

УДК 577.29

УРОВЕНЬ ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО МОНОФОСФАТА ГЕМЦИТАБИНА ПРЕДСКАЗЫВАЕТ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ХИМИОТЕРАПИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ГЕМЦИТАБИНА У БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ

© 2023 г. М. Р. Янова^{1,*}, А. П. Жиянов¹, И. Д. Антипенко¹, С. А. Слободов¹, Е. В. Степанова¹

Представлено академиком РАН Н.Е. Кушлинским

Поступило 20.05.2023 г.

После доработки 08.08.2023 г.

Принято к публикации 10.08.2023 г.

Монофосфат гемцитабина (dFdCMP) является одной из форм фосфорилированного гемцитабина, образующихся внутри клеток и определяющих его противоопухолевую активность. Разработана фармако-молекулярная модель определения относительного уровня монофосфата гемцитабина, основанная на оценке активности каналов ENT1, ENT2 и ферментов dCK, CDA в ткани опухоли. Относительный уровень монофосфата гемцитабина является более значимым фактором прогноза прогрессирования рака мочевого пузыря при химиотерапии с использованием гемцитабина, чем экспрессия отдельных маркеров, влияющих на образование его активной формы.

Ключевые слова: рак мочевого пузыря, гемцитабин, цитотоксичность, математическая модель

DOI: 10.31857/S2686738923600140, **EDN:** GUAXOE

ВВЕДЕНИЕ

Рак мочевого пузыря (РМП) занимает 8-е место по распространенности и 13-е место по смертности среди всех видов злокачественных новообразований [1, 2]. Стандартом химиотерапии РМП на данный момент является терапия комбинацией цисплатина и гемцитабина [1], которая эффективна только в 30–60% случаев [3]. Одним из подходов к повышению эффективности лечения пациентов РМП и снижению их смертности является поиск маркеров предсказания чувствительности и/или резистентности к проводимому лечению.

Гемцитабин (Гемзар) является нуклеозидным аналогом цитозина арабинозида (2'-дифтордезоксцитидин) и широко используется для терапии рака поджелудочной железы, мочевого пузыря, молочной железы, яичников, немелкоклеточного рака легкого [4]. Его противоопухолевый эффект связан с внедрением гемцитабин трифосфата в ДНК вместо цитидин трифосфата, что приводит к нарушению репликации опухолевых клеток и вызывает клеточную гибель путем апоптоза [5]. 95% транспорта гемцитабина через цитоплазматическую мембрану клеток обеспечива-

ют транспортеры нуклеозидов семейства эквilibративных переносчиков нуклеотидов (ENTs) и концентрационных переносчиков нуклеотидов (CNTs) [6]. Из них только ENT1 и ENT2 имеют высокую экспрессию в ткани РМП. Внутри клетки препарат подвергается серии последовательных фосфорилирований дезоксицитидинкиназой (dCK) до его активных фосфатных форм. Фосфорилирование dCK является лимитирующей стадией, от которой зависит скорость дальнейшей активации гемцитабина и его транспорта из клетки [5]. Внутриклеточный гемцитабин также подвергается инактивации ферментом CDA внутри клетки с образованием менее токсичной формы, которая в дальнейшем выбрасывается из клетки.

Несколько клинических исследований показали, что экспрессия мРНК/белков ENT1, ENT2, dCK и CDA в опухолевых тканях может быть прогностическим маркером течения болезни у онкологических пациентов, получавших гемцитабин при раке поджелудочной железы [7–9], желчного пузыря [10], легкого [11]. Однако экспрессия данных маркеров малоизучена при РМП.

Учитывая вовлечение в процесс формирования активной формы гемцитабина нескольких транспортеров и ферментов, нами была создана фармако-молекулярная модель определения интегрального показателя уровня монофосфата гемцитабина (уровень dFdCMP) — одной из его

¹НИУ Высшая школа экономики,
Факультет биологии и биотехнологии, Москва, Россия
*e-mail: myanova@hse.ru

Таблица 1. Кинетические параметры, используемые для подсчета dFdCMP

Параметр	Значение
k_M , ENT1	160 мкМ [15]
k_M , ENT2	740 мкМ [15]
V_{max} , ENT1	0.000009 мкМ/ч [15]
V_{max} , ENT2	0.000258 мкМ/ч [15]
k_M , dCK	4.6 мкМ [13]
V_{max} , dCK	0.145 мкМ/ч [13]
k_M CDA, int	0.0434 мкМ [13]
V_{max} CDA, int	0.11 мкМ/ч [13]

активных форм, основанная на работе каналов ENT1, ENT2 и ферментов dCK, CDA. В нашем исследовании изучена значимость определения уровня dFdCMP в опухоли для предсказания эффективности химиотерапии с использованием гемцитабина у пациентов РМП.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование клинической значимости биомаркеров были включены пациенты с РМП, получающие лечение химиотерапией с использованием гемцитабина, из ретроспективной базы данных проекта Атласа генома опухолей (The Cancer Genome Atlas Project (TCGA)) [12]. Данные о результатах секвенирования и клиническая информация о пациентах были доступны в базах данных TCGA и cBioPortal (TCGA, PanCancer Atlas), <https://portal.gdc.cancer.gov/projects/TCGA-BLCA>. Профили экспрессии генов у пациентов с раком мочевого пузыря, получающих химиотерапию с использованием гемцитабина и препаратов группы платины (исходные данные в виде рид-каунтов), были загружены из базы данных TCGA и нормализованы методом FPKM (фрагменты на килобазу на миллион картированных прочтений) при помощи языка программирования Python. Клинические данные пациентов (пол, возраст, степень злокачественности опухоли, стадия заболевания, исход болезни (прогрессирование, смерть пациента) в период наблюдения и срок наступления соответствующего события) также были загружены из базы данных TCGA.

В исследование включено 68 пациентов с РМП: 44 — мужчины и 22 женщины (соотношение 2:1). Средний возраст больных на момент постановки диагноза составил 66 лет, из них до 60 лет — 12, и старше 60 лет — 56 человек. Большинство больных (70%) на момент постановки диагноза имели III и IV стадию болезни. Все пациенты имели мышечно-инвазивный рак и им была проведена операция по поводу удаления

первичной опухоли. Больные получали химиотерапевтическое лечение с использованием гемцитабина, из них 52 получали комбинацию гемцитабина и цисплатина; 13 — гемцитабина и карбоплатина; 3 — гемцитабина.

Полный ответ на химиотерапию (CR) по критериям ответа опухоли на терапию RECIST наблюдался в 44% случаев, частичный ответ — в 12%, стабилизация болезни — в 12% и прогрессирование болезни (PD) — в 32% случаев. Все больные были прослежены в течение 2 лет или до наступления смерти больного. Среди них прогрессирование болезни наблюдалось у 46% (медиана времени до прогрессирования составила 15.7 мес (от 3.4 до 24.0)), у 54% больных прогрессирования обнаружено не было. 68% пациентов были живы на момент окончания наблюдения.

В соответствии с работой [13], скорости изменения концентрации монофосфатной формы, вне- и внутриклеточной концентрации гемцитабина описываются системой дифференциальных уравнений:

$$\begin{aligned} Gem'_{ext}(t) = & Gem'_{iv}(t) - \\ & - V_{ENT1}(Gem_{ext}(t) - Gem_{int}(t)) \cdot e_{ENT1} - \\ & - V_{ENT2}(Gem_{ext}(t) - Gem_{int}(t)) \cdot e_{ENT2} \end{aligned} \quad (1)$$

$$\begin{aligned} Gem'_{int}(t) = & V_{ENT1}(Gem_{ext}(t) - Gem_{int}(t)) \cdot e_{ENT1} + \\ & + V_{ENT2}(Gem_{ext}(t) - Gem_{int}(t)) \cdot e_{ENT2} - \\ & - V_{ENT2} - V_{CDA}(Gem_{int}(t)) \cdot e_{CDA} \end{aligned} \quad (2)$$

$$dFdCMP'(t) = V_{dCK}(Gem_{int}(t)) \cdot e_{dCK}, \quad (3)$$

где V_x — константы активности фермента x из уравнения Михаэлиса-Ментен, e_x — экспрессия фермента x , $Gem_{ext}(t)$, $Gem_{int}(t)$ — вне- и внутриклеточная концентрация гемцитабина в момент времени t , dFdCMP(t) — внутриклеточная концентрация монофосфатной формы гемцитабина, Gem_{iv} — “введенная” концентрация гемцитабина. Скорость проникновения фермента описывали уравнением Михаэлиса-Ментен. В качестве значений внешней концентрации препарата в ткани опухоли брали значения концентрации гемцитабина в плазме крови пациентов при введении однократной дозы 3.34 ммоль/м² в течение 30 мин (стандартное введение в клинических условиях), приведенные в статье [13].

Для численного решения системы (1–3) использовали язык программирования Python, пакет “integrate” библиотеки SciPy [14]. Для оценки накопленной концентрации dFdCMP брали значение численного решения в точке времени $t = 3.72$ ч. Коэффициенты, необходимые для подсчета относительного уровня монофосфатной формы гемцитабина, приведены в табл. 1.

Статистический анализ результатов осуществляли в программе Python с использованием кри-

Таблица 2. Взаимосвязь маркеров и dFdCMP с ответом на химиотерапию

Ответ опухоли на химиотерапию	Медиана экспрессии	Пациенты с низкой экспрессией/у.е., <i>n</i>	Пациенты с высокой экспрессией/у.е., <i>n</i>
ENT1			
CR	4.56	12	18
PD	4.12	13	9
<i>p</i> -значение	0.43	0.26	
ENT2			
CR	2.07	17	13
PD	2.46	10	12
<i>p</i> -значение	0.19	0.58	
dCK			
CR	3.03	16	14
PD	3.06	9	13
<i>p</i> -значение	0.56	0.41	
CDA			
CR	1.91	17	13
PD	3.42	8	14
<i>p</i> -значение	0.19	0.17	
dFdCMP			
CR	0.0077	13	17
PD	0.0040	16	6
<i>p</i> -значение	0.23	0.049	

териев Манна–Уитни, логранга, а также точного теста Фишера.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Из литературы известно, что трифосфатная форма гемцитабина может быть использована в качестве основного прогностического маркера общей выживаемости пациентов с раком поджелудочной железы [16]. Определение уровня dFdCMP было выбрано с учетом того, что его выведение из клетки минимально, и при этом его концентрация соответствует концентрации гемцитабин трифосфата [15].

Интегральный показатель уровня dFdCMP был подсчитан в клетках 68 пациентов с РМП с использованием разработанной модели и в среднем составил 0,018 (95% CI 0.011–0.025) условных единиц (у.е.). Данные о корреляции dFdCMP и ответом опухоли на химиотерапию представлены в табл. 2.

При данном объеме выборки не обнаружено значимой корреляции между значениями медианы уровней маркеров или уровнем dFdCMP и ответом опухоли на химиотерапию (полный ответ (CR) vs прогрессирование (PD)). Однако была от-

мечена тенденция к снижению вероятности ответа на химиотерапию при низких уровнях CDA ($p = 0.19$), dFdCMP ($p = 0.23$) и высоких уровнях ENT2 ($p = 0.19$). Также была обнаружена тенденция к более раннему прогрессированию опухоли (в течение 12 мес) после начала химиотерапии при низких значениях экспрессии CDA ($p = 0.14$) и уровня dFdCMP ($p = 0.0995$).

Клиническую значимость экспрессии маркеров ENT1, ENT2, dCK, CDA и относительного уровня dFdCMP оценивали по ответу опухоли на проводимую химиотерапию с использованием гемцитабина (полный ответ vs прогрессия) и по длительности времени до прогрессирования болезни. Все пациенты были разделены на подгруппы с низкой (<50% от значений экспрессии/у.е., I–II квартиль) и высокой экспрессией маркеров/уровнем dFdCMP (>50% от значений экспрессии/уровня, III–IV квартиль).

Малый объем выборки не позволил выявить корреляцию ответа на терапию гемцитабином с уровнем экспрессии маркеров ENT1, ENT2, dCK и CDA, однако, была отмечена тенденция к увеличению вероятности ответа на химиотерапию у пациентов с низкой экспрессией CDA ($p = 0.17$). Была выявлена взаимосвязь между пониженной

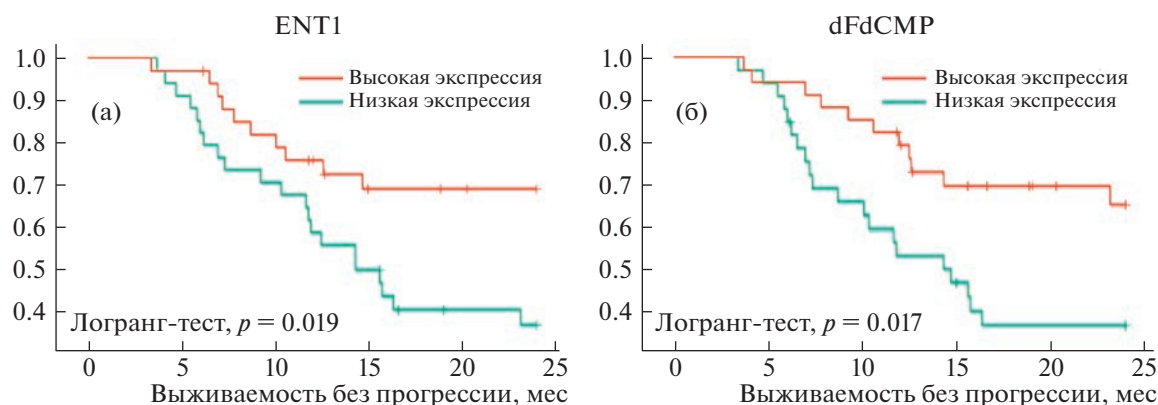


Рис. 1. Взаимосвязь (а) высокой/низкой экспрессии ENT1 и (б) высокого/низкого относительного значения dFdCMP с выживаемостью без прогрессии.

вероятностью ответа на химиотерапию и низким относительным уровнем dFdCMP ($p = 0.049$). Время до прогрессирования болезни было меньше у пациентов, имеющих низкую экспрессию ENT1: медиана времени до прогрессирования составила 14.9 ± 2.5 мес у пациентов с низкой экспрессией и не достигнута у пациентов с высокой экспрессией ($p = 0.019$) (рис. 1а).

При этом интегральный показатель dFdCMP, определенный с помощью разработанной фармако-молекулярной модели, имел более высокую предсказывающую значимость. Так, у пациентов, имеющих низкий расчетный уровень dFdCMP, медиана времени до прогрессирования составила 14.5 ± 3.7 мес, в то время как у пациентов, имеющих высокий расчетный уровень dFdCMP, достигнута не была ($p = 0.017$) (рис. 1б). Дополнительный статистический анализ показал, что экспрессия маркеров и относительный уровень dFdCMP не коррелируют со временем до метастазирования и общей выживаемостью больных.

Таким образом, предсказывающее значение транспортера ENT1 для прогрессирования пациентов с РМП, получавших химиотерапию с использованием гемцитабина, требует дополнительного изучения. Несмотря на то что в нашей работе были использованы данные секвенирования мРНК интересующих транспортеров и ферментов для отображения их индивидуального вклада в метаболизм препарата у больных РМП, упрощенная фармако-молекулярная модель определения относительного уровня dFdCMP позволила установить, что он является более значимым фактором прогноза прогрессирования РМП при химиотерапии с использованием гемцитабина, чем экспрессия отдельных маркеров, влияющих на образование его активной формы. Нами была показана клиническая значимость фармако-молекулярной модели для предсказания прогрессирования РМП у пациентов, получавших химиотерапию с использованием гемцитабина.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено в рамках Программы фундаментальных исследований Национального исследовательского университета “Высшая школа экономики” (НИУ ВШЭ).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lenis A. T., Lec P. M., and Chamie K., Bladder cancer a review, *JAMA – Journal of the American Medical Association*, vol. 324, no. 19. American Medical Association, pp. 1980–1991, Nov. 17, 2020.
2. Карпун А.Д., Старинский В.В., and Шахзадова А.О., Состояние онкологической помощи населению России в 2020 году, 2021.
3. Cao Y. et al., Phase I study of gemcitabine-cisplatin versus pemetrexed-cisplatin for patients with advanced or metastatic bladder cancer, *JBUON*, vol. 23, no. 2, pp. 475–481, 2018.
4. Saiki Y., Hirota S., and Horii A., Attempts to remodel the pathways of gemcitabine metabolism: Recent approaches to overcoming tumours with acquired chemoresistance, *Cancer Drug Resistance*, vol. 3, no. 4. OAE Publishing Inc., pp. 819–831, 2020.
5. Wong A., Soo R.A., Yong W.P., and Innocenti F., Clinical pharmacology and pharmacogenetics of gemcitabine, *Drug Metabolism Reviews*, vol. 41, no. 2. pp. 77–88, May 2009.
6. Pastor-Anglada M. and Pérez-Torras S., Emerging roles of nucleoside transporters, *Frontiers in Pharmacology*, vol. 9, no. JUN. Frontiers Media S.A., Jun. 06, 2018.
7. Spratlin J. et al., The Absence of Human Equilibrative Nucleoside Transporter 1 Is Associated with Reduced Survival in Patients With Gemcitabine-Treated Pancreas Adenocarcinoma. Accessed: Dec. 12, 2022. [Online]. Available.
8. Nishio R. et al., Disrupted plasma membrane localization of equilibrative nucleoside transporter 2 in the chemoresistance of human pancreatic cells to gemcitabine (dFdCMP), *Cancer Sci*, vol. 102, no. 3, pp. 622–629, Mar. 2011.
9. Yang H. et al., Genome-Wide CRISPR Screening Identifies DCK and CCNL1 as Genes That Contribute

- to Gemcitabine Resistance in Pancreatic Cancer, *Cancers (Basel)*, vol. 14, no. 13, Jul. 2022.
10. Espinoza J.A. et al., Low expression of equilibrative nucleoside transporter 1 is associated with poor prognosis in chemotherapy-naïve pT2 gallbladder adenocarcinoma patients, *Histopathology*, vol. 68, no. 5, pp. 722–728, Apr. 2016.
 11. Ioannidis G. et al., Messenger-RNA expression of five gemcitabine sensitivity-related genes predicting outcome in advanced-stage non-small cell lung cancer, *Anticancer Res*, vol. 40, no. 2, pp. 901–913, 2020.
 12. Hoadley K.A. et al., Cell-of-Origin Patterns Dominate the Molecular Classification of 10,000 Tumors from 33 Types of Cancer, vol. 173, no. 2, pp. 291–304, 2020.
 13. Garcia-Cremades M., Melillo N., Troconiz I.F., and Magni P., Mechanistic Multiscale Pharmacokinetic Model for the Anticancer Drug 2',2'-difluorodeoxycytidine (Gemcitabine) in Pancreatic Cancer, *Clin Transl Sci*, vol. 13, no. 3, pp. 608–617, May 2020.
 14. Virtanen P. et al., SciPy 1.0: fundamental algorithms for scientific computing in Python, *Nat Methods* 17, 261–272 (2020).
 15. Mackey J. R. et al., Gemcitabine Transport in Xenopus Oocytes Expressing Recombinant Plasma Membrane Mammalian Nucleoside Transporters. [Online]. Available.
 16. Garcia-Cremades M. et al., Predicting tumour growth and its impact on survival in gemcitabine-treated patients with advanced pancreatic cancer, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 115.
 17. Derissen E. J. B. et al., Intracellular pharmacokinetics of gemcitabine, its deaminated metabolite 2',2'-difluorodeoxyuridine and their nucleotides, *Br J Clin Pharmacol*, 84: 1279–1289, 2018.

INTRACELLULAR GEMCITABINE MONOPHOSPHATE LEVELS PREDICT CHEMOTHERAPY EFFICACY IN GEMCITABINE-TREATED PATIENTS WITH BLADDER CANCER

M. R. Yanova^{a, #}, A. P. Zhiyanov^a, I. D. Antipenko^a, S. A. Slobodov^a, and E. V. Stepanova^a

^aNIU Higher School of Economics, Faculty of Biology and Biotechnology, Moscow, Russian Federation

[#]e-mail: myanova@hse.ru

Presented by Academician of the RAS N.E. Kushlinskiy

Gemcitabine monophosphate (dFdCMP), one of the intracellular forms of phosphorylated gemcitabine, determines its antitumor activity. A pharmacomolecular model for determining gemcitabine relative monophosphate levels has been developed based on the assessment of the activity of ENT1, ENT2 channels and dCK, CDA enzymes in tumor tissue. Gemcitabine relative monophosphate levels is a more relevant predictive factor of gemcitabine resistance of bladder cancer when compared with the expression of individual markers related to dFdCMP formation.

Keywords: bladder cancer, gemcitabine, cytotoxicity, mathematical model