

Д.Ф. Глузман, д.м.н., профессор, Л.М. Скляренко, д.м.н., Т.С. Ивановская, С.В. Коваль, к.б.н., Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины, г. Киев

Лейкемические стволовые клетки при хроническом миелолейкозе

Хронический миелолейкоз (ХМЛ) – одна из наиболее частых форм миелопролиферативных новообразований. На долю ХМЛ, частота которого составляет 1-2 случая на 100 тыс. населения ежегодно, приходится около 5-20% всех лейкозов. ХМЛ диагностируется в любом возрасте, в том числе у детей, но пик заболеваемости приходится на возраст 50-60 лет.

Факторы, вызывающие возникновение заболевания, пока окончательно не выяснены. В анамнезе большинства больных нет указаний на контакт с химическими канцерогенами или токсическими соединениями. Полагают, что к увеличению частоты ХМЛ ведет воздействие ионизирующей радиации. Средняя продолжительность латентного периода при возникновении ХМЛ у лиц, переживших атомную бомбардировку в гг. Хиросиме и Нагасаки, составила 11 лет. У ликвидаторов последствий аварии на ЧАЭС, по нашим данным, ХМЛ возникает даже спустя 10-25 лет после катастрофы.

ХМЛ является клональным процессом, возникающим в результате трансформации полипотентной гемопоэтической стволовой клетки (ГСК) костного мозга, постоянно ассоциированным с наличием слитного гена *BCR-ABL* (J.D. Rowley, 1973). Данная генетическая аномалия возникает в результате реципрокной транслокации между хромосомами 9 и 22, что ведет к укорочению плеча одной из хромосом 22-й пары, определяемой при цитогенетическом исследовании как t(9;22)(q34;q11). При этом протоонкоген *ABL* (нормальный клеточный гомолог вируса мышиной лейкемии Abelson), локализованный на длинном плече хромосомы 9(q34), переносится на длинное плечо хромосомы 22 к располагающемуся в участке разрыва этой хромосомы гену *BCR*. Результатом слияния экзона 2 гена *ABL* с оставшейся на хромосоме 22 частью гена *BCR* (с экзонами b2 и b3 в зависимости от места разрыва гена *BCR*) является образование на хромосоме 22 химерного гена *BCR-ABL*. Продуктом данного гена является аномальный белок, обладающий высокой активностью тирозинкиназы. Именно этот белок считается ответственным за активацию путей сигнальной трансдукции, приводящих к аномальной пролиферации кровяных клеток, уменьшению их адгезии к строме костного мозга и дефектной апоптотической реакции на действие мутагенных факторов.

Хотя начальным гематологическим проявлением ХМЛ является нейтрофильный лейкоцитоз, представленный сегментоядерными гранулоцитами и незрелыми клетками этого ряда, ген *BCR-ABL* обнаруживается в клетках всех миелоидных линий, а также в некоторых лимфоидных и эндотелиальных клетках.

Цитогенетическая аномалия t(9;22)(q34;q11), ведущая к образованию филадельфийской хромосомы, имеет большое значение для диагностики ХМЛ, мониторинга течения заболевания и контроля эффективности терапии. Ph-хромосома – первая из ассоциированных с опухолями человека цитогенетических аномалий – была открыта в 1960 г. Р.С. Nowell и Д.А. Hungerford спустя 115 лет после описания клинических проявлений ХМЛ J.H. Bennett и R. Virchow.

Наличие Ph-хромосомы и/или гена *BCR-ABL* является важным и единственным критерием, подтверждающим диагноз ХМЛ, установленный при рутинном цитоморфологическом и цитохимическом исследовании. Ph-хромосома при стандартном цитогенетическом исследовании при ХМЛ определяется в 95% случаев. С помощью молекулярно-генетического анализа – полимеразной цепной реакции или флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) – химерный ген *BCR-ABL* обнаруживается у всех больных ХМЛ.

При ХМЛ, проходящем в своем развитии три фазы (хроническую, акселерации и бластного криза), у 80% больных, помимо Ph-хромосомы, выявляются дополнительные цитогенетические аномалии, такие как трисомия 8 и 19 или i(17q). В процессе трансформации

могут обнаруживаться изменения в генах *TP53*, *RBI*, *MYC*, *p16/NK4a (CDKN2A)*, *RAS*, *AML1* и *ENVI*, роль которых в развитии бластного криза пока остается невыясненной. Как показывают последние исследования с использованием ДНК-микрочипов, они происходят в позднем периоде в хронической фазе ХМЛ или в начальной стадии фазы акселерации.

Приобретенные мутации ответственны за самообновляемость, выживаемость и aberrантную дифференцировку *BCR-ABL*-положительных ГСК в хронической фазе ХМЛ. В свою очередь, это ведет к выработке и экспансии популяции неопластических клеток, сохраняющих в течение определенного времени способность к дифференцировке. Благодаря этому в хронической фазе ХМЛ в периферической крови обнаруживаются незрелые клетки (бласты, миелоциты), но преобладают зрелые элементы гранулоцитопоза.

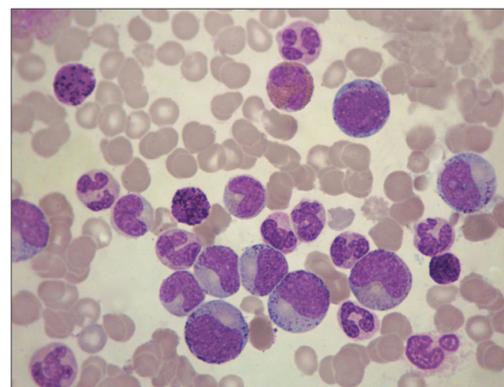


Рис. 1. Картина костного мозга при ХМЛ в хронической фазе

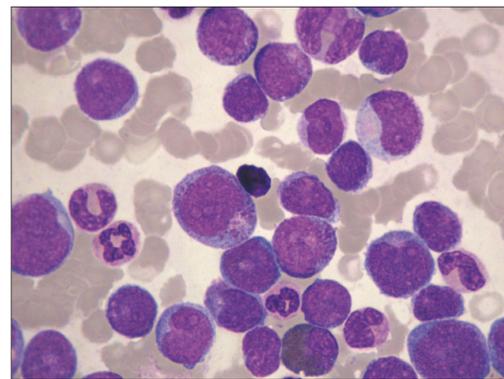


Рис. 2. Бластный криз ХМЛ по миелоидному типу

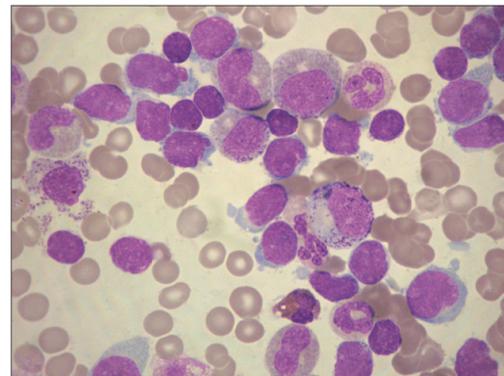


Рис. 3. Бластный криз ХМЛ по лимфоидному типу



Д.Ф. Глузман

У большинства больных ХМЛ диагностируется в хронической фазе заболевания (медиана выживаемости 35-65 мес) (рис. 1). В периферической крови определяется нейтрофильный лейкоцитоз ($12-100 \times 10^9/\text{л}$). При подсчете лейкограммы палочкоядерные и сегментоядерные нейтрофилы составляют от 35 до 70%, содержание метамиелоцитов и миелоцитов (последних, как правило, больше) колеблется между 5 и 40%, промиелоцитов – от 10 до 15%. В большинстве случаев в момент установления диагноза количество бластов не превышает 1-2%. Важным диагностическим признаком является увеличение до 3-4% содержания базофилов, нередко при одновременном повышении количества эозинофилов (базофильно-эозинофильная ассоциация).

В фазе акселерации ХМЛ, средняя продолжительность которой составляет 12-24 мес, прогрессирующее ухудшение состояния больных сочетается со следующими клинико-лабораторными показателями: содержание миелобластов в костном мозге в пределах 10-19%; количество базофилов – 20% и более; не связанная с терапией устойчивая тромбоцитопения ($<100 \times 10^9/\text{л}$); не чувствительное к терапии продолжающееся увеличение количества лейкоцитов в крови ($>10 \times 10^9/\text{л}$) и размеров селезенки; цитогенетическое подтверждение клональной эволюции. В фазе акселерации отмечаются выраженные признаки дисгранулоцитопоза и дисмиелоцитоза, появление в мазках костного мозга гипергранулярных промиелоцитов и миелоцитов, приобретенной пельгеровской аномалии нейтрофилов или эозинофилов, кольцевых сидеробластов и мегалобластидных элементов, мегакариоцитов с малыми округлыми ядрами.

У многих больных ХМЛ в среднем через 4 года после начала заболевания в результате прогрессирования процесса происходит переход в острую фазу с развитием бластного криза. У 20-25% пациентов с ХМЛ криз развивается без промежуточной фазы акселерации. Решающим для диагностики бластного криза ХМЛ считается обнаружение $>20\%$ бластов в периферической крови и костном мозге и/или наличие экстрамедуллярных очагов лейкемической инфильтрации, состоящих исключительно из бластных клеток, в коже, лимфатических узлах, центральной нервной системе, других тканях и органах, или обнаружение при гистологическом изучении трепанобиоптатов костного мозга крупных агрегатов и кластеров бластных клеток.

У 70% больных при бластном кризе ХМЛ лейкемические клетки имеют миелоидную природу, представлены трансформированными клетками-предшественниками грануло-, моноцитарного или эритробластического и мегакариоцитарного ряда либо низкодифференцированными клетками этих ростков миелоцитоза в различном сочетании (рис. 2). Приблизительно у 20-30% пациентов выявляющиеся в периферической крови и костном мозге бластные клетки имеют лимфоидную природу (рис. 3). В редких случаях выявляются одновременно отдельные популяции миелоидных и лимфоидных бластов.

Применение цитохимических методов наряду с обычными способами паноптической окраски мазков крови и костного мозга позволяет достаточно точно установить природу лейкемических клеток при бластном кризе ХМЛ в каждом конкретном случае. При наиболее распространенном миелоидном подварианте бластного криза в лейкемических клетках определяется положительная реакция при выявлении

активности миелопероксидазы (МПО) и нафтол-AS-D-хлорацетатэстеразы, слабое диффузное окрашивание цитоплазмы клеток при определении активности кислой фосфатазы и отрицательная реакция при выявлении активности кислой неспецифической эстеразы. В случаях, когда в наименее дифференцированных blastax при цитохимическом исследовании активность МПО не обнаруживается, для подтверждения природы лейкемических клеток проводится иммуноцитохимическое исследование с использованием моноклональных антител (мкАт) к указанному белку. Установление признаков миелоидной или моноцитарной направленности дифференцировки blastax выполняется также на основании выявления экспрессии антигенов CD13, CD14, CD15, CD33 и других. Взаимодействие с мкАт к антигенам CD41 и CD61, к гликофору и гемоглобину А позволяет идентифицировать blastax с признаками коммитации в клетки эритробластического и мегакариоцитарного ряда.

При лимфоидном варианте blastax криза ХМЛ клетки имеют цитоморфологические признаки лимфобластов с высоким ядерно-цитоплазматическим соотношением, содержат ядра с неправильными контурами (расщепленные и складчатые) с одним ядрышком. В умеренно базофильной цитоплазме клеток отсутствует азурофильная зернистость. Активность МПО в blastax не выявляется, а при PAS-реакции в цитоплазме обнаруживается гликоген в виде крупных гранул или блоков.

В большинстве случаев лимфоидного blastax криза ХМЛ лейкемические клетки представлены трансформированными клетками-предшественниками В-лимфоцитов. На поверхностных мембранах blastax обнаруживается экспрессия антигенов CD10, CD19 и CD20; в ядрах клеток определяется терминальная дезоксирибонуклеотидилтрансфераза (TdT). Иммуноглобулины на поверхностных мембранах blastax не выявляются, в редких случаях в цитоплазме обнаруживаются тяжелые μ -цепи. У многих пациентов при лимфоидном варианте blastax криза ХМЛ на поверхностных мембранах лейкемических клеток определяется коэкспрессия одного или более миелоидных антигенов. Описаны также редкие случаи трансформации ХМЛ у больных с Ph-хромосомой и t(3;7)(q26;q21) в blastax криз, при котором неопластические клетки имеют иммунофенотипические признаки, сходные с острым лейкозом, представленным предшественниками миелоидных клеток и естественных клеток-киллеров: CD7⁺CD13⁺CD33⁺CD34⁺CD56⁺HLA-DR⁺. По данным доступной литературы, лишь у некоторых пациентов лейкемический клон при blastax кризе ХМЛ представлен ранними клетками-предшественниками Т-лимфоцитов: CD3⁺cyCD3⁺CD7⁺TdT⁺.

Медиана выживаемости больных с лимфоидным вариантом blastax криза ХМЛ составляет 12 мес, а при наличии blastax миелоидного типа – 3-9 мес.

Достижением таргетной терапии больных ХМЛ стало успешное применение ингибиторов тирозинкиназы. Первым из них был иматиниб. Последующая генерация представлена такими препаратами, как нилотииниб, дазатииниб и др. В связи с этим повысился интерес к изучению примитивных лейкемических стволовых клеток (ЛСК) при ХМЛ на разных стадиях развития заболевания. У 70-90% пациентов, получавших иматиниб в хронической фазе ХМЛ, и у некоторых больных в стадии blastax криза удается достичь полного гематологического и цитогенетического ответа. В этом случае 5-летняя выживаемость без прогрессирования заболевания составляет от 80 до 95%. Однако при этом в 95% случаев сохраняются определяемые уровни

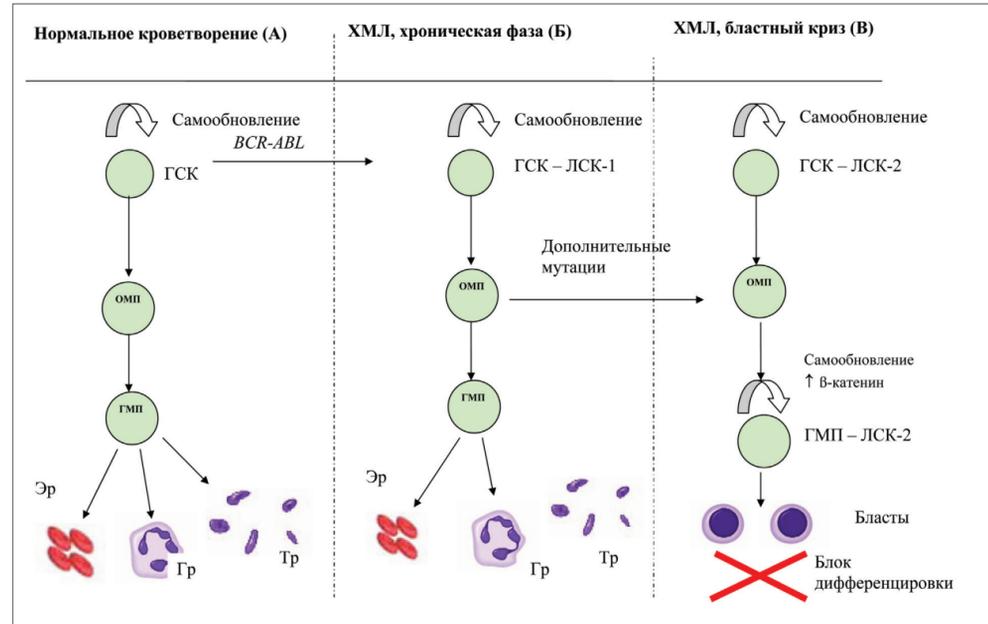


Рис. 4. Гемопоэтические стволовые клетки (ГСК) в норме (А), лейкемические стволовые клетки при ХМЛ в хронической фазе (ЛСК-1) (Б) и при blastax кризе (ЛСК-2) (В). Модифицированная схема (S.A. Stuart и соавт., 2008; M. Savona и соавт., 2008; B.J. Huntly и соавт., 2004)

тРНК *BCR-ABL*. У пациентов, прервавших терапию иматинибом, почти неизбежно развивается рецидив заболевания. Эти данные позволили предположить, что почти у всех больных существует нечувствительная к иматинибу популяция лейкоиницирующих клеток.

С.Н. Jamieson и соавт. (2004) представили данные о существовании динамического компартмента ЛСК в условиях прогрессирования заболевания. Они показали, что программа самообновления – основного свойства стволовых клеток – может быть реализована в коммитированных гемопоэтических клетках-предшественниках, в частности при миелоидном blastax кризе ХМЛ в пуле гранулоцитарно-моноцитарных клеток-предшественников. При этом была установлена связь между *BCR-ABL* и сигнальным путем WNT в поддержании самообновления.

Пока остается открытым вопрос о природе ЛСК при лимфоидном blastax кризе. По крайней мере, в доступной литературе эти данные отсутствуют.

Концепция об эволюции ЛСК при ХМЛ в случае прогрессирования заболевания находит все большее подтверждение. Известно, что при гемопоэзе в условиях нормы ГСК дает начало клеткам всех линий гемопоэза. В хронической фазе ХМЛ экспрессия гена *BCR-ABL* в компартменте ГСК (CD34⁺CD38⁻CD45RA⁻CD71⁻HLA-DR^{low}) приводит к экспансии клеток миелопоэза и выработке аномального количества зрелых и незрелых гранулоцитов. Таким образом, ГСК в хронической фазе ХМЛ функционирует как лейкоиницирующая клетка. При гетеротрансплантации клеток больных ХМЛ в этой фазе, как и нормальных ГСК, мышам NOD/SCID трансскрипты *BCR-ABL* обнаруживаются в клетках всех линий миелопоэза, в В-лимфоцитах и не определяются в Т-лимфоцитах.

Переход в фазу blastax криза обусловлен дополнительными генетическими и эпигенетическими изменениями, ведущими к появлению повышенного количества blastax клеток. Развитие blastax криза сопровождается также появлением популяции гранулоцитарно-макрофагальных предшественников (ГМП) с повышенной активностью β -катенина, способностью к самообновлению. ГМП ХМЛ в фазе blastax криза (CD34⁺CD38⁻Lin⁻) способны индуцировать лейкоз при гетеротрансплантации мышам с выраженным комбинированным иммунодефицитом. В модельных опытах у экспериментальных животных несколько десятков клеток из трансформированного *BCR-ABL* компартмента ГМП способны индуцировать заболевание, подобное ХМЛ. В хронической фазе ХМЛ активность β -катенина, как показано в ряде исследований, ограничивается фракцией ГСК. В то же время у больных в фазе blastax криза активация β -катенина в ядрах клеток определяется в популяции ГМП.

Активация сигнального пути Wnt/ β -катенин, играющего важную роль в самообновлении стволовых клеток, была установлена у пациентов с ХМЛ в фазе blastax криза с помощью конфокального люминесцентного микроскопического анализа. У ряда больных активация β -катенина была ассоциирована с дерегуляцией в стволовых клетках и клетках-предшественниках киназы GSK3 β – важного отрицательного регулятора β -катенина; в некоторых случаях – с нарушенной экспрессией другого негативного регулятора сигнального пути – актина 2. Radich и соавт. при анализе экспрессии CD34⁺ клеток в разных стадиях развития ХМЛ с помощью микроматриц идентифицировали ряд избирательно экспрессированных генов, функционирующих при самообновлении, дифференцировке клеток, реакции на повреждение ДНК. Установлена активация сигнального пути Wnt при прогрессировании заболевания, связь со снижением экспрессии гена *JunB* вследствие его дерегуляции, вызванной факторами транскрипции MDF1. Представленные данные позволили прийти к заключению, что нарушение дифференцировки и усиление самообновления клеток-предшественников при ХМЛ служит ключевым компонентом в прогрессировании патологического процесса. Известно, что в хронической фазе ХМЛ содержание транскриптов *BCR-ABL* выше в популяции ГСК, чем в кровяных клетках-предшественниках, но коренным образом изменяется при прогрессировании заболевания и развитии blastax криза.

В норме ГСК дают начало возникновению кровяных клеток всех линий (рис. 4). В хронической фазе ХМЛ экспрессия *BCR-ABL* в ЛСК-1, находящихся в компартменте ГСК, приводит к экспансии аномального числа незрелых и зрелых гранулоцитов (рис. 4). Прогрессирование в фазу blastax криза, сопровождающееся блоком дифференцировки и экспансией blastax клеток, происходит с участием дополнительных генетических и эпигенетических изменений и обусловлено приобретением клетками, относящимися к популяции ГМП с повышенной активностью β -катенина, способности к самообновлению (рис. 4).

У больных с blastax кризом ХМЛ, подвергшихся лечению иматинибом, уменьшается активация β -катенина в ГМП, что служит подтверждением связи между активностью *BCR-ABL*-тирозинкиназы и способностью клеток-предшественников к самообновлению. Лейкемические ГМП являются продуктом генетической нестабильности, однако специфические генетические изменения, благодаря которым ГМП приобретают способность к самообновлению, пока остаются неизвестными.

В хронической фазе ХМЛ в клетках-предшественниках отмечается нерегулируемая экспрессия генов дифференцировки мегакариоцитов и эритроцитов, приводящая к экспансии пула мегакариоцитарно-эритробластических клеток-предшественников. В этой же фазе заболевания в CD34⁺ клетках-предшественниках увеличивается выработка хемокинов, ассоциированных с мобилизацией стволовых клеток.

Полагают, что недостаточная эффективность применяющихся цитотоксических агентов при ХМЛ обусловлена тем, что они действуют на популяции как ЛСК, так и нормальных ГСК.

Новая стратегия терапии больных предусматривает применение препаратов, мишенью действия которых были бы популяции ЛСК, определяющиеся в различных стадиях развития заболевания. Подобные перспективные агенты (партенолид, TDZD-8) в настоящее время проходят доклинические исследования.