

Роль мутаций гена BCR-ABL в развитии рефрактерности к иматинибу у пациентов с хроническим миелолейкозом

С. И. Куцев, М. В. Вельченко, С. В. Морданов

РЕФЕРАТ

The Role of BCR-ABL Gene Mutation Analysis in Refractoriness to the Imatinib Therapy of Patients with Chronic Myeloid Leukemia

S. Kutsev, M. Veichenko, S. Mordanov

SUMMARY

Despite the high rate of cytogenetics remission achieved with imatinib for the treatment of CML, primary and acquired resistance to this tyrosine kinase inhibitor has become a problem. The most common cause of imatinib resistance is point mutations in the BCR-ABL gene leading to amino acid substitutions which prevent the appropriate binding of the drug. Using direct DNA sequencing we have screened for BCR-ABL kinase domain mutations in 23 patients with Ph+ CML and the evidence of primary cytogenetic resistance to imatinib. Mutations were associated in 5 (21.7%) patients with refractoriness (primary resistance). They were patients with M244V + M351T, L248V + F359C, T315I and two patients with L248V clinically significant mutations. Mutation analysis of BCR-ABL gene has prognostic implication and plays a certain role in changing therapeutic strategy of imatinib resistant CML patients.

Keywords:

chronic myeloid leukemia, refractoriness, imatinib, mutations of BCR-ABL gene.

Rostov State Medical University

Контакты: kutsev@mail.ru

Принято в печать: 21 ноября 2008 г.

Терапия иматинибом позволяет достичь цитогенетической ремиссии у большинства больных ХМЛ. Однако в ряде случаев наблюдается первичная и вторичная резистентность к терапии иматинибом. Основной причиной резистентности являются точечные мутации киназного домена гена BCR-ABL, приводящие к замене одной из аминокислот в белке Bcr-Abl тирозинкиназы и, как следствие, нарушению связывания иматиниба. В нашем исследовании мы провели поиск мутаций гена BCR-ABL методом прямого секвенирования ДНК у 23 пациентов с Ph+ ХМЛ с первичной резистентностью (рефрактерностью). В результате следующие клинически значимые мутации были обнаружены у 5 (21,7%) рефрактерных к иматинибу пациентов: L248V, M244V + M351T, L248V + F359C, T315I. Результаты мутационного анализа гена BCR-ABL имеют значение для определения прогноза течения ХМЛ и играют определенную роль в изменении тактики лечения ХМЛ.

Ключевые слова

хронический миелолейкоз, рефрактерность, иматиниб, мутации гена BCR-ABL.

ВВЕДЕНИЕ

Впечатляющие успехи в лечении хронического миелолейкоза (ХМЛ) ингибиторами тирозинкиназ (ИТК) оказали существенное влияние на развитие таргетной терапии различных онкологических заболеваний. Следующим уроком, который необходимо извлечь из результатов таргетной терапии ХМЛ для использования в других областях онкологии, является установление контроля над механизмами резистентности к терапии ИТК у пациентов с ХМЛ.¹

Международное рандомизированное исследование IRIS, в котором сравнивалась безопасность и эффективность интерферона и иматиниба мезилата для лечения ХМЛ, показало безусловное превосходство иматиниба.²⁻⁵ К 6 годам наблюдения общая выживаемость пациентов, получавших монотерапию иматинибом, составила 88%, бессобытийная выживаемость — 83%, а выживаемость без прогрессии в фа-

зу акселерации и бластный криз — 93%.⁶

Однако у части пациентов с ХМЛ, получающих монотерапию иматинибом, наблюдается первичная (рефрактерность) или вторичная (приобретенная) резистентность к проводимой терапии. О значении рефрактерности к терапии иматинибом для клинической практики свидетельствуют некоторые результаты исследования IRIS: в 4% вновь диагностированных случаев ХМЛ не удалось достичь полной гематологической ремиссии после 3 мес. терапии иматинибом, в 16% случаев не получено большого цитогенетического ответа после 12 мес. терапии, у 23% пациентов не был достигнут полный цитогенетический ответ после 18 мес. терапии.³

Для оценки эффективности терапии ХМЛ экспертами European Leukemia Net (ELN) разработаны критерии ответа на лечение иматинибом.⁷ Неудача (отсутствие эффекта) терапии има-

тинибом констатируется в следующих случаях: отсутствие гематологического ответа после 3 мес. терапии, полного гематологического или хотя бы минимального цитогенетического (Ph-хромосома обнаруживается более чем в 95% клеток костного мозга) ответа после 6 мес. терапии, большого цитогенетического ответа после 12 мес. терапии (Ph-хромосома обнаруживается более чем в 35% клеток костного мозга), полного цитогенетического ответа после 18 мес. терапии иматинибом, потеря полного гематологического или цитогенетического ответа при любом сроке терапии иматинибом.

Отсутствие должных гематологического и цитогенетического ответов после 3, 6, 12 и 18 мес. лечения рассматривается как проявление рефрактерности (первичной резистентности) к терапии иматинибом. Потеря уже достигнутого гематологического или цитогенетического ответа расценивается как результат приобретенной (вторичной) резистентности пациентов к терапии иматинибом.

Критерии ELN не бесспорны, поскольку учитывают только время достижения гематологического или цитогенетического ответа. У ряда пациентов полный цитогенетический ответ достигается позже рассматриваемых сроков и сохраняется длительное время. В исследовании IRIS у двух пациентов полный цитогенетический ответ был достигнут только между 5 и 6 годами терапии иматинибом.⁶ Однако, поскольку большая часть пациентов, рефрактерных к терапии иматинибом, имеет высокий риск прогрессии в фазу акселерации и бластного криза, критерии ELN сохраняют свою актуальность.

Различные исходы лечения рефрактерных к иматинибу пациентов обусловлены, вероятно, разными механизмами развития первичной резистентности. Изучение этих механизмов имеет огромное клиническое значение, поскольку может привести к выявлению прогностических факторов, позволяющих предвидеть благоприятный исход или прогрессию заболевания. Более того, выяснение причин рефрактерности может помочь оптимизировать терапию ХМЛ — повысить дозу иматиниба, перейти на терапию ИТК второго поколения (тасигна, спрайсел) и принять решение о трансплантации костного мозга.

Среди механизмов развития резистентности к терапии иматинибом главная роль отводится мутациям киназного домена гена *BCR-ABL*. Различные миссенс-мутации химерного гена *BCR-ABL* приводят к замене одной из аминокислот в белке Bcr-Abl, что обуславливает нарушение связывания иматиниба с Bcr-Abl-тирозинкиназой. Однако, если о роли мутаций в развитии приобретенной резистентности накопилось довольно много данных за последние несколько лет,⁸⁻¹⁵ то частота, спектр мутаций, их потенциальное значение в развитии первичной резистентности остаются малоизученными. Если учесть небольшую популяционную частоту ХМЛ, а также успешность терапии ХМЛ иматинибом, то становится очевидной важность описания каждого случая первичной резистентности к терапии иматинибом, обусловленного мутациями гена *BCR-ABL*.

Ряд авторов обнаружили связь между появлением мутаций гена *BCR-ABL* и возрастом пациентов, наличием ранней или поздней хронической фазы на момент начала терапии иматинибом, предлеченностью, продолжительностью периода от установления диагноза до начала терапии иматинибом, длительностью терапии иматинибом.^{9,16-18} Однако в этих исследованиях анализировались преимущественно мутации, обуславливающие развитие вторичной резистентности.

Целью нашего исследования было выяснение частоты и спектра мутаций гена *BCR-ABL*, обуславливающих в соответствии с критериями ELN первичную резистентность (рефрактерность) к терапии иматинибом в дозе 400 мг/сут и

их роли в развитии резистентности к иматинибу. Также проведен поиск возможных ассоциаций некоторых демографических показателей (возраст, пол пациентов), фазы ХМЛ и ее длительности (ранняя или поздняя хроническая фаза на момент начала терапии иматинибом, средняя продолжительность периода от установления диагноза до начала терапии иматинибом), особенностей терапевтического режима (предлеченность, средняя суточная доза иматиниба, длительности терапии иматинибом) с появлением мутаций у пациентов с рефрактерностью к иматинибу и с развитием собственно самой рефрактерности без учета наличия мутаций.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе представлены результаты мутационного анализа у 53 пациентов с цитогенетически подтвержденным диагнозом Ph(+) ХМЛ. Все пациенты находились в хронической фазе заболевания. Первую группу составили пациенты с ХМЛ, рефрактерные к терапии иматинибом ($n = 23$). В качестве критерия рефрактерности в нашем исследовании рассматривалось отсутствие цитогенетического ответа после 6 мес. терапии иматинибом в дозе 400 мг/сут, частичного цитогенетического ответа после 12 мес. терапии, полного цитогенетического ответа после 18 мес. терапии (рекомендации ELN⁷). Во вторую группу вошли пациенты с ХМЛ ($n = 30$), достигшие цитогенетического ответа на терапию иматинибом (400 мг/сут) в течение 6–18 мес. лечения в соответствии с критериями ELN.⁷

Образцы венозной крови в количестве 10 мл доставлялись в лабораторию при температуре 4–8 °С в вакуумных пробирках с ЭДТА в течение 24 ч после забора крови. Общую РНК выделяли из крови хлороформ-фенольным методом по P. Chomczynski и N. Sacchi.¹⁹ Реакцию обратной транскрипции тотальной РНК в комплементарную ДНК (кДНК) проводили с использованием случайных гексамерных праймеров и M-MLV обратной транскриптазы. Для выделения РНК и ее обратной транскрипции в кДНК использовались наборы реагентов производства ООО «ГеноТехнология» (Россия).

Исследование мутаций гена *BCR-ABL* выполнено методом прямого секвенирования кДНК у 23 больных, входящих в группу рефрактерных к иматинибу пациентов, и у 30 пациентов с оптимальным ответом на терапию иматинибом.

Аmplификация интересующего фрагмента гена *BCR-ABL* проводилась в два этапа в соответствии с рекомендациями S. Branford и T. Hughes.²⁰ На первом этапе амплифицировали участок гена *BCR-ABL* с помощью праймеров BCR F — 5'- tga cca act cgt gtg tga aac tc -3' и ABL R — 5'- tcc act tcg tct gag ata ctg gat t -3'. На втором этапе из полученного фрагмента *BCR-ABL* амплифицировали участок гена *ABL* с помощью праймеров ABL F — 5'- cgc aac aag ccc act gtc t -3' и ABL R — 5'- tcc act tcg tct gag ata ctg gat t -3'. В результате амплификации получали фрагмент гена *ABL* длиной 863 пар оснований, кодирующий Р-петлю, С-спираль, область SH2-контакта, А-петлю. Реакции были выполнены в 20 мкл общего объема смеси, содержащей 7 мкл деионизированной воды (Sigma), 5 мкл (1–3 мкг) полученной кДНК, 4 мкл 5-кратного ПЦР-буфера, 15 ммоль магния хлорида, 0,3 мкл (5 ед./мкл) TaqF ДНК-полимеразы («ИнтерЛабСервис»), 2 мкл смеси дНТФ и по 1 мкл каждого праймера. Реакцию амплификации проводили при следующих условиях: 95 °С — 10 мин; 45 циклов: 95 °С — 15 с, 60 °С — 20 с, 72 °С — 120 с, 72 °С — 5 мин.

Реакция секвенирования полученного фрагмента гена *ABL* осуществлялась с помощью набора GenomeLab™-Methods Development Kit Dye Terminator Cycle Sequencing (Beckman Coulter, США) согласно протоколу производителе-

ля. Реакционная смесь для ДНК секвенирования включала 5,5 мкл Pre-mix, 1 мкл праймера ABL-F и 3,5 мкл очищенного ПЦР продукта. Секвенирование проводили по следующей схеме: 94 °C — 1 мин; 45 циклов: 94 °C — 15 с, 64 °C — 20 с, 60 °C — 60 с.

Аmplификацию и реакцию секвенирования анализируемых фрагментов проводили с помощью термоциклера BioRad PTC200 (BioRad Lab, США).

Определение нуклеотидной последовательности выполнялось с помощью автоматического секвенатора SEQ8000 (Beckman Coulter, США). Параметры проводимого электрофореза: вольтаж — 6 кВ, время — 60 мин, температура — 56 °C, время подъема температуры — 5 мин. Анализ полученных результатов проводили с помощью программного обеспечения для Beckman Coulter SEQ8000.

Статистическая обработка данных выполнялась с помощью программного обеспечения Excel и включала в себя определение медианы, максимальных и минимальных значений, средних величин. Для оценки достоверности различий применялись критерии χ^2 , Фишера, Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В результате проведенного исследования в группе рефрактерных к иматинибу пациентов ($n = 23$) были обнаружены миссенс-мутации в 5 (21,7%) случаях, приводящие к замене 5 различных аминокислотных остатков (M244V, L248V, M351T, F359C, T315I) (рис. 1). У 2 пациентов была мутация L248V, у одного — мутация T315I, у 2 пациентов обнаружены компаунд-мутации (M244V + M351T, L248V + F359C).

Среди рефрактерных к иматинибу пациентов с выявленными мутациями гена BCR-ABL было 2 мужчин и 3 женщины. В группе рефрактерных пациентов, у которых не было обнаружено мутаций, было 9 мужчин и 9 женщин. При срав-

нении этих двух групп с использованием двустороннего критерия Фишера различий в соотношении полов не выявлено ($p > 0,05$).

Медиана возраста у рефрактерных пациентов с обнаруженными мутациями составила 43 года (32–54 года), у рефрактерных пациентов без мутаций — 40 лет (22–61 год). Статистически значимых различий при сравнении возраста этих двух групп не найдено ($p > 0,05$).

У 2 (40%) рефрактерных к иматинибу пациентов с мутациями гена BCR-ABL на момент начала терапии иматинибом диагностирована ранняя хроническая фаза, у 3 (60%) — поздняя хроническая фаза. В группе пациентов без мутаций на момент начала приема иматиниба у 8 (44%) диагностирована ранняя хроническая фаза, у 10 (56%) — поздняя. Использование двустороннего критерия Фишера не позволило выявить статистически достоверное преобладание больных с ранней или поздней хронической фазой в группах пациентов с мутациями и без них ($p > 0,05$).

Медиана продолжительности периода от момента постановки диагноза до начала терапии иматинибом в группе рефрактерных пациентов с обнаруженными мутациями составила 30,2 мес. (от 4 до 96 мес.); у пациентов без мутаций — 34 мес. (от 0 до 120 мес.). Различие между этими двумя группами по длительности периода с момента установления диагноза до начала терапии иматинибом статистически незначимо ($p > 0,05$).

Все 5 пациентов с обнаруженными мутациями с момента постановки диагноза до начала терапии иматинибом получали лечение препаратами гидроксимочевины, цитарабина. В группе пациентов без мутаций, рефрактерных к иматинибу, только 1 из 18 не получал предшествующей терапии. Статистически значимых различий по наличию или отсутствию предшествующего лечения между сравниваемыми группами также не выявлено ($p > 0,05$).

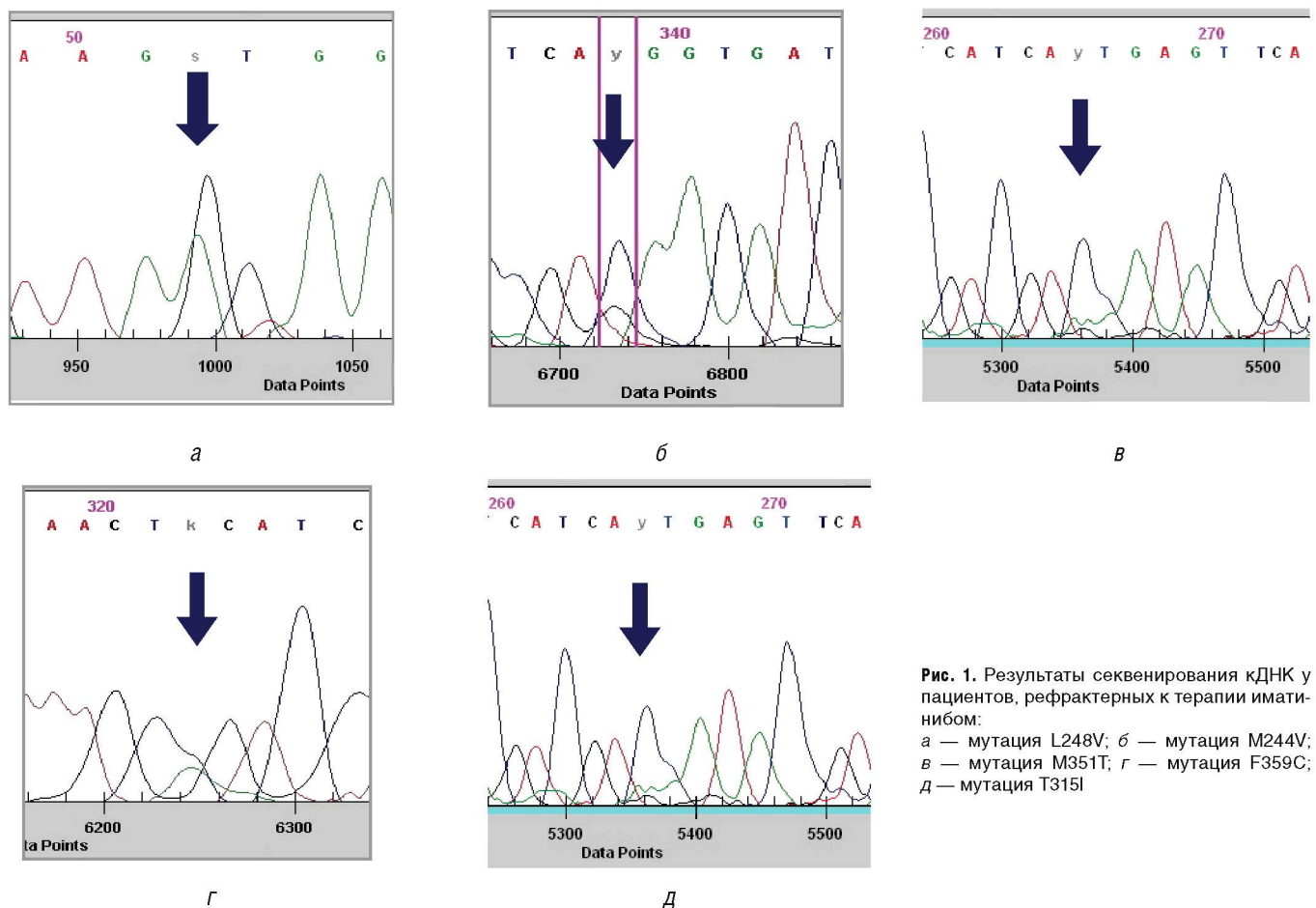


Рис. 1. Результаты секвенирования кДНК у пациентов, рефрактерных к терапии иматинибом: а — мутация L248V; б — мутация M244V; в — мутация M351T; г — мутация F359C; д — мутация T315I

Средняя суточная доза иматиниба за время наблюдения в группе пациентов с мутациями гена *BCR-ABL* составила 500 мг/сут. В группе пациентов, у которых мутации не были обнаружены, средняя суточная доза иматиниба была 420 мг/сут. При сравнении средней принимаемой дозы иматиниба за время наблюдения статистически значимых различий между этими двумя группами не выявлено ($p > 0,05$).

В случаях обнаружения мутаций медиана длительности заболевания с момента установления диагноза до момента проведения мутационного анализа составила 44 мес. в группе пациентов с обнаруженными мутациями гена *BCR-ABL* и 41 мес. — у больных ХМЛ без мутаций. Статистически значимых различий между группами не выявлено ($p > 0,05$) (табл. 1).

Медиана длительности терапии иматинибом на момент проведения мутационного анализа в группе пациентов с мутациями киназного домена гена *BCR-ABL* составила 17 мес. В группе пациентов, у которых мутационный анализ не подтвердил наличия мутаций, медиана длительности приема иматиниба — 13 мес. Сравнение длительности терапии иматинибом до момента проведения мутационного анализа в исследованных группах пациентов статистически значимых различий не выявило ($p > 0,05$).

Результаты сравнения группы пациентов с обнаруженными мутациями гена *BCR-ABL* и группы пациентов без мутаций обобщены в табл. 1.

Результате проведенного методом ДНК-секвенирования мутационного анализа в группе пациентов с полным цитогенетическим ответом к 6–18 мес. терапии иматинибом мутации киназного домена гена *BCR-ABL* не обнаружены ни у одного из пациентов.

Интерес представляет сравнение влияния различных факторов, предрасполагающих к появлению рефрактерно-

сти, в группах пациентов с рефрактерностью к терапии иматинибом и пациентов с оптимальным ответом на лечение иматинибом.

В группу рефрактерных к иматинибу пациентов входило 11 мужчин и 12 женщин, в группу с оптимальным ответом на терапию иматинибом — 14 мужчин и 16 женщин. При сравнении этих двух групп с использованием двустороннего критерия Фишера различий в соотношении полов не обнаружено ($p > 0,05$).

Медиана возраста в группе рефрактерных к иматинибу пациентов составила 43 года (22–61 год), в группе с оптимальным ответом на терапию иматинибом — 44,5 года (22–63 года). Сравнение возраста этих двух групп пациентов не выявило статистически значимых различий ($p > 0,05$).

Среди рефрактерных к иматинибу пациентов на момент начала терапии иматинибом 10 (43,5%) больных находились в ранней хронической фазе ХМЛ, 13 (56,5%) — в поздней. В группе пациентов с оптимальным ответом на терапию иматинибом на момент начала терапии иматинибом у 23 (77%) пациентов диагностирована ранняя хроническая фаза ХМЛ, у 7 (23%) — поздняя. Сравнение двух групп пациентов с использованием двустороннего критерия Фишера показало, что в группе пациентов с оптимальным ответом статистически достоверно превалировали пациенты в ранней хронической фазе ХМЛ ($p < 0,01$).

В группе рефрактерных к иматинибу пациентов средняя суточная доза иматиниба в течение наблюдаемого периода составила 430 мг, в группе с оптимальным ответом на терапию иматинибом — 415 мг. Статистически значимых различий при сравнении суточной дозы препарата в этих двух группах не выявлено ($p > 0,05$).

Медиана продолжительности периода с момента установления диагноза до начала терапии иматинибом у рефрактерных пациентов составила 32,2 мес. (0–120 мес.), в группе

Таблица 1. Сравнительная характеристика некоторых показателей у рефрактерных к иматинибу пациентов с выявленными миссенс-мутациями киназного домена гена *BCR-ABL* и у рефрактерных к иматинибу пациентов без мутаций

Показатель	Рефрактерные к иматинибу пациенты с мутациями киназного домена <i>BCR-ABL</i> (n = 5)	Рефрактерные к иматинибу пациенты без мутаций киназного домена <i>BCR-ABL</i> (n = 18)	p
Пол			
Мужской	2 (40%)	9 (50%)	> 0,05
Женский	3 (60%)	9 (50%)	
Возраст, годы			
Медиана	43	40	> 0,05
Диапазон	32–54	22–61	
Фаза ХМЛ			
Ранняя хроническая	2 (40%)	8 (44,4%)	> 0,05
Поздняя хроническая	3 (60%)	10 (55,6%)	
Продолжительность периода от постановки диагноза до начала терапии иматинибом, мес.			
Медиана	30,2	34,0	> 0,05
Диапазон	4–96	0–120	
Предшествующая терапия	5 (100%)	17 (94,4%)	> 0,05
Средняя суточная доза иматиниба, мг	500	420	> 0,05
Продолжительность периода от постановки диагноза до момента проведения мутационного анализа, мес.			
Медиана	44,0	41,0	> 0,05
Диапазон	13–120	1–120	
Длительность терапии иматинибом, мес.			
Медиана	17	13	> 0,05
Диапазон	10–24	1–39	

пациентов с оптимальным ответом — 9,38 мес. (0–39 мес.). Интервал времени с момента установления диагноза до начала терапии иматинибом в группе рефрактерных пациентов статистически достоверно больше, чем в группе пациентов с оптимальным ответом на терапию иматинибом ($p < 0,01$; 95%-й доверительный интервал 4,55–41,07).

В группе рефрактерных к иматинибу пациентов 22 (95,7%) больных до назначения иматиниба получали лечение гидроксимочевинной, цитарабином. Медиана длительности предшествующей лечению иматинибом терапии составила 32,4 мес. В группе с оптимальным ответом 21 (69%) пациент получал предшествующую терапию, медиана продолжительности которой составила 8,2 мес.; 9 (31%) больных лечились иматинибом непосредственно после установ-

ления диагноза. Статистический анализ показал достоверное различие между исследуемыми группами по длительности предшествующей терапии ($p < 0,05$; 95%-й доверительный интервал 6,038–42,36).

Медиана длительности лечения иматинибом у пациентов с рефрактерностью к этой терапии составила 19,6 мес. (12–48 мес.), у пациентов с оптимальным ответом на терапию иматинибом — 10,6 мес. (6–20 мес.). Статистически значимых различий между двумя исследуемыми группами по длительности терапии иматинибом не обнаружено ($p > 0,05$).

Результаты сравнения группы рефрактерных к терапии иматинибом пациентов и группы пациентов с оптимальным ответом на терапию иматинибом представлены в табл. 2.

Таблица 2. Сравнительная характеристика рефрактерных к иматинибу пациентов и пациентов с оптимальным ответом на лечение иматинибом

Показатель	Рефрактерные к иматинибу пациенты (n = 23)	Пациенты с оптимальным ответом на иматиниб (n = 30)	p
Пол			
Мужской	11 (47,8%)	14 (46,7%)	> 0,05
Женский	12 (52,2%)	16 (53,3%)	
Возраст, годы			
Медиана	43	44,5	> 0,05
Диапазон	22–61	22–63	
Фаза ХМЛ			
Ранняя хроническая	10 (43,5%)	23 (76,7%)	< 0,01
Поздняя хроническая	13 (56,5%)	7 (23,3%)	
Продолжительность периода от постановки диагноза до начала терапии иматинибом, мес.			
Медиана	32,2	9,3	< 0,01
Диапазон	0–120	0–39	
Предшествующая терапия	22 (95,7%)	21 (70,0%)	> 0,05
Средняя суточная доза иматиниба, мг	430	415	> 0,05
Длительность предшествующей иматинибу терапии, мес.			
Медиана	32,4	8,2	< 0,05
Диапазон	3–110	0–30	
Продолжительность периода от постановки диагноза до момента проведения мутационного анализа, мес.			
Медиана	42	12	> 0,05
Диапазон	12–48	7–48	
Длительность терапии иматинибом, мес.			
Медиана	19,6	10,6	> 0,05
Диапазон	12–48	6–20	

ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенного нами исследования у 23 пациентов, рефрактерных к терапии иматинибом, одна или две мутации были обнаружены у 5 (21,7%) больных. По данным Вассагани и соавт.,²¹ частота мутаций киназного домена гена BCR-ABL в разных группах пациентов с ХМЛ, имеющих первичную или вторичную резистентность к терапии иматинибом, колеблется от 14% в группе резистентных пациентов, начавших терапию иматинибом в ранней хронической фазе, до 83% при лимфоидном бластном кризе ХМЛ. В исследовании итальянской рабочей группы GIMEMA у пациентов с первичной резистентностью к иматинибу (n = 152) без учета

начала терапии иматинибом в ранней или поздней хронической фазе ХМЛ мутации были обнаружены в 30% случаев.¹⁷ Возможно, небольшие различия в наших данных обусловлены использованием авторами более чувствительного метода исследования мутационного статуса пациентов — денатурирующей высокоэффективной жидкостной хроматографии (дВЭЖХ) ДНК с последующим секвенированием выявленных мутантных аллелей. Чувствительность метода дВЭЖХ составляет 1–5%, тогда как чувствительность метода прямого ДНК секвенирования — 10–20%.

Однако, на наш взгляд, высокая чувствительность метода не всегда полезна в анализе мутаций гена BCR-ABL у клинически резистентных пациентов. Например, использование

метода дВЭЖХ позволяет выявить одну клетку с мутантной формой *BCR-ABL* среди 100 клеток, несущих дикий тип гена *BCR-ABL*. Едва ли можно представить, что при соотношении мутантных клеток с обычными лейкозными клетками 1:100 мутантные формы могут обуславливать резистентность к терапии иматинибом. Поэтому можно предположить, что в данном исследовании рабочей группы GIMEMA есть пациенты с клинически ничтожными (незначимыми) мутациями.

Следует заметить, что в более раннем и менее репрезентативном исследовании С. Roche-Lestienne и соавт.²² в результате анализа мутаций методом прямого секвенирования кДНК у первично-резистентных пациентов ($n = 24$) авторы обнаружили мутации всего лишь у 4 (16,6%) больных: у двух — мутацию T315I, у одного — M351T и у одного — F311L. Этот показатель частоты еще более низкий по сравнению с нашими данными, хотя из 24 иматиниб-резистентных пациентов у 16 диагностирована хроническая фаза, а у 8 — фаза акселерации, характеризующаяся повышенной частотой мутаций.

Менее объективная причина наших расхождений может относиться к проблеме комплаентности пациентов, получающих иматиниб. Естественно предположить, что если пациент не получал достаточную дозу иматиниба, достижение хорошего уровня ответа на проводимую терапию в соответствии с критериям ELN невозможно. Поэтому в группе рефрактерных пациентов не исключены псевдорефрактерные, не имеющие мутаций. Тем не менее в нашем исследовании каких-либо данных о нарушении режима приема препарата больными ХМЛ, относящимися к группе рефрактерных к терапии иматинибом, мы не имеем.

Другой причиной расхождения может быть недостаточный объем выборки по сравнению с исследованием рабочей группы GIMEMA.

По данным S. Soverini и соавт.,¹⁷ наиболее частыми мутациями киназного домена гена *BCR-ABL* являются мутации M244V, G250E, Y253F/H, E255K/V, T315I, M351T и F359V, которые составляют 85% всех ассоциированных с резистентностью к иматинибу мутаций. В нашем исследовании рефрактерных к иматинибу пациентов обнаружено 4 из 7 мутаций (M244V, T315I, M351T, F359C), относящихся к этой, наиболее часто встречающейся группе, что составляет 57%. Это обусловлено частым обнаружением в нашем исследовании только одной мутации — L248V (3 из 7 обнаруженных мутаций).

По данным S. Branford и соавт.,⁹ мутации в локусе гена *BCR-ABL*, кодирующего Р-петлю, являются причиной высокой степени резистентности к иматинибу у пациентов с ХМЛ. В проведенном нами исследовании мутационного профиля гена *BCR-ABL* у рефрактерных к терапии иматинибом пациентов мутации Р-петли (M244V и 3 мутации L248V) были выявлены в 4 из 7 обнаруженных случаев мутаций, что составило 57%.

У одного из пациентов обнаружена мутация M244V (замена метионина в положении 244 на валин) и M351T (замена метионина на треонин в положении 351). Обе мутации, если встречаются изолированно, приводят к незначительному изменению чувствительности к иматинибу мутантной *Bcr-Abl*-киназы по сравнению с *Abl*-киназой дикого типа.^{10,23,24} По мнению А. Corbin и соавт.,²⁵ N. Shah и соавт.,¹⁰ S. Soverini и соавт.,²⁶ Т. Ernst и соавт.,²⁷ ответ на терапию иматинибом может быть достигнут у резистентных пациентов с одиночными мутациями M244V и M351T назначением более высоких доз препарата. Однако данные Т. O'Hare и соавт.,¹⁸ М. Deininger²⁸ четко указывают на необходимость использования ИТК второго поколения при обнаружении данных мутаций у резистентных пациентов. Сочетание мутаций M351T

и M244V у одного пациента было описано рядом исследователей.^{10,25} Естественно предположить, что две мутации потенцируют большую степень резистентности, чем одна мутация. Учитывая невозможность на момент исследования перевести пациента на терапию ИТК второго поколения (нилотиниб, дазатиниб), в данном случае рекомендовано повышение дозы иматиниба до 600–800 мг/сут.

В нашем исследовании у двух пациентов обнаружена мутация L248V, обуславливающая замену лейцина на валин в положении 248. Мутации, в которых участвует лейцин в положении 248, вызывают развитие высокого уровня резистентности, о чем свидетельствует повышение IC_{50} (inhibitor concentration 50%) в тесте на пролиферативную активность более чем в 30 раз.²⁹ При таком показателе IC_{50} трудно ожидать эффекта от эскалации дозы иматиниба у резистентных пациентов. Необходим переход на терапию ИТК второго поколения. В связи с этим один из пациентов с мутацией L248V был включен в клиническое исследование эффективности одного из препаратов второго поколения ИТК — nilotiniba (Тасигна, Novartis Pharma; исследование CAMN107A2109, руководитель Центра — профессор Ю. В. Шатохин).

У одного из рефрактерных к иматинибу пациентов выявлено две мутации: мутация L248V, описанная выше, и мутация F359C (замена фенилаланина на цистеин в положении 359). Мутация F359C вызывает слабое снижение чувствительности к иматинибу — в 1,8 и 2,8 раза в биохимическом и пролиферативном тестах соответственно. Действительно ли такого рода мутации, обуславливающие легкую степень снижения чувствительности к иматинибу в тестах *in vitro*, могут вызвать резистентность, неизвестно. Увеличение дозы иматиниба при изолированной мутации F359C и при других аналогичных по своему биологическому эффекту мутациях должно преодолевать резистентность.²⁵ Наиболее вероятно, что в нашем исследовании рефрактерность пациента с мутациями L248V + F359C обусловлена наличием мутации L248V.

В одном случае была подтверждена мутация T315I, приводящая к замене треонина в положении 315 на изолейцин. Мутация T315I вызывает практически полное отсутствие чувствительности к иматинибу и ИТК второго поколения, обуславливая высочайшую степень резистентности к современной терапии у больных ХМЛ.^{10,17,24-26,29,30} Пациенту с обнаруженной мутацией T315I в гене *BCR-ABL* была рекомендована трансплантация костного мозга.

В нашем исследовании не обнаружено статистически достоверных различий между группами рефрактерных пациентов с мутациями и без мутаций гена *BCR-ABL* по возрасту, полу, наличию ранней или поздней хронической фазы на момент начала терапии иматинибом, средней продолжительности периода от установления диагноза до начала терапии иматинибом, предлеченности, средней суточной дозе иматиниба и длительности терапии иматинибом. Таким образом, по нашим данным, исследованные факторы не влияют на появление мутаций гена *BCR-ABL* у рефрактерных к иматинибу пациентов.

Однако, если сравнить группу пациентов, рефрактерных к иматинибу, с группой пациентов, адекватно ответивших на терапию иматинибом, то с большой долей вероятности можно сказать, что формирование рефрактерности происходит преимущественно у больных ХМЛ, начавших терапию иматинибом в поздней хронической фазе и с длительным периодом от установления диагноза до начала терапии иматинибом и, как следствие, длительным периодом предшествующей иматинибу терапии (предлеченности).

По сути, формирование рефрактерности во многом зависит от того, как долго пациент с ХМЛ не получает иматиниба.

ниб в качестве основной линии терапии. Дело в том, что чем дольше лейкозные клетки находятся под воздействием Bcr-Abl-тирозинкиназы, тем больше риск появления мутаций гена *BCR-ABL*, дополнительных хромосомных aberrаций, прогрессии заболевания.^{9,31} Тирозинкиназа Bcr-Abl индуцирует геномную нестабильность посредством различных механизмов, включая окислительный стресс.³² Активные формы кислорода, образующиеся в Bcr-Abl-трансформированных клетках, обладают стохастическим мутагенным свойством и вызывают мутации гена *BCR-ABL* и других генов, обуславливая резистентность пациентов к терапии иматинибом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в результате проведенного нами исследования выявлено, что мутации гена *BCR-ABL*, являющиеся в соответствии с общепризнанными данными литературы причиной резистентности к терапии иматинибом, обнаруживаются менее чем у 25% больных ХМЛ с первичной резистентностью к терапии иматинибом. 57% обнаруженных мутаций

гена *BCR-ABL* (4 из 7) относились к участку, кодирующему Р-петлю Bcr-Abl-тирозинкиназы.

Несмотря на невысокую частоту обнаружения мутаций у первично-рефрактерных к иматинибу пациентов по сравнению с вторично-резистентными, мутационный анализ необходим, поскольку выявление мутаций гена *BCR-ABL* позволяет выяснить причину резистентности, определить прогноз течения ХМЛ и зачастую позволяет рационализировать лечение ХМЛ. Например, выявление любой из клинически значимых мутаций киназного домена гена *BCR-ABL* предполагает повышение дозы иматиниба или переход на терапию ИТК второго поколения, выявление панрезистентной мутации T315I — поиски донора для трансплантации костного мозга.

Развитие рефрактерности ассоциировано с длительностью периода от установления диагноза ХМЛ до начала терапии иматинибом. В этой связи становится особенно очевидной клиническая значимость ранней диагностики и раннего начала терапии иматинибом для успешного лечения ХМЛ.

ЛИТЕРАТУРА

- Mughal T. I., Goldman J. M. Emerging strategies for the treatment of mutant Bcr-Abl T315I myeloid leukemia. Clin. Lymphoma Myeloma 2007 Mar; 7 (Suppl. 2): S81–4.
- Kantarjian H., Sawyers C., Hochhaus A. et al. Hematologic and cytogenetic responses to imatinib mesylate in chronic myelogenous leukemia. N. Engl. J. Med. 2002; 346: 645–52.
- O'Brien S., Guilhot F., Larson R. et al. Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. N. Engl. J. Med. 2003; 348: 994–1004.
- Goldman J., Melo J. Chronic myeloid leukemia—advances in biology and new approaches to treatment. N. Engl. J. Med. 2003; 349: 1451–64.
- 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: 2408–17.
- Hochhaus A., Druker B. J., Larson R. A. et al. IRIS 6-Year Follow-Up: Sustained Survival and Declining Annual Rate of Transformation in Patients with Newly Diagnosed Chronic Myeloid Leukemia in Chronic Phase (CML-CP) Treated with Imatinib. Blood (ASH Annual Meeting Abstracts) Nov 2007; 110: 25.
- 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 LeukemiaNet. Blood 2006; 108: 1809–20.
- Branford S., Rudzki Z., Walsh 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(9): 3472–5.
- Branford S., Rudzki Z., Walsh S. et al. Detection of BCR-ABL mutations in patients with CML treated with imatinib is virtually always accompanied by clinical resistance, and mutations in the ATP phosphate-binding loop (P-loop) are associated with a poor prognosis. Blood 2003; 102: 276–83.
- Shah N., Nicoll J., Nagar B. et al. Multiple BCR-ABL kinase domain mutations confer polyclonal resistance to the tyrosine kinase inhibitor imatinib

(STI571) in chronic phase and blast crisis chronic myeloid leukemia. Cancer Cell 2002; 2: 117–25.

- Gambacorti-Passerini C., Gunby R., Piazza R. et al. Molecular mechanisms of resistance to imatinib in Philadelphia chromosome-positive leukemias. Lancet Oncol. 2003; 4: 75–85.
- Kreil S., Mueller M., Hanfstein B. et al. Management and clinical outcome of CML patients after imatinib resistance associated with ABL kinase domain mutations. Blood 2003; 102: 71a.
- Shah N., Sawyers C. Mechanisms of resistance to STI571 in Philadelphia chromosome-associated leukemias. Oncogene 2003; 22: 7389–95.
- Al-Ali H., Heinrich M., Lange T. et al. High incidence of BCR-ABL kinase domain mutations and absence of mutations of the PDGFR and KIT activation loops in CML patients with secondary resistance to imatinib. Hematol. J. 2004; 5: 55–60.
- Hochhaus A., La Rosee P. Imatinib therapy in chronic myelogenous leukemia: strategies to avoid and overcome resistance. Leukemia 2004; 18: 1321–31.
- Jabbour E., Kantarjian H., Jones D. et al. Frequency and clinical significance of BCR-ABL mutations in patients with chronic myeloid leukemia treated with imatinib mesylate. Leukemia. 2006 Oct; 20(10): 1767–73. Epub 2006 Jul 20.
- Soverini S., Colarossi S., Gnani 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.
- 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.
- Chomczynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal. Biochem. 1987 Apr; 162(1): 156–9.
- Branford S., Hughes T. Diagnosis and monitoring of chronic myeloid leukemia by qualitative and quantitative RT-PCR. Methods Mol. Med. 2006; 125: 69–92.
- Baccarani M., Pane F., Saglio G. Monitoring treatment of chronic myeloid leukemia. Haematologica 2008; 93(2): 161–7.
- Roche-Lestienne C., Soenen-Cornu V., Grandel-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.

- Hochhaus A., Kreil S., Corbin A. et al. Molecular and chromosomal mechanisms of resistance to imatinib (STI571) therapy. Leukemia 2002; 16: 2190–6.
- O'Hare T., Walters D., Stoffregen E. et al. In vitro activity of Bcr-Abl inhibitors AMN107 and BMS-354825 against clinically relevant imatinib-resistant Abl kinase domain mutants. Cancer Res. 2005; 65: 4500–5.
- Corbin A., La Rosee 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.
- Soverini S., Martinelli G., Rosti G. et al. ABL mutations in late chronic phase chronic myeloid leukemia patients with up-front cytogenetic resistance to imatinib are associated with a greater likelihood of progression to blast crisis and shorter survival: a study by the GIMEMA Working Party on Chronic Myeloid Leukemia. J. Clin. Oncol. 2005; 23: 4100–9.
- Ernst T., Erben P., Miller M. et al. Dynamics of BCR-ABL mutated clones prior to hematologic or cytogenetic resistance to imatinib. Haematologica 2008; 93(2): 186–92.
- Deininger M., Buchdunger E., Druker B. The development of imatinib as a therapeutic agent for chronic myeloid leukemia. Blood 2005; 105(7): 2640–53.
- Burgess M., Skaggs B., Shah N. et al. Comparative analysis of two clinically active BCR-ABL kinase inhibitors reveals the role of conformation-specific binding in resistance. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2005; 102: 3395–400.
- Gorre M., Mohammed M., Ellwood K. et al. Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. Science 2001; 293: 876–80.
- Willis S. G., Lange T., Demehri S. et al. High-sensitivity detection of BCR-ABL kinase domain mutations in imatinib-naive patients: correlation with clonal cytogenetic evolution but not response to therapy. Blood 2005; 106(6): 2128–37.
- Sattler M., Verma S., Shrikhande G. et al. The BCR/ABL tyrosine kinase induces production of reactive oxygen species in hematopoietic cells. J. Biol. Chem. 2000; 275(32): 24273–8.

