

Хронический миелолейкоз: молекулярный мониторинг в клинической практике

Н.Р. Рябчикова¹, И.Р. Миннихметов², Г.Ш. Сафуанова¹, Д.В. Исламгулов², А.С. Карунас², Э.К. Хуснутдинова²

¹ГБОУ ВПО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Уфа;

²ФГБУН «Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра» РАН

Контакты: Гузель Шагбановна Сафуанова safuanova@bk.ru

Применение ингибитора тирозинкиназ (ИТК) иматиниба у пациентов с хроническим миелолейкозом (ХМЛ) привело к быстрому и значительному прогрессу в лечении данного заболевания. На сегодняшний день мониторинг терапии препаратами ИТК с помощью генетических технологий является обязательным атрибутом контроля эффективности лечения ХМЛ. Целью исследования было проведение комплексного молекулярно-генетического мониторинга с использованием методов стандартного цитогенетического исследования, полимеразной цепной реакции в режиме реального времени и мутационного анализа для оценки эффективности лечения пациентов с ХМЛ, получающих терапию иматинибом. Показана корреляция цитогенетического и молекулярного ответов и неоднородность структуры молекулярного ответа в каждой группе больных. Анализ характера мутаций гена *BCR-ABL* показал, что мутации киназного домена были выявлены у 32 % больных ХМЛ, резистентных к иматинибу.

Ключевые слова: хронический миелолейкоз, молекулярно-генетический мониторинг, мутации в *Ph*-позитивных клетках

Chronic myelogenous leukemia: molecular monitoring in clinical practice

N.R. Ryabchikova¹, I.R. Minniakhmetov², G.Sh. Safuanova¹, D.V. Islamgulov², A.S. Karunas², E.K. Khusnutdinova²

¹Bashkortostan State Medical University, Ministry of Health of Russia, Ufa;

²Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Scientific Center, Russian Academy of Sciences

Use of tyrosine kinase inhibitor imatinib has led to significant progress in chronic myeloid leukemia (CML) treatment. To date, genetic monitoring is a mandatory attribute of therapy with tyrosine kinase inhibitors. **The purpose of this study** was to assess the imatinib therapy efficacy in CML patients using complete molecular genetic monitoring by standard cytogenetics, real-time polymerase chain reaction and mutational analysis. Correlation between cytogenetic and molecular response was shown. Heterogeneity of molecular response in each patient group was revealed by expression of *BCR-ABL*. Kinase domain mutations were detected in 32 % of CML patients resistant to imatinib.

Key words: chronic myeloid leukemia, molecular genetic monitoring, *Ph*-positive cells mutations

Введение

Хронический миелолейкоз (ХМЛ) является формой лейкоза, которая характеризуется усиленным и нерегулируемым ростом преимущественно миелоидных клеток в костном мозге с их накоплением в крови. Основной причиной ХМЛ является реципрокная транслокация $t(9;22)(q34;q11)$ с образованием филадельфийской хромосомы (*Ph*-хромосома) [1], обнаруживаемой у 90–95 % больных. В результате транслокации образуется химерный ген *BCR-ABL*, продуктом которого является патологический белок, обладающий выраженной тирозинкиназной активностью. Именно белок *BCR-ABL*, продуцируемый химерным геном, имеет ключевое значение в патогенезе ХМЛ [2].

Исследования молекулярных основ патогенеза ХМЛ подготовили почву для развития таргетной (целенаправленной) терапии этого заболевания, заключающейся в применении специфических ингибиторов *BCR-ABL*-тирозинкиназы (ИТК). Создание первого из них – иматиниба (STI571), стало революционным событием в области целенаправленной противоопухолевой терапии [3]. Иматиниб селективно ингибирует *BCR-ABL*-тирозинкиназу, встраиваясь в аденозин-

трифосфат (АТФ)-связывающий карман киназного домена белка. Благодаря этому АТФ не может встроиться в АТФ-связывающий карман, *BCR-ABL*-тирозинкиназа остается в неактивном состоянии и тем самым блокируется сигнальный путь пролиферации опухолевых клеток [3, 4].

Несмотря на высокую эффективность препарата, у некоторых больных в 20–30 % случаев наблюдается первичная (рефрактерность) или вторичная (приобретенная) резистентность к проводимой терапии [5]. Возникновение устойчивости к ИТК является следствием взаимодействия многих факторов. Эти факторы включают в себя схему лечения, фармакодинамику ИТК, генетические изменения, мутации *BCR-ABL* киназного домена [5]. Наиболее широко обсуждается влияние мутаций химерного гена *BCR-ABL* на развитие резистентности. По современным данным, частота мутаций в гене *BCR-ABL* в разных группах больных колеблется от 15 до 90 % и зависит от критериев определения резистентности, методов обнаружения мутаций и фазы течения ХМЛ [6]. Эти мутации делают тирозинкиназу нечувствительной к действию иматиниба, при этом сохраняя трансформирующую актив-

ность фермента. Предполагается, что возникновение мутаций вызывает изменение конформации химерного белка тирозинкиназы, что затрудняет связывание иматиниба с аденозинтрифосфатным карманом белка [7, 8]. На сегодняшний день разработаны ИТК 2-го поколения, более эффективные по сравнению с иматинибом, 2 из которых уже зарегистрированы в России в начале 2008 г. — нилотиниб и дазатиниб. Применение ИТК 2-го поколения позволяет преодолеть проблемы с резистентностью и непереносимостью иматиниба у ряда больных, однако в некоторых случаях даже новые препараты не улучшают ответ на лечение и являются неэффективными [9].

В настоящее время основными методами диагностики и мониторинга заболевания при ХМЛ являются общий анализ крови, цитогенетическое определение содержания Ph-позитивных клеток в костном мозге и измерение уровня транскрипта гена *BCR-ABL*.

Гематологический подсчет клеток является наименее чувствительным методом и используется для определения гематологического ответа (ГО) на лечение. Если анализ показывает отсутствие опухолевых клеток, ГО является полным; при наличии лейкозных клеток — частичным ГО [10]. Для определения цитогенетического ответа (ЦО) оценивается количество Ph-позитивных клеток по отношению к числу клеток, не несущих Ph-хромосомы [11]. Стандартное цитогенетическое исследование (СЦИ) клеток является единственным методом, позволяющим анализировать весь хромосомный набор клетки. Посредством СЦИ можно обнаружить дополнительные хромосомные aberrации, которые в ряде случаев свидетельствуют о неблагоприятном прогнозе заболевания. При этом необходимо понимать, что разрешающая способность этого метода относительно низкая и составляет 1–5 % клеток. ЦО на лечение определяется по относительному содержанию Ph⁺-клеток в костном мозге: полный — 0 %, частичный — 1–35 %, малый — 36–65 %, минимальный — 66–95 %, нет ответа — более 95 %. Большой ЦО (БЦО) определяется при достижении полного (ПЦО) или частичного ЦО при наличии в костном мозге 0–35 % Ph⁺-клеток [12].

Высокочувствительный молекулярно-цитогенетический метод флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH) хромосом позволяет обнаружить химерный ген *BCR-ABL* у Ph-позитивных больных ХМЛ не только в метафазе, но и в интерфазе митотического деления клетки [13], с частотой 1 опухолевая клетка на 200–500 клеток костного мозга. В соответствии с рекомендациями European Leukemia Net (ELN) контрольное СЦИ или FISH-анализ (в случае отсутствия митозов клеток костного мозга) необходимо проводить на 3 и 6 мес терапии ХМЛ ИТК, затем каждые 6 мес до достижения и подтверждения ПЦО, далее — каждые 12 мес в случаях, когда регулярная оценка молекулярных изменений неосуществима, и всегда

при признаках миелодисплазии, субоптимальном ответе или неудаче лечения [12].

Кариотипирование с окрашиванием хромосом методом G-banding в клетках костного мозга, находящихся в стадии метафазы, необходимо проводить на 3 и 6 мес, а затем каждые 6 мес до достижения и подтверждения ПЦО, далее — каждые 12 мес в случаях, когда регулярная оценка молекулярных изменений неосуществима, и всегда при признаках миелодисплазии, субоптимальном ответе или неудаче лечения [12].

Наиболее чувствительным методом оценки молекулярного ответа (МО) на лечение является количественная полимеразная цепная реакция (ПЦР). Большой МО определяется как тысячекратное снижение количества транскриптов *BCR-ABL* по сравнению с исходным (до начала терапии). Полным МО (ПМО) считают случаи, когда *BCR-ABL*-транскрипты не выявляются [14].

Метод ПЦР применяется как для диагностики ХМЛ, так и для мониторинга минимальной остаточной болезни в процессе терапии [15, 16]. Чувствительность этого метода высока и позволяет обнаружить одну единственную клетку со специфической ДНК или РНК среди 10⁴–10⁶ клеток.

В пределах чувствительности цитогенетического метода (10⁻²) оба метода (цитогенетический и молекулярный) равноценны для количественной оценки лейкоэмических клеток. В исследовании S. Branford et al. показано, что уровень экспрессии транскрипта гена *BCR-ABL* в периферической крови коррелирует с числом Ph-позитивных лейкоэмических клеток костного мозга (рис. 1) [17].

Молекулярный мониторинг уровня *BCR-ABL*-транскрипта при помощи количественной ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) используется в качестве оценки ответа на лечение у пациентов с ХМЛ [18, 19]. Этот метод особенно важен при терапии ХМЛ ИТК, когда резидуальное количество лейкоэмических клеток ниже уровня чувствительности цитогенетического исследования [19–21].

Любая положительная динамика соотношения *BCR-ABL/ABL* является МО, так как отражает динамику соотношения нормальных и лейкоэмических клеток. Следовательно, количественный метод ПЦР можно использовать и на начальных этапах терапии ИТК [18, 20, 21].

Количественная ПЦР-РВ должна проводиться на цельных клетках из лейкоконцентрата, а результаты должны быть представлены в виде отношения *BCR-ABL/ABL* (или другим конститутивным генам), выраженного в процентах [12].

Целью нашего исследования было проведение комплексного молекулярно-генетического мониторинга с использованием методов СЦИ, ПЦР-РВ и мутационного анализа для оценки эффективности лечения пациентов с ХМЛ, получающих терапию иматинибом.

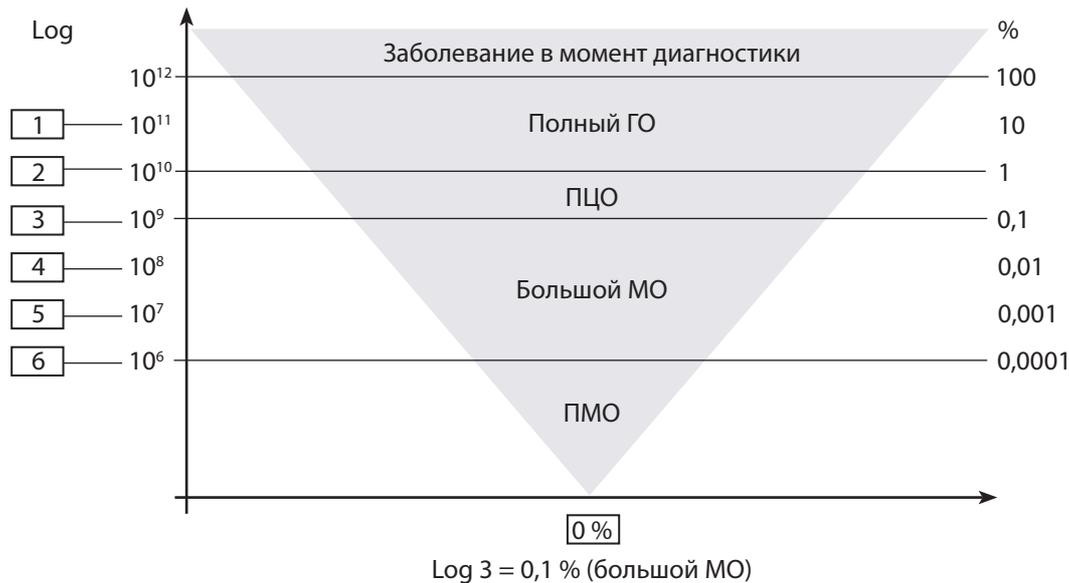


Рис. 1. Оценка ответа на терапию молекулярным методом [18]

Материалы и методы

Пациенты. Материалом исследования послужили образцы РНК и кДНК, выделенные из периферической крови 114 больных (55 мужчин и 59 женщин, в возрасте от 14 до 76 лет, медиана – 43 года) с клинически и цитогенетически установленным диагнозом ХМЛ, обследовавшихся в Республиканской клинической больнице им. Г.Г. Куватова г. Уфы. Все больные получали лечение препаратом ИТК иматинибом в дозе 400, 600 или 800 мг/сут (согласно рекомендациям ELN) [12]. Максимальная длительность терапии составила 205 мес, минимальная – 6 мес; медиана длительности терапии – 65,5 мес.

Исследование одобрено Этическим комитетом Института биохимии и генетики Уфимского научного центра Российской академии наук. Все больные ХМЛ дали информированное согласие на участие в исследовании.

Выделение РНК. РНК выделяли из 5–7 мл венозной крови реагентом TriZol (Invitrogene) в соответствии с рекомендациями изготовителя. Эффективность выделения мРНК определяли с использованием спектрофотометра NanoDrop. Качество препаратов РНК оценивали по соотношению оптических плотностей A260/A280 и электрофорезом в 1 % агарозном геле по соотношению количества 28S и 18S рРНК [16]. Выделенную РНК обрабатывали ДНКазой I, свободной от РНКазы (Sigma). Наличие в образце РНК примесей ДНК определяли с помощью ПЦП со специфическими праймерами к гену «домашнего хозяйства» GAPDH (Fermentas).

Обратная транскрипция проводилась с использованием набора “RevertAid™ First Strand cDNA” (Fermentas) с помощью гекса- и дексануклеотидных праймеров согласно рекомендациям производителя.

Цитогенетические исследования костного мозга.

Цитогенетическое исследование костного мозга на этапе постановки диагноза ХМЛ выполнено у 101 больного. Контрольные цитогенетические исследования проведены через 6, 12 и 18 мес терапии иматинибом. Образцы костного мозга транспортировали в лабораторию при температуре 4–8 °С в термоконтейнере в течение 1–24 ч. В работе использовали общепринятый прямой метод и метод культивирования костного мозга в течение 24 ч. Для СЦИ препараты окрашивались методом GTG (дифференциальная окраска G). Результаты кариотипирования описывали в соответствии с требованиями Международной цитогенетической номенклатуры ISCN 2009. ЦО, а также критерии отсутствия ответа определяли в соответствии с рекомендациями ELN [12].

ПЦП-РВ осуществляли с помощью системы детекции продуктов ПЦП-РВ CFX96™ (BioRad). Для анализа экспрессии гена *BCR-ABL* использовали набор реагентов Онкоскрин-1-1-Q (ООО «ГеноТехнология»). Определение интенсивности экспрессии химерного онкогена *BCR-ABL* и контрольного гена *ABL* проводили согласно протоколу производителя. Метод не стандартизирован по международной шкале (IS), результаты анализа уровня экспрессии представлены в процентах.

Исследование мутаций в гене *BCR-ABL*. ПЦП проводили в 2 этапа с целью амплификации мутантного транскрипта *ABL*, согласно рекомендациям Soverini et al. [22]. На первом этапе амплифицировали участок гена *BCR-ABL* длиной в 1,2 тыс. пар оснований (п. о.) с использованием следующих праймеров: F-*BCR-A* и R-*ABL-A* (таблица). На 2-м этапе проводили реамплификацию, используя в качестве матрицы ампликат от первого этапа с использованием 2 пар внутренних праймеров (F-*ABL-B/R-ABL-B* и F-*ABL-C/R-ABL-C*)

Примеры для ПЦР

Название праймера	Последовательность, 5'–3'	Позиция	Длина ампликона
F-BCR-A	GAG CAG CAG AAG AAG TGT TTC AGA	BCR (3075–3098)	A* [1475 п. о. (b3a2) или 1401 п. о. (b2a2)]
R-ABL-A	CTC TAG CAG CTC ATA CAC CTG GG	ABL (1484–1506)	
F-ABL-B	CAT CAT TCA ACG TGT GCC GAC GG	ABL (748–770)	B (393 п. о.)
R-ABL-B	GTT GCA CTC CCT CAG GTA GTC	ABL (1120–1140)	
F-ABL-C	GAA GAA ATA CAG CCT GAC GGT G	ABL (930–951)	
R-ABL-C	CGT CGG ACT TGA TGG AGA A	ABL (1393–1411)	C (482 п. о.)

Примечание. * – длина ампликона после первого этапа ПЦР варьирует в зависимости от типа транскрипта гена BCR-ABL (b3a2 или b2a2).

и образованием 2 фрагментов длиной 393 п. о. и 482 п. о. соответственно.

Для амплификации использовали реакционную смесь объемом 25 мкл, содержащую 2,5 мкл 10 × Taq-буфера, 0,5 единиц Taq полимеразы, смесь dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP по 200 мкМ каждого), 2,5 мМ MgCl₂ и по 5 пМ каждого праймера. В реакцию брали 1–3 мкг кДНК. В первом раунде ПЦР проводилась при следующих условиях: после денатурации (94 °С, 5 мин) проводили 30 циклов амплификации в режиме 94 °С/40 с; 60 °С/60 с; 72 °С/60 с; финальная достройка 72 °С/7 мин. Реамплификация проводилась при следующих условиях: после первичной денатурации (94 °С, 5 мин) проводили 35 циклов амплификации в режиме 94 °С/30 с; 55 °С/40 с; 72 °С/40 с; финальная достройка 72 °С/7 мин.

Определение нуклеотидной последовательности кДНК гена BCR-ABL выполняли с помощью автоматического секвенатора ABI PRISM модель 310 (“Applied Biosystems”) с использованием набора для флуоресцентного мечения DYEnamic™ ET, согласно протоколу фирмы-производителя (“Amersham Pharmacia Biotech” DYEnamic™ ET Terminator Cycle Sequencing Kit).

Наличие мутаций подтверждали с помощью анализа полиморфизма длины рестрикционных фрагментов (ПДРФ). Фрагменты гена BCR-ABL подвергали рестрикции специфическими эндонуклеазами DdeI, NcoI. Реакцию проводили согласно протоколу фирмы-производителя (Fermentas). Продукты амплификации и рестрикции анализировали в 7 % полиакриламидном геле с последующей окраской в растворе бромистого этидия (конечная концентрация 0,1 мкг/мл) и визуализацией в проходящем УФ-свете при длине волны 312 нм.

Статистическая обработка данных осуществлялась с использованием программы GraphPad Prism 3.0, GraphPad Software.

Результаты и обсуждение

Цитогенетический мониторинг терапии хронического миелолейкоза иматинибом

Цитогенетическое исследование клеток костного мозга позволяет наиболее точно определить размер опухолевого клона клеток и оценить эффективность терапии иматинибом в течение первых 12 мес лечения [23]. Одним из самых важных критериев прогноза ответа на терапию иматинибом является результат цитогенетического исследования клеток костного мозга после 6 мес лечения (рекомендации ELN 2006, 2009). В соответствии с данными рекомендациями в эти сроки больные должны достичь БЦО (содержание Ph-позитивных клеток менее 35 %) [12, 23].

В нашем исследовании эффективность лечения иматинибом оценивалась после 6 мес лечения у 101 пациента с ХМЛ, из них в хронической фазе были 82 (81,2 %) пациента, из которых иматиниб в дозе 400 мг/сут получали 76 (92,7 %) больных и 600 мг/сут – 6 (7,3 %) пациентов. В фазе акселерации находились 16 больных ХМЛ, из которых 1 (6,25 %) пациент получал терапию иматинибом в дозе 400 мг/сут, 12 (75 %) – в дозе 600 мг/сут, 3 (18,75 %) больных – в дозе 800 мг/сут. В бластном кризе – 3 пациента, которые получали иматиниб в дозировке 400, 600 и 800 мг/сут соответственно.

Следует отметить, что достижение оптимального ответа на терапию иматинибом у пациентов в хронической фазе и особенно в фазе акселерации напрямую зависит от назначенной дозы иматиниба. Больные ХМЛ в хронической фазе должны получать иматиниб в дозе не менее 400 мг/сут, в фазе акселерации – не менее 600 мг/сут. Поэтому в нашем исследовании пациенты, получавшие иматиниб в фазе акселерации и бластного криза в дозе 400 мг/сут, были исключены из дальнейшего анализа.

Результаты проведенного анализа показали, что после 6 мес лечения из 82 пациентов в хронической фазе ХМЛ, получавших иматиниб в дозе 400–600 мг/сут, 43 (52,4 %) пациента достигли ПЦО и 6 (7,3 %) больных достигли частичного ЦО. Таким образом, БЦО выявлен у 49 (59,7 %) пациентов, что в соответствии с рекомендациями ELN (2009) рассматривается как оптимальный ответ. Из 82 обследованных больных ХМЛ в хронической фазе после 6 мес лечения 9 (11 %) достигли малого ЦО и 4 (4,9 %) пациента имели минимальный ЦО. Таким образом, малый или минимальный ЦО, рассматриваемый в рекомендациях ELN (2009) как субоптимальный ответ, был достигнут у 13 пациентов (15,9 % случаев).

Из 15 больных ХМЛ, находившихся в фазе акселерации и получавших иматиниб в дозе 600–800 мг/сут,

ПЦО после 6 мес лечения достиг только 1 (6,7 %) пациент, частичного ответа – 2 (13,3 %) пациента, минимальный ЦО был достигнут у 2 (13,3 %) пациентов. Таким образом, в группе больных в фазе акселерации оптимальный ответ был выявлен у 3 (20 %) пациентов, субоптимальный – у 2 (13,3 %) пациентов.

У 20 (24,4 %) больных ХМЛ в хронической фазе, у 10 (66,7 %) пациентов с ХМЛ в фазе акселерации и у всех больных, находящихся в бластном кризе, ЦО отсутствовал, что определяется как «неудача терапии». Отсутствие ГО после 3 мес и любого ЦО после 6 мес терапии, а также потеря уже достигнутого ГО, ЦО и МО рассматриваются как проявления резистентности к терапии ИТК.

Анализ экспрессии гена *BCR-ABL* у больных хроническим миелолейкозом

Для количественной оценки транскриптов *BCR-ABL* у 114 больных ХМЛ был проведен анализ экспрессии методом ПЦР-РВ. Относительная экспрессия гена *BCR-ABL* определялась как отношение среднего числа копий гена *BCR-ABL* к среднему числу копий гена *ABL*, умноженное на 100 %. Согласно рекомендациям ELN, обнаружение гена *BCR-ABL* более чем в 1 % клеток свидетельствует о выраженной экспрессии *BCR-ABL*, оценить которую можно с помощью СЦИ. Экспрессия гена *BCR-ABL* в 0,1–1 % клеток характерна для умеренного уровня экспрессии, который уже невозможно оценить с помощью СЦИ. Экспрессия гена *BCR-ABL* на уровне менее 0,1 % свидетельствует о достижении БМО [23]. Для удобства представления данных по изменению уровня экспрессии *BCR-ABL* в процессе лечения была также использована логарифмическая шкала измерений. Результаты выражали в виде десятичного логарифма (lg) снижения экспрессии по отношению к базовому уровню. Снижение экспрессии на 1 lg означало снижение уровня *BCR-ABL*-транскрипта в 10 раз, на 2 lg – в 100 раз, на 3 lg – в 1000 раз, на 4 lg – в 10 000 раз.

В результате проведенного нами анализа было выявлено, что медиана экспрессии гена *BCR-ABL* в общей выборке пациентов с ХМЛ составила 23,77 % (10–90-й перцентиль, 0–316,8 %), или 1,5 lg. У 32 (28 %) больных ХМЛ был выявлен ПМО на терапию ИТК (0 % гена *BCR-ABL*). Медиана снижения уровня экспрессии *BCR-ABL* составила 4,2 lg. Умеренный уровень экспрессии был выявлен в 10 (9 %) случаях. Медиана экспрессии гена *BCR-ABL* составила 0,15 % (10–90-й перцентиль, 0,05–0,93 %), или 2,5 lg. В группе больных ХМЛ с высоким уровнем экспрессии гена *BCR-ABL* ($n = 72$) медиана экспрессии составила 79,9 %, или 1,2 lg.

Сравнение значений цитогенетического и молекулярного ответа

Сравнение данных МО и ЦО проводилось на 77 образцах крови пациентов. Образцы были разделены на группы, соответствующие уровню ЦО. Разброс

значений экспрессии *BCR-ABL* в каждой группе был очень широким, но с уменьшением процентного содержания Ph-позитивных клеток увеличивалась доля образцов с более слабым уровнем экспрессии. Сравнительный анализ данных ЦО и МО подтвердил наличие положительной корреляции между процентным содержанием Ph-позитивных клеток и уровнем экспрессии *BCR-ABL*. Коэффициент ранговой корреляции Спирмена для этих параметров составил 0,822 ($p < 0,0001$).

В группе пациентов с ПЦО в 43,8 % (14 из 32) образцов транскрипты гена *BCR-ABL* не были выявлены; в 15,6 % (5 образцов) экспрессия *BCR-ABL* составляла от 0 до 0,1 %, в 40,6 % (13 образцов) – выше 1 %. В группе с частичным ЦО в 28,6 % (2 из 7) образцов экспрессия гена *BCR-ABL* не выявлялась, в 71,4 % (5 из 7) образцов экспрессия была выше 1 %. В группе с малым ЦО 14,3 % (1 из 7) образцов экспрессия была равна нулю, в остальных 85,7 % (6 из 7) наблюдалась экспрессия свыше 1 %. В группе с минимальным ЦО транскрипты *BCR-ABL* не выявлялись в 28,6 % (2 из 7) случаев, экспрессия выше 1 % наблюдалась в 71,4 % (5 из 7). В группе с отсутствием ЦО в 100 % (24 образца) случаев экспрессия была свыше 1 %. Таким образом, в нашем исследовании высокий уровень экспрессии гена *BCR-ABL* ($> 1 %$) наблюдался во всех группах больных, в том числе и в группе пациентов с ПЦО. Пациенты с низким уровнем экспрессии ($< 0,1 %$) имеются в группах с малым и частичным ЦО, в группе с частичным ЦО есть также пациенты с отсутствием экспрессии *BCR-ABL*. Доля образцов пациентов с большим и ПМО значительно возрастает в группе с ПЦО.

Анализ мутаций в гене *BCR-ABL*

Для проведения анализа мутаций мы сформировали группу из 50 больных, соответствующих критериям резистентности к иматинибу. В этой группе пациентов медиана экспрессии гена *BCR-ABL* составила 141,6 %. В состав группы входили 22 мужчины и 28 женщин с медианой возраста 46 лет.

С целью идентификации мутаций в гене *BCR-ABL* у 50 пациентов с ХМЛ проведен анализ изменений нуклеотидной последовательности тирозинкиназного домена *BCR-ABL* путем прямого секвенирования кДНК (рис. 2а и б). В результате проведенного нами исследования у пациентов с резистентностью к иматинибу выявлены 4 миссенс-мутации (M244V, T315I, M351T и H396R).

У 7 (14 %) больных с ХМЛ при секвенировании кДНК обнаружена замена цитозина на тимин в 944-м положении, приводящая к замене треонина на изолейцин в 315-м положении (T315I). Наличие мутации у всех больных с выявленными при секвенировании изменениями последовательности нуклеотидов подтверждено методом ПДРФ-анализа с помощью эндонуклеазы рестрикции DdeI (рис. 2в и г). Анализ про-

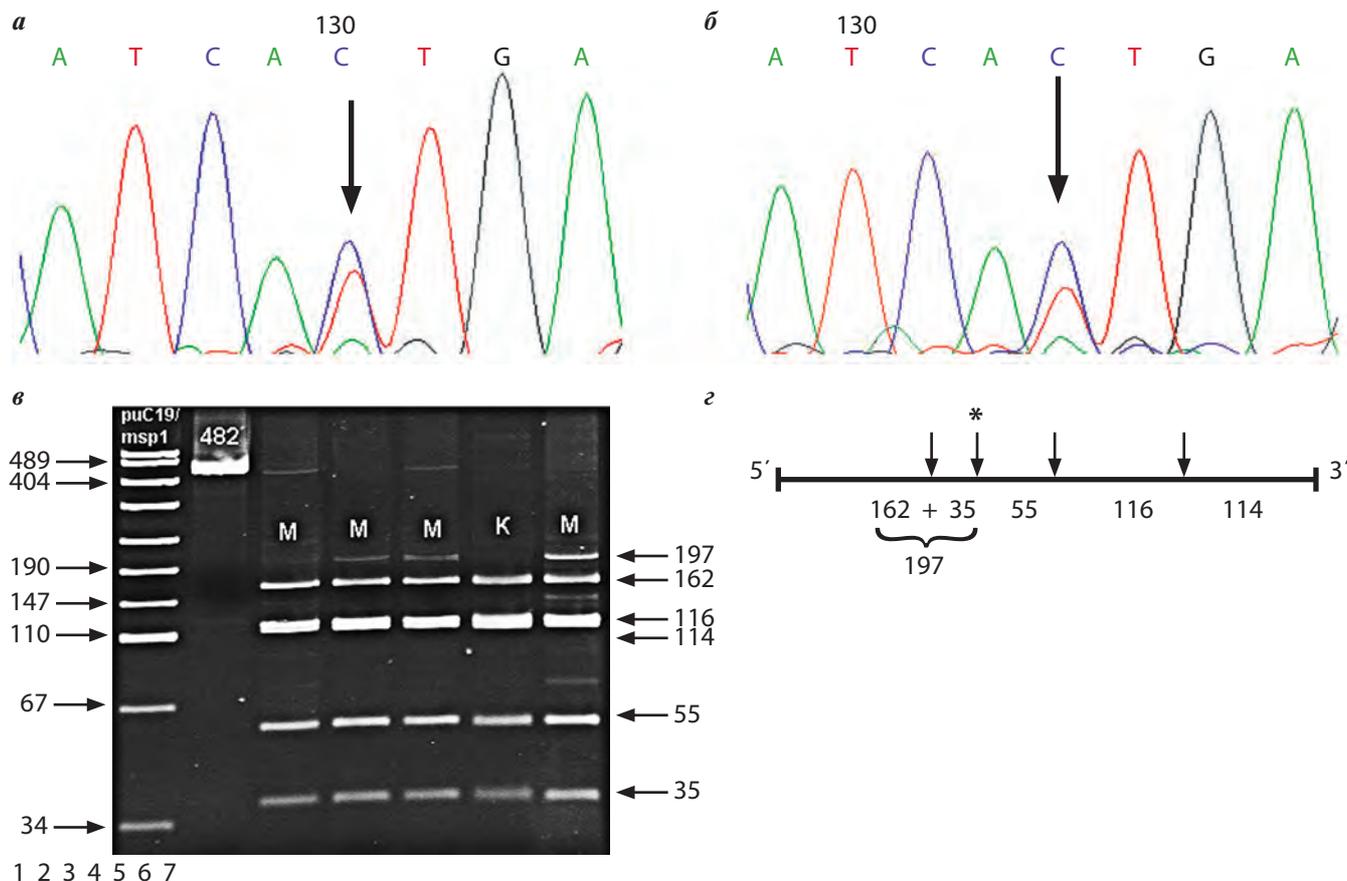


Рис. 2. Секвенирование 2 образцов кДНК с мутацией T315I (а, б) с последующим ПДРФ-анализом (в, г); в – электрофореграмма ПДРФ-анализа гена *BCR-ABL1* с помощью эндонуклеазы рестрикции *DdeI*. Дорожка 1 – маркер молекулярного веса *pUC19/MspI*; 2 – контрольный образец, не обработанный рестриктазой; 3, 4, 5, 7 – образцы кДНК с мутацией T315I; 6 – образец кДНК без мутации T315I; г – рестрикционная карта фрагмента кДНК длиной 482 п. о. для эндонуклеазы *DdeI*. Сайты рестрикции показаны стрелками. При мутации T315I пропадает один из сайтов узнавания для рестриктазы *DdeI* (отмечен *), с образованием фрагмента длиной 197 п. о.

водили после амплификации фрагмента кДНК длиной 482 п. о., который в норме содержит 4 сайта рестрикции для эндонуклеазы *DdeI*, гидролизующей кДНК на 5 фрагментов длиной 35, 55, 114, 116, 162 п. о. При возникновении замены цитозина на тимин пропадает один из сайтов рестрикции *DdeI* (отмечен * на рис. 2г), и у мутантного варианта *ABL*-транскрипта появляется дополнительный негидролизованный фрагмент длиной 197 п. о. В образцах с мутацией также были выявлены фрагменты длиной 162 п. о. и 35 п. о., что свидетельствует о клоновом характере мутаций, т. е. мутантные образцы представлены разным соотношением транскриптов дикого и мутантного типов.

Мутация T315I в гене *BCR-ABL* является, по данным литературы, наиболее распространенной мутацией, вызывающей резистентность ко всем известным ИТК [4, 5]. Треонин в положении 315 находится на периферии нуклеотид-связывающего сайта *ABL1* и формирует ключевое взаимодействие через водородную связь с иматинибом [24]. Мутация T315I разрывает это взаимодействие, ослабляет связывание иматиниба и приводит к полной нечувствительности к нему. Резистентность к терапии при этой мутации гена *BCR-ABL* невозможно преодолеть увеличением дозы има-

тиниба, так же как и терапией ИТК 2-го поколения, поэтому при наличии совместимого донора пациентам с мутацией T315I показана аллогенная трансплантация костного мозга [3].

В исследовании итальянской группы GIMEMA (Italian Group for Hematologic Malignancies of the Adult) [25] частота данной мутации у больных ХМЛ составила 12 %, в исследовании Catherine Roche-Lestienne у больных ХМЛ из Франции мутация T315I была выявлена с частотой 12,5 % [26], что коррелирует с результатами нашего исследования. При исследовании мутаций у больных из г. Ростова было обнаружено, что частота мутации T315I составляет 4 % [4]. Достаточно низкая частота этой мутации, возможно, связана с тем, что авторами в исследование были отобраны только больные с первичной резистентностью к иматинибу (рефрактерность).

У 10 пациентов с ХМЛ при секвенировании кДНК гена *BCR-ABL* нами была обнаружена замена тимина на цитозин в 1052-м положении, приводящая к замене метионина в положении 351 на треонин (M351T) (рис. 3а и б). Для подтверждения наличия мутации M351T проводился ПДРФ-анализ (рис. 3в и г) с использованием специфической эндонуклеазы *NcoI*.

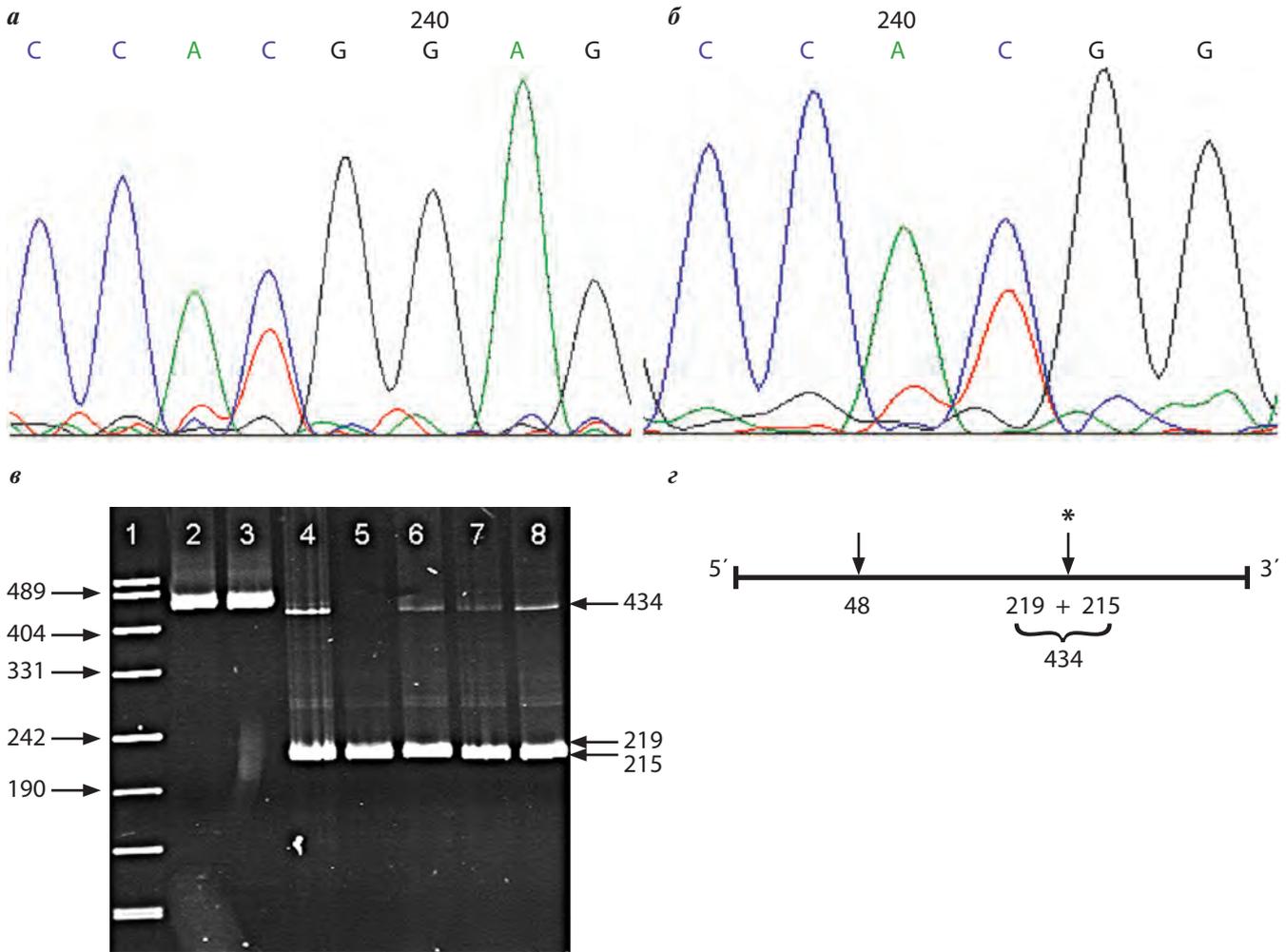


Рис. 3. Секвенирование 2 образцов кДНК с мутацией M351T (а, б) с последующим ПДРФ-анализом (в, з): в – электрофореграмма ПДРФ-анализа гена *BCR-ABL1* с помощью эндонуклеазы рестрикции *NcoI*. Дорожка 1 – маркер молекулярного веса *pUC19/MspI*; 2, 3 – контрольный образец, не обработанный рестриктазой; 4, 6, 7, 8 – образцы кДНК с мутацией M351T; 5 – образец кДНК без мутации M351T; з – рестрикционная карта фрагмента кДНК длиной 482 п. о. для эндонуклеазы *NcoI*. Сайты рестрикции показаны стрелками. При мутации M351T пропадает один из сайтов узнавания для рестриктазы *NcoI* (отмечен *) и образуется дополнительный фрагмент длиной 434 п. о.

Гидролиз амплифицированного фрагмента кДНК без мутации приводит к образованию 3 фрагментов длиной 219, 215 и 48 п. о. При наличии мутации M351T пропадает один из двух сайтов узнавания эндонуклеазы *NcoI* и образуются 2 фрагмента длиной 434 п. о. и 48 п. о.

Мутация M351T в гене *BCR-ABL* является одной из часто встречаемых при ХМЛ мутаций, связанных с развитием резистентности к терапии [3]. Данная мутация приводит к умеренному снижению чувствительности к иматинибу в тестах *in vitro*, которая восстанавливается при концентрации препарата 1–4 мкмоль (концентрация 4 мкмоль соответствует суточной дозе иматиниба 800 мг/сут) [3, 27]. Предполагается, что в основе развития резистентности при этой мутации лежит нарушение связи между SH2- и киназным доменами ABL-киназы. В норме метионин в положении 351 связывается с SH2-доменом и стабилизирует неактивную конформацию ABL-киназы. Показано, что терапия высокими дозами иматиниба может привести

к преодолению резистентности, однако более эффективный результат достигается при применении ИТК 2-го поколения [23].

По литературным данным, частота мутации M351T у больных ХМЛ из Германии составляет 6 % [28], в Италии и Австралии мутация M351T определяется с частотой 11 % [25, 29]. У больных ХМЛ из Республики Башкортостан мутация M351T встречается с более высокой частотой – 20 %, и является самой распространенной мутацией.

Мутация H396R в гене *BCR-ABL*, возникающая в результате замены аденина на гуанин в 1187-м положении, обнаружена у 1 (2 %) больного (рис. 4а). В исследовании Hochhaus et al. (Германия, 2002) частота мутации H396R составила 1,5 % [28], в то время как в исследовании итальянской группы GIMEMA (Italian Group for Hematologic Malignancies of the Adult) ее частота была 0,7 % [25].

Показано, что наличие данной мутации может являться причиной резистентности к терапии иматини-

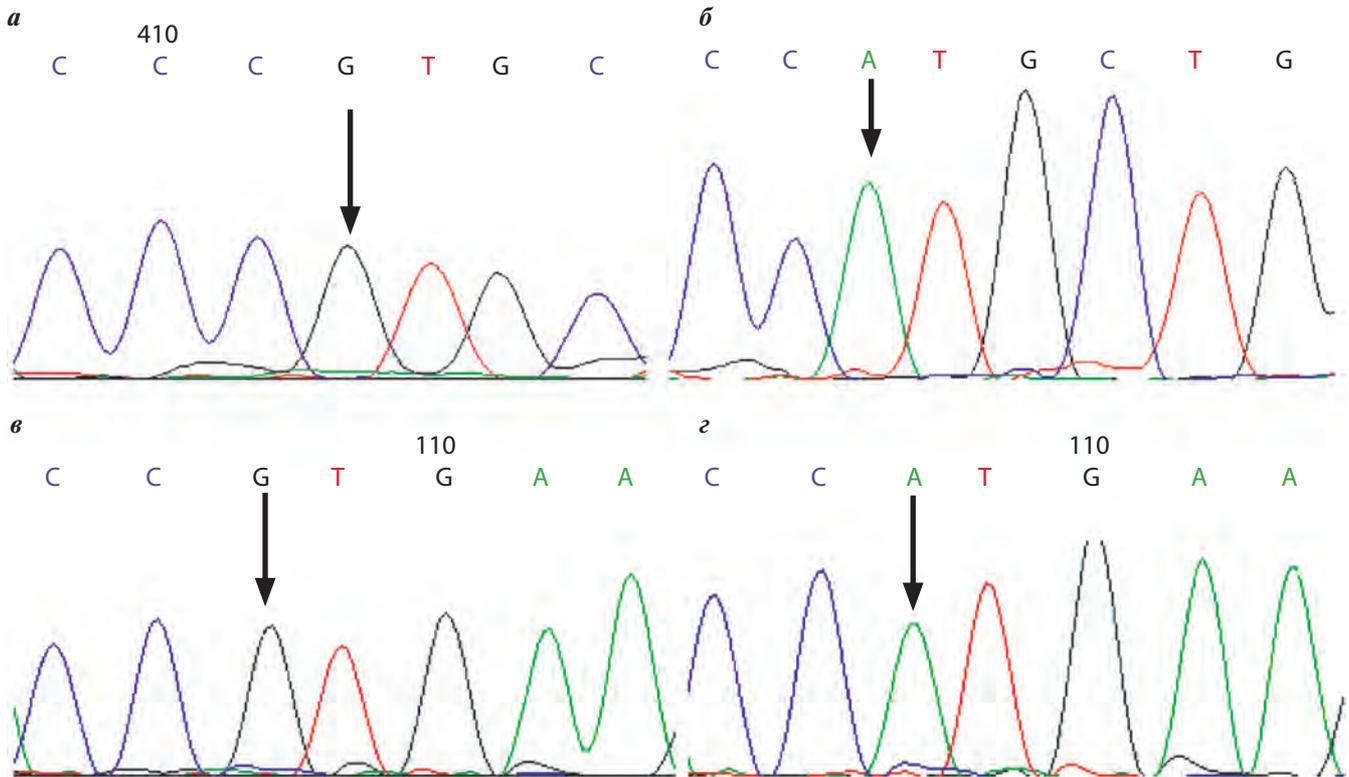


Рис. 4. Результаты секвенирования образцов кДНК с мутациями H396R (а), M244V (в) и в норме (б, з)

бом. Мутация H396R дестабилизирует расположение активационной (A) петли так, что домен киназы не может перейти в неактивную пространственную организацию, необходимую для связывания с иматинибом. Обнаружение данной мутации является основанием для повышения дозы иматиниба. В случае отсутствия положительного результата необходимо перейти на терапию препаратами 2-го поколения (нилотиниб и дазатиниб) [3].

У 1 больного ХМЛ нами выявлена замена аденина на гуанин в 730-й позиции, приводящая к замене метионина в 244-м положении на валин (M244V) (рис. 4в). Несмотря на то, что фосфорилирующая активность ABL-киназы с данной мутацией незначительно отличается от активности ABL-киназы дикого типа, в работах А. Corbin и Т. O'Hare et al. была доказана роль мутации M244V в развитии резистентности при лечении иматинибом у больных ХМЛ. По мнению авторов, при обнаружении данной мутации у пациентов необходимо увеличить дозу иматиниба или назначить ИТК 2-го поколения [7, 27].

Частота мутации M244V в исследовании группы GIMEMA достигла 4,4 % [25]. По данным Hochhaus et al., мутация M244V определяется в 1,5 % случаев [28]. В выборке больных ХМЛ из Республики Башкортостан частота мутации M244V составила 2 %.

В целом, в результате проведенного исследования мутаций в гене *BCR-ABL* у 16 резистентных к иматинибу пациентов из 50 (32 %) были выявлены 4 мутации в киназном домене. У 7 пациентов с ХМЛ была обна-

ружена мутация M351T, у 4 пациентов – мутация T315I, у 3 больных было выявлено по 2 мутации – T315I и M351T, и у 2 пациентов было определено по 1 мутации – M244V и H396R.

Частота встречаемости обнаруженных нами в гене *BCR-ABL* мутаций варьировала при различных фазах заболевания. У большинства резистентных пациентов была хроническая фаза заболевания. У 7 (17 %) из них были обнаружены мутации в гене *BCR-ABL*: M351T ($n = 4$), T315I ($n = 1$), M244V ($n = 1$) и H396R ($n = 1$). У 6 пациентов, находившихся в фазе акселерации, были выявлены мутации: у 3 больных – мутация M351T, у 2 – мутация T315I, у 1 – 2 мутации, T315I и M351T. Из 3 пациентов, у которых наблюдался бластный криз, у 1 была определена мутация T315I, у 2 – по 2 мутации, T315I и M351T.

Нами проведен сравнительный анализ уровня экспрессии химерного гена у больных с различными мутациями в киназном домене *BCR-ABL*. Установлено, что наиболее высокий средний уровень экспрессии химерного гена наблюдается у пациентов с компаунд-мутацией T315I + M351T (медиана экспрессии – 442,3 %), а также у пациентов с мутацией M351T (медиана экспрессии – 94,6 %).

Таким образом, в результате проведенного анализа мутаций в гене *BCR-ABL* у обследованной группы больных ХМЛ было установлено, что мутации киназного домена встречаются у 32 % больных ХМЛ, резистентных к терапии иматинибом, что свидетельствует о необходимости проведения своевременной

диагностики данных мутаций и коррекции тактики лечения.

Обсуждение

В результате проведенного исследования была показана корреляция ЦО и МО, проявляющаяся в том, что с уменьшением процентного содержания Ph-позитивных клеток увеличивалась доля образцов с более слабым уровнем экспрессии.

В то же время мониторинг эффективности лечения иматинибом в группе больных с определенным уровнем ЦО показал неоднородность в структуре МО: разброс значений экспрессии гена *BCR-ABL* в каждой группе пациентов был очень широким. Пациенты с низким уровнем экспрессии (< 0,1 %) имеются в группах с малым и частичным ЦО, в группе с частичным ЦО есть также пациенты с отсутствием экспрессии гена *BCR-ABL*. Тем не менее, с учетом низкой разрешающей способности цитогенетического метода (10^{-2}) и в особенности после достижения цитогенетической ремиссии, оценивать дальнейшую редукцию лейкозного клона клеток можно только с помощью молекулярного метода ПЦР.

Мониторинг лечения ХМЛ в настоящее время должен включать как цитогенетические, так и молекулярные исследования (определение уровня экспрессии *BCR-ABL*, поиск мутаций в гене *BCR-ABL*) и проводиться регулярно. Такой подход позволяет оценить ди-

намику терапии и предсказать возможность развития рецидива. Значимость молекулярного анализа определяется также и тем, что уровень МО служит предиктором безрецидивной выживаемости. Повышение уровня экспрессии *BCR-ABL*-транскрипта во время терапии иматинибом косвенно может указывать на наличие мутаций в гене *BCR-ABL*, являющихся ведущей причиной резистентности к препарату. Как следствие, молекулярный мониторинг целесообразно использовать в качестве скрининговой стратегии для мутационного анализа.

Заключение

Мутации киназного домена гена *BCR-ABL* являются одной из основных причин резистентности к терапии иматинибом у некоторых пациентов с ХМЛ, что подтверждается данными, полученными в нашем исследовании. Мутационный анализ необходим для выяснения причин резистентности к иматинибу и поиска путей ее преодоления, определения прогноза течения заболевания, особенно при продолжении терапии иматинибом. В 14 % случаев у больных ХМЛ встречается мутация T315I, приводящая к резистентности к лечению всеми видами ИТК, что свидетельствует о необходимости проведения скрининга данной мутации у всех пациентов с ХМЛ, имеющих признаки резистентности. Раннее и своевременное обнаружение мутации T315I позволит изменить тактику лечения в пользу трансплантации костного мозга.

ЛИТЕРАТУРА

- Savona M., Talpaz M. Getting to the stem of chronic myeloid leukaemia. *Nat Rev Cancer* 2008;8:341–50.
- Kurzrock R., Kantarjian H., Druker B. et al. Philadelphia chromosome–positive leukemias: from basic mechanisms to molecular therapeutics. *Ann Intern Med* 2003;138:819–30.
- Куцев С.И., Вельченко М.В. Значение анализа мутаций гена *BCR-ABL* в оптимизации таргетной терапии хронического миелолейкоза. *Клин онкогематол* 2008;1(3):190–9.
- Куцев С.И., Вельченко М.В., Морданов С.В. Роль мутаций гена *BCR-ABL* в развитии рефрактерности к иматинибу у пациентов с хроническим миелолейкозом. *Клин онкогематол* 2008;1(4):303–9.
- Quintas-Cardama A., Kantarjian H., Cortes J. Mechanisms of primary and secondary resistance to imatinib in chronic myeloid leukemia. *Cancer Control* 2009;16(2):122–31.
- Barnes D.J., Palaiologou D., Panousopoulou E. et al. *BCR-ABL* expression levels determine the rate of development of resistance to imatinib mesylate in chronic myeloid leukemia. *Cancer Res* 2005;65(19):8912–9.
- Corbin A., La Rose P., Stoffregen E. et al. Several *BCR-ABL* kinase domain mutants associated with imatinib mesylate resistance remain sensitive to imatinib. *Blood* 2003;101(11):4611–4.
- Druker B.J., Sawyers C.L., Kantarjian H. et al. Activity of a specific inhibitor of the *BCR-ABL* tyrosine kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia with the Philadelphia chromosome. *N Engl J Med* 2001;344(14):1038–42.
- Виноградова О.Ю., Туркина А.Г., Хорошко Н.Д. Организация терапии хронического миелолейкоза. Первый общероссийский регистр больных хроническим миелолейкозом: анализ и перспективы. *Гематол и трансфузиол* 2008;53(5):54–8.
- Sessions J. Chronic myeloid leukemia in 2007. *J Manag Care Pharm* 2007;13(Suppl S-a):S4–S7.
- Аксенова Е.В., Крутов А.А., Солдатова И.Н. и др. Стандартизация молекулярной диагностики хронического миелолейкоза. *Клин онкогематол* 2010;3(2):160–5.
- Baccarani M., Cortes J., Pane F. et al. Chronic myeloid leukemia: an update of concepts and management recommendations of European LeukemiaNet. *J Clin Oncol* 2009;27:6041–51.
- Jha C.B., Kucheria K., Choudhary V.P. Diagnostic role of conventional cytogenetics and fluorescence in situ hybridization (FISH) in chronic myeloid leukemia patients. *KUMJ* 2006;4(2):171–5.
- Gabert J., Beillard E., van der Velden V.H. et al. Standardisation and quality control studies of «real-time» quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia. A Europe Against Cancer program. *Leukemia* 2003;17:2318–57.
- Туркина А.Г. Ингибитор сигнальных путей STI 571 (Signal Transductor Inhibitor) – новое направление в лечении хронического миелолейкоза. *Совр онкол* 2001;3(2):46–8.
- Мисюрин А.В., Аксенова Е.В., Крутов А.А. и др. Молекулярная

диагностика хронического миелолейкоза. Гематол и трансфузиол 2007;2:35–40.

17. Branford S., Hughes T.P., Rudzki Z. Monitoring chronic myeloid leukaemia therapy by real-time quantitative PCR in blood is a reliable alternative to bone marrow cytogenetics. Br J Haematol 1999;107:587–99.

18. Дубина М.В., Куевда Д.А., Хомякова Т.Е. и др. Молекулярный мониторинг эффективности терапии больных хроническим миелолейкозом в России. Совр онкол 2010;4(12):11–7.

19. Чельшева Е.Ю., Туркина А.Г., Мисюрин А.В., Захарова А.В. Раннее выявление цитогенетического рецидива при динамическом исследовании уровня BCR-ABL-транскрипта у больного хроническим миелолейкозом. Гематол и трансфузиол 2007;2:50–1.

20. Kaeda S.A., Chase A., Goldman J.M. Cytogenetic and molecular monitoring of residual disease in chronic myeloid leukemia. Acta Hematol 2002;107:64–75.

21. Goldman J., Gordon M. Why do chronic myelogenous leukemia stem cells survive allogeneic stem cell transplantation or imatinib: does it really matter? Leuk Lymphoma 2006;47:1–7.

22. Soverini S., Martinelli G., Amabile M. et al. Denaturing-HPLC-based assay for detection of ABL mutations in chronic myeloid leukemia patients resistant to Imatinib. Clin Chem 2004;50:1205–13.

23. Куцев С.И., Вельченко М.В., Зельцер А.Н. Молекулярно-генетический мониторинг терапии хронического миелолейкоза ингибиторами тирозинкиназ. Онкогематол 2008;4:17–25.

24. Nagar B., Bornmann W.G., Pellicena P. et al. Crystal structures of the kinase domain of c-Abl in complex with the small molecule inhibitors PD173955 and imatinib (STI-571). Cancer Res 2002;62(15):4236–43.

25. Soverini S., Colarossi S., Gnan A. et al. Contribution of ABL kinase domain mutations to imatinib resistance in different subsets of Philadelphia-positive patients: by

the GIMEMA working party on chronic myeloid leukemia. Clin Cancer Res 2006;12(24):7374–9.

26. Roche-Lestienne C., Soenen-Cornu V., Gardel-Duflos N. et al. Several types of mutations of the ABL gene can be found in chronic myeloid leukemia patients resistant to STI571, and they can pre-exist to the onset of treatment. Blood 2002;100:1014–8.

27. O'Hare T., Eide C.A., Deininger M. BCR-ABL kinase domain mutations, drug resistance, and the road to a cure for chronic myeloid leukemia. Blood 2007;110(7):2242–9.

28. Hochhaus A., Kreil S., Corbin A.S. et al. Molecular and chromosomal mechanisms of resistance to imatinib (STI571) therapy. Leukemia 2002;16(11):2190–6.

29. Branford S., Rudzki Z., Walshet S. et al. High frequency of point mutations clustered within the adenosine triphosphate-binding region of BCR/ABL in patients with chronic myeloid leukemia or Ph-positive acute lymphoblastic leukemia who develop imatinib (STI571) resistance. Blood 2002;99:3472–5.