средний возраст среди вновь заболевших больных составляет около 70 лет. Распространенность заболевания среди населения моложе 40 лет не превышает 2%. Отмечено существенное различие по частоте заболеваемости ММ среди различных этнических групп. Среди афроамериканцев она приблизительно в 2 раза выше, чем у белокожего населения [6]. Помимо этого отмечено увеличение частоты заболеваемости ММ среди пациентов с длительной антигенной стимуляцией, например у больных ревматоидным артритом, хроническими бактериальными инфекциями [7]. В 2011 г. в России было зарегистрировано 2862 больных с впервые диагностированной ММ. Таким образом, показатель заболеваемости составил 2 на 100 тыс. населения, при этом соотношение мужчин и женщин равнялось 1:1,4. Приведенные данные демонстрируют рост заболеваемости ММ в России по сравнению с 2007 г., когда этот показатель составлял 2372 первичных случаев ММ в год [8]. Отчасти это связано с улучшением методов диагностики, что увеличивает число выявляемых случаев ММ.

До настоящего времени не установлен этиологический фактор ММ. Механизмом патогенеза является генетически детерминированное нарушение созревания В-лимфоцита. К «уязвимым» периодам клеточной дифференцировки относятся период генетической модификации гена иммуноглобулина (Ig), который состоит из трех этапов: 1) V(D)J-рекомбинация, происходящая на ранних этапах созревания В-клеток; 2) переключение класса Ig; 3) соматическая гипермутация [9]. Определены некоторые генетические события, приводящие к развитию ММ. Наиболее часто транслоцируемыми генами-партнерами для гена *IgH* являются: *CCND1* (хромосома 11), *CCND3* (хромосома 6), *MMSET* (хромосома 4), *c-MAF* (хромосома 16) и *c-MYC* (хромосома 8) [10]. В результате перечисленных выше транслокаций, встречающихся по разным данным у 40–60% больных ММ, гены-партнеры 14-й хромосомы попадают под действие энхансеров локуса генов тяжелых цепей Ig, что в значительной степени усиливает их экспрессию.

Согласно опубликованным данным [11–15], изменение активности гена *MYC* существенно влияет на течение онкологического процесса. Показано, что его гиперэкспрессия сопровождается низкой химиочувствительностью опухоли у онкологических больных, что отрицательно сказывается на прогнозе заболевания. Этот феномен четко очерчен в течении лимфомы Беркитта, диффузной В-крупноклеточной лимфомы, “Double hit”-лимфомы, острых лимфобластных и миелоидных лейкозов, ряда солидных опухолей (рак молочной железы, предстательной железы, кишечника, меланома). Для больных ММ исследования в этом направлении продолжаются.

Изучение активности белка тус было начато сравнительно давно, еще 30 лет назад. Тогда немецкой исследовательской группой [16] было отмечено, что уровень тус м-РНК быстро возрастает при применении факторов для стимуляции покоящихся клеток.

На сегодняшний день известно 6 типов гена *MYC*: *c-MYC*, *N-MYC*, *L-MYC*, *S-MYC*, *B-MYC*, *P-MYC*, из них гены *c-MYC*, *N-MYC*, *L-MYC* относятся к протоонкогенам и могут принимать участие в злокачественном перерождении клеток. Гены *S-MYC*, *B-MYC* являются противоопухолевыми генами и ингибируют опухолевую трансформацию. *P-MYC* – псевдоген, производное гена *L-MYC*. Онкогены семейства *MYC* (*c-MYC*, *N-MYC*, *L-MYC*) в норме экспрессируются только на эмбриональной стадии развития и в делящихся клетках на ранних этапах дифференцировки. Он также является геном раннего ответа на воздействие митогенов. При активации его экспрессии клетка переходит в S-фазу клеточного цикла (G₁/S-переход). Белок с-тус является участником всех пролиферативных и антипролиферативных процессов. При этом как м-РНК гена *c-MYC*, так и конечный продукт – белок с-тус имеют короткое время жизни (от 30 мин до 1 ч) и локализуются в ядре делящейся клетки – области своей потенциальной активности. Вероятнее всего, такой короткий период жизни можно объяснить необходимостью короткой и точной регуляции экспрессии этого гена [17].

При транслокации t(8;14), как уже упоминалось выше, ген *c-MYC* попадает под контроль энхансеров локуса генов тяжелых цепей Ig, что приводит к повышению его экспрессии. Однако приблизительно в 10% от всех случаев ММ перестройки гена *c-MYC* обнаруживаются без вовлечения локуса генов тяжелых цепей Ig. При других вариантах транслокаций, таких как t(2;8), t(8;22), ген *c-MYC* объединяется с локусами легких цепей Ig. В настоящее время по-

Для корреспонденции:

Нарейко Мария Вячеславовна, врач-гематолог, аспирант научно-клинического отделения высокодозной химиотерапии паранепротенимических гемобластозов ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России. 125167, г. Москва, Россия. E-mail: nareyko@yandex.ru.

For correspondence:

Nareyko Mariya V., MD, hematologist, post graduate of Clinical Research Department of High-Dose Chemotherapy Hemoblastosis, Depression of Hematopoiesis and Bone Marrow Transplantation of National Research Center for Hematology. Moscow, 125167, Russian Federation. E-mail: nareyko@yandex.ru.

Information about authors:

Kuzmina L.A., <http://orcid.org/0000-0001-6201-6276>; Galtseva I.V., <http://orcid.org/0000-0002-8490-6066>; Scopus Author ID: 6506926619; Drokov M.Yu., <http://orcid.org/0000-0001-9431-8316>; Scopus Author ID 48661939800; Parovichnikova E.N., <http://orcid.org/0000-0001-6177-3566>; Savchenko V.G., <http://orcid.org/0000-0003-2935-4040>.

казано, что нарушение регуляции гена *c-MYC* происходит не только в результате крупных хромосомных aberrаций (транслокация или амплификация), но также и в результате возникновения точечных мутаций в промоторной зоне, приводящих к его гиперэкспрессии [18]. Помимо этого, повышение экспрессии гена достигается за счет добавления или потери нуклеотидных последовательностей в 5'- или 3'- нетранслируемых районах мРНК. Стабилизация продукта гена *MYC*, а за счет этого и удлинение периода активности белка *c-myc*, наблюдаются при возникновении мутаций как в самом белке, так и в факторах, участвующих в его разрушении [19].

В целом, при ММ частота встречаемости реаранжировок гена *c-MYC* составляет около 50%, в том числе при вялотекущей форме заболевания. Предполагают, что изменение активности этого гена в основном относится к вторичным генетическим событиям при ММ. Однако доказано с помощью иммуногистохимических исследований и методики профилирования экспрессии генов, что гиперэкспрессия гена *c-MYC* наблюдается не только при развернутой клинической картине ММ, но и на стадии моноклональной гаммапатии неутонченного генеза (МГНГ) [20, 21]. Опубликованные результаты различных исследований позволяют сделать вывод, что гиперэкспрессия *c-MYC* приводит к автономии опухоли независимо от этапа, на котором произошло событие перестройки [13].

При исследовании экспрессии гена *c-MYC* у больных ММ, МГНГ и среди здоровых людей получены следующие данные. Уровень м-РНК гена *c-MYC* в случае выявления в нем реаранжировок выше, чем при ММ без перестроек гена *c-MYC*. При этом нет различий между уровнем экспрессии исследуемого гена в случаях с перестройками в самом гене по сравнению с ситуацией, когда выявляется транслокация с его участием. Также отмечено, что средний уровень экспрессии мРНК гена *c-MYC* всегда выше при ММ, чем при МГНГ. В свою очередь у больных с МГНГ уровень экспрессии *c-MYC* значимо выше, чем у здоровых людей [22–24].

Чрезмерная экспрессия гена *c-MYC* ассоциируется с плохим прогнозом для большинства онкологических заболеваний, в том числе и у больных ММ [21]. По мнению М. Jain и соавт. [25], даже временное ингибирование экспрессии гена *c-MYC* при таких заболеваниях, как остеосаркома, рак поджелудочной железы, а также при лимфопролиферативных заболеваниях, приводит к существенному снижению пролиферации опухолевых клеток, индуцируя их апоптоз, в результате чего останавливается рост опухоли. При остеосаркомах ингибирование гена *c-MYC* приводит к дифференцировке опухолевых клеток до остеоцитов, а при реактивации онкогена – к апоптозу опухолевых клеток. Таким образом, авторы делают вывод, что воздействие на активность гена *c-MYC* практически исключает возможность рецидива опухоли, в отличие от стандартных химиотерапевтических методик, что актуально в плане разработки таргетной терапии препаратами биологической направленности действия.

Подобные выводы о значимости роли гена *c-MYC* в развитии опухолевого процесса подкреплены экспериментальными работами. Совместной группой американских, канадских и итальянских исследователей [26] было показано, что при активации гена *c-MYC* В-клеток герминальных центров трансгенных мышей почти в 100% случаев наблюдается переход МГНГ в ММ. Еще в одно исследование [27] были включены мыши двух видов: мыши дикого типа и мыши с *c-MYC*-индуцированной ММ. В рамках эксперимента исследователи подавляли активность гена *c-MYC* в CD138⁺-клетках в обеих линиях мышей. Интересно, что ингибирующее действие было отмечено только в CD138⁺-клеточном пуле, выделенном от мышей с *c-MYC*-индуцированной ММ. У мышей «дикого» типа уровень экспрессии гена *c-MYC* не изменялся. На основании полученных данных исследователи предлагают рассматривать ген *c-MYC* в качестве потенциальной мишени для лекарственных средств.

Опубликованные результаты исследований указывают на актуальность данного научного направления и делают обоснованным детальное изучение *c-MYC*-опосредованной регуляции опухолевого процесса. Настоящая работа посвящена изучению зависимости течения ММ и характера ответа на терапию от уровня экспрессии гена *c-MYC*.

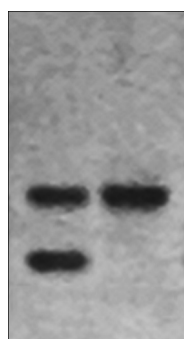
Цель исследования – определение уровня экспрессии гена *c-MYC* у больных с впервые выявленной ММ методом мультиплексной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (qRT-PCR) относительно уровня экспрессии гена «домашнего хозяйства» *HMBS*, который является рекомендованным для работы с клетками костного мозга [28], а также поиск взаимосвязи между уровнем экспрессии гена *c-MYC* в тотальном или обогащенном CD138⁺-клетками материалом костного мозга и достигнутым противоопухолевым ответом на индукционный этап терапии.

Материал и методы

В исследование включены 40 пациентов (24 мужчины и 16 женщин) в возрасте от 29 до 77 лет (медиана возраста 55,5 года) с впервые диагностированными ММ/МГНГ в период с января 2013 по ноябрь 2014 г. и 9 здоровых доноров костного мозга (группа контроля).

Всем больным проводили стандартное первичное обследование, включающее морфологическое исследование аспирата костного мозга, гистологическое исследование трепанобиоптата, клинический и биохимический анализы крови, иммунохимическое исследование сыворотки крови и суточной мочи, рентгенологическое исследование костей скелета. Диагноз ММ/МГНГ устанавливали в соответствии с диагностическими критериями Международной рабочей группы по изучению множественной миеломы (The International Myeloma Working Group – IMWG) [29]. Стадирование проводили по системе Durie–Salmon [30].

У 36 больных с симптоматической ММ проводилась противоопухолевая терапия бортезомиб-содержащими курсами (VCD: бортезомиб + циклофосфан + дексаметазон, PAD: бортезомиб + адриабластин + дексаметазон). Противоопухолевый ответ оценивали по окончании индукционной терапии в соответствии с рекомендациями IMWG 2006 [31]. Стадию заболевания перед началом лечения у 16 больных оценивали как II, у 20 больных – как III стадию. 4 больных с МГНГ и вялотекущей формой ММ оставались под наблюдением без лечения.



Трек 1 Трек 2

Рис. 1. Электрофорез продуктов полимеразной цепной реакции генов *c-MYC* и *HMBS* в 6% полиакриламидном геле.

Трек 1 – распределение в геле фрагментов кДНК генов *c-MYC* и *HMBS*; длина *c-MYC* 191 пар нуклеотидов, *HMBS* – 142 пары нуклеотидов; Трек 2 – результат PCR только с праймерами *c-MYC*.

Оценку экспрессии гена *c-MYC* проводили на образцах костного мозга. У больных забор материала для исследования проводили до начала какой-либо терапии, а у здоровых доноров в момент эксфузии костномозговой взвеси. Из костного мозга выделяли популяцию моноклеаров при использовании градиента плотности фиколла (плотность 1,077 г/см³). Для получения материала, обогащенного миеломными плазмодитами, методом магнитной сепарации выделяли клетки костного мозга, экспрессирующие на своей поверхности рецептор CD138, поскольку этот иммунофенотипический маркер (синдекан 1) специфичен для плазматических клеток, являющихся биологическим субстратом ММ. Сепарация CD138⁺-клеток проводили по протоколу Miltenyi Biotec (www.miltenyibiotec.com) с помощью ручного сортера Macs с применением антител CD138 MicroBeads human ("Miltenyi Biotec", Германия) и колонок для магнитной сепарации MACS Separation Columns ("Miltenyi Biotec", Германия). Далее определяли процентное содержание CD138⁺-клеток в полученном клеточном пуле, который составлял 80–98% в конечном материале. Данную часть работы проводили на проточном цитометре FACS Canto II ("Beckton Dickinson", США).

Исследовали по два образца костного мозга от каждого пациента и донора костного мозга: образец, обогащенный CD138⁺-клетками, и образец тотального материала, не прошедший сепарацию. Тотальную РНК выделяли с помощью лизиса в гуанидин-изотиоцианатном буфере с последующей экстракцией смесью фенол–хлороформ [32]. Обратную транскрипцию с целью построения кДНК проводили с помощью смеси специфичных праймеров (к исследуемому гену *c-MYC* mycRRT – cat-cga-ttt-ctt-cc и к контрольному гену «домашнего хозяйства» *HMBS* – HMBSrRT – tgt-gcc-cca-aaa-ac). Полученную к-ДНК использовали в качестве матрицы для qRT-PCR с системами праймеров: mycD – tct-tcc-cct-acc-ctc-tca-ac/mycR – ttc-ttg-ttc-ctc-ctc-aga-gtc; HMBSd – cat-gtc-cct-gcc-cag-cat-gaa/HMBSr – gct-cct-ttg-ctc-agc-aac-aa и флуоресцентными зондами: *c-MYC* – (FAM) tg-ggc-ggt-gtc-tcc-tca-tgg-(RTQ1) и *HMBS* – (ROX) cc-agg-ctg-atg-ccc-aag-ttc-t-(BHQ2). Системы праймеров предварительно проверяли на тех же матрицах с помощью полимеразной цепной реакции (PCR) без зондов с последующим электрофорезом в 6% полиакриламидном геле. Разделение двух продуктов PCR в полиакриламидном геле в зависимости от их молекулярной массы показано на рис. 1, что демонстрирует возможность проведения многокомпонентной PCR.

qRT-PCR выполняли на приборе Rotor-Gene-Q. Проведение многокомпонентной PCR (Multiplex PCR) в одной пробирке позволило нивелировать разницу между исходным количеством матрицы в образцах. Уровень экспрессии гена *c-MYC* оценивали по разнице (ΔCt) между интенсивностью сигнала флуоресценции от продукта гена *HMBS* (канал

Таблица 1

Экспрессия гена *c-MYC* у здоровых доноров костного мозга

Номер образца костного мозга донора	Экспрессия гена <i>c-MYC</i>			
	в CD138 ⁺ -обогащенном материале, 2 ^{ΔCt}		в CD138 ⁺ -обогащенном материале, 2 ^{ΔCt}	
	значение в образце	среднее значение ($M \pm m$)	значение в образце	среднее значение ($M \pm m$)
D1	4,198	7,183 ± 1,491	2,77	1,907 ± 0,337
D2	1,658		0,57	
D3	4		3,317	
D4	11,551		1,693	
D5	7,11		1,624	
D6	6,868		0,476	
D7	16,449		2,188	
D8	4,924		3,031	
D9	7,889		1,494	

orange, ROX) и продукта гена *c-MYC* (канал green, FAM). Для сравнения результатов qRT-PCR в разных образцах, значения ΔCt были переведены в разы: 2^{ΔCt}. Полученные цифры отражают уровень экспрессии гена *c-MYC* относительно уровня экспрессии гена «домашнего хозяйства» *HMBS*. Таким образом, итоговое значение уровня экспрессии *c-MYC* не является абсолютным показателем. Олигонуклеотидные праймеры и флуоресцентные зонды синтезировали в ЗАО «Синтол».

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью программы SPSS version 12 (IBM), методом Стьюдента.

Результаты

Оценить разницу (ΔCt) между экспрессией гена *c-MYC* и контрольного гена «домашнего хозяйства» *HMBS* удалось в 36 образцах, не прошедших магнитную сепарацию, и в 17 образцах, обогащенных CD138⁺-клетками. В материале, полученном от здоровых доноров, реакция qRT-PCR прошла во всех образцах и тотального, и обогащенного материала. Ограничением для получения статистически значимых результатов qRT-PCR на всех обогащенных образцах была низкая исходная клеточность полученного материала.

Среднее значение экспрессии гена *c-MYC* у 9 здоровых доноров в тотальном материале составило 1,907 ± 0,337 (2^{ΔCt}), при разбросе данных от 0,476 до 3,317 (2^{ΔCt}), в обогащенном CD138⁺-клетками – 7,183 ± 1,491 (2^{ΔCt}), разброс данных составил от 1,658 (2^{ΔCt}) до 16,449 (2^{ΔCt}) (табл. 1). На основании результатов qRT-PCR определили максимально допустимые для здоровых лиц пороговые значения экспрессии гена *c-MYC*, которые составили: для обогащенного материала 16,5 (2^{ΔCt}), для тотального материала – 3,4 (2^{ΔCt}).

У больных с МГНГ и вялотекущей миеломой, терапию которым не проводили, в материале, обогащенном CD138⁺-клетками, qRT-PCR эффективно прошла лишь в одном случае и экспрессия гена *c-MYC* была равна 10,928 (2^{ΔCt}). В тотальном материале статистически значимые результаты были получены во всех образцах, и среднее значение экспрессии гена *c-MYC* составило 7,232 ± 2,899 (2^{ΔCt}), разброс данных от 3,294 до 15,779 (2^{ΔCt}).

Таблица 2

Частота достигнутого противоопухолевого ответа у больных ММ в зависимости от уровня экспрессии гена *c-MYC* в дебюте заболевания

Уровень экспрессии гена <i>c-MYC</i> в дебюте заболевания, 2ΔCt	Число больных с соответствующим уровнем экспрессии гена <i>c-MYC</i>	Среднее значение экспрессии гена <i>c-MYC</i> у больных, $M \pm m$ (min-max)	Частота достижения	
			ПО + ОХЧО + ЧО	ПО + ОХЧО
Результаты, полученные в материале, обогащенном CD138 ⁺ -клетками, 2ΔCt:				
< 16,5	4	6,876 ± 3,297 (1,265–16)	4 (100%) из 4	2 (50%) из 4
16,5–100	9	38,395 ± 5,22 (21,555–64,445)	9 (100%) из 9	4(44,4%) из 9
> 100	3	183,749 ± 37,02 (116,97–245,571)	1(33,3%) из 3	0 (0%) из 3
Результаты, полученные в тотальном материале, 2ΔCt:				
< 3,4	9	1,909 ± 0,346 (0,817–3,363)	8 (88,8%) из 9	5 (55,5%) из 9
3,4–34	19	10,179 ± 1,782 (3,58–30,484)	16 (84,2%) из 19	6 (31,5%) из 19
> 34	4	98,39 ± 27,94 (35,753–171,254)	3 (75%) из 4	2 (50%) из 4

Среди больных симптоматической ММ значения экспрессии гена *c-MYC* в образцах костного мозга, обогащенных CD138⁺-клетками, колебались в весьма широких пределах: от 1,265 (2^{ΔCt}) до 245,571 (2^{ΔCt}). В связи с этим были сформированы три группы, включающие исследованные образцы, с подпороговым значением экспрессии менее 16,5 (2^{ΔCt}), промежуточным значением – 16,5–100 (2^{ΔCt}) и гиперэкспрессией гена *c-MYC* – более 100 (2^{ΔCt}). В образцах тотального материала уровень экспрессии *c-MYC* также существенно различался: 0,817–171,254 (2^{ΔCt}). На основании результатов, полученных при работе с тотальным материалом, были сформированы аналогичные группы: с подпороговым уровнем экспрессии менее 3,4 (2^{ΔCt}), промежуточным уровнем – 3,4–34 (2^{ΔCt}) и с гиперэкспрессией гена *c-MYC* – более 34 (2^{ΔCt}).

Проведен анализ, направленный на поиск взаимосвязи между уровнем экспрессии гена *c-MYC* в CD138⁺-клетках костного мозга первичных больных ММ и достигнутым противоопухолевым ответом на индукционном этапе терапии. В результате бортезомибсодержащей терапии полный ответ (ПО) был достигнут у 8 больных, очень хороший частичный ответ (ОХЧО) – у 7, частичный ответ (ЧО) – у 16, неудача терапии, свидетельствующая о резистентности опухоли, констатирована у 5 больных.

В табл. 2 представлено сопоставление показателей исходной экспрессии гена *c-MYC* с частотой достижения противоопухолевого ответа. Более четкая взаимосвязь исходной экспрессии гена *c-MYC* и степени достигнутого противоопухолевого ответа прослеживается при анализе результатов работы с материалом, обогащенным CD138⁺-клетками. ПО + ОХЧО + ЧО после индукционной терапии был получен только у тех больных, экспрессия гена *c-MYC* в момент диагностики у которых соответствовала под-

Таблица 3

Значения исходной экспрессии гена *c-MYC* у больных ММ с разным противоопухолевым ответом на индукционную терапию; $M \pm m$ (min-max)

Противоопухолевый ответ на индукционную терапию	Среднее значение экспрессии гена <i>c-MYC</i> в дебюте заболевания, 2 ^{ΔCt}	
	в материале, обогащенном CD138 ⁺ -клетками (n = 16)	в тотальном материале костного мозга (n = 32)
Полный ответ	n = 3 14,259 ± 12,172 (1,265–38,585)	n = 6 5,138 ± 1,463 (0,84–11,08)
Очень хороший частичный ответ	n = 3 38,314 ± 13,1 (23,588–64,445)	n = 7 30,355 ± 16,356 (1,866–99,733)
Частичный ответ	n = 8 50,506 ± 20,624 (7,31–188,706)	n = 14 11,877 ± 3,141 (0,817–35,753)
Резистентное течение	n = 2 181,271 ± 64,3 (116,97–245,571)	n = 5 38,911 ± 33,119 (0,952–171,254)

пороговому – менее 16,5 (2^{ΔCt}) и промежуточному – 16,5–100 (2^{ΔCt}) уровню. Из 3 больных с исходной гиперэкспрессией гена *c-MYC* лишь у 1 больного был достигнут ЧО, у остальных больных из этой группы наблюдалось резистентное течение заболевания.

При анализе результатов работы с тотальным материалом столь явных различий определить не удалось.

На следующем этапе исследования было изучено, какие показатели исходной экспрессии гена *c-MYC* могли бы явиться предиктором достижения значимого противоопухолевого ответа. В табл. 3 представлены средние значения экспрессии гена *c-MYC* у больных с различным противоопухолевым ответом на проведенную индукционную терапию. Установлено, что уровень исходной экспрессии гена *c-MYC* коррелировал с глубиной противоопухолевого ответа. При анализе результатов работы с материалом, обогащенным CD138⁺-клетками, отмечено, что ПО достигался у больных, уровень экспрессии гена *c-MYC* которых не превышал показателя 38,584 (2^{ΔCt}), при среднем значении экспрессии исследуемого гена в этой группе больных 14,259 ± 12,172 (2^{ΔCt}). А ОХЧО был получен только у тех больных, уровень экспрессии гена *c-MYC* которых не превышал 64,445 (2^{ΔCt}), при средних значениях 38,314 ± 13,1 (2^{ΔCt}). У больных с более высокими показателями экспрессии гена *c-MYC* противоопухолевый ответ был менее выражен. В связи с небольшим числом больных выявленные различия оказались статистически незначимыми ($p > 0,1$).

На рис. 2, а представлена диаграмма, иллюстрирующая сопоставление средних значений экспрессии гена *c-MYC* в материале, обогащенном CD138⁺-клетками, у больных симптоматической ММ (в зависимости от полученного противоопухолевого ответа), МГНГ и вялотекущей формой ММ, а также здоровых доноров. Выявлено статистически значимое различие уровня экспрессии гена *c-MYC* между здоровыми донорами и больных ММ/МГНГ ($p = 0,01$). Помимо этого выявлена близкая к статистически значимой разница уровней экспрессии гена *c-MYC* при сравнении групп больных, достигших ПО + ОХЧО

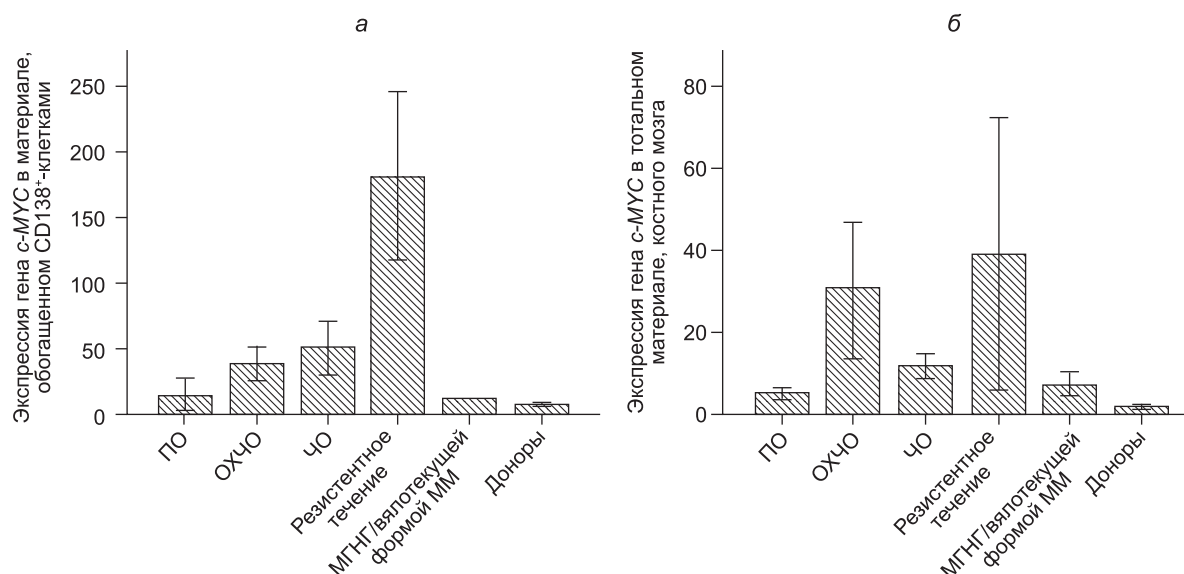


Рис. 2. Средние значения экспрессии гена *c-MYC* у больных ММ при разном противоопухолевом ответе на терапию, а также у больных МГНГ/вялотекущей миеломой и здоровых доноров костного мозга.

а – данные qRT-PCR в материале, обогащенном CD138⁺-клетками; б – данные qRT-PCR в тотальном материале костного мозга.

с больными с ЧО или резистентным течением заболевания ($p = 0,09$). Вероятнее всего, на статистическую значимость полученных результатов повлияла малая выборка больных в каждой подгруппе.

По результатам qRT-PCR в образцах тотального материала костного мозга такой зависимости не было (рис. 2, б).

Проведенный анализ, направленный на определение взаимосвязи уровня экспрессии гена *c-MYC* со стадией заболевания на момент диагностики, не выявил какой-либо зависимости при работе как с тотальным материалом, так и с обогащенным CD138⁺-клетками.

Заключение

Результаты работы подтвердили предположение о том, что уровень экспрессии гена *c-MYC* в образцах, обогащенных CD138⁺-клетками, выше, чем в тотальном материале. Какой-либо зависимости между уровнем экспрессии гена *c-MYC* в пробах тотального материала и глубиной противоопухолевого ответа обнаружить не удалось. Между тем, при изучении показателей экспрессии гена *c-MYC* во фракции, обогащенной CD138⁺-клетками, несмотря на малую выборку, выявлена взаимосвязь между глубиной противоопухолевого ответа и уровнем экспрессии гена *c-MYC*. Полученные результаты совпадают с данными других авторов и подтверждают, что гиперэкспрессия гена *c-MYC* ассоциируется с худшим прогнозом и низкой химиочувствительностью ММ. Схожие результаты в настоящей работе были получены при условии использования методики детекции уровня экспрессии гена *c-MYC* отличной от других исследователей [20, 21, 33]. В то же время в ряде источников [3, 13, 20] можно найти данные о том, что к гиперэкспрессии гена *c-MYC* приводят хромосомные aberrации, которые свойственны преимущественно продвинутой стадии и/или рецидивам ММ, а не дебюту заболевания.

Основываясь на представленных результатах можно сделать вывод, что для использования показателей экспрессии гена *c-MYC* в качестве предиктора противоопухолевого ответа и получения адекватной информации, необходима предварительная сепарация клеток костного мозга по поверхностному маркеру синдекан-1 (CD138⁺). Анализ показателей экспрессии гена *c-MYC*, полученных при работе с тотальным клеточным пулом, не выявил какой-либо корреляции с выраженностью противоопухолевого ответа на терапию бортезомибсодержащими курсами.

Учитывая тот факт, что гиперэкспрессия гена *c-MYC* при ММ относится к вторичным генетическим событиям, предполагалось, что имеется взаимосвязь гиперэкспрессии исследуемого гена с более поздней распространенной стадией заболевания. Однако этого явления обнаружить не удалось. По всей вероятности, отсутствие взаимосвязи гиперэкспрессии гена *c-MYC* со стадией заболевания обусловлено тем, что белок с-тус является лишь составляющей частью механизма патогенеза ММ и не может рассматриваться как единственный предиктор варианта противоопухолевого ответа.

Целью нашего исследования являлось определение уровня экспрессии гена *c-MYC* у больных ММ в момент диагностики. Полученные данные сопоставляли с ответом на индукционную терапию. Выполненный этап работы не позволил оценить роль этого гена в формировании резистентности опухоли и сроков возникновения рецидива заболевания.

Несмотря на малую выборку, очевидно, что степень активности гена *c-MYC* оказывает существенное влияние на течение ММ. Для получения статистически значимых результатов необходимо расширение когорты пациентов, включенных в исследование. Кроме того, для более полного анализа роли онкогенов в патогенезе и клиническом течении ММ представляется целесообразным исследование других генов, таких как *CCND1*, *MMSET*, *K-RAS*, *N-RAS*.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 15-04-02568).

ЛИТЕРАТУРА

6. Диагностика и лечение множественной миеломы. Рекомендации Британского форума по множественной миеломе и Скандинавской исследовательской группы по множественной миеломе, 2005. *Стандарты мировой медицины*. 2006; 2: 24–56.
8. Давыдов М.И., Аксель Е.М. Заболеваемость злокачественными новообразованиями населения России и стран СНГ в 2007 г. *Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН*. 2009; 3: 52–90.
17. Кабилова Т.О., Черноловская Е.Л. Онкогены семейства мус как терапевтические мишени. *Бюллетень сибирской медицины*. 2008; (Прил. 3): 11–26.

Остальные источники литературы см. в References

REFERENCES

1. Paszekova H., Kryukov F., Kubiczko L., Hajek R., Sevcikova S. High-Risk Multiple Myeloma: Different definitions, different outcomes? *Clin. Lymphoma Myeloma Leuk*. 2014; 14(1): 24–30. doi:10.1016/j.clml.2013.09.004.
2. Bergsagel P.L., Chesi M.V. Molecular classification and risk stratification of myeloma. *Hematol. Oncol*. 2013; 31(Suppl.1): 38–41. doi: 10.1002/hon.2065.
3. Morgan G.J., Walker B.A., Davies F.E. The genetic architecture of multiple myeloma. *Nat. Rev. Cancer*. 2012; 12(12): 335–48. doi: 10.1038/nrc3257.
4. Lorbach R.B., His E.D., Dogan A., Fend F. Plasma cell myeloma and related neoplasms. *Am. J. Clin. Pathol*. 2011; 136(2): 168–82. doi: 10.1309/AJCPENJ68FFBRIYB.
5. Van Wier S., Braggio E., Baker A., Ahmann G., Levy J., Carpten J.D., et al. Hypodiploid multiple myeloma is characterized by more aggressive molecular markers than non-hyperdiploid multiple myeloma. *Hematologica*. 2013; 98(10): 1586–92. doi: 10.3324/haematol.2012.081083.
6. Smith A., Wisloff F., Samson D.; UK Myeloma Forum; Nordic Myeloma Study Group; British Committee for Standards in Haematology. Guidelines on the diagnosis and management of multiple myeloma, 2005. *Br. J. Haematol*. 2006; 132(4): 410–51.
7. Bhatia K.G., Cherney B.W., Huppi K., Magrath I.T., Cossman J., Sausville E., et al. A deletion linked to a poly (ADP-ribose) polymerase gene on chromosome 13q33-qter occurs frequently in the normal black population as well as in multiple tumor DNA. *Cancer Res*. 1990; 50(17): 5406–13.
8. Davidov M.I., Aksel E.M. The incidence of malignant neoplasms of the population of Russia and the CIS in 2007. *Journal of N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center RAMS (Vestnik RNC im. N.N. Blokhina)*. 2009; 20(3): 52–90. (in Russian)
9. Gonzalez G., van der Burg M., Garcia-Sanz R., Fenton J.A., Langerak A.W., Gonzalez M., et al. Immunoglobulin gene rearrangements and the pathogenesis of multiple myeloma. *Blood*. 2007; 110(9): 3112–21.
10. Bergsagel P.L., Kuehl W.M., Zhan F., Sawyer J., Barlogie B., Shaughnessy J.Jr. CyclinD dysregulation: an early and unifying pathogenic event in multiple myeloma. *Blood*. 2005; 106(1): 296–303.
11. Lwin T., Zhao X., Cheng F., Zhang X., Huang A., Shah B., et al. A microenvironment-mediated c-Myc/miR-548m/HDAC6 amplification loop in non-Hodgkin B cell lymphomas. *J. Clin. Invest*. 2013; 123(11): 4612–26.
12. Terunuma A., Pulturi N., Mishra P., Mathe E.A., Dorsey T.H., Yi M., et al. MYC-driven accumulation of 2-hydroxyglutarate is associated with breast cancer prognosis. *J. Clin. Invest*. 2014; 124(1): 398–12. doi: 10.1172/JCI71180.
13. Affer M., Chesi M., Chen W.D., Keats J.J., Demchenko Y.N., Tamizhmani K., et al. Promiscuous MYC locus rearrangements hijack enhancers but mostly super-enhancers to dysregulate MYC expression in multiple myeloma. *Leukemia*. 2014; 28(8): 1725–35. doi: 10.1038/leu.2014.70.
14. Delgado M.D., Leon J. Myc roles in hematopoiesis and leukemia. *Gen. Cancer*. 2010; 1(6): 605–16. doi: 10.1177/1947601910377495.
15. Janz S. Myc translocations in B cell and plasma cell neoplasms. *DNA Repair*. 2006; 5(9–10): 1213–24.
16. Muller R., Bravo R., Burckhardt J., Curran T. Induction of c-fos gene and protein by growth factor precedes activation of c-myc. *Nature*. 1984; 312(5996): 716–20.
17. Kabilova T.O., Chernogolovskaya E.L. Myc-family oncogenes as therapeutic targets. *Bulletin of Siberian medicine (Bulletin sibirskoy meditsiny)*. 2008; (Issue 3): 11–26. (in Russian)
18. Grand C.L., Powell T.J., Nagle R.B., Bearss D.J., Tye D., Gleason-Guzman M., Hurley L.H. Mutations in the G-quadruplex silencer element and their relationship to c-MYC overexpression, NM23 repression, and therapeutic rescue. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 2004; 101(16): 6140–5.
19. Taniguchi M., Fujiwara K., Nakai Y., Ozaki T., Koshikawa N., Toshio K., et al. Inhibition of malignant phenotypes of human osteosarcoma cells by a gene silencer, a pyrrole-imidazole polyamide, which targets an E-box motif. *FEBS Open Bio*. 2014; 13(4): 328–34. doi: 10.1016/j.fob.2014.03.004.
20. Chng W.J., Huang G.F., Chung T.H., Ng S.B., Gonzalez-Paz N., Troska-Price T., et al. Clinical and biological implications of MYC activation: a common difference between MGUS and Newly diagnosed multiple myeloma. *Leukemia*. 2011; 25(6): 1026–35. doi: 10.1038/leu.2011.53.
21. Zhan F., Hardin J., Kordsmeier B., Bumm K., Zheng M., Tian E., et al. Global gene expression profiling of multiple myeloma, monoclonal gammopathy of undetermined significance, and normal bone marrow plasma cell. *Blood*. 2002; 99(5): 1745–57.
22. Zhan F., Barlogie B., Arzoumanian V., Huang Y., Williams D.R., Hollmig K., et al. Gene expression signature of benign monoclonal gammopathy evident in multiple myeloma is linked to good prognosis. *Blood*. 2007; 109(4): 1692–700.
23. Klein U., Tu Y., Stolovitzky G.A., Keller J.L., Haddad J.Jr., Miljkovic V., et al. Transcriptional analysis of the B cell germinal center reaction. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 2003; 100(5): 2639–44.
24. Zhan F., Tian E., Bumm K., Smith R., Barlogie B., Shaughnessy J.Jr. Gene expression profiling of human plasma cell differentiation and classification of multiple myeloma based on similarities to distinct stages of late-stage-B-cell development. *Blood*. 2003; 101(3): 1128–40.
25. Jain M., Arvanitis C., Chu K., Dewey W., Leonhardt E., Trinh M., et al. Sustained loss of a neoplastic phenotype by brief inactivation of MYC. *Science*. 2002; 297(5578): 102–4.
26. Chesi M., Robbiani D. F., Sebag M., Chng W.J., Affer M., Tiedemann R., et al. AID-dependent activation of a MYC transgene induces multiple myeloma in a conditional mouse model of post-germinal center malignancies. *Cancer Cell*. 2008; 13(2): 167–80. doi: 10.1016/j.ccr.2008.01.007.
27. Pourdehnad M., Truitt M.L., Siddiqi I.N., Ducker G.S., Shokat K.M., Ruggero D. Myc and mTOR converge on a common node in protein synthesis control that confers synthetic lethality in Myc-driven cancers. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 2013; 110(2): 11988–93. doi: 10.1073/pnas.1310230110.
28. Vandesompele J., De Preter K., Pattyn F., Poppe B., Van Roy N., De Paep A., et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*. 2002; 3(7): 1–12.
29. Rajkumar V., Dimopoulos M.A., Palumbo A., Blade J., Merlini G., Mateos M.V., et al. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol*. 2014; 15(12): e538–48. doi: 10.1016/S1470-2045(14)70442-5.
30. 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.
31. Durie B.G., Harousseau J.L., Miguel J.S., Blade J., Barlogie B., Anderson K., et al. International Myeloma Working Group. International uniform response criteria for multiple myeloma. *Leukemia*. 2006; 20(9): 1467–73.
32. Chomczynski P., Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem*. 1987; 162(1): 156–9.
33. Holien T., Vatsveen T.K., Hella H., Rampa C., Brede G., Grosset L.A., et al. Bone morphogenetic proteins induce apoptosis in multiple myeloma cells by Smad-dependent repression of MYC. *Leukemia*. 2012; 26(5): 1073–80. doi: 10.1038/leu.2011.263.

Поступила 13.10.15

Принята к печати 11.12.15