

AZ ATRA ONKOHEMATOLÓGIAI HATÁSAI
Retinoinsav hatása a citogenetikai remisszióra krónikus
fázisú CML-ben

PhD értekezés tézisei

Dr. Egyed Miklós

Programvezető: Prof. Dr. Pajor László

Program: Tumorsejtek patomorfológiájának vizsgálata

NK sejtek: ontogenezis, funkció, patomorfológia

Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar
Patológiai Intézet

2003

Bevezetés

A CML az első malignus betegség, amelyet konzisztens, szerzett genetikai abnormalitáshoz a Philadelphia transzlokáció t(9;22) (q34;q11), molekuláris szinten a bcr-abl fúziós génhez lehetett kötni. A betegek túlélése a betegség krónikus fázisának hosszától függ, amely a citogenetikai remisszióval (a Ph- progenitorokból történő hemopoézis mértékével) arányos.

Munkám során az ATRA citogenetikai remisszióra kifejtett hatását vizsgáltam.

Dolgozatom első részében az EORTC-LG tanulmány keretében vizsgált új kezelést az IFN+ATRA kombinációt, a beválasztás kritériumait, a követés vizsgálmódszereit ismertetem, különös tekintettel a metafázis citogenetika eredményeire.

Az eredmények fejezetben összesítem a citogenetikai válaszokat és összehasonlítom az általam csak IFN kezelt betegek citogenetikai eredményeivel. A dolgozat záró részében az irodalmi adatokkal hasonlítom össze az új kombinációt, a Glivec (imatinib) érában lehetséges szerepére mutatok rá.

I. Elméleti rész

I.1. A CML kezelési lehetőségei

A CML gyógyításában döntő fontosságú az allogén csontvelőátültetés, melynek azonban határt szab a betegek idős életkora és a donor limitáltsága. Az esetek többségében a krónikus fázis megnyújtása, a citogenetikai remisszió elérése a terápia célja, és ennek gerincét közel 20 éve az IFN alkalmazása és esetleg kisdózisú citozárral való kombinációja képezte. A kezelt betegek 10–45 százalékában értek el major citogenetikai választ, és a remisszióba jutottak magas aránya hosszú ideig, akár 10 évet is meghaladóan krónikus fázisban maradt. A kombináció, és az eddig alkalmazott egyéb kezelések mindegyike a Ph+ klónra hatott, annak proliferációs előnyét próbálta megszüntetni.

I.2. Az IFN+ATRA kezelés

Az ATRA a retinoidok biológiailag aktív formája, a sejtekérésében játszik döntő szerepet, és CML-es betegek sejt kultúráiban a Ph-, egészséges sejtek proliferációs hátrányát látszóan megszüntetni. ezért 1995-ben elsőként a világon az EORTC-LG keretében kezdtük el alkalmazni. krónikus fázisú CML-es betegek kezelésére. Az IFN+ATRA kombinációtól az összetevők szinergizmusát vártuk el, az IFN-nak a Ph+ klónra kifejtett jól ismert proliferáció-gátló hatása mellett a ATRA-nak a Ph- progenitorokra való serkentő hatását, vagyis több, mélyebb és gyorsabb citogenetikai remissziót. Az egészséges őssejtek stimulációjával kívántuk a malignus klón szuppresszióját elérni.

II. Vizsgálati rész

II.1. Beteganyag

1995. november – 1999. július között 11 első krónikus fázisú CML-es betegen kezdtük el, és közülük 9 esetében fejeztük be a 12 hónapos IFN+ATRA kombinációt. Azok a 3 évnél nem régebben diagnosztizált, 18–70 év közötti, donorral nem rendelkező, első krónikus fázisban lévő CML-es betegek (Ph és/vagy bcr-abl pozitív), akiknek általános állapota megfelelő volt (WHO–ECOG 0–1–2), IFN mellett hematológiai remisszióban voltak, és a 12 hónapos kezelést vállalták – kerültek be az EORTC–LG O6941 tanulmányába.

Azon CML-es betegek, akiket a tanulmányt megelőzően, vagy azt követően kezeltünk, vagy az ATRA kezelést nem vállalták, csak IFN terápiában részesültek, életkoruk, *Sokal* score-uk hasonló volt a kombinált kezeltekéhez – képezték az osztályos kontrollcsoportot.

A tanulmányba való bekerüléskor és azt követően havonta ellenőriztük vércépküket. életminőségüket és összegeztük a kezelés mellékhatásait.

4 havonta vese-, májfunkciós vizsgálat, csontvelő aspiráció történt – metafázis citogenetika, szemikvantitatív PCR vizsgálat, 1998-tól + interfázis citogenetika (FISH) is.

II.2. A kiértékeléshez alkalmazott vizsgálatok

II. 2.1. Metafázis citogenetika

Budapesti Szent László Kórház. Citogenetikai Laboratórium

A csontvelő aspirátumból nyert sejtek rövid (24–48 órás) sejtenyészeteiből colchicines gátlást követően nyert metafázisokat értékeltük Giemsa (G-sáv) technikával. Minimum 30 metafázis-vizsgálata történt.

II.2.2. Interfázis citogenetika (FISH)

POTE Patológiai Intézet

A csontvelő aspirátum, fixált keneteiben alkalmazott in situ hibridizációval minimum 200 sejtmag festődését értékeltük. Pozitívumnak a sárga fúziós szint tekintettük (abl = piros), (bcr = zöld), ha 5 százalékot meghaladta.

II.2.3. Szemikvantitatív polimeráz láncreakció (Q-PCR)

POTE Patológiai Intézet

A bcr-abl kiméra mRNS molekulaszámát mértük 10^7 csontvelői sejtben és a transzlokációban részt nem vevő abl (a2a3) mRNS molekulaszámára vonatkoztattuk, az expressziójuk arányát adtuk meg logaritmikus mértékben. A vizsgálattal a kiméra gén expressziójának mértékét vizsgáltuk.

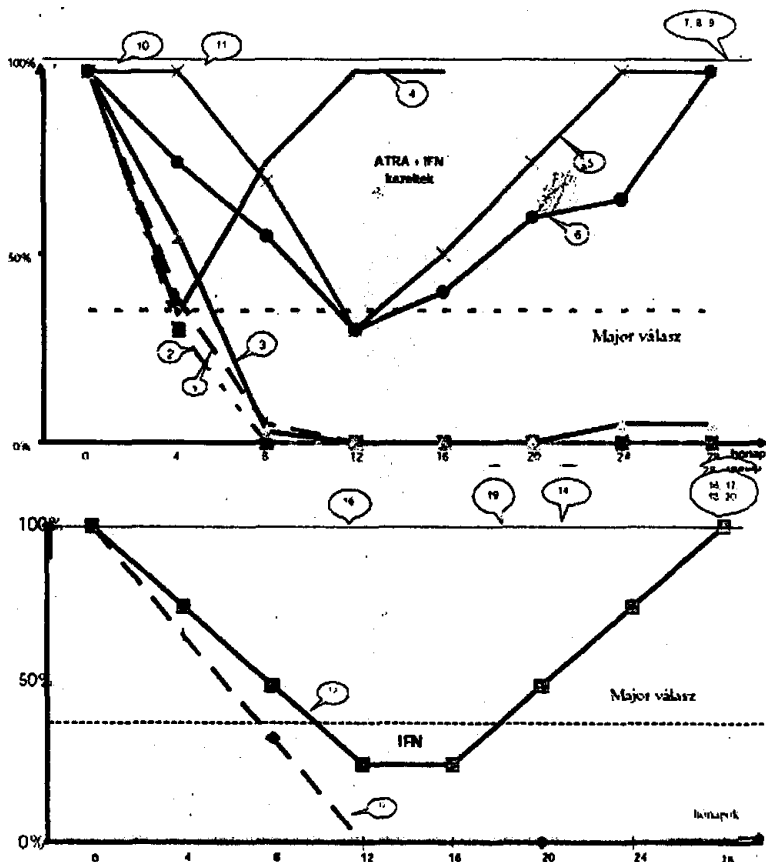
III. Eredmények

A vizsgálatban részt vett betegek a kezelést jól tolerálták, NCI-CTC 3-4 fokú toxicitást nem észleltünk. A vizsgálatba bevont 11 beteg közül 2 betegnél (*10. és 11. beteg*) fogyás, fejfájás, csontfájdalmak, szem- és szájszárazság (*10. beteg*) és együttműködési probléma (*11. beteg*) miatt le kellett állítani a kezelést. (1. táblázat). Az IFN-nel elért hematológiai remisszió a vizsgálat időszakában minden beteg esetén megmaradt. Az észlelt citogenetikai válaszokat az 1. ábra szemlélteti.

6 betegnél major citogenetikai választ, közülük az *1., 2. és 3. betegekben* komplett citogenetikai remissziót (CoCR) észleltünk a 12. hónapban, mely az *1. betegnél* több mint 2 év után is megmaradt. A *2. betegnél* az ATRA leállítását követően parciális citogenetikai relapszus (15% Ph+) lépett fel. A *3. betegnek* az 1 évig tartó ATRA-kezelés befejezése után csak 4 hónapos kontrollját végeztük el, komplett citogenetikai remisszióban maradt. A *4. beteg* a regisztrációkor már 2 éve kapott IFN kezelést CML miatt (heti 3×3 ME dózisban), de 100%-ban Ph+ volt. A 4. hónapra major részleges citogenetikai remissziót (PaCR) detektáltunk átmenetileg, mely a 8. hónapra romlott (MiCR), a 12. hónapra teljes citogenetikai relapszust észleltünk, és a citogenetikai lelet megérkezésekor már limfoblasztos krízisbe került, majd 6 hónap múlva meghalt. Az *5. és 6. beteg* a 12. hónapra szintén major részleges citogenetikai remisszióba (PaCR) jutott, az ATRA leállítását követően azonban a változatlan dózisban adott IFN mellett, a hematológiai remisszió ellenére teljes citogenetikai relapszus következett be. A vizsgált időszakban új citogenetikai eltérés nem alakult ki beleértve a 4. beteget is.

Mivel az EORTC tanulmánynak nem volt kontroll betegcsoportja, ezért az IFN+ATRA kezelt betegek eredményeit az osztályunkon ezen időben kezelt betegek eredményeivel hasonlítottuk össze. A kilenc hasonló életkorú és Sokal score-ral rendelkező beteg az EORTC tanulmányba való belépést nem vállalta, kezelésük azonban azonos dózsisú IFN-nel történt, és ellenőrzésük is a 3. pontban leírtaknak megfelelően.

A 12. és 13. sz. betegeken észleltünk major citogenetikai választ, a 12. sz. beteg 1 évvel az IFN kezdetét követően komplett citogenetikai, újabb 2 év múlva molekuláris remisszióba jutott. További 2 év múlva az IFN kezelést leállítottuk, és a beteg ezt követő 3 év múlva is molekuláris remisszióban maradt (gyógyult?!). A 13. betegnél, aki major részleges citogenetikai remisszióba jutott, az IFN folytatása mellett is lassú citogenetikai relapszus következett be.



1. ábra. A résztvevő betegek összesített citogenetikai eredményei

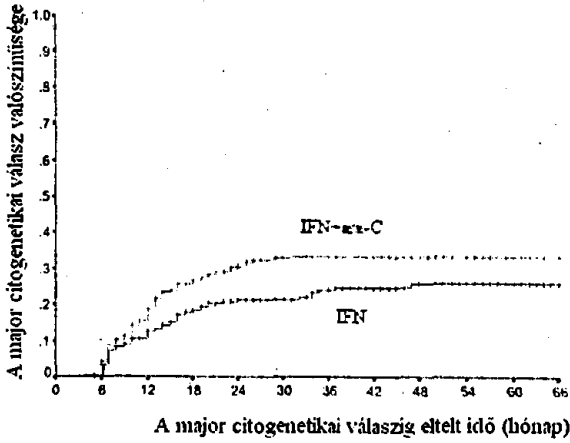
1. táblázat. A résztvevő betegek összesített klinikai adatai

Sorszám	Nem	Életkor (év)	Dg. (időpont)	Sokal-index	Regisztráció (időpont)
IFN+ATRA					
1.	ffi	48	96. 09.	alacsony	97. 03.
2.	ffi	60	97. 10.	magas	98. 07.
3.	ffi	41	98. 12.	intermedier	99. 06.
4.	ffi	32	94. 09.	magas	96. 08.
5.	nő	42	97. 02.	intermedier	98. 01.
6.	ffi	57	96. 08.	intermedier	97. 08.
7.	nő	41	95. 07.	alacsony	95. 11.
8.	ffi	67	96. 02.	intermedier	96. 06.
9.	nő	53	98. 05.	magas	99. 02.
10.	nő	55	97. 05.	magas	97. 09.
11.	ffi	37	97. 01.	alacsony	97. 12.
IFN					
12.	nő	55	92. 04.	magas	92. 05.
13.	nő	36	97. 04.	intermedier	97. 06.
14.	ffi	38	98. 10.	alacsony	97. 12.
15.	ffi	75	99. 08.	intermedier	99. 10.
16.	nő	34	94. 07.	alacsony	94. 10.
17.	nő	53	95. 06.	intermedier	95. 08.
18.	ffi	35	94. 09.	intermedier	94. 12.
19.	nő	49	97. 10.	alacsony	97. 11.
20.	nő	38	98. 06.	alacsony	98. 07.

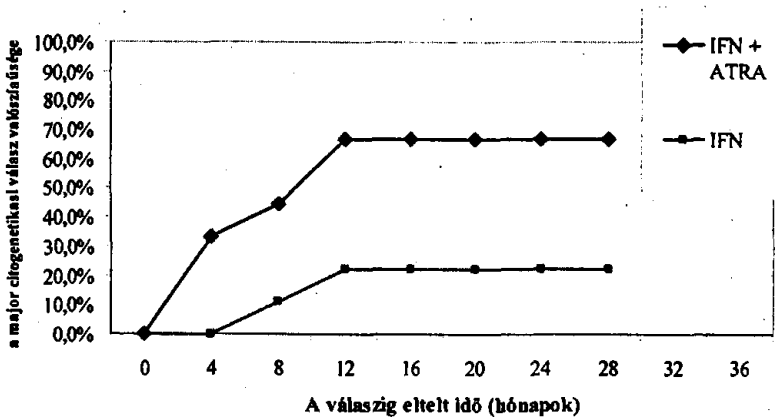
IV. Megbeszélés

A tanulmány keretében 11 krónikus fázisú 34-68 év közötti életkorú CML-es beteg kezelése során alkalmaztuk az IFN+ATRA kombinációt. Arra a kérdésre kerestünk választ, hogy a klonális vérképzést gátló IFN és a klonális vérképzést szintén gátló, de inkább a Ph-progenitorok proliferációját elősegítő ATRA kombinációja előnyöse-e, a várható szinergista hatásuk érvényesül-e? Az IFN+ATRA kombináció előnyösebb-e az IFN monoterápiánál? A kis számú beteg eredményeit az osztályunkon IFN monoterápiával kezelt betegek eredményeivel hasonlítottuk össze. Mivel a kilenc IFN+ATRA kezelt, és a kilenc csak IFN kezelt beteg klinikai, prognosztikus score értéke és az alkalmazott IFN dózisa egyező volt, az alacsony betegszám ellenére eredményeik összehasonlíthatóak.

Az IFN+ATRA kombinációval kezelt 9 beteg esetében a kezelés 12 hónapja alatt háromszor gyakrabban értünk el major citogenetikai remissziót, mint a kontroll csak IFN kezelt betegek között. A kezelés során használt ATRA mellett a betegek életminőségét rontó mellékhatás nem jelentkezett. Eredményeink alapján úgy tűnik, hogy az ATRA in vitro kedvező hatása a CML-es sejtekre in vivo körülmények között is érvényesül és toxikus hatása sem korlátozza alkalmazhatóságát. Eredményeink alapján feltehető, hogy az ATRA kezelés csak akkor nyújt hosszan tartó remissziót, ha tartósan alkalmazzuk. Az IFN monoterápiával és az IFN+ara-C kombinációval elért eredmények irodalmi adataival összehasonlítva az IFN csoportban saját eredményeink (3. ábra) hasonló képet mutatnak, de az IFN+ATRA csoportban jelentősen, csaknem négyszer magasabb a major citogenetikai válasz aránya, mint az idézett tanulmány IFN csoportjáé, és több mint kétszer magasabb az IFN+ara-C csoportnál.



2. ábra. A major cytogenetikai válaszig eltelt idő (Baccarani – Italian CML study group)



3. ábra. A major cytogenetikai válaszig eltelt idő (9 beteg, 6 major cytogenetikai válasz)

Jelentősnek gondoljuk továbbá a major citogenetikai válaszig eltelt időt is. Az olasz tanulmány esetében fokozatosan 24–30 hónapig nőtt a citogenetikai válaszolók aránya; és a 6. hónapban még szinte nem észleltek választ. Ez a saját IFN+ATRA csoportunkban már a 4. hónapban megindult és egy évig folytatódott. A változatlan dózisban tovább adott IFN mellett már nem alakult ki további genetikai válasz, így ez a tény is az ATRA hatását bizonyítja. Az a feltételezés, hogy ATRA és IFN szinergista módon hat, a beteg kis száma ellenére is bizonyíthatónak tűnik.

Látható, hogy az olyan kombinációhoz viszonyítva, melynek mindkét eleme a Ph+ klónon hat (IFN+ara-C), az általunk vizsgált IFN+ATRA kombináció előnyösebbnek látszik a major válasz elérésére.

Legjobb tudomásunk szerint ez az első olyan kombináció, amelynek a klonális vérképzés elnyomása mellett hangsúlyozottan a fő célkitűzése volt az egészséges őssejtekből való vérképzés visszaállítása.

Az ATRA Ph- (egészséges) őssejtre való kedvező hatására utalhat, hogy a vizsgált kombináció alkalmazása során több, mélyebb major citogenetikai válasz jött létre, és lényegesen rövidebb kezelési idő alatt, mint az eddig vizsgált kombinációk alkalmazásakor (ahol a kombináció egyik szere ugyanaz az IFN volt, mint esetünkben).

A CML talán a leginkább kutatott és molekuláris szinten megismert leukémia. 1996 óta a fúziós géntermék bcr-abl tirozin-kináz enzimét specifikusan bénító terápiával, az imatinib mesylate-val (STI-571, Glivec) rendelkezünk. A szer a leukemogenezisért felelős enzim ATP kötő helyére kötődve blokkolja annak ligand független aktivitását. Mivel mai tudásunk szerint a CML létrejöttéért maga a bcr-abl fúziós génen képződött fehérje a felelős, így ennek blokkolása szinte oki terápiának tűnik, elsőként a daganatok történetében.

Nyilvánvalóan mindent felülmúló az érdeklődés az új gyógyszer iránt, az eredmények nagyrészt igazolják is a reményeket. I. fázisú tanulmányokban, krónikus fázisú CML-es betegek esetén 300 mg/nap dózis felett a betegek 98%-ban teljes hematológiai remissziót lehetett elérni 4 hét alatt, és 31%-ban major citogenetikai választ (13% teljes, 18% részleges). Blasztos fázisban 55–70% között lépett fel hematológiai remisszió és az 2–3

hónapig tartott. 400 mg/nap vagy ezt meghaladó STI-571 dózis mellett IFN refrakter betegek 95%-a került hematológiai remisszióba és 60% major citogenetikai választ észleltek (41% teljes és 19% részleges).

Újabb tanulmányok frissen diagnosztizált CML-es betegeken igen magas és dóziszfüggő citogenetikai választ észleltek. Akcelerált és blasztos fázisban is hatékonyak találták az STI-571-et. III. fázisú tanulmány több mint 1000 betegén 63%-ban észleltek major citogenetikai választ.

Fenti eredmények alapján ma az STI-571 a CML kezelésében a leginkább hatékony szernek tűnik. Az irodalmi adatokból azonban nyilvánvaló, hogy a betegség progressziója során egyre nagyobb arányban kell számolni STI-571 rezisztenciával. A rezisztencia priméren fennállhat (nonresponder) vagy a kezelés során alakulhat ki (szekunder vagy szerzett rezisztencia).

A késői krónikus fázisban a betegek 10%-a hematológiailag és közel 50%-a citogenetikailag nonresponder. Az akcelerált fázisban 18%, a blasztos fázisban közel 50% hematológiai nonresponderek aránya.

A primér rezisztencia esetén a bcr-abl nem bénítható, más mechanizmus lehet felelős a progresszióért. A szerzett rezisztencia esetén a génamplifikáció, vagy csak a szoliter bcr-abl fokozott expressziója, multidrug-resistance fokozott expressziója, vagy a bcr-abl fúziós géntermék intracelluláris megváltozott lokalizációja, vagy bcr-abl független jelátvivő rendszer általi progresszió lehet felelős a hatástalanságért.

Ezen irodalmi adatok azt bizonyítják, hogy a specifikusnak tekinthető target molekulát blokkoló terápia mellett is egyre nagyobb arányban találunk olyan betegeket, akiknek kezelése nem megoldott. Számukra egyéb szerekkel való kombináció az egyik lehetséges megoldás, vagy eddig még nem alkalmazott kombinációk.

A kisszámú betegünkön észlelt magas citogenetikai válasz és enyhe mellékhatások miatt a jövőben talán ezen betegek részére lenne érdemes alkalmazni az általunk vizsgált IFN+ATRA kombinációt.

V. A PhD munka új eredményei

- Munkám során elsőként alkalmaztunk krónikus fázisú CML-es betegek kezelésére IFN+ATRA kombinációt feltételezve szinergista hatásukat.
- Az irodalmi adatokkal és saját csak IFN-nal kezelt CML-es betegcsoportunkkal összehasonlítva IFN+ATRA kezelte ken több, mélyebb, és gyorsabban kialakuló citogenetikai választ észleltünk, az ATRA leállítása után relapszus következett be, amely a két szer feltételezett szinergista hatása mellett szól.
- A CML kezelésében a Ph+ klón szupressziója mellet fontos lehet a Ph-progenitorok proliferációs hátrányának megszüntetése.
- Egy akut promielocita leukémiás (APL) betegünk ATRA rezisztens relapszusában IFN kezeléssel tartós (8 hónapos) hematológiai remissziót értünk el. A kezelés 4. hónapjára molekuláris remisszió, a leállítást követően 2 hónap múlva relapszus, majd az újraindításra 2. molekuláris remisszió alakult ki. A terápia elméleti alapját a PML gén in vitro igazolt transzkripcionális IFN szabályozása jelentette.
- Az ATRA-t a RAR-béta receptorra való hatása ismeretében elsőként alkalmaztuk eredményesen (23 hónapig tartó komplett remisszió) előrehaladott hepatocelluláris karcinóma kezelésére.
- Eredményeink alapján az ATRA sejterést és differenciálódást elősegítő hatása nem csak APL-ben, hanem CML-ben is klinikailag hasznosítható.

VI. A PhD dolgozat alapjául szolgáló közlemények és absztraktok

Közlemények

Egyed M, Rumi Gy, Boros B, Páldi-Haris P, Földi J (2000) Interferon may reduce minimal residual disease of acute promyelocytic leukemia. *Leukemia*. 14: 1153. IF: 3,376

Pajor L, Vass JA, Kereskai L, Kajtár P, Szomor Á, Egyed M, Iványi J, Jáksó P (2000) The existence of lymphoid lineage restricted Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia with heterogeneous bcr-abl re arrangement. *Leukemia*. 14: 1122–1126. IF: 3,376

Egyed M, Mihályfalvi Z, Kollár B, Rumi Gy, Keller É, Vass J, Fekete S (2001) Retinsav hatása a citogenetikai remisszióra krónikus myeloid leukemia interferonnal kezelt első krónikus fázisában. *Orv Hetil.* 142: 2421–2425.

Egyed M, Kollár B, Rumi Gy, Keller É, Vass J, Fekete S (2003) Effect of retinoic acid treatment on cytogenetic remission of chronic myeloid leukemia. *Acta Haematol.* 109: 84–89. IF: 0,796

Absztraktok

Egyed M (1997) Successful treatment of hepatocellular carcinoma with all-trans-retinoic acid (ATRA). *Onkologie*. 20(Suppl. 1): 163.

Egyed M, Kollár B, Boros B, Rumi Gy, Földi J (1998) Can interferon cause molecular remission in genetically relapsed acute promyelocytic leukemic patient. *Ann Hematology*. 77(Suppl. 2.): 206.

Egyed M, Rumi Gy, Kollár B, Fekete S (1999) Myelodysplastic syndrome /RARS/ with dysplastic marrow eosinophilia and del (16q). *Leukemia Res. 23(Suppl.):* 120. **IF: 1,142**

Egyed M, Rumi G, Viski A, Puskás A, Horváth G (1999) Treatment of hepatocellular carcinoma with all-trans-retinoic-acid (ATRA). *Eur J Int Med. (Suppl.):* 79.

Egyed M, Rumi G, Puskás A, Horváth G, Viski A (1999) All-trans-retinoic-acid, a possible agent in the treatment of hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res. (Suppl.)*

Muss P, Egyed M, Beksac M, Labar B, Indrak K, Dardene M, Suciú S, Cevreska L, Willemze R, Stryckmans P (1999) All-trans retinoic acid (ATRA) in addition to r-interferon alpha first chronic phase, a feasibility study by the EORTC-LCG. *Blood. 94(Suppl.):* 1673. **IF: 8,782**

Jaksic B, Brugiatelli M, Suciú S, Beaumelou E, Wijermans PW, Delmer A, Roozendaal KJ, Teixeira A, Jehn U, Feremans W, Belhabri A, Egyed M, Venditi A, Indrak K, Cevreska L, Rodts P, Solbu G, Willemze R, De Witte TM & For EORTC Leukemia Group Dept. of Medicine, University Hospital „Merkur” Zagreb Croatia (2000) Fludarabine vs. high dose chlorambucil in advanced B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL): results of EORTC phase-II randomized trial after 4 years of median follow-up. *Blood. 96:* 758a.

IF: 8,977

Szomor Á, Molnár L, Iványi J, Radványi G, Nagy Zs, Karádi Á, Gergely L, Bányai A, Demeter J, Aryan H, Gasztonyi Z, Kiss A, Kollár B, Egyed M, Losonczy H, kelényi G, Pajor L (2001) Extranodal involvement in primary systemic anaplastic large cell lymphoma (ALCL) in adults. *Ann Hemat. 80(Suppl. 3.):* B144. **IF: 1,397**

Összesített IF: 27,846