

АМПЛИФИКАЦИЯ ГЕНА *BCR-ABL* У ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКИМ МИЕЛОИДНЫМ ЛЕЙКОЗОМ, РЕФРАКТЕРНЫХ К ИМАТИНИБУ

С.И. Куцев, С.В. Морданов

Ростовский государственный медицинский университет, Ростов-на-Дону

Контакты: Сергей Иванович Куцев kutsev@mail.ru

У больных хроническим миелоидным лейкозом (ХМЛ), получающих терапию иматинибом, с высокой частотой достигается полный цитогенетический ответ. Тем не менее у некоторых пациентов наблюдается первичная или приобретенная резистентность к иматинибу. В данной работе исследовано значение амплификации гена *BCR-ABL* в развитии первичной резистентности к иматинибу у пациентов с ХМЛ. Амплификация гена *BCR-ABL* выявлена у 18% больных ХМЛ, рефрактерных к иматинибу. Показано достоверное снижение вероятности достижения полного цитогенетического ответа у пациентов с амплификацией гена *BCR-ABL*.

Ключевые слова: хронический миелоидный лейкоз, рефрактерность к иматинибу, амплификация гена *BCR-ABL*

BCR-ABL GENE AMPLIFICATION IN PATIENTS WITH CHRONIC MYELOID LEUKEMIA AND IMATINIB RESISTANCE

S.I. Kutsev, S.V. Mordanov

Rostov state medical university, Rostov-on-Don

The treatment of Ph-positive chronic myeloid leukemia (CML) has achieved significant progress with the tyrosine kinase inhibitor (TKI) imatinib. Complete cytogenetic remission is a standard for patients treated in chronic phase. Nevertheless, primary and acquired resistance has been observed in few CML patients. Imatinib resistance in patients is related to heterogeneous mechanisms. The role of the *BCR-ABL*-related mechanism of imatinib resistance — *BCR-ABL* gene amplification in primary resistant cases was studied. The *BCR-ABL* gene amplification was established in 18% refractory to imatinib patients. Decreasing probability of complete cytogenetic response was revealed in these cases.

Key words: chronic myeloid leukemia, imatinib resistance, *BCR-ABL* gene amplification

Введение

В клинических исследованиях иматиниба (иматиниба мезилат, STI571) была показана высокая эффективность этого препарата в терапии хронического миелолейкоза (ХМЛ). Так, через 5 лет от начала терапии гливексом полный гематологический ответ был получен у 98% больных ХМЛ, большой цитогенетический ответ (БЦГО) — у 92% и полный цитогенетический ответ (ПЦГО) — у 87% пациентов; 5-летняя выживаемость без прогрессии заболевания составила 93% [1].

Несмотря на хорошие результаты, существует проблема резистентности к иматинибу. Первичная резистентность (или рефрактерность) определяется как отсутствие гематологического ответа через 3 мес, малого цитогенетического ответа (Ph-хромосома выявляется в 35—65% клеток костного мозга) — через 6 мес, БЦГО (Ph-хромосома определяется менее чем в 35% клеток костного мозга) — через 12 мес, ПЦГО (Ph-хромосома в клетках костного мозга не выявляется) — через 18 мес

терапии. Вторичная, или приобретенная, резистентность — это потеря гематологического, цитогенетического или молекулярного ответа либо прогрессия заболевания до фазы акселерации или бластного криза [2].

В основе развития резистентности к иматинибу лежат несколько механизмов, которые подразделяют на *BCR-ABL*-зависимые и *BCR-ABL*-независимые [3]. К *BCR-ABL*-зависимым механизмам относят мутации и амплификацию гена *BCR-ABL*. *BCR-ABL*-независимые механизмы включают в себя «клональную эволюцию» (появление дополнительных хромосомных aberrаций в Ph-позитивных лейкозных клетках), активацию *BCR-ABL*-независимых путей, например, членов семейства Src-киназ, избыточное связывание иматиниба с сывороточным α -1-кислым гликопротеином, дисбаланс между клеточными белками — переносчиками препарата.

Данные литературы о роли амплификации гена *BCR-ABL* в развитии резистентности к иматинибу довольно ограничены. Впервые в экспе-

риментах *in vitro* было показано, что гиперэкспрессия *BCR-ABL*-транскрипта, в основе которой лежит амплификация гена *BCR-ABL*, является одним из механизмов резистентности к иматинибу [4–6].

М.Е. Gorre и соавт. [7] методом флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) впервые показали *in vivo* амплификацию гена *BCR-ABL* у 3 из 9 пациентов, резистентных к иматинибу (33,3%).

А. Hochhaus также обнаружил множественные копии гена *BCR-ABL* методом FISH у 2 (28,6%) из 7 обследованных больных ХМЛ с первичной резистентностью и не выявил их ни у одного из 25 пациентов с рецидивом ХМЛ [8].

Цель исследования — изучение роли *BCR-ABL*-зависимого механизма резистентности, а именно — амплификации гена *BCR-ABL* — в развитии рефрактерности к иматинибу.

Материалы и методы

Проведено обследование 298 пациентов с диагнозом ХМЛ, подтвержденным цитогенетическим (обнаружение транслокации t(9;22)(q34;q11.2) в клетках костного мозга) и/или молекулярно-цитогенетическим (обнаружение слитного гена *BCR-ABL* в клетках костного мозга) методом. Все включенные в исследование больные ХМЛ получали иматиниб в дозе 400, 600 или 800 мг/сут в течение ≥6 мес в соответствии с рекомендациями Европейского общества по лечению лейкозов (ELN) [2]. Обязательным условием включения больных ХМЛ в исследование являлось наличие информированного согласия пациентов на анонимное использование результатов проведенного обследования в научных целях.

Медиана возраста на момент постановки диагноза составила 46,6 года (минимальный возраст — 12,9, максимальный — 77,4 года). Соотношение мужчины/женщины — 137/161. В исследование включались пациенты, начавшие терапию иматинибом как в хронической фазе ($n=215$; 72,1%), так и в фазе акселерации ($n=83$; 27,9%). Медиана длительности терапии иматинибом составила 24 (от 6 до 84) мес.

С целью цитогенетической диагностики и мониторинга эффективности терапии исследовали стерильный пунктат костного мозга. Всего было выполнено 1190 диагностических и мониторинговых исследований у 298 пациентов. Культивирование клеток костного мозга проводилось по об-

Результаты FISH-исследований костного мозга больных ХМЛ с амплификацией гена *BCR-ABL*

№	Ф.И.	Результат FISH-анализа
1	Щ.Л.	nuc ish (ABL1x3), (BCRx3), (ABL1conBCRx2)[161/200]/ (ABL1x4), (BCRx4), (ABL1conBCRx3)[10/200]/(ABL1x8-12), (BCRx9-12), (ABL1conBCRx9-12) [3/200] / (ABL1, BCR)x2[26/200]
2	Х.К.	nuc ish (ABL1x3), (BCRx3), (ABL1conBCRx2)[111/200]/(ABL1x4), (BCRx4), (ABL1conBCRx3)[71/200]/ (ABL1x2), (BCRx2)[18/200]
3	Т.З.	nuc ish (ABL1x3), (BCRx3), (ABL1conBCRx2)[87/200]/ (ABL1x2), (BCRx2), (ABL1conBCRx1)[62/200]/ (ABL1x5-6), (BCRx5-6), (ABL1conBCRx4)[6/200]/ (ABL1x2), (BCRx2)[45/200]
4	С.О.	nuc ish (ABL1x3), (BCRx3), (ABL1conBCRx2)[106/140]/ (ABL1x2), (BCRx2), (ABL1conBCRx1)[14/140]/ (ABL1x4), (BCRx4), (ABL1conBCRx3)[4/140]/ (ABL1x2), (BCRx2)[76/140]
5	Р.Л.	nuc ish (ABL1x3), (BCRx3), (ABL1conBCRx2)[140/200]/ (ABL1x4), (BCRx4), (ABL1conBCRx3)[44/200]/ (ABL1x2), (BCRx2)[16/200]
6	П.А.	nuc ish (ABL1x4), (BCRx4), (ABL1conBCRx3)[144/200]/ (ABL1x3), (BCRx3), (ABL1conBCRx2)[46/200]/ (ABL1x2), (BCRx2)[10/200]
7	П.Л.	nuc ish (ABL1x3), (BCRx3), (ABL1conBCRx2)[47/200]/ (ABL1x4), (BCRx4), (ABL1conBCRx3)[6/200]/ (ABL1x2), (BCRx2)[147/200]
8	К.С.	nuc ish (ABL1x3), (BCRx3), (ABL1conBCRx2)[169/200]/ (ABL1x4-5), (BCRx4-5), (ABL1conBCRx3-4)[6/200]/(ABL1x2), (BCRx2) [25/200]
9	К.В.	nuc ish (ABL1x3), (BCRx3), (ABL1conBCRx2)[132/200]/ (ABL1x2), (BCRx2), (ABL1conBCRx1)[35/200]/ (ABL1x4), (BCRx4), (ABL1conBCRx3) [15/200]/ (ABL1x3), (BCRx2), (ABL1conBCRx1)[14/200]/(ABL1x2), (BCRx2)[4/200]
10	Б.С.	nuc ish (ABL1x3), (BCRx3), (ABL1conBCRx2)[28/200]/ (ABL1x4), (BCRx4), (ABL1conBCRx3)[8/200]/ (ABL1x2), (BCRx2)[164/200]
11	Б.О.	nuc ish (ABL1x3), (BCRx3), (ABL1conBCRx2)[169/200]/ (ABL1x4-5), (BCRx4-5), (ABL1conBCRx3-4)[11/200]/ (ABL1x2), (BCRx2)[20/200]
12	Б.А.	nuc ish (ABL1x3), (BCRx3), (ABL1conBCRx2)[136/200]/ (ABL1x4), (BCRx4), (ABL1conBCRx3)[41/200]/ (ABL1x2), (BCRx2)[23/200]
13	М.М.	nuc ish (ABL1x3), (BCRx3), (ABL1conBCRx2)[102/200]/ (ABL1x4), (BCRx4), (ABL1conBCRx3)[65/200]/ (ABL1x2), (BCRx2)[33/200]
14	Л.Г.	nuc ish (ABL1x3), (BCRx3), (ABL1conBCRx2)[26/200]/ (ABL1x4), (BCRx4), (ABL1conBCRx3)[23/200]/ (ABL1x2), (BCRx2)[151/200]
15	Д.Л.	nuc ish (ABL1x3), (BCRx3), (ABL1conBCRx2)[47/200]/ (ABL1x4), (BCRx4), (ABL1conBCRx3)[6/200]/ (ABL1x2), (BCRx2)[147/200]
16	Г.Л.	nuc ish (ABL1x3), (BCRx3), (ABL1conBCRx2)[154/200]/ (ABL1x4), (BCRx4), (ABL1conBCRx3)[16/200]/ (ABL1x2), (BCRx2)[30/200]
17	С.Р.	nuc ish (ABL1x3), (BCRx3), (ABL1conBCRx2)[120/200]/ (ABL1x4), (BCRx4), (ABL1conBCRx3)[6/200]/ (ABL1x2), (BCRx2)[74/200]
18	К.В.	nuc ish (ABL1x3), (BCRx3), (ABL1conBCRx2)[154/200]/ (ABL1x4), (BCRx4), (ABL1conBCRx3)[26/200]/ (ABL1x2), (BCRx2)[20/200]

шепринятой методике. Цитогенетические препараты окрашивались GTG-дифференциальным методом. У каждого пациента проанализировано не менее 20 метафазных пластинок клеток костного мозга.

FISH хромосом с ДНК-зондом к слитному гену *BCR-ABL* проводилась при отсутствии метафазных пластинок в стандартном цитогенетическом исследовании, а также в случае резистентности к терапии иматинибом для выявления амплификации гена *BCR-ABL*. Всего выполнено 172 FISH-анализа. В работе использован двухцветный ДНК-зонд 22q11.2 LSI *BCR* SpectruGreen/9q34 LSI *ABL* SpectrumOrange dual fusion DNA probe («Vysis», Abbott). FISH-анализ проводился согласно протоколу производителя на цитогенетических препаратах, содержащих как метафазные хромосомы, так и интерфазные ядра. В каждом случае ХМЛ проанализировано не менее 200 интерфазных ядер клеток костного мозга. Результаты FISH-исследований приведены в работе в соответствии с Международной цитогенетической номенклатурой 2009 г. [9].

Кариотипирование и FISH-исследования проводили с помощью микроскопа Аксиоплан-2-мот («Carl Zeiss») и программного обеспечения *ikaros* и *isis* («Metasystems»).

Статистическая обработка полученных данных осуществлялась с использованием пакета прикладных программ Statistica 6,0 и электронных таблиц Excel 2003. Расчеты выполнены в соответствии с рекомендациями О.Ю. Ребровой [10] по обработке численных результатов экспериментов в медицине.

Результаты и обсуждение

Медиана длительности терапии иматинибом в нашем исследовании составила 24 (от 6 до 84) мес. Из 298 обследованных пациентов с ХМЛ, получавших терапию иматинибом в течение ≥ 6 мес, оптимальный ответ, т.е. БЦГО, достигнут у 197 (66,1%) больных. Из 263 пациентов, получавших терапию иматинибом на протяжении ≥ 12 мес, оптимальный ответ, т.е. ПЦГО, получен у 157 (59,7%) пациентов. Из 197 больных ХМЛ, получавших терапию иматинибом в течение ≥ 18 мес, ПЦГО зафиксирован у 97 (49,2%). У остальных 100 больных ХМЛ (50,8%) после 18 мес терапии не было получено ПЦГО, что согласно критериям ELN [2] свидетельствует о рефрактерности к проводимому лечению.

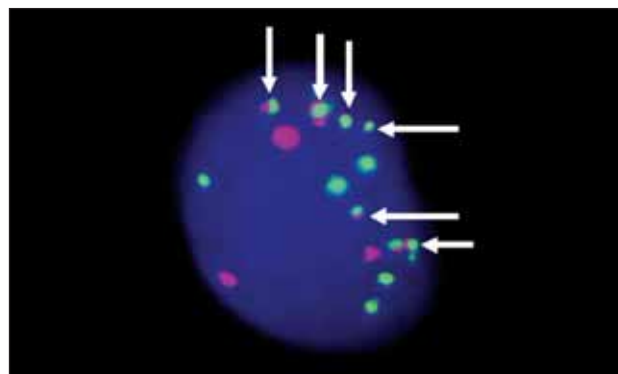


Рис. 1. Амплификация гена *BCR-ABL* в *BCR-ABL*-позитивной клетке костного мозга (последовательность *ABL* мечена красным цветом флуорохромом *SpectrumOrange*; последовательности *BCR* мечена зеленым цветом флуорохромом *SpectrumGreen*, желтые слитные сигналы гена *BCR-ABL* указаны стрелками). FISH хромосом с ДНК-зондом к слитному гену *BCR-ABL*. $\times 1000$

В результате проведенного исследования методом FISH с ДНК-зондом к слитному гену *BCR-ABL* его амплификация выявлена у 18 (18%) рефрактерных пациентов (см. таблицу).

При FISH-исследовании число клеток с амплификацией гена *BCR-ABL* у каждого пациента варьировало от 3 до 72% из 200 анализируемых клеток костного мозга. Количество дополнительных копий гена *BCR-ABL* в каждой клетке с его амплификацией равнялось от 1 до 6 (рис. 1).

Также был проведен FISH-анализ с ДНК-зондом к гену *BCR-ABL* у 48 больных, достигших оптимального ответа на терапию иматинибом, и у 24 пациентов с впервые выявленным ХМЛ. Ни у одного из этих больных не обнаружено амплификации гена *BCR-ABL*.

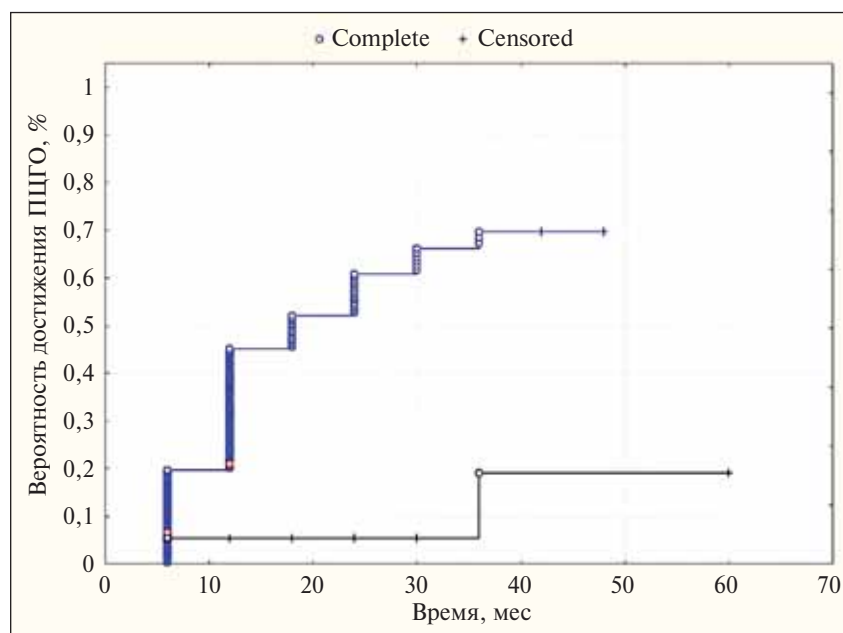


Рис. 2. Вероятность достижения ПЦГО на терапию иматинибом у больных ХМЛ в зависимости от наличия амплификации гена *BCR-ABL* (синяя кривая — без амплификации; черная кривая — с амплификацией)

В нашем исследовании, выполненном на довольно обширной когорте рефрактерных к иматинибу пациентов с ХМЛ, амплификация гена *BCR-ABL* имела место в 18% случаев. С учетом влияния амплификации гена *BCR-ABL* на достижение цитогенетического ответа на фоне терапии иматинибом следует отметить, что у некоторых рефрактерных пациентов с дополнительными копиями гена *BCR-ABL* сохраняется возможность достижения ПЦГО. Однако в нашем исследовании у больных с амплификацией гена *BCR-ABL* ($n=18$) вероятность достижения ПЦГО через 36 мес терапии иматинибом не превышает 20%, тогда как у пациентов без амплификации этого гена она достигает 70%. Анализ вероятности достижения ПЦГО в зависимости от наличия амплификации гена *BCR-ABL* показал ее достоверное ($p=0,00034$) снижение у больных ХМЛ с амплификацией гена *BCR-ABL* по сравнению с группой пациентов с ХМЛ без нее (рис. 2).

Таким образом, амплификация гена *BCR-ABL* является неблагоприятным прогностическим фактором для достижения цитогенетического ответа на фоне терапии иматинибом и предполагает изменение тактики терапии ХМЛ: повышение дозы иматиниба или перевод на терапию ингибиторами ти-

розинкиназ второго поколения. В связи с этим следует отметить, что 1 из 18 пациентов, рефрактерных к иматинибу, имевший признаки амплификации гена *BCR-ABL*, был переведен на терапию ингибитором тирозинкиназ второго поколения — нилоти-нибом в дозе 800 мг/сут, через 12 мес лечения у него был достигнут ПЦГО.

Заключение

Обнаружение лейкозных клеток с амплификацией гена *BCR-ABL* на фоне терапии иматинибом является неблагоприятным прогностическим фактором для достижения цитогенетического ответа на проводимое лечение и предполагает изменение тактики терапии при ХМЛ. В настоящее время анализ амплификации гена *BCR-ABL* у пациентов, резистентных к терапии иматинибом и другими ингибиторами тирозинкиназ, не входит в алгоритм обязательного мониторинга терапии ХМЛ. FISH-анализ с ДНК-зондом к гену *BCR-ABL* проводится только в случае отсутствия митотически делящихся клеток костного мозга. Между тем FISH-анализ позволяет выявлять клоны опухолевых клеток с множественными копиями гена *BCR-ABL* и должен проводиться, по крайней мере, у пациентов с первичной резистентностью (рефрактерностью) к иматинибу.

Л и т е р а т у р а

1. Druker B.J., Guilhot F., O'Brien S.G. et al. Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2006;355(23):2408—17.
2. Baccarani M., Saglio G., Goldman J. et al. Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European Leukemia Net. *Blood* 2006;108(6):1809—20.
3. Kantarjian H., Talpaz M., Giles F. et al. New insights into the pathophysiology of chronic myeloid leukemia and imatinib resistance. *Ann Intern Med* 2006;145(12):913—23.
4. Le Coutre P., Tassi E., Varella-Garcia M. et al. Induction of resistance to the Abelson inhibitor STI571 in human leukemic cells through gene amplification. *Blood* 2000;9:1758—66.
5. Mahon F.X., Deininger M.W., Schultheis B. et al. Selection and characterization of BCR-ABL positive cell lines with differential sensitivity to the tyrosine kinase inhibitor STI571: diverse mechanisms of resistance. *Blood* 2000;96:1070—9.
6. Weisberg E., Griffin J.D. Mechanism of resistance to the ABL tyrosine kinase inhibitor STI571 in BCR/ABL-transformed hematopoietic cell lines. *Blood* 2000;95:3498—505.
7. Gorre M.E., Ellwood-Yen K., Chiosis G. et al. BCR-ABL point mutants isolated from patients with imatinib mesylateresistant chronic myeloid leukemia remain sensitive to inhibitors of the BCR-ABL chaperone heat shock protein 90. *Blood* 2002;100:3041—4.
8. Hochhaus A. Cytogenetic and molecular mechanisms of resistance to imatinib. *Semin Hematol* 2003;40(Suppl 2):69—79.
9. Shaffer L.G., Slovak M.L., Campbell L.J. An International system for human cytogenetic nomenclature (2009). Karger, 2009.
10. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. М.: Медицина Сфера, 2002.