

Экспрессия раково-тестикулярных генов *PRAME*, *NY-ESO1*, *GAGE1*, *MAGE A3*, *MAGE A6*, *MAGE A12*, *SSX1*, *SLLP1*, *PASD1* у больных множественной миеломой, их влияние на показатели общей выживаемости и скорость возникновения рецидива

А.А. Солодовник¹, А.С. Мкртчян², В.А. Мисюрин¹, В.В. Тихонова¹, Ю.П. Финашутина¹, Н.Н. Касаткина¹, О.Н. Солопова¹, О.М. Вотякова¹, О.Ю. Якимович¹, О.М. Володина¹, М.Ю. Кичигина¹, Е.Г. Медведевская¹, А.С. Антипова¹, И.З. Заводнова¹, А.А. Семенова¹, Г.Р. Аракелян¹, Ю.Е. Рябухина¹, О.А. Коломейцев¹, А.Д. Ширин¹, Е.А. Османов³, А.В. Мисюрин^{1,2}

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24;

²ООО «Гено Технологии»; Россия, 17279 Москва, ул. Профсоюзная, 104;

³ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России; Россия, 119991 Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2

Контакты: Алена Александровна Солодовник alionka1363@rambler.ru

Цель исследования – изучить прогностическое значение экспрессии раково-тестикулярных генов (РТГ) *PRAME*, *NY-ESO1*, *GAGE1*, *MAGE A3*, *MAGE A6*, *MAGE A12*, *SSX1*, *SLLP1*, *PASD1* у больных множественной миеломой (ММ) и их влияние на показатели общей выживаемости и скорость возникновения рецидивов, определить их влияние на такие клинические показатели, как уровни лактатдегидрогеназы, лейкоцитов, гемоглобина, кальция, альбумина, креатинина и бета-2-микроглобулина.

Материалы и методы. Количественную полимеразную цепную реакцию в реальном времени проводили на комплементарной ДНК, полученной из образцов костного мозга 77 больных с установленным диагнозом ММ. Статистический анализ выполняли с помощью программного пакета *Statistica 10.0*. Для построения кривых общей выживаемости использовали метод Каплана–Майера.

Результаты. Проведено исследование для определения уровня экспрессии РТГ *PRAME*, *NY-ESO1*, *GAGE1*, *MAGE A3*, *MAGE A6*, *MAGE A12*, *SSX1*, *SLLP1*, *PASD1* в группе больных ММ. В группу вошли как первичные пациенты, так и получающие лекарственную противоопухолевую терапию при ММ. Согласно *log-rank*-тесту существенное влияние на показатели общей выживаемости и выживаемости без прогрессирования/рецидива заболевания оказывает экспрессия любого из РТГ *NY-ESO1*, *MAGE A6*, *MAGE A12*, *SSX1*, *PASD1*. Также определено, что при экспрессии некоторых РТГ уровни креатинина, кальция и бета-2-микроглобулина были на порядок выше, чем у больных без экспрессии.

Ключевые слова: раково-тестикулярный ген, множественная миелома, общая выживаемость, безрецидивная выживаемость

Для цитирования: Солодовник А.А., Мкртчян А.С., Мисюрин В.А. и др. Экспрессия раково-тестикулярных генов *PRAME*, *NY-ESO1*, *GAGE1*, *MAGE A3*, *MAGE A6*, *MAGE A12*, *SSX1*, *SLLP1*, *PASD1* у больных множественной миеломой, их влияние на показатели общей выживаемости и скорость возникновения рецидива. *Успехи молекулярной онкологии* 2018;5(2):62–70.

DOI: 10.17650/2313-805X-2018-5-2-62-70

Expression of cancer-testis genes *PRAME*, *NY-ESO1*, *GAGE1*, *MAGE A3*, *MAGE A6*, *MAGE A12*, *SSX1*, *SLLP1*, *PASD1* in patients with multiple myeloma, their influence on overall survival and relapse rate

A.A. Solodovnik¹, H.S. Mkrtychyan², V.A. Misyurin¹, V.V. Tikhonova¹, Yu.P. Finashutina¹, N.N. Kasatkina¹, O.N. Solopova¹, O.M. Votyakova¹, O.Yu. Yakimovich¹, O.M. Volodina¹, M.Yu. Kichigina¹, E.G. Medvedovskaya¹, A.S. Antipova¹, I.Z. Zavodnova¹, A.A. Semenova¹, G.R. Arakelyan¹, Yu.E. Ryabukhina¹, O.A. Kolomeytshev¹, A.D. Shirin¹, E.A. Osmanov³, A.V. Misyurin^{1,2}

¹N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia;

²GeneTechnology; 104 Profsoyuznaya St., Moscow 117485, Russia;

³I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of Russia; Build. 2, 8 Trubetskaya St., Moscow 119991, Russia

Objective: to study the prognostic significance of the expression of cancer-testis (CT) genes *PRAME*, *NY-ESO1*, *GAGE1*, *MAGE A3*, *MAGE A6*, *MAGE A12*, *SSX1*, *SLLP1*, *PASD1* in patients with multiple myeloma (MM) and their influence on overall survival and relapse rate. To determine their effect on such clinical parameters as levels of lactate dehydrogenase, leucocytes, hemoglobin, calcium, albumen, creatinine, beta-2-microglobulin.

Materials and methods. Real-time polymerase chain reaction was performed on complementary DNA obtained from bone marrow of 77 patients with MM. The statistical analysis was performed using the Statistica 10.0 software package. To estimate prognostic values of the CT gene expression data were analyzed by the Kaplan – Meier method.

Results. The study was conducted to determine the level of expression of CT genes PRAME, NY-ESO1, GAGE1, MAGE A3, MAGE A6, MAGE A12, SSX1, SLLP1, PASD1 in a group of patients with MM. The group included primary and receiving cancer treatment in MM patients. According to the log-rank criterion expression of any of the CT genes PRAME, NY-ESO1, GAGE1, MAGE A3, MAGE A6, MAGE A12, SSX1, SLLP1, PASD1 exerts a significant influence on overall survival and progression-free survival/relapse. It was also determined that providing expression of some CT genes, the levels of creatinine, calcium, beta-2-microglobulin were much higher to compare with patients without expression.

Key words: cancer-testis genes, multiple myeloma, overall survival, progression-free survival

For citation: Solodovnik A.A., Mkrtychyan H.S., Misyurin V.A. et al. Expression of cancer-testis genes PRAME, NY-ESO1, GAGE1, MAGE A3, MAGE A6, MAGE A12, SSX1, SLLP1, PASD1 in patients with multiple myeloma, their influence on overall survival and relapse rate. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2018;5(2):62–70.

Введение

Раково-тестикулярные гены (РТГ) представляют собой группу генов, экспрессия которых в норме ограничена здоровыми репродуктивными тканями взрослого человека и эмбриональными тканями. Экспрессия РТГ наблюдается в 40 % случаев различных типов опухолей [1]. Впервые термин «раково-тестикулярные антигены» (РТА) был упомянут в 1997 г. [2]. Однако обнаружены РТА были намного раньше, с 1980 г. и по настоящее время ведется их активное изучение и пополнение списка. Впервые они выделены и описаны при исследовании плоскоклеточной карциномы пищевода [2–5]. РТА можно разделить на 2 группы:

- кодируемые генами, расположенными на хромосоме X (X-РТА) [6];
- кодируемые генами, расположенными на всех других хромосомах, кроме X [5].

В группу X-РТА входит более половины всех известных РТА. Они представляют собой мультигенные семейства, которые часто организованы в кластеры, в отличие от остальных РТА, которые распределены по всему геному и представлены однокопийными генами [5, 7]. Функции многих РТА до сих пор остаются неизвестными, однако полагают, что эти белки принимают участие в регуляции клеточного цикла и процессов апоптоза. Результаты исследований экспрессии РТА также показали, что метилирование ДНК – один из основных механизмов эпигенетической регуляции экспрессии РТА в половых и трансформированных клетках [7]. Отмечается, что в опухолях РТГ обладают особыми свойствами [5], именно поэтому многие из них обнаружены благодаря наличию спонтанного гуморального ответа к этим антигенам у больных со злокачественными новообразованиями [2, 5, 8]. Поскольку экспрессия РТГ ограничивается либо тканями мужской репродуктивной системы и эмбриональными тканями, где уровень экспрессии РТГ у здоровых лиц очень мал, либо опухолевыми клетками, где уровень их экспрессии значительно выше, а также благодаря антигенным свойствам, РТА являются перспективными объектами для использования в иммунотерапии. Кроме того,

некоторые из них считаются маркерами таких злокачественных новообразований, как рак яичников, шейки матки, молочной железы, легкого, мочевого пузыря, пищевода, меланомы, различных гематологических заболеваний и др. [9–17]. На сегодняшний день описано более 150 семейств РТГ, которые включают около 276 генов (<http://www.cta.lncc.br>).

Несмотря на современные химиотерапевтические средства и терапию моноклональными антителами, прогноз для многих пациентов с гематологическими злокачественными новообразованиями, особенно с агрессивными заболеваниями, такими как диффузная В-крупноклеточная лимфома, лимфома мантийной зоны, множественная миелома (ММ), остается неблагоприятным [18–21]. Тем не менее с каждым годом появляется все больше клинических испытаний, которые демонстрируют, что вакцины, содержащие продукты экспрессии РТГ, могут вызывать специфический иммунный ответ у больных лимфомами и ММ [22, 23].

Усовершенствования в лечении ММ привели к значительному увеличению выживаемости пациентов. Однако общая выживаемость (ОВ) редко превышает 4–5 лет [24]. Для молодых пациентов лечение основано на высокодозной химиотерапии с аутологичной трансплантацией стволовых клеток [25]. Минимальная остаточная болезнь является одной из основных проблем, для решения которой специфические терапевтические подходы, например иммунотерапия, могут быть полезны [26]. Помимо иммунотерапевтических преимуществ, РТА могут быть использованы в качестве маркеров для обнаружения злокачественного новообразования на более ранних сроках. В последнее десятилетие ведется активное изучение РТА в онкологии, в том числе при ММ, которая характеризуется выраженной клинической, цитогенетической и молекулярной гетерогенностью.

ММ – злокачественное В-клеточное лимфопролиферативное заболевание с клональной пролиферацией плазматических клеток в костном мозге и за его пределами. Несмотря на то, что полная ремиссия может быть достигнута у 25–50 % впервые

диагностированных больных, которым проводили высокодозную терапию мелфаланом и аутологичную трансплантацию стволовых клеток периферической крови, почти у всех пациентов наблюдаются рецидивы с медианой безрецидивной выживаемости (БРВ) 2–3 года [27]. Как правило, ранний рецидив связан с тем, что в результате проведенной терапии небольшое количество трансформированных плазматических клеток все же остается в кроветворной системе больного [28].

Цель исследования — используя метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени определить уровень экспрессии 9 РТГ (*PRAME*, *NY-ESO1*, *GAGE1*, *MAGE A3*, *MAGE A6*, *MAGE A12*, *SSX1*, *SLLP1*, *PASDI*) и оценить их влияние на показатели ОБ и скорость возникновения рецидивов ММ, а также влияние экспрессии этих РТГ на некоторые клинические биохимические показатели.

Материалы и методы

Характеристика пациентов. Исследованы образцы костного мозга, взятые у 77 больных ММ (42 женщины, 35 мужчин). Все пациенты находились под наблюдением в НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина с 2016 по 2017 г. Медиана возраста составила 53 года. Максимальный срок наблюдения — 16,5 мес. В соответствии с законодательством России биоматериал от каждого пациента был получен при наличии информированного согласия на его использование.

Предварительная подготовка образцов костного мозга. Для удаления эритроцитов костный мозг обрабатывали гемолизирующим раствором (0,8 % NH_4Cl) в соотношении 1:14. Смесь инкубировали 15 мин при температуре +4 °С. Затем смесь центрифугировали 10 мин при 1600 об/мин. Образовавшийся супернатант удаляли, а оставшийся клеточный осадок растворяли в 1 мл гемолизирующего раствора; образовавшуюся смесь центрифугировали 5 мин при 2500 об/мин. Супернатант удаляли, а клеточный осадок использовали для выделения РНК.

Выделение РНК. В подготовленный клеточный материал добавляли 500 мкл лизирующего буфера (4 моль гуанидин тиоционата, 25 ммоль цитрата натрия, 0,5 % N-лаурилсаркозила натрия и 0,1 моль 2-меркаптоэтанола) и перемешивали с помощью одноразового шприца с диаметром инъекционной иглы 1,1 мм (19G). Затем в пробирку добавляли 0,5 мл водонасыщенного фенола (рН 5,2) и 0,125 мл раствора ацетата натрия (рН 4,2), встряхивали и добавляли 0,25 мл хлороформа. Полученную смесь перемешивали и центрифугировали в течение 10 мин при 1200 об/мин. Отбирали надосадочную жидкость и добавляли равный объем изопропанола. Инкубацию РНК проводили в течение 1 ч при температуре –70 °С. После инкубации РНК осаждали центрифугированием в течение 10 мин при 1200 об/мин, удаляли супернатант, оставшийся осадок дважды промывали в 80 % этаноле, высушивали в термостате при

температуре 37 °С и растворяли в деионизированной воде.

Получение комплементарной ДНК. Для синтеза комплементарной ДНК использовали 2 мкг матричной РНК, полученной на предыдущем этапе с применением ревертазы. Реакцию обратной транскрипции проводили с помощью фермента RevertAid Reverse Transcriptase и набора реактивов (Fermentas, США) в условиях, указанных производителем. Для отжига использовали смесь вырожденных гексамерных нуклеотидов (Евроген, Россия). Для отрицательного контроля применяли рабочую смесь без добавления РНК.

Количественная ПЦР в реальном времени. Количественную ПЦР проводили с использованием рабочей смеси (40 ммоль трис-НСl, 100 ммоль КCl, 4 ммоль MgCl_2 , 1 ммоль каждого из 4 дезоксирибонуклеотидов и 0,2 ммоль 2-меркаптоэтанола) и TaqДНК-полимеразы (Fermentas, США). В каждую пробу добавили по 5 мкл комплементарной ДНК, 350 нмоль прямого, 350 нмоль обратного праймера и 140 нмоль флуоресцентного зонда.

Исследование выполняли на приборе LightCycler 96 (Roche, Швейцария).

Программа проведения реакции, для каждого из изучаемых генов, была следующей:

- «горячий старт»: 10 мин при температуре +95 °С;
 - денатурация: 20 с при температуре +95 °С;
 - отжиг праймеров и синтез: 60 с при температуре +60 °С.
- } 50 циклов

Статистический анализ полученных данных. Согласно критерию Колмогорова–Смирнова количественные данные имели нормальное распределение. Вследствие этого для дальнейшего статистического анализа использовали параметрические критерии. Для исследования связи экспрессии РТГ с количественными параметрами (уровень лактатдегидрогеназы, лейкоцитов, гемоглобина, кальция, альбумина, креатинина, бета-2-микроглобулина) применяли *t*-критерий. ОБ и БРВ в зависимости от экспрессии любого из исследуемых РТГ анализировали по методу Каплана–Майера. Для построения кривых ОБ и БРВ продолжительность жизни больных рассчитывали с момента проведения первичного цитогенетического исследования до летального исхода или последней информации о больном. Для сравнения показателей ОБ для больных в клетках костного мозга, в которых обнаружена экспрессия РТГ и без таковой, использовали *log-rank*-тест. Количественные данные представлены в виде медианы значения и граничных значений, охваченных доверительным интервалом 0,95. Различия между группами считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Вычисления выполняли с помощью программного пакета Statistica 10.0.

Результаты

В работе проанализированы влияние экспрессии некоторых РТГ на показатели ОБ и скорость возникновения рецидива у 77 больных ММ. График ОБ представлен на рис. 1. Медиана ОБ не достигнута.

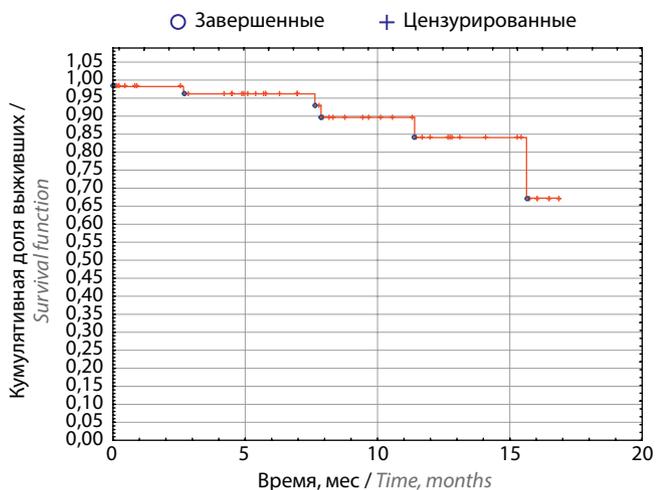


Рис. 1. Общая выживаемость больных множественной миеломой (n = 77)
 Fig. 1. Overall survival of patients with multiple myeloma (n = 77)

При отсутствии экспрессии генов *NY-ESO1* ($p = 0,014$), *MAGE A6* ($p = 0,00048$), *MAGE A12* ($p = 0,04$) и *SSX1* ($p = 0,016$) показатели ОБ у больных ММ увеличиваются. Медиана ОБ у больных с экспрессией гена *NY-ESO1* составила 15,8 мес, а при отсутствии его экспрессии – не достигнута (рис. 2а); с экспрессией гена *MAGE A6* – 8,0 мес, при отсутствии его экспрессии – не достигнута (рис. 2б); с экспрессией гена *MAGE A12* – 8,0 мес, при отсутствии его экспрессии – 15,8 мес; с экспрессией генов *MAGE A12* и *SSX1* – 7,9 мес, при отсутствии их экспрессии – 15,8 мес (рис. 2в, г). Экспрессия генов *PRAME* ($p = 0,93$), *GAGE1* ($p = 0,68$), *SLLP1* ($p = 0,21$) и *PASD1* ($p = 0,24$) не влияет на параметры ОБ у больных ММ.

Рецидивы развиваются в более ранние сроки у пациентов с экспрессией генов *NY-ESO1* ($p = 0,011$), *MAGE A6* ($p = 0,012$), *MAGE A12* ($p = 0,041$), *SSX1* ($p = 0,017$) и *PASD1* ($p = 0,0013$). Медиана БРВ в группах больных ММ с экспрессией генов *NY-ESO1*, *MAGE A6*, *SSX1* и *PASD1* независимо друг от друга составила 7,9 мес и с экспрессией гена *MAGE A12* – 16 мес (рис. 3). Медиана БРВ у больных без экспрессии генов *NY-ESO1* составила 13 мес, *MAGE A6* и *SSX1* – 16 мес. При

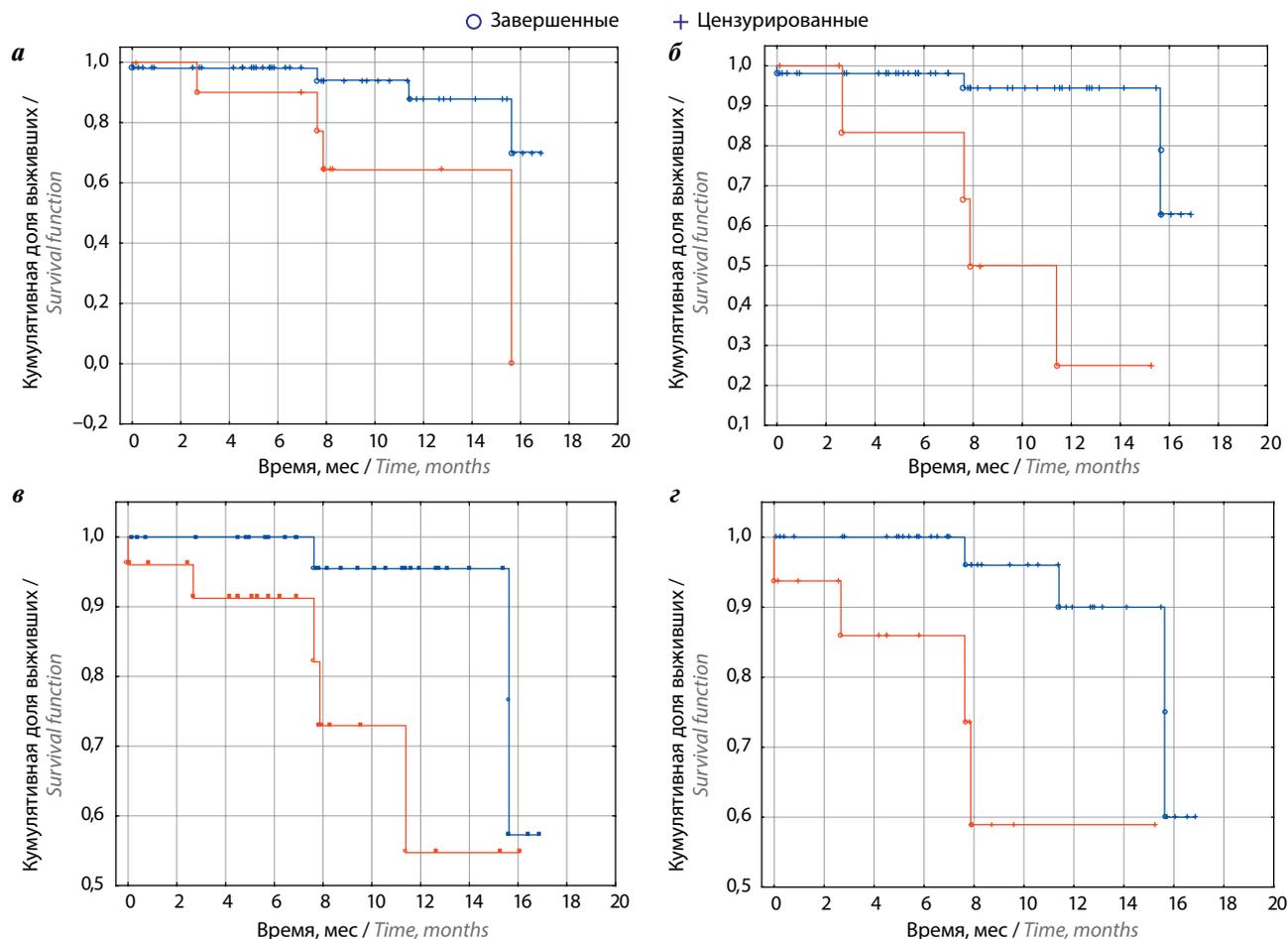


Рис. 2. Графики общей выживаемости у больных множественной миеломой (n = 77) с экспрессией (красные линии) и без нее (синие линии) следующих генов: а – *NY-ESO1* ($p = 0,014$); б – *MAGE A6* ($p = 0,0048$); в – *MAGE A12* ($p = 0,04$); г – *SSX1* ($p = 0,016$)
 Fig. 2. Overall survival plots for patients with multiple myeloma (n = 77) and with (red lines) and without (blue lines) expression of the following genes: а – *NY-ESO1* ($p = 0.014$); б – *MAGE A6* ($p = 0.0048$); в – *MAGE A12* ($p = 0.04$); г – *SSX1* ($p = 0.016$)

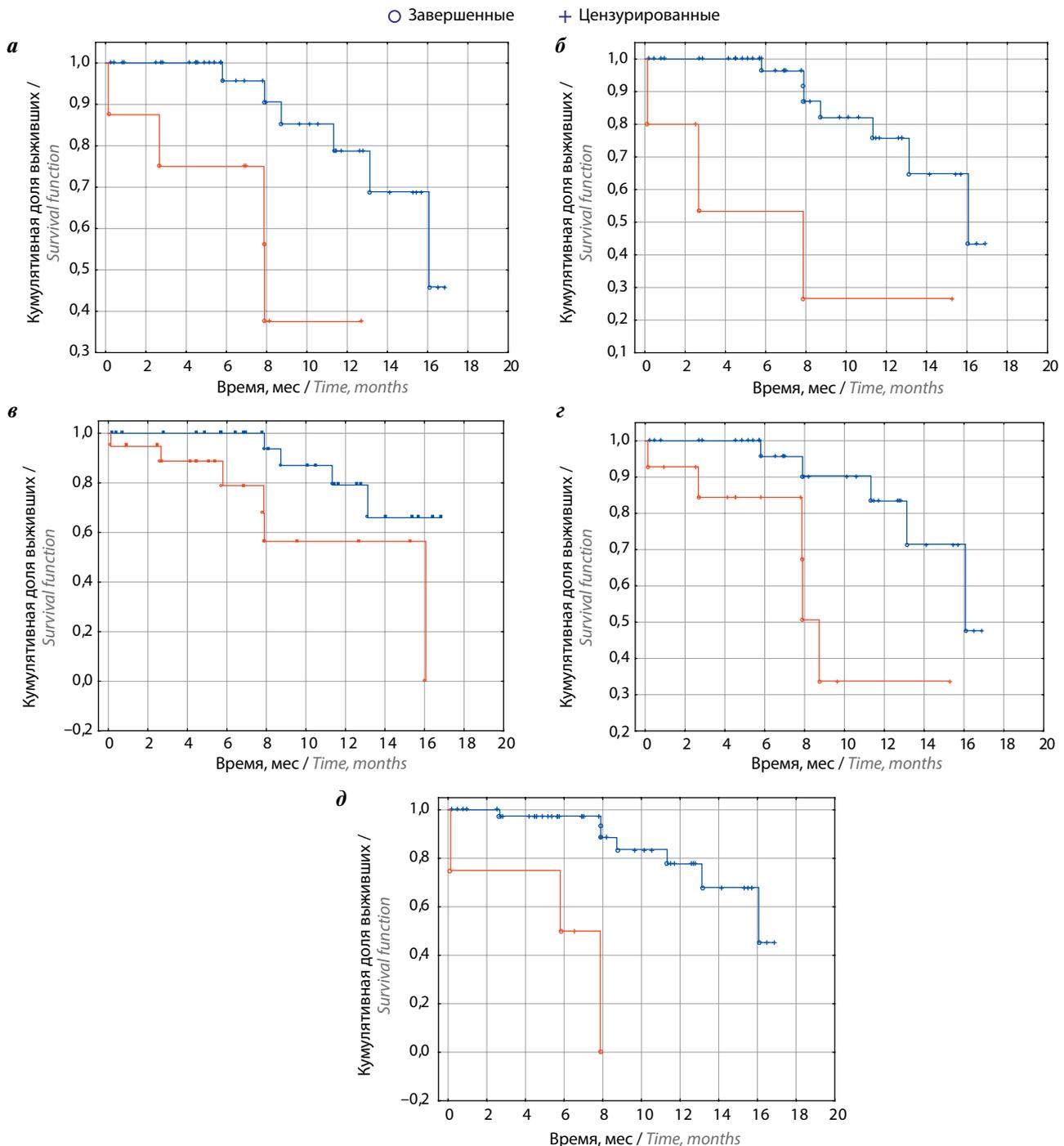


Рис. 3. Графики выживаемости без прогрессирования у больных множественной миеломой ($n = 77$) с экспрессией (красные линии) и без нее (синие линии) следующих генов: а – NY-ESO1 ($p = 0,011$); б – MAGE A6 ($p = 0,012$); в – MAGE A12 ($p = 0,041$); г – SSX1 ($p = 0,0017$); д – PASD1 ($p = 0,0013$)
Fig. 3. Progression-free survival plots for patients with multiple myeloma ($n = 77$) and with (red lines) and without (blue lines) expression of the following genes: а – NY-ESO1 ($p = 0.011$); б – MAGE A6 ($p = 0.012$); в – MAGE A12 ($p = 0.041$); г – SSX1 ($p = 0.0017$); д – PASD1 ($p = 0.0013$)

расчете БРВ у больных без экспрессии генов *MAGE A12* и *PASD1* медиана не достигнута.

Следующим этапом нашей работы стала оценка влияния экспрессии РТГ на клинические показатели (уровни лактатдегидрогеназы, лейкоцитов, гемоглобина, кальция, альбумина, креатинина и бета-2-микроглобулина) у больных ММ. Некоторые клинические показатели продемонстрировали зави-

симость от экспрессии РТГ. Так, повышенный уровень креатинина наблюдается у пациентов с экспрессией генов *MAGE A3*, *MAGE A6*, *MAGE A12* и *SSX1*, повышенный уровень кальция – с экспрессией *MAGE A3* и *MAGE A12* (табл. 1). Показатели бета-2-микроглобулина практически в 2 раза выше у пациентов с экспрессией гена *MAGE A12*. Для других исследованных клинических параметров значимой зависимости

Таблица 1. Некоторые клинические показатели в зависимости от экспрессии раково-тестикулярных генов

Table 1. Selected clinical characteristics depending on the expression of cancer-testis genes

| Экспрессия генов Gene expression | Кальций Calcium | <i>p</i> | Креатинин Creatinine | <i>p</i> | Бета-2-микроглобулин Beta-2-microglobulin | <i>p</i> |
|-------------------------------------|--------------------|----------|-------------------------|----------|--|----------|
| <i>MAGE A3</i> – | 2,33 (1,82–2,51) | 0,0329 | 70,0 (12,52–134,0) | 0,0076 | 3,03 (1,37–7,38) | 0,1133 |
| <i>MAGE A3</i> + | 2,53 (2,23–3,55) | | 108,5 (50–232) | | 4,39 (2,12–10,5) | |
| <i>MAGE A6</i> – | 2,35 (1,8–2,9) | 0,1608 | 73,5 (2,3–134,0) | 0,0304 | 3,38 (1,37–7,38) | 0,1789 |
| <i>MAGE A6</i> + | 2,53 (2,25–3,54) | | 116 (50–284) | | 8,97 (2,49–13,50) | |
| <i>MAGE A12</i> – | 2,31 (1,82–2,51) | 0,0235 | 71,0 (12,52–131,0) | 0,0461 | 2,50 (1,37–6,75) | 0,0261 |
| <i>MAGE A12</i> + | 2,48 (1,80–3,55) | | 89,5 (2,39–199,0) | | 4,39 (1,60–15,71) | |
| <i>SSX1</i> – | 2,36 (2,05–2,63) | 0,3438 | 71,0 (2,3–134,0) | 0,0192 | 3,20 (1,37–7,38) | 0,2339 |
| <i>SSX1</i> + | 2,49 (2,09–3,55) | | 88,5 (49,0–232,0) | | 3,58 (1,86–20,27) | |

Таблица 2. Число больных с экспрессией раково-тестикулярных генов (*n* = 77), *n* (%)Table 2. The number of patients with expression of cancer-testis genes (*n* = 77), *n* (%)

| Ген Gene | Первичные больные Primary patients | Больные, ранее получавшие терапию Patients who previously received therapy | Больные с прогрессированием/ рецидивом Patients with progression/ recurrence | Неустановленная группа больных Unspecified patient group |
|-----------------|--|--|---|--|
| <i>PRAME</i> | 33 (43) | 10 (13) | 5 (6,5) | 5 (6,5) |
| <i>NY-ESO</i> | 7 (9) | 4 (5) | 4 (5) | – |
| <i>GAGE</i> | 29 (38) | 10 (13) | 5 (6,5) | – |
| <i>MAGE A3</i> | 12 (16) | 2 (3) | 3 (4) | – |
| <i>MAGE A6</i> | 6 (8) | 1 (1) | 3 (4) | – |
| <i>MAGE A12</i> | 22 (29) | 3 (4) | 4 (5) | 3 (4) |
| <i>SSX1</i> | 10 (13) | 1 (1) | 5 (6,5) | 1 (1) |
| <i>SLLP1</i> | 36 (47) | 13 (17) | 3 (4) | 4 (5) |
| <i>PASD1</i> | 1 (1) | 1 (1) | 2 (3) | 1 (1) |

от экспрессии РТА не обнаружено ($p > 0,05$) (данные не представлены).

Показано, что у больных ММ в той или иной степени экспрессировались все исследуемые гены (табл. 2). Полученные результаты позволили показать важное прогностическое значение таких РТГ, как *NY-ESO1*, *MAGE A6*, *MAGE A12*, *SSX1* и *PASD1*. Так, у больных ММ с экспрессией этих генов наблюдается развитие рецидива в более ранние сроки.

Обсуждение

Проведенное исследование посвящено изучению экспрессии РТГ у больных ММ, их влияния на клинические показатели, ОБ и БРВ.

Ранее продемонстрировано, что экспрессия генов семейства *MAGE*, *NY-ESO1*, *SSX1*, *PASD1* прямо коррелирует с более поздней стадией болезни, неблаго-

приятным прогнозом, более короткими сроками БРВ [29, 30]. Результаты, полученные нами, подтверждают эти данные. Так, медиана ОБ у больных ММ с экспрессией генов *NY-ESO1* ($p = 0,014$), *MAGE A6* ($p = 0,0004$), *MAGE A12* ($p = 0,04$) и *SSX1* ($p = 0,016$) значительно ниже, чем у пациентов, в клетках костного мозга которых отсутствует экспрессия этих генов. БРВ у больных ММ с экспрессией генов *NY-ESO1* ($p = 0,011$), *MAGE A6* ($p = 0,012$), *MAGE A12* ($p = 0,041$), *SSX1* ($p = 0,017$) и *PASD1* ($p = 0,0013$) значительно ниже, чем у пациентов, в образцах которых экспрессия отсутствовала. Однако в нашем исследовании зависимости между экспрессией РТГ и стадией болезни не обнаружено. Была определена зависимость экспрессии РТГ и того, к какой группе относится больной (первичный – 42/77, плановый – 22/77, прогрессирующий/рецидивирующий – 7/77). Анализ показал, что при прогрессировании/

рецидиве заболевания наблюдается повышенный уровень экспрессии генов *PRAME*, *MAGE A3*, *MAGE A12*, *SSX1* и *PASDI*. Важно отметить, что у больных, поступивших на последующий курс терапии, и первичных пациентов уровень экспрессии генов *MAGE A3*, *MAGE A12*, *SSX1* и *PASDI* равен или близок к нулю, в отличие от гена *PRAME*, экспрессия которого у первичных больных выше, чем у пациентов, получавших терапию ранее.

Для того чтобы оценить возможные прогностические факторы, мы провели анализ зависимости некоторых лабораторных показателей крови, которые были взяты из историй болезни пациентов с ММ (уровни лактатдегидрогеназы, гемоглобина, кальция, альбумина, креатинина, бета-2-микроглобулина). Установлено, что уровень кальция значительно выше у больных ММ с экспрессией генов *MAGE A3* ($p = 0,0329$) и *MAGE A12* ($p = 0,0235$), чем у пациентов без их экспрессии. При экспрессии генов *MAGE A3* ($p = 0,0076$), *MAGE A6* ($p = 0,0304$), *MAGE A12* ($p = 0,0461$), *SSX1* ($p = 0,0192$) показатели креатинина были как минимум в 2 раза выше, чем без экспрессии этих генов. Экспрессия гена *MAGE A12* ($p = 0,0261$) совпала с повышенным уровнем бета-2-микроглобулина. Известно, что одним из неблагоприятных факторов при ММ является высокий уровень бета-2-микроглобулина, а высокий уровень кальция указывает на более агрессивную фазу заболевания. Таким образом, можно предположить, что

действительно экспрессия генов *MAGE A3*, *MAGE A6*, *MAGE A12* и *SSX1* связана с неблагоприятным течением болезни. Также важно отметить, что экспрессия гена *MAGE A12* наблюдалась у больных, имеющих повышенное содержание кальция, креатинина и бета-2-микроглобулина в крови. Возможно, по этой причине экспрессия гена *MAGE A12* является основным маркером более развитого опухолевого процесса, агрессивного течения болезни.

Заключение

В нашей работе определены уровни экспрессии РТГ *PRAME*, *NY-ESO1*, *GAGE1*, *MAGE A3*, *MAGE A6*, *MAGE A12*, *SSX1*, *SLLP1*, *PASDI*, их влияние на ОБ и скорость возникновения рецидива, влияние на некоторые биохимические показатели у больных ММ. Полученные результаты позволили обнаружить, что у больных ММ с экспрессией таких РТГ, как *NY-ESO1*, *MAGE A6*, *MAGE A12*, *SSX1* и *PASDI*, наблюдается развитие рецидива в более ранние сроки. Показано, что медиана ОБ больных с экспрессией *NY-ESO1*, *MAGE A6*, *MAGE A12* и *SSX1* значительно ниже, чем у пациентов, в клетках которых экспрессия этих генов отсутствует. Таким образом, экспрессия исследуемых РТГ имеет важное прогностическое значение для больных ММ и может быть использована, как тест-система для раннего выявления прогрессирования заболевания.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Scanlan M.J., Simpson A.J., Old L.J. The cancer/testis genes: review, standardization, and commentary. *Cancer Immunol* 2004;4:1. PMID: 14738373.
- Chen Y.T., Scanlan M.J., Sahin U. et al. A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94(5):1914–8. PMID: 9050879.
- Scanlan M.J., Gure A.O., Jungbluth A.A. et al. Cancer/testis antigens: an expanding family of targets for cancer immunotherapy. *Immunol Rev* 2002;188:22–32. PMID: 12445278.
- Simpson A.J., 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. PMID: 16034368.
- Mirandola L., Cannon M.J., Cobos E. et al. Cancer testis antigens: novel biomarkers and targetable proteins for ovarian cancer. *Int Rev Immunol* 2011;30(2–3):127–37. DOI: 10.3109/08830185.2011.572504. PMID: 21557639.
- Мисюрин В.А. X-хромосомные раково-тестикулярные гены. Российский биотерапевтический журнал 2014;13(2):3–9. [Misyurin V.A. X-chromosomal cancer-testis genes. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Biotherapeutic Journal* 2014;13(2):3–9. (In Russ.)].
- Fratta E., Coral S., Covre A. et al. The biology of cancer testis antigens: putative function, regulation and therapeutic potential. *Mol Oncol* 2011;5(2):164–82. DOI: 10.1016/j.molonc.2011.02.001. PMID: 21376678.
- Song M.H., Ha J.C., Lee S.M. et al. Identification of BCP-20 (FBXO39) as a cancer/testis antigen from colon cancer patients by SEREX. *Biochem Biophys Res Commun* 2011;408(2):195–201. DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.02.077. PMID: 21338577.
- Chen Y.T., Ross D.S., Chiu R. et al. Multiple cancer/testis antigens are preferentially expressed in hormone-receptor negative and high-grade breast cancers. *PLoS One* 2011;6(3):17876. DOI: 10.1371/journal.pone.0017876. PMID: 21437249.
- Boss D.S., Glen H., Beijnen J.H. et al. Serum β -HCG and CA-125 as tumor markers in a patient with osteosarcoma: case report. *Tumori* 2011;97(12):109–14. PMID: 21528673.
- Silina K., Zayakin P., Kalnina Z. et al. Sperm-associated antigens as targets for cancer immunotherapy: expression pattern and humoral immune response in cancer patients. *J Immunother* 2011;34(1):28–44. DOI: 10.1097/CJI.0b013e3181fb64fa. PMID: 21150711.
- Maruyama M., Yoshitake H.T.H., Takamori K., Araki Y. Molecular expression of Ly6k, a putative glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane protein on the mouse testicular germ cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;402(1):75–81. DOI: 10.1016/j.bbrc.2010.09.117. PMID: 20920470.
- Matsuda R., Enokida H., Chiyomaru T. et al. LY6K is a novel molecular target in bladder cancer on basis of integrate genome-wide profiling. *Br J Cancer* 2011;104(2):376–86. DOI: 10.1038/sj.bjc.6605990. PMID: 21063397.
- Li F.Q., Liu Q., Han Y.L. et al. Sperm protein 17 is highly expressed in endometrial and cervical cancers. *BMC Cancer* 2010;10:429.

- DOI: 10.1186/1471-2407-10-429.
PMID: 20712874.
15. Demento S.L., Siefert A.L., Bandyopadhyay A. et al. Pathogen-associated molecular patterns on biomaterials: a paradigm for engineering new vaccines. *Trends Biotechnol* 2011;29(6):294–306. DOI: 10.1016/j.tibtech.2011.02.004. PMID: 21459467.
 16. Forghanifard M.M., Gholamin M., Farshchian M. et al. Cancer-testis gene expression profiling in esophageal squamous cell carcinoma: identification of specific tumor marker and potential targets for immunotherapy. *Cancer Biol Ther* 2011;12(3):191–7. PMID: 21613820.
 17. Gaugler B., van den Eynde B., van der Bruggen P. et al. Human gene MAGE-3 codes for an antigen recognized on a melanoma by autologous cytolytic T lymphocytes. *J Exp Med* 1994;179(3):921–30. PMID: 8113684.
 18. Ng A.K. Diffuse large B-cell lymphoma. *Semin Radiat Oncol* 2007;17(3):169–75. DOI: 10.1016/j.semradonc.2007.02.002. PMID: 17591563.
 19. Weigert O., Unterhalt M., Hiddemann W., Dreyling M. Current management of mantle cell lymphoma. *Drugs* 2007;67(12):1689–702. PMID: 17683170.
 20. Richardson P.G., Mitsiades C., Schlossman R. et al. New drugs for myeloma. *Oncologist* 2007;12(6):664–89. DOI: 10.1634/theoncologist.12-6-664. PMID: 17602058.
 21. Harris N.L., Jaffe E.S., Diebold J. et al. The World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues. Report of the Clinical Advisory Committee meeting, Airlie House, Virginia, November, 1997. *Ann Oncol* 1999;10(12):1419–32. PMID: 10643532.
 22. Veelken H., Osterroth F. Vaccination strategies in the treatment of lymphomas. *Oncology* 2002;62(3):187–200. DOI: 10.1159/000059565. PMID: 12065865.
 23. Bogen B., Ruffini P.A., Corthay A. et al. Idiotype-specific immunotherapy in multiple myeloma: suggestions for future directions of research. *Haematologica* 2006;91(7):941–8. PMID: 16818282.
 24. Richardson P.G., Sonneveld P., Schuster M. et al. Extended follow-up of a phase 3 trial in relapsed multiple myeloma: final time-to-event results of the APEX trial. *Blood* 2007;110(10):3557–60. DOI: 10.1182/blood-2006-08-036947. PMID: 17690257.
 25. Engelhardt M., Udi J., Kleber M. et al. European myeloma network: the 3rd Trialist forum consensus statement from the European experts meeting on multiple myeloma. *Leuk Lymphoma* 2010;51(11):2006–11. DOI: 10.3109/10428194.2010.516378. PMID: 20807087.
 26. Kono K., Mizukami Y., Daigo Y. et al. Vaccination with multiple peptides derived from novel cancer-testis antigens can induce specific T cell responses and clinical responses in advanced esophageal cancer. *Cancer Sci* 2009;100(8):1502–9.
 27. Barlogie B., Shaughnessy J., Tricot G. et al. Treatment of multiple myeloma. *Blood* 2004;103(1):20–32. DOI: 10.1182/blood-2003-04-1045. PMID: 12969978.
 28. Bakkus M.H., Bouko Y., Samson D. et al. Post-transplantation tumour load in bone marrow, as assessed by quantitative ASO-PCR, is a prognostic parameter in multiple myeloma. *Br J Haematol* 2004;126(5):665–74. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2004.05120.x. PMID: 15327517.
 29. van Rhee F., Szmania S.M., Zhan F. et al. NY-ESO-1 is highly expressed in poor-prognosis multiple myeloma and induces spontaneous humoral and cellular immune responses. *Blood* 2005;105(10):3939–44. DOI: 10.1182/blood-2004-09-3707. PMID: 15671442.
 30. van Duin M., Broy 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. PMID: 21791470.

Благодарность. Авторы выражают благодарность сотрудникам ООО «ГеноТехнология» за оказанную помощь при выполнении данной работы.

Acknowledgment. Authors express thanks to GeneTechnology for the assistance in performing this study.

Вклад авторов

А.А. Солодовник, А.С. Мкртчян, А.В. Мисюрин: концепция и дизайн исследования, сбор и обработка данных, предоставление материалов исследования, анализ и интерпретация данных, подготовка рукописи, утверждение рукописи;
В.А. Мисюрин: концепция и дизайн исследования, сбор и обработка данных, предоставление материалов исследования, анализ и интерпретация данных, утверждение рукописи;

В.В. Тихонова, Ю.П. Финашутина, Н.Н. Касаткина, О.Н. Солопова: сбор и обработка данных, предоставление материалов исследования, анализ и интерпретация данных, утверждение рукописи;

О.М. Вотякова, О.Ю. Якимович, О.М. Володина, М.Ю. Кичигина, Е.Г. Медведовская, А.С. Антипова, И.З. Заводнова, А.А. Семенова, Г.Р. Аракелян, Ю.Е. Рябухина, О.А. Коломейцев: предоставление материалов исследования, утверждение рукописи;

А.Д. Ширин: сбор и обработка данных, предоставление материалов исследования, подготовка рукописи, утверждение рукописи;

Е.А. Османов: концепция и дизайн исследования, предоставление материалов исследования, подготовка рукописи, утверждение рукописи.

Authors' contributions

A.A. Solodovnik, H.S. Mkrtychyan, A.V. Misyurin: study concept and design, data accumulation and processing, provision of study materials data analysis and interpretation, article preparation, article approval;

V.A. Misyurin: study concept and design, сбор и обработка данных, предоставление материалов исследования, анализ и интерпретация данных, утверждение рукописи;

V.V. Tikhonova, Yu.P. Finashutina, N.N. Kasatkina, O.N. Solopova: data accumulation and processing, provision of study materials, data analysis and interpretation, article approval;

О.М. Votyakova, O.Yu. Yakimovich, O.M. Volodina, M.Yu. Kichigina, E.G. Medvedovskaya, A.S. Antipova, I.Z. Zavodnova, A.A. Semenova, G.R. Arakelyan, Yu.E. Ryabukhina, O.A. Kolomeytsev: provision of study materials, article approval; A.D. Shirin: data accumulation and processing, provision of study materials, article preparation, article approval; E.A. Osmanov: study concept and design, provision of study materials, article preparation, article approval.

ORCID авторов

A.A. Солодовник: <https://orcid.org/0000-0001-8399-057X>
A.C. Мкртчян: <https://orcid.org/0000-0002-0638-213X>
B.A. Мисюрин: <http://orcid.org/0000-0002-0762-5631>
B.V. Тихонова: <https://orcid.org/0000-0002-8658-2819>
Ю.П. Финашутина: <https://orcid.org/0000-0002-6154-535X>
Н.Н. Касаткина: <http://orcid.org/0000-0002-4735-977X>
О.Ю. Якимович: <https://orcid.org/0000-0002-4309-2473>
Е.Г. Медведовская: <https://orcid.org/0000-0001-9615-6090>
A.C. Антипова: <http://orcid.org/0000-0002-1731-8336>
И.З. Заводнова: <http://orcid.org/0000-0001-6674-8634>
O.A. Колomeйтsev: <https://orcid.org/0000-0003-3430-8540>
A.D. Ширин: <https://orcid.org/0000-0003-3244-7774>
E.A. Османов: <https://orcid.org/0000-0002-3067-1601>
A.V. Мисюрин: <http://orcid.org/0000-0003-1349-2879>

ORCID of authors

A.A. Solodovnik: <https://orcid.org/0000-0001-8399-057X>
H.S. Mkrтчyan: <https://orcid.org/0000-0002-0638-213X>
V.A. Misyurin: <http://orcid.org/0000-0002-0762-5631>
V.V. Tikhonova: <https://orcid.org/0000-0002-8658-2819>
Yu.P. Finashutina: <https://orcid.org/0000-0002-6154-535X>
N.N. Kasatkina: <http://orcid.org/0000-0002-4735-977X>
O.Yu. Yakimovich: <https://orcid.org/0000-0002-4309-2473>
E.G. Medvedovskaya: <https://orcid.org/0000-0001-9615-6090>
A.S. Antipova: <http://orcid.org/0000-0002-1731-8336>
I.Z. Zavodnova: <http://orcid.org/0000-0001-6674-8634>
O.A. Kolomeytsev: <https://orcid.org/0000-0003-3430-8540>
A.D. Shirin: <https://orcid.org/0000-0003-3244-7774>
E.A. Osmanov: <https://orcid.org/0000-0002-3067-1601>
A.V. Misyurin: <http://orcid.org/0000-0003-1349-2879>

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.

Информированное согласие. Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

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

Статья поступила: 18.04.2018. **Принята к публикации:** 25.05.2018

Article received: 18.04.2018. **Accepted for publication:** 25.05.2018