

АЛКИЛГУАНИН АЛКИЛТРАНСФЕРАЗА КАК ФАКТОР ПРЕДСКАЗАНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ РЕЖИМА ДАКАРБАЗИН+ЦИСПЛАТИН+НИДРАН У БОЛЬНЫХ МЕТАСТАТИЧЕСКОЙ МЕЛАНОМОЙ КОЖИ

Е.В. Степанова, М.Е. Абрамов, А.Ю. Барышников, М.Р. Личиницер

Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН, г. Москва

Ключевые слова: метастатическая меланома кожи, химиотерапия, АГТ, предсказывающие факторы

Цель работы. Целью работы было изучить значение экспрессии АГТ в опухолевых клетках для предсказания эффективности режима с включением дакарбазина, цисплатина и нидрана для лечения метастатической меланомы кожи.

Материалы и методы. В ретроспективное исследование включены 26 больных метастатической меланомой кожи. Было проведено исследование экспрессии АГТ иммуногистохимическим методом в парафиновых блоках опухоли (первичный очаг или доступный метастаз).

Результаты. Экспрессия АГТ в опухоли ассоциировалась с низким эффектом режима дакарбазин+цисплатин+нидран. Прогрессирование наблюдалось у 85,7% больных с АГТ-положительными опухолями и 29,4% — с АГТ-отрицательными ($p=0,023$). Различия в выживаемости без прогрессирования больных не достигали достоверности.

Заключение. Экспрессия АГТ может рассматриваться как перспективный маркер для предсказания эффективности режима дакарбазин+цисплатин+нидран у больных метастатической меланомой кожи.

Введение

Меланома кожи характеризуется быстрым ростом, ранним метастазированием и недостаточной эффективностью современных методов лечения. До настоящего времени метастатическая меланома кожи по-прежнему считается практически инкурабельным заболеванием. Средняя продолжительность жизни больных метастатической меланомой колеблется от 6 до 9 мес при 5-летней выживаемости менее 5% [1]. Лишь у небольшого числа больных с помощью лекарственных методов удается добиться стойких ремиссий [2]. Причем 5-летняя выживаемость больных, леченных с эффектом, может достигать 33–47%.

Алкилирующие агенты и дакарбазин остаются «золотым стандартом» лекарственного лечения метастатической меланомы. Эффективность дакарбазина колеблется в пределах 20%, с частотой полных ремиссий только 2–5%, при средней дли-

тельности ответа 5–6 мес [3]. Объективный эффект достигается при мягкотканых метастазах и редко в случаях развития метастазов в висцеральные органы. С целью увеличения эффективности химиотерапии развиваются режимы с включением нескольких препаратов. Среди химиотерапевтических режимов, включающих 2 лекарственных компонента, наиболее эффективные комбинации на основе дакарбазина и цисплатина.

Выбор эффективного режима уже в первой линии химиотерапии позволяет в значительной мере улучшить прогноз течения заболевания, однако, используя доступные врачу методы современной диагностики, на сегодняшний день невозможно предсказать эффективность терапии. Одним из подходов к дальнейшему совершенствованию лечения метастатической меланомы является поиск молекулярных маркеров, предсказывающих эффективность химиотерапии.

Терапевтический эффект алкилирующих агентов, таких как нитрозоамины и нитрозомочевины, связан с образованием производных O⁶-алкилгуанина [4]. Эти производные связываются с тиминном вместо цитозина во время репликации ДНК, блокируя пролиферацию клеток и вызывая их гибель.

Адрес для корреспонденции

Степанова Евгения Владиславовна
E-mail: e_stepanova@nm.ru

Эффективность цитотоксического действия препаратов определяется действием системы репарации последовательностей O⁶-метилгуанин: Тимин. Белок O⁶-алкилгуанин-ДНК алкилтрансфераза (АГТ или МГМТ) отвечает за репарацию повреждений, вызванных O⁶-алкилгуанином [5]. Этот фермент осуществляет перенос алкильной группы с O⁶ атома гуанина ДНК на свой остаток цистеина [6]. При этом ДНК возвращается к своему нормальному немодифицированному состоянию, одновременно происходит инактивация АГТ. Показано, что присутствие высокого количества АГТ в опухолевых клетках обратно коррелирует с чувствительностью к алкилирующим агентам [7–9]. Эффективность лечения АГТ отрицательных опухолей режимами с включением нитрозопроизводных и алкилирующих агентов примерно в два раза выше, чем АГТ отрицательных больных [8, 9].

Нами было проведено изучение предсказывающего значения АГТ для эффективности режима с включением дакарбазина, цисплатина и нидрана для лечения метастатической меланомы кожи.

Материалы и методы

В ретроспективное исследование включены 26 больных с морфологически доказанным диагнозом метастатической меланомы кожи, проходивших лечение в Российском онкологическом научном центре с 1992 по 2003 г. Средний возраст больных составил 49 лет (31–68 лет). Все больные имели измеряемые проявления болезни. Общее состояние больных по критериям ВОЗ было 0–2. Критерием включения в исследование было наличие гистологического материала первичной опухоли или операбельных метастазов. Клиническая характеристика больных приведена в табл. 1.

В качестве 1-й линии лекарственной терапии использовалась комбинация дакарбазина, нидрана и цисплатина. Нидран 1 мг/кг вводили внутривенно струйно в день 1-й, через 3 ч после дакарбазина. Дакарбазин 250 мг/м² вводили внутривенно струйно в дни 1-, 2-, 3-й. Цисплатин вводили через 1 ч после дакарбазина. Цисплатин 80 мг/м² вводили внутривенно в 400 мл физиологического раствора хлорида натрия 1-часовой инфузией (с предварительной гидратацией в течение 3 ч путем инфузии 2,4 л физиологического раствора хлорида натрия и последующим, после цисплатина, введением 400 мл этого раствора). В первый и второй дни за 30 мин до введения дакарбазина вводился дексаметазон 8 мг внутривенно, затем зофран 8 мг. В 3-й день за 30 мин до дакарбазина применялся зофран 24 мг (или навобан 5 мг, китрил 3 мг) в сочетании с дексаметазоном 8 мг внутривенно. Интервал между курсами составлял 4 нед. Коррекция доз лекарств и интервалов между курсами проводилась в соответствии с разрабо-

Таблица 1. Характеристика 26 больных метастатической меланомой, включенных в исследование

Параметр	Количество случаев	
	n	%
Средний возраст больных	49,4	
Локализация первичного очага		
Конечности	13	50,0
Туловище	12	46,2
Первичный очаг не определен	1	3,8
Эффективность лечения		
Частичная ремиссия (ЧР)	11	42,3
Стабилизация (СТ)	2	7,7
Прогрессирование (ПРГ)	11	42,3
Смешанная	2	7,7
Локализация исследованного опухолевого образца		
Первичный очаг	5	19,2
Метастаз в лимфоузел	10	38,5
Метастаз в мягкие ткани	11	42,3
Химиотерапия до взятия образца		
Отсутствует	17	65,4
До 4 курсов химиотерапии	9	34,6

танными рекомендациями. При нейтропении IV степени и/или тромбоцитопении IV степени дозы всех лекарств снижались на 25%, при этом увеличивали интервал до следующего курса на 2 нед, и он составлял 6 нед.

Лечение прекращали при прогрессировании болезни.

Иммуногистохимическое исследование

Всем больным было проведено исследование АГТ в опухолевом материале (первичный очаг или метастаз) (см. табл. 1). Анализ экспрессии АГТ проводился на срезах с парафиновых блоков опухолевого материала иммунопероксидазным стрептавидин-биотиновым методом по стандартной методике.

В качестве первичных антител использовали моноклональные антитела к АГТ (клон МТ3.1, разведение 1:50, Chemicon). Для выявления антигенных детерминант проводили обработку срезов в 10 мМ цитратном буфере (рН 6,0) в течение 30 мин при 95–99 °С. Инкубацию с первичным антителом проводили в течение ночи при 4 °С. Для визуализации реакции антиген-антитело использовали тест-систему LSAB+kit [DAKO Corp]. Хромогеном служил АЕС+ [DAKO Corp]. Срезы докрашивали гематоксилином Караччи и заключали в желатин-глицерин.

Оценивали как интенсивность окрашивания, так и количество положительных клеток. Опухоль считали положительной по АГТ, если было окрашено более 20% опухолевых клеток.

Статистический анализ

Статистический анализ проводили с использованием программы «SPSS» (v 9.0. for Windows). Для проверки достоверности различий значений признаков в группах использовали тесты «хи-квадрат» (χ^2) и точный критерий Фишера. Различия считались статистически достоверными при $p < 0,05$ (95% точности). Кривые безрецидивной выживаемости строили с использованием метода Каплана-Майера. Сравнение выживаемости различных групп проводили с помощью однофакторного логранкового метода.

Результаты и обсуждение

Эффективность режима дакарбазин+цисплатин+нидран

Общая эффективность лечения составила 50%: 11 частичных ремиссий и 2 стабилизации процесса более 1 года (12 мес и 34+ мес). Прогрессирование обнаружено у 11 (42,3%) больных. Двое (7,7%) больных имели смешанный эффект в различных метастатических очагах. Прогрессирование болезни обнаруживалось спустя $1,27 \pm 0,14$ мес (медиана 1 мес) после начала лечения, а среднее время продолжения частичной ремиссии — $23,0 \pm 7,78$ (медиана 12 мес).

Экспрессия АГТ в опухоли и эффективность режима дакарбазин+цисплатин+нидран

Экспрессия АГТ в опухоли обнаружена в 8 (30,8%) случаях метастатической меланомы кожи. Частота экспрессии АГТ не коррелировала с локализацией первичного очага — туловище (33,3%) или конечности (30,8%), и с локализацией изученного опухолевого образца — первичный очаг (60,0%), метастазы в лимфоузлы (30,0%) или мягкие ткани (18,2%) ($p = 0,625$).

Из анализа предсказывающего эффекта были исключены 2 больных, у которых имелась смешанная эффективность лечения. Экспрессия АГТ в опухолевых клетках была неблагоприятным фактором для эффективности лечения (табл. 2). 85,7%

Таблица 2. Экспрессия АГТ и эффективность режима дакарбазин+цисплатин+нидран

Статус опухоли (n)	Эффективность лечения, n (%)		Достоверность, p*
	ЧР+СТ (более 1 года)	Прогрессирование	
АГТ отрицательная (17)	12 (70,6)	5 (29,4)	0,023
АГТ положительная (7)	1 (14,3)	6 (85,7)	

* достоверность различий рассчитывалась с использованием точного критерия Фишера.

АГТ-положительных больных имели прогрессирование болезни, тогда как АГТ-отрицательные больные в 70,6% случаев были лечены с эффектом (частичная ремиссия или стабилизация более 1 года) ($p = 0,023$). Из 6 больных, имевших частичную ремиссию или стабилизацию более 1 года, 5 больных были АГТ-отрицательными. Экспрессия АГТ имела тенденцию быть связанной с более коротким временем до прогрессирования ($p = 0,18$). Медиана времени до прогрессирования составила 6 мес (95% CI 1,2–10,7 мес) для АГТ-отрицательных больных и 2 мес (95% CI 1,2–2,7 мес) для АГТ-положительных больных (рисунок).

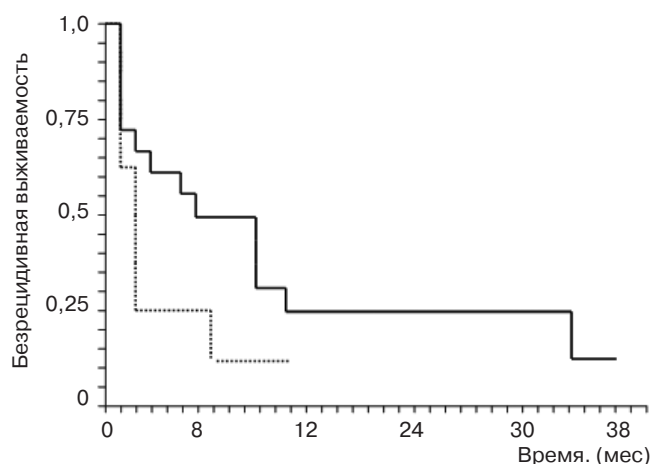


Рисунок. Зависимость времени до прогрессирования больных, получавших лечение режимом дакарбазин+цисплатин+нидран, от экспрессии АГТ в опухолевой ткани. АГТ-отрицательные больные — сплошная линия, АГТ-положительные больные — прерывистая линия

Таким образом, в настоящем исследовании мы провели первичное изучение возможного значения анализа экспрессии АГТ в опухолевой ткани иммуногистохимическим методом как предсказывающего маркера эффективности лечения больных метастатической меланомой режимом дакарбазин+цисплатин+нидран. Экспрессия АГТ в опухоли ассоциировалась с низким эффектом режима дакарбазин+цисплатин+нидран. Прогрессирование наблюдалось у 85,7% АГТ-положительных больных и 29,4% АГТ-отрицательных больных. Однако различия в выживаемости без прогрессирования больных не достигают достоверности. Из-за небольшого количества включенных в исследование больных прогностическая ценность, чувствительность и специфичность метода оценены не были.

Для определения активности/экспрессии АГТ в ткани используется множество методов. Это и непосредственное определение активности АГТ в ткани по уровню O⁶-метилгуанина [7], и определение экспрессии белка биохимическим методом в цитозоле опухолевых клеток, иммуногистохимическим методом на срезах с парафиновых блоков опухолей

[7, 8], измерение уровня мРНК методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией [10], измерение метилирования гена АГТ и др. Иммуногистохимический метод является широко используемым методом для оценки экспрессии молекулярно-биологических маркеров в тканях. Он достаточно прост, нетрудоемок, и, что особенно важно, может быть использован архивный материал.

Определение уровня АГТ в опухоли является перспективным прогностическим фактором, предсказывающим эффективность химиотерапии с использованием алкилирующих агентов и нитрозомочевин больных метастатической меланомой кожи, различных типов глиом. Так, ретроспективное исследование биопсий подкожных и лимфатических метастазов показало, что 50% АГТ-положительных больных, получавших дакарбазин самостоятельно или в комбинации с виндезином и цисплатином, не ответили на химиотерапию. Среди АГТ-отрицательных больных таких больных было 23% [8]. Статистически значимая коррекция была получена между уровнем АГТ в биопсиях злокачественных астроцитов и общей и безрецидивной выживаемостью больных, получавших лучевую терапию и препараты хлорэтилмочевины. В другом исследовании высокая активность АГТ предсказывала резистентность к темозоломиду больных глиомой [11]. Интересно, что при других опухолях (рак молочной железы, желудка, печени), где для лечения не используются нитрозопроизводные, экспрессия АГТ является благоприятным фактором прогноза [12].

В нашем исследовании, возможно, из-за небольшого количества включенных больных, не было обнаружено статистически значимой корреляции между уровнем АГТ и безрецидивной выживаемостью. Но существует вероятность, что среди больных, ответивших на лечение, есть те, которые являются резистентными к нитрозомочевинам, но чувствительными к другим препаратам. Так, уровень АГТ не определяет чувствительность опухоли к цисплатину, что уменьшает вероятность получения точной корреляции между уровнем АГТ и клиническим ответом на разработанный режим [13]. Кроме того, несколько исследований показали, что цисплатин способен ингибировать активность АГТ в опухоли [14].

Другой причиной недостаточной точности предсказывающего значения АГТ может быть вариабельность экспрессии АГТ внутри различных опухолевых образцов. Некоторые исследования показывают, что уровень экспрессии АГТ варьирует в различных типах клеток, включая и опухолевые [15]. При этом уровень экспрессии в опухоли может быть не связан с уровнем экспрессии фермента в нормальной ткани. Уровень экспрессии АГТ в метастазах меланомы различной локализации также может различаться [7, 10]. Показано, что имеются

вариации в количестве АГТ-положительных клеток в разных биопсиях одного и того же больного. Некоторые авторы предлагают оценивать опухоль по образцу, содержащему максимальное количество АГТ-положительных клеток [8]. Мы оценивали экспрессию АГТ в последнем доступном удаленном метастазе. Требуется развитие дополнительной методологии тестирования АГТ.

Таким образом, исследования АГТ в опухоли могут представлять интерес для клинической практики.

Вывод

Экспрессия АГТ может рассматриваться как перспективный маркер для предсказания эффективности режима дакарбазин+цисплатин+нидран у больных метастатической меланомой кожи.

ЛИТЕРАТУРА

1. Tsao H., Atkins M.B., Sober A.J. Management of cutaneous melanoma. *N. Engl. J. Med.* 2004, v. 351, p. 998-1012.
2. Coates A.S., Segelov E. Long term response to chemotherapy in patients with visceral metastatic Melanoma. *Annals of Oncology.* 1994, No. 5, p. 249-251.
3. Legha S.S., Ring S., Papadopoulos N. et al. A prospective evaluation of a triple-drug regimen containing cisplatin, vinblastine and DTIC (CVD) for metastatic melanoma. *Cancer.* 1989, v. 64, p. 2024-2029.
4. Dolan M.E., Pegg A.E. O⁶-benzilguanine and its role in chemotherapy. *Clin. Cancer Res.* 1997, No. 3, p. 837-847.
5. Pegg A.E. Mammalian O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase: regulation and importance in response to alkylating carcinogenic and therapeutic agents. *Cancer Res.* 1990, v. 50, p. 6119-629.
6. Pegg A.E., Byers T.L. Repair of DNA containing O⁶-alkylguanine. *FASEB J.* 1992, No. 6, p. 2302-2310.
7. Egyhazi S., Margison G.P., Hansson J., Ringborg U. Immunohistochemical examination of the expression of O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase in human melanoma metastases. *Eur. J. Cancer.* 1997, v. 33, No. 1, p. 129-134.
8. Ma S., Egyhazi S., Martenhed G. et al. Analysis of O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase in melanoma tumors in patients treated with dacarbazine-based chemotherapy. *Melanoma Res.* 2002, v. 12, No. 4, p. 335-342.
9. Ma S., Egyhazi S., Ueno T., Lindholm C. et al. O⁶-methylguanine-DNA-methyltransferase expression and gene polymorphisms in relation to chemotherapeutic response in metastatic melanoma. *Br. J. Cancer.* 2003, v. 89, p. 1517-1523.
10. Hansson J., Martenhed G., Egyhazi S. et al. Analysis of O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase mRNA in fine needle biopsies from human melanoma metastases by reverse transcription and polymerase chain reaction. *Eur. J. Cancer.* 1996, v. 32A, No. 13, p. 2319-2326.
11. Russel S.J., Ye Y.W., Waber P.G. et al. P53 mutations, O⁶-alkylguanine DNA alkyltransferase activity, and sensitivity to procarbazine in human brain tumors. *Cancer.* 1995, v. 75, p. 1339-1342.
12. Cayre A., Penault-Llorca F., De Latour M. et al. O⁶-methylguanine-DNA methyl transferase gene expression and prog-

- nosis in breast carcinoma. Int. J. Oncol. 2002, v. 21, No. 5, p. 1125-1131.
13. Balaca C., Ramirez J.L., Taron M. et al. O⁶-methyl-guanine-DNA methyltransferase methylation in serum and tumor DNA predicts response to 1,3-Bis(2-Chloroethyl)-1-nitrosourea but not to temozolamide plus cisplatin in glioblastoma multiforme. Clin. Cancer Res. 2003, No. 9, p. 1461-1468.
14. D'Atri S., Graziani G., Lacal P.M. et al. Margison Attenuation of O⁶-Methylguanine-DNA Methyltransferase Activity and mRNA Levels by Cisplatin and Temozolomide in Jurkat Cells. Pharmacol. J. Exp. Ther. 2000, No. 8, p. 294.
15. Citron M., Decker R., Chen S. et al. O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase in human normal and tumor tissue from brain, lung, and ovary. Cancer Res. 1991, v. 51, p. 4131-4134.
- Статья поступила 13.02.2011 г., принята к печати 13.04.2011 г.
Рекомендована к публикации Т.К. Харатишвили

ALKYLGUANINE-DNA ALKYLTRANSFERASE AS PREDICTIVE FACTOR OF EFFICACY OF DACARBAZINE+CISPLATIN+NIDRAN REGIMEN IN PATIENTS WITH METASTATIC SKIN MELANOMA

Stepanova E.V., Abramov M.E., Baryshnikov A.Yu., Lichinitser M.R.

N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Russian Academy of Medical Science, Moscow, Russian Federation

Key words: metastatic skin melanoma, chemotherapy, AGT, predictive factor

Background. The goal of this study was to analyze significance of AGT expression as predictive marker of efficacy of Dacarbazine+Cisplatin+Nidran regimen in patients with metastatic skin melanoma

Methods. 26 patients with metastatic skin melanoma were enrolled in the retrospective study. Immunohistochemical analysis of AGT expression was performed on paraffin-embedded tissue sections of primary tumor or available metastasis.

Results. High AGT expression in tumor cells was associated with low efficacy of Dacarbazine+Cisplatin+Nidran regimen. Disease progression was observed in 85,7% patient with AGT-positive tumor and 29,4% – AGT-negative ($p=0,023$). There was a not significant difference of time without progression between two groups of patients.

Conclusion. AGT expression could be potentially useful tool for predicting response of metastatic melanoma patients to Dacarbazine+Cisplatin+Nidran regimen.