

ЭКСПРЕССИЯ ОПУХОЛЕАССОЦИИРОВАННЫХ ГЕНОВ *PRAME*, *WT1* И *XIAP* У БОЛЬНЫХ МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМОЙ

Т.В. Гапонова, Л.П. Менделеева, А.В. Мисюрин, Е.В. Варламова, В.Г. Савченко
ГНЦ РАМН, Москва

Контакты: Татьяна Владимировна Гапонова garovol@mail.ru

Проведено исследование экспрессии опухолеассоциированных генов *PRAME*, *WT1* и *XIAP* у 34 больных множественной миеломой (ММ) в дебюте заболевания, а также после выполнения им химиотерапии по схеме VAD — винкристин, доксорубин, дексаметазон ($n=20$) и лечения ингибитором протеасом ($n=10$). Экспрессия генов *PRAME*, *WT1* и *XIAP* в клетках костного мозга определялась методом количественной полимеразной цепной реакции. Экспрессия гена *PRAME* была выявлена у 62% первичных больных ММ, при этом медиана экспрессии составила 0,3%, что почти в 100 раз превышало этот показатель у доноров костного мозга (0,0035%). Экспрессия гена *WT1* обнаружена у 20% пациентов, причем она определялась только у *PRAME*-позитивных больных. Экспрессия гена *XIAP* имела место у всех больных ММ в момент диагностики, и ее медиана более чем в 10 раз превышала медиану экспрессии гена в контрольной группе доноров (28% против 2%). В группе больных с гиперэкспрессией *PRAME* лишь в 25% случаев был получен частичный ответ, в то время как у пациентов с низкой экспрессией *PRAME* или ее отсутствием проводившаяся VAD-терапия была эффективной в 75% случаев ($p=0,06$). На фоне лечения бортезомибом уровень экспрессии гена *XIAP* значительно снижался при достижении полной или частичной ремиссии: с 11–325 (медиана 66) до 1–123% (медиана 20). При резистентности опухоли к проводимой терапии бортезомибом экспрессия *XIAP*, напротив, повышалась с 16–127 (медиана 36) до 22–528% (медиана 121).

Ключевые слова: множественная миелома, опухолеассоциированные гены *PRAME*, *WT1*, *XIAP*, химиотерапия, ингибиторы протеасом, бортезомиб

PRAME, *WT1* AND *XIAP* TUMOR-ASSOCIATED GENES EXPRESSION IN MULTIPLE MYELOMA PATIENTS

T.V. Gaponova, L.P. Mendeleeva, A.V. Misurin, E.V. Varlamova, V.G. Savchenko
Hematological Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

Tumor-associated genes (*PRAME*, *WT1* and *XIAP*) expression study is conducted in 34 patients with multiple myeloma (MM) in disease onset and after chemotherapy (VAD, 20 pts) and proteasom inhibitor therapy (10 pts). *PRAME*, *WT1* and *XIAP* gene expression in bone marrow cells detected by polymerase chain reaction (PCR) method. *PRAME* gene expression in 62% primary patients was revealed, thus expression median was 0.3% that almost in 100 times greater than in bone marrow donors (0.0035%). *WT1* gene expression in 20% patients was detected, and it was determined only in *PRAME*-positive patients. At diagnosis *XIAP* gene expression was revealed in all MM patients, thus expression median was more 10 times greater than in the control groups (28% versus 2%). In patients with *PRAME* hyperexpression partial response was achieved only in 25% of cases, while in patients with low or absence of *PRAME* expression VAD therapy was effective in 75% of cases ($p=0,06$). After bortezomib treatment *XIAP* gene expression level was significantly decreased with complete and partial remission achievement: from 11–325% (median — 66%) to 1–123% (median — 20%). In cases of tumor resistance to bortezomib treatment *XIAP* expression increased from 16–127% (median — 36%) to 22–528% (median — 121%).

Key words: multiple myeloma, tumor-associated genes *PRAME*, *WT1*, *XIAP*, chemotherapy, proteasom inhibitors, bortezomib

В течение последнего десятилетия результаты лечения множественной миеломы (ММ) значительно улучшились. Достижение полной иммунохимической ремиссии перестало быть редкостью. Длительность жизни без признаков прогрессии заболевания стала одним из основных критериев оценки эффективности лечения. Медиана общей выживаемости пациентов увеличилась с 30 до 45 мес [1].

Все эти достижения обусловлены в первую очередь внедрением в клиническую практику таких новых лекарственных препаратов, как ингибиторы протеасом (бортезомиб) и иммуномодуляторы (талидомид, леналидомид). Немаловажную роль играет и проведение высокодозной химиотерапии (ХТ) с последующей трансплантацией аутологичных гемопоэтических стволовых клеток (ауто-ТГСК), которые в настоящее время определены стандартом терапии больных ММ моложе 60–65 лет [2]. Тем не менее ММ является пока еще биологически неизлечимым заболеванием. Резистентность опухолевого процесса к адекватному терапевтическому воздействию, некурабельный рецидив болезни, вы-

ход из-под ХТ-контроля — все это причины так называемых неудач в лечении.

В основе опухолевого роста и формирования механизмов лекарственной резистентности с наибольшей вероятностью лежит нестабильность генома опухоли [3]. Последовательность случайных генетических событий в опухолевых клетках, в совокупности приводящая к нарушению процессов дифференцировки клеток и их бесконтрольному делению вследствие блокирования апоптоза, обуславливает прогрессирующее течение опухолевого заболевания. Пролиферация опухолевых клеток индуцируется путем активации генов онкопротеинов и инактивации генов-супрессоров опухоли. В регуляции механизма запрограммированной гибели клеток принимают участие большое число как апоптотических, так и антиапоптотических белков и, в конечном счете, их соотношение предопределяет, будет клетка жить или погибнет [4]. Выявление в опухолевых клетках высокой экспрессии антиапоптотических генов, а также инактивации проапоптотических генов подтверждает их участие в механизмах опухолевого роста.

В начале 1990-х годов в злокачественно трансформированных гемопоэтических клетках была обнаружена аномальная экспрессия ряда генов, принадлежащих к семействам *MAGE*, *BAGE*, *GAGE*. Данная группа генов получила общее название *C/T* (*cancer/testis*), так как в норме их транскрипция присуща главным образом клеткам семенников, а реэкспрессия происходит в опухолевых клетках [5]. В настоящее время известно большое число так называемых опухолеассоциированных генов, принимающих участие в механизмах регулирования клеточного цикла и клеточной дифференцировки. Среди них отмечены такие как *PRAME*, *WT1* и *XIAP*.

Известно, что белок *PRAME* обладает антиапоптотическим действием и блокирует экспрессию проапоптотического гена *p21*. Кроме того, данный белок является устойчивым коингибитором ядерных рецепторов семейства RAR за счет участия в блокировании конечной дифференцировки клеток. Ген *PRAME*, локализованный в 22-й хромосоме, в норме экспрессируется клетками яичка, яичников, коры надпочечников и эндометрия. Впервые реэкспрессия *PRAME* была выявлена в опухолевых клетках при меланоме (причем обнаруживалась у 98% больных). Позднее экспрессию *PRAME* удалось обнаружить при некоторых других опухолях, в том числе и при гемобластозах. Так, ген *PRAME* выявлялся у 35–40% больных острым миелобластным лейкозом (ОМЛ), часто в сочетании с транслокациями t(12;21), t(8;21), t(15;17), t(16;16) и инверсией хромосомы 16. При хроническом миелолейкозе (ХМЛ) он наблюдался у 42% больных в фазе акселерации и бластного криза и у 23% – в хронической фазе. При остром лимфобластном лейкозе (ОЛЛ) экспрессия *PRAME* чаще имела место у взрослых пациентов (64% случаев), чем у детей (23%). Однако если у взрослых больных это считалось фактором неблагоприятного прогноза, то в педиатрической практике рассматривалось в качестве благоприятного признака. При лимфомах ген *PRAME* выявлялся у 23% больных, а при ММ – более чем у половины пациентов, значительно чаще в развернутой стадии болезни [6–9].

Белок *WT1* стимулирует экспрессию гена *bcl2*, закрывающего митохондриальные каналы, препятствуя тем самым выходу цитохрома С и образованию апоптосомы. Ген *WT1* локализован в 11p 13-й хромосомы и экспрессируется в клетках-предшественниках гломерул почек, селезенке, мезотелиальных клетках, выстилающих сердце, диафрагму и брюшину. Дикий тип гена *WT1* действует обычно как рецессивный ген-супрессор опухолевого роста, однако вследствие доминантной мутации или взаимодействия со специфическим участком регуляторной молекулы, приводящим к укорочению белка, *WT1* приобретает свойства доминантного онкогена. Мутировавший *WT1* выявляется у большинства боль-

ных ОМЛ (80–90%), а также у пациентов с ХМЛ в фазе акселерации и бластного криза (95%) [10,11].

Ген *XIAP* относится к семейству ингибиторов апоптоза (*IAPs* – *inhibitor of apoptosis*), которые блокируют митохондриальные и (Fas)-рецептор-опосредованные его пути. Белки семейства ингибиторов апоптоза повышают устойчивость клетки к кратковременным апоптотическим воздействиям. Кроме того, эти белки обладают убиквитинлигазной активностью, т.е. способностью присоединять активированный убиквитин к белкам, подлежащим расщеплению. Апоптоз в конечном итоге – это гибель клетки, осуществляемая семейством специфических протеаз, известных как каспазы. *XIAP* – наиболее мощный ингибитор каспаз из всего семейства ингибиторов апоптоза, содержащий в своей структуре не только BIR2-домен, характерный для всего семейства и блокирующий эффекторные каспазы 3 и 7, но и уникальный BIR3-домен, инактивирующий инициаторную каспазу 9, запускающую каскадный механизм активации каспаз. Экспрессия *XIAP* определяется во всех клетках здоровых людей. Гиперэкспрессия *XIAP* может обнаруживаться в опухолевых клетках [12–14].

Целью настоящей работы явилось исследование экспрессии опухолеассоциированных генов *PRAME*, *WT1* и *XIAP* у больных ММ. При этом экспрессия генов определялась как в дебюте заболевания, так и после проведения ХТ. Особое внимание уделено анализу экспрессии гена *XIAP* на фоне лечения препаратом бортезомиб, являющимся ингибитором протеасом.

Материалы и методы

В исследование включены 34 пациента с впервые установленным диагнозом ММ. Среди них было 14 женщин и 20 мужчин в возрасте от 31 года до 62 (медиана 46) лет. Иммунохимический вариант заболевания был представлен парапротеином G ($n=28$), парапротеином A ($n=2$) и белком BJ ($n=4$). Двадцати больным был выполнен индукционный этап лечения, включавший в себя 3 курса VAD (винкристин + доксорубицин + дексаметазон). Десяти из этих пациентов в качестве терапии 2-й линии назначалась схема бортезомиб (1,3 мг/м² в 1, 4, 8, 11-й дни) + дексаметазон (40 мг в 1–4-й дни), всего 6–8 курсов.

Экспрессию генов *PRAME*, *WT1* и *XIAP* в клетках костного мозга определяли до начала терапии ($n=34$), после 3 курсов VAD ($n=20$), после курсов бортезомиб + дексаметазон ($n=10$). В качестве контрольной группы экспрессия генов *PRAME*, *WT1*, *XIAP* исследовалась у 8 доноров костного мозга.

Выделение тотальной мРНК из клеток костного мозга пациентов с ММ и доноров проводилось по методу P. Chomczynski и N. Sacchi [15]. Для постановки реакции обратной транскрипции к раствору РНК (1 мкг) добавляли 2 мкл гексамеров (концентрация 110 пМ) и проводили отжиг в течение 30 с при

температуре 95°C. Далее осуществляли реакцию в растворе, содержащем 75 мМ KCl, 50 мМ Трис, 10 мМ DTT, 3 мМ MgCl₂, 1 мМ каждого из 4 дезоксирибонуклеотидов, 20 ЕД ингибитора РНКаз (Promega), 100 ЕД обратной транскриптазы М-MLV (Promega) в течение 1–1,5 ч при температуре 37°C. Объем реакционной смеси составлял 20 мкл.

Количественное определение экспрессии генов *PRAME*, *WT1* и *XIAP* проводилось методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени (Real-time) по технологии TaqMan. Для осуществления Real-time ПЦР использовался прибор ICycler IQ («BioRad»).

Экспрессию генов *PRAME*, *WT1*, *XIAP* и *ABL* определяли в числе копий мРНК соответствующего гена. В качестве положительного контроля использовали плазмиды pGEM-T, содержащие клонированные фрагменты этих генов. На основании серии разведений плазмиды в каждом эксперименте строилась калибровочная кривая, по которой определялось число копий гена в исследуемых образцах. Серия разведений плазмиды представляла собой последовательность 10-кратных разведений, использовались разведения от 10⁷ до 10³ копий в 1 мкл.

Для каждого образца, в том числе и для разведений плазмид, ПЦР-реакция проводилась в 3 повторях. В качестве гена сравнения использовался ген *ABL*.

Для каждой тройки образцов рассчитывалась средняя экспрессия гена. Система праймеров и зондов была разработана в лаборатории генной инженерии ГНЦ РАМН в 2002 г. [9]. Нуклеотид-

ные последовательности праймеров и зондов представлены в табл. 1.

Пороговая линия (Threshold Position) для *PRAME*, *WT1*, *XIAP* и *ABL* устанавливалась на уровне 50 для всех экспериментов, что позволило адекватно анализировать и сравнивать полученные в разных экспериментах данные. Наклон стандартной кривой теоретически должен составлять -3,3, что соответствует 100% эффективности амплификации, но реально наклон в интервале между -3,0 и -3,9 рассматривался как приемлемый, так же как и коэффициент корреляции >0,95. Эти параметры были использованы нами при проведении экспериментов.

Окончательный результат относительной экспрессии генов выражался в виде нормированных процентов по формуле:

$$\frac{\text{Число копий гена (PRAME, WT1, XIAP)}}{\text{Число копий ABL}} \times 100\%.$$

Результаты и обсуждение

При исследовании клеток костного мозга первичных больных ММ экспрессия гена *PRAME* выявлена у 21 (62%) пациента. Экспрессия гена *WT1* обнаружена у 7 (20%) больных, причем оказалось, что *WT1* определялся только у *PRAME*-позитивных пациентов. Экспрессия гена *XIAP* имела место у всех первичных больных ММ.

При исследовании костно-мозговых клеток доноров экспрессия гена *PRAME* обнаружена у 4 (50%) из 8 человек, *WT1* — лишь у 1 (12,5%) из 8, *XIAP* — у 5 (62,5%) из 8.

Далее нами были изучены количественные характеристики экспрессии генов. Так, медиана экспрессии *PRAME* у больных ММ составила 0,3%, что почти в 100 раз превышало этот показатель у доноров костного мозга (0,0035%). Разброс значений экспрессии *PRAME* в группе пациентов колебался в пределах от 0,001 до 132%, в то время как в группе доноров он составлял от 0,002 до 2,54%. При сопоставлении диапазона значений *PRAME* у пациентов и доноров замечено, что максимальный уровень экспрессии гена у больных ММ в момент диагностики значительно превышал таковой в контрольной группе, при этом гиперэкспрессия гена (выше 2,5%, наблюдавшихся у доноров) была выявлена у 4 (19%) больных.

Медиана экспрессии *WT1* в группе больных ММ составила 0,01% при диапазоне значений

Таблица 1. Нуклеотидные последовательности праймеров и зондов

Праймеры и зонды	5'–3' последовательность нуклеотидов	Анализируемый ген
PRAME-F	GAC TCT TTA TTT TTT CCT TAG A	<i>PRAME</i>
PRAME-R	CGA AAG CCG GCA GTT AGT TAT T	
PRAME-probe	FAM- CTG GAT CAG (T-RTQ1)TG CTC AGG CAC GTG A	
WT1-F	CAGGCTGCAATAAGAGATATTTTAAGCT	<i>WT1</i>
WT1-R	GAA GTC ACA CTG GTA TGG TTT CTC A	
WT1-probe	FAM-CTT ACA GAT GCA CAG CAG GAA GCA CAC TG BHQ1	
XIAP-F	ACT TGA GGA GTG TCT GGT AA	<i>XIAP</i>
XIAP-R	GGA TTT TGG AAG ATG GTA TCA TC	
XIAP-probe	FAM AAC TAC (T-BHQ)GA GAA AAC ACC ATC ACT AAC TAG AAG AA p	
ABL-F	AGC TCC GGG TCT TAG GCT AT	<i>ABL</i>
ABL-R	TAG TTG CTT GGG ACC CAG CC	
ABL-probe	Fam CCA TT(T-RTQ1) TTG GTT TGG GCT TCA CAC CAT Tp	

Таблица 2. Основные клинико-лабораторные показатели первичных больных ММ в зависимости от экспрессии генов *PRAME*, *WT1* и *XIAP*

Характеристика опухоли	<i>PRAME</i>		Экспрессия генов <i>WT1</i>		<i>XIAP</i>	
	выявлен (n=21)	не выявлен (n=13)	выявлен (n=7)	не выявлен (n=27)	экспрессия >18% (n=27)	экспрессия <18% (n=7)
Содержание М-градиента в сыворотке крови, медиана, г/л	38	53,7	35,4	51,6	46,6	38,6
Содержание альбумина в сыворотке крови, медиана, г/л	34,5	29	31	34	33,5	35
Наличие β_2 -микроглобулина $\geq 3,5$ г/л, % больных	20	36	16	28	25	28,5
Наличие множественных остеолитических очагов + мягкотканых компонентов, % больных	25	17	16	24	29	14

от 0,002 до 2,54%. У доноров костного мозга показатель экспрессии *WT1* равнялся 0,0017%.

Медиана экспрессии *XIAP* при ММ более чем в 10 раз превышала медиану экспрессии гена в контрольной группе (28% против 2%). При этом наиболее выраженные различия степени экспрессии *XIAP* у больных ММ и доноров удалось обнаружить при анализе диапазона колебаний показателей. Если минимальные значения экспрессии гена у больных ММ (5%) сопоставимы с выявленными в группе доноров (2%), то максимальный уровень экспрессии *XIAP* у пациентов с ММ достигал 5382%, в то время как у доноров не превышал 18%. Следует отметить, что гиперэкспрессия *XIAP* (>18%) имела место у 79% больных ММ.

Нами проведен анализ основных признаков заболевания, имеющих диагностическое и прогностическое значение, в зависимости от наличия экспрессии генов *PRAME*, *WT1* и *XIAP*. Как видно из табл. 2, ни объем опухолевой массы, характеризующийся величиной М-градиента, ни существование множественных остеолитических поражений и мягкотканых компонентов не коррелировали с наличием экспрессии изучавшихся генов. Не было выявлено корреляционной связи таких неблагоприятных прогностических факторов, как гипоальбуминемия и высокое содержание β_2 -микроглобулина с наличием экспрессии генов *PRAME*, *WT1* и *XIAP*. В немногочисленных публикациях, посвященных изучению экспрессии опухолеассоциированных генов у больных ММ, также отмечалось, что присутствие гена *PRAME* не коррелировало с параметрами, отражающими величину опухолевой массы. В то же время, в отличие от наших результатов, авторы обнаружили некоторую взаимосвязь экспрессии *PRAME* с выраженностью литических повреждений костной ткани [9].

Поскольку нам не удалось выявить взаимозависимости экспрессии генов *PRAME*, *WT1* и *XIAP* и клинико-лабораторных параметров опухоли, было

предпринято исследование, направленное на поиск взаимосвязи экспрессии опухолеассоциированных генов с такой биологической характеристикой опухоли, как ответ на проводимую терапию.

Были проанализированы частота достижения ремиссии в зависимости от выраженности экспрессии генов *PRAME* и *XIAP* перед началом лечения, а также изменение количественных показателей экспрессии этих генов у больных ММ в зависимости от результатов терапии. Принимая во внимание широкий диапазон количественных показателей экспрессии *PRAME* и особенно *XIAP* у больных ММ в момент диагностики, все пациенты были разделены на группы в соответствии с тем, превышали или нет указанные показатели значения, выявленные у доноров костного мозга и условно принятые за норму.

С учетом редкой выявляемости экспрессии *WT1* у первичных больных ММ указанный ген не включен в проводимый анализ.

В результате выполнения ХТ по схеме VAD у 13 из 20 больных была достигнута полная (ПР) или частичная (ЧР) иммунохимическая ремиссия, у 7 пациентов наблюдался минимальный противоопухолевый ответ. После проведения 2-й линии терапии (бортезомибсодержащие курсы) у 6 из 10 пролеченных больных отмечалось улучшение результатов в виде значительного снижения содержания парапротеина в сыворотке крови, однако у 4 пациентов ответ на лечение все же оставался минимальным.

При сопоставлении результатов лечения больных ММ с показателями экспрессии генов *PRAME* и *XIAP* удалось отметить следующее. Присутствие мРНК *PRAME* коррелировало с частотой достижения полного и(или) частичного ответа на применение ХТ-препаратов схемы VAD. Более того, противоопухолевый ответ зависел от степени выраженности экспрессии гена *PRAME*. Как представлено в табл. 3, в группе больных с гиперэкспрессией *PRAME* лишь в 1 случае из 4 был получен частичный ответ, в то время как у пациентов с низкой экспрес-

Таблица 3. Противопухолевый ответ в результате проведения VAD-терапии у больных ММ в зависимости от выраженности экспрессии генов *PRAME* и *XIAP*

Экспрессия генов <i>PRAME</i> и <i>XIAP</i> до начала VAD-терапии, %	Число больных	Частота достижения ПР + ЧР, % больных	
<i>PRAME</i>			
гиперэкспрессия >2,5	4	25	$p=0,06$
экспрессия <2,5	12	75	
экспрессия не выявлена	4	75	
<i>XIAP</i>			
гиперэкспрессия >18	13	69	
экспрессия <18	7	57	

Таблица 4. Изменение экспрессии генов *PRAME* и *XIAP* (медиана, %) у больных ММ до и после лечения бортезомибом

Результат терапии бортезомибом	Ген	До назначения бортезомиба	После назначения бортезомиба
ПР + ЧР ($n=6$)	<i>PRAME</i> <i>XIAP</i>	0,04 (0,02–5) 66 (11–325)	0,05 (0,02–2,7) 20 (1–123)
Минимальный ответ ($n=4$)	<i>PRAME</i> <i>XIAP</i>	8,5 (0,001–14) 36,5 (16–127)	24,8 (4,7–45) 121 (22–528)

сией *PRAME* или ее отсутствием проводившаяся VAD-терапия была эффективной в 75% наблюдений ($p=0,06$). Выраженность экспрессии гена *XIAP*, напротив, не коррелировала с результатами ХТ.

Приступая к анализу результатов лечения больных ММ ингибитором протеасом — бортезомибом и поиску взаимосвязи между противоопухолевым ответом и экспрессией опухолеассоциированных генов, представляется целесообразным отметить некоторые механизмы регуляции экспрессии гена *XIAP*. Ядерный транскрипционный фактор NFkB, освобождаясь в цитоплазме от своего ингибитора IkB, который расщепляется по протеасом-убиквинтиновому пути, проникает в ядро и стимулирует экспрессию генов *IAPs* [12], приводя к блокированию апоптоза. В результате ингибирования протеасом ядерный фактор NFkB, связанный со своим ингибитором IkB, остается в цитоплазме, а синтез *XIAP* прекращается. Из этого становится ясным, что для адекватной оценки результатов терапии ингибитором протеасом в первую очередь необходимо рассматривать изменение экспрессии гена *XIAP* до и после применения бортезомиба.

В нашем исследовании, как и предполагалось, уровень экспрессии гена *XIAP* у больных ММ значи-

тельно менялся в результате лечения бортезомибом. При этом снижение или повышение показателей экспрессии *XIAP* четко коррелировало со степенью противоопухолевого ответа (табл. 4). Так, на фоне достигнутой ПР или ЧР после терапии бортезомибом экспрессия *XIAP* снижалась с 11–325 (медиана 66) до 1–123% (медиана 20), приближаясь к значениям, наблюдаемым у здоровых людей (доноров костного мозга). При резистентности опухоли к проводимой терапии бортезомибом экспрессия *XIAP*, напротив, повышалась с 16–127 (медиана 36) до 22–528% (медиана 121). Более того, резистентность ММ к бортезомибу сопровождалась также и повышением экспрессии *PRAME*: медиана показателей возрастала с 8,5 до 24,8%.

Заключение

Следует отметить, что исследование экспрессии опухолеассоциированных генов *PRAME*, *WT1* и *XIAP* у больных ММ может способствовать более глубокому пониманию биологических характеристик клона злокачественных клеток. Экспрессия гена *PRAME* выявлена у 62% больных ММ. При этом установлено, что высокий уровень экспрессии гена *PRAME* ассоциировался с резистентностью ММ к ХТ-препаратам (схема VAD). Экспрессия гена *XIAP* имела место у всех больных ММ в момент диагностики. Более того, у 78% пациентов количественные показатели экспрессии *XIAP* значительно превышали таковые у доноров костного мозга. Снижение экспрессии *XIAP* на фоне лечения ингибитором протеасом — бортезомибом коррелировало с высокой эффективностью терапии. При достижении ремиссии уровень экспрессии гена *XIAP* приближался к нормальному. Клиническое значение экспрессии гена *WT1* в нашем исследовании определить не удалось в связи с малым числом наблюдений. Возможно, дальнейшие исследования позволят определить пороговые значения экспрессии генов, определяющие как полноту противоопухолевого ответа, так и выбор оптимальной терапевтической тактики.

Л и т е р а т у р а

1. Kumar S.K., Rajkumar S.V., Dispenzieri A. Improved survival in multiple myeloma and the impact of novel therapies. *Blood* 2008;111(5):2516–20.
2. Менделеева Л.П., Покровская О.С. Протокол высокодозной химиотерапии и трансплантации аутологичных стволовых гемопоэтических клеток при множественной миеломе. В кн.: Программное лечение лейкозов. Под ред. В.Г. Савченко.

3. Burington B., Barlogie B., Zhan F. et al. Tumor cell gene expression changes following short-term in vivo exposure to single agent chemotherapeutics are related to survival in Multiple Myeloma. *Clin Cancer Res* 2008;14(15):4821–9.
4. Leilist M., Jäättelä M. Four deaths and funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;2:589–98.

5. Andrade V.C., Vettore A.L., Felix R.S. et al. Prognostic impact of cancer/testis antigen expression in advanced stage multiple myeloma patients. *Cancer Immunol* 2008;8:2–10.
6. Matsushita M., Yamazaki R., Ikeda H. et al. Preferentially expressed antigen of melanoma (PRAME) in the development of diagnostic and therapeutic methods for hematological malignancies. *Leukem Lymph*

2003;44(3):439–44.

7. Epping M.T., Bernards R. A causal role for the human tumor antigen preferentially expressed antigen of melanoma in cancer. *Cancer Res* 2006;66(22):10639–42.

8. Proto-Siqueira R., Figueiredo-Pontes L.L., Panepucci R.A. et al. PRAME is a membrane and cytoplasmic protein aberrantly expressed in chronic lymphoid leukemia and mantle cell lymphoma. *Leukem Res* 2006;30:1333–9.

9. Абраменко И.В., Белоус Н.И., Крячок

И.А., Мисюрин А.В. Экспрессия гена PRAME при миеломной болезни. *Тер арх* 2004;(7):35–40.

10. Yang L., Han Y., Saiz F.S. et al. A tumor suppressor and oncogene: the WT1 story. *Leucemia* 2007;21:868–76.

11. Gaiger A., Reese V., Disis M.L. et al. Immunity to WT1 in the animal model and in patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2000;96(4):1480–9.

12. Holclic M., Korneluk R.G. X-chromosome-linked Inhibitor of Apoptosis (XIAP).

Nat Rev Mol Cell Biol 2001;2:550–6.

13. Sun Y.E. 3 Ubiquitin ligases as cancer targets and biomarkers. *Neoplasia* 2006;8:645–54.

14. Silke J., Ekert P.G., Day C.L. et al. Direct inhibitor of caspase 3 is dispensable for the anti-apoptotic activity of XIAP. *The EMBO J* 2001;20(12):3114–23.

15. Chomczynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162:156–9.

ТЯЖЕЛАЯ ВРОЖДЕННАЯ НЕЙТРОПЕНИЯ: ПАТОФИЗИОЛОГИЯ ЛЕЙКЕМОИДНОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ

Ю. Скокова, К. Вельге

Отдел молекулярной гематологии Высшей медицинской школы, Ганновер, Германия (перевод Ю.В. Румянцева, ФГУ Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии, Москва)

Контакты: Юлия Скокова Skokova.Julia@mh-hannover.de

Тяжелая врожденная нейтропения (ВН) — это гетерогенная патология гемопоэза, характеризующаяся прекращением созревания гранулоцитов на стадии промиелоцитов с абсолютным количеством нейтрофилов в периферической крови (ANC) $<0,5 \times 10^9/\text{л}$. В обзоре суммированы имеющиеся в настоящий момент сведения о патофизиологии развития острой миелобластной лейкемии (ОМЛ) у пациентов с ВН.

По типу наследования ВН делится на два подтипа: 1) с аутосомно-доминантным наследованием, связанный с мутациями ELA2, наблюдающийся у 60% пациентов и 2) с аутосомно-рецессивным наследованием, встречающийся приблизительно у 30% пациентов. ВН рассматривается как прелейкемический синдром, так как через 10 лет наблюдения кумулятивный риск развития лейкемии составляет 21%. Приобретенные мутации рецептора гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (Г-КСФР) обнаружены приблизительно у 80% больных ВН с развившимся ОМЛ. Пациенты с ВН с приобретенными мутациями Г-КСФР составляют группу высокого риска развития лейкемии.

Ключевые слова: тяжелая врожденная нейтропения, мутации рецептора гранулоцитарного колониестимулирующего фактора, острая миелобластная лейкемия

SEVERE CONGENITAL NEUTROPENIA: PATHOPHYSIOLOGY OF LEUKEMOGENIC TRANSFORMATION

J. Skokowa, K. Welte

Department of Molecular Hematology, Hannover Medical School, Hannover, Germany

Severe congenital neutropenia (CN) is a heterogeneous disorder of hematopoiesis characterized by a maturation arrest of granulopoiesis at the level of promyelocytes with peripheral blood absolute neutrophil counts (ANC) below $<0,5 \times 10^9/\text{L}$. In this review we summarize our current knowledge on pathophysiology of AML in CN patients.

There are two major subtypes of CN as judged by inheritance, 1) autosomal dominant trait defined by ELA2 mutations consisting 60% of patients and 2) autosomal recessive trait comprising approximately 30% of patients. CN is considered as a pre-leukemic syndrome, since after ten years of observation the cumulative incidence of acute leukemia is 21%. Acquired G-CSFR mutations are detected in approx. 80% of CN patients who developed AML. CN patients with acquired G-CSFR mutations define a group with high risk for development of leukemia.

Keywords: Severe congenital neutropenia (CN), G-CSFR mutations, AML

Введение

Врожденная нейтропения (ВН) — это мультигенное заболевание с общим гематологическим и клиническим фенотипом. ВН наследуется аутосомно-доминантно или аутосомно-рецессивно. Шведский врач R. Kostmann [1, 2] описал в 1956 г. аутосомно-рецессивную гематологическую патологию с тяжелой нейтропенией, абсолютным количеством нейтрофилов (ANC) $<0,5 \times 10^9/\text{л}$ и появлением тяжелых бактериальных инфекций в раннем возрасте, позднее названную синдромом Костманна.

И прогноз, и качество жизни пациентов с ВН существенно улучшились после появления в 1987 г. терапии гранулоцитарным колониестимулиру-

ющим фактором (Г-КСФ) [3–6]. Более 90% пациентов с ВН отвечают на терапию Г-КСФ повышением ANC $>1,0 \times 10^9/\text{л}$. Следует отметить, что всем ответившим пациентам потребовалось значительно меньшее число антибиотиков и дней госпитализации [6–10]. Несмотря на это, трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) от HLA-совместимого донора остается единственным способом лечения пациентов, рефрактерных к Г-КСФ, и больных с трансформацией в миелодиспластический синдром — МДС/лейкемию [11].

Диагностика

ВН — редкое заболевание (1–2 случая на 1 млн родившихся). ВН обычно диагностируется уже в пе-