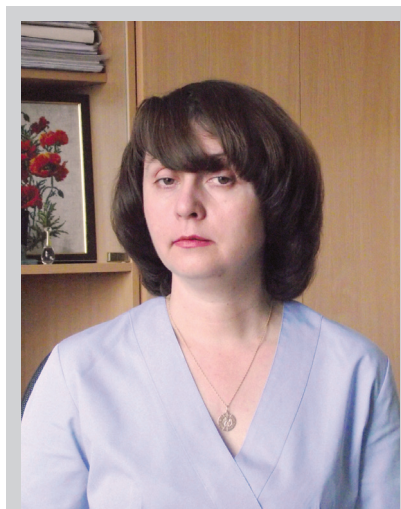


¹Національна медична академія післядипломної освіти ім. П.Л. Шупика, Київ²Референс-центр з молекулярної діагностики МОЗ України, Київ³Черкаський обласний онкологічний диспансер⁴Кіровоградська обласна лікарня⁵Кримський республіканський інститут «Клінічний онкологічний диспансер», Сімферополь⁶Обласна комунальна установа «Лікарня швидкої медичної допомоги», Чернівці⁷Запорізька обласна клінічна лікарня⁸Херсонська обласна клінічна лікарня

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА ХВОРИХ НА МНОЖИННУ МІЄЛОМУ В УКРАЇНІ



Н.І. Костюкова¹, З.І. Россоха²,
Г.В. Пилипенко³, І.П. Єрмолицька⁴,
М.Я. Кисельова⁵, Л.В. Аджигітова⁶,
Т.І. Харчевська⁷, М.Г. Гаркуша⁸,
С.В. Видиборець¹, Н.Г. Горовенко¹

Адреса:

Костюкова Ніна Іванівна
03115, Київ, просп. Перемоги, 119/121
Київський центр трансплантації
кісткового мозку
Тел.: (044) 451-26-60
E-mail: kostyukova@meta.ua

Ключові слова: множинна мієлома, гени, поліморфізм.

У роботі проведено порівняльний аналіз частоти поліморфних варіантів генів, задіяних у біотрансформації цитостатичних ліків у хворих на множинну мієлому (ММ). Нами визначено частоту делеційного поліморфізму генів *GSTT1*, *GSTM1*, частоту генотипів за поліморфними варіантами *A313G*, *C3435T* генів *GSTP1*, *MDR1* у 137 хворих на ММ, які не відрізнялися у пацієнтів з різних регіонів України. Виявлено генетичну схожість хворих на ММ європейських популяцій та України за дослідженими генами. Отримані результати вказують, що генотип *CC* за поліморфізмом *C3435T* гена *MDR1* є предиктором розвитку ММ з несприятливим перебігом за рахунок формування в переважній більшості типу Бенс-Джонса. Перспектива подальших досліджень полягає у вивченні ролі генетичних факторів у механізмі формування фенотипу відповіді на лікування з оцінкою ризику розвитку рефрактерних форм ММ.

ВСТУП

На сьогодні з'явилися нові можливості в лікуванні хворих на множинну мієлому (ММ) завдяки застосуванню, окрім стандартних схем терапії, препаратів імунологічної спрямованості. Проте повідомлення про успіхи, отримані при застосуванні талідоміду, бортезомібу тощо, продемонстрували також, що ці лікарські засоби, як і ті, що входять до стандартних схем, не завжди забезпечують ефективну відповідь на лікування [2–4].

Дані літератури свідчать про залежність ефективності лікарських засобів від поліморфізму генів, що кодують ферменти, задіяні в метаболізмі фармакологічних препаратів. Швидкість перетворення ліків, або їх перетворення до активних сполук, залежить від наявності та активності ферментів у пацієнтів, що вказує на індивідуальні відмінності, генетично детерміновані [7, 8, 16, 17].

Поліморфізм генів біотрансформації ліків має також етнічні та популяційні особливості, що свідчить про необхідність урахування результатів попередніх генетичних досліджень із визначення розповсюдженості поліморфних варіантів генів та їх асоціацій з ризиком розвитку рефрактерних форм ММ [16].

В Україні такі дослідження досі не проводили.

Метою даної роботи стало дослідження розповсюдженості поліморфних варіантів генів, причетних до метаболізму ліків, у хворих на ММ із різних регіонів України.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Для досягнення поставленої мети нами відібрано можливі гени-кандидати, поліморфізм яких впливає, за даними джерел літератури [5–17], на метаболізм цитостатичних препаратів, що застосовуються для лікування ММ. Обстежено 137 пацієнтів із різних регіонів України, у яких у 2007–2011 рр. вперше встановлено діагноз ММ. Застосовували стандартні схеми лікування хворих на ММ. Молекулярно-генетичним методом у пацієнтів проведено дослідження делеційного поліморфізму генів *GSTT1*, *GSTM1*, *A313G* поліморфізму гена *GSTP1*, *C3435T* поліморфізму гена *MDR1*. На проведення дослідження отримано дозвіл етичної комісії. Усі пацієнти після ознайомлення з інформаційним листом надали згоду на участь у проведенні дослідження.

Серед хворих на ММ було 60 (43,79%) осіб чоловічої статі та 77 (56,21%) жіночої. Середній вік пацієнтів становив 56 (27–80) років. У гематологічних

відділеннях для встановлення діагнозу застосовано стандартні методи його верифікації на підставі клінічної картини, показників гемограми та біохімічних тестів, імунохімічного, морфологічного (мієлограми), гістологічного (трепанобіопсія) дослідження кісткового мозку та додаткових інструментальних методів.

У обстежених хворих клінічна картина характеризувалася розвитком анемічного синдрому, болями різної інтенсивності в кістках, у понад 30% пацієнтів розвивався геморагічний синдром. У 67,3% хворих відзначали блідість шкірних покривів, у 40,4% — інтоксикаційний синдром та у 36,5% пацієнтів клінічна маніфестація відбувалася на фоні зменшення маси тіла. Ознаки ураження нервової системи у вигляді периферичної больової поліневропатії зустрічалися рідше — у 13,5%, гепатомегалія — у 9,6% хворих.

У хворих, залучених до дослідження, застосовано молекулярно-генетичний метод з використанням полімеразної ланцюгової реакції та полімеразної ланцюгової реакції з визначенням поліморфізму довжини рестрикційних фрагментів для визначення розповсюдженості поліморфних варіантів генів *GSTT1*, *GSTM1*, *GSTP1*, *MDR1*.

Статистичний аналіз проводили з використанням критеріїв χ^2 та Ірвіна — Фішера за допомогою програми Statistica 7.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Переважає більшість хворих, залучених у дослідження, були з Північної (29,92%) та Центральної (34,30%) частини України. Частка пацієнтів з Південної України становила 21,16%, із Західної — 13,13%. 1,45% хворих були зі Сходу України.

Аналіз клінічних даних показав, що середній вік хворих та статевий розподіл не мали вірогідних відмінностей у різних регіонах України. Серед пацієнтів з Центральної та Західної України дещо зростає відсоток осіб жіночої статі, який становив відповідно

61,22 та 66,66%. Клінічна картина початку та перебігу захворювання не різнилася залежно від регіону проживання.

Загалом у 137 пацієнтів із ММ серед населення України нами виявлено делеційний поліморфізм гена *GSTT1* у 20,43% хворих, а делеційний поліморфізм гена *GSTM1* — у 50,36%. Представлено результати дослідження делеційного поліморфізму генів *GSTT1*, *GSTM1* *glutathion-S-transferase* (*GSTs*) у хворих на ММ з різних регіонів України (рис. 1, 2). Як видно (див. рис. 1), частота делеційного поліморфізму гена *GSTT1* у пацієнтів з ММ з різних регіонів України вірогідно не різнилася, хоча була тенденція до підвищення частоти *GSTT1* делеційного поліморфізму у хворих з Центральної України порівняно з іншими регіонами Півночі та Півдня України (див. рис. 1).

Серед обстежених 137 пацієнтів з ММ були 2 особи жіночої статі зі Східної України, у яких не виявлено делеційного поліморфізму *GSTT1*, тоді як делеційний поліморфізм *GSTM1* зареєстровано в 1 хворої. Тому нам не вдалося оцінити частоту досліджуваних поліморфних варіантів генів у пацієнтів зі Східної України. Частота делеційного поліморфізму *GSTM1* мала тенденцію до зниження у хворих з Північної України порівняно з пацієнтами з Центральної та Південної, але не вірогідну (див. рис. 2).

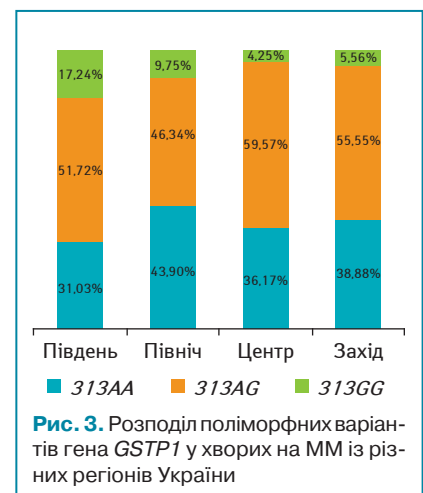
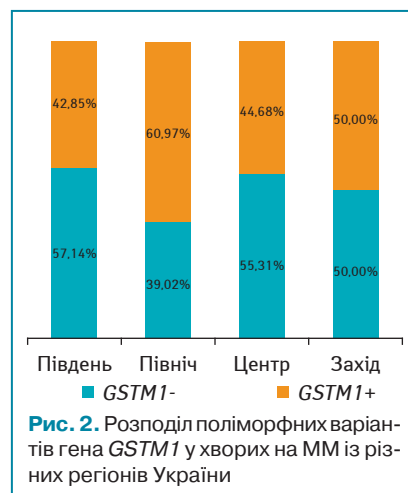
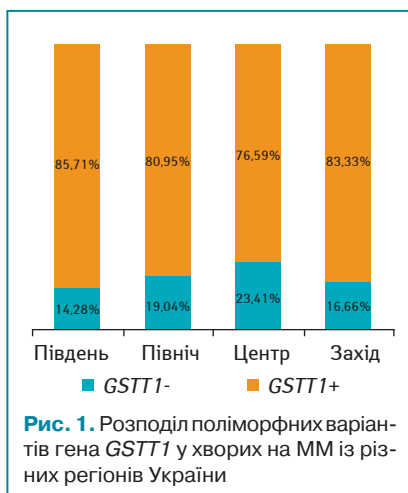
Отримана частота делеційного поліморфізму генів *GSTT1*, *GSTM1* вірогідно не відрізнялася від їх розповсюдженості у хворих на ММ представників європеоїдної раси. За даними, наведеними в дослідженні С. Schlthuisen та співавторів [14], у пацієнтів з ММ з Нідерландів частота генотипу *GSTT1* — становила 27%, а генотипу *GSTM1* — 50% [7]. У російсько-американському дослідженні [8] визначено, що частота генотипу *GSTT1* — становила 22%, а генотипу *GSTM1* — 50% у пацієнтів з ММ.

Серед 137 пацієнтів з ММ з України нами виявлено генотип *AA* гена *GSTP1* у 37,23%, *AG* — у 54,72%, *GG* — у 8,03%. У хворих на ММ з Південної

України підтверджено тенденцію до підвищення частоти *GG* генотипу гена *GSTP1* порівняно з іншими регіонами України (рис. 3). У 2 пацієток зі Східної України виявлено генотипи *AA* та *AG* гена *GSTP1*.

Dasgupta та співавтори встановили наступну частоту генотипів гена *GSTP1* у 222 хворих на ММ британського походження: *AA* — 44%, *AG* — 39%, *GG* — 17% [7]. У 204 хворих з Нідерландів [14] частота генотипів гена *GSTP1* вірогідно не відрізнялася і становила: *AA* — 37%, *AG* — 48%, *GG* — 15%. У 143 пацієнтів з ММ із Франції [9] відзначали невірогідне підвищення частоти генотипу *AA* — 51,74%, ймовірно, за рахунок зниження частоти генотипів *AG* і *GG* серед цих пацієнтів відповідно 37,06 і 11,18%. Таким чином, нами не виявлено вірогідних відмінностей у частоті генотипів за поліморфізмом *A313G* гена *GSTP1* у хворих на ММ, що проживають в Україні, порівняно з аналогічними хворими з європейських популяцій.

У дослідженні R.K. Dasgupta та співавторів продемонстровано, що поліморфні варіанти гена *GSTP1* модулюють результати лікування хворих на ММ та впливають на показники виживаності пацієнтів [7]. Можливий функціональний ефект досліджених поліморфних варіантів гена *GSTP1* пов'язують з впливом поліморфних варіантів гена на ензиматичну активність ферменту-ізомеру та його детоксикаційну спроможність [9], яка бере участь у метаболізмі цитостатичних препаратів. При попередньому плануванні дослідження ми звернули увагу, що варто аналізувати поліморфні варіанти гена *MDR1*, оскільки в літературних джерелах наявні відомості про асоціації певних поліморфних варіантів цього гена з результатами лікування хворих на ММ. Теоретичні відомості вказують на те, що залежно від генотипу існують різні функціональні варіанти Р-глікопротеїну, задіяного в метаболізмі лікарських препаратів [6, 9, 11, 13].



У загальній групі 137 пацієнтів з України частота генотипу *CC* становила 25,54%, генотипу *CT* — 46,71%, *TT* — 27,73%. Одержана частота вірогідно не відрізнялася від аналогічної у 115 хворих на ММ з Італії [6], у яких виявлено наступну частоту генів: *CC* — 28,69%, *CT* — 47,82%, *TT* — 23,47%, та у 147 пацієнтів із Франції [10], у яких частота цих генотипів становила: *CC* — 36,73%, *CT* — 38,77%, *TT* — 24,48%. У обстежених хворих на ММ із 4 регіонів України нами не виявлено вірогідних відмінностей у частоті генотипів за поліморфізмом *C3435T* гена *MDR1* (рис. 4), хоча у пацієнтів із Західної України відзначено тенденцію до зниження частоти *TT* генотипу гена *MDR1*. У 2 пацієнок зі Східної України виявлено генотип *TT* гена *MDR1*.

Результати більшості досліджень вказують на те, що на рівень захворюваності впливають популяційні відмінності. Так, серед представників європейських популяцій захворювання зустрічається з частотою від 2,6 на 100 000 населення в Англії до 3,3 на 100 000 населення в Швеції, а в Україні — 1,6 на 100 000 населення [1]. Найвищу захворюваність виявлено у представників негроїдної раси в США — 8,25 на 100 000 населення, а найнижчу в Китаї — 1,0 на 100 000 населення [4, 5]. Виявлені відмінності, на нашу думку, пов'язані з генетичною гетерогенністю генів, асоційованих з ймовірним розвитком захворювання. Але переконливих даних щодо ролі генетичної компоненти в розвитку ММ не отримано. Водночас у більшості згаданих нами робіт вказано на те, що генетична компонента є важливою складовою відповіді на лікування, і її необхідно вивчати для того, щоб ін-

дивідуалізувати використання існуючих схем та протоколів.

У 66 обстежених нами хворих, пролікованих у Київському центрі трансплантації кісткового мозку, визначено методом імунофіксації тип мієломи. 74,24% цих пацієнтів мали *G* тип, 13,63% — Бенс-Джонса тип, 10,6% — *A* тип, 1,51% — *D* тип. Отримана частота окремих типів ММ в обстежених пацієнтів узгоджується з даними інших авторів. Для хворих з Бенс-Джонса типом прогноз щодо перебігу захворювання та відповіді на лікування є найбільш несприятливим порівняно з *A* і *G* типами [2].

Відмінності в перебігу захворювання при різних типах мієломи пов'язували з експресією генів множинної лікарської стійкості та генів, залучених до метаболізму лікарських засобів. Тому ми проаналізували досліджені гени залежно від типу мієломи в обстежених хворих (рис. 5). Тип *D* виявлено в 1 хворого, тому цей результат не враховано при вивченні розподілу поліморфних варіантів генів *GSTT1*, *GSTM1*, *GSTP1*, *MDR1* залежно від типу мієломи.

Проведено порівняння розповсюдженості досліджуваних генотипів генів *GSTT1*, *GSTM1*, *GSTP1*, *MDR1* у хворих з різними типами мієломи. Як видно з рис. 5, у пацієнтів з різними типами мієломи були відмінності в розповсюдженості генотипів, які насамперед стосувалися гена *MDR1*. Наведено результати вивчення розповсюдженості поліморфних варіантів гена *MDR1* у хворих з різними типами ММ (таблиця).

У хворих на ММ з типом Бенс-Джонса була вірогідно підвищена частота генотипу *CC* гена *MDR1* ($\chi^2=3,88$; $p=0,0488$) та визначалася тенденція до зниження частоти генотипу *TT* гена

MDR1 ($\chi^2=2,86$; $p=0,0907$) порівняно з їх частотою у хворих на ММ з типом *A*. При типі *G* частота генотипу *CC* гена *MDR1* була вищою, ніж у хворих з *A* типом, але нижчою, ніж у хворих з Бенс-Джонса типом, — встановлені відмінності не були вірогідними. Подібну тенденцію виявлено для *TT* генотипу гена *MDR1*: у хворих з *G* типом відзначали зниження частоти порівняно з пацієнтами з типом *A*, але ця частота була вищою, ніж у хворих з Бенс-Джонса типом.

За доведеними даними, особи з *TT* генотипом за поліморфізмом *C3435T* гена *MDR1* характеризуються зниженням рівня Р-глікопротеїну та підвищенням рівня цитостатичних препаратів у клітині, що на сьогодні не пов'язують з токсичним ефектом [9, 16, 14], а розглядають як сприятливий предиктор у формуванні фенотипу відповіді на лікування [6].

Отримані нами результати щодо асоціації певних типів мієломи з поліморфними варіантами гена *MDR1* вказують на його ймовірну участь у механізмах формування певних типів ММ. Виходячи з результатів статистичного аналізу, у осіб з генотипом *CC* гена *MDR1* вірогідно частіше відбуватиметься формування Бенс-Джонса типу захворювання.

ВИСНОВКИ

Проведена нами робота дозволила визначити частоту делеційного поліморфізму генів *GSTT1*, *GSTM1*, частоту генотипів за поліморфними варіантами *A313G*, *C3435T* генів *GSTP1*, *MDR1* у хворих на ММ, яка не різнилася в пацієнтів з різних регіонів України. Виявлено генетичну схожість хворих на ММ з європейських популяцій та України за дослідженими генами. Отримані результати вказують на те, що за наявності генотипу *CC* за поліморфізмом *C3435T* гена *MDR1* у хворих вірогідно частіше виявляють ММ з типом Бенс-Джонса. Перспектива подальших досліджень полягає у вивченні ролі генетичних факторів у механізмі формування фенотипу відповіді на лікування з оцінкою ризику розвитку рефрактерних форм ММ.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Бюлетень Національного канцер-реєстру № 13 — «Рак в Україні, 2010–2011».
2. Крячок І.А. (2005) Клініко-лабораторні маркери прогнозу перебігу захворювання та відповіді на комбіноване лікування із включенням високодозової хіміотерапії та трансплантації стовбурових клітин у хворих на множинну мієлому. Укр. мед. часопис, 4(48) VII–VIII: 132–138.
3. Крячок І.А. (2010) Сучасні стандарти діагностики та лікування хворих на множинну мієлому. Укр. мед. часопис, 2(76) III/IV: 91–97.
4. Серафим Н.Я., Лукавський Л.М., Цяпка О.М. та ін. (2007) Лікування хворих на множинну мієлому: досвід та перспективи. Онкологія, 9(2): 159–163.
5. Becker N. (2011) Epidemiology of Multiple Myeloma. T. Moehler and Goldschmidt (eds.) Multiple Myeloma. Springer-Verlag Berlin Heidelberg (DOI: 10.1007/978-3-540-85772-3_2).
6. Buda G., Maggini V., Galimberti S. et al. (2007) *MDR1* polymorphism influences the outcome of multiple myeloma. Br. J. Haematol., 137: 454–456.

Таблиця Розподіл частоти генотипів за поліморфізмом *C3435T* гена *MDR1* у хворих із різними типами ММ

Ген	Генотип	Тип А (n=7)		Тип G (n=49)		Тип Б-Д (n=9)		Тип D (n=1)	
		n	%	n	%	n	%	n	%
<i>MDR1</i> (<i>C3435T</i>)	<i>CC</i>	1	14,28	14	28,57	5	55,55	0	0
	<i>CT</i>	2	28,57	22	44,89	3	33,33	1	100
	<i>TT</i>	4	57,14	13	26,53	1	11,11	0	0

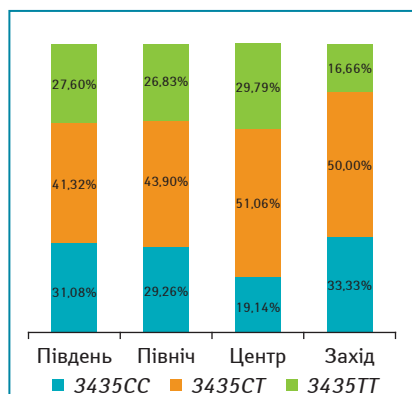


Рис. 4. Розподіл поліморфних варіантів гена *MDR1* у хворих на ММ із різних регіонів України

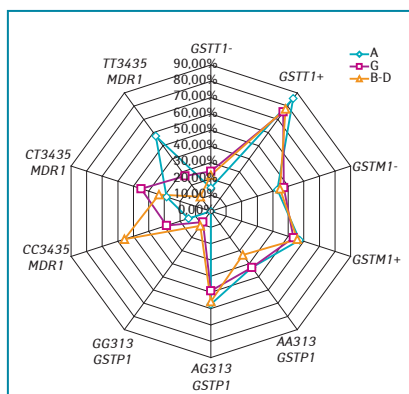


Рис. 5. Розподіл поліморфних варіантів генів *GSTT1*, *GSTM1*, *GSTP1*, *MDR1* залежно від типу мієломи

7. Dasgupta R. K., Adamson P. J., Davies F. E. (2003) Polymorphic variation in GSTP1 modulates outcome following therapy for multiple myeloma. *Blood*, 102(7): 2345–2350.

8. DeVita V. T., Hellman S., Rosenberg S. A. et al. (Eds) (1997) *Principles and Practice of Oncology*. Cancer, 2–5th ed.

9. Dumontet C., Landi S., Reimen T. et al. (2010) Genetic polymorphisms associated with outcome in multiple myeloma patients receiving high-dose melphalan. *Bone Marrow Transplantation*, 45: 1316–1324.

10. Linsenmeyer M. E., Jefferson S., M. Wola M. et al. (1992) Levels of expression of the mdr1 gene and glutathione S-transferase genes 2 and 3 and response to chemotherapy in multiple myeloma. *Br. J. Cancer*, 65: 471–475.

11. Maggini V., Buda G., Martino A. et al. (2008) MDR1 diplotypes as prognostic markers in multiple myeloma. *Pharmacogenet Genomics*, 18(5): 383–389.

12. Hahn T., Zhelnova E., Sucheston L. et al. (2010) A Deletion Polymorphism in Glutathione-S-Transferase Mu (GSTM1) and/or Theta (GSTT1) Is Associated with an Increased Risk of Toxicity after Autologous Blood and Marrow Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 16: 801–808.

13. Hodges L. M., Markova S., Chinn L. W. et al. (2011) Very important pharmacogene summary: ABCB1 (MDR1, P-glycoprotein). *Pharmacogenet Genomics*, 21(3): 152–161.

14. Schilthuisen C., Broyl A., Holt B. et al. (2007) Influence of genetic polymorphisms in CYP3A4, CYP3A5,

GSTP1, *GSTM1*, *GSTT1* and *MDR1* genes on survival and therapy-related toxicity in multiple myeloma. *Haematologica*, 92(02): 277–278.

15. Maggini V., Buda G., Martino A. et al. (2008) MDR1 diplotypes as prognostic markers in multiple myeloma. *Pharmacogenet. Genomics*, 18(5): 383–389.

16. Vangsted A., Klausen Tobias W., Vogel U. et al. (2012) Genetic variations in multiple myeloma II: association with effect of treatment. *Eur. J. Haematol.*, 88(2): 93–117.

17. Van Ness B., Ramos C., Haznadar M. et al. (2008) Genomic variation in myeloma: design, content, and initial application of the Bank On A Cure SNP Panel to detect associations with progression-free survival. *BMC Medicine*, 6(26): 1–14.

Молекулярно-генетическая характеристика больных множественной миеломой в Украине

Н.И. Костюкова¹, З.И. Россоха², Г.В. Пилипенко³,
И.П. Ермолицкая⁴, М.Я. Киселева⁵, Л.В. Адзигитова⁶,
Т.И. Харчевская⁷, М.Г. Гаркуша⁸, С.В. Выдыборец¹, Н.Г. Горовенко¹
¹Национальная медицинская академия последиplomного образования имени П.Л. Шупика, Киев
²Референс-центр по молекулярной диагностике МЗ Украины, Киев
³Черкасский областной онкологический диспансер
⁴Кировоградская областная больница, ⁵Крымский республиканский институт «Онкологический клинический диспансер», Симферополь
⁶Областное коммунальное учреждение «Больница скорой медицинской помощи», Черновцы
⁷Запорожская областная клиническая больница
⁸Херсонская областная клиническая больница

Резюме. В работе проведен сравнительный анализ частот полиморфных вариантов генов, вовлеченных в трансформацию цитостатических препаратов у больных множественной миеломой (ММ). Нами определена частота делеционного полиморфизма генов *GSTT1*, *GSTM1*, частота генотипов по полиморфным вариантам *A313G*, *C3435T* генов *GSTP1*, *MDR1* у 137 больных ММ из Украины, которые не отличались у пациентов из разных регионов. Выявлено генетическое сходство больных ММ европейских популяций и Украины по исследованным генам. Полученные результаты показали, что генотип *CC* гена *MDR1* является предиктором развития ММ с неблагоприятным течением за счет формирования преимущественно типа Бенс-Джонса. Перспектива дальнейших исследований состоит в определении роли генетических факторов в механизме формирования фенотипа ответа на лечение с оценкой риска развития рефрактерных форм ММ.

Ключевые слова: множественная миелома, гены, полиморфизм.

Molecular-genetic characteristics of patients with multiple myeloma in Ukraine

N.I. Kostyukova¹, Z.I. Rossokha², G.V. Pilipenko³, I.P. Yermolytskaya⁴,
M.Y. Kyselyova⁵, L.V. Adzhyhytova⁶, T.I. Harchevskaya⁷,
M.G. Garkusha⁸, S.V. Vydyborets¹, N.G. Gorovenko¹
¹National medical academy of post-graduate education named after P.L. Shupik, Kyiv
²Reference-Centre for Molecular Diagnostics, Kyiv
³Cherkasy Regional Oncology Center
⁴Kyrovohrad Regional Clinical Hospital
⁵Crimean Republican Institution «Oncological Clinical Dispensary», Simferopol
⁶Regional communal establishment «Regional Emergency Hospital», Chernivtsi
⁷Zaporizhzhia Regional Clinical Hospital
⁸Kherson Regional Clinical Hospital

Summary. Conducted work allowed us to determine frequency of deletion polymorphism of genes *GSTT1*, *GSTM1*, frequency of genotypes according to polymorphous variants *A313G*, *C3435T* genes *GSTP1*, *MDR1* in 137 patients with multiple myeloma (MM), who did not differ from patients of different regions of Ukraine. Genetic similarity was determined in patients with MM from European populations and patients from Ukraine according to studied genes. Received results show that genotype *CC* according to polymorphism *C3435T* of gene *MDR1* is predictor of development of MM with unfavorable process at the expense of formation in most cases of type of Bence Jones. Perspective of further researches means studying the role of genetic factors in mechanism of formation the phenotype of reaction on treatment with evaluation of risk of development of refractory forms of MM.

Key words: multiple myeloma, genes, polymorphism.