

ВЛИЯНИЕ ПЕРЕРЫВОВ ТЕРАПИИ ИМАТИНИБОМ НА ДОСТИЖЕНИЕ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКОГО И МОЛЕКУЛЯРНОГО ОТВЕТОВ У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ МИЕЛОЛЕЙКОЗОМ

Сергей Иванович Куцев¹, Юрий Васильевич Шатохин²

¹ Лаборатория медицинской генетики (зав. — доц. С.И. Куцев), ² кафедра гематологии и трансфузиологии с курсом лабораторной диагностики ФПК и ППС (зав. — проф. Ю.В. Шатохин) Ростовского государственного медицинского университета, e-mail: kutsev@mail.ru

Реферат

Изучено влияние перерывов в терапии иматинибом на вероятность достижения большого и полного цитогенетического ответов, а также большого молекулярного ответа у 298 пациентов с хроническим миелолейкозом в хронической и акселерационной фазах. Обнаружено статистически достоверное снижение вероятности их достижения у пациентов с перерывами в терапии иматинибом более 30 дней при медиане длительности терапии иматинибом 24 месяца.

Ключевые слова: хронический миелолейкоз, перерывы в терапии иматинибом, цитогенетический и молекулярный ответы.

В основе патогенеза хронического миелоидного лейкоза (ХМЛ) лежит появление в стволовой кроветворной клетке реципрокной транслокации $t(9;22)(q34;q11.2)$. Образующуюся при этой хромосомной перестройке дериватную хромосому 22 называют филадельфийской (Ph-хромосома). На момент диагностики миелолейкоза 90–100% клеток костного мозга характеризуется наличием Ph-хромосомы. На молекулярном уровне транслокация $t(9;22)(q34;q11.2)$ сопровождается образованием химерного онкогена BCR-ABL, кодирующего патологически активную BCR-ABL тирозинкиназу.

Исследования молекулярного патогенеза ХМЛ подготовили почву для развития таргетной (целенаправленной) терапии этого заболевания, заключающейся в применении специфических ингибиторов BCR-ABL тирозинкиназы. Создание первого из них — иматиниба (STI571) — стало революционным прорывом в области целенаправленной противоопухолевой терапии. Впервые вместо уничтожения всех миелоидных клеток с помощью неспецифического цитостатического воздействия стала применяться терапия, действующая избирательно, блокируя повышенную пролиферативную активность и стимулируя

апоптоз только опухолевых клеток.

Для оценки эффективности терапии ХМЛ ингибиторами тирозинкиназ, в частности иматинибом, Европейское общество по лечению лейкозов (ELN) рекомендовало критерии оптимального ответа, субоптимального ответа и отсутствия ответа на проводимое лечение, отражающие уровень редукции клона опухолевых клеток [2]. Оптимальный ответ на терапию иматинибом заключается в достижении полного гематологического ответа (ПГО: содержание в крови тромбоцитов менее чем 450×10^9 /л, лейкоцитов менее чем 10×10^9 /л, отсутствие незрелых гранулоцитов, базофилов менее чем 5%, селезенка не пальпируется) после 3 месяцев терапии. Частичный цитогенетический ответ (ЧЦГО) определяется при числе Ph-положительных клеток в костном мозге от 1 до 35% после 6 месяцев терапии, полный цитогенетический ответ (ПЦГО) — при отсутствии положительных клеток в костном мозге после 12 месяцев терапии, большой молекулярный ответ (БМО) — при снижении уровня экспрессии гена BCR-ABL относительно базового уровня на 3 log и более после 18 месяцев терапии [2].

Субоптимальный ответ расценивается как отсутствие ПГО после 3 месяцев терапии иматинибом при положительной динамике показателей крови, ЧЦГО — после 6 месяцев, ПЦГО — после 12, БМО — после 18 [2]. Отсутствие ответа на проводимое лечение манифестируется исчезновением ПГО и/или какого-либо цитогенетического ответа (количество в костном мозге Ph-позитивных клеток превышает 95% после 6 месяцев терапии), не появляются ЧЦГО после 12 и ПЦГО после 8. Как “неудача” проводимой терапии расцениваются прогрессия заболевания и переход его хронической фазы в фазу акселерации или

бластный криз, а также случаи утраты гематологического ответа, ЧЦГО и ПЦГО, повышение уровня BCR-ABL транскрипта более чем на 1 log, произошедшее на фоне ранее эффективной терапии иматинибом.

Несмотря на значительные успехи таргетной терапии ХМЛ иматинибом, после 7 лет терапии иматинибом у 18% пациентов на фоне непрерывной терапии не был достигнут ПЦГО, а среди больных ХМЛ, достигших ПЦГО, 17% пациентов потеряли цитогенетический ответ. В 3% случаев наблюдались прогрессия ХМЛ в фазе акселерации и бластный криз, 2% пациентов умерли от причин, связанных с основным заболеванием [6].

В условиях повседневной практики терапия иматинибом зачастую сопровождается кратковременной (на 7–14 дней) обоснованной отменой препарата в связи с гематологической и негематологической токсичностью препарата. Однако в ряде случаев у некоторых пациентов были выявлены необоснованные перерывы терапии иматинибом, обусловленные, в частности, снижением приверженности пациентов к проводимой терапии.

Целью настоящего исследования являлось изучение влияния перерывов в терапии иматинибом на достижение цитогенетического и молекулярного ответов у пациентов с ХМЛ.

Обследованы 298 пациентов с клинически манифестированным хроническим миелолейкозом в хронической фазе или фазе акселерации. У всех больных диагноз ХМЛ был подтвержден цитогенетическим методом (обнаружение транслокации t(9;22)(q34;q11.2) в клетках костного мозга) и/или молекулярно-цитогенетически (обнаружение слитного гена BCR-ABL в клетках костного мозга). Все пациенты с ХМЛ получали терапию препаратом класса ингибиторов тирозинкиназ — иматинибом в дозе 400, 600 или 800 мг/сут 6 или более месяцев. Обязательным условием участия больных ХМЛ в исследовании являлось наличие их информированного согласия на анонимное использование результатов выполненных анализов в научном исследовании.

Медиана возраста пациентов на момент постановки диагноза составляла 46,6 года (минимальный возраст — 12,9 года, максимальный — 77,4). Отношение числа

мужчин и женщин — 137/161. Были обследованы все пациенты, впервые начавшие получать терапию иматинибом как в хронической фазе (n=215; 72,1%), так и в фазе акселерации (n=83; 27,9%). Медиана длительности терапии ХМЛ составляла 24 месяца (минимальная длительность — 6 месяцев, максимальная — 84).

С целью диагностики ХМЛ и цитогенетического мониторинга эффективности терапии анализ кариотипа клеток стерального пунктата костного мозга пациентов с ХМЛ исследовали каждые 6 месяцев терапии по общепринятой методике. Цитогенетические препараты окрашивали GTG-дифференциальным методом. Кариотипирование проводили с помощью микроскопа Аксиоплан-2-мт («Carl Zeiss») и программного обеспечения ikaros («Metasystems»). В каждом случае анализировали не менее 20 метафазных пластинок.

В случаях отсутствия в образцах костного мозга митотически делящихся клеток или при неудовлетворительном качестве полученных метафазных пластинок выполняли интерфазную флуоресцентную *in situ* гибридизацию хромосом (iFISH) с двухцветным ДНК зондом к слитному гену BCR-ABL — 22q11.2 LSI BCR SpectruGreen / 9q34 LSI ABL Spectrum Orange dual fusion DNA probe (Vysis, Abbott) согласно протоколу производителя. В каждом случае анализировали не менее 200 интерфазных ядер. Снижение количества Ph-позитивных клеток в костном мозге до 35% и меньше означало достижение пациентом БЦГО, который включал в себя ЧЦГО и ПЦГО.

Для молекулярно-генетического мониторинга из образцов венозной крови в количестве не менее 10 мл выделяли тотальную РНК гуанидин-тиоционат хлороформ-фенольным методом по P. Chomczynski и N. Sacchi [3]. Для реакции обратной транскрипции использовали от 1 до 3 мкг выделенной РНК, случайные гексамерные праймеры и M-MLV обратную транскриптазу. ПЦР с детекцией в режиме реального времени проводили в термоциклере Rotor-Gene 6000 (версии 1.7, «Corbett Life Science», Австралия). Для выделения РНК, проведения реакции обратной транскрипции и ПЦР в реальном времени использовали наборы реагентов

ОНКОСКРИН 1-1-Q (ООО «ГеноТехнология», Россия). Интенсивность экспрессии химерного онкогена BCR-ABL типа p210 и контрольного (“housekeeping”) гена ABL определяли согласно протоколу производителя. Результаты относительной экспрессии гена BCR-ABL устанавливали по отношению к рассчитанному нами среднестатистическому базовому уровню (БУ) экспрессии гена BCR-ABL у пациентов с впервые выявленным ХМЛ и выражали их в виде десятичного логарифма снижения ($\Delta\log$) экспрессии по отношению к БУ. Снижение экспрессии на 1 log по отношению к БУ означало снижение уровня экспрессии BCR-ABL транскрипта по сравнению с БУ в 10 раз, на 2 log — в 100 раз, на 3 log — в 1000 раз, на 4 log — в 10000 раз. Снижение экспрессии гена BCR-ABL более чем на 3 log ($\Delta\log > 3$) означало достижение БМО.

Перерывы в терапии иматинибом обнаруживали на основании изучения медицинской документации, а также результатов анкетирования пациентов с ХМЛ, получавших лечение этим препаратом.

Статистическую обработку данных производили с использованием пакета прикладных программ Statistica 6,0 в соответствии с рекомендациями О.Ю. Ребровой [1] по обработке численных результатов экспериментов в медицине.

Исследование стандартным цитогенетическим и молекулярно-цитогенетическим методами клеток костного мозга в процессе терапии иматинибом позволяет в полной мере оценить редукцию опухолевого клона клеток. В нашем исследовании при медиане длительности терапии иматинибом 24 месяца среди 298 пациентов с ХМЛ, получавших терапию иматинибом 6 или более месяцев, у 197 (66,1%) больных был достигнут БЦГО: при цитогенетическом исследовании костного мозга число Ph-положительных клеток составляло менее 35% миелокариоцитов. Из этих пациентов в соответствии с рекомендациями Европейского общества по лечению лейкозов (ELN) в срок после 6 месяцев терапии иматинибом (оптимальный ответ) БЦГО был достигнут у 135 (45,3%) человек. У остальных 62 (20,8%) больных БЦГО был достигнут в сроки 12–72 месяца. Однако у 101 больного ХМЛ (33,9%) БЦГО вообще не развивался на фоне терапии иматинибом.

ПЦГО на терапию иматинибом, при котором Ph-положительные клетки в костном мозге не обнаруживались цитогенетическим методом, был достигнут у 157 (59,7%) больных ХМЛ из 263 пациентов, получавших терапию иматинибом 12 или более месяцев. Из них в соответствии с рекомендациями Европейского общества по лечению лейкозов (ELN) в срок после 12 месяцев терапии иматинибом (оптимальный ответ) ПЦГО был достигнут у 119 (45,2%) больных. У остальных 38 (14,5%) больных ПЦГО был получен через 18 – 72 месяца. У 106 (40,3%) пациентов с ПЦГО на терапию иматинибом вообще отсутствовал.

Достижение БМО у пациентов с ПЦГО, характеризующегося редукцией экспрессии гена BCR-ABL на 3 log или более относительно БУ, является важнейшим критерием эффективности терапии ХМЛ. В нашем исследовании БМО достигли 84 (28,2%) пациента с ХМЛ.

При медиане длительности терапии иматинибом, равной 24 месяцам, среди пациентов с ХМЛ у 95 (31,9%) из них было выявлено от 1 до 6 эпизодов перерывов в терапии иматинибом. Медиана длительности перерывов в терапии составляла 60 дней (минимально — 5 дней, максимально — 210 дней). С целью проверки гипотезы об отрицательном влиянии перерывов на эффективность лечения иматинибом были изучены различия вероятности достижения БЦГО, ПЦГО и БМО у пациентов с перерывами более 30 дней (половина медианы) и без перерывов. В результате проведенного исследования было обнаружено статистически достоверное снижение вероятности достижения БЦГО ($p=0,00246$), ПЦГО ($p=0,00013$) и БМО ($p=0,04572$) у пациентов с перерывами в терапии иматинибом (рис.1, 2). Особенно заметно влияние перерывов в течение первого года терапии. Так, у пациентов с перерывами продолжительностью более 30 дней вероятность достижения БЦГО и ПЦГО после 6 и 12 месяцев терапии в 2 раза меньше, чем у пациентов без перерывов.

В нашем исследовании показана высокая эффективность терапии ХМЛ иматинибом: при медиане длительности терапии иматинибом 24 месяца БЦГО развивался в 66,1% случаев ХМЛ, ПЦГО — в 45,2%, БМО — в 28,2%. Результаты тера-

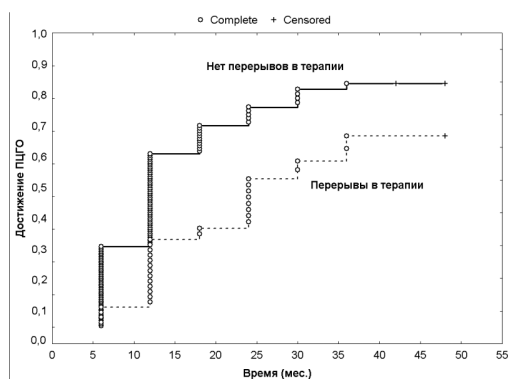


Рис. 1. Вероятность достижения полного цитогенетического ответа у больных хроническим миелолейкозом в зависимости от перерывов в терапии иматинибом.

пии иматинибом, обнаруженные в изученной нами когорте пациентов с ХМЛ, сопоставимы с результатами терапии иматинибом, выявленными в ряде клинических исследований. Так, в “ключевом” международном рандомизированном исследовании IRIS после 18 месяцев терапии иматинибом БЦГО наблюдался у 60% пациентов с ХМЛ [5].

Особенный интерес вызывает рефрактерность к иматинибу пациентов, обусловленная, возможно, разными механизмами развития резистентности: амплификация и повышенная экспрессия гена BCR-ABL, мутации гена BCR-ABL, появление дополнительных хромосомных aberrаций, избыточное связывание иматиниба с транспортными белками крови (например, сывороточным альфа-1-кислым гликопротеином), экспрессия белка множественной лекарственной резистентности Pgp [4].

Редукция клона Ph-позитивных опухолевых клеток в ответ на терапию иматинибом является, несомненно, мультифакториальным процессом. Поэтому отсутствие цитогенетического ответа на проводимую терапию может быть вызвано не только различными механизмами резистентности, но и, например, перерывами в терапии. Перерывы в терапии иматинибом могут замедлять достижение БЦГО, ПЦГО и БМО, являясь причиной субоптимального ответа или отсутствия ответа на проводимое лечение. Нами было обнаружено статистически достоверное снижение вероятности достижения БЦГО, ПЦГО и БМО у пациентов с перерывами в терапии иматинибом не

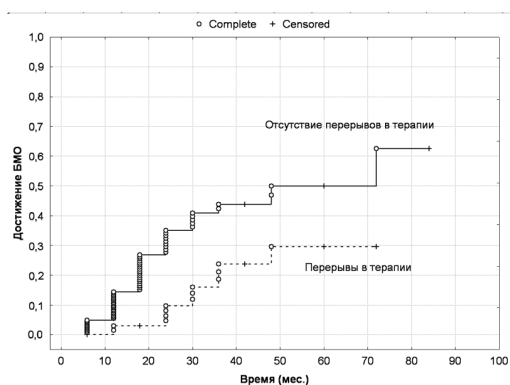


Рис.2. Вероятность достижения большого молекулярного ответа у больных хроническим миелолейкозом в зависимости от перерывов в терапии иматинибом.

более 30 дней за весь период лечения.

Особенно важно, на наш взгляд, выявленное влияние перерывов в течение первого года терапии. Перерывы в терапии иматинибом более 30 дней приводят к снижению в 2 раза вероятности редукции опухолевого клона до уровня ПЦГО, который обычно наблюдается после 12 месяцев непрерывной терапии.

Таким образом, по нашим данным, терапия ХМЛ ингибитором тирозинкиназы иматинибом высокоэффективна у пациентов с ХМЛ в хронической фазе и фазе акселерации. Перерывы в терапии иматинибом являются одной из важных причин субоптимального ответа или отсутствия ответа на лечение иматинибом. Необоснованные перерывы в терапии иматинибом должны быть полностью исключены из практики лечения ХМЛ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. — М.: Медиа Сфера, 2002. — 305 с.
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 LeukemiaNet // *Blood*. — 2006. — Vol. 108, № 6. — P. 1809–1820.
3. Chomczynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction // *Anal. Biochem.* — 1987. — Vol. 162, № 1. — P. 156–159.
4. Goldman J.M. How I treat chronic myeloid leukemia in the imatinib era // *Blood*. — 2007. — Vol. 110, № 8. — P. 2828–2837.
5. Kantarjian H., Sawyers C., Hochhaus A. et al. Hematologic and cytogenetic responses to imatinib mesylate in chronic myelogenous leukemia // *N. Engl. J. Med.* — 2002. — Vol. 346, № 9. — P. 645–652.

6. O'Brien S.G., Guilhot F., Goldman J.M. et al. International randomized study of interferon versus STI571 (IRIS) 7-year follow-up: sustained survival, low rate of transformation and increased rate of major molecular response (MMR) in patients (pts) with newly diagnosed chronic myeloid leukemia in chronic phase (CMLCP) treated with imatinib (IM) // Blood. — 2008. — Vol. 112, № 11. — P. 186.

Поступила 04.09.09.

EFFECTS OF BREAKS IN TREATMENT WITH IMATINIB IN ACHIEVING CYTOGENETIC AND MOLECULAR RESPONSES IN PATIENTS WITH CHRONIC MYELOID LEUKEMIA

S.I. Kutsev, Yu.V. Shatohin

Summary

Studied was the effect of interruption of imatinib treatment on the probability of achieving large and complete cytogenetic responses, as well as a large molecular response in 298 patients with chronic myeloid leukemia in chronic and acceleration phases. Found was a statistically significant decrease in the likelihood of their achievement in patients with breaks in imatinib therapy for more than 30 days with a median duration of imatinib therapy 24 months.

Keywords: chronic myeloid leukemia, imatinib therapy interruptions, cytogenetic and molecular responses.

УДК 616.411—001—089.8:612—084

ВЫБОР ХИРУРГИЧЕСКОЙ ТАКТИКИ ПРИ ПОВРЕЖДЕНИЯХ СЕЛЕЗЕНКИ

Гасрет Сейфуллаевич Рагимов

Кафедра оперативной хирургии и топографической анатомии (зав. — проф. М.Г. Ахмадудинов)
Дагестанской государственной медицинской академии, г. Махачкала

Реферат

Предложена тактика хирургического лечения повреждений селезенки, разработанная в условиях эксперимента и использованная в клинике при её травмах. Тактика основана на дифференцированном подходе к оперативному вмешательству при ранах, разрывах, субкапсулярных повреждениях селезенки. Аутотрансплантация ткани селезенки использована как альтернатива спленэктомии при невозможности её сохранения.

Ключевые слова: селезенка, травма, хирургическая тактика.

Частота повреждений селезенки составляет 22,3–30% при травме органов брюшной полости и занимает второе место среди разрывов паренхиматозных органов [1, 3, 9, 10]. Многообразие повреждений селезенки и неудовлетворительные результаты их лечения привели к использованию многочисленных приемов гемостаза — от прошивания, лигирования артерии, применения биологических и синтетических пленок, клеевых композиций до методов неконтактного воздействия (лазерного, плазменного), аргонного коагулятора, спрей-коагуляции [2, 4–8, 11–13]. Остановка лиенальных кровотечений является одной из важнейших проблем хирургии паренхиматозных органов. Тактика хирурга при повреждениях селезенки опре-

деляется характером её травмы и должна быть направлена в первую очередь на обеспечение гемостаза. Однако отсутствует оптимальная тактика в отношении приемов временного и окончательного гемостаза и объема вмешательства в зависимости от тяжести повреждения. Совершенствование способов гемостаза и выбор тактики при травмах селезенки и последующей операции имеют весьма актуальное значение.

Нами обобщены результаты лечения повреждений селезенки в эксперименте. Операции выполняли на беспородных собаках обоего пола с соблюдением этических норм. Под внутривенным наркозом вскрывали брюшную полость. Выводили в операционную рану селезенку. Предварительно моделировали раны (резаные, колото-резаные) различной длины и глубины, создавали гематомы (подкапсульные, внутриорганные) и разрывы диафрагмальной и висцеральной поверхностей селезенки (табл. 1). С момента травмирования селезенки до операции мы наблюдали за животными от 20 до 50 минут, в течение которых объем кровотечения из поврежденной селезенки составил 200–700 мл (в зависимости от тяжести травмы). Та-