

УДК 616.006

Т.И. Поспелова, М.И. Лосева, И.Б. Ковынев, Т.А. Агеева, М.А. Зенкова,  
Е.Л. Черноловская, А.Н. Зенков, Н.В. Скворцова, В.В. Власов

## ОСНОВЫ ОПУХОЛЕВОЙ ПРОГРЕССИИ ГЕМОБЛАСТОЗОВ

Новосибирская государственная медицинская академия МЗ РФ  
Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

Обследовано 104 больных неходжкинскими лимфомами IV стадии с поражением костного мозга, которые в зависимости от результатов лечения были разделены на группу с хорошим ответом на лечение (полная или частичная ремиссия) и группу с отсутствием эффекта от лечения (безремиссионное течение). Исследованы: маркер пролиферации Ki-67, регуляторы апоптоза bcl-2, p53, онкобелок c-myc, маркеры множественной лекарственной устойчивости (экспрессия генов *MDR1* и *MRP*). В группе больных с плохим ответом на лечение исследуемые показатели значительно превышали таковые в группе пациентов с хорошим ответом на лечение. Полученные результаты указывают на необходимость индивидуализации программной химиотерапии у больных с высокими уровнями множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) и плохим прогнозом.

**Ключевые слова:** иммуногистохимия, множественная лекарственная устойчивость, лимфома, *MDR1*, *MRP*, химиотерапия

В последние десятилетия достигнуты значительные успехи в лечении гемобластозов – опухолевых заболеваний крови: повысилось число полных ремиссий, увеличилась безрецидивная выживаемость больных, описаны случаи выздоровления. Все это стало возможным благодаря использованию интенсивной программной полихимиотерапии (ПХТ). В настоящее время при острых лейкозах частота достижения полных ремиссий у взрослых составляет 65–70%, а 5-летняя безрецидивная выживаемость – 25–34% [4]. При лимфогранулематозе полные ремиссии достигаются в зависимости от стадии заболевания у 60–90% впервые диагностированных больных, а 20-летняя безрецидивная выживаемость составляет более 60% [3]. При неходжкинских злокачественных лимфомах (НХЛ) 5-летняя выживаемость варьирует в зависимости от морфологического варианта опухоли от 70% до 38% [5]. Вместе с тем, дальнейшее улучшение результатов лечения лимитируется высокой несовместимой с жизнью токсичностью, так как порог чувствительности опухолевых и здоровых тканей невелик.

Многочисленными исследованиями показано, что в большинстве случаев неуспех лечения обусловлен резистентностью опухолевых клеток к химиотерапии. Установлено, что в основе развития феномена множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) лежит резкое снижение внутриклеточной концентрации препаратов за счет выведения их из клетки с помощью транспортных белков, работающих в режиме “выкачивающей помпы” [1, 12].

Лучше всех изучен, в основном при солидных опухолях, белок Р-гликопротеин, являющийся продуктом *MDR1* гена, локализованного на 7-й хромосоме, а также белок *MRP*-множественной лекарственной резистентности. Ген, кодирующий его, расположен на 16-й хромосоме [7, 9, 10]. В настоящее время можно считать установленным, что реализация циторедуктивного эффекта всех химиотерапевтических препаратов, независимо от механизма их действия, происходит через активацию в опухолевых клетках программы апоптоза – программируемой клеточной гибели. С этой точки зрения, резистентность опухолевых клеток к терапии может быть

следствием двух процессов: во-первых, неспособности противоопухолевого препарата запустить программу апоптоза (недостаточная внутриклеточная концентрация активной формы препарата, отсутствие внутриклеточных мишеней, восприимчивых к действию препарата и включающих программу апоптоза); во-вторых, нарушений механизмов апоптоза в самих опухолевых клетках. То есть, опухолевый рост может возникать как вследствие неконтролируемой (неограниченной) пролиферации, так и вследствие замедления процессов апоптоза [2, 8].

Наиболее частой причиной лекарственной резистентности является мутация (или дефицит) гена p53, развивающаяся в процессе опухолевой трансформации и отменяющая его проапоптотическую функцию. При дефектном функционировании этого гена происходит накопление клеток с множественными генетическими дефектами, что лежит в основе опухолевой прогрессии и делает клетку невосприимчивой к химиотерапевтическим препаратам [8, 11].

Ключевые позиции в регуляции апоптоза занимает семья генов bcl-2, гиперэкспрессия которых делает клетки нечувствительными к проапоптотическим стимулам и вызывает рефрактерность опухолевых клеток к цитостатическим препаратам, то есть bcl-2 действует как супрессор апоптоза, увеличивая продолжительность жизни клеток и способствуя их накоплению [1].

Безусловно, механизмы МЛУ и апоптоза достаточно сложны и глубоки, однако попытки выделения на основании исходных прогностических факторов группы больных, имеющих низкую вероятность достижения ремиссии или высокий риск развития рецидива, с целью индивидуализации лечения, являются перспективным направлением в современной терапии злокачественных новообразований. Такой подход может основываться только на углубленном изучении молекулярно-биологических особенностей опухолевой клетки.

Целью настоящего исследования явилось изучение клинко-морфологических и молекулярно-биологических особенностей опухолевой прогрессии при гемобла-

стозах, выявление прогностической роли маркеров МЛУ, апоптоза и пролиферативной активности у этой категории больных и оценка их влияния на эффективность полихимиотерапии.

**Методика.** В условиях Городского гематологического центра Новосибирска в течение 2000–2003 гг. был обследован 721 больной с опухолевыми заболеваниями крови: лимфогранулематозом (51 чел.), различными вариантами острого лейкоза (180 чел.), миелодиспластическим синдромом (14 чел.), хроническим миелолейкозом (14 чел.). Самую большую группу составили пациенты с НХЛ – 462 человека (64%). В данной работе представлен анализ материала, касающийся особенностей течения НХЛ у 104 больных с впервые установленным диагнозом и первичным поражением костного мозга. У 36,5% пациентов была диагностирована агрессивная лимфома (средний возраст больных составил 48,2 лет); больные с индолентными лимфомами составили 63,5% (средний возраст их был равен 55,3 года).

Все пациенты подвергались стандартному обследованию, включающему общеклинические, биохимические методы исследования, в том числе свидетельствующие об активности опухолевого процесса; инструментальные и специальные методы – подсчет миелограммы; трепанобиопсию. У всех больных диагноз выставлялся на основании морфологического исследования биопсированного лимфоузла.

Молекулярно-биологические особенности опухолевых клеток, их линейную принадлежность и уровень дифференцировки определяли иммуноморфологическим методом с использованием панели из 37 моноклональных антител против дифференцировочных антигенов гемопоэтических клеток. При этом, наряду с изучением лимфоидных и нелимфоидных маркеров, оценивались маркеры пролиферации (Ki-67), регуляторы апоптоза (bcl-2, p53), онкобелки (c-myc), маркеры МЛУ (гены *MDR1*, *MRP*, Р-гликопротеин). С целью проведения дифференциального диагноза с другими видами неоплазий использовалась панель моноклональных антител, включающая еще 24 маркера. Уровень экспрессии генов *MDR1* и *MRP* в образцах костного мозга определялся методом полуколичественной RT-PCR – “обратная транскрипция – полимеразная цепная реакция” – с использованием в качестве внутреннего стандарта уровня экспрессии гена *RPL-30* (*ribosomal protein L-30*). Группу контроля составили 19 клинически здоровых доноров.

Все больные получали стандартную терапию: при агрессивных лимфомах – протоколы СНОР, СНОЕР, ДНАР; при индолентных – СОР, СНОР, монохимиотерапию.

**Результаты.** В группе больных агрессивными лимфомами высокая экспрессия гена *MDR1* была зарегистрирована у 64% обследуемых, гена *MRP* – у 33%, обоих генов – также у 33%; высокие уровни Р-гликопротеина отмечены у 53% пациентов, *bcl-2* – у 69%, Ki-67, свидетельствующего о высокой пролиферативной активности, – у 92% больных (рис. 1).

В группе больных индолентными лимфомами высокий уровень экспрессии *MDR1* отмечен у 63% обследуемых, *MRP* – у 41%, обоих генов – у 34%; высокий уровень Р-гликопротеина зарегистрирован у 49% пациен-

тов, *bcl-2* – у 73%, Ki-67 – у 10,5%, что значительно ниже, чем в группе агрессивных лимфом (рис. 2).

Все пациенты с лимфомами, в зависимости от результатов лечения были разделены на 2 группы: с хорошим ответом (полная и частичная ремиссия) и отсутствием эффекта от лечения (безремиссионное течение). В группе больных агрессивными лимфомами с хорошим ответом на терапию уровень *MDR1* был в 2,5 раза выше контрольных значений, а уровень *MRP* не отличался от контроля, тогда как в группе больных с плохим ответом на лечение уровень *MDR1* в 5,2 раза, а *MRP* в 2,3 раза превышал контрольные значения.

В группе больных с индолентными лимфомами отмечена та же тенденция: в группе больных с отсутствием эффекта от лечения уровень *MDR1* был в 6,2 раза, а *MRP* – в 1,3 раза выше контрольных значений; в группе же с хорошим ответом на лечение это превышение было не столь значительным и составляло для *MDR1* 2,6 раза, а для *MRP* не отличалось от контроля (рис. 3).

Анализ результатов лечения свидетельствует о том, что в группе больных с высоким уровнем экспрессии *MDR1* и *MRP* у большинства пациентов наблюдались резистентность к проводимой терапии и плохой прогноз: безремиссионное течение отмечено у 64,2% обследуемых. При этом лечение сопровождалось высокой частотой осложнений – у 66,6% пациентов. В структуре осложнений наиболее часто встречались: полинейропатия, миокардиодистрофия, пневмония, гепатиты.

Международный прогностический индекс соответствовал группе высокого и высокого/промежуточного риска у 77% обследуемых. Высокие уровни *MDR1* и *MRP* сочетались с высокими уровнями Р-гликопротеина, *bcl-2* и высоким уровнем пролиферативной активности.

В группе больных с низким уровнем *MDR1* и *MRP* общий ответ на лечение (число полных и частичных ремиссий) был достигнут в 67%, что почти в 2 раза выше, чем у больных с высоким уровнем *MDR1* и *MRP*. Безремиссионное течение заболевания отмечено лишь в 33% случаев. Осложнения в период проведения ПХТ наблюдались у 40% пациентов, что также меньше, чем в предыдущей группе больных. Международный прогностический индекс соответствовал группе низкого и низкого/промежуточного риска у 62% больных. В этой группе не отмечено взаимосвязи между уровнями экспрессии *MDR1* и *MRP* с Р-гликопротеином, *bcl-2* и Ki-67.

Следует отметить, что у пациентов, получивших полихимиотерапию, уровни *MDR1* и *MRP* значительно превышали таковые у нелеченных больных как в группе агрессивных, так и в группе индолентных лимфом.

**Выводы.** Полученные данные свидетельствуют о том, что гиперэкспрессия генов *MDR1* и *MRP*, а также повышенные уровни Р-гликопротеина, *bcl-2*, Ki-67 у больных агрессивными и индолентными лимфомами коррелируют с плохим ответом на лечение и плохим прогнозом.

Проводимая полихимиотерапия сопровождается увеличением экспрессии генов *MDR1* и *MRP* в сравнении с пациентами, не получавшими ПХТ.

Оценка уровней экспрессии генов *MDR1* и *MRP*, а также маркеров апоптоза и МЛУ (Р-гликопротеина, *bcl-2*, Ki-67) является основанием для индивидуализации программной полихимиотерапии. При высоком

уровне данных маркеров – выбор более агрессивных программ полихимиотерапии в качестве терапии 1-й линии.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Владимирская Е.Б. Причины и пути преодоления лекарственной резистентности при лейкозах и лимфомах у детей / Е.Б. Владимирская, Н.С. Кисляк, А.Г. Румянцев // Гематология и трансфузиология. 1998. № 6. С. 3–8.
2. Владимирская Е.Б. Механизмы апоптотической смерти клеток / Е.Б. Владимирская // Гематология и трансфузиология. 2002. № 2. С. 35–40.
3. Демина Е.А. Лимфогранулематоз / Е.А. Демина // Клиническая онкогематология / Под ред М.А. Волковой. С. 314–335.
4. Лосева М.И. Печень при гемобластозах / М.И. Лосева. Новосибирск, 1989. 435с.
5. Поддубная И.В. Обоснование лечебной тактики при неходжкинских лимфомах / И.В. Поддубная // Современная онкология (Экстра-выпуск). 2002. С. 15–19.
6. Стратегия терапии острых миелоидных лейкозов взрослых / В.Г. Савченко, Е.Н. Паровичникова, В.Г. Исаев и др. // Тер. архив. 1998. № 7. С. 6–11.
7. Chevillard S. French multicentric evaluation of *mdr1* gene expression by RT – PCR in leukemia and solid tumors. Standardization of RT – PCR and preliminary comparisons between RT – PCR and immunohistochemistry in solid tumors / S. Chevillard // Leukemia. 1997. Vol. 11. P. 1095–1106.
8. Dalton William S. Mechanism of drug resistance in hematological malignancies // Supplement to Seminars in hematology. 1997. Vol. 34 (4). P. 3–8.
9. MDR1 and MPR expression in chronic B-lymphoproliferative disorders / M. Webb, M. Brun, M. McNiven et al. // British journal of hematology. 1998. Vol. 102. P. 710–717.
10. Multidrug resistance in acute leukemia: a comparison of different diagnostic methods / G. Pall, M. Spitaler, J. Hofmann et al. // Leukemia. 1997. Vol. 11. P. 1067–1072.
11. Multidrug resistance mechanisms in chronic lymphocytic leukemia // U. Consoli, A. Santonocito, F. Stagno et al. // British Journal of Hematology. 2002. Vol. 116. P. 774.
12. Sonneveld P. Multi-drug resistance in hematological malignancies / P. Sonneveld // Journal of Internal Medicine. 2000. Vol. 247. P. 521–534.

#### THE TUMOR PROGRESSION IN HEMOBLASTOSIS FOUNDATIONS

T.I. Pospelova, M.I. Loseva, I.B. Kovynev, T.A. Ageeva, M.A. Zenkova, E.L. Chernolovskaya, A.N. Zenkov, N.V. Skvortsova, V.V. Vlasov

104 patients with 4th stage non-Hodgkin's lymphomas with primary bone marrow involvement were admitted to the study. All patients were divided, according to the clinical data, into group with good response to therapy (complete remission, partial remission) and group with treatment failure. Levels of the proliferation marker Ki-67, apoptosis regulators *bcl-2*, *p53*, multi-drug resistance markers (expression levels of the *MDR1* and *MRP* genes) and oncoprotein *c-myc* were investigated. The data demonstrated that in patients with treatment failure the levels of all tested proteins were significantly higher than in patients with good response to therapy. Therefore, these results can be used as prognostic method for administration more aggressive protocols of chemotherapy to those patients who show increased levels of above-listed proteins.

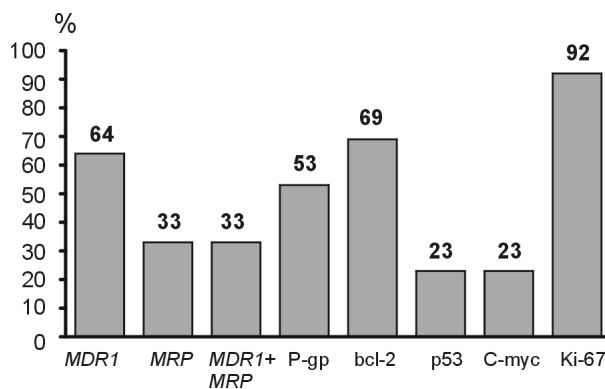


Рис. 1. Частота встречаемости маркеров МЛТУ, апоптоза, пролиферативной активности у больных агрессивными лимфомами

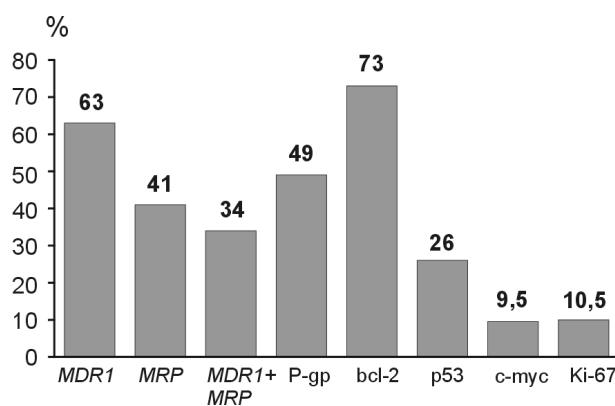


Рис. 2. Частота встречаемости маркеров МЛТУ, апоптоза, пролиферативной активности у больных индолентными лимфомами

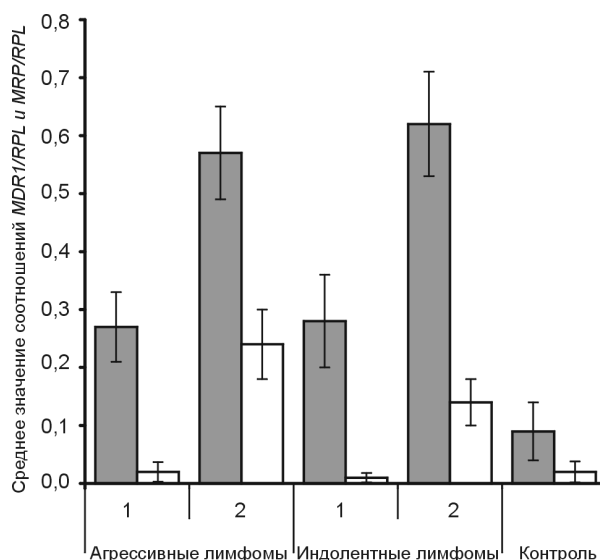


Рис. 3. Сравнительный анализ средних соотношений *MDR1/RPL* (серые столбцы) и *MRP/RPL* (белые столбцы) в группах больных с хорошим ответом на лечение (1) и больных, у которых терапия оказалась неэффективна (2)