

**Національна академія медичних наук України**

**РАННІЙ ПРОГНОСТИЧНИЙ МАРКЕР ЕФЕКТИВНОЇ ВІДПОВІДІ НА ТЕРАПІЮ  
ІНГІБІТОРАМИ ТИРОЗИНКІНАЗ У ХВОРИХ НА ХРОНІЧНУ МІЄЛОЇДНУ  
ЛЕЙКЕМІЮ  
(методичні рекомендації)**

Київ 2018

**Національна академія медичних наук України**

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Начальник лікувально-  
організаційного управління

НАМН України, д-р мед.наук, проф.

\_\_\_\_\_ І.Д.Шкробанець

*25 червня* 2018 р.

**РАННІЙ ПРОГНОСТИЧНИЙ МАРКЕР ЕФЕКТИВНОЇ ВІДПОВІДІ НА ТЕРАПІЮ  
ІНГІБІТОРАМИ ТИРОЗИНКІНАЗ У ХВОРИХ НА ХРОНІЧНУ МІЄЛОЇДНУ  
ЛЕЙКЕМІЮ**

(методичні рекомендації)

Київ 2018

**Установа-розробник:** ДУ «Національний науковий центр радіаційної медицини НАМН України» (ННЦРМ)

**Укладачі:** д-р мед. наук, ст. н.с. І.С.Дягіль, (044) 450-23-29  
д-р біол. наук, проф. Ж.М.Мінченко, (044) 451-82-22  
канд. біол. наук І.В.Дмитренко, (044) 451-03-88  
канд. біол. наук О.О.Дмитренко, (044) 451-03-88  
канд.мед.наук В.І.Хоменко, (044) 451-03-88  
В.В. Шолойко, (044) 406-64-31  
В.Г.Федоренко, (044) 451-03-88  
канд.мед наук, З.В.Мартіна, (044) 406-64-31  
канд.мед.наук Т.Ю.Шляхтиченко, (044) 451-03-88  
А.О.Товстоган, (044) 406-64-31  
Ю.О.Сілаєв, (044) 406-64-31  
чл.-кор.НАМН України В.Г.Бєбешко (044) 452-59-81

**Рецензент:** д-р мед. наук О.В.Кучер, професор кафедри гематології та трансфузіології Національної академії післядипломної освіти ім. П.Л. Шупика

Рішення проблемної комісії «Гематологія та трансфузіологія»,  
протокол №4 від 27 вересня 2018 р.

Голова проблемної комісії МОЗ та НАМН України «Гематологія та трансфузіологія», чл.-кор. НАМН України В. Г.Бєбешко

## ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК СКОРОЧЕНЬ	5
ВСТУП	6
1. Цитогенетичні та молекулярно-генетичні методи, що використовуються для діагностики ХМЛ та оцінки відповіді на терапію ІТК	8
1.1 Цитогенетичний метод	8
1.2 Якісне молекулярно-генетичне дослідження із застосуванням зворотньо-транскриптазної полімеразної ланцюгової реакції (ЗТ-ПЛР)	9
1.3 Дослідження рівня експресії химерного гену <i>BCR/ABL1</i> із застосуванням кількісної ЗТ-ПЛР у реальному часі	10
2 Генетичні дослідження, які проводяться з метою верифікації діагнозу ХМЛ	11
2.1 Вихідні фактори, які можуть впливати на швидкість отримання оптимальної відповіді на терапію ІТК у пацієнтів з хронічною мієлоїдною лейкемією	12
2.1.1 Фаза захворювання	12
2.1.2 Прогностичне значення терміну передлікованості у хворих на ХМЛ до початку терапії ІТК	14
2.1.3 Наявність додаткових клональних хромосомних аберацій	14
2.1.4 Тип транскрипту <i>BCR/ABL1</i>	14
3 Молекулярно-генетичний моніторинг пацієнтів з ХМЛ, які отримують терапію ІТК	15
3.1 Принципи моніторингу	15
3.2 Критерії оцінки відповіді на терапію із застосуванням інгібіторів тирозинкіназ у пацієнтів з ХМЛ	16
3.3 Оцінка відповіді на терапію ІТК	17
3.4 Особливості молекулярно-генетичного супроводу пацієнтів із застерігаючими ознаками та невдачею лікування	19
4 Рекомендації щодо лікування пацієнтів з ХМЛ залежно від досягнутої відповіді на терапію інгібіторами тирозинкіназ	19
5 Дослідження динаміки цитогенетичної відповіді у хворих на ХМЛ з глибокою молекулярною відповіддю на терапію іматинібом	21
ВИСНОВОК	27
ПЕРЕЛІК РЕКОМЕНДОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	28

## ПЕРЕЛІК СКОРОЧЕНЬ

ало-ТГСК	алогенна трансплантація гемопоетичних стовбурових клітин
ВМВ	велика молекулярна відповідь
ВООЗ	Всесвітня організація охорони здоров'я
ГМВ	глибока молекулярна відповідь
ДНК	дезоксирибонуклеїнова кислота
ДКХА	додаткові клональні хромосомні аберації
ЗТ-ПЛР	зворотньо-транскриптна полімеразна ланцюгова реакція
ІТК	інгібітор тирозинкіназ
ПГВ	повна гематологічна відповідь
ПЦВ	повна цитогенетична відповідь
РНК	рибонуклеїнова кислота
ХМЛ	хронічна мієлоїдна лейкемія
BCR/ABL	химерний ген
ELN	Європейська організація з лікування лейкемій
FISH	флуоресцентна гібридизація in situ
I-FISH	інтерфазна флуоресцентна гібридизація in situ
ISCN	Міжнародна система для номенклатури в цитогенетиці людини
MR <sup>4</sup>	молекулярна відповідь на рівні 4 log
MR <sup>4,5</sup>	молекулярна відповідь на рівні 4,5 log
NCCN	Національна онкологічна мережа
Ph- хромосома	філадельфійська хромосома

## ВСТУП

Лікування хронічної мієлоїдної лейкемії за допомогою специфічних таргетних препаратів, які є конкурентними інгібіторами зв'язування аденозин-трифосфату з онкогенною тирозинкіназою *BCR/ABL1*, стало ключовим моментом у онкогематології останніх 15 років. Терапія ІТК триває пожиттєво. Доведена висока ефективність ІТК 1-го покоління - іматинібу, а також наявність нових препаратів наступного покоління призвели до того, що очікування від терапії ІТК стали ще більш вагомими. Важливою метою лікування ХМЛ на сьогоднішній день у світі є не тільки збільшення загальної та безрецидивної виживаності хворих, але і можливість збільшення частки пацієнтів з максимальним пригніченням пухлинного клону, які досягають не тільки великої молекулярної відповіді, але й стабільної глибокої молекулярної відповіді.

Отримання стабільної ГМВ дозволить спостерігати цих пацієнтів без терапії, що важливо в умовах очікуваної довгої тривалості життя хворих на ХМЛ і багаторічного застосування дороговартісних лікарських засобів. Тому найважливішими етапами в лікуванні пацієнтів на ХМЛ є ефективність терапії, зниження ризику розвитку побічних явищ, отримання ранньої позитивної відповіді на лікування, при відсутності глибокої ремісії якомога швидкий перехід на ІТК 2-го покоління, що дасть можливість знизити розвиток резистентності до препаратів таргетної групи.

У даних методичних рекомендаціях наведені вимоги до молекулярно-генетичної діагностики ХМЛ, алгоритм цитогенетичного та молекулярно-генетичного обстеження хворих на ХМЛ на різних етапах терапії ІТК, моніторингу відповіді на терапію ІТК, а також оцінка відповіді на терапію ІТК та прогностична важливість відповіді на 3-й місяць лікування. В їх основі лежать власний багаторічний досвід лікування та моніторингу хворих на ХМЛ, які приймають ІТК, а також прийняті до уваги рекомендації Європейської організації з лікування лейкемій 2013 та Національної онкологічної мережі США.

Методичні рекомендації розроблені науковими співробітниками відділу гематології та трансплантології ДУ «Національний науковий центр радіаційної медицини НАМН України» відповідно до вимог сучасних міжнародних стандартів та результатів науково-дослідної роботи «Роль мутацій гену *BCR/ABL*, хромосомних, молекулярно-генетичних порушень та імуногенетичних показників у формуванні підходів до оптимізації таргетної терапії хворих на хронічну мієлоїдну лейкемію у віддалений період після аварії на ЧАЕС», яка виконувалася впродовж 2016-2018 рр. (№ держреєстрації 0116U003574).

Методичні рекомендації розраховані для використання фахівцями гематологічних відділень України всіх рівнів, які надають медичну допомогу пацієнтам на хронічну

мієлоїдну лейкемію, а також для спеціалістів з молекулярної біології діагностичних лабораторій медичних установ України.

1 Цитогенетичні та молекулярно-генетичні методи, що використовуються для діагностики ХМЛ та оцінки відповіді хворих на терапію ІТК

Хронічна мієлоїдна лейкемія характеризується посиленням та нерегульованим зростанням переважно молодих форм мієлоїдних клітин у кістковому мозку та накопиченням їх в периферичній крові. Основною діагностичною ознакою ХМЛ є реципрокна транслокація  $t(9;22)(q34;q11)$  з утворенням філадельфійської хромосоми, яку виявляють у 90 - 95% хворих. В результаті транслокації утворюється химерний ген *BCR/ABL1*, продуктом якого є патологічний білок, який демонструє виразну тирозинкіназну активність. Саме цей білок *BCR/ABL1* має ключове значення в патогенезі ХМЛ.

Дослідження генетичних маркерів ХМЛ може бути виконано за допомогою декількох методів, доцільність використання кожного з яких обумовлюється метою та часом проведення досліджень.

### 1.1 Цитогенетичний метод

При використанні стандартного цитогенетичного дослідження аналізують весь набір хромосом у клітині, який дозволяє виявити Ph-хромосому і інші видимі оком аномалії каріотипу. Однак при цьому необхідно враховувати, що навіть при максимальній розподільній здатності цей метод здатний виявити тільки порівняно великі та виразні порушення хромосом. Також лімітуючим є той факт, що аналізуються тільки клітини в мітозі. Перевагою цього методу є здатність виявити додаткові клональні хромосомні аберації в Ph-позитивних та Ph-негативних клітинах. Роздільна здатність цитогенетичного методу відносно низька і становить лише 1 - 5% клітин.

Цитогенетичний аналіз проводять на метафазних пластинках, отриманих у 24-годинній нестимульованій культурі клітин кісткового мозку. Зразки кісткового мозку отримують шляхом стерильної пункції. Культивування клітин здійснюють у поживному середовищі RPMI-1640 (Gibco, США) з додаванням 20% телячої ембріональної сироватки (Gibco, США). Після інкубації культуру клітин обробляють 0,075 М гіпотонічним розчином KCl та проводять стандартну фіксацію сумішшю метанолу та льодяної оцтової кислоти у співвідношенні 3:1.

Для отримання диференційного G-забарвлення препарати метафазних хромосом обробляють за стандартною методикою з використанням барвника Гімзи та 0,25 % розчину трипсину (Gibco, США). Ідентифікацію кожної пари хромосом та їх змін проводять згідно з критеріями "Міжнародної системи для номенклатури в цитогенетиці людини - 2013" (ISCN 2013). У кожного пацієнта аналізують не менше 20 метафазних пластинок при верифікації



діагнозу та до 30 метафазних пластинок під час моніторингу відповіді на терапію. В облік беруть тільки клональні порушення. Клоном вважають порушення, яке повторюється не менше ніж двічі на 20 проаналізованих пластинках, якщо мова йде про структурні аномалії або появу додаткової хромосоми. Клон із втратою хромосоми враховують тільки при наявності мінімум трьох клітин з однаковою кількісною аномалією.

Іноді, у випадках, коли немає достатньої кількості метафаз кісткового мозку для каріотипування із фарбуванням хромосом методом G-banding, або неможливо отримати клітини кісткового мозку, цитогенетичне дослідження замінюють методом FISH. Основна перевага методу полягає в можливості працювати з інтерфазними ядрами. Тому метод може бути застосований і для клітин, що не діляться. В таких випадках рекомендовано проведення I-FISH клітин кісткового мозку або периферичної крові та подальше підрахування клітин з додатковим сигналом від *BCR/ABL1* з використанням двоколірних зондів для визначення подвійних злитих сигналів і підрахунку щонайменше 200 ядер. Чутливість методу трохи вище рутинного цитогенетичного (0,3-5%).

1.2 Якісне молекулярно-генетичне дослідження із застосуванням зворотньо-транскриптазної полімеразної ланцюгової реакції

Для визначення типу *BCR/ABL1* транскрипту використовують якісну мультиплексну та двораундову “гніздову” ЗТ-ПЛР. Метод дуже високоспецифічний і високочутливий. Чутливість мультиплексної ЗТ-ПЛР складає 100 копій на 3 мкл нуклеїнової кислоти. Це на 2-3 порядки нижче порівняно із двораундовою “гніздовою” ЗТ-ПЛР. Експресію химерних транскриптів *BCR/ABL1* досліджують у зразках кісткового мозку та периферичної крові.

Вилучення РНК проводять з використанням гуанідинтіоціанату, фенолу та хлороформу за загальною методикою Хомчинського або за допомогою комерційного реагенту TRIZOL (Invitrogen, США).

Для синтезу комплементарної ДНК (зворотньої транскрипції) використовують гексамерні праймери та M-MuLV ревертазу.

Для визначення експресії химерного гену *BCR/ABL1* можна використати комерційний набір (Seegen, Корея). Отриманий ПЛР-продукт візуалізують методом електрофорезу у 2% агарозному гелі із послідовним забарвленням бромистим етідієм. Тип *BCR/ABL1* транскриптів, які виявляють при застосуванні цього методу, наведений у табл. 1.

Таблиця 1 - Розмір ПЛР-продуктів та тип транскриптів при використанні для ампліфікації гену *BCR/ABL1* методу мультиплексної ЗТ-ПЛР

Тип транскрипту гену <i>BCR/ABL1</i>	Розмір ПЛР-продукту (п.о.)
Внутрішній контроль	600
c3a2 (micro)	1012
b1a1	754
b3a2 (major)	476
b2a2 (major)	401
e1a2 (minor)	348
b3a3	299
b2a3	224
e1a3	174

Результат вважають позитивним, коли продукт ампліфікації присутній в кістковому мозку та периферичній крові, або позитивний результат повторюється в декількох зразках матеріалу, отриманих від одного й того ж хворого.

### 1.3 Дослідження рівня експресії химерного гену *BCR/ABL1* із застосуванням кількісної ЗТ-ПЛР у реальному часі

Для кількісної оцінки рівня експресії химерного гену *BCR/ABL1* використовують метод ЗТ-ПЛР в реальному часі. Матеріалом дослідження є РНК та кДНК, отримані з периферичної крові хворих на ХМЛ методом, що описаний у попередньому розділі. Для ПЛР в реальному часі використовують комерційні набори реагентів (наприклад, Амплісенс, Росія), або праймерні системи, що рекомендують провідні міжнародні дослідницькі групи.

Флуоресцентний сигнал визначають із застосуванням фільтрів для FAM. Контрольний матеріал (стандарти) – це комерційні розведення плазмід з відомим числом копій генів *BCR/ABL* та *ABL* (Nanogen, Італія; Ipsogen, США). Кількість копій кожного гену визначають за допомогою калібрувальної кривої. Для побудови калібрувальних кривих використовують стандарти, концентрації яких складають  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$  копій в 5 мкл розчину.

Результати представляють у вигляді відношення *BCR/ABL1* до *ABL* (або іншим конститутивним генам), вираженого у відсотках. В якості контролю використовують гени *BCR*, *GUS* та інші. Насьогодні в якості контрольного гену-нормалізатора загальноприйнято використання гену *ABL*. Використання контрольного гену-нормалізатора дозволяє відійти від жорсткої стандартизації кількості клітин, що вводяться в ПЛР. Також це дає можливість оцінити якість постановки реакції: якщо експресія контрольного гену низька, це свідчить про те, що для постановки реакції використано недостатня кількість клітин або про технічні помилки. Результат враховують як валідний, якщо кількість копій гену *ABL* більше 10 000.

Чим нижче рівень експресії *BCR/ABL1* гену, тим більший рівень експресії гену *ABL* необхідний для валідизації результату (табл. 2).

Таблиця 2 – Співвідношення *BCR/ABL1* до *ABL* та рекомендована кількість копій гену *ABL* для валідизації результату (M.C.Muller et al., 2009)

Співвідношення <i>BCR/ABL1</i> до <i>ABL</i>	Кількість копій гену <i>ABL</i>
Більше 0,01%	Більше 5 000
0,0032-0,01%	Більше 10 000
Менше 0,0032%	Більше 32 000

Критерії оцінки результатів ПЛР у реальному часі наведені у таблиці 3.

Таблиця 3 - Оцінка результатів ПЛР у реальному часі

Рівень співвідношення <i>BCR/ABL1</i> до <i>ABL</i>	Інтерпретація результату згідно рекомендацій ELN 2013
Більше 1%	Високий рівень експресії <i>BCR/ABL1</i> . Рівень 1-2% відповідає повній цитогенетичній відповіді, більше 2% - свідчить про втрату повної цитогенетичної відповіді
Від 0,1% до 1%	Помірний рівень експресії <i>BCR/ABL1</i> , відповідає повній цитогенетичній відповіді
Від 0,01% до 0,1%	Низький рівень експресії <i>BCR/ABL1</i> , відповідає великій молекулярній відповіді
Від 0,0032% до 0,01%	Молекулярна відповідь на рівні $4 \log (MR^4)$
Менше 0,0032%	Молекулярна відповідь на рівні $4,5 \log (MR^{4,5})$

Конструкція праймерних систем для цього методу дозволяє об'єктивно оцінювати результати в діапазоні від 10% до 0,01%. Тому рівень експресії гену *BCR/ABL1* вище 10% не має клінічного значення. Рівень *BCR/ABL1* >10% виявляється у хворих, які не досягли великої цитогенетичної відповіді, тобто рівень Ph<sup>+</sup> клітин вище 35%. Якщо рівень *BCR/ABL1* менше 0,01%, коректніше не вказувати точне значення, а визначати, що рівень експресії гену *BCR/ABL1* не вище 0,01%. Підвищення аналітичної чутливості цього методу можливо за рахунок збільшення кількості крові для вилучення РНК, збільшення кількості РНК, що залучається до зворотної транскрипції, або заміни ферментів на етапі зворотної транскрипції.

## 2 Генетичні дослідження, які проводяться з метою верифікації діагнозу ХМЛ

На сьогоднішній день діагноз ХМЛ остаточно верифікується за допомогою цитогенетичного і/або молекулярно-генетичного методів визначення Ph-хромосоми і/або *BCR/ABL1* транскрипту.

На етапі встановлення діагнозу виконується цитогенетичне дослідження клітин кісткового мозку і визначається тип транскрипту *BCR/ABL1*.

Доцільність виконання якісної ПЛР на етапі діагностики було підтверджено в наших діагностичних дослідженнях великої когорти пацієнтів з ХМЛ (більше за 1500 пацієнтів). Проведення якісної ПЛР на цьому етапі є обов'язковим з кількох причин. Перш за все, це завжди надійне додаткове підтвердження діагнозу. У випадках, коли нечітко розпізнається транслокація  $t(9;22)$  цитогенетичним методом (неякісний препарат, наявність комплексних транслокацій, які маскують типову  $t(9;22)$ , наявність перебудови тільки окремих ділянок хромосом, задіяних у формуванні *BCR/ABL* гена, технічні проблеми), це альтернативний варіант встановлення діагнозу. У цьому випадку неінформативне цитогенетичне дослідження можна також замінити методом FISH.

Молекулярно-генетичне дослідження на етапі встановлення діагнозу дає важливу інформацію про тип транскрипту, який визначається місцем розриву в залучених генах. Як правило, експресуються транскрипти b2a2 (e13a2) або b3a2 (e14a2). Саме вони використовуються в якості маркерів при проведенні молекулярного моніторингу. В наших дослідженнях було показано, що у 6 - 7% пацієнтів експресуються інші рідкісні транскрипти e1a2 або e19a2. Крім того, можливі випадки коекспресії декількох транскриптів. Надалі при стандартному моніторингу у таких пацієнтів будуть помилково негативні результати і з метою уникнення такої ситуації, необхідно визначати тип транскрипту гена *BCR/ABL1*.

Дослідження мутації кіназного домена гена *BCR/ABL1* методом прямого секвенування під час встановлення діагнозу доцільне тільки для пацієнтів з просунутою фазою ХМЛ (фаза акселерації чи бластної кризи).

Таким чином, на етапі встановлення діагнозу необхідно отримати максимально повну характеристику генетичного маркера захворювання. Зробити це можливо тільки при наявності в лабораторії всіх необхідних методів дослідження.

2.1 Вихідні фактори, які можуть впливати на швидкість отримання оптимальної відповіді на терапію ІТК у пацієнтів з хронічною мієлоїдною лейкемією

#### 2.1.1 Фаза захворювання

Перебіг ХМЛ має стадійність. Виділяють три фази захворювання - хронічна, фаза акселерації (просунута) і фаза бластної кризи. Диференційно-діагностичні критерії різних фаз ХМЛ сформульовано у класифікаціях Всесвітньої організації охорони здоров'я та ELN. Насьогодні частіше використовується класифікація ELN (табл. 4).

Таблиця 4 – Визначення фаз ХМЛ згідно класифікації ELN.

Фаза ХМЛ	Основні ознаки
Хронічна фаза	Відсутність ознак фази акселерації та бластної кризи
Фаза акселерації	15-29% бластних клітин в периферичній крові та/або в кістковому мозку; Сума бластів та промієлоцитів $\geq 30\%$ (при цьому бластів $< 30\%$ ); Кількість базофілів в крові $\geq 20\%$ ; Тромбоцитопенія $< 100$ Г/л не пов'язана з терапією
Фаза бластної кризи	Наявність в периферичній крові або в кістковому мозку $\geq 30\%$ бластних клітин; Поява екстрамедулярних інфільтратів з бластних клітин, за виключенням селезінки

На ранніх етапах захворювання хронічна фаза характеризується поступово зростаючим лейкоцитозом – від 15-20 Г/л, в розгорнутій фазі іноді до 500-900 Г/л. Поступово в патологічний процес втягується селезінка, що приводить до збільшення її розмірів. Тривалість хронічної стадії без лікування може складати 2 - 2,5 роки. При прогресуванні захворювання для фази акселерації характерним є перш за все зниження чутливості до раніше ефективної терапії, при цьому в периферичній крові, як правило, зростає кількість незрілих елементів гемопоєзу - промієлоцитів, мієлоцитів, метамієлоцитів, сумарне число яких нерідко починає перевищувати кількість зрілих елементів. Ця стадія без лікування може тривати від 2 - 3 місяців до 1 - 1,5 років. Термінальна фаза хвороби у 80 - 85% випадків характеризується розвитком бластної кризи з наростанням кількості бластних клітин в крові і кістковому мозку до 50 - 90%, появою скарг на болі в кістках, суглобах, м'язах, різкими підйомами температури з лихоманкою і виразною пітливістю, швидким збільшенням розмірів селезінки, а нерідко і печінки, зниженням маси тіла, різкою слабкістю. Треба пам'ятати, що бластна криза може розвиватися по мієлоїдному (75%) та лімфоїдному типам (25%). В залежності від типу бластної кризи проводиться специфічне лікування. Як правило ця фаза короткотривала. Уперше захворювання може бути виявлено на будь-якій стадії, але найбільш часто (85% випадків) діагноз встановлюється в хронічній фазі.

Пацієнти в фазі акселерації та бластної кризи потребують додаткового дослідження мутаційного статусу кіназного домену гена *BCR/ABL1*. Зазвичай вони гірше відповідають на терапію ІТК у порівнянні з пацієнтами в хронічній фазі. Наявність фази акселерації на момент встановлення діагнозу впливає на вибір лікування і стратегію моніторингу, а також на прийняття рішення про необхідність застосування аллогенної трансплантації гемопоетичних стовбурових клітин.

2.1.2 Прогностичне значення терміну «передлікованості» у хворих на ХМЛ до початку терапії ІТК

Період часу від встановлення діагнозу ХМЛ до призначення любого препарату з групи ІТК називають періодом передлікованості. Наші дослідження, а також дослідження багатьох Європейських робочих груп показали прогностичне значення терміну передлікованості хворих на ХМЛ до призначення інгібіторів тирозинкінази. Пацієнти, які були передліковані препаратами гідроксисечовини, інтерферону або бусульфану не більше ніж 6 місяців, вірогідно частіше досягають оптимальної відповіді на терапію ІТК через 6 місяців лікування порівняно із пацієнтами, передлікованими впродовж тривалого часу. Серед пацієнтів, передлікованих більше 36 місяців вірогідно частіше зустрічаються випадки первинної резистентності до терапії як іматинібом, так і нілотинібом. Тобто, чим довше період передлікованості, тим менша вірогідність досягнення ПЦВ та ВМВ. Максимальна результативність іматинібуну з точки зору вираженості пригнічення Ph<sup>+</sup> клону клітин показана при призначенні його в якості терапії першої лінії.

2.1.3 Наявність додаткових клональних хромосомних аберацій

У переважної більшості пацієнтів при встановленні діагнозу ХМЛ в кістковому мозку виявляється специфічна транслокація t(9;22). Кількість Ph + метафаз перевищує 75%. Крім того, іноді присутні також додаткові клональні хромосомні порушення у вигляді додаткових до t(9;22) хромосомних аномалій, зокрема додаткової Ph-хромосоми (до 8% у пацієнтів на етапі встановлення діагнозу ХМЛ). Наявність додаткових хромосомних аномалій в Ph + клітинах як правило є ознакою просунутої фази ХМЛ, тобто вважаються фактором несприятливого прогнозу перебігу захворювання. Найбільш часті хромосомні аномалії в Ph + клітинах (+8, додаткова Ph, iso17q, +19), так звані основні, асоціюються з гіршою виживаністю без прогресії і загальною виживаністю порівняно з пацієнтами без ДКХА або з рідкісними ДКХА.

Навпаки, наявність варіантних транслокацій (у 5% пацієнтів), коли в утворенні дериватної 22-ї хромосоми бере участь ще як мінімум одна хромосома, а також делеція дериватної 9-ї хромосоми згідно результатам наших досліджень не впливали на швидкість досягнення цитогенетичної або молекулярної відповіді на терапію ІТК.

2.1.4 Тип транскрипту *BCR/ABL1*

На сьогодні питання про прогностичне значення найбільш поширених при ХМЛ транскриптів b2a2 (e13a2) або b3a2 (e14a2) залишається відкритим. За результатами

нашого дослідження краще відповідають на терапію іматинібом пацієнти з e14a2 транскриптом. Хоча вони не відрізняються динамікою ПЦВ, але вірогідно частіше (порівняно з пацієнтами з e13a2 транскриптом) отримують ВМВ та глибоку молекулярну відповідь вже на 12-му (ВМВ) та 24-му (MR<sup>4</sup>) місяці лікування. При аналізі таких довгострокових показників, як загальна виживаність, виживаність без прогресії та безподійна виживаність, пацієнти з e13a2 відрізняються коротшою безподійною виживаністю. В групі пацієнтів-носіїв транскрипту e13a2 достовірно переважають випадки втрати досягнутої відповіді або випадки недосягнення ВМВ, що свідчить про асоціацію транскрипту e13a2 з нестабільною відповіддю на терапію іматинібом. Ми вважаємо, що e13a2 транскрипт можна розглядати як несприятливий прогностичний фактор при терапії іматинібом. Навіть за наявності передлікованості, яка змінює відповідь на терапію ІТК, ми виявили вірогідну різницю у відповіді на терапію іматинібом між пацієнтами з e13a2 та e14a2 транскриптами гену *BCR/ABL1*.

### 3 Молекулярно-генетичний моніторинг пацієнтів з ХМЛ, які отримують терапію ІТК

#### 3.1 Принципи моніторингу

Оцінка відповіді на терапію ІТК потребує своєчасного проведення загального гематологічного, цитогенетичного та молекулярно-генетичного обстеження, а саме: аналіз крові в динаміці, каріотипування клітин кісткового мозку та молекулярно-генетичне дослідження для виявлення типу транскрипту гену *BCR/ABL* та рівня його експресії, а також дослідження мутацій в кіназному домені гена *BCR/ABL*.

Загальний аналіз крові виконують регулярно кожні 2 тижні в перші 3 місяці до досягнення нормалізації показників, тобто повної гематологічної відповіді, у подальшому – кожні 3 місяці.

Каріотипування із диференційним забарвленням хромосом методом G-banding в клітинах кісткового мозку проводять кожні 3 місяці лікування до повної елімінації метафаз із Ph-хромосомою, тобто повної цитогенетичної відповіді, а по отриманні ПЦВ - кожні 12 місяців. Однак в останній час, змінилися підходи до проведення цитогенетичного дослідження на етапах моніторингу. Обов'язковим залишається проведення досліджень на етапі діагностики, а далі проводиться тільки у разі виявлення додаткових хромосомних аномалій, у разі відсутності оптимальної відповіді та прогресії захворювання.

Кількісну ПЛР в реальному часі для оцінки рівня експресії гену *BCR/ABL1* рекомендується проводити кожні 3 міс. поки не буде досягнута і підтверджена велика молекулярна відповідь. Надалі таке обстеження рекомендується проводити не рідше, ніж

кожні 6 місяців. У випадку стабільної глибокої молекулярної ремісії протягом більше 2 років і більше (рівень транскриптів *BCR/ABL1* менше 0,01%) дослідження виконується 1 - 2 рази на рік.

Аналіз мутацій в кіназному домені гена *BCR/ABL1* методом прямого секвенування за Санжером при встановленні діагнозу вважають доцільним тільки для пацієнтів у фазі акселерації або бластної кризи. Під час моніторингу мутаційний аналіз виконують у випадку недосягнення або втрати оптимальної відповіді, а також під час зміни ІТК.

Існує ряд випадків, коли виникає потреба у проведенні додаткових досліджень у хворих, а саме:

- Якщо рівень *BCR/ABL1* транскрипту збільшився більше ніж в 5 разів та/або була втрачена ВМВ. В цьому випадку тести повторюють у найближчий час.
- У випадку недосягнення оптимальної відповіді рекомендовано повторення всіх тестів щомісяця.
- У випадку невдачі терапії або прогресії захворювання проводять цитогенетичне, молекулярно-генетичне дослідження та мутаційний аналіз.
- У випадку появи ознак мієлодисплазії рекомендовано проведення позачергового цитогенетичного дослідження.

### 3.2 Критерії оцінки відповіді на терапію із застосуванням інгібіторів тирозинкіназ у пацієнтів з ХМЛ

Оцінка досягнення відповіді у пацієнтів з ХМЛ, які отримують лікування із застосуванням інгібіторів тирозинкіназ, проводиться за допомогою специфічних гематологічних, цитогенетичних та молекулярних критеріїв з урахуванням часу, коли зафіксовано відповідь згідно з рекомендаціями ELN 2013. Базуючись на цих критеріях, можна виділити пацієнтів з «оптимальною відповіддю», «застерегаючими ознаками» і «невдачею лікування».

Відповідь вважається *оптимальною*, коли своєчасно (3-6-12 міс) отримується повна гематологічна, цитогенетична та молекулярна ремісія відповідно і немає ознак, що зміна терапії може підвищити виживаність (насьогодні 6 - 7-річна виживаність в групі таких пацієнтів наближається до 100%). *Застерегаючими ознаками* є не отримання у вищевказані терміни повної гематологічної, цитогенетичної та молекулярної ремісії. У цьому випадку шанс досягнення оптимальної відповіді знижений, тому виправдані альтернативні методи лікування. Тим не менш, застерегаючі ознаки за своєю природою є перехідним станом і при своєчасному втручанні, тобто підвищенні дози препарату або переводі пацієнта на ІТК II-ї лінії, можна досягти оптимальної відповіді. *Невдача терапії* свідчить про вкрай низьку



ймовірність позитивного результату, тому рекомендується перехід на інше лікування, якщо тільки воно доступне, доречне і своєчасне. Застерегаючі ознаки так само несприятливі, як і невдача терапії. Беручи до уваги, що недосягнення оптимальної відповіді може бути обумовлено різними причинами, подальший перебіг захворювання може бути різним. Доведено, що відсутність оптимальної відповіді на цитогенетичному рівні має гірший прогноз, ніж на рівні молекулярному.

Будь-яка відповідь нижче оптимальної є незадовільною і може бути розцінена як невдача лікування. В таких випадках тактика лікування дуже обмежена, так як потребує проведення аlogenної трансплантації стовбурових гемопоетичних клітин, або застосування експериментального лікування за умови його доступності, або паліативної терапії. Відмова від одного виду терапії на користь іншої або вибір експериментального протоколу повинні базуватися на вагомих та обґрунтованих даних. Саме цим обумовлена необхідність вдосконалення моніторингу відповіді вже на ранніх етапах терапії, розробки критеріїв прогнозу відповіді на терапію та змін в лікувальній тактиці.

### 3.3 Оцінка відповіді на терапію ІТК

Головна мета терапії пацієнтів з ХМЛ із використанням ІТК – досягнення оптимальної відповіді. Визначення оптимальної відповіді залежить від відрізка часу, на якому цю відповідь було досягнуто. Згідно рекомендацій ELN 2013 при використанні ІТК в якості терапії першої лінії оптимальною вважається відповідь, коли досягнуто повну гематологічну відповідь до 3 місяців терапії ІТК, ПЦВ – до 6 міс. терапії, ВМВ – до 12 місяців терапії (табл.5).

Для оцінки відповіді на терапію ІТК найбільш інформативним показником є динаміка пухлинного клону у перший рік захворювання. Тому цитогенетичний та/або молекулярно-генетичний моніторинг в цей період проводиться кожні 3 місяці.

У 2013 році в рекомендаціях ELN було введено поняття ранньої молекулярної відповіді - рівень  $BCR/ABL1 \leq 10\%$  на 3-й місяць терапії ІТК. Третій місяць після початку терапії ІТК може бути самою критичною точкою для оцінки резистентності до терапії ІТК. Рання молекулярна відповідь прогнозує більш високу виживаність досягнення глибокої молекулярної відповіді у подальшому, кращу виживаність без прогресії та загальну виживаність як при терапії іматинібом, так і при терапії дазатинібом та нілотинібом як першої так і другої лінії.

Насьогодні відсутність ранньої молекулярної відповіді через 3 місяці не є підставою для зміни ІТК, проте дозволяє виділити групу пацієнтів, які недостатньо ефективно відповідають на терапію ІТК та потребують ретельного спостереження.

Вже після трьох місяців терапії імаїнібом застерігаючими ознаками є рівень  $BCR/ABL1 > 10\%$  та/або відсутність часткової цитогенетичної відповіді (кількість Ph-позитивних метафаз перевищує 35 %). Відсутність повної гематологічної відповіді у ті ж терміни розцінюють як невдачу лікування.

Контрольними термінами являються також 6-й та 12-й місяці спостереження, для яких також наведені критерії відповіді, застережливі ознаки та ознаки невдачі лікування (табл.5).

Таблиця 5. Діючі критерії відповіді на терапію ІТК, розроблені ELN (2013 р.), для пацієнтів з хронічною фазою ХМЛ

Період проведення оцінки відповіді	Оптимальна відповідь	Застерегаючі ознаки	Невдача лікування
3 місяці	$BCR/ABL1 \leq 10\%$ і/або Ph+ $\leq 35\%$	$BCR/ABL1 > 10\%$ і/або Ph+ $\leq 36 - 95\%$	Відсутність повної гематологічної відповіді і/або Ph+ $> 95\%$
6 місяців	$BCR/ABL1 < 1\%$ і/або Ph+ 0 (ПЦВ)	$BCR/ABL1 \leq 1 - 10\%$ і/або Ph+ 1 - 35%	$BCR/ABL1 > 10\%$ і/або Ph+ $> 35\%$
12 місяців	$BCR/ABL1 \leq 0,1\%$ (ВМВ)	$BCR/ABL1 0,1 - 1\%$	$BCR/ABL1 > 1\%$ і/або Ph+ $> 0$
Потім в будь-який період часу	ВМВ або краще	ДКХА/Ph- (-7 або 7q-)	Втрата повної гематологічної відповіді Втрата ПЦВ Втрата ВМВ (підтверджена у двох послідовних тестах) ДКХА/ Ph+ Наявність мутацій

За умов планового моніторингу на будь-якому етапі терапії застережливою ознакою вважають появу ДКХА у Ph-негативних клітинах.

Втрата повної гематологічної відповіді та/або ПЦВ, а також поява додаткових клональних хромосомних аномалій у Ph-позитивних клітинах або мутацій на будь-якому етапі терапії ІТК є сигналом невдачі лікування.

Особливої уваги заслуговує підвищення рівня транскрипта  $BCR/ABL1$  у двох послідовних дослідженнях. Не зважаючи на те, що на сьогодні не визначено остаточно, яке саме збільшення кількості транскрипта  $BCR/ABL1$  слід вважати вирішальним для визначення прогресії (в різних лабораторіях цей показник змінюється в 2-10 разів), але сам факт його підвищення є застережливим сигналом, який з одного боку може свідчити про прогресію захворювання та/або появу мутацій, а з іншого – про невідповідну дозу ІТК, або порушення регулярного прийому ІТК. Молекулярним рецидивом вважають втрату великої молекулярної відповіді.

### 3.4 Особливості моніторингу пацієнтів із застерігаючими ознаками та невдачею лікування

Тактика ведення пацієнтів з ХМЛ, які отримують ІТК, суттєво змінюється у випадках появи застерігаючих ознак або невдачі лікування на будь-якому етапі терапії.

У зв'язку з тим, що наслідки втрати або недосягнення оптимальної відповіді можуть призвести до неефективності терапії ІТК, такі хворі знаходяться під більш ретельним наглядом. Незалежно від терміну терапії, при наявності застерігаючих ознак пацієнтам проводять регулярне цитогенетичне дослідження клітин кісткового мозку раз на 6 місяців для контролю появи додаткових клональних хромосомних аномалій у Ph-позитивних клітинах.

В разі збільшення рівня транскрипта *BCR/ABL1* відносно попереднього результату обстеження проводять кожні 3-4 тижні. Пацієнтам із застерігаючими ознаками або невдачею лікування проводять обов'язково мутаційний аналіз кіназного домену гену *BCR/ABL1* методом прямого сіквенування для визначення мутацій, які обумовлюють рівень чутливості чи резистентності до ІТК.

### 4 Рекомендації лікування пацієнтів з ХМЛ залежно від досягнутої відповіді на терапію

Насьогодні згідно рекомендацій ELN 2013р. для лікування хворих у хронічній фазі ХМЛ в якості першої лінії терапії використовують один із трьох інгібіторів тирозинкіназ - іматиніб, нілотиніб та дазатиніб у стандартних дозах: іматиніб 400 мг один раз на добу, нілотиніб 300 мг двічі на добу, дазатиніб 100 мг один раз на добу (в Україні на сьогодні дазатиніб не зареєстровано).

Оцінку відповіді на лікування ІТК проводять кожні 3 місяці.

За умови досягнення і утримання повної гематологічної, цитогенетичної та великої молекулярної відповідей, доза препарату не змінюється і хворий продовжує його прийом.

При наявності застерігаючих ознак чи невдачі лікування можливо підвищення дози препарату (іматиніб до 600 – 800 мг/добу, нілотиніб – 800 мг/добу, дазатиніб – 140 мг/добу) або зміна ІТК. Босутиніб (у дозі 500 мг один раз в день) та понатиніб (45 мг один раз на день) призначають пацієнтам, які виявились резистентними до попередньої терапії ІТК або поганого її переносили. У таких випадках також призначають нові дослідницькі препарати (радотиніб, омацетаксин). Всі перелічені препарати окрім іматинібу, нілотинібу та босутинібу в Україні не зареєстровані. Понатиніб також застосовують для лікування пацієнтів із наявною мутацією T315I.

Бусульфан не рекомендовано застосовувати для лікування пацієнтів у хронічній фазі ХМЛ. Гідроксисечовина може застосовуватись протягом нетривалого періоду часу – до підтвердження діагнозу ХМЛ та початку терапії одним із ІТК. Інтерферони- $\alpha$  в якості монотерапії використовуються у рідких випадках, коли неможливо використання ІТК. Комбінації ІТК та інтерферонів- $\alpha$  потенціально можуть використовуватись, але їх ефективність все ще досліджується. Цитотоксична терапія ніколи не застосовується для лікування пацієнтів у хронічній фазі; вона може бути використана для лікування пацієнтів у фазі бластної кризи, у тому числі і перед підготовкою їх до алогенної трансплантації гемопоетичних стовбурових клітин.

Ало-ТГСК все ще залишається актуальним методом лікування пацієнтів, які не отримали або втратили відповідь на лікуванні ІТК. Але на сьогодні вона застосовується в якості третьої чи четвертої лінії терапії.

Рекомендації щодо лікування пацієнтів з ХМЛ наведені в таблиці 6.

Таблиця 6. Тактика лікування ІТК хворих на ХМЛ (згідно рекомендацій ELN 2013)

Лінія	Випадок	ІТК, стандартна доза <sup>1</sup>						Трансплантація			
		Іматиніб 400 мг/ qd	Нілотиніб 300 мг/bid	Дазатиніб 100 мг/ qd	Босутиніб 500 мг/ qd	Понатиніб 45 мг/ qd	Пошук		Алло-ТГСК		Хімотерапія
							HLA-тип + сподірений донор	Неспоріднений донор	необхідна	рекомендована	
1-а	Початкова	x	x	x			x <sup>2</sup>				
2-а	Непереносимість 1-го ІТК	Інший ІТК, схвалений для 1-ї лінії									
	Невдача 1-ї лінії з:	імаїтиніб	x <sup>8</sup>	x	x	x	x	x			
		даїзатиніб		x <sup>8</sup>		x	x	x	x	x	
3-я	Непереносимість/ невдача від 2-х ІТК	Інші наявні ІТК								x	
Інше	Мутація T315I					x	x	x	x		
Фаза акселерації чи бластної кризи											
У вперше діагностованих і не лікованих ІТК пацієнтів:	починати з:	x <sup>3</sup>		x <sup>4</sup>			x	x			
	відсутність оптимальної відповіді, бластна криза									x <sup>7</sup>	x <sup>5</sup>
Пацієнти, які отримували лікування ІТК		Інші наявні ІТК				x <sup>6</sup>				x <sup>7</sup>	x <sup>5</sup>

1 - вибір ІТК залежить від переносимості та безпечності, характеристик пацієнта (вік, коморбідність);

2 - тільки у випадку наявності застерігаючих ознак початково (високий ризик, клональні хромосомні аномалії в Ph+ клітинах);

- 3 - 400 мг/bid;
- 4 – 70 мг/ bid або 140 мг/ qd;
- 5 – може бути потрібна перед ТГСК для контролю захворювання і підготовки пацієнта до ало-ТГСК;
- 6 – у випадку мутації T315I;
- 7 – тільки для пацієнтів, які придатні до ало-ТГСК, не для хворих із неконтрольованою, резистентною бластною кризою;
- 8 – 400 мг/ bid у випадку невдачі;
- qd – один раз на добу, bid – двічі на добу.

Урахування всіх вищезазначених чинників, які обумовлюють швидкість та глибину відповіді на терапію ІТК, а також вихідних генетичних детермінант дозволить оптимізувати таргетну терапію у хворих на ХМЛ.

5 Дослідження динаміки цитогенетичної відповіді у хворих на ХМЛ з глибокою молекулярною відповіддю на терапію іматинібом

Цитогенетичні дослідження клітин кісткового мозку проводили у 48 хворих на ХМЛ з глибокою молекулярною відповіддю на терапію іматинібом.

До призначення іматинібуму всім обстеженим діагноз ХМЛ було підтверджено на підставі виявлення в клітинах кісткового мозку специфічної транслокації t(9;22)(q34;q11) (Ph-хромосоми) в результаті цитогенетичного дослідження та/або при наявності експресії химерного гена *BCR/ABL1*, яку визначали із застосуванням молекулярно-генетичного методу зворотньо-транскриптазної ПЛР.

У трьох пацієнтів виявляли клони пухлинних клітин з варіантними транслокаціями t(9;V;22) із залученням додаткових хромосом, що призводило до утворення der(22)t(9;22). В жодного пацієнта не було виявлено додаткових (крім t(9;22)) хромосомних транслокацій.

Для аналізу динаміки цитогенетичної відповіді у хворих на ХМЛ, які досягли глибокої молекулярної відповіді на терапію іматинібом, оцінювали відсоток метафаз з транслокацією t(9;22)(q34;q11) на різних етапах терапії. Цитогенетичні дослідження через 3 місяці терапії вдалося провести лише у 26 хворих. У 11 з них (42,3%) зареєстровано повну цитогенетичну відповідь. Через 6 місяців лікування в групі пацієнтів з ХМЛ, які досягли глибокої молекулярної відповіді, частка пацієнтів з ПЦВ збільшилася до 48% (23 з 48). А на 12 місяці терапії іматинібом ПЦВ реєстрували у 81,3% пацієнтів (39 з 48). Тобто, в групі обстежених нами пацієнтів з ХМЛ, які досягли глибокої молекулярної відповіді на терапії іматинібом, половина досягала ПЦВ значно пізніше строку, який рекомендований ELNet як ключовий термін для оцінки оптимальної відповіді (досягнення ПЦВ на 6 місяці терапії). Цей факт можна пояснити наявністю у наших пацієнтів значного терміну передлікованості до призначення іматинібуму, який сприяє затягненню та сповільненню відповіді на терапію ІТК.

Для оцінки прогностичного значення швидкості редукції Ph<sup>+</sup> клону розраховували вірогідність досягнення глибокої молекулярної відповіді (враховували дані про пацієнтів основної групи та групи порівняння) залежно від залишкової кількості Ph<sup>+</sup> клітин через три місяці терапії іматинібом методом Каплан-Майер (рис. 2.1).

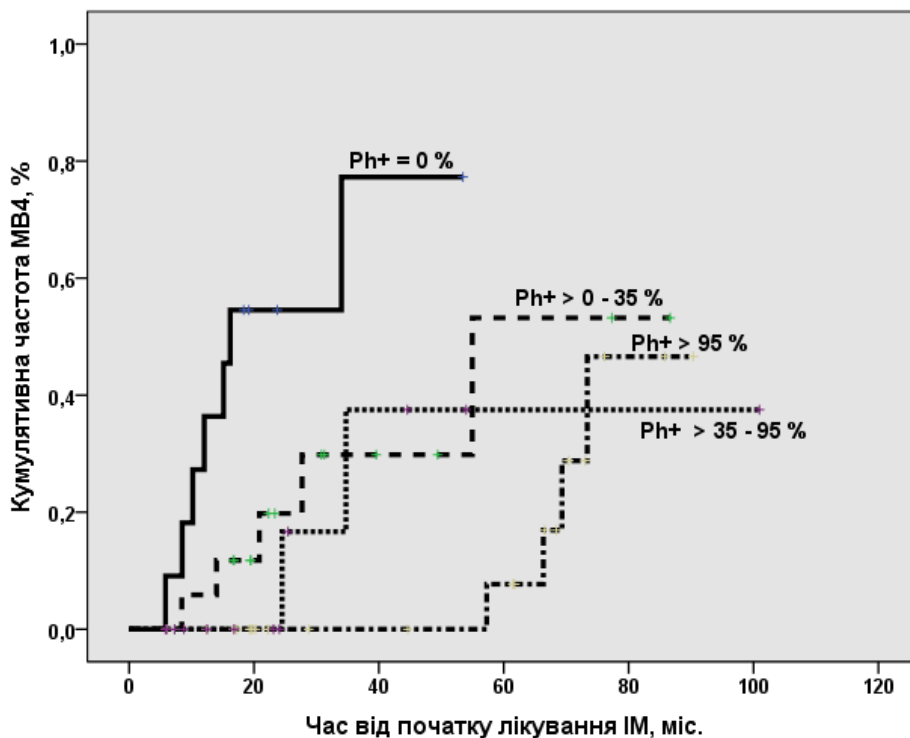


Рисунок 2.1 - Кумулятивна частота досягнення глибокої молекулярної відповіді МВ<sup>4</sup>, залежно від рівня Ph<sup>+</sup> метафаз в кістковому мозку через 3 місяці терапії іматинібом

Було встановлено, що пацієнти, у яких на 3-му місяці терапії іматинібом не виявляли Ph<sup>+</sup> клітини (Ph<sup>+</sup> = 0%, повна цитогенетична відповідь) мали значуще вищу кумулятивну частоту досягнення МВ<sup>4</sup> через 2 роки лікування, порівняно із пацієнтами, у яких через 3 місяці терапії реєстрували Ph<sup>+</sup> клітини ( $p < 0,001$ ). Серед пацієнтів, у яких кількість Ph<sup>+</sup> клітин на 3 місяці терапії іматинібом перевищував 95%, на 24 місяці терапії ніхто не досяг глибокої молекулярної відповіді.

Таким чином, досягнення повної цитогенетичної відповіді (Ph<sup>+</sup> = 0%) через 3 місяці терапії є раннім прогностичним маркером, асоційованим з високою вірогідністю отримання глибокої молекулярної відповіді на терапію ІТК на 24 місяці лікування.

Було проаналізовано фактори, які асоціюються з досягненням МВ<sup>4</sup> у хворих на ХМЛ, які отримують терапію іматинібом.

Через 3 місяці терапії із 12 пацієнтів групи спостереження, у чотирьох рівень експресії гена *BCR/ABL1* дорівнював 0,009%, у 20 пацієнтів рівень експресії гена

*BCR/ABL1* знаходився в діапазоні 0,1 – 1% (Me = 0,269%, діапазон 0,164 - 0,478%), у 16 пацієнтів рівень експресії гена *BCR/ABL1* знаходився в діапазоні 1 - 10% (Me = 7,044%, діапазон 3,495–8,173%). У восьми пацієнтів рівень експресії гена *BCR/ABL1* перевищував 10%.

Через 6 місяців терапії іматинібом 11 із 48 пацієнтів (22,9%) досягли глибокої молекулярної відповіді (рівень *BCR/ABL1* був менший 0,01%), у 9 пацієнтів (18,75 %) одержали редукцію експресії гена *BCR/ABL1* до рівня 0,01 – 0,1% (Me = 0,03%, діапазон 0,016 – 0,130%), що відповідає рівню ВМВ. У 24 із 48 (50%) пацієнтів реєструвався рівень експресії гена *BCR/ABL1* в діапазоні 0,1 – 1 % (Me = 0,484%, діапазон 0,151 – 1,606%), у чотирьох пацієнтів рівень експресії гена *BCR/ABL1* був в діапазоні 1 – 10% (Me = 3,462%, діапазон 2,475 – 4,720%).

При дослідженні молекулярно-генетичної відповіді на терапію іматинібом через 12 місяців лікування було виявлено, що 16 з 48 пацієнтів (33,33%) досягли рівня експресії гена *BCR/ABL1* нижче 0,01 %, у 13 пацієнтів (27,08%) рівень експресії *BCR/ABL1* знаходився в межах ВМВ (від 0,01% до 0,1 %, Me = 0,026%, діапазон 0,013-0,093%). У 11 з 48 пацієнтів (22,9%) досліджуваної групи рівень експресії гена *BCR/ABL1* був на рівні 0,1 – 1 % (Me = 0,184%, діапазон 0,106 – 0,572%). У п'яти пацієнтів рівень експресії гена *BCR/ABL1* знаходився в діапазоні 1 – 10%, а ще у трьох – перевищував 10%.

Для оцінки значення ступеня та швидкості редукції експресії химерного гена *BCR/ABL1* використовували декілька підходів. Для визначення найбільш ранніх факторів, які асоціювалися з досягненням МВ<sup>4</sup> на терапії іматинібом, розраховували вірогідність досягнення глибокої молекулярної відповіді залежно від рівня експресії гена *BCR/ABL1* на три та шість місяців терапії іматинібом методом Каплан-Майер з урахуванням цензурованих даних (рис. 2.2).

Незважаючи на невелику групу пацієнтів, для яких були доступні дані про рівень експресії гена *BCR/ABL1* на три місяці терапії іматинібом (42 пацієнта), було виявлено статистично значущу різницю у розрахованій кумулятивній частоті досягнення МВ<sup>4</sup> через 24 місяці терапії іматинібом. Показано, що пацієнти, у яких рівень експресії гена *BCR/ABL1* на 3 місяці терапії не перевищував 1%, мали значуще вищу кумулятивну частоту досягнення МВ<sup>4</sup> через 2 роки терапії, порівняно із пацієнтами, у яких рівень експресії гена *BCR/ABL1* на 3 місяці лікування складав більше 1% (72% проти 24%,  $p = 0,001$ ). Серед пацієнтів, у яких рівень експресії гена *BCR/ABL1* на 3 місяці терапії іматинібом перевищував 10%, на 24 місяці терапії ніхто не досяг глибокої молекулярної відповіді.

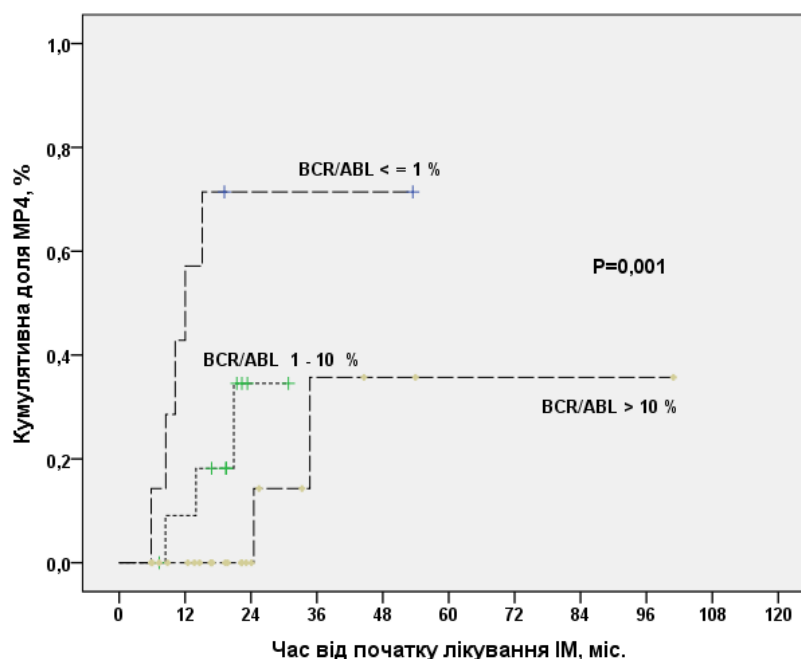


Рисунок 2.2 - Кумулятивна частота пацієнтів, які досягли глибокої молекулярної відповіді МВ<sup>4</sup>, залежно від рівня експресії гена *BCR/ABL1* на 3-му місяці терапії іматинібом

Аналіз вірогідності досягнення глибокої молекулярної відповіді залежно від рівня експресії гена *BCR/ABL1* на шість місяців терапії іматинібом показав, що у пацієнтів з рівнем експресії гена *BCR/ABL1* нижче за 0,1% на 6-й місяць терапії кумулятивна частота досягнення МВ<sup>4</sup> після 24 місяці терапії була значуще більшою порівняно з групою пацієнтів, у яких в цей же період часу рівень експресії гена *BCR/ABL1* знаходився в діапазоні 0,1 – 1% (79% проти 44%,  $P < 0,009$ ). Тобто, через 6 місяців терапії досягнення редукції експресії гена *BCR/ABL1*, який відповідає рівню великої молекулярної відповіді ( $BCR/ABL1 \leq 0,1\%$ ) згідно з критеріями ELN 2013, є фактором сприятливого прогнозу щодо отримання глибокої молекулярної відповіді на терапію іматинібом впродовж 24 місяців лікування.

Відомо, що рівень повної цитогенетичної відповіді за умови відсутності Ph<sup>+</sup> клітин в кістковому мозку, відповідає рівню експресії гена *BCR/ABL1* від 1 до 0%. Рівень експресії гена  $BCR/ABL1 \leq 0,1\%$  вважають великою молекулярною відповіддю. Тобто, у пацієнтів з ПЦВ рівень експресії *BCR/ABL1* може досягати ВМВ або ні. Для підтвердження значущості раннього досягнення ВМВ аналізували кумулятивну частоту досягнення МВ<sup>4</sup> залежно від цитогенетичного та молекулярно-генетичного статусу на 6 місяців терапії іматинібом.

Показано, що досягнення ПЦВ та ВМВ до 6-го місяця терапії іматинібом асоціюється з більшою кумулятивною частотою глибоких молекулярних відповідей через 2



роки терапії порівняно з пацієнтами, які досягли тільки ПЦВ без ВМВ на 6 місяців терапії ( $p < 0,001$ ) (рис.2.3).

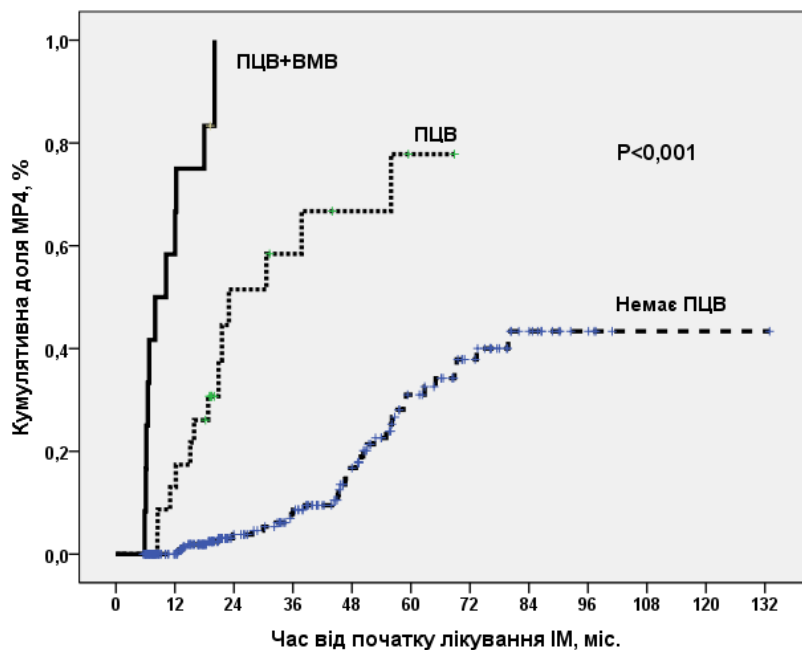


Рисунок 2.3 - Кумулятивна частота глибокої молекулярної відповіді (МВ<sup>4</sup>) у пацієнтів залежно від наявності/відсутності ПЦВ та/або ВМВ на 6 місяців терапії іматинібом.

Для оцінки статистично значущих термінів досягнення ВМВ для отримання глибокої молекулярної відповіді всіх пацієнтів розділили на групи згідно часу, протягом якого була досягнута ВМВ на терапії іматинібом: до 6 місяців включно, від 6 до 12 включно, від 12 до 24 місяців включно, більше 24 місяців (рис. 2.4). Виявлено, що найбільшу кумулятивну вірогідність досягнення МВ<sup>4</sup> на 2 роки терапії мають пацієнти, у яких редукція експресії гена *BCR/ABL1* до рівня ВМВ (менше 0,1%) відбулася до 6-го місяця терапії іматинібом. Досить висока кумулятивна вірогідність досягнення МВ<sup>4</sup> на 2 роки терапії відмічається також у пацієнтів, у яких ВМВ реєстрували до 12-го місяця терапії. Саме цей термін досягнення ВМВ відповідає критеріям ELN щодо оптимальної відповіді на терапію ІТК 1-ї лінії. Треба зазначити, що значуще меншою порівняно із попередніми групами, але досить високою (59%,  $P < 0,001$ ) була кумулятивна частота досягнення МВ<sup>4</sup> серед пацієнтів, у яких ВМВ вперше реєстрували через 12 - 24 місяців від початку лікування. Звертає увагу той факт, що зберігається вірогідність отримати МВ<sup>4</sup> навіть у пацієнтів, у яких ВМВ була зареєстрована значно пізніше (більше 24 місяців). В той же час інші автори відмічають, що їм не вдалося досягти МВ<sup>4,5</sup> у пацієнтів, у яких зменшення експресії гена *BCR/ABL1* до рівня 0,1% (ВМВ) відбулося після 18-го місяця терапії іматинібом (А. Hochhaus et al., 2009).

Таку розбіжність даних можна пояснити тим, що наша група пацієнтів відрізнялась тривалим строком передлікованості, що призводить до уповільнення редукції пухлинного клону та має вираження у відтермінованості та зниженні частоти ефектів терапії (досягнення ПЦВ, ВМВ МВ<sup>4</sup>).

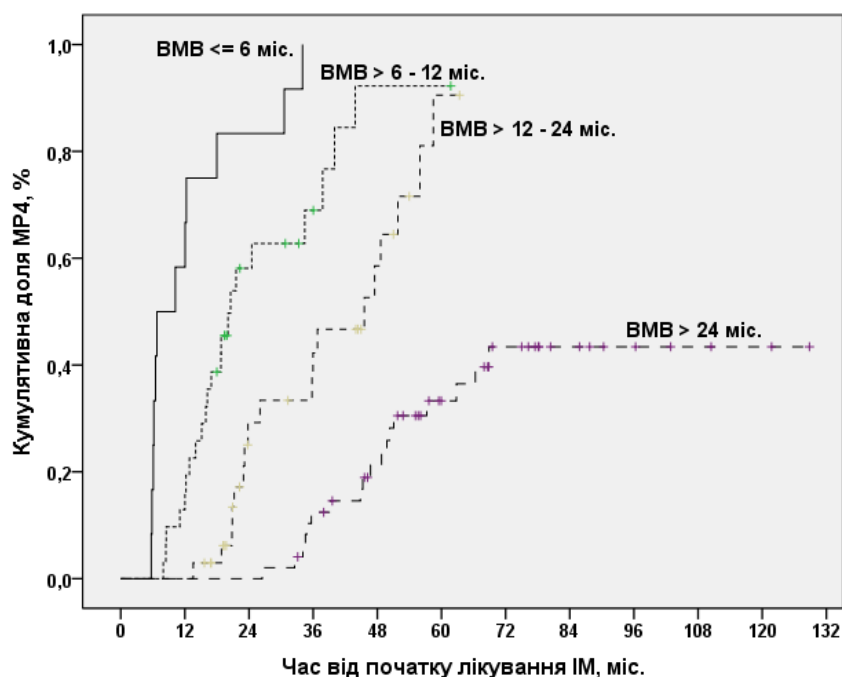


Рисунок 2.4 - Кумулятивна частота пацієнтів, які досягли глибокої молекулярної відповіді МВ<sup>4</sup>, залежно від часу досягнення рівня експресії гена *BCR/ABL1* ≤ 0,1% (ВМВ).

Встановлено, що у пацієнтів, у яких редукція експресії гена *BCR/ABL1* до рівня ВМВ відбувалася пізніше, подальше зниження рівня експресії гена *BCR/ABL1* (до рівня МВ<sup>4</sup>) відбувалося більш повільно. Швидка ВМВ мала прогностичне значення для досягнення глибокої молекулярної відповіді. Відтермінування досягнення ВМВ асоціювалося з повільною динамікою зниження рівня експресії гена *BCR/ABL1* ( $p < 0,001$ ).

Таким чином, досягнення повної цитогенетичної відповіді ( $Ph^+ = 0\%$ ) через 3 місяці терапії ІТК є раннім прогностичним маркером, асоційованим з високою вірогідністю досягнення глибокої молекулярної відповіді на терапію іматинібом впродовж 24 місяців лікування. Пацієнти, у яких на 3 місяці терапії іматинібом рівень експресії гена *BCR/ABL1* не перевищував 1%, мали значуще вищу кумулятивну частоту досягнення глибокої молекулярної відповіді через 2 роки терапії, порівняно із пацієнтами, у яких рівень експресії гена *BCR/ABL1* на ці ж строки складав більше 1% (72% проти 24%,  $p = 0,001$ ). Досягнення редукції експресії гена *BCR/ABL1* рівня великої молекулярної відповіді (*BCR/ABL1* ≤ 0,1%) через 6 місяців лікування є фактором сприятливого прогнозу щодо

отримання глибокої молекулярної відповіді на терапію іматинібом впродовж 24 місяців лікування.

Для пацієнтів з ХМЛ, які не досягають оптимальної відповіді у відповідні строки, наступним кроком в лікуванні є призначення ІТК II та III поколінь з більш широким спектром тирозинкіназної активності, а також типування клітин периферичної крові за системою HLA для пошуку гістоідентичного донора стовбурових клітин для проведення аlogenної трансплантації. Такий диференційований підхід дозволить гематологам виділити пацієнтів з оптимальним чи неоптимальним результатом після визначення рівня *BCR/ABL1* за перші 3 місяці лікування ІТК, а в подальшому індивідуалізувати терапію, включаючи трансплантацію.

### **ВИСНОВОК**

В методичних рекомендаціях представлені дані щодо методології діагностики та ведення пацієнтів з хронічною мієлоїдною лейкемією, які отримують терапію інгібіторами тирозинкіназ.

Визначено критерії оптимальної відповіді, застерігаючих ознак та невдачі лікування, строки проведення відповідних досліджень та тактику лікування таргетними препаратами залежно від досягнутої відповіді. Проаналізовано на основі власних даних, які збігаються з іноземними, що вирішальним є швидкість зниження рівня *BCR/ABL1* за 3 місяці лікування ІТК, яка впливає на досягнення тривалої молекулярної відповіді на етапах подальшої терапії.

## ПЕРЕЛІК РЕКОМЕНДОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Наказ Міністерства охорони здоров'я України від 30.07.2010 № 647 Про затвердження клінічних протоколів надання медичної допомоги хворим зі спеціальності "Гематологія".
2. European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013 / M. Vuccarani [et al.] // *Blood*. - 2013. – Vol. 122. – P. 872-884.
3. An international system for human cytogenetic, nomenclature 2013 / L.Shaffer [et al.] - M.: Karger, 2013. - 140 p.
4. Sokal, J. E. Prognosis in chronic myeloid leukaemia: biology of the disease vs. treatment / J. E. Sokal // *Baillieres Clin Haematol*. – 1987. – Vol. 1. - P. 907-929.
5. Harmonization of molecular monitoring of CML therapy in Europe / Muller M. C.[ et al] // *Leukemia*. – 2009. - Vol. 23. – P. 1957–1963.
6. IRIS Investigators. Six-year follow-up of patients receiving imatinib for the first-line treatment of chronic myeloid leukemia / A. Hochhaus et al. *Leukemia*. 2009. Vol. 23. P. 1054–1061.