

DOI: 10.17650/1818-8346-2022-17-2-51-59



Сопоставление экспрессии гена *MAGE-C1* и белка *mage-c1* у первичных больных множественной миеломой

Э.А. Макунина, Л.П. Менделеева, В.Л. Сурин, М.В. Соловьев, М.В. Фирсова, А.М. Ковригина, А.А. Шерстнев, И.В. Гальцева, Ю.О. Давыдова, С.М. Куликов

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава России; Россия, 125167 Москва, Новый Зыковский проезд, 4

Контакты: Элеонора Анатольевна Макунина Makunina.ea@yandex.ru

Введение. В настоящее время гематология является динамично развивающейся наукой ввиду углубленного изучения молекулярных механизмов той или иной болезни. Благодаря лучшему пониманию биологии онкогематологических заболеваний удастся синтезировать новые препараты с таргетным механизмом действия, что благоприятно сказывается на лечении пациентов. В частности, при множественной миеломе после введения в клиническую практику ингибиторов протеасом, иммуномодулирующих препаратов отмечено улучшение показателей общей выживаемости. Однако характеристика механизмов, ответственных за трансформацию нормальных плазматических клеток в злокачественные, все также затруднена, в связи с чем изучение патобиологических основ множественной миеломы на сегодняшний день является актуальной задачей.

Цель исследования – оценить возможное влияние экспрессии гена *MAGE-C1* и наличия белка *mage-c1* у больных с впервые выявленной множественной миеломой на противоопухолевый ответ бортезомибсодержащей терапии.

Материалы и методы. В проспективное исследование были включены 33 больных множественной миеломой. Диагноз устанавливали в соответствии с критериями Международной рабочей группы по изучению ММ (IMWG, 2014). У 32 больных индукционный этап терапии состоял из бортезомибсодержащих курсов, 1 больной в схеме 1-й линии был включен леналидомид. Всем больным в дебюте заболевания определяли экспрессию гена *MAGE-C1* методом полимеразной цепной реакции в реальном времени в плазматических клетках пунктата костного мозга и белка *mage-c1*, определенного иммуногистохимическим методом в трепанобиоптате костного мозга. В качестве контроля исследовали материал костного мозга здоровых доноров.

Результаты. При оценке статистической взаимосвязи экспрессии гена *MAGE-C1* и белка *mage-c1* выявлено, что при низких значениях экспрессии гена *MAGE-C1* не наблюдалось высокой экспрессии белка *mage-c1*. При этом высокая экспрессия исследуемого гена всегда ассоциировалась с экспрессией белка выше нормальных значений. Анализ, направленный на поиск взаимосвязи между детекцией гена *MAGE-C1* и белка *mage-c1* и степенью противоопухолевого ответа после 6 курсов индукционной терапии показал, что наличие высокой экспрессии изучаемых параметров ассоциировалось с худшим ответом на бортезомибсодержащее лечение.

Заключение. В рамках проведенного анализа удалось подтвердить, что результаты 2 методов сопоставимы. Однофакторный анализ продемонстрировал, что у больных со сниженными показателями экспрессии гена *MAGE-C1* и белка *mage-c1* достижение противоопухолевого ответа на бортезомибсодержащие схемы достоверно выше, в то время как высокая экспрессия сопровождается рефрактерностью к бортезомибу.

Ключевые слова: множественная миелома, ген *MAGE-C1*, белок *mage-c1*

Для цитирования: Макунина Э.А., Менделеева Л.П., Сурин В.Л. и др. Сопоставление экспрессии гена *MAGE-C1* и белка *mage-c1* у первичных больных множественной миеломой. Онкогематология 2022;17(2):51–9. DOI: 10.17650/1818-8346-2022-17-2-51-59.

MAGE-C1 gene and *mage-c1* protein expression comparison in primary multiple myeloma patients

E.A. Makunina, L.P. Mendeleeva, V.L. Surin, M.V. Soloviev, M.V. Firsova, A.M. Kovrigina, A.A. Sherstnev, I.V. Gal'tseva, Yu.O. Davydova, S.M. Kulikov

National Research Center for Hematology, Ministry of Health of Russia; 4 Novyy Zykovskiy Proezd, Moscow 125167, Russia

Contacts: Eleonora Anatol'evna Makunina Makunina.ea@yandex.ru

Background. Nowadays, hematology is a dynamically developing science due to the in-depth study of the molecular mechanisms of a particular disease. A better understanding of oncohematological diseases biology makes it possible to synthesize new targeted drugs, which have a favorable therapeutic effect. In particular, in multiple myeloma, after the introduction of proteasome inhibitors and immunomodulatory drugs into clinical practice, an improvement in overall survival was observed. However, characteristics of the mechanisms of transformation normal plasma cells into malignant ones are still difficult; therefore, the study of the pathobiological basis of multiple myeloma is currently an urgent task.

The objective: to evaluate the possible influence of *MAGE-C1* gene expression and the presence of mage-c1 protein in patients with newly diagnosed multiple myeloma on the anti-tumor response after bortezomib-containing therapy.

Materials and methods. A prospective study included 33 multiple myeloma patients. The diagnosis was established according to International Myeloma Working Group criteria (IMWG, 2014). In 32 patients the induction therapy included bortezomib-containing courses, in one patient lenalidomide was included in the first-line regimens. The *MAGE-C1* gene expression by real-time polymerase chain reaction and mage-c1 protein by immunohistochemistry in plasma cells bone marrow, were determined for all patients at the debut of multiple myeloma. As a control group was examined the bone marrow material of healthy donors.

Results. When assessment the statistical relationship between the expression of *MAGE-C1* gene and mage-c1 protein, it was found that there was no high expression of mage-c1 protein at low values of *MAGE-C1* gene expression. At the same time, high expression of the gene was always associated with protein expression above normal values.

The analysis aimed at finding the relationship between *MAGE-C1* gene and mage-c1 protein detection and the degree of antitumor response after 6 courses of induction therapy showed that high expression of the studied parameters was associated with a worse response to bortezomib-containing treatment.

Conclusion. We confirmed that the results of the two methods were comparable. Single factor analysis showed that patients with decreased *MAGE-C1* gene and mage-c1 protein expression levels achieved a significantly higher antitumor response to bortezomib-containing regimens, while high expression was accompanied by refractoriness to bortezomib.

Key words: multiple myeloma, *MAGE-C1* gene, mage-c1 protein

For citation: Makunina E.A., Mendeleeva L.P., Surin V.L. et al. *MAGE-C1* gene and mage-c1 protein expression comparison in primary multiple myeloma patients. *Onkogematologiya = Oncohematology* 2022;17(2):51–9. (In Russ.). DOI: 10.17650/1818-8346-2022-17-2-51-59.

Введение

Множественная миелома (ММ) — В-клеточная опухоль, характеризующаяся клональной экспансией неопластических плазматических клеток (ПК) в костном мозге [1]. За последние десятилетия, в эпоху развития молекулярной биологии, диагностика и лечение ММ претерпели значительные изменения, в первую очередь за счет расширения возможностей изучения генетических трансформаций в опухолевых клетках и изменений костномозгового микроокружения, способствующих росту опухоли [2, 3].

Каждый новый этап интерпретации этих молекулярных открытий способствовал модификации и пересмотру диагностических критериев, которые на данный момент позволяют провести более раннее распознавание ММ и начало специфической терапии до появления признаков органного поражения (так называемого CRAB-синдрома) [4, 5]. Помимо этого, более глубокое понимание гетерогенности заболевания привело к разработке новых терапевтических стратегий, направленных на повышение общей и безрецидивной выживаемости.

Несмотря на то что у большинства пациентов достигается противоопухолевый ответ на фоне современных методов терапии, включающих инновационные таргетные препараты, а также высокие дозы мелфалана и аутологичную трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток (ауто-ТГСК), ММ остается неизлечимым заболеванием с медианой 5-летней выжива-

емости не более 50 % [4]. В связи с этим сохраняется необходимость поиска критериев прогноза и мониторинга ответа на терапию, так как убедительно доказано, что глубина ответа на терапию является одним из наиболее важных факторов эффективности применяемых схем лечения [5].

Уникальная группа генов, кодирующих опухолевоспецифичные раково-тестикулярные антигены (РТА), активно изучается в качестве новых маркеров возможной рефрактерности заболевания и мишеней для иммунотерапии при некоторых видах злокачественных заболеваний, в том числе при ММ. Интерес к изучению РТА возник в 90-е годы прошлого столетия после идентификации меланома-ассоциированного антигена *mage-a1* (melanoma antigen gene family member A1). Последующий поиск новых иммуногенных опухолевоассоциированных антигенов позволил выявить более 250 РТА [6–8]. Экспрессия РТА опосредована регуляцией таких механизмов, как метилирование ДНК и ацетилирование гистонов. Вместе с тем при многих опухолевых заболеваниях возникает нарушение эпигенетической регуляции, что может приводить к деметилированию промотора и вызывать гиперэкспрессию РТА [7, 9, 10].

Гены, кодирующие РТА, демонстрируют крайне ограниченную экспрессию в соматических клетках нормальных тканей, экспрессия регистрируется только в клетках яичка и плацентарных клетках, в то же время патологическая экспрессия наблюдается

в опухолевых клетках при многих злокачественных заболеваниях [11].

При гематологических заболеваниях экспрессия РТА является редким событием, однако изучение РТА позволило выявить ряд антигенов, составивших исключение [12, 13]. Примером такого исключения стал *mage-c1* (melanoma antigen gene family member C1), наиболее часто экспрессируемый в aberrантных ПК при ММ [6, 11, 12, 14–16]. *Mage-c1* кодируется геном, расположенным на длинном плече X-хромосомы в локусе Xq26-Xq27.2 [9].

Большой интерес вызывают немногочисленные публикации, позволяющие предположить, что экспрессия РТА может оказаться прогностическим фактором, определяющим эффективность химиотерапевтического воздействия, использоваться в качестве дополнительного маркера неблагоприятного течения заболевания и раннего предиктора рецидива или прогрессии ММ.

Цель исследования — оценить возможное влияние экспрессии гена *MAGE-C1*, измеренной методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) в ПК пунктата костного мозга, и наличия белка *mage-c1*, определенного иммуногистохимическим (ИГХ) методом в трепанобиоптате костного мозга у больных с впервые выявленной ММ, на противоопухолевый ответ бортезомибсодержащей терапии.

Материалы и методы

В исследование были включены 33 пациента (18 мужчин и 15 женщин) в возрасте от 35 до 68 лет (медиана 57 лет) с впервые диагностированной ММ, получавших лечение в НМИЦ гематологии в период с марта 2019 г. по август 2021 г.

Диагноз симптоматической ММ устанавливали в соответствии с критериями Международной рабочей группы по изучению ММ (IMWG, 2014) [17]. У 9 больных стадию по системе Durie–Salmon оценивали как I–II, у 24 — как III. По Международной системе стадирования (ISS) у 21 больного зарегистрирована I–II стадия, у 12 — III. В миелограмме содержание ПК варьировало от 5 до 89 % (медиана 23 %), секреция парапротеина составила 2,1–51,2 г/л, белок Бенс-Джонса в моче (от следовых значений до 7,7 г/сут) определялся у 22 (66,7 %) больных. Высокий цитогенетический риск (t(4;14)(p16;q32), del17p) был документирован у 10 (30,3 %) больных, костные плазмцитомы — у 15 (45,5 %), миеломная нефропатия — у 10 (30,3 %). Срок наблюдения составил 1–26 мес (медиана 18 мес).

У 32 больных индукционный этап терапии состоял из бортезомибсодержащих курсов, 1 больной в связи с симптомами полинейропатии в дебюте заболевания в схемы 1-й линии был включен леналидомид. Проведение 2-й линии терапии с включением леналидомидсодержащих схем потребовалось 5 больным, 1 больному выполнено 3 линии терапии, в том числе с использо-

ванием только химиотерапевтических препаратов. Количество индукционных курсов составило от 1 до 10 (медиана 7). До начала системной терапии 1 больному провели локальную лучевую терапию на область костной плазмцитомы левой подвздошной кости в суммарной очаговой дозе 50 Гр. Противоопухолевый ответ оценивали по критериям IMWG-2016 после 6 бортезомибсодержащих курсов индукционной терапии.

Исследование экспрессии гена *MAGE-C1* в образцах костного мозга, обогащенного CD138⁺-клетками, выполнили всем 33 больным ММ. В качестве контроля исследовали аналогичные костномозговые клетки 7 здоровых доноров. Первый этап работы включал выделение популяции моноклеаров из цельной костномозговой взвеси, в последующем подвергшихся высокоактивной магнитной сепарации и обогащению CD138⁺-клетками с использованием моноклонального антитела к CD138 MicroBeads human (Miltenyi Biotec, Германия). Анализ чистоты выделения моноклеаров, обогащенных CD138⁺-клетками, проводили с помощью проточного цитометра BD FACSCanto II, Beckton (BD, США). Медиана содержания моноклеаров, обогащенных CD138⁺-клетками, составила 73,2 %.

Тотальную РНК выделяли с помощью лизиса в гуанидин-изотиоцианатном буфере с последующей экстракцией смесью фенол — хлороформ. Количество РНК оценивали на спектрофотометре по значению A260. Чистоту образца определяли по соотношению A260/A280 (в пределах 1,8–2,0).

Уровень экспрессии гена *MAGE-C1* оценивали методом ПЦР-РВ (прибор CFX96 Real-Time System) по разнице (ΔC_t) между пороговыми циклами от продукта гена домашнего хозяйства *GAPDH* и продукта исследуемого гена.

В качестве матрицы для ПЦР-РВ использовали комплементарную ДНК, полученную после проведения обратной транскрипции. Олигонуклеотидные праймеры и флуоресцентные зонды, использованные в работе, синтезировали в компании «Синтол». Прямой и обратный праймеры соответственно представлены последовательностями tga-ggg-aca-cat-aca-tcc-taa-aag-c и ttg-tct-tct-ggg-aac-ctt-gac-tc для исследуемого гена *MAGE-C1* и ggt-gaa-ggt-cgg-agt-caa-cg и tgg-gtg-gaa-tca-tat-tgg-aac-a для контрольного гена домашнего хозяйства *GAPDH*. Флуоресцентные зонды: к гену *MAGE-C1* — (FAM)-ac-tgc-ctg-ggc-ctc-ctc-tgc-tgt-(BHQ1), к гену *GAPDH* — (ROX)-ct-ctg-gta-aag-tgg-ata-ttg-ttg-cca-tca-(BHQ2).

Значения ΔC_t больных ММ сравнивали с диапазоном ΔC_t доноров. Для интерпретации результатов ПЦР-РВ в образцах значения ΔC_t были переведены в разы ($2^{\Delta C_t}$). Полученные цифры отражают уровень экспрессии гена *MAGE-C1* относительно уровня экспрессии гена домашнего хозяйства, т. е. итоговое значение уровня экспрессии *MAGE-C1* не является абсолютным показателем.

Исследование ИГХ-методом экспрессии белка *mage-c1* костного мозга было выполнено 33 больным ММ с применением панели антител anti-MAGE-C1 (клон EPR18067, Abcam, Великобритания). В качестве положительного контрольного образца использовали биопсийный материал ткани яичка, в качестве отрицательного контроля — материал трепанобиоптатов 7 здоровых доноров. Просмотр гистологических препаратов костного мозга и ткани яичка осуществляли с помощью микроскопа Leica DM4000B.

Для анализа данных использовали классические методы описательной статистики, частотного анализа (анализа таблиц сопряженности), однофакторного дисперсионного анализа. Критический уровень значимости p принят равным 0,05. Расчеты проводили в статистических пакетах GraphPad Prism 9 и SAS 9.4.

Результаты

Среднее значение экспрессии гена *MAGE-C1* у 7 здоровых доноров составило $0,01 \pm 0,007$ ($2^{\Delta Ct}$), при разбросе данных от 0,0003 до 0,06 ($2^{\Delta Ct}$). На основании результатов ПЦР-РВ определили максимально допустимое для здоровых доноров пороговое значение экспрессии исследуемого гена, которое составило 0,06 ($2^{\Delta Ct}$). Разброс значений экспрессии гена *MAGE-C1* у 33 больных ММ находился в диапазоне от 0,002 до 9,44 ($2^{\Delta Ct}$).

В зависимости от уровня экспрессии гена *MAGE-C1* в мононуклеарах костного мозга больных ММ было сформировано 3 группы. В 1-ю группу отнесены 8 пациентов с нормальными показателями экспрессии ($\leq 0,06$ ($2^{\Delta Ct}$)), во 2-ю группу — 15 больных со средним уровнем экспрессии (0,07–1,47 ($2^{\Delta Ct}$)), в 3-ю группу — 10 пациентов с высоким уровнем экспрессии исследуемого гена ($\geq 1,48$ ($2^{\Delta Ct}$)).

При ИГХ-исследовании трепанобиоптатов у 5 здоровых доноров ПК, экспрессирующих белок *mage-c1*, не выявлено, у 2 обнаружены единичные ПК, экспрессирующие данный белок. ИГХ-исследование костного мозга больных ММ позволило определить процент ПК, экспрессирующих белок *mage-c1* в каждом трепанобиоптате. Диапазон детекции белка *mage-c1* в ПК варьировал от минимальных значений (<5 % клеток) до окрашивания практически всех ПК (рис. 1).

В зависимости от количества ПК, экспрессирующих белок *mage-c1*, было сформировано также 3 группы больных: 1-ю группу составили 8 больных с минимальной экспрессией белка *mage-c1* (<5 % клеток), соответствующей норме, 2-ю группу — 10 больных со средним показателем экспрессии (<50 % клеток), 3-ю группу — остальные 15 больных, у которых наблюдалась высокая экспрессия исследуемого белка (доля ПК, экспрессирующих белок *mage-c1*, превышала 50 %). У 26 больных удалось определить внутриклеточную локализацию белка *mage-c1*: цитоплазматическую — в 24 (92,3 %) образцах биоптатов и ядерно-цитоплазматическую — в 2 (7,7 %) образцах.

Сопоставление частоты экспрессии гена *MAGE-C1* и белка *mage-c1* у больных ММ в дебюте заболевания показало практически одинаковые результаты (табл. 1). При оценке статистической взаимосвязи экспрессии гена *MAGE-C1* и белка *mage-c1* методом многомерного частотного распределения выявлено, что при нормальных показателях экспрессии гена *MAGE-C1*, соответствующих таковым у доноров, не наблюдалось высокой экспрессии белка *mage-c1*. При этом высокая экспрессия исследуемого гена всегда ассоциировалась с экспрессией белка выше нормальных значений. Взвешенный коэффициент согласия Каппа равен 0,4 с доверительным интервалом 0,17–0,61 (стандартная ошибка 0,11) ($p = 0,002$). Особо существенным является выделение группы больных с высокой экспрессией белка *mage-c1*, поскольку группы с нормальной и средней экспрессией не показали значимых различий (табл. 2).

Таблица 1. Сопоставление частоты экспрессии гена *MAGE-C1* и белка *mage-c1* у больных множественной миеломой в дебюте заболевания ($n = 33$), n (%)

Table 1. Comparison of *MAGE-C1* gene and *mage-c1* protein expression frequency in multiple myeloma patients at the disease debut ($n = 33$), n (%)

Уровень экспрессии Expression level	Ген <i>MAGE-C1</i> <i>MAGE-C1</i> gene	Белок <i>mage-c1</i> <i>Mage-c1</i> protein
Нормальный Normal	8 (24,2)	8 (24,2)
Средний Medium	15 (45,5)	10 (30,3)
Высокий High	10 (30,3)	15 (45,5)

У больных с нормальными показателями экспрессии белка *mage-c1* в ПК среднее значение экспрессии гена *MAGE-C1* составило $0,33 \pm 0,14$ ($2^{\Delta Ct}$), у больных со средними показателями экспрессии белка *mage-c1* — $0,62 \pm 0,34$ ($2^{\Delta Ct}$), при высокой экспрессии белка *mage-c1* — $2,63 \pm 0,75$ ($2^{\Delta Ct}$) (рис. 2).

Противоопухолевый ответ после 6 бортезомибсодержащих курсов был оценен у 29 больных. Полный ответ (ПО) был достигнут у 5 больных, очень хороший частичный ответ (ОХЧО) — у 12, частичный ответ (ЧО) — у 8, резистентность опухоли констатирована в 4 случаях.

Проведен анализ, направленный на поиск взаимосвязи между детекцией экспрессии гена *MAGE-C1* и степенью противоопухолевого ответа после 6 курсов индукционной терапии. У 100 % больных с нормальными значениями экспрессии ($\leq 0,06$ ($2^{\Delta Ct}$)) достигнут $\geq$ ЧО, у больных с экспрессией 0,07–1,47 ($2^{\Delta Ct}$) $\geq$ ЧО получен в 92 % случаев, при высокой экспрессии $\geq 1,48$ ($2^{\Delta Ct}$) частота общего ответа была несколько ниже и составила 70 %. При этом достижение более глубокого ответа (ПО + ОХЧО) в группах с нормальным и средним

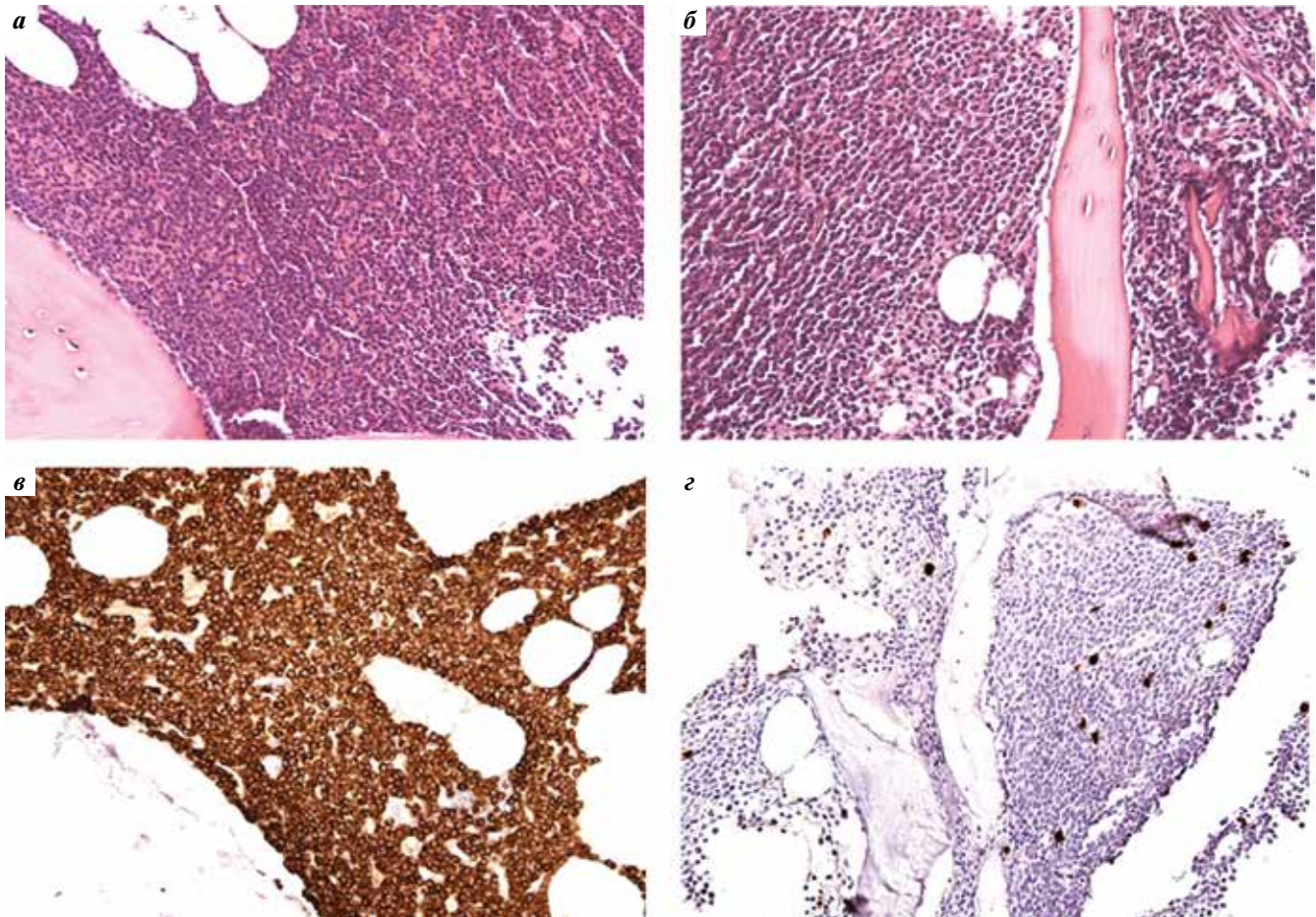


Рис. 1. Гистологическая и иммуногистохимическая картины костного мозга больного А. (а, в) и больного З. (б, з) ($\times 200$): а, б (окраска гематоксином и эозином) — диффузная инфильтрация плазматических клеток со зрелой морфологией; в (окраска антителом к *mage-c1*) — практически все клетки плазмноклеточного инфильтрата экспрессируют белок *mage-c1* (цитоплазматическая реакция); з (окраска антителом к *mage-c1*) — среди диффузного плазмноклеточного инфильтрата единичные клетки экспрессируют белок *mage-c1* (ядерно-цитоплазматическая реакция)

Fig. 1. Histological and immunohistochemical pictures of bone marrow of patient A. (a, v) and patient Z. (b, z) ($\times 200$): a, б (hematoxylin and eosin staining) — diffuse infiltration of plasma cells with mature morphology; в (staining with antibody to *mage-c1*) — almost all cells of plasma cell infiltrate express protein *mage-c1* (cytoplasmic reaction); з (staining with antibody to *mage-c1*) — among diffuse plasma cell infiltrate single cells express protein *mage-c1* (nuclear-cytoplasmic reaction)

Таблица 2. Таблица сопряженности для 2 методов исследования: полимеразной цепной реакции в реальном времени и иммуногистохимического ($n = 33$) ($p = 0,002$), n (%)

Table 2. Concordance for two methods: real-time polymerase chain reaction and immunohistochemistry ($n = 33$) ($p = 0.002$), n (%)

Уровень экспрессии белка <i>mage-c1</i> (ИГХ-метод) Expression level of <i>mage-c1</i> protein (IHC)	Уровень экспрессии гена <i>MAGE-C1</i> (метод ПЦР-РВ) <i>MAGE-C1</i> gene expression level (qPCR-RT)			Всего больных Total number of patients
	нормальный normal	средний medium	высокий high	
Нормальный Normal	4 (50)	4 (26,7)	0	8
Средний Medium	4 (50)	4 (26,7)	2 (20)	10
Высокий High	0	7 (46,6)	8 (80)	15
Всего больных Total number of patients	8	15	10	33

Примечание. ПЦР-РВ — полимеразная цепная реакция в реальном времени; ИГХ — иммуногистохимический.
Note. qPCR-RT — real-time polymerase chain reaction; IHC — immunohistochemistry.

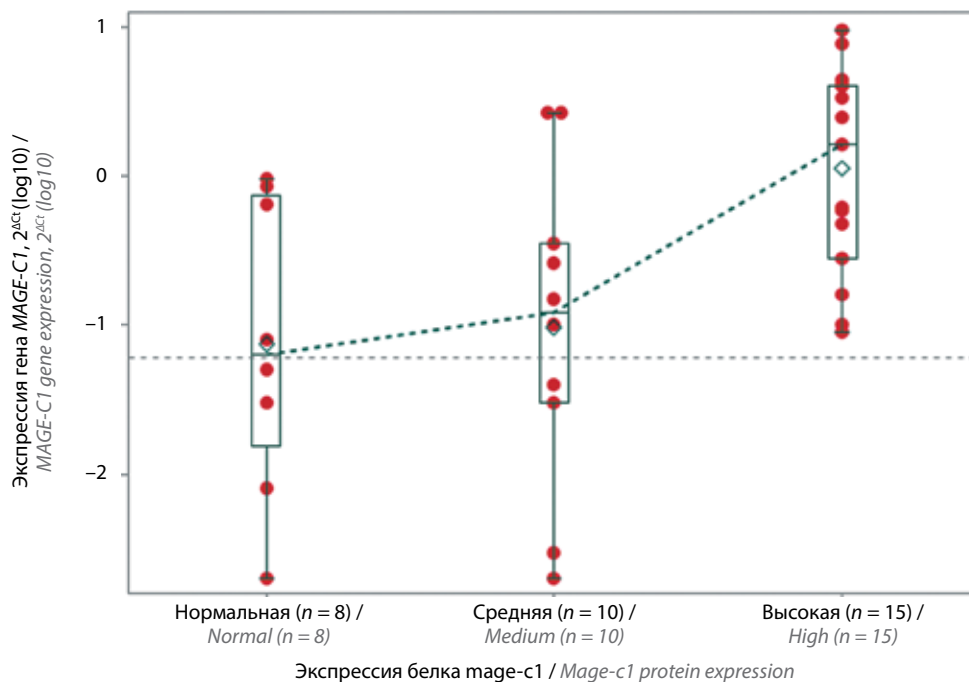


Рис. 2. Значения экспрессии гена *MAGE-C1* (методом полимеразной цепной реакции в реальном времени) у больных множественной миеломой в дебюте заболевания в зависимости от экспрессии белка *mage-c1* (иммуногистохимическим методом)
Fig. 2. *MAGE-C1* gene expression values (real-time polymerase chain reaction) in multiple myeloma patients at the disease onset as a function of *mage-c1* protein expression (immunohistochemistry)

Таблица 3. Частота противоопухолевого ответа на бортезомибсодержащие курсы у больных множественной миеломой в зависимости от экспрессии гена *MAGE-C1* в дебюте заболевания (n = 29)
Table 3. Frequency of antitumor response to bortezomib-containing courses in multiple myeloma patients as a function of *MAGE-C1* gene expression at disease onset (n = 29)

Уровень экспрессии гена <i>MAGE-C1</i> <i>MAGE-C1</i> gene expression level	Число больных с соответствующим уровнем экспрессии гена <i>MAGE-C1</i> Number of patients with the corresponding level of <i>MAGE-C1</i> gene expression	Частота достижения противоопухолевого ответа Frequency of achieving an antitumor response	
		ПО + ОХЧО + ЧО, n/N (%) CR + VGPR + PR, n/N (%)	ПО + ОХЧО, n/N (%) CR + VGPR, n/N (%)
Нормальный Normal	7	7/7 (100)	5/7 (71)
Средний Medium	12	11/12 (92)	9/12 (75)
Высокий High	10	7/10 (70)	3/10 (30)

Примечание. Здесь и в табл. 4: ПО – полный ответ; ОХЧО – очень хороший частичный ответ; ЧО – частичный ответ.
Note. Here and in table 4: CR – complete response; VGPR – very good partial response; PR – partial response.

значениями экспрессии гена *MAGE-C1* документировано в 71 и 75 % случаев, тогда как у больных с высокой экспрессией частота глубокого ответа снижалась больше чем в 2 раза и составила всего 30 % ($p = 0,09$) (табл. 3).

При оценке глубины противоопухолевого ответа было обнаружено, что у больных, достигших ПО + ОХЧО, показатели экспрессии гена *MAGE-C1* в дебюте были значительно ниже, чем у больных с рефрактерным течением ММ ($p = 0,02$). Медиана экспрессии гена *MAGE-C1* у 16 больных, достигших ПО + ОХЧО, составила 0,16 (0,002–4,45; $2^{\Delta Ct}$), у 8 больных, достиг-

ших ЧО, – 1,06 (0,002–4,08; $2^{\Delta Ct}$), у 4 больных с рефрактерным течением – 5,1 (0,09–9,44; $2^{\Delta Ct}$).

При оценке связи экспрессии белка *mage-c1* с достижением противоопухолевого ответа наблюдалась аналогичная тенденция. У всех больных, у которых в гистологическом препарате костного мозга выявляли менее 50 % ПК, экспрессирующих белок *mage-c1*, был получен общий ответ ($\geq$ ЧО). В то же время в случае выявления практически тотального окрашивания ПК антителом к *mage-c1* почти у трети пациентов диагностировали рефрактерность к бортезомибу. При этом достижение более глубокого ответа (ПО + ОХЧО)

Таблица 4. Частота противоопухолевого ответа на бортезомибсодержащие курсы у больных множественной миеломой в зависимости от экспрессии белка *mage-c1* ($n = 29$)

Table 4. Frequency of antitumor response to bortezomib-containing courses in multiple myeloma patients depending on *mage-c1* protein expression ($n = 29$)

Уровень экспрессии белка <i>mage-c1</i> Expression level of <i>mage-c1</i> protein	Число больных с соответствующей экспрессией белка <i>mage-c1</i> Number of patients with corresponding expression of <i>mage-c1</i> protein	Частота достижения противоопухолевого ответа Frequency of achieving an antitumor response	
		ПО + ОХЧО + ЧО, n/N (%) CR + VGPR + PR, n/N (%)	ПО + ОХЧО, n/N (%) CR + VGPR, n/N (%)
Нормальный Normal	5	5/5 (100)	4/5 (80)
Средний Medium	10	10/10 (100)	6/10 (60)
Высокий High	14	10/14 (71)	5/14 (36)

также значительно чаще документировали у больных с низкой экспрессией белка *mage-c1* по сравнению с больными, отнесенными к группе высокой экспрессии ($p = 0,08$) (табл. 4).

Обсуждение

В опубликованных исследованиях экспрессия гена, кодирующего *mage-c1*, при ММ определяется в 57–88,7 % случаев, может быть выявлена как в дебюте, так и в рецидиве заболевания. При ИГХ-исследовании белка *mage-c1* в ПК определяется цитоплазматическая или ядерная реакция, а также возможен смешанный характер окрашивания [8–10, 14, 18–22].

В результате проведенного нами исследования наличие повышенной экспрессии гена *MAGE-C1* и белка *mage-c1* выявлено у 76 % больных, что сопоставимо с данными других авторов. У 26 (78,8 %) больных, включенных в наше исследование, удалось определить внутриклеточную локализацию белка *mage-c1*: цитоплазматическую – у 24 и ядерно-цитоплазматическую – у 2 больных.

Кроме этого, при изучении экспрессии гена *MAGE-C1* и белка *mage-c1* выявлена сопоставимость результатов использованных методов ПЦР-РВ и ИГХ. Таким образом, выбранные нами методы можно рассматривать как взаимозаменяемые и применять ИГХ трепанобиоптатов костного мозга в случае низкой клеточности пунктата костного мозга, что может составлять трудности для выполнения ПЦР-РВ.

М. Tinguely и соавт. представили данные о статистически достоверной корреляции повышенной пролиферативной активности ПК со степенью экспрессии белка *mage-c1* ИГХ-методом. При ядерной и смешанной формах экспрессии этого белка был документирован наиболее высокий пролиферативный индекс. Одновременно авторы обнаружили статистически значимую разницу показателей общей выживаемости в зависимости от локализации белка. У больных с цитоплазматической локализацией *mage-c1* отмечалась более высокая общая выживаемость, в отличие от пациентов, в ПК трепанобиоптатов костного мозга

которых выявлялось смешанное или внутриядерное окрашивание (медианы общей выживаемости 48 и 33 мес соответственно) [22].

В других публикациях также было обращено внимание на наличие прямой взаимосвязи между индексом пролиферативной активности и экспрессией белка *mage-c1*, что позволяло предположить согласованность между экспрессией этого белка и нарушением регуляции клеточного цикла. Авторы обсуждали гипотезу, что наличие экспрессии белка *mage-c1* способствует выживанию aberrантных ПК, защищая их как от спонтанного, так и от лекарственного апоптоза [10, 14, 18, 19, 22, 23].

D. Atanackovic и соавт. изучали экспрессию гена *MAGE-C1* и 3 других генов, кодирующих РТА, у больных ММ после индукционного этапа терапии, после ауто-ТГСК, а также после аллогенной трансплантации костного мозга (алло-ТКМ). У всех больных после индукционного этапа выявлялась экспрессия генов, кодирующих РТА, после выполненной ауто-ТГСК экспрессия сохранялась в 77 % случаев, в то время как после проведения алло-ТКМ – лишь у 40 % больных. При этом экспрессия гена *MAGE-C1* стойко сохранялась в ПК, изменению подвергались только показатели данной экспрессии. Проанализировав результаты исследования экспрессии гена *MAGE-C1* у больных после алло-ТКМ, авторы выявили, что при высоких показателях экспрессии резко снижалась частота достижения ПО и возрастал риск развития иммунохимического рецидива заболевания. При этом у части больных повышение уровня экспрессии гена *MAGE-C1* опережало появление нарушений в стандартных лабораторных показателях, что позволяло расценивать изменения экспрессии гена в качестве предиктора последующего рецидива заболевания [18]. Аналогичные результаты были представлены и в исследовании E. M. Tyler и соавт. [19].

Кроме этого, D. Atanackovic и соавт. обратили внимание, что у 75 % больных с высоким уровнем экспрессии гена *MAGE-C1* развитие рецидива было документировано в среднем в течение 14 мес после

алло-ТКМ. Среди больных с отсутствием экспрессии этого гена рецидив был констатирован только в 7 % случаев в течение 41 мес ($p < 0,001$) [18].

Целью нашего исследования было определение экспрессии гена *MAGE-C1* и белка *mage-c1* в дебюте заболевания. Результаты работы позволили оценить связь экспрессии гена и белка с риском формирования резистентности опухоли. Низкие параметры экспрессии гена *MAGE-C1* и белка *mage-c1* ассоциировались с более высокой вероятностью достижения глубокого противоопухолевого ответа.

Полученные нами данные диктуют необходимость дальнейших исследований в этом направлении в целях поиска возможных предикторов, помогающих опре-

делить адекватную тактику терапии уже на этапе индукции.

Заключение

Несмотря на активное изучение генов, кодирующих РТА, результаты проведенных исследований не позволяют однозначно ответить на вопрос о биологической роли гена *MAGE-C1* как в зародышевой линии, так и в опухолевых клетках. Дальнейшее исследование этих антигенов ставит перед собой задачу определить, являются ли они побочным продуктом клеточной трансформации или же их экспрессия представляет собой индикатор участия гена *MAGE-C1* в молекулярном патогенезе ММ.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Kryukov F., Nemec P., Radova L. et al. Centrosome associated genes pattern for risk sub-stratification in multiple myeloma. *J Transl Med* 2016;14(1):150. DOI: 10.1186/s12967-016-0906-9.
- Prideaux S.M., Conway O'Brien E., Chevassut T.J. The genetic architecture of multiple myeloma. *Adv Hematol* 2014;2014:864058. DOI: 10.1155/2014/864058.
- Morgan G.J., Walker B.A., Davies F.E. The genetic architecture of multiple myeloma. *Nat Rev Cancer* 2012;12(5):335–48. DOI: 10.1038/nrc3257.
- Landgren O., Iskander K. Modern multiple myeloma therapy: deep, sustained treatment response and good clinical outcomes. *J Intern Med* 2017;281(4):365–82. DOI: 10.1111/joim.12590.
- Cavo M., Rajkumar S.V., Palumbo A. et al. International Myeloma Working Group consensus approach to the treatment of multiple myeloma patients who are candidates for autologous stem cell transplantation. *Blood* 2011;117(23):6063–73. DOI: 10.1182/blood-2011-02-297325.
- Shires K., van Wyk T. The role of cancer/testis antigens in multiple myeloma pathogenesis and their application in disease monitoring and therapy. *Crit Rev Oncol Hematol* 2018;132:17–26. DOI: 10.1016/j.critrevonc.2018.09.010.
- Simpson A.J.G., Caballero O.L., Jungbluth A. et al. Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer. *Nat Rev Cancer* 2005;5(8):615–25. DOI: 10.1038/nrc1669.
- Zhang Y., Bao L., Lu J. et al. The clinical value of the quantitative detection of four cancer-testis antigen genes in multiple myeloma. *Mol Cancer* 2014;13(1):25. DOI: 10.1186/1476-4598-13-25.
- De Carvalho F., Vettore A.L., Colleoni G.W.B. Cancer/testis antigen MAGE-C1/CT7: new target for multiple myeloma therapy. *Clin Develop Immunol* 2012;2012:257695. DOI: 10.1155/2012/257695.
- De Carvalho F., Alves V.L.F., Braga W.M.T. et al. MAGE-C1/CT7 and MAGE-C2/CT10 are frequently expressed in multiple myeloma and can be explored in combined immunotherapy for this malignancy. *Cancer Immunol Immunother* 2013;62(1):191–5. DOI: 10.1007/s00262-012-1376-4.
- Andrade V.C.C., Vettore A.L., Felix R.S. et al. Prognostic impact of cancer/testis antigen expression in advanced stage multiple myeloma patients. *Cancer Immun* 2008;8:2.
- Scanlan M.J., Andrew J.G., Old L.J. The cancer/testis genes: review, standardization, and commentary. *Cancer Immun* 2004;4(1):1.
- Lim S.H., Austin S., Owen-Jones E. et al. Expression of testicular genes in haematological malignancies. *Br J Cancer* 1999;81(7):1162–4. DOI: 10.1038/sj.bjc.6690824.
- Jungbluth A.A., Ely S., Di Liberto M. et al. The cancer-testis antigens CT7 (MAGE-C1) and MAGE-A3/6 are commonly expressed in multiple myeloma and correlate with plasma-cell proliferation. *Blood* 2005;106(1):167–74. DOI: 10.1182/blood-2004-12-4931.
- Wienand K., Shires K. The use of MAGE C1 and flow cytometry to determine the malignant cell type in multiple myeloma. *PLoS One* 2015;10(3):e0120734. DOI: 10.1371/journal.pone.0120734.
- He L., Ji J., Liu S. et al. Expression of cancer-testis antigen in multiple myeloma. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2014;34(2):181–5. DOI: 10.1007/s11596-014-1255-7.
- Rajkumar S.V., Dimopoulos M.A., Palumbo A. 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.
- Atanackovic D., Luetkens T., Hildebrandt Y. et al. Longitudinal analysis and prognostic effect of cancer-testis antigen expression in multiple myeloma. *Clin Cancer Res* 2009;15(4):1343–52. DOI: 10.1158/1078-0432.ccr-08-098.9.
- Tyler E.M., Jungbluth A.A., Gnajic S. et al. Cancer-testis antigen 7 expression and immune responses following allogeneic stem cell transplantation for multiple myeloma. *Cancer Immunol Res* 2014;2(6):547–58. DOI: 10.1158/2326-6066.cir-13-0174.
- Condomines M., Hose D., Raynaud P. et al. Cancer/testis genes in multiple myeloma: expression patterns and prognosis value determined by microarray analysis. *J Immunol* 2007;178(5):3307–15. DOI: 10.4049/jimmunol.178.5.3307.
- Van Duin M., Broyl A., de Knecht Y. et al. Cancer testis antigens in newly diagnosed and relapse multiple myeloma: prognostic markers and potential targets for immunotherapy. *Haematologica* 2011;96(11):1662–9. DOI: 10.3324/haematol.2010.037978.
- Tinguely M., Jenni B., Knights A. et al. MAGE-C1/CT-7 expression in plasma cell myeloma: sub-cellular localization impacts on clinical outcome. *Cancer Sci* 2008;99(4):720–5. DOI: 10.1111/j.1349-7006.2008.00738.
- De Carvalho F., Costa E.T., Camargo A.A. et al. Targeting MAGE-C1/CT7 expression increases cell sensitivity to the proteasome inhibitor bortezomib in multiple myeloma cell lines. *PLoS One* 2011;6(11):e27707. DOI: 10.1371/journal.pone.0027707.

Вклад авторов

Э.А. Макунина: набор больных в исследование, выполнение лабораторной части исследования (полимеразная цепная реакция в реальном времени), обзор публикаций по теме статьи, анализ полученных данных, написание текста рукописи;
Л.П. Менделеева: разработка научной идеи и дизайна исследования, анализ полученных данных, редактирование рукописи, утверждение статьи;
В.Л. Сурин: организация и участие в лабораторной части исследования (полимеразная цепная реакция в реальном времени);
М.В. Соловьев, М.В. Фирсова: выполнение диагностических и лечебных мероприятий у больных, включенных в исследование, мониторинг течения болезни и ответа на проведенное лечение;
А.М. Ковригина, А.А. Шерстнев: выполнение гистологического и иммуногистохимического исследования, участие в анализе результатов;
И.В. Гальцева: разработка дизайна исследования, организация и выполнение лабораторной части исследования (иммунофенотипирование);
Ю.О. Давыдова: выполнение лабораторной части исследования (иммунофенотипирование);
С.М. Куликов: статистическая обработка данных, редактирование рукописи.

Authors' contributions

E.A. Makunina: accruing of patients in the study, laboratory part of the study (real-time polymerase chain reaction), review of publications on the article's topic, analysis of the data obtained, article writing;
L.P. Mendeleva: development of the scientific idea and design of the study, analysis of the data obtained, editing and approval of the article;
V.L. Surin: organization and participation in the laboratory part of the study (real-time polymerase chain reaction);
M.V. Soloviev, M.V. Firsova: diagnostic and therapeutic measures in the patients included in the study, monitoring of the disease and treatment response;
A.M. Kovrigina, A.A. Sherstnev: histological and immunohistochemistry studies, participation in the analysis of the results;
I.V. Gal'tseva: research design development, organization and performance of the laboratory part of the study (immunophenotyping);
Yu.O. Davydova: laboratory part of the study (immunophenotyping);
S.M. Kulikov: statistical analysis, article editing.

ORCID авторов / ORCID of authors

Э.А. Макунина / E.A. Makunina: <https://orcid.org/0000-0001-6736-064X>
Л.П. Менделеева / L.P. Mendeleva: <https://orcid.org/0000-0002-4966-8146>
В.Л. Сурин / V.L. Surin: <https://orcid.org/0000-0002-1890-4492>
М.В. Соловьев / M.V. Soloviev: <https://orcid.org/0000-0002-7944-6202>
М.В. Фирсова / M.V. Firsova: <https://orcid.org/0000-0003-4142-171X>
А.М. Ковригина / A.M. Kovrigina: <https://orcid.org/0000-0002-1082-8659>
А.А. Шерстнев / A.A. Sherstnev: <https://orcid.org/0000-0002-1597-4591>
И.В. Гальцева / I.V. Gal'tseva: <https://orcid.org/0000-0002-8490-6066>
Ю.О. Давыдова / Yu.O. Davydova: <https://orcid.org/0000-0001-5932-0285>
С.М. Куликов / S.M. Kulikov: <https://orcid.org/0000-0002-6288-7570>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Financing. The study was performed without external funding.

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики. Протокол исследования одобрен комитетом по биомедицинской этике ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава России.

Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Compliance with patient rights and principles of bioethics. The study protocol was approved by the biomedical ethics committee of National Research Center for Hematology, Ministry of Health of Russia.

All patients gave written informed consent to participate in the study.