

УДК 616-006.446.2-036.12:615.277.3.015.46:616-092.4

А.Н. Иншаков¹, Е.В. Катаева², Е.В. Трифонова², А.К. Голенков²**ФАРМАКОДИНАМИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ *IN VITRO*
КЛИНИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ФЛЮДАРАБИНА
ПРИ РЕЗИСТЕНТНЫХ ФОРМАХ ХРОНИЧЕСКОГО ЛИМФОЛЕЙКОЗА**¹РОНЦ им. Н.Н. Блохина, Москва²МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского, Москва**Контактная информация:**

Иншаков Андрей Николаевич, научный сотрудник лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей.

адрес: 115478, Москва, Каширское шоссе, 24; **тел.:** +7(495)-392-26-16, **моб.:** +7(926)-179-04-20**e-mail:** an-inshakov@yandex.ru

Статья поступила 02.06.2009, принята к печати 07.10.2009.

Резюме

Методом МТТ-теста *in vitro* определяли чувствительность к флюдарабину опухолевых лимфоцитов 14 первичных и 49 резистентных больных хроническим лимфолейкозом. Выявлено, что 61,2% резистентных больных чувствительны к препарату *in vitro*. Обнаружено, что лучшему клиническому эффекту соответствуют более низкие значения LD₅₀ при ПР 0,61±0,21 мкг/мл, ЧР 1,69±0,56 мкг/мл, СБ 3,5±1,3 мкг/мл и ПБ 10,21±6,5 мкг/мл. Анализ клинического ответа показал, что в группе чувствительных *in vitro* больных 82,4 % (n=17) ответивших на лечение, а в группе не чувствительных больных клиническая эффективность была достоверно ниже: 37,5 % (n=16) ответивших на лечение флюдарabiном (p<0,05).

Ключевые слова: хронический лимфолейкоз, МТТ-тест, резистентность, флюдарабин.A.N. Inshakov¹, E.V. Kataeva², E.V. Trifonova², A.K. Golenkov²**FLUDARABINE PHARMACODYNAMIC *IN VITRO*****AND ITS EFFECT IN PATIENTS****WITH CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA**¹N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of RAMS, Moscow²M.F. Vladimirovsky Clinical Institute of Moscow Region, Moscow**Abstract**

We have used MTT assay to examine the effect of Fludarabine on lymphocytes of patients with chronic lymphocytic leukemia. 14 non-treated and 49 resistant patients with chronic lymphocytic leukemia were enrolled in this study. 61,2 % of patients responded to Fludarabine.

Here, we show that the low IC₅₀ is more effective in treatment of disease: IC₅₀ of the complete remission was 0,61±0,21 mkg/ml, the partial remission – 1,69±0,56 mkg/ml, the stabilization of disease – 3,5±1,3 mkg/ml, the progression of disease – 10,21±6,5 mkg/ml. In case of sensitivity toward Fludarabine, observed *in vitro* test 82,4 % patients (n=17) responded to treatment and only 37,5 % (n=16) patients responded in resistant group of patients. The data are statistically significant.

Key words: chronic lymphocytic leukaemia, MTT-assay, resistance, fludarabine.**Введение**

В последнее время в гематологии уделяется большое внимание проблеме лекарственной устойчивости, так как именно с этим связана неэффективность программной ХТ. В настоящее время данная проблема разрабатывается в следующих направлениях:

- изучение клинической эффективности новых противоопухолевых препаратов с различными механизмами действия;
- создание более эффективных химиотерапевтических программ на основе этих препаратов;
- высокодозная терапия с пересадкой аутологичных и аллогенных стволовых клеток;
- применение модуляторов резистентности – препаратов, обладающих способностью подавлять механизмы, ответственные за развитие устойчивости.

Определение чувствительности опухолевых клеток к химиопрепаратам при лейкозах *in vitro* так

же можно рассматривать как актуальное направление в преодолении устойчивости опухолевых клеток к цитостатикам. Применение пуриновых аналогов открыло новый этап в лечении хронического лимфолейкоза (ХЛЛ).

Появилась реальная возможность увеличить число полных ремиссий и выживаемость без прогрессии заболевания у первичных больных по сравнению с другими препаратами [6].

Необходимо учитывать, что 22–30 % первичных больных рефрактерны к флюдарабину [4]. Средние рефрактерных и рецидивных больных результаты лечения флюдарabiном хуже, частота достижения полной и частичной ремиссии ниже, чем в группе ранее не леченных пациентов [3].

По данным литературы, исследование чувствительности В-клеток больных ХЛЛ в культуре позволяет прогнозировать ответ на терапию флюдарabiном [1; 2; 5; 6]. В связи с этим, представляется актуальным исследовать чувствительность В-клеток больных ХЛЛ к флюдарабину и сопоставить клинические и лабораторные данные.

Материалы и методы

В исследовании представлены результаты терапии 63 больных ХЛЛ, из них женщин – 26, мужчин – 37 в возрасте 43–78 лет (средний возраст 59,5 года). Из 63 исследуемых 49 проводилось предшествующее лечение программной полихимиотерапией. Вследствие этого у них развилась резистентность к проводимому ранее лечению. Резистентными считались больные, не ответившие на 2 курса ХТ. Исследование чувствительности опухолевых лимфоцитов к флюдарабину первичным больным проводили до лечения, а получавшим ранее терапию – не менее чем через 2 мес. после последнего курса. Выделение мононуклеарных клеток из цельной гепаринизированной крови осуществляли на градиенте плотности Ficoll-Paque или фиколл-верографин по общепринятому методу *Böyum*. Для постановки МТТ-теста выделенные из периферической крови клетки скапывали в концентрации $2 \cdot 10^5$ в 180 мкл полной среды RPMI-1640 в 96-луночные плоскодонные планшеты (Costar, USA). В каждую лунку добавляли 20 мкл исследуемого препарата в 5 концентрациях, каждую концентрацию ставили в триплете, максимальная концентрация в лунке составила 33 мкг/мл с шагом разведения 3.

Флюдарабин (Schering AG, Германия): флакон, содержащий 50 мг лиофилизированного препарата. Разводили 5 мл 0,9%-ного р-ра NaCl до конечной стоковой концентрации 10 мг/мл. Хранили в аликвотах по 0,04 мл при -20°C до использования. Теоретически рассчитанная терапевтическая концентрация флюдарабина в плазме (ТПК) составила 0,97 мкг/мл.

В контрольные лунки с клетками добавляли по 20 мкл чистой среды RPMI-1640. В качестве контроля среды использовали лунки, содержащие 180 мкл полной и 20 мкл чистой среды RPMI-1640. Планшеты с клетками инкубировали в течение 96 ч при 37°C в атмосфере 5%-ного CO_2 . Через 96 ч в планшет с клетками добавляли по 20 мкл МТТ (концентрации в PBS 5 мг/мл) в каждую лунку и инкубировали 5–6 ч при 37°C в атмосфере 5%-ного CO_2 .

После образования синих кристалов формазана планшеты центрифугировали при 2000 об/мин 7–10 мин, надосадочную жидкость удаляли. Осадок растворяли, добавляя в лунки по 150–200 мкл ДМСО. Планшеты помещали на 5–7 мин в термостат при температуре 37°C . Далее планшеты встряхивали на шейкере, после этого интенсивность окрашивания среды измеряли на спектрофотометре «Multiscan» при $\lambda=540\text{--}690$ нм, за *blank* принимали лунки, содержащие среду без клеток и препаратов. Величина поглощения прямо пропорциональна числу живых клеток.

Процент живых клеток вычисляли по формуле:

$$N_0 = \frac{N_1}{N_2} \times 100\%, \text{ где}$$

- N_0 – процент живых клеток;
- N_1 – средняя оптическая плотность лунок, содержащих клетки и препарат;
- N_2 – средняя оптическая плотность контрольных лунок, содержащих только клетки.

Потом строили график зависимости «доза–эффект» и определяли LD_{50} (концентрация, которая вызывала гибель 50 % клеток). Клетки опухоли считались чувствительными к препарату, если значение LD_{50} было меньше ТПК.

Результаты и обсуждение

У 63 больных ХЛЛ было проведено скрининговое исследование чувствительности опухолевых клеток к флюдарабину МТТ-тестом. По нашим дан-

ным, В-лимфоциты 37 больных (58,7 %) оказались чувствительными, а 26 (41,3 %) – резистентны к флюдарабину. Часть обследованных больных составили ранее не леченные (первичные) 14 пациентов: в этой группе у 12 (85,7 %) опухолевые клетки были чувствительны, у 2 (14,3 %) устойчивы к действию флюдарабина *in vitro*. У остальных 49 была выявлена клиническая рефрактерность к проводимой ранее ХТ: опухолевые клетки 30 (61,2 %) больных были чувствительны, 19 (38,8 %) устойчивы к действию препарата (рис. 1). Как видно из проведенного скрининга, в группе рефрактерных больных ($n=49$) больше половины оказались чувствительны к флюдарабину. Это послужило основанием для изучения противоопухолевого эффекта флюдарабина у преимущественно резистентных больных.

В дальнейшем лечении этим препаратом было проведено 33 больным ХЛЛ, среди которых было 7 первичных, 26 рефрактерных к проводимому ранее лечению. Флюдарабин назначали в виде монотерапии по 25 мг/м² в течение 5 дней через 4-недельные интервалы. В зависимости от ответа на лечение больных разделили на две группы: отвечающие и не отвечающие на ХТ. Ответ должен был сохраняться не менее 2 мес. К отвечающим относили больных, достигших полной и частичной ремиссии, к не отвечающим – больных, у которых произошла стабилизация болезни или прогрессирование заболевания.

В результате проведенного лечения:

- у 33 больных ХЛЛ было достигнуто 11 полных (33,3 %) + 9 частичных ремиссий (27,3 %) = в совокупности 61 % ответивших,
- у 10 больных произошла стабилизация (30 %) + у 3 прогрессирование болезни (9,1 %) = не ответившие 39 %.

Результаты сопоставления данных чувствительности опухолевых клеток к флюдарабину в МТТ-тесте по LD_{50} у 33 больных с клиническими данными у этих же пациентов представлены на рис. 2. Средняя величина LD_{50} при полной ремиссии составила $0,61 \pm 0,21$ мкг/мл, частичной ремиссии $1,69 \pm 0,56$ мкг/мл, стабилизации болезни – $3,5 \pm 1,3$ мкг/мл и прогрессирование болезни – $10,21 \pm 6,5$ мкг/мл. Эти данные показывают, что лучшему клиническому эффекту соответствуют более низкие показатели LD_{50} . Были выявлены достоверные различия значений LD_{50} в группах ПР и СБ ($p < 0,05$), ПР и ПБ ($p < 0,05$), ЧР и ПБ ($p < 0,05$). Значение LD_{50} в группе больных, ответивших на лечение, было достоверно ниже и составило $1,1 \pm 0,3$ мкг/мл. В группе больных, не ответивших на лечение, значение LD_{50} было достоверно выше $5,1 \pm 1,8$ мкг/мл ($p < 0,01$; рис. 3).

При рассмотрении фармакодинамических кривых в группах больных, ответивших и не ответивших на лечение флюдарабином, получены следующие результаты. Фармакодинамическая кривая ответивших (ПР+ЧР) расположена более полого и ближе к оси ОХ, на которой отложены значения 5 концентраций флюдарабина, что отражает меньшее количество жизнеспособных клеток, оставшихся после культивирования с противоопухолевым препаратом. Фармакодинамическая кривая больных, не ответивших (СБ+ПБ) на терапию флюдарабином, расположена более круто и в точках 5 концентраций флюдарабина показывает большее количество жизнеспособных клеток. При увеличении концентрации более 11,1 мкг/мл отмечено приближение кривых друг к другу, что свидетельствует об одинаковой жизнеспособности клеток у больных, ответивших и не ответивших на лечение (рис. 4).



Рис. 1. Скрининг чувствительности к флюдарабину всех обследованных больных.

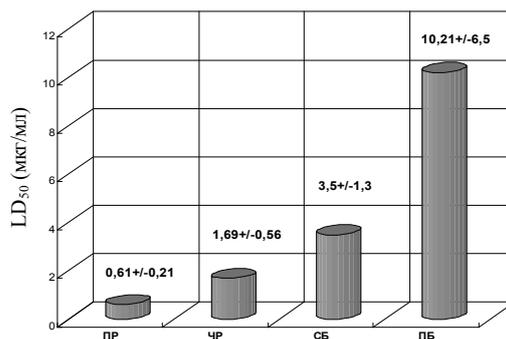


Рис. 2. Сравнение клинических результатов и величины LD₅₀ у больных ХЛЛ (n=33).

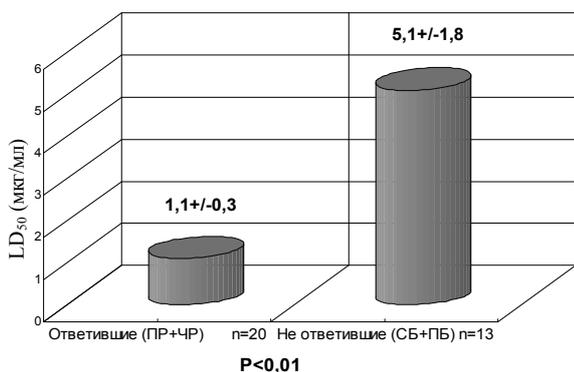


Рис. 3. Значения LD₅₀ в группах больных ХЛЛ, ответивших и не ответивших на лечение флюдарабинном (n=33).

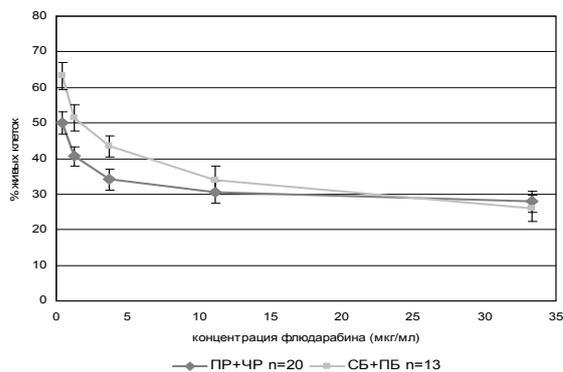


Рис. 4. Фармакодинамические кривые флюдарабина в культуре опухолевых клеток у 33 больных ХЛЛ *in vitro*.

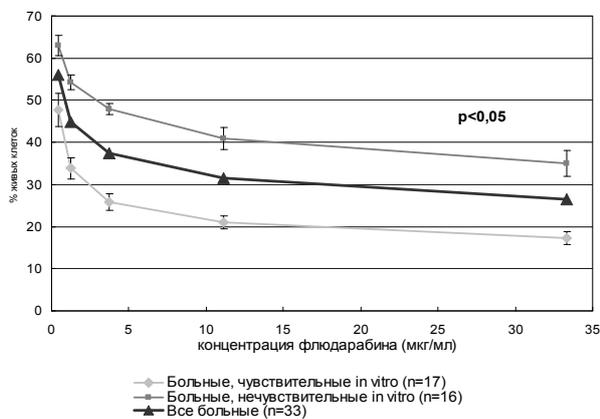


Рис. 5. Фармакодинамические кривые зависимости жизнеспособности опухолевых клеток от концентрации флюдарабина *in vitro*.

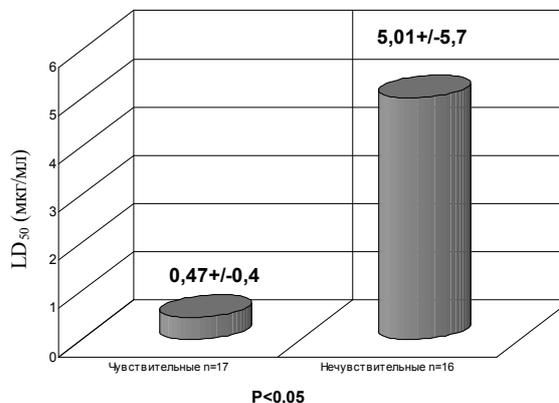


Рис. 6. Сравнение значений LD₅₀ в группах больных ХЛЛ чувствительных и нечувствительных к флюдарабину *in vitro* (n=33).

Таблица 1

Зависимость количества живых клеток от концентрации флюдарабина в МТТ-тесте

Клинический ответ	Концентрация флюдарабина <i>in vitro</i> , мкг/мл				
	0,41	1,23	3,7	11,1	33,3
	Количество живых клеток, %				
ПР+ЧР, n=20	50±3,1	40,6±2,7	34,1±3,0	30,5±3,0	27,9±3,0
СБ+ПБ, n=13	63,2±3,9	51,5±3,6	43,5±3,0	34±3,8	26,1±3,7
Достоверность	P<0,05	P<0,05	P<0,05		

В табл. 1 представлена цифровая зависимость количества живых клеток от концентрации флюдарабина в культуре. При концентрации флюдарабина в культуре 0,41; 1,23; 3,7 мкг/мл у больных, ответивших на лечение, количество живых клеток достоверно меньше, чем у пациентов, не ответивших на терапию.

Увеличение концентрации флюдарабина в культуре более 3,7 мкг/мл не приводит к дополнительной гибели клеток.

Таким образом, концентрации флюдарабина в культуре 0,41–3,7 мкг/мл являются оптимальными для оценки жизнеспособности клеток. Кроме того, выявлена обратная корреляционная зависимость между клинической эффективностью флюдарабина и количеством оставшихся живых опухолевых клеток.

Анализ соотношения жизнеспособности опухолевых клеток и концентраций флюдарабина в МТТ-тесте позволил выделить 2 подгруппы, в зависимости от LD_{50} и ТПК флюдарабина (которая составила ~0,97 мкг/мл): чувствительные ($LD_{50} < \text{ТПК}$, $n=17$) и нечувствительные ($LD_{50} > \text{ТПК}$, $n=16$). Средняя кривая – это средние значения живых клеток всех исследованных больных при каждой концентрации флюдарабина. Нижняя кривая отражает средние значения процентов живых клеток при 5 концентрациях флюдарабина у чувствительных пациентов. Верхняя кривая показывает средние значения процентов живых клеток при 5 возрастающих концентрациях во второй подгруппе больных (рис. 5).

Сравнение результатов показало, что у чувствительных пациентов среднее значение живых клеток по 5 концентрациям флюдарабина *in vitro* достоверно меньше, чем у нечувствительных (табл. 2).

LD_{50} в подгруппах чувствительных и нечувствительных больных так же достоверно ($p < 0,05$) различаются $0,47 \pm 0,4$ и $5,01 \pm 5,7$ мкг/мл, (рис. 6).

При анализе клинической эффективности флюдарабина в двух подгруппах также были получены отличающиеся результаты.

У чувствительных ($n=17$) зафиксировано 9 полных ремиссий, 5 частичных ремиссии (всего 82,4 % ответивших) и 3 стабилизации болезни. В подгруппе не чувствительных ($n=16$) клиническая эффективность была ниже: 2 полных ремиссии, 4 частичных ремиссий (всего 37,5 % ответивших), 7 стабилизации болезни и у 3 возникло прогрессирование болезни.

Полученные данные свидетельствуют о достоверно ($p < 0,05$) худших клинических результатах у не чувствительных пациентов согласно МТТ-тесту.

Заключение

При скрининге чувствительности опухолевых клеток к флюдарабину у резистентных больных ХЛЛ было установлено, что более половины (62,2 %) чувствительны к действию препарата *in vitro*. Клинический ответ свидетельствует о дозозависимом эффекте флюдарабина, что подтверждается данными фармакодинамики в МТТ-тесте, лучше клиническому эффекту соответствуют более низкие значения LD_{50} . При анализе клинических ответов после терапии флюдарabiном у больных с разной чувствительностью *in vitro* наблюдается четкая взаимосвязь: в группе больных, чувствительных к флюдарабину по МТТ-тесту, LD_{50} достигалась при концентрации препарата 0,47–0,4 мкг/мл и наблюдалась большая клиническая эффективность (82,4 % ответивших) по сравнению с нечувствительными *in vitro*, LD_{50} у которых составила 5,01–5,7 мкг/мл, $p < 0,05$ (37,5 % ответивших). Таким образом, полученные результаты указывают на то, что МТТ-тест может использоваться как достоверный метод в определении чувствительности опухолевых клеток к флюдарабину *in vitro*, и позволяет прогнозировать клиническую значимость препарата.

Таблица 2

Зависимость жизнеспособности опухолевых клеток от концентрации флюдарабина в МТТ-тесте

Группы	Концентрация флюдарабина <i>in vitro</i> , мкг/мл				
	0,41	1,23	3,7	11,1	33,3
	Количество живых клеток, %				
Чувствительные, $n=17$	47,5±3,8	31,6±2,5	24,8±1,6	21,1±1,5	16,7±1,6
Нечувствительные, $n=16$	63,4±2,4	52,8±1,7	47,5±1,6	41,4±2,3	35,2±2,8
Достоверность	$P < 0,05$	$P < 0,05$	$P < 0,05$	$P < 0,05$	$P < 0,05$

Литература

1. Bosanquet A.G., Jonson S.A., Richards S.M. Do not treat all CLL patients with fludarabine? // Brit. J. of Hematol. – 1998. – Vol. 102(1). – P. 190.
2. Bosanquet A.G., Stephen A.G., Richards S.M. High mortality of DiSC assay resistant CLL patients treated with fludarabine // Brit. J. of Hematol. – 1998. – Vol. 101. – P. 24.
3. Bowen A.L., Dearden C.E., Matutes E., Catovsky D. Fludarabine—combination chemotherapy in chronic lymphocytic leukaemia // Brit. J. of Hematol. – 1999. – Vol. 105(1). – P. 85.
4. Juliusson G. Complications in the treatment of CLL with purine analogues // Hematology and Cell Therapy. – 1997. – Vol. 39. – P. S41–S44.
5. Morabito F., Steliana C., Callea I. et al. In vitro drug-induced cytotoxicity predicts clinical response to fludarabine in B-cell chronic lymphocytic leukemia // Brit. J. Of Hematol. – 1998. – Vol. 102. – P. 528–9.
6. Silber R., Degar B., Costin D. et al. Chemosensitivity of lymphocytes from patients with B-cell chronic lymphocytic leukaemia to chlorambucil, fludarabine, and camptothecin analogs // Blood. – 1998. – Vol. 84. – P. 3440–6.