# ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ «БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ» МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ

ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

#### Рябчикова Наира Рафаэлевна

### КЛИНИКО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ АССОЦИАЦИИ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ МИЕЛОЛЕЙКОЗЕ

3.1.28 – гематология и переливание крови

#### Диссертация

на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

Научный руководитель: доктор медицинских наук, профессор В. И. Никуличева

#### ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ. Современные аспекты эпидемиологии, этиопатогенеза, факторов риска, классификации, клиники, диагностики и лечения хронического миелолейкоза
1.1 Определение, эпидемиология, патогенез, классификация и клиника
хронического миелолейкоза
1.2 Современная диагностика хронического миелолейкоза
1.3 Современные принципы лечения хронического миелолейкоза и мониторинга
1.3.1 Молекулярный мониторинг хронического миелолейкоза
1.4 Вопросы резистентности больных хронического миелолейкоза при лечении ингибиторами тирозинкиназ
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ
2.1 Материал исследования: Общая характеристика больных
2.2 Методы исследования
2.2.1 Эпидемиологические, клинические, лабораторные и инструментальные методы исследования
2.2.2 Цитогенетические и молекулярно-генетические методы исследования 43
2.2.2.1 Цитогенетическое исследование клеток костного мозга
2.2.2.2 Молекулярно-цитогенетическое исследование клеток костного мозга 4
2.2.2.3 Молекулярно-генетическое исследование методом полимеразной цепной реакции в реальном времени
2.2.2.4 Определение мутационного анализа гена BCR::ABL
2.2.2.5 Определение полиморфных вариантов в генах <i>hOCT1</i> , <i>ABCG2</i> и <i>CYP3A5</i>
ГЛАВА З ЭПИДЕМИОЛОГИЯ И КЛИНИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ МИЕЛОЛЕЙКОЗОМ В РЕСПУБЛИКЕ БАШКОРТОСТАН48
3.1 Анализ эпидемиологических показателей хронического миелолейкоза в республике Башкортостан
3.2 Клиническая характеристика больных хроническим миелолейкозом 52

3.3 Мониторинг терапии ингибиторами тирозинкиназы больных хроническим
миелолейкозом в республике Башкортостан
3.3.1 Комплексный мониторинг терапии ИТК в группе больных хроническим
миелолейкозом для проведения мутационных и генетических
исследований
3.3.2. Изучение мутаций в гене <i>BCR::ABL</i> у пациентов с хроническим
миелолейкозом в Республике Башкортостан71
ГЛАВА 4 КЛИНИКО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ АССОЦИАЦИИ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ
МИЕЛОЛЕЙКОЗЕ77
4.1 Анализ ассоциации полиморфного варианта rs776746 в гене изофермента
цитохрома р450 СҮРЗА5 у больных хроническим миелолейкозом с критериями
риска, ответом на лечение и выживаемость
4.2 Анализ ассоциации полиморфного варианта rs776746 в гене изофермента
hOCT1у больных хроническим миелолейкозом с критериями риска, ответом на
лечение и выживаемость
4.2.1. Оценка уровня экспрессии гена $hOCT1$ и гена переносчика $ABCG2$ в
клеточной линии К562 и лейкоцитах периферической крови больных
хроническим миелолейкозом
ЗАКЛЮЧЕНИЕ91
ВЫВОДЫ108
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ110
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

#### **ВВЕДЕНИЕ**

#### Актуальность избранной темы

В экономически развитых странах хронический миелолейкоз (ХМЛ) занимает 5 место среди гемобластозов, 20% от всех лейкозов в возрасте 30-70 лет, 29-30%- это больные ХМЛ репродуктивного возраста до 40 лет (Hochhaus A. 2017, Туркина А.Г. 2017, Челышева Е.Ю.2020). В странах Европы и Северной Америки ХМЛ встречается гораздо чаще, чем в странах Азии (Кіт D.2018). Стандартизованная заболеваемость по 6 регионам России, по данным С. М. Куликова и соавт. (2014), составила 0,7–0,8 случая на 100 000 населения. Изучение эпидемиологических данных в различных регионах является актуальным и позволяет оценить, рационально планировать и мониторировать специализированную помощь больным ХМЛ.

Успехи достигнутые учеными в понимании патогенеза и терапии ХМЛ позволили значимо изменить продолжительность и качество жизни больных, а в настоящее время уже рассматривается вопрос об их излечении [Mahon F. 2015, Saussele S. 2018, Abruzzese E., 2019, Федорова Е.Ю.2016, Ломаиа Э.Г. 2017, Шухов О.А. 2019, Ионова Т.И. 2021]. Однако, несмотря на все достижения, остается проблема развития резистентности и прогрессии данной патологии [Hughes T.P., 2014; Shah N.R., 2016, Maddin N. 2016, Hoffmann V.S. 2017, Cortes J., 2019, Виноградова О.Ю. 2011, Шуваев В.А., 2015, Абдулкадыров К.М. 2016, Туркина А.Г. 2017, Фоминых М.С.2017]. В связи с этим все чаще встречаются работы по изучению молекулярно-генетических основ ХМЛ, прогноза эффективности таргетной терапии на основании молекулярно-биологических механизмов развития резистентности лечения [Corbin AS. 2003, Вассагапі V. et al., 2013, Wang W. 2016, Куцев С.И., 2009; Савченко В.Г., 2017, Тихонова В.В.2018].

Оказалось, что признаки резистентности к терапии могут проявлятся не только при мутациях киназного домена гена BCR::ABL, высоком риске неблагоприятного прогноза, что указывает на необходимость изучения

дополнительных механизмов образования резистентного к лекарственному препарату фенотипа, генов участвующих в метаболизме ИТК, некоторых онкогенов и супрессоров опухолевого роста у больных ХМЛ ( Gromicho M., 2011 , Ursan I.D. 2015, Pfirrmann M. 2016, Campiotti L. 2017, Benchikh 2022, Куцев С.И., 2008, Фоминых М.С., 2016; Шухов О.А. 2019).

Таким образом, изучение эпидемиологии, клинико-гематологической характеристики больных XMЛ в различных регионах с исследованием полиморфизма генов и анализом клинико-генетических ассоциаций, позволит уточнить некоторые механизмы патогенеза данной патологии, развития резистентности к терапии, что, в свою очередь поможет совершенствовать индивидуализированный подход при выборе лечебной тактики и определении прогноза заболевания.

#### Степень разработанности темы диссертации

В настоящее время все основные сведения, накопленные исследователями в мировой практике по эпидемиологии, принципах диагностики, лечения и мониторирования взрослых пациентов ХМЛ в России представлены рабочей группой экспертов в клинических рекомендациях (Афанасьев Б. А. и др., 2020).

Несмотря на огромные достижения в ведении этих пациентов, все больше работ встречаются о развитии резистентности к первой и последующим линиям терапии (Maddin N., 2016; Абдулкадыров К.М., 2013; Тихонова В. В., 2018). Существует много дискуссий относительно развития резистентности и прогрессирования заболевания. Есть мнение о низкой комплаентности к лечению, развитию непереносимости, нежелательных явлений, токсического действия препаратов, вынужденных, и не только, перевывов в лечении, развитии мутаций и др. (Челышева Е.Ю., 2007, 2013; Виноградова О.Ю., 2011; Туркина А.Г., 2015, 2018; Голенков А.К., 2019). Последние годы все больше работ встречается по изучению молекулярно-генетических основ в патогенезе ХМЛ, его биологических характеристик с целью прогнозирования эффективности таргетной терапии (Куцев С.И., 2009; Минниахметов И.Р., 2011; Шухов О. А.,

2019). Показано, что наличие мутаций в гене BCR::ABL ассоциировано с прогрессией заболевания, снижением общей выживаемости и увеличением летальности. В 20% случаев при ХМЛ наличие мутаций может сопровождаться дополнительными хромосомными абберациями или комплексными аномалиями, что существенно ухудшает показатели 10-летней выживаемости и летальности, по сравнению с пациентами без этих нарушений (Фоминых М. С., 2016, 2017). А исследования по изучению однонуклеотидных полиморфизмов генов (SNR) при XMЛ в разных регионах мира, в том числе полиморфизма гена CYP3A5 (rs 7776746) и гена hOCT1 M408V (rs628031) и их неоднозначной ассоциацией с проводимым лечением ИТК, побудило нас К изучению полиморфизмов с критериями риска, резистентностью к терапии и общей выживаемостью больных в многонациональной республике Башкортостан (РБ) (Адильгереева Э.П., 2018; Vaidya S., 2015; Maddin N., 2016; Hamed N.A., 2018).

Следовательно, дальнейшее изучение эпидемиологических показателей XMЛ в различных регионах, в том числе Республике Башкортостан, позволит выявить местные особенности развития и течения XMЛ, сравнить их с показателями России и других стран. Выявление частоты встречаемости различных мутаций и их комбинаций на разных территориях даст возможность прогнозировать течение заболевания и на ранних этапах переключаться на более эффективные препараты. А исследование полиморфизма генов, участвующих в фармакогенетике и фармакодинамике ингибиторов тирозинкиназ с изучением клинико-генетических ассоциаций, позволит уточнить некоторые механизмы патогенеза данной патологии.

#### Цель исследования

Оценка прогностического значения клинико-генетических ассоциаций на основе анализа эпидемиологических, клинических, и молекулярно-генетических показателей больных хроническим миелолейкозом в Республике Башкортостан

#### Задачи исследования

- 1. Изучить эпидемиологические показатели больных хроническим миелолейкозом в Республике Башкортостан за период 2000–2020 годы.
- 2. Представить клинико-гематологическую характеристику больных хроническим миелолейкозом по данным регистра Республики Башкортостан и сравнить показатели с данными Российского многоцентрового популяционного исследования EUTOS.
- 3. Провести мониторинг терапии ИТК больных хроническим миелолейкозом с анализом мутаций в гене *BCR::ABL*.
- 4. Оценить прогностическое значение распределения частот генотипов полиморфных вариантов генов, участвующих в метаболизме ингибиторов тирозинкиназ (CYP3A5(rs776746) и hOCT1 (rs683369)) у больных хроническим миелолейкозом, на основании анализа их клинико-генетических ассоциаций с критериями риска, эффективностью лечения ингибиторами тирозинкиназ и общей выживаемостью.
- 5. Проанализировать изменения уровеня экспрессии генов множественной лекарственной устойчивости (*ABCG2*, *hOCT1*) в лейкоцитах периферической крови больных хроническим миелолейкозом на терапии ингибиторами тирозинкиназ, клеточной линии К562 и группе контроля.

#### Научная новизна

Впервые анализ эпидемиологических данных ХМЛ среди населения Республики Башкортостан за последние 20 лет показал, что на фоне внедрения в практику современной диагностики и лечения ИТК, отмечается рост заболеваемости в 2 раза, распространенности в 5 раз, что существенно увеличивает контингент пациентов хронического миелолейкоза в Республике Башкортостан.

Впервые представлена полная клинико-гематологическая характеристика больных с XMЛ в Республике Башкортостан, значимых отличий по сравнению с

данными Российского многоцентрового популяционного исследования EUTOS не получено.

При изучении механизмов, приводящих к развитию резистентности при терапии ИТК ХМЛ нами показано, что у 32% пациентов с высокой экспрессией химерного гена на фоне лечения встречаются 4 наиболее характерные для больных Республики Башкортостан мутации в гене *BCR::ABL*.

Впервые на основании проведенного комплексного клинико-генетического исследования в группе больных с резистентным течением ХМЛ, среди всех изученных генов выявлена ассоциация только полиморфного локуса гена hOCT1(rs683369) с критериями риска, резистентностью к терапии ИТК и общей выживаемостью, что может быть использовано для оптимизации прогнозирования стратификации риска при ХМЛ.

Полученные данные по уровню экспрессии генов *hOCT1*, *ABCG2* в лейкоцитах периферической крови пациентов с ХМЛ на терапии ИТК, в отличии от контроля и клеточной линии К562, свидетельствуют об опосредованном участии генов переносчиков лекарственных препаратов в патогенезе и метаболизме таргетных препаратов.

#### Теоретическая и практическая значимость

Полученные результаты вносят вклад в расшифровку патогенеза хронического миелолейкоза, в частности, участия генов *hOCT1*, *ABCG2* в метаболизме ИТК при ХМЛ, а изучение клинико-генетических ассоциаций позволяет оптимизировать критерии прогноза, предрасположенности к развитию резистентности к терапии ИТК и определения персонифицированной тактики ведения.

В практическом отношении результаты эпидемиологического исследования позволяют оптимизировать планирование оказание медицинской помощи пациентам с ХМЛ, а полученные научные данные выделить полиморфные варианты гена hOCT1 (rs683369), в качестве предикторов

неблагоприятного прогноза течения и ответа на терапию, снижения выживаемости больных, что имеет значение для клинической практики.

Основные положения диссертационной работы могут послужить основой для последующих исследований по определению генетических факторов, влияющих на заболеваемость, характер течения и исходы ХМЛ.

#### Методология и методы диссертационного исследования

Методология исследования построена на результатах отечественных и зарубежных исследований ПО эпидемиологии, этиологии, диагностике и лечению больных с ХМЛ. Оценка степени разработанности и актуальности темы позволили сформулировать цель и задачи исследования, в соответствии с которыми разработан план, выбраны объект и комплекс В работе современных методов исследования. использовались эпидемиологические, клинические, инструментальные, лабораторные, в том числе генетические и статистические методы исследования.

#### Основные положения, выносимые на защиту:

- 1. Эпидемиологические исследования в Республике Башкортостан за период 2000-2020гг показали, что количество пациентов с хроническим миелолейкозом в регионе значительно увеличилось за счет повышения заболеваемости в 2 раза и роста распространенности в 5 раз после внедрения ИТК, что указывает на повышение эффективности диагностики и лечения за этот период. Показатели смертности от ХМЛ значимо не изменились.
- ХМЛ 2. Клинико-гематологическая характеристика больных В Республике Башкортостан Российского ПО сравнению данными многоцентрового популяционного исследования EUTOS не выявила существенных региональных особенностей заболевания.
- 3. У пациентов с резистентным течением ХМЛ в РБ, определялись следующие мутации гена *BCR::ABL*: T315I, M351T, M244V и H396R. Наличие часто встречаемых мутаций M351T и компаунд-мутации T315I+M351T у

пациентов с ХМЛ в РБ свидетельствовало о наиболее неблагоприятном прогнозе.

- 4. Наличие генотипа \*C\*G полиморфного варианта rs683369 гена hOCT1 ассоциировано с высоким критерием риска, прогрессированием заболевания и достоверным снижением общей выживаемости пациентов с ХМЛ на терапии ИТК. Генотип С\*С\* является не только благоприятным прогностическим признаком по ответу на лечение ИТК, выживаемость пациентов с ХМЛ, но и свидетельствует о наиболее низком риске развития неблагоприятного прогноза течения заболевания. Достоверных клинико-генетических ассоциаций с распределением частот аллелей и генотипов полиморфного локуса (rs776746) гена СҮРЗА5 не получено.
- 5. Выявленные изменения уровня экспрессии генов *hOCT1 и ABCG2* в лейкоцитах периферической крови пациентов с XMЛ получающих ИТК, в отличии от контроля и клеточной линии К562, свидетельствуют об опосредованном участии генов переносчиков лекарственных препаратов в метаболизме таргетных препаратов.

#### Степень достоверности

Достоверность результатов исследования основана на первичных теоретических позициях, носящих доказательную базу, на достаточном количестве пациентов в клинических группах, на наличии групп сравнения, использовании стандартизованных эпидемиологических, лабораторных методов и сертифицированных наборов реактивов, на использование современной программы статистической обработки полученных данных и отсутствии расхождения полученных результатов с ранее проводимыми и опубликованными исследованиями по данной теме.

#### Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации соответствуют шифру специальности 3.1.21 - «Гематология и переливание крови». Результаты работы соответствуют области исследования данной специальности, конкретно пунктам 2, 3 паспорта научной специальности.

#### Апробация работы

Основные положения диссертации доложены обсуждены на: Республиканской конференции молодых ученых РБ «Медицинская наука» (Уфа, 2011; 2012), ІІ Всероссийской школе-конференции молодых ученых УНЦ РАН и Волго-Уральского региона (Уфа, 2011), научной конференции «Актуальные вопросы онкогенетики» (Уфа, 2011), Международной конференции молодых ученых «Медицинская наука – 2012» (Уфа, 2012), на Всероссийской научнопрактической конференции «Совершенствование гематологической помощи населению РБ» в рамках Недели здравоохранения РБ (Уфа, 2016), на межрегиональной Научно-практической Конференции «Актуальные вопросы гематологии» (Уфа, 2017), 1X Всероссийском съезде Онкологов России (Уфа, 2017).

Апробация результатов исследования состоялась на заседании проблемной комиссии «Онкология» Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации 16.02.2021.

Работа выполнена В Федеральном государственном бюджетном учреждении образовательном образования «Башкирский высшего государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ректор, проф. В.Н. Павлов) на базе гематологического отделения ГУЗ Республиканская клиническая больница им Г.Г. Куватова (главный врач – Булатов Ш.Э., зав. гематологическим отделением – Латыпова А.А.) и отдела геномики Института биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН (профессор, д.м.н. Хуснутдинова Э.К.).

#### Внедрение результатов исследования в практику

Научные положения и практические рекомендации, изложенные диссертационной работе, внедрены в работу гематологических отделений ГБУЗ «Республиканская клиническая больница им Г. Г. Куватова», ГБУЗ «Городская клиническая больница №13». Полученные результаты используются программе тематического усовершенствованию врачей терапевтов, гематологов на кафедре терапии и общей врачебной практики с курсом гериатрии института профессионального дополнительного образования Федерального бюджетного образовательного государственного учреждения высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

#### Публикации

По теме диссертации опубликовано 20 научных работ, в том числе 9 статей в журналах, включенных в перечень рецензируемых изданий, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Министерства образования и науки Российской федерации для публикации основных результатов диссертации на соискание ученой степени кандидата медицинских наук, 1 статья в зарубежной печати.

#### Объем и структура диссертационной работы

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы (одна глава), материалов собственных исследований (три главы), обсуждения результатов, выводов и практических рекомендаций. Диссертация изложена на 143 страницах машинописного текста, содержит 18 таблиц, 17 рисунков. Список литературы включает 266 источников, их них отечественных - 96, зарубежных авторов - 170.

#### Личный вклад диссертанта в выполнение исследования

Автор принимал непосредственное участие на всех этапах исследования. Им разработан план, дизайн работы, подбор литературных данных по научной теме, набор материала, лечение и наблюдение за пациентами с ХМЛ, статистическая обработка и анализ полученных результатов. Генетическая часть исследования проводилась совместно с сотрудниками отдела геномики Института биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН. Написание глав диссертации выполнены лично автором, публикации по материалам работы подготовлены как лично, так и в соавторстве с долей личного участия диссертанта 90% в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки России.

#### ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.

## Современные аспекты эпидемиологии, этиопатогенеза, факторов риска, классификации, клиники, диагностики и лечения хронического миелолейкоза

#### 1.1 Определение, эпидемиология, патогенез хронического миелолейкоза

Хронический миелолейкоз — это клональное опухолевое заболевание, злокачественным перерождением плюрипотентной гемопоэтической клетки пролиферация и дифференцировка которой приводит к кроветворения, расширению ростков представленных преимущественно зрелыми и промежуточными формами миелоидных клеток [34, 79, 83]. ХМЛ наиболее встречающейся часто разновидностью является миелопролиферативного заболевания, на его долю приходися от 15 до 20% всех лейкозов, обязательным выявлением филадельфийской хромосомы транслокации t(9;22)(q34;q11) [55, 84, 134].

Эпидемиология. Эпидемиологических данных o заболеваемости, распространенности, группах и факторах риска развития ХМЛ в России до последнего времени было явно не достаточно и они имели разрозненный характер [6, 95, 96]. В экономически развитых странах опыт сбора эпидемиологических данных в рамках различных регистров был гораздо шире [98, 104]. В научной литературе исследователи часто ссылались на показатели Опухолевого статистического обзора 1975-2001г Национального института рака (CIIIA) Surveillance End Results Cancer Statistic Review (SEER CSR) 1975–2001, National Cancer Institute. Однако, внедрение современной дорогостоящей таргетной терапии ХМЛ в нашей стране превращает эпидемиологические исследования в России из чисто медицинской проблемы в медико-социальную [34]. Так как планирование комплекса лечебно-диагностических профилактических заболеванием мероприятий для пациентов cЭТИМ предполагает необходимость не только ведения регистра больных, но и

эпидемиологических, генетических исследований в каждом регионе [5, 86]. По данным мировой литературы регистрируемая заболеваемость ХМЛ составляет 1,0-1,5 на 100 000 населения и занимает 5 место среди гемобластозов [25]. Заболевание встречается у людей любого возраста и обоего пола, но редко у детей младше 10 лет [31, 155]. Пик заболеваемости приходится на возраст 30–50лет, около 30% составляют больные старше 60 лет [68]. Ценность эпидемиологических исследований возрастает, когда предоставляется возможность их сравнения. Стабильно высокие и сопоставимые с SEER CSR эпидемиологические показатели получены в Нижегородской области за 1980-2003гг, 2000-2010гг [95, 96]. Региональные колебания заболеваемости ХМЛ в 6 регионах России по данным популяционного исследования 2009-2012гг составили от 0,7 до 0,8 на 100 000 населения [25]. Аналогичные данные получены А.С. Лямкиной и соавт. [87] в Новосибирской области, О. В. Ефремовой и соавт. [24] в Алтайском крае. Крупнейший Российский регистр, охватывающий 91% населения, показал, что медиана возраста составляет 50 лет, доля больных ХМЛ репродуктивного возраста до 40 лет, составляет 29-30%, из них 39-54 % женщины, пик заболеваемости приходиться на 50-59 лет - это наиболее социально активная часть населения [33, 68].

В Республике Башкортостан неоднократно (1962-1971гг., 1990-1995гг., 1999-2008гг.) проводились эпидемиологические исследования гемобластозов, свидетельствующие об их росте [78, 88]. Так за 47-летний период показано преимущественное увеличение показателей для хронических лейкозов и 3a лимфом. данный период отмечен значительный рост показателя гемобластозов целом распространенности OT всех [5]. Изучение эпидемиологической ситуации, в частности ХМЛ, за последнее пятнадцатьдвадцать лет в республике позволит оценить и рационально планировать специализированную помощь этому контингенту больных в современных условиях, что имеет важное социально-экономическое значение.

Этиология. К возможным этиологическим факторам ХМЛ относят вирусы, неблагоприятную наследственность и приобретенную недостаточность

противоопухолевого иммунитета. Достоверно доказано увеличение частоты развития ХМЛ у лиц, подвергшихся ионизирующей радиации, установлена связь с воздействием бензола и иприта [34, 58, 80]. Высказывались предположения об участие факторов, вызывающих генетическую нестабильность [1, 83, 85].

Патогенез. XMЛ возникает в результате приобретенного повреждения хромосомного аппарата одной полипотентной стволовой клетки костного мозга, хотя точная причина этого пока остается неизвестной [1, 34, 159, 160] (NCCN, 2017).

Цитогенетические и молекулярные исследования при ХМЛ показали, что заболевание развивается в результате реципрокной транслокации t(9,22), (q 34;q11), объединяющей гены тирозинкиназы ABL1 (хромосома 9) с геном BCR (хромосома22), с образованием «филадельфийской хромосомы» (Pн +) [55, 103]. При этом BCR сообщает химерному гену промотор, а ABL1 является классическим протоонкогеном. Соответственно на 22 хромосоме образуется слитный ген BCR::ABL, кодирующий образование белка p210 BCR::ABL, являющегося тирозинкиназой с повышенной активностью. Ph-хромосома участвует в регуляции сигнальных путей, ответственных за клеточный рост, активацию, дифференцировку, адгезию и апоптоз клеток [1, 15, 17, 19, 34, 64, 247].

O изменений возможном влиянии В клетках предшественницах стромального микроокружения костного мозга в дебюте заболевания ХМЛ и в H.A. Петинати и соавт. [27]. Злокачественная ходе лечения пишут трансформация клетки и нарушение нормального ее функционирования происходит при появлении белка р210 тирозинкиназы в гемопоэтических предшественниках [159]. Эти клетки вытесняют нормальные стволовые клетки, а у больного развивается развернутая картина хронического миелолейкоза [222, 231]. Для хронического миелолейкоза характерен постепенно нарастающий лейкоцитоз с увеличением количества зрелых и не зрелых клеток миелоидного ряда периферической крови. Повышенное образование, гранулоцитов в костном мозге и в экстрамедуллярных очагах кроветворения,

преимущественно селезенке, печени и других органах, что является особенностью данного заболевания.

Клон клеток при ХМЛ генетически нестабилен. По мере прогрессирования заболевания и в фазу акселерации он эволюционирует в направлении уменьшения дифференцировки клеток и переходит в бластный криз, для которого характерен бластоз, рефрактерный к терапии и чаще всего неблагоприятный исход [11, 23].

Иногда при ХМЛ не удается выявить Ph-хромосому, но специальные методы исследования, как правило, позволяют установить наличие химерного гена *BCR::ABL* [92, 222, 231]. В соответствии с последними клиническими рекомендациями обязательным условием постановки диагноза ХМЛ является выявление Ph-хромосомы или гена *BCR::ABL* [34, 159]. Исследователями установлено также, что у больных ХМЛ одновременно могут сосуществовать Ph-позитивные и Ph-негативные, то есть нормальные стволовые клетки. С течением времени прогрессирующая нестабильность в Ph-позитивных клетках многократно усиливает их онкогенный потенциал и является пусковым фактором прогрессии ХМЛ [12, 17, 60, 68].

#### 1.2 Современная диагностика хронического миелолейкоза

Диагноз ХМЛ устанавливается на основании клиники (слабости, увеличение размеров печени и селезенки), данных лабораторных исследований (лейкоцитоза с выраженным сдвигом влево до молодых форм, эозинофильно-базофильной ассоциации, тромбоцитоза), а также обнаружения Рн-хромосомы и/или слитного гена *BCR::ABL* [39, 45, 60, 83]. Для этого проводят стандартное цитогенетическое исследование и/или более чувствительный метод FISH флюорисцентной гибридизации in situ, позволяющий обнаружить слитный ген BCR-ABL даже в тех случаях, когда стандартное цитогенетическое исследование показывает отрицательный результат [13]. Молекулярный анализ с использованием ПЦР обнаруживает не саму хромосому, а продукт функционирования аномального гена *BCR::ABL* - патологического белка, что очень важно для контроля минимальной

остаточной болезни [26, 45, 136]. О роли стандартного цитогенетического исследования и молекулярно-генетического анализа в подтверждении диагноза и для постоянного мониторирования эффективности проводимой терапии пишут Н.С. Лазорко и соавт [65]. Иммунофенотипирование или цитохимическое исследование не имеют принципиального значения и выполняются только в фазу бластного криза.

Классификация и клиническая картинаВ своем развитии ХМЛ проходит три фазы (ELN 16): хроническую (ХФ), фазу акселерации (ФА) и терминальную фазу бластной трансформации или бластный криз (БК) [33, 34, 159, 248].

Хроническая фаза ХМЛ диагностируется до 94% пациентов и может протекать бессимптомно, а заболевание чаще всего обнаруживается случайно, при изменениях в анализе крови. Характерен нейтрофильный лейкоцитоз со сдвигом до миелоцитов и даже промиелоцитов при нормальном самочувствии больного. Затем потливость, слабость, может появиться повышенная утомляемость, снижение массы тела, увеличение селезенки, иногда боли в костях. В костном мозге общая клеточность более  $350 \times 10^9 / \pi$ ; количество миелобластов и промиелоцитов более 8%; содержание клеток нейтрофильного ряда с учетом бластных форм превышает 85%; «эозинофильно-базофильная ассоциация» в аспирате костного мозга более 6,5%. При трепанобиопсии выявляется гиперплазия гемопоэтической ткани за счет клеток гранулоцитарного в сочетании с мегакариоцитарным ростками. Симптомы ранней хронической фазы ХМЛ не специфичны, поэтому диагноз обязательно подтверждается с помощью цитогенетических методов исследования. При этом отсутствуют признаки ФА и БК. Продолжительность этой фазы 5–8 лет.

В фазу акселерации появляются вторичные мутации в опухолевых клетках, что характеризуется развитием резистентности к проводимой терапии и появлением признаков прогрессии. По классификации ELN, в этой фазе бластных клеток в периферической крови или пунктате костного мозга обнаруживается от 15 до 29%; сумма бластов и промиелоцитов более 30%,

содержание базофилов в периферической крови не менее 20%; возможна персистирующая тромбоцитопения (менее  $100x10^9/\pi$ ), не связанная с терапией; обнаруживаются дополнительные хромосомные аномалии (ДХА); отмечается рост числа лейкоцитов и спленомегалия, не отвечающие на лечение. Средняя продолжительность фазы акселерации 6–8 месяцев [34, 195].

Бластный криз или терминальная стадия ХМЛ характеризуется увеличением количества бластных клеток в периферической крови или костном мозге более 30%, а также выявлением экстрамедуллярных бластных пролифератов, Присоединяются анемией, тромбоцитопенией, гранулоцитопенией. инфекционные осложнения, лихорадка, боли в костях, быстропрогрессирующее гепатоспленомегалия. БК истощение, ПО клинике И гематологическим показателям схож с острым лейкозом, преобладают признаки опухолевой прогрессии, рефрактерной к проводимой терапии. Продолжительность 3-6 месяцев.

ФА и БК относятся к продвинутым фазам заболевания. Медиана продолжительности жизни составляет от 6 до 12 месяцев [134, 162].

Развернутая клинико-гематологическая характеристика больных при диагностике XMЛ представлена в работе О. В. Лазаревой с соавт. [32], где проведен анализ российских данных в рамках международного популяционного исследования.

В ХФ ХМЛ до начала терапии определяют группы риска или критерии прогрессирования, которые рассчитываются на основании прогностически значимых характеристик: низкий, промежуточный и высокий. К неблагоприятным признакам относят: 1) возраст 60 лет и более в момент установления диагноза; 2) число бластных клеток в крови 3% и более или в костном мозге 5% и более; 3) число базофилов в крови — 7% и более или в костном мозге 3% и более; 4) число тромбоцитов 700х10<sup>9</sup>/л и более [229]. По критериям European Leukemia Net клональная эволюция исключена как признак прогрессии ХМЛ. Группы риска могут быть оценены по J.E. Sokal [237, 254], EURO, EUTOS [229, 234, 257]. Для стадирования и прогнозирования

течения XMЛ также используют модель Н. Kantarjan и соавт. [138]. Однако, признанной многие годы и не утратившей своего значения считается оценка по J.E. Sokal.

## 1.3 Современные принципы лечения хронического миелолейкоза и мониторинга

Широко используемые до начала 70-80-х годов в лечении больных ХМЛ препараты миелосан, а затем и гидроксимочевина (hydrea, hydroxyurea) позволяли уменьшить массу опухоли, несколько улучшить качество жизни, но не влияли на патогенез и общую выживаемость [14, 15, 17, 174].

Определенной вехой в терапии больных ХМЛ следует считать использование препаратов а-интерферона (ИНФ-а). Эта терапия ИНФ-а позволяла получить уже стойкую гематологическую и цитогенетическую ремиссию, увеличивала период до прогрессирования ХМЛ и 5-летнюю выживаемость больных [124]. Однако значимые побочные эффекты интерферонотерапии ухудшали качество жизни больных и часто требовали отмены. Частота получения ПГО, а тем более большого молекулярного ответа были низкими [80].

Эффективность ТГСК бесспорна, однако этот метод может быть выполнен только у 30% больных ХМЛ. Основной недостаток ТГСК высокая смертность (до 20%) в раннем посттрансплантационном периоде [221]. Выживаемость зависит от: возраста пациента, стадии заболевания, типа донора, времени, терапии до трансплантации и других факторов [10, 107, 163]. Наиболее благоприятный прогноз в хронической фазе ХМЛ при ТГСК наблюдался у лиц моложе 30 лет, в течение первого года после установления диагноза [97, 150, 208, 259].

Новой эпохой в терапии хронического миелоидного лейкоза стало появление ИТК в таргетной терапии ХМЛ. Она оказалась сопоставимой по эффективности с аллоТГСК, а по безопасности существенно превосходила ее [1, 34, 151]. Иматиниб (ИМ) является препаратом 1 линии для большинства больных с ХМЛ [84, 109, 207]. Он показал стабильные и хорошие ответы в достижении ПЦО и

БВП до поздних фаз ХМЛ [76, 123, 236]. А появление новых ИТК значимо решило вопрос первичной и вторичной резистентности на иматиниб и сместило алло ТГСК со второй линии терапии пациентов ХМЛ с хронической фазой [17, 135, 140, 153, 183, 205, 253, 257]. Н. Воwer и соавт. [204] пишут, что ожидаемая продолжительность жизни пациентов с хроническим миелоидным лейкозом на терапии ИТК приближается к продолжительности жизни населения в целом.

Механизм действия ИМ заключается в таргетном ингибировании BCR::ABL-тирозинкиназы, что блокирует процесс фосфорилирования и всю патогенетическую цепь событий, приводящих к пролиферации патологического клона.

Рандомизированное исследование IRIS (international randomized interferon vs STI 571), при сравнении эффективности ИМ и а-интерферона показало несомненные ИТК 95% преимущества 1линии. Было получено полных клиникогематологических ремиссий и 76% полных цитогенетических ремиссий при первичной терапии ИМ ранее не леченных больных. У 40% пациентов с ХМЛ в течение первого года лечения ИМ получено сокращение количества клетокносительниц Рh-хромосомы не менее чем в 1000 раз [182]. После 54 месяцев наблюдения выживаемость составила 90%, а у 93% больных не отмечено каких-либо признаков прогрессирования. Не наблюдалось и признаков гематологического или 84% больных [193, цитогенетического рецидива y 253]. Признаки прогрессирования не наблюдались у 40% в течение 3 лет даже у тех, кто начал лечение в фазе акселерации. У больных, начавших лечение при уже развившемся были получены худшие результаты: бластном без прогрессирования в течение 3 лет оставались только 7% больных [138]. В динамике, если у больных при лечении ИМ, большой молекулярный ответ сохраняется в течение 18 месяцев, в 100% случаев не отмечается перехода заболевания в стадию акселерации или бластного криза на протяжении 72 месяцев наблюдения [153, 182, 187].

Десятилетняя выживаемость, по обновленным данным исследования IRIS, в группе иматиниба составила 83,3% [76, 123]. При достижении

оптимального ответа на терапию продолжительность жизни больных XMЛ в XФ сопоставима с общепопуляционной [30, 204].

Конечно, по эффективности и частоте трансформации ХМЛ в ФА и БК ИТК 2 покаления имеют преимущества по сравнению с ИМ. Клинические исследования DASISION, ENACT и ENESTnd показали, что нилотиниб и дазатиниб превосходят иматиниб по глубине МО и скорости достижения ответа на терапию [1, 116, 153, 163, 187]. Все это стало основанием для рекомендации этих препаратов в первую линию терапии ХМЛ [204, 245]. Однако, по ряду причин, в том числе финансовых, использование нилотиниба и дазатиниба в реальной клинической практике России до последнего времени было ограничено. А анализ долгосрочных результатов выживаемости без прогрессии и общей выживаемости при использовании ИТК 2 покаления в первой линии не показал существенного преимущества перед иматинибом [93, 135, 205].

ИМ у больных ХМЛ в ХФ назначается в начальной дозе 400 мг в день в виде однократного приема во время еды на ночь. В фазу акселерации и бластного криза доза ИМ может быть увеличена до 600–800 мг/сут. Для получения оптимального терапевтического эффекта препарат необходимо назначать в дозах, способствующих максимальному подавлению активности ВСR::ABL-тирозинкиназы или достаточных для индукции апоптоза ВСR::ABL-позитивных клеток [124, 160, 243, 257].

Однако, по мере наблюдения за пациентами появилась проблема резистентности к терапии ИТК. Результаты международных исследований, выявили у 16% больных первичную резистентность к иматинибу, а в продвинутых фазах ХМЛ она оказалась значительно выше — до 30%. Развитие бластного криза ХМЛ, представляющего переход в поликлоновую стадию, требует пересмотра терапии ИТК и назначения химиотерапии [123, 171, 214, 245].

Данные литературы свидетельствуют, что существуют различные причины резистентности к ИМ. Это могут быть мутации киназного домена гена

*ВСR::АВL*, обнаружение дополнительных хромосомных аберраций (ДХА), что ассоциировано с высокой прогрессией заболевания и меньшей выживаемостью больных [1, 6, 23,39, 53, 76, 83, 85]. Даже у пациентов с низкой группой риска оптимальный ответ может быть не достигнут в связи с плохой переносимостью, низкой приверженностью к лечению [30, 37]. Снижение дозы и перерывы в терапии, особенно в первые годы применения препарата, снижали эффективность лечения [44, 49, 62, 67, 90].

Увеличение дозы ИМ с целью преодоления резистентности, не всегда приводило к желаемому результату, и, чаще всего, усиливало признаки токсичности. Наиболее часто встречающимися побочными эффектами ИМ являются миелосупрессия: нейтропения, тромбоцитопения, анемия и другие негематологические осложнения: тошнота, отеки, утомляемость, гепатотоксичность, кожная сыпь, мышечные судороги, боли в костях и артралгии, диарея. Обычно, в терапевтических дозах, указанные нежелательные проявления легко контролируются [60, 77].

Таким образом, причиной «неудачи терапии» при лечении ИТК1 могут быть разные факторы, и они должны быть определены в каждом конкретном случае. По последним рекомендациям Международных профессиональных сообществ, в т. ч. Национальной всеобщей онкологической сети США и Европейской сети по изучению лейкозов дана оценка результатов лечения ИТК через 3, 6, 12 месяцев и показания к своевременной смене лечения при «неудаче терапии». При отсутствии ПЦО через 6–12 месяцев лечения (IS менее 1%) требуется переключение на другие ИТК (NCCN, ELN 2019).

Наиболее часто развитие резистентности связывают с появлением мутаций в разных участках гена *BCR::ABL*, что ведет к изменению ее пространственной конфигурации в результате чего становится невозможной связь лекарственного препарата с тирозиновым карманом и блокирование захвата АТФ *BCR::ABL*-тирозинкиназой [266]. В литературе описано около 90 различных мутаций [145, 190, 233]. Среди этих мутаций встречаются определяющие снижение чувствительности или полную резистентность к

терапии любыми ингибиторами тирозинкиназ. Наиболее значимой является ТЗ15I [125, 145, 190, 194]. Рассматривается возможность рискадаптированной терапии пациентов ХМЛ с мутацией ТЗ151 [9].

Препараты 2 покаления ИТК: нилотиниб (Novartis Pharmaceuticals) и дазатиниб (Bristol-Myers Squibb), большинстве случаев преодолевают резистентность к терапии иматинибом [22, 169, 177, 180, 252]. Они подавляют рост клеток, содержащих большинство известных мутации, кроме одной - Т315I [167, 190, 226, 227, 232]. Эти препараты снижают активность клеток - носительниц мутантных форм BCR::ABL-тирозинкиназы и позволяют снова получить полные гематологические ремиссии у 77-91%, а полные цитогенетические - у 41-53% больных резистентных к ИМ [205, 219, 224]. Между иматинибом, нилотинибом и дазатинибом, несмотря на схожесть механизмов действия, наличия перекрестной токсичности не выявлено, но при их назначении необходимо учитывать развитие соответствующих осложнений [50, 70, 85, 227, 251].

В настоящее время алло ТГСК рекомендуется только при определении Т3151 и некоторых других мутаций, при неудаче терапии в ФА/БК, а также при неудаче лечения препаратами 2 и 3 поколения ИТК [47, 108, 217]. Для терапии резистентных к ИТК 1 и 2 при терапии ХМЛ разработаны и используются бозутиниб и ИТК 3 покаления — понатиниб [3, 49, 117, 167, 226, 227]. Опыт применения этих препаратов в регионах России еще очень мал, так как ИТК 3 применялись в основном в рамках клинического исследования.

Некоторые исследования показывают, что даже при длительной цитогенетической ремиссии сохраняются стволовые клетки с *BCR::ABL* транслокацией и при прекращении ингибирующего действия препаратов они могут быть источником рецидива заболевания [129, 212]. По данным ряда зарубежных авторов Т.Р. Hughes et al. [181], А. Hochhaus et al. [123], F.X. Mahon et al. [212], S. Sauscel et al. [150], G.M. Austin et al. [110], В. Spiess [148], у больных ХМЛ с длительным стабильным МО при четком молекулярном мониторировании возможна безопасная остановка терапии ИТК.

В обновленных рекомендациях NCCN 2019г предложено тщательное наблюдение больных с длительным глубоким МО без терапии, что свидетельствует о возможном излечении пациентов, положительном медикосоциальном и экономическом эффектах.

Стоп терапия в клинической практике России только набирает обороты, наблюдение за такими пациентами проводится в основном в рамках клинических исследований [34, 54, 58, 63, 71, 82].

Таким образом, основной целью лечения больных с ХМЛ является увеличение пациентов с максимальным подавлением опухолевого клона и стабильным глубоким молекулярным ответом. Наиболее часто назначаемым, доступным, безопасным с долгосрочной доказанной эффективностью препаратом является иматиниб. В настоящее время в России терапия ИТК проводиться непрерывно и длительно, что позволяет большинству больных в течение 10 и более лет вести образ жизни здорового человека. Возможность достижения стойкой ремиссии без лечения позволяет перейти от пожизненного лечения к отмене терапии. В случае же появления значимых нежелательных явлений, или развития резистентности показана смена на другие более эффективные ИТК. Следовательно, наиболее приоритетными задачами терапии ХМЛ являются персонифицированная терапия пациентов, требующая исследований направленных на изучение различных вариантов резистентности для определения прогноза и индивидуализированного лечения ИТК. До сих пор многие вопросы, касающиеся эффективности лечения и резистентности к ИТК, требуют изучения, что определяет важность продолжения проспективных клинико-генетических исследований.

#### 1.3.1 Молекулярный мониторинг хронического миелолейкоза

В последние годы иматиниб остается наиболее оптимальным препаратом по доступности, эффективности и безопасности, особенно в группе низкого и промежуточного риска, старших возрастных группах и наличии

сопутствующих заболеваний при ХФ ХМЛ. Однако, при этом ожидать получения оптимального ответа можно лишь при длительной терапии ИТК 1 линии [34, 123, 160, 236, 257].

Основной задачей и конечной целью терапии пациентов с XMЛ является максимальное подавление лейкозного клона, получение длительного глубокого МО и снижение риска прогрессирования заболевания [34].

Для этого проводится регулярный мониторинг лечения, включающий гематологические, цитогенетические и молекулярно-генетические показатели [45, 58, 159, 195]. При достижении полного цитогенетического ответа рекомендуется дальнейший мониторинг проводить с помощью молекулярных методов, а оценка уровня МО может служить предиктором безрецидивной выживаемости пациентов с ХМЛ [85, 160, 236, 256].

Чувствительность метода количественной ПЦР в реальном времени высока и позволяет обнаружить минимальную остаточную болезнь (МОБ) при уровне лейкозных клеток ниже уровня чувствительности цитогенетического исследования [40, 65, 175, 196].

Молекулярный мониторинг пациентов ХМЛ на 1 линии терапии ИТК методом ПЦР, отражает динамику соотношения нормальных и лейкозных клеток, может определять уровень экспрессии *BCR::ABL*-транскрипта до начала терапии и затем каждые 3 мес. [46, 94]. Ранее считалось, что любая положительная динамика соотношения *BCR::ABL*/ABL является ответом, однако по клиническим рекомендациям последнего пересмотра оптимальным являются большой и глубокий ответы [33, 76].

Для оценки эффективности лечения ХМЛ используют рекомендации европейской группы по изучению лейкозов European Leukemia Net (2013, 2016) и национальные клинические рекомендации (2017, 2020). Эффективность лечения рассматривается как оптимальный ответ, предупреждение и неудача доказательности A). Оптимальный ответ свидетельствует (уровень благоприятном прогнозе и не требует смены лечения. Предупреждение предполагает более агрессивное течение заболевания, тщательный

мониторинг, оценку приверженности к лечению, анализ мутаций *BCR::ABL*, возможное повышение дозы или готовность к смене препарата. Неудача указывает на резистентность к лечению, неблагоприятный прогноз на данной терапии, потерю ремиссии, появление новых мутаций или ДХА в Рн+ клетках при проведении терапии ИТК, показания к переходу на другую линию терапии [129, 256, 265].

Ранее о благоприятном прогнозе для пациента судили по оптимальному ответу на лечение ИТК 1 линии в следующие сроки: ПГО через 3 месяца, ПЦО – через 6 месяцев и БМО – через 12 месяцев, а также, при достижении ПМО в 18 мес. Чем раньше достигнут БМО, тем лучше прогноз. Если же к 3 месяцу регистрируется лишь МЦО, к 6 месяцу – ЧЦО и только к 12 месяцу – ПЦО, это предупреждение. Неудача констатируется при отсутствии ПГО и минимального ЦО (Ph+> 65%) к 3 месяцу, малого ЦО (Ph+> 35%) к 6 месяцу и менее ПЦО (Ph+> 0%) к 12 месяцам. В последующем может быть потеря ПГО, ПЦО, БМО, мутации ВСЯ::АВЬ, ДХА. "Оптимальный ответ" указывает на продолжение терапии, "неудача" – на смену терапии и "предупреждение" – на более тщательный мониторинг и готовность к смене терапии (ESMO, 2012).

Считается, что РМО связан с клиническим исходом у пациентов с ХМЛ, получавших ингибиторы тирозинкиназы. В разных исследовательских группах: ELN, NCCN, [126, 129] рекомендуются различные сроки оценки раннего молекулярного ответа (РМО). По данным NCCN уже через 3 месяца лечения при отсутствии РМО и неудачи терапии возможно переключение на другие ИТК. J. Ylescas-Soria и соавт. [238] показали, что прогностические факторы при ХМЛ могут различаться в зависимости от этнического или географического контекста. В России при отсутствии общедоступной системы молекулярного мониторинга и высокой стоимости ИТК 2 выполнение этих рекомендаций довольно сложно [34, 76]. Тем более, что проспективных исследований по оценке эффективности раннего переключения больных с ХМЛ на ИТК 2 не проводилось. Есть лишь отдельные работы, позволяющие оценить результаты последних рекомендаций [261, 263]. G.M. Austin и соавт.

[110] показали, что РМО был связан с клиническим исходом у пациентов с XMЛ, получавших ингибиторы тирозинкиназы.

Е. Cayssials с соавт. [122] считают, что в настоящее время молекулярная оценка ответа представляет собой рутинный мониторинг пациентов с ХМЛ. Тем не менее, они предлагают проводить также и цитогенетический анализ с мазком костного мозга. В случаях цитопении с признаками дисплазии с -7 ССА / Рh- клеток на фоне лечения, их следует рассматривать как сигнал к переходу на альтернативное лечение. Оптимальный ответ подразумевает благоприятный прогноз и ожидаемую безрецидивную выживаемость больных в течение 7–8 и более лет.

Неудача терапии, потеря МО или повышение уровня экспрессии BCR::ABL-транскрипта на фоне терапии иматинибом чаще всего указывает на развитие резистентности, причиной которой может быть наличие мутаций в гене BCR::ABL [41, 180, 211, 218].

По данным Soverini S. et al. [133, 190] у больных ХМЛ в дебюте заболевания частота выявляемости клинически значимых мутаций составляет 3-5%, при неудаче терапии в ХФ до 16-20% и в ФА и БК до 30-40%. Мутации, обусловливающие низкую чувствительность к ИТК: при выявлении *F317L/V*, *T315A*, *V299L* предпочтительнее терапия нилотинибом, при *Y253H*, *E255K/V*, *F359V/C* терапия дазатинибом. Отсутствие эффекта терапии всеми ИТК отмечается при наличии мутации *T3151* [190, 224]. При непереносимости и не эффективности ИТК во второй и последующих линиях может быть использован Бозутиниб. При применении препарата 3 линии терапии Понатиниба возможно получение цитогенетических и молекулярных ремиссий у больных с мутацией *T3151* [227]. Следовательно, раннее выявление мутаций при недостаточном МО или его потере, позволит индивидуализировать терапию и вовремя подобрать препарат, преодолевающий резистентность к лечению.

# 1.4 Вопросы резистентности больных хронического миелолейкоза при лечении ингибиторами тирозинкиназ

По данным различных исследователей, несмотря на успехи в лечении ИТК больных ХМЛ, примерно 16-30% приобретают резистентность к ИМ [239, 240]. Устойчивость к ИТК может быть обусловлена многими факторами и их взаимодействием: это и конкретный препарат ИТК, его фармакодинамика, длительность и глубина полученного ответа, мутации *BCR::ABL* киназного домена, ДХА, генетические изменения и др. [239, 240].

Маhon F.X. et al. [247] впервые показали, что между амплификацией и мутациями в гене *BCR::ABL* имеется определенная связь и сейчас это наиболее изученный механизм появления устойчивости к лечению [57, 89].

По данным Hochhaus A. et al. [214] частота мутаций при резистентности к ИМ в гене BCR::ABL колеблется от 40% до 90% у больных, а также зависит от критериев определения резистентности, методов обнаружения мутаций и фазы течения ХМЛ. Клетки экспрессирующие высокое количество транскриптов BCR::ABL при XMЛ, являются менее чувствительными к ИМ и чаще подвержены образованию мутаций в гене ВСР::АВL, чем клетки с меньшим уровнем экспрессии ВСЯ::АВЬ [94]. А. О. Абдуллаев [73] показал, что на ингибиторами тирозинкиназ терапию влияют сочетание транслокации BCR::ABL1 и мутации JAK2 V617F у больных хроническим миелолейкозом. Наиболее часто при резистентности к иматинибу встречается мутация T315I, при которой наблюдается замена треонина в положении 315 на изолейцин, которая ослабляет связывание ИТК не только первого, но и второго поколения (дасатиниб, нилотиниб и босутиниб), приводит к полной нечувствительности к этим препаратам и может быть преодолена лишь препаратами 3 поколения (понатиниб) [3, 103, 137, 167, 227, 263]. Учитывая различную эффективность препаратов в зависимости от типов мутаций, необходимо выявлять и определять характер молекулярного дефекта в гене BCR::ABL при назначении терапии WTK[89, 239, 240].

Активность иматиниба и ИТК второго поколения при наиболее частых мутациях, обнаруживаемых у больных ХМЛ в гене *BCR::ABL* представлена в таблице 1.4.1.

Таблица 1.4.1 – Зависимость наличия частых мутаций, обнаруживаемых у больных XMЛ в гене *BCR::ABL* с чувствительностью к ИТК первого и второго поколения

		Иматиниб ( <b>nM</b> )	Нилотин (nM)	Дасатиниб (nM)
	BCR-ABL1	260	13	0.8
Р-петля АТФ-связы- вающий сайт	M244V	2000	38	1.3
	G250E	1350	48	1.8
	Q252H	1325	70	3.4
	Y253H	>6400	450	1.3
	Y253F	3475	125	1.4
	E255K	5200	200	5.6
	E255V	>6400	430	11
	V299L	540	нет данных	18
	F311L	480	23	1.3
	T315I	>6400	>2000	>200
	T315A	971	61	125
	F317L	1050	50	7.4
	F317V	350	нет данных	53
Каталитический домен А-петля	M351T	880	15	1.1
	E355G	2300	нет данных	1.8
	F359V	1825	175	2.2
	V379I	1630	51	0.8
	L387M	1000	49	2
	H396R	1750	41	1.3
	H396P	850	41	0.6
	Высокая чувствительность	Промежуточная чувствительность		Высокая нечувствительность

Концентрации IC50 (50% inhibitor concentration) указаны в нмоль/мл.

Несмотря на большое разнообразие мутаций, найденных в BCR::ABL, большинство мутаций редки. Однако, мутации, включающие остатки Gly250, Tyr253, Glu255, Thr315, Met351, u Phe359, составляют 60–70% всех мутаций [133].

Устойчивость к иматинибу, возникающая благодаря дополнительным мутациям, а их обнаружено более 100, является наиболее общим механизмом резистентности [72, 214, 239].

Исследования в молекулярной генетике, проведенные в последние годы, позволили серьезно продвинуться в понимании механизмов устойчивости на лечение ИТК у многих больных ХМЛ. Тем не менее, механизмы резистентности к иматинибу, их влияние на клинику и течение заболевания далеко не полностью понятны, и требуют продолжения активного изучения этих механизмов. Кроме того, особого внимания требует и изучение *BCR::ABL* независимого механизма устойчивости, связанного с фармакокинетикой, фармакодинамикой. внутриклеточным усвоением ИМ и иными механизмами.

Другим вариантом такой устойчивости может быть низкая комплаентность и приверженность пациентов к лечению, что очень часто наблюдалось в период начала лечения ИТК 1 линии, связанных с вынужденными перерывами в поставках препарата, развитием тех или иных нежелательных явлений [37, 75]. М. Lauseker и соавт. [149] указывают, что, даже в высокоразвитой стране Федеративная республика Германия (Бавария) значительное число пациентов с ХМЛ, не получают адекватного лечения, тогда как молекулярный мониторинг можно считать удовлетворительным. У больных на терапии ИМ может наблюдаться значительная вариабельность количества этого препарата в плазме крови. Доза иматиниба 400 мг в день не у всех больных гарантирует его доставку в клетки-мишени в эффективных концентрациях, что может быть причиной субоптимального ответа или отсутствия ответа на терапию иматинибом, а минимально необходимой для достижения ответа на терапию иматинибом признана концентрация не менее 1000 нг/мл [262].

По данным результатов рандомизированного исследования ХМЛ IVфазы, глубокий молекулярный ответ достигается у большинства пациентов, принимающих иматиниб, прогнозирует длительную выживаемость и достигается быстрее при использовании иматиниба в высоких дозах [144].

Уровень иматиниба в плазме может также зависеть от различной активности CYP3A5/A5, поскольку метаболизм Иматиниба в значительной мере осуществляется с помощью изофермента *P3A4* (*CYP3A5*) и *P3A5* (*CYP3A5*)

цитохрома р450 или концентрации лекарственных препаратов, которые могут ингибировать или индуцировать данные ферменты [230, 262].

Скрининг однонуклеотидных полиморфизмов (*SNP*) в генах кандидатах, участвующих в транспорте, а следовательно, и биодоступности ИМ (оттокприток) является распространенным подходом для расшифровки его роли на фармакокинетику ИМ. В регуляции абсорбции, распределения и экскреции многих лекарств участвуют и транспортные белки [213].

Патологические клетки при ХМЛ могут иметь врожденную резистентность к терапии, обусловленную экспрессией некоторых белков, участвующих в оттоке лекарственных препаратов. Ключевые детерминанты внутриклеточной концентрации лекарственных препаратов, включая иматиниб и ИТК второго поколения- это белки с множественной лекарственной устойчивостью (МRP – Multiple drug resistance protein), белки переносчики из семейства АВС (АВС-аdenosine triphosphate-binding cassette): АВСВ1 (Р гликопротеин -это трансмембранный белок, *MDR1*), *ABCC1 и ABCC3 или ABCG2 (BCRP*) — белок резистентности при раке молочной железы, активно регулируют движение молекул через клеточную мембрану [170, 213].

Некоторые авторы сообщают, что сам химерный белок BCR::ABL может регулировать экспрессию белка ABCG2 и способствовать резистентности к иматинибу, а генотип ABCG1 не ассоциируется с ответом на лечение ИТК [102, 128].

Важную роль в фармакогенетике ИТК играют переносчики органических катионов *hOCT1* (*hOCT1*-human organic cation transporter), которые могут регулировать активный транспорт иматиниба (в клетки и из клеток). А полиморфные варианты этих белков переносчиков могут изменить способность проникновения иматиниба в клетки. Однако, в литературе встречаются разрозненные данные о связи *hOCT1* с ответом на лечение ИМ у больных ХМЛ [128, 178]. Есть сведения об ассоциации полиморфных вариантов генов: \*G\*G полиморфного варианта 34G> A (*V12M*, *rs2231137*) и \*C\*C полиморфного варианта 421C>A (Q141K, rs2231142) гена *ABCG2*, с эффективностью лечения

ХМЛ ингибиторами тирозинкиназ [128]. Генотип \*G\*G (480C> G (F160L), rs683369) в гене hOCT1 в прогрессирующей стадии ХМЛ коррелировал с высокой вероятностью появления резистентности к терапии [128]. А полиморфизм hOCT1 C480G не имел ассоциации с ИМ.

Под действием ИТК, из-за их различной чувствтительности к лечению, дифференцированные клетки ХМЛ быстро элиминируются, а латентные стволовые клетки ХМЛ нет и это ведет к сохранению остаточной болезни [152, 200, 235].

Клональная эволюция — это состояние генетической нестабильности, которая часто связана с прогрессированием ХМЛ и появлением дополнительных цитогенетических аббераций [53, 120]. У 25%-30% больных в ФА и БК выявляются мутации гена онкосупрессора р53, локализованного на 17р [120, 240]. Инактивация р53 существенно снижает ответ к иматинибу in vitro и in vivo, что также ведет к резистентности ХМЛ [210, 239]. М.А.Столяр и соавт. [18] изучали влияние уровня экспрессии генов WT1 и HMGA2 при хронических миелопролиферативных заболеваниях, а В. А. Овсепян и соавт. [48] исследовали роль полиморфизмов генов глутатион-S-трансфераз M1 (GSTM1) и T1 (GSTT1) в развитии и прогрессировании хронического миелолейкоза, а также ответа на терапию иматинибом.

Таким образом, литературные данные о роли генов участвующих в патогенетических механизмах развития и прогрессии ХМЛ с образованием резистентного к лечению фенотипа немногочисленны, разнообразны неоднозначны. Необходим поиск механизмов ответственных за индивидуальную вариабельность к ответу на лечение ИМ у пациентов с ХМЛ. Следовательно, изучение клинико-генетических ассоциаций при хроническом миелолейкозе является позволит получить дополнительные актуальным И данные ХМЛ, молекулярно-генетических механизмах патогенеза вопросах прогнозирования, преодолении резистентности, разработке более эффективной персонифицированной терапии этого контингента больны

#### ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

#### 2.1 Материал исследования: Общая характеристика больных

Осуществлено сплошное (только больные ХМЛ), динамическое (мониторинг), комбинированное (сочетание данных, полученных ретроспективно и при проспективном наблюдении), полевое (больные при приеме препарата находились в условиях обычной жизни), неконтролируемое, экспериментальное эпидемиологическое и клиническое исследование с оценкой фактической эффективности терапии иматинибом. Информационной основой исследования послужили результаты собственных клинических наблюдений за больными, данные которых включались в регистр больных ХМЛ Республики Башкортостан и единый регистр Российской Федерации, созданный для обеспечения эффективной работы по профилактике и лечению ХМЛ в России, насчитывающий более 8 тысяч пациентов [6, 68].

Набор материала и исследования проводились в период с 2005 по 2018 годы на базе гематологических отделений ГБУЗ «Республиканская клиническая больница им. Г.Г. Куватова» (главный врач – Ш.Э. Булатов) и ГБУЗ «Городская клиническая больницы №13» г. Уфы (главный врач – Б.Н. Гарифуллин) и генетики человека Учреждения Российской лаборатории молекулярной академии наук Института биохимии и генетики Уфимского научного центра **PAH** PAH, профессор Э.К. (директор, акалемик Хуснутдинова). Эпидемиологические данные получены на основе обработки данных регистра, статистических показателей Медицинского информационно аналитического центра и организационно методического отдела Республиканского клинического онкологического диспансера (главный врач – А. А. Измайлов).

Настоящее исследование выполнено в соответствии со стандартами надлежащей клинической практики (Good Clinical Practise) и принципами Хельсинской декларации. Протокол исследования одобрен локальным этическим

комитетом ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России. У всех пациентов ХМЛ, принявших участие в исследовании, получено информированное согласие.

Критерии включения в общую группу:

- 1. Наличие XMЛ, подтвержденное цитогенетическим и/или молекулярным анализом и выявленной филадельфийской хромосомой.
  - 2. Возраст пациентов старше 15 лет.
  - 3. Текущая терапия пациентов ХМЛ.
  - 4. Подписанное информированное согласие.

Критерии невключения общие:

- 1. Отсутствие филадельфийской хромосомы при постановке диагноза.
- 2. Наличие клинически значимой сопутствующей патологии (другие онкологические заболевания, тяжелые хронические заболевания внутренних органов в стадии обострения, психические расстройства).
  - 3. Состояние после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток.

Критерии невключения в дополнительные группы:

- 1. Недостаточная комплаентность и перерывы в лечении ИТК
- 2. Не адекватно назначенные дозы ИТК
- 3. Отказ пациента и невозможность проведения мониторинга

Обследование больных включало в себя сбор жалоб, анамнеза, объективный осмотр, проведение стандартных для ХМЛ лабораторных и инструментальных методов исследования.

классификацией Оценка критериев риска на низкий (HP),c промежуточный (ПР) и высокий (ВР) проведена по J.Sokal, Euro score ГНЦ. В настоящее время критерии риска чаще рассчитываются по ELTS (модель разработана в 2016г) для прогнозирования достижения молекулярных и цитогенетических ответов и выживаемости, однако модель Sokal не потеряла публикациях по своей значимости. В оценке отдаленных результатов выживаемости при ХМЛ, в основном, также учитывается эта прогностическая модель [32, 34].

В работе проведен анализ эпидемиологических показателей пациентов с диагнозом хронический миелолейкоз за период 2000-2020гг, установленным на основании клиники и цитогенетического исследования преимущественно в ХФ (95–98%). Диагноз был верифицирован на первых этапах с 2008г в молекулярногенетической лаборатории Областной клинической больницы г. Екатеринбурга, обслуживающей Республику Башкортостан, а в дальнейшем в лаборатории «Гентехнология» в г. Москва с 2012.

Большинство пациентов с ХФ ХМЛ в РБ после внедрения ИТК1 получают 1линию терапии: иматиниб в дозе 400, 600 или реже 800 мг/сутки, по показаниям, согласно рекомендациям Европейского общества по лечению лейкозов в течение не менее 6 месяцев (Вассагапі М. с соавт., 2006, ELN 2009,2013, 2016). При прогрессировании заболевания, потере ответа и развитии резистентности к лечению больные переводятся на 2, 3 линию ИТК.

В настоящее время средняя продолжительность времени от постановки клинического диагноза до лабораторного подтверждения диагноза ХМЛ проходит 5-10 дней. А на период перевода пациентов на лечение ИТК 1 она составляла 6 месяцев (от 0,5 до 60 месяцев). Поэтому на момент начала терапии ИТК1 линии до 94,0% больных имели предлеченность. До ИМ 75,5% (n=225) получали терапию только гидроксикарбомидом, медиана длительности лечения этим препаратом составила 7 месяцев (от 1 до 18 месяцев). 5,4% пациентов ХМЛ получили лечение гидроксикарбамидом, (n=16) c бусульфаном. Медиана длительности терапии этих больных составила 37,5 месяцев (от 1 до 108 месяцев). У 11,1% пациентов с XMЛ (n=33) лечение гидроксикарбомидом сочеталось с терапией интерфероном-а, а медиана продолжительности лечения составила 13,5 месяцев (от 3 до 76 месяцев). И только в 2% случаях 6 пациентов получили предшествующую ИТК1 терапию интерфероном-α и малыми дозами цитозара. Медиана длительности терапии – 54 месяца (от 7 до 108 месяцев). Предлеченность пациентов до начала терапии ИТК1 линии представлена на рис. 2. 1

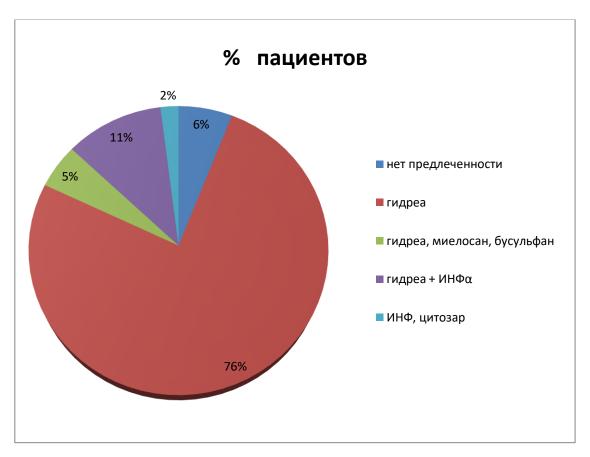


Рисунок 2.1 - Предлеченность пациентов с хроническим миелолейкозом до начала терапии Иматинибом.

Следовательно, до назначения терапии Иматинибом основная масса (94%) анализируемых пациентов, имела высокий процент предлеченности. Так, 75,5% из них получали гидроксикарбамид в монотерапии, еще 18,5% в комбинации с интерфероном или другими препаратами и только 20 пациентов (6%) начали терапию с ИМ.

Поскольку в работе использовано различное количество анализируемых пациентов, включенных в разные группы с учетом дополнительных критериев включения и исключения, их характеристика будет представлена ниже. Этапы, объем и методы исследований представлены в таблице 2.2.1.

Таблица 2.2.1- Дизайн: этапы, объем и методы исследований

Этапы	Материал	Методы исследования			
	исследования				
Эпидемиологические	Ретроспективный	Стандартные описательно-			
исследования:	анализ больных	оценочные (дескриптивные)			
распространенность,	ХМЛ за период	методы.			
заболеваемость и	2000-2020 гг в РБ				
смертность					
Слинико-гематологическая	184 больных ХМЛ	Сбор анамнеза, общеклинические,			
характеристика больных	РБ,	гематологические, лабораторные и			
в РБ и сравнение с группой	197 больных в	инструментальные методы			
больных ХМЛ в	Российском	исследования (в соответствии со			
Российском исследовании	исследовании	стандартами по диагностике и			
EUTOS	EUTOS	лечению больных ХМЛ).			
Изучение	114 больных ХМЛ	Стандартное цитогенетическое			
цитогенетического,		исследование или FISH, метод ПЦР			
молекулярного и		в режиме реального времени, метод			
мутационного статуса		секвенирования кДНК гена			
		<i>BCR::ABL</i> типа p210			
Анализ полиморфных	14 пациентов ХМЛ	Анализ полиморфных локусов			
локусов генов СҮРЗА5,		генов осуществляли методом			
hOCT1, ABCG2 и их		ПЦР синтеза ДНК и			
клинико-генетические		ПДРФ анализа			
ассоциации					
Группы были сопоставимы по полу и возрасту					

#### 2.2 Методы исследования

# 2.2.1 Эпидемиологические, клинические, лабораторные и инструментальные методы исследования

Анализ эпидемиологических показателей ХМЛ в РБ осуществлен по результатам клинико-эпидемиологического мониторинга за период 2000–2020 гг. с использованием стандартных описательно-оценочных (дескриптивных) методов. Использовались ретроспективные данные ПО изучению эпидемиологических показателей ХМЛ. Сбор эпидемиологических данных осуществлялся путем выкопировки сведений из республиканского регистра онкологических больных, федерального больных регистра онкогематологическими заболеваниями, медицинских документов: журнал учета приема больных и отказа от госпитализации (форма 001/у); медицинская карта 003/y);стационарного больного (история болезни медицинская амбулаторного больного (форма 025/у); журнал регистрации амбулаторных больных (форма 074/у); протоколы патологоанатомических вскрытий (форма 013/у); извещение о больном с впервые в жизни установленным диагнозом злокачественного образования (форма № 090/у); выписка из медицинской карты стационарного больного злокачественным новообразованием (форма № 027.1/у). В Государственном комитете Республики Башкортостан по статистике были получены сведения о численности популяции населения.

Изучены заболеваемость, распространенность ХМЛ и смертность с оценкой многолетней динамики показателей и тенденций в целом по республике. Уровень кумулятивной заболеваемости определяли как частоту новых случаев ХМЛ среди восприимчивого населения, возникших за исследуемый период (1год), рассчитанный на 100 000 восприимчивого населения. Восприимчивым считали взрослое население — лиц старше 15 лет. Моментную распространенность рассчитывали, как отношение всех случаев заболевания среди взрослого населения на определенный момент времени

(конец года) к численности взрослого населения, умноженное на 100 000. Кумулятивную смертность определяли как частоту случаев смерти больных ХМЛ в изучаемый отрезок времени (1 год), рассчитанную на 100 000 восприимчивого населения.

Показатель заболеваемости рассчитывали по формуле:  $Y = n * 10^5 / N \times T$ , где n - число впервые в жизни зарегистрированных случаев заболевания; N - средняя численность популяции за время наблюдения; T - время наблюдения (в годах). При расчете показателя распространенности учитывались все случаи заболевания, зарегистрированные в данном году независимо от времени их возникновения и первичного диагностирования.

Расчет показателя смертности, выводили по этой же формуле, но п соответствовало числу случаев смерти от этого заболевания в данном году. Показатели заболеваемости, распространенности и смертности рассчитывали на 100 тыс. населения в год.

Проведено изучение заболеваемости, распространенности и смертности больных XMЛ всех возрастов на всей территории Республики Башкортостан за период 2000–2020 годы.

Клиническое обследование больных ХМЛ выполнялось по общепринятой методике со сбором жалоб, анамнеза заболевания, жизни и оценкой объективного статуса. Исследование общего анализа крови проводили с помощью гематологического анализатора «Sysmex» (Япония) морфологическим анализом лейкограммы, изучение миелограммы - для оценки Биохимические костномозгового кроветворения. исследования исследование общего белка плазмы крови, глюкозы, общего холестерина, активности ферментов АЛТ, АСТ. Проводились рентгенография органов грудной клетки, ЭКГ, УЗИ органов брюшной полости.

Для подтверждения диагноза XMЛ пациентам проводилось цитогенетическое исследование костного мозга с определением филадельфийской хромосомы. При постановке диагноза и в процессе мониторинга терапии XMЛ проводили количественную оценку экспрессии

химерного гена *BCR::ABL* типа p210 молекулярно-генетическим методом ПЦР в режиме реального времени. Фазы заболевания устанавливалась на основании критериев ELN (2013,2016).

#### 2.2.2 Цитогенетические и молекулярно-генетические методы исследования

#### 2.2.2.1 Цитогенетическое исследование клеток костного мозга

Для диагностики и мониторинга эффективности терапии пациентов с ХМЛ миелограммы проводили стандартное изучение И цитогенетическое исследование клеток костного мозга. В целом проведено 1190 анализов для 298 пациентов. В диагностики И мониторинга каждом случае ХМЛ анализировалось не менее 20 метафазных пластинок клеток костного мозга. Результаты исследований представлены в соответствии с Международной цитогенетической номенклатурой (Shaffer L.G. et al., 2009).

Культивирование клеток костного мозга в объеме 1 мл с гепарином лития проводили в среде, содержащей 7 мл RPMI 1640 («Sigma») и 2 мл телячьей эмбриональной сыворотки («Sigma») с добавлением колцемида за 2 часа до конца реакции. Культивирование осуществлялось в термостате в течение 2 и 24 часов при температуре 37°С, после чего полученную клеточную суспензию раскапывали на предметные стекла и окрашивали GTG дифференциальным методом. Кариотипирование проводили с помощью микроскопа Аксиоплан-2-мот («Carl Zeiss») и программного обеспечения *ikaros* («Metasystems»).

#### 2.2.2.2 Молекулярно-цитогенетическое исследование клеток костного мозга

При отсутствии метафазных пластинок при стандартном цитогенетическом исследовании клеток костного мозга дополнительно проводили флуоресцентную in situ гибридизацию хромосом (FISH) с ДНК зондом к слитному гену *BCR- ABL*. FISH анализ проводили согласно протоколу производителя на цитогенетических препаратах, содержащих как метафазные хромосомы, так и интерфазные ядра. В каждом случае ХМЛ анализировалось не менее 200 интерфазных ядер клеток

костного мозга. Использовался двухцветный ДНК зонд 22q11.2 LSI *BCR* SpectruGreen / 9q34 LSI *ABL* SpectrumOrange dual fusion DNA probe (Vysis, Abbott).

Препараты изучались с помощью флуоресцентного микроскопа «Axioplan-2-mot» с фильтром DAPI/Orange/Green (Vysis, Abbott). Результаты FISH исследований приведены также в соответствии с Международной цитогенетической номенклатурой (Shaffer L.G. et al., 2009).

# 2.2.2.3 Молекулярно-генетическое исследование методом полимеразной цепной реакции в реальном времени

С целью количественной оценки экспрессии химерного гена *BCR::ABL* типа р210 на этапе постановки диагноза и в процессе мониторинга терапии ХМЛ проводили молекулярно-генетические исследования методом ПЦР в режиме реального времени. Забор периферической крови осуществляли в объеме не менее 5 мл в вакуумные пробирки («Vacuette») с ЭДТА. Для проведения ПЦР в РНК, постановки реальном времени выделения реакции обратной И транскрипции использовали наборы реагентов ОНКОСКРИН 1-1-Q (ООО «ГеноТехнология»), разработанные c учетом рекомендаций протокола стандартизации «Европейской программы против рака» (Chomczynski P., 1987) [45, 136, 255].

Определение интенсивности экспрессии химерного онкогена *BCR::ABL* контрольного гена АВС проводили согласно протоколу типа р210 и Относительную BCR::ABL производителя. экспрессию химерного определяли как отношение среднего числа копий гена BCR::ABL к среднему числу копий гена ABL, умноженное на  $10^6$ , как отношение среднего числа копий гена BCR::ABL к среднему числу копий гена ABL, умноженной на 100%. Согласно рекомендациям ELN, обнаружение гена BCR::ABL более чем в 1% клеток, свидетельствует о выраженной экспрессии BCR::ABL, оценить которую можно с помощью стандартного цитогенетического исследования. Экспрессия гена ВСР::АВС в 0,1-1% клеток характерна для умеренного уровня экспрессии,

который уже невозможно оценить с помощью СЦИ. Экспрессия гена BCR::ABL на уровне менее 0,1% свидетельствует о достижении большого молекулярного ответа.

Таблица 3.3.1 - Критериальная оценка ответа на лечение больных ХМЛ

Ответ на терапию	Критерии ответа
Полный	Тромбоциты менее 450 x 10 <sup>9</sup> /л
Гематологический	Лейкоциты менее $10 \times 10^9$ /л
ответ (ПГО)	Отсутствие в ОАК миелоцитов, промиелоцитов,
	миелобластов, менее 5% базофилов в крови
	Селезенка не пальпируется
Цитогенетический ответ:	Ph+ 0%. Филадельфийская хромосома в клетках
полный (ПЦО)	не выявляется
частичный (ЧЦО)	Ph+ 1-35%. Филадельфийская хромосома
	выявляется не более чем в 35% клеток
малый	Ph+ 36-65%. Филадельфийская хромосома
	Выявляется в 36-65% клеток
минимальный	Ph+ 66-95%. Филадельфийская хромосома
	выявляется в 66-95% клеток
нет ответа	Ph+ более 95%. Филадельфийская хромосома
	выявляется более чем в 95% клеток
Молекулярный ответ:	MO 3,0. Снижение <i>BCR::ABL</i> /abl менее 0,1 %
большой (БМО)	и более 0,01% по международной шкале (IS)
Глубокий (ГМО)	MO 4,0. Снижение $BCR$ :: $ABL$ /abl менее ≤ 0,01 % и
	более 0,00032% по международной шкале (IS)
	или неопределяемый уровень <i>BCR::ABL</i> при abl
	более 1 × 10*4 (10 000)
	МО 4,5. Снижение <i>BCR::ABL</i> /abl менее 0,00032% и
	более 0,001% по международной шкале (IS)
	или неопределяемый уровень <i>BCR::ABL</i> при abl
	более 3,2× 10*4 (32 000) МО 5 0. Сунуулуул РСР: 4 PL/obl маугаа 0 001 %
	MO 5,0. Снижение <i>BCR::ABL</i> /abl менее 0,001 % по международной шкале (IS) или
	неопределяемый уровень <i>BCR::ABL</i> при abl
	более 1 × 10*5 (100 000)
	` ´

Для оценки данных по изменению уровня экспрессии BCR::ABL в процессе лечения была также использована логарифмическая шкала измерений в виде десятичного логарифма снижения ( $\Delta \log$ ) относительной экспрессии гена BCR::ABL по отношению к базовому уровню, рассчитанному как медиана экспрессии гена BCR::ABL у больных с ХМЛ до начала терапии иматинибом. Снижение экспрессии на 1  $\log$  означало снижение уровня BCR::ABL транскрипта в 10 раз, на 2  $\log$  – в 100 раз, на 3  $\log$  – в 1000 раз, на 4  $\log$  – в 10000 раз.

В таблице 3.3.2 представлены варианты ответа в зависимости от степени подавления опухолевого клона: оптимальный ответ, предупреждение и неудача лечения.

Таблица 3.3.2 - Варианты ответа на терапию Иматинибом в хронической фазе ХМЛ в зависимости от длительности лечения

Срок терапии	Оптимальный ответ	Предупреждение	Неудача терапии
3 мес.	ПГО	Ph+36-95% (МЦО)	Нет ПГО
	Ph+ ≤ 35 % (ЧЦО)	$BCR::ABL \ge 10 \%$	Факторы риска
	<i>BCR::ABL</i> < 10 %-		неудачи:
			Ph+> 95% (менее
			МЦО)
бмес.	Ph+ 0%(ПЦО)	Ph+1-35 % (ЧЦО)	Ph+> 35% (менее
	<i>BCR::ABL</i> ≤1%	BCR::ABL	ЧЦО) и <i>ВСК::АВL</i>
		1-10 %	≥ 10 %
12мес	Ph+ 0% (ПЦО)	Ph+ 0% (ПЦО)	Ph+>0%
	<i>BCR::ABL</i> ≤0,1%	BCR::ABL	(менее ПЦО)
	(БМО)	0,1-1,0 %	<i>BCR::ABL</i> ≥1 %
В любое	<i>BCR::ABL</i> ≤0,1%	ДХА в клетках	Потеря ПГО,
последующее	(БМО)	Ph-(-7 или 7q-)	ПЦО, БМО***
время			Мутации <i>BCR::ABL</i>
			ДХА в клетках Ph+

ДХА- дополнительные хромосомные аномалии; МЦО- малый цитогенетический ответ; ЧЦО- частичный цитогенетический ответ.

\*При выполнении только молекулярного анализа рекомендуется повторное исследование в течение 1–2 мес. для подтверждения результата.

\*\*Подтвержденная потеря БМО (уровень BCR::ABL>0,1 % в двух и более последовательных анализах, в одном из некоторых BCR::ABL>1 %).

#### 2.2.2.4 Определение мутационного анализа гена *BCR::ABL*

Анализ мутаций гена *BCR::ABL* выполнялся у пациентов XMЛ, резистентных иматинибу, помощью определения нуклеотидной методом кДНК BCR::ABL. последовательности секвенирования гена соответствии с рекомендациями Branford S. et al. [114] амплификацию интересующего фрагмента гена BCR::ABL производили в два этапа

Реакцию секвенирования полученного фрагмента гена *ABL* проводили согласно протоколу производителя с помощью набора GenomeLab<sup>TM</sup>Methods Development Kit Dye Terminator Cycle Sequencing ("Beckman Coulter", США). С помощью автоматического анализатора CEQ8000 ("Beckman Coulter", США) проводили анализ нуклеотидной последовательности (Таблица 2.2).

Таблица 2.2 - Праймеры, последовательность, позиция и длина ампликона для

	ПЦР		
Название праймера	Последовательность, 5 ' - 3 '	Позиция	Длина ампликона
F - B C R - A	GAG CAG CAG AAG AAG TGT TTC AGA	B C R (3075-3098)	А* [1475 п.о. (b3a2) или 1401 п.о. (b2a2)]
R - A B L - A	CTC TAG CAG CTC ATA CAC CTG GG	A B L (1484-1506)	
F - A B L - B	CAT CAT TCA ACG TGT GCC GAC GG	A B L (148-110)	В (393 п.о.)
R - A B L - B	GTT GCA CTC CCT CAG GTA GTC	A B L (1120-1140)	
F - A B L - C	GAA GAA ATA CAG CCT GAC GGT G	A B L (930-951)	
R - A B L - C	CGT CGG ACT TGA TGG AGA A	A B L (1393-1411)	С (482 п.о.)

\* Длина ампликона после первого этапа ПЦР варьирует в зависимости от типа транскрипта гена *BCR::ABL* (b3a2 или b2a2)

## **2.2.2.5** Определение полиморфных вариантов в генах *hOCT1*, *ABCG2* и *CYP3A5*

Методом ПЦР синтеза ДНК и полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ) осуществляли анализ полиморфных ДНК-локусов генов *hOCT1*, *ABCG2* и *CYP3A5* с последующим электрофорезом в 7-8% полиакриламидном геле, окраской в растворе бромистого этидия (конечная концентрация 0,1 мкг/мл) и визуализацией в проходящем УФ-свете при длине волны 312 нм.

Для амплификации использовали реакционную смесь объёмом 25 мкл, которая содержала 2,5 мкл 10хТаq-буфера (67 мМ трис-HCl (рН 8,8), 16,6 мМ (NH4)2 SO4,, 2,5мМ MgCl2, 0,01% Tween-20), 0,1 мкг геномной ДНК, смесь dNTP (dATP, dCTP, dTTP по 200 мкМ каждого), 1 ед. ДНК-полимеразы Termus aquaticus (производства фирмы «Силекс», г. Москва) и 5-10 пМ локусспецифичных олигонуклеотидных праймеров. После амплификации 10 мкл амплификата обрабатывали 5 единицами соответствующей рестриктазы, согласно рекомендациям производителя. Данные о полиморфных вариантах и названия рестриктаз представлены в таблице 2.3.

Таблица 2.3 - Использованные при ПДРФ анализе полиморфные варианты генов и названия рестриктаз

Название гена	Полиморфный вариант	Рестриктаза
hOCT1	rs683369	PdmI(Fermentas)
CYP3A5	rs776746	SspI(Fermentas)
ABCG2	rs2231137	BmuI(SibEnzyme)

#### Статистическая обработка данных

Статистическая обработка полученных данных проводились на персональном компьютере типа IBM PC/AT с использованием стандартной программы «Microsoft Office Excel» и пакета прикладных программ статистической программы «Statistica 6.0 for Windows», SAS v.9.3.

Расчеты по обработке численных результатов экспериментов в медицине выполнены по рекомендациям О. Ю. Ребровой (2002).

Использовался метод вариационной статистики с определением средней величины М и средней ошибки т. Достоверность различий оценивалась с помощью критерия Стьюдента (t). Различие между сравниваемыми показателями считалось статистически значимым при р <0,05. Для выяснения зависимости применялся корреляционный Пирсона показателями анализ между определением достоверности. Равенство дисперсий распределений признаков проверяли при помощи критерия Левена, в противном случае использовали Uкритерий Манна-Уитни. Для оценки динамики показателей заболеваемости, распространенности и смертности использованы показатели динамического ряда, регрессионный анализ с вычислением коэффициента корреляции. Анализ таблиц сопряженности двух качественных признаков 2х2 рассчитывали с использованием критерия  $\chi^2$  с поправкой Йэйтса на непрерывность, силу ассоциаций оценивали в значениях показателя соотношения шансов Odds Ratio (OR) (Schlesselman J. et al., 1982). Соответствие наблюдаемого распределения значений количественных показателей нормальному закону распределения критерия Шапиро-Уилка. Для оценивали использованием оценки продолжительности жизни в зависимости от генотипа полиморфных локусов генов *CYP3A5 и hOCT1* был проведен анализ выживаемости методом Каплана— Мейера. Статистическая обработка данных осуществлялась с использованием программы GraphPad Prism 3.0, GraphPad Software.

# ГЛАВА З ЭПИДЕМИОЛОГИЯ И КЛИНИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ МИЕЛОЛЕЙКОЗОМ В РЕСПУБЛИКЕ БАШКОРТОСТАН

## 3.1 Анализ эпидемиологических показателей хронического миелолейкоза в Республике Башкортостан

В связи с достижениями последних десятилетий диагностика и лечение популяция больных ХМЛ не остается неизменной. Изменяется структура первичной диагностики, ответ на лечение, эпидемиологические данные. С ростом выживаемости увеличивается и популяция больных ХМЛ.

Зарегистрированная первичная заболеваемость ХМЛ в РБ в 2020г. составила 0,66 на 100 000 всего населения и 0,83 на 100 000 взрослого населения. Средний показатель в РБ за последние 5 лет составил 0,48± 0,08 на 100 000 населения (по данным ВОЗ-0,7). Динамика заболеваемости за двадцатилетний период представлена на рисунке. 3.1.



Рисунок 3.1 - Первичная заболеваемость XMЛ по РБ за период 2000–2020 гг. (на 100 000 населения).

Средний пятилетний показатель первичной заболеваемости за последние 15 лет значимо не изменился (p>0.05) и составил  $0.57\pm0.12$  (в 2005-2010гг.),  $0,67\pm0,10$  (в 2010-2015гг.),  $0,48\pm0,11$  (в 2015-2020гг.). Однако, за период 2000 и 2005гг. он был гораздо ниже и составлял  $0.28\pm0.22$ . Если рассматривать период с 2000 до 2008гг, до внедрения в терапию ИТК (Государственная регистрация иматиниба в России -2006г) и систематического определения филадельфийской хромосомы, отмечается неравномерное распределение показателей заболеваемости по годам от 0,1 до 0,6 на 100 000 населения, средний показатель за восьмилетний период составил 0,36±0,12 на 100 000 населения. Вероятнее всего, это связано с недостаточным вниманием, выявляемостью и регистрацией данной категории больных до начала современной диагностики и назначения ИТК 1 линии и ведения регистра больных ХМЛ.

В течение последующих 8 лет (2009-2016гг.), на фоне лечения ИМ, уровень заболеваемости колебался от 0,44 до 0,80 на 100 000 населения, а средний показатель повысился практически в два раза до 0,65±0,09 на 100 000 населения (p<0,05). Эти данные свидетельствуют о лучшей выявляемости и регистрации больных за последующие 8 лет, связанные с совершенствованием и внедрением регулярных цитогенетических и молекулярных методов диагностики в регионах. При анализе диаграммы заболеваемости больных ХМЛ в РБ обращает на себя внимание, что с 2008 по 2012гг. идет стабильный рост заболеваемости с 0,6 до 0,8 на 100 000 населения, а с 2012г. до 2019г. отмечается снижение с 0,8 до 0,4 и резкий подъем в 2020г. до 0,66 на 100 000 населения. Именно с 2012г. в РБ начинается период внедрения дженериков иматиниба в РБ (Государственная регистрация первого дженерика в России – 2010г.) и одновременное регулярного нарушение системы мониторирования диагностики Рн-хромосомы в закрепленных лабораториях, поддерживаемых фирмой производителем оригинального препарата иматиниба – Гливека. А рост этого показателя в 2020г. мы связываем с началом работы Республиканского медико-генетического центра в г. Уфа, который на постоянной и регулярной

основе позволяет проводить современную диагностику и мониторинг лечения пациентов с XMЛ в PБ.

Анализ показателя распространенности хроническим миелолейкозом по РБ за период 2000–2020 гг. четко указывает на значимое увеличение этого показателя (в 5 раз) с 2008г., а именно, с момента повсеместного внедрения таргетного лечения на основе выявления филадельфийской хромосомы (Рисунок 3.2).

Показатель смертности хроническим миелолейкозом по РБ за 2000-2020гг. колебался в разные года от 0,17 до 0,39 на 100 000 населения (Рис 3. 3). Однако, средне-пятилетний показатель смертности за 20 лет оставался относительно стабильным, и разница была статистически незначимой (р>0,05).

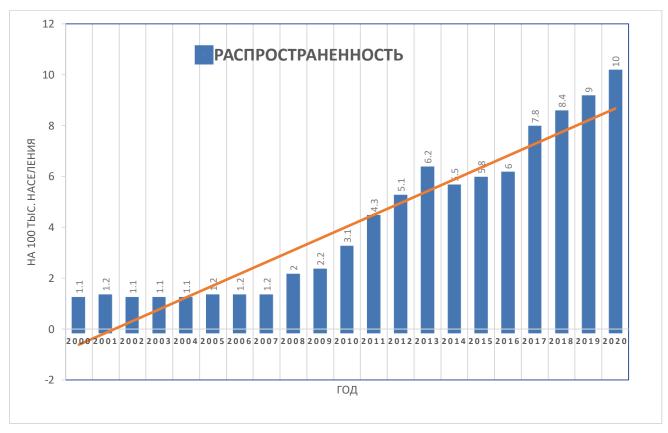


Рисунок 3.2 - Распространенность хронического миелолейкоза в РБ за период 2000–2020 гг. (на 100 000 населения).

Основной причиной летального исхода была прогрессия ХМЛ, в среднем 15-20% летальности было обусловлено другими причинами: ИБС, инфаркт миокарда, острое нарушение мозгового кровообращения, развитие вторичных

опухолей и др. Так, за все пятилетние периоды с 2001г. средний показатель смертности составил соответственно 0,25±0,04, 0,30±0,10, 0,37±0,04 и 0,29±0,04 на 100 000 населения. Эти данные свидетельствуют о том, что показатель смертности значимо не зависел в РБ от внедрения современных методов диагностики и лечения больных с ХМЛ.

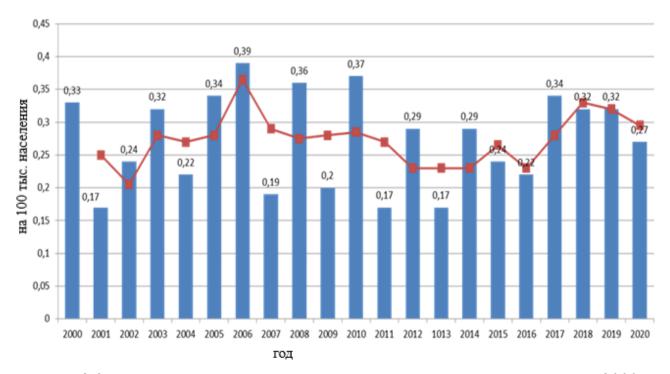


Рисунок 3.3 - Смертность от хронического миелолейкоза по РБ за период 2000-2020гг. (на 100 000 населения).

Анализ эпидемиологических данных за период 2000-2020гг. показал, что в республике Башкортостан заболеваемость имеет тенденцию распростараненность значимо (в 5 раз) выросла за последние 12 лет, что совершенно четко связано с возможностью выявления Рh-хромосомы и/или гена BCR::ABL, созданием и ведением регистра пациентов с XMЛ с 2008г., внедрением терапии ИТК и, как следствие, увеличением продолжительности Следовательно, организация лечебно-диагностических жизни пациентов. мероприятий в соответствии с новыми достижениями медицины отражается на эпидемиологических данных территории. Показатели смертности имеют лишь тенденцию к снижению за исследуемый период времени. Данные

результаты свидетельствуют о том, что существует группа пациентов резистентных к терапии ИТК и прогрессия заболевания даже на фоне терапии ИТК приводит к их гибели. Следовательно, полученные данные свидетельствуют об актуальности дальнейших исследований по изучению ХМЛ, а поиск причин неудачи лечения и преодоления резистентности терапии ИТК остается актуальной проблемой рутинной практики.

#### 3.2 Клиническая характеристика больных хроническим миелолейкозом

В исследовании проанализированы клинико-лабораторные данные пациентов ХМЛ в РБ на этапе постановки диагноза в зависимости от стадии заболевания и проведена оценка критериев риска. С целью выявления региональных особенностей ХМЛ в РБ полученные данные сравнивались с результатами Российской части международного многоцентрового проспективного популяционного исследования EUTOS (2017) и общепринятыми критериями по рекомендациям European Leukemia Net (2016).

Углубленное клиническое обследование проведено 184 пациентам с ХМЛ, из них по гендерному признаку они распределились следующим образом: 96 мужчин (52,2%) и 88 женщин (47,8%). Соотношение мужчин и женщин 1,1:1 (Рисунок 3.2.1).

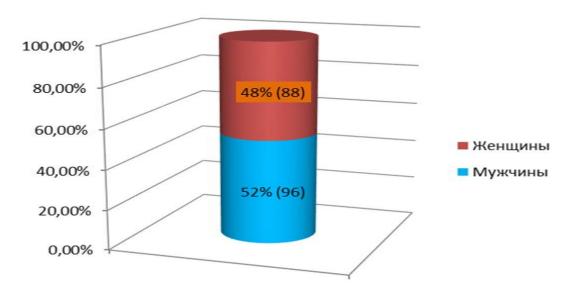


Рисунок 3.2.1 - Соотношение пациентов ХМЛ по гендерному признаку.

Медиана возраста пациентов с ХМЛ составила 54,6 лет (от 15 до 82 лет) (Рисунок 3.2.2). В возрастной группе 50–60 лет отмечалось наибольшее количество зарегистрированных случаев ХМЛ и снижение их после 60 лет. Эти данные согласуются с показателями российского регистра, однако по данным мировой статистики, этот показатель растет в старших возрастных группах.

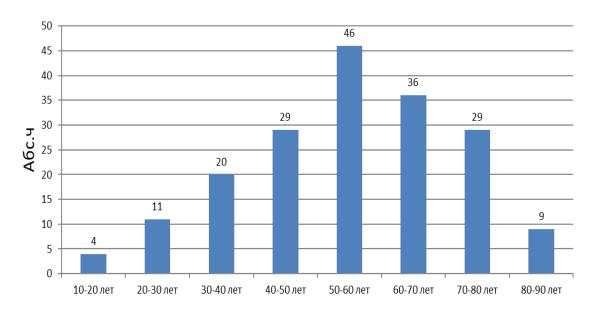


Рисунок 3.2.2 - Структура больных хроническим миелолейкозом в республике Башкортостан по возрасту (абс.ч).

Республика Башкортостан многонациональный регион. Распределение больных по этнической принадлежности также было разнообразным: наибольшую долю составили татары — 99 (54%) и русские —54 (29%). Доля башкир составила 12% (22 пациента), чувашей 4% (8), таджиков 1% (2).

Анализ занятости пациентов показал, что до болезни 85 (46%) были служащими, 55 (30%) рабочими, 16 (9%) учащимися, 20 (11%) были военнослужащими, предпринимателями и 8 домохозяйками (4%). Высшее и среднее образование имели 97 (53%) пациентов.

Заболевания крови у родственников встречались у 11% пациентов. В основном это были проявления анемии, у одного дядя лечился от полицитемии, у второго был родственник с острым лейкозом. На наличие профессиональной

вредности указывали 81 (44%) больных. С учетом того, что РБ является регионом с развитой нефтехимической промышленностью, на наличие связи с нефтехимическим производством отмечали 30% пациентов, 7% указывали на радиацию, 4% были связаны с вибрацией, с газосваркой – 3%.

По мнению заболевших, возникновение заболевания связано с такими причинами как, стресс (42%), экологическое неблагополучие (23%), воздействие радиации (7%), предшествующее введение вакцин и сывороток (4%). Выяснилось, что 27%, преимущественно мужчины, имели вредные привычки (курили и умеренно потребляли алкоголь). Большинство 126 пациентов имели семьи (68,5%). Из них 79 (63%) уже имели детей, из них двух детей -55 (44%), одного -14 (11%) и трех детей -10 (8%). Заболевание крови и кроветворных органов среди них не обнаружено.

Большинство респондентов имели II Rh (+) группу крови -35%, III Rh (+) -27%, I Rh (+) -23%, IV Rh (+) и II Rh (-) - по 7,5% в равной степени.

Хроническая фаза наблюдалась у 177 (96,2%) больных, фаза акселерации у 6 (3,3%), бластный криз у 1 (0,5%) больного (Рисунок 3.2.3). Продолжительность заболевания до начала лечения ИТК1 линией в среднем составила 63,4 мес.

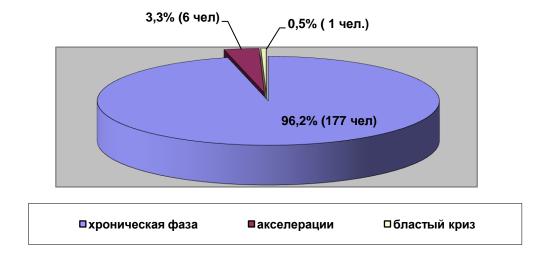


Рисунок 3.2.3 - Распределение пациентов ХМЛ по фазам.

Общая характеристика больных ХМЛ в РБ представлена в таблице 3.2.1.

Таблица 3.2.1. Характеристика пациентов с XMЛ в республике Башкортостан на момент постановки диагноза

Bcero n (%)	184 (100%)
Мужчин п (%)	96 (52,2%)
Женщин n (%)	88 (47,8%)
Соотношение М/Ж	1,1/1,0
Город/село п (%)	56% / 44%
Возраст Ме лет (от - до)	54,6 (15-82)
Этическая принадлежность: n (%)	
Русские	53 (28,8%)
Татары	99 (53,8%)
Башкиры	22 (11,9%)
Чуваши	8 (4,4%)
Таджики	2 (1,1%)
Профессиональные вредности п (%)	81 (44,0%)
Вредные привычки (курение ) n (%)	49 (27%)
Семейный статус: женат/замужем	126 (69%)
Образование ( высшее и среднее) п (%)	97 (53%)
Фазы n (%) : ХФ	177 (96,2%)
ФА	6 (3,3%)
БК	1 (0,5%)
Сплено- и гепатомегалия п (%)	76,1% и 16,3%
Факторы риска по J.Sokal / Euro n (%)	
Низкий	63 (34,0%) /120 (65,0%)
Промежуточный	81 (44,0%) / 51 (28,0%)
Высокий	40 (22,0%) / 13 (7,0%)

Подобные данные были получены и опубликованы в 2017 году О. В. Лазаревой и соавт. [32] по результатам российской части международного многоцентрового проспективного популяционного исследования EUTOS (Population-based CML Study), где на момент диагностики у 197 пациентов с ХМЛ ХФ зарегистрирована у 184 (94%), ФА у 12 (6%) и БК у 1 (1%) человек. Медиана их возраста составила 50 лет (18–82), соотношение мужчин и женщин 1:1. Доля пациентов старше 70 лет была всего 13%.

При установлении диагноза, в нашем исследовании, практически 100% пациентов указывали на наличие слабости в той или иной степени. Хотя по данным Российских авторов у 78 (40%) больных жалоб не было, а на слабость указывали лишь 92 (77%) из 119 обследованных. По-видимому, данный симптом не является специфическим критерием оценки состояния больного и имеет больше субъективный характер. Что касается других жалоб, они представлены в сравнении с Российскими данными на рисунке 3.2.4.

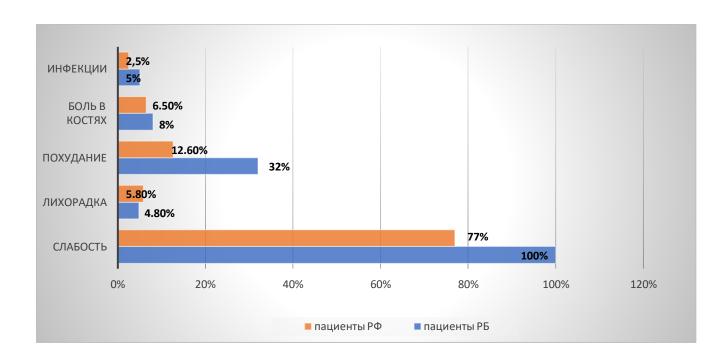


Рисунок 3.2.4 - Жалобы пациентов с хроническим миелолейкозом в Республике Башкортостан (n-184) и российской части международного популяционного исследования EUTOS (n-119).

Наличие большего процента зарегистрированных жалоб по сравнению с Российскими данными в нашем исследовании: слабость, похудание более чем в два раза, боли в костях, частые инфекции, скорее свидетельствует о более позднем от начала заболевания первичном обращении пациентов к врачу.

При объективном осмотре размеры печени и селезенки определялись в сантиметрах из-под края реберной дуги (не увеличена-0 см, увеличена - от 1 до 40 см). В республике Башкортостан у больных ХМЛ гепатоспленомегалия выявлялась чуть чаще, чем по России, хотя в целом эти показатели оказались сопоставимыми (р>0,05): медиана по размерам селезенки составила 1 см, а по печени-0 см. Так, в первой группе селезенка не пальпировалась у 75 (41%), а во второй у 86 (44%) пациентов с ХМЛ. Спленомегалия более чем на 1 сантиметр из под края реберной дуги пальпировалась у 109 (59%) пациентов республики, а в исследовании EUTOS у 111 (56%). Увеличение печени не зарегистрировано в первой группе у 121 (66%), а по данным России-118 (59%) больных. Гепатомегалия отмечалась у 81 пациента в обеих группах, что составило 44% и 41% соответственно. В продвинутых фазах заболевания закономерно гепатоспленомегалия была более выраженной: по размерам селезенки медиана +10, печени +4 сантиметра.

Статус ECOG на момент диагноза отражен в таблице 3.2.1.

Таблица 3.2.1 - Характеристика степени активности пациентов с XMЛ по шкале ECOG/WHO

Степень активности по школе ECOG/WHO	Число	Число
	пациентов в РБ	пациентов
	(%)	EUTOS (%)
пациентов	184 (100%)	197 (100%)
0- без симптомная	68 (37%)	79 (40%)
-Не значительные симптомы, ближе к нормальному	94 (51%)	92 (47%)
состоянию		
2-с симптомами заболевания, но проводит 50%	15 (8%)	14(7%)
времени в сутки в постели		
3-с симптомами заболевания, но проводит >50%	5 (3%)	6 (3%)

времени в сутки в постели		
4-постельный режим (прикован к кровати)	2 (1%)	6 (3%)

Также, как и в Российском исследовании (87%) EUTOS у 88 % больных РБ отмечена не высокая степень активности (ECOG 0–1 балл).

При осмотре пациентов на момент диагностики о наличии в анамнезе сопутствующих заболеваний в республике указали 74 пациента (40%), что соответствует показателям российского исследования - 37%. Однако, в структуре сопутствующих заболеваний по данным зарубежных и российских исследователей превалировала артериальная гипертензия у 48% из 73 больных (Таблица 3.2.2).

Таблица 3.2.2 - Сопутствующие заболевания у пациентов с XMЛ в Республике Башкортостан и российской части популяционного исследования EUTOS

Исследования	Российское	Республика
	(EUTOS ELN)	Башкортостан
Пациентов всего	n-197	n-184
показатель	n (%)	n (%)
Наличие сопутствующих	73 (37%)	74 (40%)
заболеваний		
Артериальная гипертензия	35 (48%)	23 (31%)
СС заболевания	14 (19%)	12 (16,2%)
Хр. заболевания печени	3 (4%)	4 (5,4%)
Хр. заболевания почек	3 (4%)	4 (5,4%)
Сахарный диабет	4 (5%)	5 (6,7%)
Более 2х опухолей	14 (19%)	4 (5,4%)
Более 2 сопутствующих	32 (44%)	36 (50%)
заболеваний		

В нашем исследовании артериальная гипертензия встречалась на 17% реже: у 23 больных с ХМЛ, что составило 31% против 48%. А на наличие более 2 сопутствующих заболеваний указывали 50% пациентов против 44%. Значимое снижение количества более 2-х опухолей можно объяснить тем, что в исследование не включались пациенты с опухолевыми заболеваниями.

Среди других сопутствующих заболеваний в РБ чаще отмечалась патология желудочно-кишечного тракта и суставов, так на хронический деформирующий остеоартроз указывали 27% панкреатит больных, хронический бронхит был диагностирован у 19% пациентов. По сердечнососудистым заболеваниям, сахарному диабету, заболеваниям почек и печени были показатели сопоставимыми c данными исследования EUTOS. Следовательно, в целом, существенных различий по сопутствующей патологии в обоих работах не было, хотя они могут иметь ряд особенностей по регионам в зависимости от привычек, обычаев, характера питания или других особенностей проживания.

В таблице 3.2.3 представлены показатели периферической крови у пациентов с различными фазами заболевания.

Контрольную группу составили 60 здоровых лиц, соответствующих исследуемой группе по полу и возрасту: 30 мужчин и 30 женщин (1:1), в возрасте от 18 до 68 лет, средний возраст  $46,5\pm14,6$  лет.

При постановке диагноза ХМЛ с в общем анализе крови больных наблюдался выраженный лейкоцитоз ( $127,3\pm8,4\cdot10^9$ /л, р<0,001), тромбоцитоз ( $383,9\pm20,2\cdot10^9$ /л, р<0,001), анемический синдром легкой степени присутствовал в 80 % случаев, а также другие изменения, достоверно отличающиеся от показателей здоровых лиц: снижение концентрации гемоглобина до  $111,2\pm1,7$ г/л (р<0,001) и количества эритроцитов до  $3,8\pm0,1\cdot10^{12}$ /л (р<0,01).

Таблица 3.2.3 - Показатели периферической крови у больных XMЛ на момент постановки диагноза

		хроническая фазы акселерации и		
Показатель ( $M \pm m$ )	больные ХМЛ	фаза	бластного криза	контроль
количество больных	184	177	7	60
гемоглобин, г/л	111,2±1,7***	111,7±1,7***	99,7±10,3**	132,0±3,2
эритроциты, ·10 <sup>12</sup> /л	3,8±0,1**	3,8±0,1**	3,4±0,4***	4,6±0,3
тромбоциты, $\cdot 10^9 / \pi$	383,9±20,2***	389,0±20,8***	310,5±71,8	256,2±12,2
лейкоциты, ·10 <sup>9</sup> /л	127,3±8,4***	127,9±8,7***	130,4±14,6***	5,2±0,2
бласты, %	1,9±0,1	1,9±0,1	4,0±2,4	0,0±0,0
промиелоциты, %	3,2±0,2	3,2±0,2	1,7±0,5	0,0±0,0
миелоциты, %	14,5±0,8	14,5±0,8	10,9±1,9	0,0±0,0
метамиелоциты, %	3,0±0,2	2,9±0,2	4,3±1,3	0,0±0,0
палочкоядерные, %	17,8±0,8***	17,7±0,9***	18,0±3,4 ***	1,4±0,2
сегментоядерные, %	36,1±1,2***	36,0±1,2***	28,6±5,3***	57,3±1,3
базофилы, %	2,3±0,2**	2,2±0,2**	14,3±1,4***	1,3±0,1
эозинофилы, %	3,3±0,1***	3,3±0,1***	3,9±0,7***	2,2±0,3
моноциты, %	4,2±0,2	4,2±0,2	4,8±1,5	4,0±0,4
лимфоциты, %	7,4±0,5***	7,4±0,5***	5,5±1,8***	31,9±0,1

Примечание. Статистическая значимость обозначена по отношению к контрольной группе: \*\*\*-p<0,001; \*\*-p<0,01; \*-p<0,05.

В лейкоцитарной формуле выявлен резкий сдвиг влево до бластов с промежуточных промиелоцитов, наличием всех форм: миелоцитов, метамиелоцитов, отсутствующих В группе контроля, увеличение палочкоядерных  $(17.8\pm0.8\%)$  и снижение сегментоядерных  $(36.1\pm1.2\%)$  форм лейкоцитов (p<0,001), увеличение количества базофилов до  $2,3\pm0,2\%$  (p<0,01) и эозинофилов до  $3.3\pm0.1\%$  (p<0.001) (базофильно- эозинофильная ассоциация). При сопоставлении данных российской части популяционного исследования EUTOS отмечено, что показатели крови значимо не отличались от полученных нами данных в  $X\Phi$  по уровню эритроцитов (медиана-3,9\* $10^{12}$ /л), гемоглобина (медиана-116 г/л), тромбоцитов (медиана-390  $*10^9$ /л), лейкоцитов (медиана- $93,1*10^9/\pi$ ), бластных клеток (медиана-2%), промиелоцитов (медиана-1%), миелоцитов (медиана-15%), метамиелоцитов (медиана-7%), палочкоядерных (медиана- 13%), сегментоядерных (медиана-40%), базофилов (медиана-2%), эозинофилов (медиана-2%), процент моноцитов был несколько ниже (медиана 2,5%), лимфоцитов (медиана-7%). Более низкий средний уровень гемоглобина (111г/л против 116г/л) и более высокий лейкоцитов периферической крови больных ХМЛ (127,9 против 93\*10<sup>9</sup>/л) в нашей работе также свидетельствует о позднем выявлении и более выраженных проявлениях заболевания у больных с ХМЛ в ХФ на момент диагностики, хотя эти разичия и не имели статистической достоверности. По данным О. В. Лазаревой и соавт. [32] также показано, что в разных регионах России статистически значимых различий по ключевым показателям крови (р<0,05) для установления прогностических групп ХФ ХМЛ выявлено не было.

При анализе миелограммы в 100 % случаев костный мозг был богат клеточными элементами. Мегакариоцитарный росток деятельный. Эритроидный росток сужен. Резкое раздражение и омоложение миелоидного ростка соответствовало картине хронического миелолейкоза. Выявлено достоверное увеличение количества бластов до  $5,65\pm0,42\%$  (p<0,01), промиелоцитов до  $11,35\pm0,65\%$  (p<0,001) относительно группы контроля (Таблица 3.2.4).

Таблица 3.2.4 - Показатели миелограммы у больных XMЛ при постановке диагноза

показатель ( $M \pm m$ )	$(M \pm m)$ больные $XM\Pi$ $X\Phi$		ФА и БК	Контроль
количество больных	184	177	7	27
бласты, %	5,65±0,42**	5,10±0,38**	16,10±3,09***	2,36±0,29
промиелоциты, %	11,35±0,65***	11,11±0,67***	15,82±1,96***	3,43±0,46
базофилы, %	1,40±0,19	1,04±0,16	7,45±0,85***	0,60±0,40
эозинофилы, %	3,73±0,31	3,48±0,31	7,92±0,99***	2,36±0,27
моноциты, %	0,56±0,09***	0,54+0,09***	1,00±0,24	1,86±0,22
лимфоциты, %	1,20±0,13***	1,21±0,14***	0,98±0,05***	6,74±0,76

Примечание. Статистическая значимость обозначена по отношению к контрольной группе: \*\*\*-p<0,001; \*\*-p<0,01; \*-p<0,05.

Показатели крови в ФА и БК указывали на более значимую анемию и лейкоцитоз, но принципиально не различались в обоих исследованиях. Так, при анализе 7 пациентов (6 пациентов в фазе акселерации и 1 пациента в фазе бластного криза) выявлены статистически значимые изменения показателей крови: уровень гемоглобина и периферической эритроцитов 99,7 $\pm$ 10,3 $\Gamma$ /л (p<0,01) и 3,4 $\pm$ 0,410<sup>12</sup>/л (p<0,001), лейкоцитов 130,4 $\pm$ 14,6·10<sup>9</sup>/л (p<0,001), сдвиг лейкоцитарной формулы влево до бластов и более выраженная базофильно-эозинофильная ассоциация (p<0.001)(Таблица 3.2.3). миелограмме по сравнению с хронической фазой выявлены достоверно более высокие цифры бластов  $(16,10\pm3,09\%)$ , промиелоцитов  $(15,82\pm1,96\%)$ , а также базофилов  $(7,45\pm0,85\%)$  и эозинофилов до  $7,92\pm0,99\%$  (p<0,001) (Таблица 3.2.4).

При цитогенетическом исследовании у 100% пациентов была выявлена Рһ-хромосома.

У всех пациентов при постановке диагноза проведен анализ по критериям риска J.Sokal, Evro с классификацией риска на низкий (НР), промежуточный (ПР) и высокий (ВР) и проведено сравнение с данными российской части международного многоцентрового проспективного популяционного исследования EUTOS (Таблица 3.2.5).

В РБ у больных ХМЛ выявляется преимущественно низкий и промежуточный риск прогресса заболевания по обоим критериям. Показатели высокого риска в российском исследовании на 10% выше, хотя общая тенденция превалирования низкого и промежуточного риска сохраняется и в том и другом исследовании.

Таблица 3.2.5 - Структура больных ХМЛ по критериям риска

Риск	Республика Башкортостан				Российск	ое иссле	дование	
	N= 184				EUTOS	N=19'	7	
	J.Sok	al	Evro		J.Sokal		Evro	
	абс.	%	абс.	%	абс	%	абс.	%
HP	63	34	120	65	60	33	74	40
ПР	81	44	51	28	63	34	76	41
BP	40	22	13	7	57	31	30	17

Таким образом, на момент постановки диагноза большинство пациентов в РБ находились в хронической фазе (96,2%), с преимущественно низким по критериям Euro (93%) и промежуточным риском прогресса заболевания (78%) по Sokal, что соответствует общероссийским и европейским показателям. Группа была этнически неоднородной, имела преимущественно II и III Rh (+) группу крови. Факторами риска XMЛ по мнению больных были стресс, наличие профессиональной вредности, экологическое неблагополучие, вредные привычки. При клинико-лабораторном обследовании выявлена сплено- и гепатомегалия у 76,1% и 16,3% соответственно, в анализах крови: анемия нормоцитарная легкой степени тяжести, выраженный лейкоцитоз со сдвигом лейкоцитарной формулы резко влево до бластов с наличием промежуточных базофильно-эозинофильной форм, наличие ассоциации, В миелограмме количество бластов в среднем составило 5,65±0,42%. У пациентов в фазе акселерации и бластного криза выявлены более выраженные изменения клинико-лабораторных показателей по сравнению с пациентами в хронической фазе.

Клинико-гематологическая характеристика пациентов с XMЛ в РБ не выявила каких-либо региональных особенностей заболевания и соответствовала критериям оценки российской части международного многоцентрового проспективного популяционного исследования EUTOS, а следовательно и всей

европейской группы, что позволяет организовать более раннюю диагностику, с акцентом на старшую возрастную группу, наблюдение и лечение больных ХМЛ в РБ по общемировым стандартам.

## 3.3 Мониторинг терапии ингибиторами тирозинкиназы больных хроническим миелолейкозом в Республике Башкортостан

Последние десятилетия литературе встречается много работ, направленных на оптимизацию лечения ХМЛ, основанную на данных цитогенетического и молекулярного мониторинга заболевания. Выявление ранних признаков резистентности к проводимой терапии позволяет ставить вопрос об изменении тактики ведения больного. Назначение тех или иных ИТК должны быть основаны на оценке индивидуального течения заболевания, анализе клинико-лабораторных данных значительной популяции больных, которым проводилось универсальное лечение с прослеженным мониторингом терапии, включающим гематологические, цитогенетические и молекулярно-Конечной целью генетические показатели. терапии является получение длительного глубокого МО (табл. 3.2.2)

Появление и раннее назначение патогенетически направленного препарата иматиниб, играющего основную роль в терапии большинства больных ХМЛ, коренным образом изменило тактику его таргетного лечения. Исследования последних лет показали, что использование ИТК1 линии позволило получить быструю клинико-гематологическую у большинства пациентов, цитогенетическую, молекулярную ремиссию, в несколько раз увеличить выживаемость, качество жизни пациентов, снизить ежегодную летальность, при условии непрерывного приема препарата в адекватной дозе. Многими авторами показано, что прогностическими факторами, влияющими на выживаемость, летальность являются возраст, длительность заболевания, предлеченность, размеры селезенки и ответ на проводимую терапию.

Анализ проводимой терапии на момент исследования показал, что из 184 больных XMЛ иматиниб получали 148 пациентов (80,5%) более 12 месяцев.

Резистентность или потерю ответа к терапии ИТК 1 имели 29 (15,7%) пациентов, которые уже были переведены на 2 линию: нилотиниб (800 мг/с)-15 и дазатиниб (10мг/с) 14 пациентов. Гидроксикарбамид с интерфероном получали - 7 (3,8%) больных, в связи с непереносимостью ИТК 5 человек или по желанию 2 пациента с хорошим ответом не были переведены на базисную терапию (эти пациенты были исключены из анализа). Распределение пациентов по текущим дозам иматиниба были следующие: 123 пациента в ХФ с дозой 400 мг/сут (83,1%), 22 пациента в ХФ и ФА – 600-800 мг (14,9%) и 3 с дозой 800 мг (2,0%) в БК. Общее количество пациентов резистентных к терапии ИТК1 линии составили 59 человек (32%), из них 29 (15,7%) переведенные на ИТК2, 22 (12%) на ИМ 600мг, 3 (1,6%) на ИМ 800мг с потерей ответа или первичной резистентностью, 5 (2,7%) пациентов получающих гидроксикарбомид с интерфероном.

Нами выяснялась приверженность к лечению, в ходе чего было установлено, что перерывы в лечении до одного месяца имели 112 (61%) пациентов, из них каждый второй (34%) - многократно. Чаще всего причиной этому послужили перебои с централизованными поставками препарата на первых этапах их получения или низкой комплаентностью пациентов в связи с недостаточностью знаний и ответственному подходу к терапии.

В ходе исследования нами установлена переносимость иматиниба, которая в 37% была хорошей (68 пациентов с 0 токсичностью), в 55% случаев (101) удовлетворительной (1-2 степень токсичности) и только в 8% (15)- не удовлетворительной (3-4 степень). Гематологическая токсичность, выявленная в 31,5% проявлялась анемией легкой или средней степени тяжести и умеренной тромбоцитопенией, не требующей отмены препаратов. Негематологическая токсичность в виде тошноты отмечалось в 46% случаев (85 пациентов), отеков, в том числе периорбитальных - в 58% (106), головной боли - в 38% (70), зуда - в 15% (27), диспепсии - в 11% (20). В трех случаях были серьезные гематологические и негематологические нежелательные явления, потребовавшие

отмены препарата (3 - 4 степень токсичности), что соответствует данным мировой литературы.

В результате таргетной терапии ИТК1 через 12 месяцев и более в ХФ из 148 пациентов 100% имели полный клинико-гематологический ответ, ПЦО наблюдался у 90 (61%), ЧЦО у 12 (8%). Следовательно, БЦО при лечении ИТК1 в ХФ получен у 102 (69%) пациента и не удалось его получить у 46 (28%). Первичная резистентность к ИМ наблюдалась у 36 (21,8%) и вторичная у 10 (6,2%). При этом 6 (2,8%) человек утратили ПГО, ПЦО, а 4 (1,8%) ПЦО и БМО. В дальнейшем в этой группе БМО достигнут у 75 (50,6%), при этом стабильный глубокий MO (4,0-5,0 lg) в течение 24 месяцев у 30 (20%) больных. В ФА из 15 больных БЦО получен у 6 (26,6%), из них ПЦО и ЧЦО по 3 пациента. В фазу БК у 3 пациентов ответ не получен. Данные нашей работы несколько ниже результатов, полученных в российских и зарубежных исследованиях, однако они имеющихся сопоставимы учетом моментов нарушения дозового И таймингового режимов в реальной клинической практики.

Проанализирована группа 29 пациентов ХМЛ, не ответивших на терапию 1 линии и уже получающих ИТК2, из них ХФ была у 25 (86%) больных, ФА у 4 (14%) больных. Мужчин было 12 (41,4%), женщин 17 (58,6%) с медианой возраста  $49,0\pm12,0$  лет и со средней продолжительностью заболевания  $69,0\pm41,0$  мес. (в среднем 5 лет 3 мес.). Городских жителей - 51,7%, сельских – 48,3%. Первичная резистентность к иматинибу отмечалась у 2 больных (6,8%), а вторичная у 27 (93,2%).

При цитогенетическом исследовании при переводе на ИТК 2 линии у 55% больных выявлена Ph-хромосома: полный цитогенетический ответ регистрировался только у 4,5%, частичный у 30,4%, малый у 26%, минимальный у 8,7% и отсутствие ответа у 30,4% больных. У всех больных молекулярного ответа не было, и экспрессия гена BCR::ABL p210 составила в среднем по международной шкале (МШ) 21,9  $\pm$ 17,5%.

Через 3 месяца лечения ИТК 2 линии полный гематологический ответ отмечался уже у 22 (76%) больных, у остальных 7 (24%) были проявления

гематологической токсичности в виде анемии у 26% и тромбоцитопении у 14,8% больных, не потребовавшие отмены препарата. Умеренные проявления не гематологической токсичности 2 ст отмечали 18 человек (66%) в виде слабости 18,5%, одышки 14,8%, головокружения 11,1%. Полный цитогенетический ответ получен у 10%, частичный у 70%, малый у 11%, минимальный у 6% и полное отсутствие ответа у 3% больных. Молекулярный ответ и экспрессия гена BCR::ABL p210 на этот период составила по МШ 1,43  $\pm$ 1,42%.

Результаты исследования показали довольно высокую эффективность ИТК 2 линии, уже через 3 месяца был получен ПГО у 76%, полный и частичный ЦГО – 70%, глубокий МО у 17% больных резистентных к 1 линии ИТК. Экспрессия гена *BCR::ABL* по МШ снизилась за этот период в 7 раз. Однако, при лечении 2 линией ИТК отмечены более значимые нежелательные явления в виде гематологической и не гематологической токсичности (развитие тяжелого плеврита, обострение сердечно-сосудистого заболевания и др., что привело в 5 случаях (17,2%) к необходимости ротации препаратов, с учетом мутационного статуса, и продолжения наблюдения в другой группе больных.

Медиана общей выживаемости в группе пациентов с ХМЛ получающих ИТК1 не достигнута. В группе получающих ИТК1,2 пятилетняя выживаемость составила 83,5%, выживаемость без прогрессии 66,7%. Эти данные соответствуют результатам полученным примерно В TOT период К.М.Абдулкадыровым и соавт. (ОВ-86,4%, ВБП-67,5%) (2012) и несколько ниже показателей, полученных в работах H.M.Kantarjian (2012) и результатов более поздних исследований: E.Alsobhi (2015), А.С. Лямкина (2020).

Летальность больных ХМЛ в РБ с 2005 по 2011гг составила 29 человек из 184 (15,7%). Из них у (48%) прогрессирование и развитие резистентности с летальным исходом было связано с многократными нарушениями режима приема препаратов, у (25%) с имеющейся и прогрессирующей сопутствующей патологией, чаще всего сосудистой, с развитием ОНМК, Инфаркта миокарда и др, и у (28%) с прогрессированием основного заболевания.

Анализ данных проводимой терапии, не достижение целевых значений ЦГ и МО к 6, 12 и более месяцам, свидетельствует о возможном развитии резистентности, мутаций или других причин не достаточной эффективности или ее потери в лечении пациентов ИТК и прежде всего может быть связан с частыми и длительными перерывами в лечении. Следовательно, в дальнейшем исследовании для оценки эффективности лечения ИТК1 и выявления резистентности к проводимой терапии, анализа полиморфизма генов и клиникогенетических ассоциаций, нами были исключены 70 пациентов (38%), имеющих многократные и длительные перерывы в лечении ИТК.

# 3.3.1. Комплексный мониторинг терапии ИТК в группе больных XMЛ для проведения мутационных и генетических исследований

Последующий комплексный молекулярно-генетический мониторинг проводился у 114 пациентов с ХМЛ, мужчин-55, женщин-59 (1:1,1), с медианой возраста 52 года (от 15 до 76 лет) и медианой длительности терапии ИТК1 65,5 мес (от 6 до 105 месяцев).

По рекомендации ELN ЦГО проводится в течение первого года терапии ИТК и является критерием прогноза ответа на лечение, особенно после 6 месяцев терапии. За этот период пациенты с ХМЛ должны достичь БЦО, который объединяет полный и частичный ЦО в соответствии с национальными клиническими рекомендациями под редакцией В.Г. Савченко [33].

Данные цитогенетического исследования оценивались нами после 6 месяцев непрерывной терапии ИТК1 у 101 пациента с ХМЛ, данные МО у 114.

ХФ была диагностирована у 82 пациентов (81,2%), из них 76 (92,7%) получали ИМ в дозе 400 мг/сут (92,7%) и только 6 пациентов (7,3%) -600 мг/сут. Однако оказалось, что в рутинной клинической практике не все пациенты получали ИМ в соответствующих клиническим рекомендациям дозах. Так, 1 пациент (6,25%) из 16 больных ХМЛ в ФА получал ИМ в дозе 400 мг/сут, 12 пациентов (75%) по 600 мг/сут и 3 (18,75%) по 800 мг/сут. В фазе БК 3 пациента с ХМЛ получали этот препарат в дозе 400, 600 и 800 мг/сут. Поскольку

эффективность терапии ИМ на различных этапах развития заболевания напрямую зависит от адекватно назначенной дозы, 3 пациента, получавшие иматиниб в дозе 400 мг/ сутки в ФА и БК были исключены из дальнейшего исследования.

По нашим данным, через полгода проводимого лечения, 43 пациента (52,4%) с ХМЛ из 82 больных в ХФ достигли ПЦО и 6 (7,3%) пациентов ЧЦО. Поэтому, практически 60% пациентов продолжили терапию в прежней дозе в соответствии с клиническими рекомендациями. Однако, у 13 пациентов (15,9%) за этот период был зарегистрирован только малый ЦО и минимальный ЦО: у 9 (11%) и 4 (4,9%) больных соответственно. По рекомендациям ELN (2009, 2013) такой уровень ЦО рассматривался как субоптимальный, а по последним руководствам данная ситуация рассматривается как неудача терапии.

Из 15 больных, получавших иматиниб в дозе 600–800 мг/сут в ФА за этот период, только один (6,7%) достиг ПЦО, а 4 пациента - ЧЦО (26,6%). Следовательно, можно считать, что в ФА только 33,3% анализируемых пациентов с ХМЛ достигли оптимального ответа.

Что касается неудачи в терапии или отсутствие ПЦО, ЧЦО (0-35%), то она была зарегистрирована у всех 3 больных (100%) в фазу БК, у 10 пациентов (66,7%) в ФА и у 20 больных ХМЛ в ХФ (24,4%). Таким образом, 33 пациента (32,6%) ХМЛ не достигли оптимального ЦГО.

Для количественной оценки транскриптов BCR::ABL был проведен анализ экспрессии гена методом ПЦР-РВ у 114 больных. Снижение уровня BCR::ABL транскрипта в 10раз означало снижение экспрессии на 1 lg, в 100 раз на 2 lg, в 1000раз на 3 lg, в 10 000 раз на 4 lg.

У больных ХМЛ медиана экспрессии гена BCR::ABL, проведенная методом ПЦР в режиме реального времени, составила 23,77% (0 – 316,8%) или 1,5 lg. Большой МО констатирован у 32 больных ХМЛ (28%), где медиана снижения уровня экспрессии BCR::ABL составила 4,2 lg. Умеренный уровень экспрессии до 2,5 lg был выявлен у 10 исследуемых (9%), а медиана этого

показателя составила 0.15% (0.05 - 0.93%). Высокий уровень экспрессии гена BCR::ABL (1.2 lg) выявлен у 72 больных ХМЛ, где медиана составила 79,9%.

При наличии ПЦО только у 14 из 32 пациентов ХМЛ, что составляет 43,8%, транскрипты гена BCR::ABL не были обнаружены. Экспрессия BCR::ABL от 0 до 0,1% выявлялась у 5 больных (15,6%), у 13 пациентов (40,6%) она была выше 1%. При анализе показателей пациентов с ЧЦО, у 2 из 7 (29% случаев) экспрессия гена BCR::ABL не выявлялась, хотя большинство 5 из 7 больных ХМЛ (71%) имели экспрессию выше 1%. Мы не обнаружили экспрессию гена BCR::ABL у 14% больных с МЦО (1 из 7) и у 29% пациентов с минимальным ЦО (2 из 7). Хотя большинство больных в этих группах: 86% (6 из 7) и 71% (5 из 7) имели экспрессию BCR::ABL выше 1%, так же как и все 100% (24) пациентов с отсутствием ЦО.

С учетом полученных данных и довольно широким разбросом экспрессии гена *BCR::ABL* в группах с различным цитогенетическим ответом, мы провели сравнительный корреляционный анализ между уровнем экспрессии *BCR::ABL* и процентным содержанием Ph-позитивных клеток. Коэффициент ранговой корреляции Спирмена для этих параметров у 77 больных ХМЛ составил 0,82 (р <0,0001). Следовательно, полученные нами данные не противоречат другим исследованиям и свидетельствуют, что цитогенетический и молекулярный мониторинг терапии больных ХМЛ имеет очень большое значение и требует индивидуализированной оценки этих показателей.

В дальнейшем при анализе полученных данных 114 пациентов с ХМЛ, исследовании мутаций и генетических ассоциаций мы разделили пациентов на 2 группы: с оптимальным ответом (n=50) и не ответивших на проводимое лечение ИТК (n=64).

Оптимальным ответом считалось достижение к 6 месяцам лечения: ПГО, ПЦО, ЧЦО,  $BCR::ABL\ 1-10\%$  и менее. К 12 месяцам и более наличие ПГО, ПЦО, БМО, ГМО,  $BCR::ABL\ 0,1-1\%$  и менее.

Резистентными к терапии считались пациенты, не достигшие к 6 месяцам менее ЧЦО, BCR::ABL более 10%, к 12 месяцам отсутствие или потеря ПГО, ПЦО, БМО, BCR::ABL более 1%.

## 3.3.2. Изучение мутаций в гене BCR::ABL у пациентов с XMЛ в Республике Башкортостан

Известно, что пациенты ХМЛ с недостаточным ЦО или МО ответом чаще всего несут или генетические мутации, или дополнительные хромосомные аберрации. Именно они имеют наивысший риск прогрессирования ХМЛ. Мутации гена *BCR::ABL* и вследствие этого потеря способности ингибирования BCRABL-тирозинкиназы ИМ, являются одной из основных причин резистентности к терапии ИТК. При отсутствии ответа данные мутации встречаются у 1/3 больных, а у пациентов с потерей ответа выявляются в 2/3 всех случаев [39, 53, 89].

По данным В. В. Тихоновой и соавт. [77], выявление закономерностей возникновения мутаций у пациентов с ХМЛ может иметь важное значение для долговременного прогноза развития устойчивости и более успешного планирования терапии. Частота устойчивости, связанной с мутациями, зависит от региона РФ.

С этой целью в Республике Башкортостан нами проведен анализ мутаций у 50 больных резистентных к ИТК1. В этой группе медиана экспрессии гена *BCR::ABL* составила 142%, а средний возраст - 48 лет, соотношение мужчин и женщин 22 (44%) и28 (46%), что свидетельствовало о сопоставимости изучаемых групп.

У 16 (32%) из 50 пациентов с высокой экспрессией гена BCR::ABL резистентных к иматинибу выявлены 4 миссенс-мутации: T315I, M351T, M244V u H396R.

Основным методом определения мутаций в клинической практике является прямое секвенирование кДНК с последующим анализом изменений нуклеотидной последовательности тирозинкиназного домена гена *BCR::ABL* 

(Рисунок 3.3.2 а и b). У всех больных наличие мутации при секвенировании подтверждено методом ПДРФ-анализа с помощью эндонуклеазы рестрикции DdeI (Рисунок 3.3.2 с и d). Полученные данные указывают на клоновый характер мутаций с различным соотношением транскриптов дикого и мутантного типов.

Молекула ИТК не может встроиться в соответствующий участок гена *BCR::ABL*-тирозинкиназы при изменении в структуре аминокислоты белка и эффект от терапии не наблюдается. Большинство мутаций *BCR::ABL* происходит в 4-х критических зонах. Они имеют различную чувствительность к ингибированию ИМ, различной трансформирующей активностью и способностью определять различный клинический прогноз.

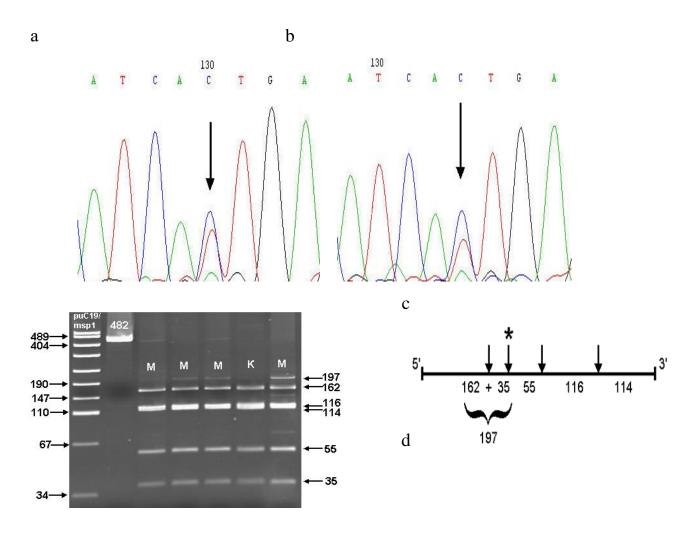


Рисунок 3.3.2 - Мутация T315I в двух образцах кДНК (a,b) и подтверждение ПДРФ-анализом (c, d).

Одна из наиболее известных мутаций в гене *BCR::ABL -T315I*, вызывает резистентность ко всем ингибиторам тирозинкиназ 1 и 2 поколения [9, 40, 41, 224]. При ее выявлении назначается терапия ИТК 3 покаления или аллогенная трансплантация костного мозга [3, 40, 41, 47].

В нашем исследовании у 10 пациентов (20%) с ХМЛ была выявлена мутация *М351Т*, при которой происходит замена тимина на цитозин в 1052 положении, приводящая к замене метионина в положении 351 на треонин (Рисунок 3.3.3 а и b). Наличие мутации *М351Т* было подтверждено ПДРФ-анализом (Рисунок 3.3.3 с и d).

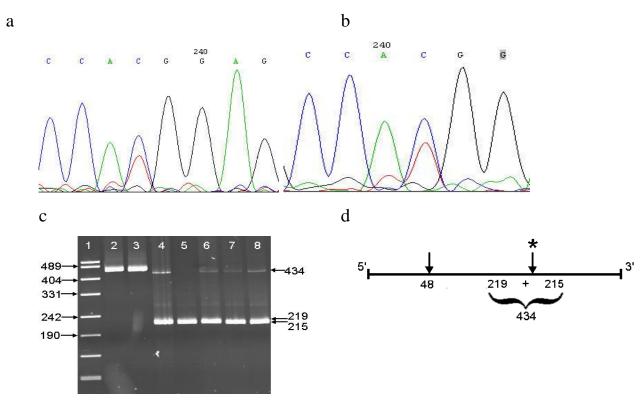


Рисунок 3.3.3 - Мутация M351T в двух образцах кДНК (a,b) и подтверждение ПДРФ-анализом (c, d).

Известно, что мутация M351T является одной из 7 наиболее значимых мутаций гена *BCR::ABL*, которые составляют около 85% всех известных мутаций [47]. Так частота мутации *M351T* у больных ХМЛ из Германии определялась с частотой 6%, в Италии и Австралии -11% [133, 177, 214]. В

Республике Башкортостан по данным нашего исследования мутация *М351Т* у пациентов с ХМЛ была самой распространенной. Мутация *М351Т* дает умеренное снижение чувствительности к ИМ и может быть восстановлена при повышении концентрации суточной дозы иматиниба до 800 мг/сут или назначении ИТК 2 [40, 41, 145, 224].

Достаточно редко встречающаяся мутация H396R в гене BCR::ABL, возникающая при замене в 1187 положении аденина на гуанин, была выявлена нами у одного больного из РБ (2%) (Рисунок 3.3.4). Примерно такие же результаты были получены в Германии - 1,5 %, а в Италии ее частота составила всего 0,7% [133, 214].

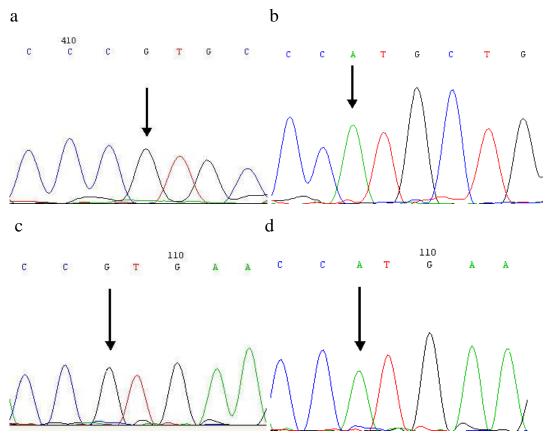


Рисунок 3.3.4 - Мутации H396R , M244V (a, c) в образцах кДНК и норма (b и d).

Данная мутации может стать причиной резистентности к лечению ИТК, т происходит дестабилизация активационной петли и домен киназы не может перейти в пространственную организацию, необходимую для связывания с ИМ.

В нашем исследовании частота мутации *М244V* у больных с ХМЛ выявлена также в 2% случаев. При этом замена аденина на гуанин в 730 позиции приводит к замене метионина на валин в 244 положении (Рисунок 3.3.4). Данная мутации играет существенную роль в развитии резистентности к терапии ИТК1 у больных ХМЛ. Так в Германии ее обнаруживали в 4%, в Италии в 1,5% случаев.

По данным В. В. Тихоновой и соавт. [77], при выявлении мутаций H396R и M244V можно рекомендовать повышение дозы ИТК1 или перевод на ИТК 2 линии: нилотиниб и дазатиниб.

Анализ мутаций в киназном домене гена BCR-ABL пациентов в разных фазах XMЛ в РБ показал, что у резистентных к иматинибу больных выявлено четыре мутации. Мутация M351T (7 случаев) и мутация T315I (4 пациента) встречались чаще всего: 14% и 8% соответственно, реже по 2% выявлялись мутации - M244V и H396R (по 1 случаю). У трех пациентов (6%) с неудачей терапии XMЛ на ИМ обнаружено по две мутации: T315I и M351T. Сравнительный анализ различных мутаций в киназном домене и уровня экспрессии гена BCR:ABL у больных в РБ показал, что наиболее высокий средний уровень экспрессии химерного гена регистрировался при наличии компаунд-мутации (T315I+M351T), а также мутации M351T (медиана экспрессии BCR:ABL 442% и 95% соответственно).

Наиболее неблагоприятная, в плане развития резистентности к терапии ИТК, мутация T315I наблюдалась у пациентов в фазу бластного криза (3 случая, из них у двух была обнаружена компаунд-мутация T315I и M351T).

Из шести пациентов у трех в ФА выявлена мутация *Т315I* (у двух – только мутация *Т315I*, у одного - компаунд-мутация), у трех- мутация М35IT. Больные с мутацией *Т315I* были направлены в Федеральные центры, где одна была включена в клиническое исследование на 3 линию ИТК (понатиниб), было некоторое улучшение состояния, получен ПГО, однако в течение 2х лет ПЦГО получено не было, заболевание прогрессировало, проведена аллогенная ТГСК

без эффекта. У второго пациента после аллогенной ТГСК получена стойкая ремиссия. Третий ответил на лечение ИТК3 покаления лишь малым ответом.

В хронической фазе компаунд-мутации и мутация Т315I не выявлялись, у большинства (4случая) присутствовала мутация М351T, все остальные мутации в гене *BCR::ABL*: *T315I*, *M244V и H396R* зарегистрированы по одному случаю (Таблица 3.3.4).

Таблица 3.3.4 - Частота встречаемости мутаций *BCR::ABL* у пациентов хроническим миелолейкозом в Республике Башкортостан

Фаза ХМЛ	Количество	% выявленных				
	пациентов	мутаций	M35IT	T315I	M244V	H396R
ΧФ	N=41	17	4	1	1	1
ФА	N=6	100	3	2	-	-
	-	-	1		-	-
БК	N=3	100	-	1	-	-
	-	-	1		-	-

Таким образом, изучение профиля мутаций киназного домена в гене BCR::ABL у больных XMЛ в нашем исследовании показал, что в РБ у пациентов, резистентных к терапии ИТК1, встречаются четыре мутации, из них две ТЗ151 и *M351T* в виде компаунд-мутации. В 100% случаев при бластном кризе и в фазу выявлялись мутации, ИЗ них более 55% наиболее акселерации неблагоприятные: Т315I в монорежиме или в сочетании с *M351T*. В хронической фазе только у 17% больных ХМЛ встречались все четыре вида мономутаций, из них наиболее часто (20%) выявлялась мутация МЗ5ІТ с умеренным снижением чувствительности к ИМ. Выявление региональных особенностей возникновения мутаций у пациентов с ХМЛ, имеет важное значение для долговременного прогноза развития устойчивости и более успешного планирования и смены терапии. А дальнейшее изучение различных причин резистентности к терапии ИТК больных ХМЛ, в том числе генетических, помогут раскрыть новые механизмы их возникновени

### ГЛАВА 4 КЛИНИКО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ АССОЦИАЦИИ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ МИЕЛОЛЕЙКОЗЕ

Комплексное молекулярно-генетическое исследование с анализом клинико-генетических ассоциаций проведено у 114 пациентов с ХМЛ, из низ мужчин-55, женщин-59 (1:1,1), с медианой возраста 52 года (от 15 до 76 лет, из них 15-29 лет-9 (7,9%), 30-49 лет- 34 (29,8%), 50-69 лет – 57 (50%), более 79 лет – (11,3%)) и медианой длительности терапии ИТК1 65,5 мес (от 6 до 105 месяцев). По критериям риска (по J.Sokal) больные распределились: 1 низкий риск - 50 (43,9%), 2 промежуточный риск – 35 (30,7%), 3 высокий риск – 29 (25,4%). Так же, как и предыдущие группы большинство имели низкий и промежуточный риск (74,6%). По фазам: ХФ была у 91 (80,0%), ФА у 20 (17,5%), БК у 3 пациентов (2,5%). Все пациенты получали терапию ИТК.

Пациентов разделили на 2 группы: 1 группа с оптимальным ответом (n=50) и 2 группа резистентных, не ответивших на проводимое лечение ИТК (n=64).

Оптимальным ответом считалось достижение к 6 месяцам лечения : ПГО, ПЦО, ЧЦО, BCR::ABL 1-10% и менее. К 12 месяцам и более наличие ПГО, ПЦО, БМО, ГМО, BCR::ABL 0,1-1% и менее.

Резистентными к терапии считались пациенты не достигшие к 6 месяцам менее ЧЦО, BCR::ABL более 10%, к 12 месяцам отсутствие или потеря ПГО, ПЦО, БМО, BCR::ABL более 1%.

# 4.1 Анализ ассоциации полиморфного варианта rs776746 в гене изофермента цитохрома p450 *CYP3A5* у больных хроническим миелолейкозом с критериями риска, ответом на лечение и выживаемостью

В последние десятилетия исследователями уделяется большое внимание изучению различных генов, которые могут оказывать влияние на метаболизм ИТК. Известно, что с участием ферментов семейства цитохромов Р450 происходит метаболизм многих классов лекарственных препаратов, таких как

ингибиторы протонной помпы, антигистаминные препараты, блокаторы кальциевых каналов, ингибиторы ретровирусной протеазы и многие другие.

Эффекты цитохрома Р450 связаны с его каталитическим действием на присоединение различных химических групп к молекулам в процессе метаболических превращений. Они выполняют дезинтоксикационную функцию, осуществляя влияние на окисление и биотрансформацию назначаемых препаратов и некоторых эндогенных биоорганических веществ. У человека выявлено уже более 55 различных изоформ цитохрома Р450, каждая из которых кодируется отдельным геном.

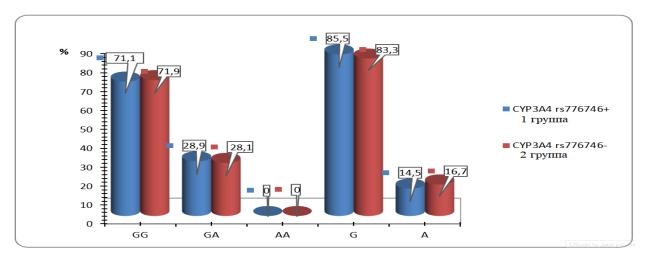
В нашем исследовании проанализировано распределение частот генотипов полиморфного локуса rs776746 изофермента P3A5 цитохрома p450 (*CYP3A5*) локализованного в интроне 3, для оценки его зависимости от критериев риска развития XMЛ, влияния на фармакокинетику ИТК и возможную лекарственную устойчивость (Таблица 4.1.1).

Таблица 4.1.1 - Частота встречаемости аллелей и генотипов полиморфного варианта rs776746 в гене *CYP3A5* у больных с хроническим миелолейкозом с различным ответом на терапию ИТК.

Аллель, генотип		Пациенты	Пациенты с	Пациенты с	
		с ХМЛ	неудачей терапии	оптимальным	
			ИТК	ответом на	
				терапию ИТК	
G	$n_{\rm i}$	194	110	65	
	$p_i \pm s_p$	85,84±2,32	85,94±3,07	85,53±4,04	
	χ <sup>2</sup> (P)	-	0,006 (0,93)		
A	$n_{\rm i}$	32	18	11	
	$p_i \pm s_p$	14,16±2,32	14,06±3,07	14,47±4,04	
	χ <sup>2</sup> (P)	-	0,006 (0,93)		
G/G	$n_i$	81	46	27	
	$p_i \pm s_p$	71,68±4,24	71,88±5,62	73,68±7,14	

	χ <sup>2</sup> (P)	-	0,007 (0,92)		
G/A	n <sub>i</sub>	32	18	11	
	$p_i \pm s_p$	28,32±4,24	28,12±5,62	28,95±7,36	
	χ <sup>2</sup> (P)	-	0,007 (0,92)		
A/A	n <sub>i</sub>	-	-	-	
	$p_i \pm s_p$	-	-	-	
	$\chi^2(P)$	-	-		
	N	113	64	38	

Результаты исследования частот генотипов полиморфного локуса rs776746 в гене *CYP3A5* у больных XMЛ показали, что в большинстве случаев, у 72% пациентов с XMЛ, выявлялся гомозиготный генотип \*G\*G, гомозиготный генотип \*A\*A не встречался вовсе и только в 28% случаев определялся гетерозиготный генотип \*A\*G. Значимых различий в распределении частот аллелей и генотипов изучаемого полиморфного локуса у больных с разным ответом на проводимую терапию ИТК не было выявлено (p>0,05) (Рисунок4.1.1).



1 группа -больные, не ответившие на терапию ИТК - n=64

2 группа - больные с оптимальным ответом на терапию ИТК- n=38

Рисунок 4.1.1 - Частота встречаемости аллелей и генотипов полиморфного варианта rs776746 в гене *CYP3A5* у пациентов с XMЛ с различным ответом на терапию ИТК.

В работе осуществлена оценка продолжительности жизни больных ХМЛ в зависимости от генотипа полиморфного локуса rs776746 гена *CYP3A5*. Анализ выживаемости проведен с помощью метода Каплана—Мейера (Рисунок 4.1.2).

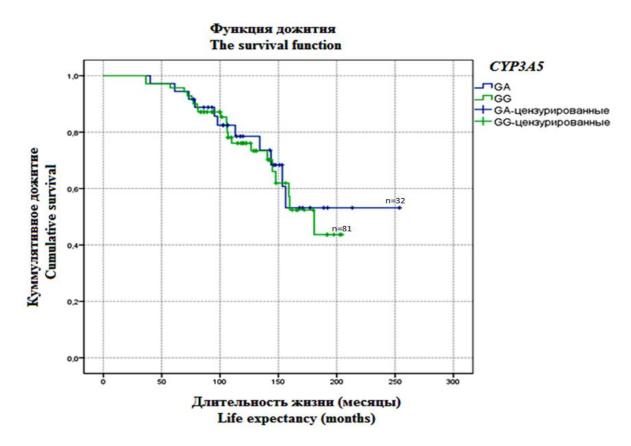


Рисунок 4.1.2 - Общая выживаемость пациентов XMЛ в зависимости от генотипа полиморфного локуса rs776746 гена *CYP3A5*.

Средняя продолжительность жизни у больных с генотипом GA составила -  $190,3\pm15,1$  месяца, с генотипом GG -  $154,9\pm7,2$  месяца. Однако, сравнительный анализ показал, что различия в продолжительности жизни пациентов ХМЛ в зависимости от генотипа полиморфного локуса rs776746 гена *CYP3A5* не достигли уровня статистической значимости (Лонг-ранг тест, p=0,755).

Нами был выполнен анализ зависимости показателя полиморфного локуса rs776746 гена *CYP3A5* от показателя критерии риска (1-низкий риск, 2-помежуточный рискр, 3-высокий риск). Однако выявить статистически

значимых различий в этой группе не удалось (p = 0.817) (используемый метод: Хи-квадрат Пирсона). (Рисунок 4.1.3).

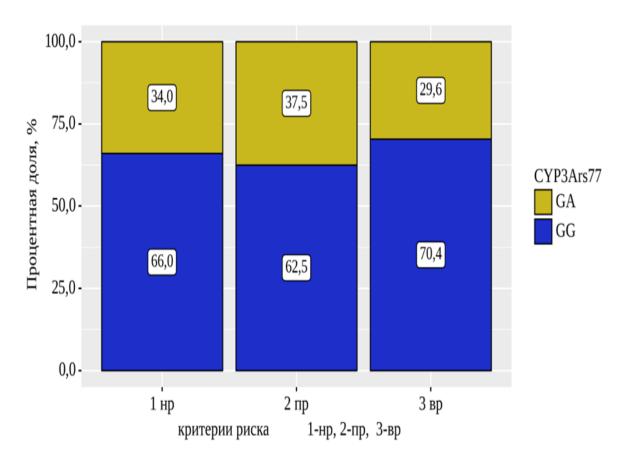
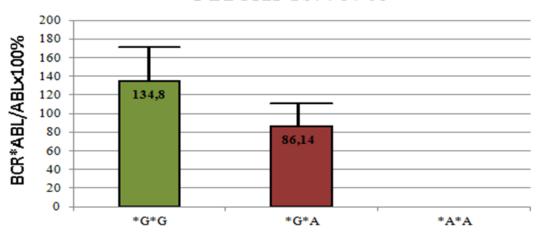


Рисунок 4.1.3 Зависимость показателя полиморфного локуса rs776746 гена *CYP3A5* от показателя критерии риска (1-низкий риск, 2-помежуточный риск, 3-высокий риск).

Нами проведен анализ ассоциаций между уровнем экспрессии гена BCR::ABL и частотой встречаемости генотипов изученных полиморфных локусов. Так, у носителей генотипа \*G\*G полиморфного локуса rs776746 гена CYP3A5 медиана экспрессии химерного гена BCR::ABL составила 134,8±37,09 и была выше медианы экспрессии этого гена у носителей гетерозиготного генотипа \*G\*A -  $86,14\pm25,17$  соответственно. Однако, различия оказались статистически не достоверными (p>0,05) (Рисунок 4.1.4).

### CYP3A5 rs776746



Генотип GG-n=81; GA-n=31; AA-n=0

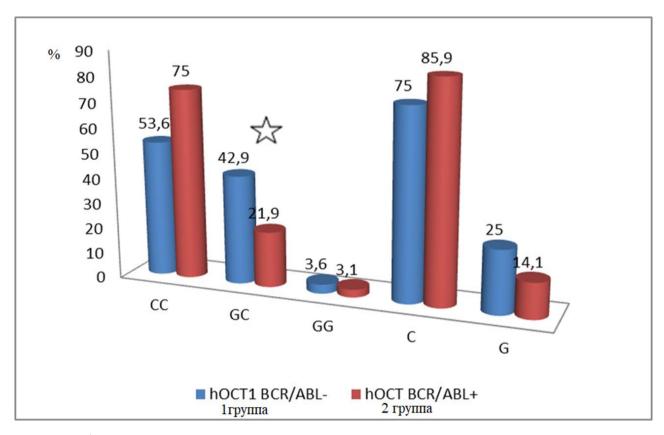
Рисунок 4.1.4 — Ассоциация экспрессии гена *BCR::ABL* и генотипов полиморфного локуса rs776746 в гене *CYP3A5* у пациентов с хроническим миелолейкозом, \*-p>0,05.

Таким образом, анализ ассоциации полиморфного варианта rs776746 в гене изофермента цитохрома p450 *CYP3A5* у больных хроническим миелолейкозом с критериями риска, ответом на лечение и выживаемостью не выявил достоверных статистических закономерностей.

## 4.2 Анализ ассоциации полиморфного варианта rs683369 в гене *hOCT1* у больных хроническим миелолейкозом с критериями риска, ответом на лечение и выживаемостью.

Известно, что влияние переносчиков органических катионов *hOCT1* (human organic cation transporter) очень важно в регуляции внутриклеточной доступности лекарственных препаратов. Поэтому интересно их влияние и на доступность ИМ. В нашей работе мы изучили распределение частот аллелей и генотипов полиморфного варианта rs683369 в гене hOCT1 у всех пациентов ХМЛ и сравнили эти показатели в группах пациентов с различным ответом на лечение ИМ. Интересно, что у большинства пациентов ХМЛ с эффективным ответом на лечение генотип \*C\*C встречался значительно чаще в 75% случаев, а

в группе пациентов с резистентным течением заболевания - 53,6% соответственно ( $\chi$ 2=3,94, p=0,04, OR=0,38 (95%CI 0,14-1,00) (Рисунок 4.2.1).



1 группа -больные, не ответившие на терапию ИТК - n=56

Рисунок 4.2.1 - Частота встречаемости аллелей и генотипов полиморфного варианта rs683369 гена hOCT1 у больных ХМЛ с различным ответом на терапию ИТК.

Оказалось, что частота встречаемости гетерозиготного генотипа \*C\*G была практически в два раза выше у больных ХМЛ в группе с неудачей к терапии ИТК, по отношению группы больных с оптимальным ответом на лечение (42,9% и 21,9% соответственно) ( $\chi$ 2=3,92, p=0,04, OR=2,67 (95%CI 0,99-7,21) (Таблица 4.2.1).

<sup>2</sup> группа - больные с оптимальным ответом на терапию ИТК- n=32

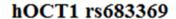
разница между показателями статистически достоверна (p<0,05)

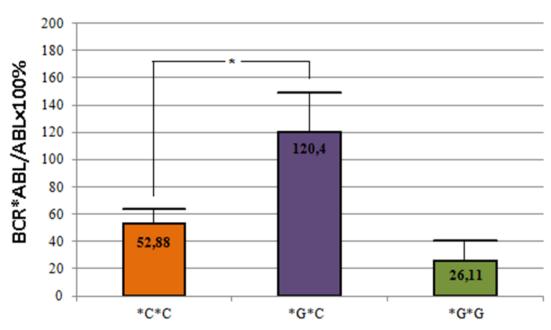
Таблица 4.2.1 - Частота встречаемости аллелей и генотипов полиморфного варианта rs683369 гена *hOCT1* у больных с хроническим миелолейкозом с различным ответом на терапию ИТК

ллель, генотип	ациенты с XN	ИЛ ациенты	сациенты	c
		еудачей тер	апииттимальным	
		ТК	гветом	на
			рапию ИТК	
	59	4	5	
$\pm s_p$	0,3±2,83	5,00±4,09	5,94±4,35	
(P)		93 (0,08)		
	P	8		
$\pm s_p$	9,7±2,83	5,00±4,09	4,06±4,35	
(P)		93 (0,08)	93 (0,08)	
/C	3	þ	4	
$\pm s_p$	3,64±4,83	3,57±6,66	5,00±7,65	
(P); OR (	CI)	,94 (0,04); 0,3	94 (0,04); 0,38 (0,14-1,00)	
/G	3	4		
$\pm s_p$	3,33±4,74	2,86±6,61	1,88±7,31	
(P); OR (	CI)	92 (0,04); 2,6	92 (0,04); 2,67 (0,99-7,21)	
G				
$\pm s_p$	03±1,72	,57±2,48	12±3,07	
(P)		01 (0,91)	01 (0,91)	
	P	5	2	

При изучении экспрессии химерного гена BCR::ABL у носителей различных генотипов полиморфного локуса rs683369 гена hOCT1 были обнаружены статистически значимые различия (Рисунок 4.2.2). Средний уровень экспрессии гена BCR::ABL у пациентов носителей гетерозиготного генотипа \*C\*G полиморфного локуса rs683369 в гене переносчике органических катионов

оказался максимальным и составил  $120,4\pm29,07$ , в отличии от гомозиготного носительства: при  $*C*C - 52,88\pm10,80$ ;  $*G*G - 26,11\pm14,75$  (p= 0,0112).





Генотип СС- n=63; GС- n=33; GG-n=3; \*-p<0,05.

Рисунок 4.2.2 - Ассоциация экспрессии гена BCR::ABL и генотипов полиморфного локуса rs683369 в гене hOCT1 у пациентов с XMЛ,

Следовательно, полученные данные показывают, что наличие генотипа СС полиморфного локуса rs683369 в гене hOCT1 ассоциировано с лучшим ответом на терапию ИТК больных ХМЛ.

Анализ выживаемости методом Каплана—Мейера в зависимости от генотипа полиморфного локуса rs683369 гена hOCT1 показал статистически значимые различия в группах (Лонг-ранг тест, p=0,018) (Рисунок4.2.3).

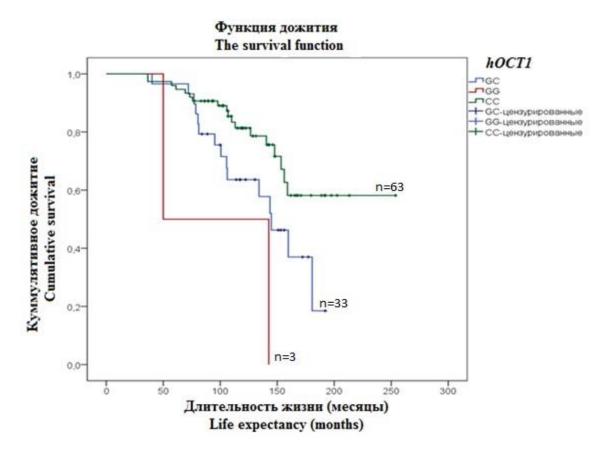


Рисунок 4.2.3 - Общая выживаемость больных XMЛ в зависимости от генотипа полиморфного локуса rs683369 гена *hOCT1*.

Наиболее благоприятным прогностическим признаком по выживаемости пациентов оказался генотип СС, средняя продолжительность жизни при его наличии составляла - 197,7±11,0 месяцев. Общая выживаемость у пациентов с генотипом GC занимала промежуточное значение — медиана 139,0±9,2 месяцев. Наиболее неблагоприятным при оценке медианы выживаемости больных ХМЛ являлся генотип GG, средняя продолжительность жизни при его наличии составила в среднем 96,3±46,3 месяцев. Было показано, что медиана выживаемости у пациентов ХМЛ с генотипом GG составила 50 месяцев, у пациентов с генотипом GC была практически в 3 раза выше — 144,84 месяцев, а у пациентов с генотипом СС она не была достигнута на момент проведения исследования.

Нами был выполнен анализ зависимости показателя полиморфного локуса локуса rs683369 гена hOCT1 от показателя критерии риска (1-низкий риск, 2-

помежуточный риск, 3-высокий риск). В соответствии с полученными данными представленными на рисунке, была выявлена статистически значимая зависимость, а следовательно и клинико-генетическая ассоциация между этими показателями (р < 0,001) (используемый метод: Хи-квадрат Пирсона) (Рисунок 4.2.4).

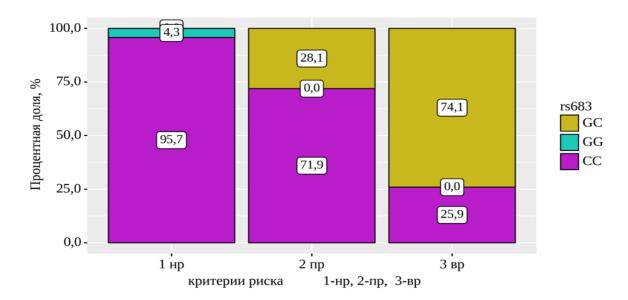


Рисунок 4.2.4 Зависимость показателя полиморфного локуса rs683369 гена hOCT1 от показателя критерий риска (1-низкий риск, 2-помежуточный риск, 3-высокий риск).

Эта зависимость подтверждает, что наличие генотипа СС полиморфного локуса rs683369 гена *hOCT1* является не только благоприятным прогностическим признаком по ответу на лечение ИТК, выживаемость пациентов с ХМЛ, но и свидетельствует о наиболее низком риске развития неблагоприятного прогноза течения заболевания.

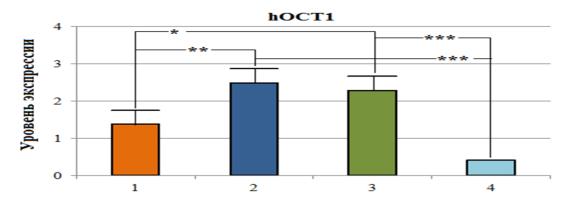
Полиморфный вариант GC и GG rs683369 в гене переносчике органических катионов *hOCT1* может влиять на биодоступность ИТК1 и вследствие этого способствовать повышению экспрессии гена *BCR::ABL* с развитием резистентности к лечению и ухудшению общей выживаемости больных. Полученные данные раскрывают некоторые патогенетические механизмы развития резистентности к терапии ИТК больных ХМЛ, определяют

индивидуализированный подход к ведению и мониторированию пациентов, оптимизации прогноза течения и персонифицированной тактики лечения XMЛ.

# 4.2.1. Оценка уровня экспрессии гена *hOCT1* и гена переносчика ABCG2 в клеточной линии К562 и лейкоцитах периферической крови больных хроническим миелолейкозом

Учитывая, что транспорт лекарственных препаратов в клетку может быть опосредован геном переносчиков органических катионов (*hOCT1*) и может влиять на эффективность лечения ИМ, нами проанализирована взаимосвязь уровня экспрессии данного гена в лейкоцитах периферической крови пациентов с ХМЛ, в контрольной группе здоровых лиц, клеточной линии К562 и при разном ответе на терапию ИТК.

Оказалось, что в лейкоцитах крови здоровых лиц медиана уровня экспрессии гена hOCT1 была существенно ниже (p<0,05) чем в группе с резистентным течением заболевания (1,38±0,37 против 2,49±0,38). Такая же тенденция прослеживалась при сравнении с группой с оптимальным ответом на лечение ИТК (1,38±0,37 против 2,27±0,39, p<0,05) (Рисунок 4.2.5).



1 – контроль n-60; 2 – больные с оптимальным ответом n=32;

Рисунок 4.2.5 – Уровень экспрессии гена *hOCT1* у больных хроническим миелолейкозом с различным ответом на терапию, в контрольной группе и линии клеток K562.

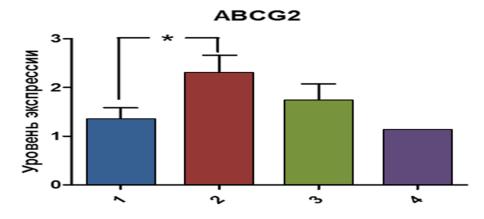
<sup>3 –</sup> больные без ответа к терапии ИТК n=56; 4 – линия клеток К562.

<sup>\*-</sup>p= 0,014; \*\*-p=0,037; \*\*\*p=0,025; \*\*\*\*p=0,025

В клеточной линии K562 нами обнаружен самый низкий уровень экспрессии гена hOCT. В контрольной группе наблюдалась такая же тенденция. В группе больных XMЛ получающих лечение ИТК он оказался наиболее высоким (p<0,05), однако статистически значимых различий в уровне экспрессии гена hOCT1 в лейкоцитах периферической крови у пациентов с резистентностью к терапии и оптимальным ответом на ИТК не было выявлено. Вероятно, активность гена переносчика hOCT1 при XMЛ зависит от концентрации ИМ в крови и требует дальнейших углубленных исследований.

Мы провели также и анализ уровня экспрессии генов *ABCG2*, в лейкоцитах периферической крови в группе больных ХМЛ в ХФ с оптимальным ответом, в группе пациентов резистентных к терапии ИТК, в контроле и в линии клеток К562.

На рисунке 4.2.6 видно, что в лейкоцитах периферической крови уровень экспрессии гена ABCG2 между резистентными к терапии больными  $(1,73\pm0,34)$  и контрольной группой  $(1,34\pm0,23)$ , а также между резистентными больными и больными с оптимальным ответом  $(2,29\pm0,36)$  статистически значимых различий не было обнаружено (p>0,05).



- 1 контроль n-60; 2 больные с оптимальным ответом n=32;
- 3 больные без ответа к терапии ИТК n=56; 4 линия клеток К562. (\*p<0,05)

Рисунок 4.2.6 – Уровень экспрессия гена ABCG2 в лейкоцитах периферической крови у больных XMЛ с различной эффективностью терапии.

У пациентов, ответивших на лечение ИТК уровень экспрессии данного гена был достоверно выше  $(2,29\pm0,36)$  по сравнению с выборкой контроля (p=0,036). Полученные данные свидетельствуют, о возможном участии гена ABCG2 в метаболизме препаратов ИТК при ХМЛ и его влиянии на исход терапии пациентов ХМЛ.

Таким образом, в нашем исследовании изучение полиморфизма генотипов полиморфного локуса rs776746 в гене *CYP3A5* не показал статистически значимых изменений клинико-гематологических ассоциаций при XMЛ. При этом уровень экспрессии гена *hOCT1* и гена *ABCG2* показали линейный характер зависимости на терапию ИТК, а полиморфизм гена *hOCT1* четко ассоциировался как наиболее важный критерий для оценки прогноза, выживаемости и ответа на терапию ИТК пациентов с XMЛ.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ отечественной и зарубежной литературы свидетельствует о том, что ХМЛ занимает 5 место среди гемобластозов, а регистрируемая заболеваемость составляет 1,0—1,5 на 100 000 населения [25]. Заболевание может встречаться у обоего пола и в любом возрасте, однако довольно редко у детей, особенно младше 10 лет. Пик заболеваемости приходится на возраст 30—50 лет, а на возрастную группу старше 60 лет около 30% больных [34].

С целью планирования комплекса лечебно-диагностических и профилактических мероприятий для этого контингента больных на местах необходимо не только ведения регистра, но и проведение эпидемиологических, генетических исследований в каждом регионе [5]. По данным российского популяционного исследования 2009-2012гг региональные колебания заболеваемости ХМЛ в 6 регионах России составили от 0,7 до 0,8 на 100 000 населения [25].

Зарегистрированная первичная заболеваемость ХМЛ в РБ в 2020г. составила 0,66 на 100 000 всего населения и 0,83 на 100 000 взрослого населения (по данным ВОЗ-0,7). Медиана возраста составила 54 года, а наибольшее количество зарегистрированных случаев ХМЛ отмечалось в возрастной группе 50-60 лет и снижение после 70 лет. Такая же тенденция наблюдалась в Российском исследовании. Хотя, по данным мировой статистики, этот показатель продолжает расти в старших возрастных группах. Медиана возраста больных ХМЛ в Германии, Швеции Эстонии, Словении составляет 61-62 года. А в соответствии с онкологическим регистра США SEER CSR (Surveillance, Epidemiology and Results Cancer Statistic Review), заболеваемость XMЛ за период с 1996 г по 2005 г. у пациентов старше 65 лет была 7,9 случаев на 100 000 населения против 0,8 случаев в возрасте до 65 лет [25, 264]. Скорее всего, данные свидетельствует о недостаточной обращаемости диагностике данной патологии у пациентов старше 70 лет в нашем регионе и в целом по России, что требует большего внимания к этой возрастной группе.

Анализ эпидемиологических данных в Республике Башкортостан за период 2000-2020гг показал, что средний пятилетний показатель первичной заболеваемости за последние 15 лет значимо не изменился (p>0.05), а за период 2000 и 2005гг он был гораздо ниже. Если рассматривать период с 2000 по 2008гг, до внедрения в терапию ИТК (Государственная регистрация иматиниба в России -2006г) и систематического определения уровня филадельфийской хромосомы с помощью СЦГИ, отмечалось не равномерное распределение показателей заболеваемости по годам от 0,1 до 0,6 на 100 000 населения, средний показатель за восьмилетний период составил 0,36±0,12 на 100 000 населения. Вероятнее всего, это связано с недостаточным вниманием, выявляемостью, регистрацией данной категории больных до начала современной диагностики и назначения ИТК 1 линии и ведения регистра больных ХМЛ. В течение последующих 8 лет (2009-2016гг.), на фоне лечения ИМ, уровень заболеваемости колебался от 0,44 до 0,80 на 100 000 населения, а средний показатель повысился практически в два раза до  $0.65\pm0.09$  на 100~000 населения (p<0.05). Эти данные свидетельствуют о лучшей выявляемости и регистрации больных за последующие 8 лет, связанные совершенствованием внедрением регулярных цитогенетических И И молекулярных методов диагностики в регионах.

При анализе диаграммы заболеваемости больных ХМЛ в РБ обращает на себя внимание, что с 2008 по 2012гг идет стабильный рост заболеваемости с 0,6 до 0,8 на 100 000 населения, а с 2012г до 2019г отмечается снижение от 0,8 до 0,4 и резкий подъем в 2020г до 0,66 на 100 000 населения. Именно с 2012г в РБ начинается период внедрения дженериков иматиниба в РБ (Государственная регистрация первого дженерика в России – 2010г) и одновременное нарушение системы регулярного мониторирования и диагностики Рн-хромосомы закрепленных лабораториях, поддерживаемых фирмой производителем оригинального препарата иматиниба – Гливека. А рост этого показателя в 2020г мы связываем с началом работы Республиканского медико-генетического центра в г. Уфа, который на постоянной и регулярной основе позволяет проводить современную диагностику и мониторинг лечения пациентов с ХМЛ в РБ.

За 20-летний период оценки эпидемиологических данных в РБ, показатель заболеваемости имел лишь тенденцию к росту. Распространенность же выросла в 5 раз и это четко можно связать с созданием и ведением в этот период регистра пациентов с XMЛ, появившейся возможностью выявления Ph-хромосомы и/или гена BCR::ABL, доступностью терапии ИТК и, как следствие, увеличением продолжительности жизни пациентов. А вот показатель смертности, исследуемый период времени, имели лишь небольшую тенденцию к снижению. Полученные результаты указывают, что, несмотря на улучшение ситуации с диагностикой и лечением ИТК больных с ХМЛ, остаются пациенты, не отвечающие на терапию ИМ, развивается резистентность к ИТК и прогрессия заболевания, приводящая к их гибели. Все перечисленное свидетельствует об актуальности проблемы и необходимости дальнейших исследований по изучению ХМЛ на местах, с целью оптимизации организации медицинского обслуживания больных, получения новых сведений о патогенезе развития ХМЛ, поиска причин неудачи лечения ИТК, преодоления резистентности терапии, выявление прогностических факторов течения и исхода заболевания.

Оценка клинических и лабораторных данных 184 пациентов в зависимости от стадии ХМЛ в РБ была проведена на этапе постановки диагноза с оценкой критериев риска с целью выявления региональных особенностей заболевания. Для этого полученные показатели сравнивались с результатами российской части международного многоцентрового проспективного популяционного исследования EUTOS и общепринятыми критериями European Leukemia Net (2013).

Обе группы были сопоставимы, так средний возраст пациентов с ХМЛ в РБ 54,6 (15-82), соотношение мужчин и женщин 1,1:1, во второй: медиана возраста составила 50 лет, соотношение мужчин и женщин 1:1. Хроническая фаза (ХФ) наблюдалась у 96,2% против 94%, фаза акселерации (ФА) у 3,3% против 6%, бластный криз (БК) у 0,5% против 1% больного. Так же, как и в Российском исследовании (87%) EUTOS у 88 % больных РБ отмечена не высокая степень активности (ECOG 0–1 балл).

При объективном осмотре у больных ХМЛ в РБ гепатоспленомегалия выявлялась чуть чаще, чем по России, хотя в целом эти показатели оказались сопоставимыми (p>0,05). Спленомегалия зафиксирована у 109 (59%) пациентов первой и у 111 (56%) во второй, гепатомегалия - 44% и 41% соответственно.

О наличии в анамнезе сопутствующих заболеваний в РБ указывали 74 пациента (40%), что соответствует российским данным — 74 (37%). Однако, в отличие от зарубежных и российских исследователей, у наших пациентов артериальная гипертензия в анамнезе встречалась на 17% реже: 31% против 48%. Процент сопутствующей сердечно-сосудистой патологии в РБ также был несколько ниже 16% против 19%, что, возможно, связано с недостаточным вниманием к выявлению и диагностике сопутствующей кардиологической патологии больных в РБ.

Что касается заболеваний печени, почек, сахарного диабета, то они встречались несколько чаще, но не достигали статистически значимых различий по сравнению с данными EUTOS: разница была не более 2%. Больше двух сопутствующих заболеваний в РБ встречалось чаще: 50% против 44%, а вот диагностика более 2 опухолей наблюдалась значимо меньше: 5,4% против 19%. Это можно объяснить тем, что в исследование изначально не включались пациенты с опухолевыми заболеваниями.

Следовательно, общая клиническая характеристика пациентов с ХМЛ в РБ принципиально не отличалась от показателей других регионов России, хотя некоторые различия по проявлениям и сопутствующей патологии может иметь ряд особенностей по регионам в зависимости от привычек, обычаев, характера питания или других особенностей проживания. Однако, стоит обратить внимание, что при наличии большего количества сопутствующих заболеваний в целом, у больных ХМЛ в исследуемом регионе возможна недостаточная диагностика сердечно-сосудистой патологии и вторичных опухолей.

В исследуемой группе больных ХМЛ в РБ выявлялся преимущественно низкий и промежуточный риск прогресса заболевания (78% по J.Sokal и 93% по Evro). В российском исследовании показатели высокого риска отмечались на

10% выше, хотя общая тенденция превалирования низкого и промежуточного риска сохранялась и в том и другом исследовании.

Следовательно, на момент постановки диагноза большинство пациентов в РБ находились в хронической фазе (96,2%), с преимущественно низким по критериям Evro (93%) и промежуточным риском прогресса заболевания (78%) по Sokal, что соответствует общероссийским и европейским показателям (81% и 67%) [32].

больных ΡБ была Группа этнически неоднородной, имела преимущественно II и III Rh (+) группу крови. Факторами риска XMЛ по больных были стресс, наличие профессиональной экологическое неблагополучие, вредные привычки. При клинико-лабораторном обследовании в анализах крови выявлены соответствующие диагнозу ХМЛ изменения: анемия нормоцитарная легкой степени тяжести, выраженный лейкоцитоз со сдвигом лейкоцитарной формулы резко влево до бластов с форм, базофильно-эозинофильной наличием промежуточных наличие ассоциации, в миелограмме количество бластов у всех больных в среднем составило 5,65±0,42%. У пациентов в фазе акселерации и бластного криза эти изменения в анализах были более значимыми по сравнению с пациентами в хронической фазе.

По данным О. В. Лазаревой и соавт. [32] показано, что в разных регионах России статистически значимых различий по ключевым показателям крови (р <0,05) для установления прогностических групп ХФ ХМЛ выявлено не было. Анализ показателей крови и миелограммы в нашем исследовании также соответствовал общепринятым данным.

Таким образом, клинико-гематологическая характеристика пациентов с XMЛ в РБ не выявила каких-либо региональных особенностей заболевания и соответствовала критериям оценки российской части международного многоцентрового проспективного популяционного исследования EUTOS, а следовательно и всей европейской группы XMЛ, так как при сравнении данных показателей в этих двух исследованиях принципиальных различий также получено не было. Полученные в нашем исследовании некоторые региональные особенности клинико-гематологической характеристики больных ХМЛ позволяет направить организационные усилия на более раннюю диагностику, с акцентом на старшую возрастную группу, а наблюдение и лечение пациентов в РБ по стандартам, принятым во всем мире [34].

Последние десятилетия в литературе встречается много работ, направленных на оптимизацию лечения ХМЛ, на основе цитогенетического и молекулярного мониторинга [33, 42, 43, 45, 77, 81, 160, 249]. Сегодня разработаны принципы стоп терапии, что позволяет говорить о возможности излечения у 50% больных с ХМЛ [34, 54, 58, 63, 71, 82, 121, 123, 129, 148, 150]. Однако, наряду с отличными результатами терапии ИТК, ученые и врачи столкнулись с проблемой мутаций и других причин развития резистентности, возможностях раннего переключения, индивидуализированного подхода на основе особенностей течения заболевания [57, 72, 73, 89, 314, 239, 240].

Многими авторами показано, что прогностическими факторами, влияющими на выживаемость, летальность являются возраст, длительность заболевания, предлеченность, размеры селезенки и ответ на проводимую терапию. На момент регистрации в России и начала лечения в РБ 1линией ИТК до 94% пациентов имели предлеченность, что по данным некоторых исследователей давало меньший ответ на проводимую терапию, по сравнению с пациентами, начинающими лечение иматинибом [2, 32, 90].

В РБ перерывы в лечении до одного месяца имели 61% пациентов, из них каждый второй (34%) — многократно. Чаще всего причиной этому послужили перебои с централизованными поставками препарата на первых этапах их получения или низкой комплаентностью пациентов в связи с недостаточностью знаний и ответственному подходу к терапии. Поэтому пациенты с низкой приверженностью к лечению исключались нами из дальнейшего исследования при изучении вопросов развития резистентности к терапии ИТК.

Однако, по данным отечественных и зарубежных авторов, высокая частота развития первичной и вторичной резистентности, ведущая к прогрессированию

заболевания и неудаче терапии, требует продолжения исследований на значительной популяции больных, которым проводилось универсальное лечение и рекомендуемый мониторинг терапии для разработки новых подходов к персонифицированной терапии ХМЛ основанной на индивидуальных проявлениях болезни. Недостижение целевых значений ЦГ и МО к 6–12 и более месяцам, свидетельствует о возможном развитии резистентности, мутаций или других причин недостаточной эффективности в лечении пациентов 1 линией терапии ИТК [73, 89, 239, 240].

Исследованиями IRIS и других авторов показаны очень хорошие результаты лечения ИТК и, если к 12 месяцам терапии ИТК 1 линии достигается оптимальный ответ, то дальнейшее прогрессирование чаще всего исключается [118, 212, 243]. Однако, анализируя накопленный мировой опыт и количество наблюдений за пациентами с ХМЛ, становится очевидным, что резистентность к ИМ увеличивается с каждым годом [89]. Авторы сходятся во мнение, что у 15-30% пациентов наблюдается первичная или вторичная резистентность к лечению ИТК 1 линии [18, 77, 147, 239, 240].

Мониторинг терапии на момент исследования показал, что из 184 больных ХМЛ в РБ иматиниб получали 148 пациентов (80,5%) более 12 месяцев. Через год 100% пациентов в ХФ имели ПГО, БЦО получен у 69% пациентов и не удалось его получить у 28%. Первичная резистентность к ИМ наблюдалась в 21,8%, вторичная у 6,2%. При этом 2,8% человек утратили ПГО, ПЦО, а 1,8% ПЦО и БМО. В дальнейшем в этой группе БМО достигнут у 50,6%, при этом стабильный глубокий МО (4,0-5,0 lg) в течение 24 месяцев у 20% больных. В ФА БЦО получен только у 26,6%. В фазу БК ни у кого ответ не получен. Полученные данные не противоречат ранее проведенным исследованиям в других регионах страны [34, 44, 46, 51, 52, 60].

Нами установлено, что переносимость иматиниба у 37% была хорошей (68 пациентов с 0 токсичностью), в 55% случаев (101) удовлетворительной (1-2 степень токсичности) и только в 8% (15)- не удовлетворительной (3-4 степень). Результаты ЦГО и МО на терапию ИТК1 и ИТК2 у больных ХМЛ в РБ

несколько ниже результатов, полученных в российских и зарубежных исследованиях, однако они сопоставимы с учетом имеющихся моментов нарушения дозового и таймингового режимов в реальной клинической практики.

В дальнейшем потерю уже достигнутого гематологического, цитогенетического и большого молекулярного ответов, а также недостижение полного гематологического ответа к 3 месяцам лечения, получение менее ЧЦО к полугодовому периоду и менее чем ПЦО после 12 месяцев терапии, мы рассматривали как неудачу лечения и проявления первичной или развития вторичной резистентности к терапии иматинибом.

Результаты исследования показали довольно высокую эффективность ИТК 2 линии у 29 пациентов ХМЛ. Уже через 3 месяца был получен ПГО у 76%, полный и частичный ЦГО – 70%, глубокий МО у 17% больных резистентных к 1 линии ИТК. Экспрессия гена *BCR::ABL* по МШ снизилась за этот период в 7 раз. Однако, при лечении 2 линией ИТК отмечены более значимые нежелательные явления в виде гематологической и негематологической токсичности (развитие тяжелого плеврита, обострение сердечно-сосудистого заболевания и др., что привело в 5 случаях (17,2%) к необходимости ротации препаратов 2 линии, с учетом мутационного статуса, и продолжения наблюдения в другой группе больных.

В настоящее время известно, что при ХМЛ, в зависимости от наличия или отсутствия, а также от типа мутаций в гене BCR-ABL, наблюдается различный терапевтический эффект на ИТК [11, 23, 42,43,65,91,218,219, 228,266].

С учетом довольно широкого разброса экспрессии гена *BCR::ABL* в группах с различным цитогенетическим ответом, медиана экспрессии гена *BCR::ABL*, проведенная методом ПЦР в режиме реального времени, составила 23,77% (0–316,8%) или 1,5 lg. мы провели сравнительный корреляционный анализ между уровнем экспрессии *BCR::ABL* и процентным содержанием Phпозитивных клеток. Коэффициент ранговой корреляции Спирмена для этих параметров у 77 больных ХМЛ составил 0,8 (р<0,0001). Следовательно, полученные нами данные не противоречат другим исследованиям и

свидетельствуют, что цитогенетический и молекулярный мониторинг терапии больных XMЛ имеет очень большое значение и требует индивидуализированной оценки этих показателей.

Общее количество пациентов резистентных к терапии ИТК1 линии составили 59 человек (32%), из них 29 (15,7%) переведенные на ИТК2, 22 (12%) на ИМ 600мг, 3 (1,6%) на ИМ 800мг и 5 (2,7%) пациентов получающих гидроксикарбамид с интерфероном в результате непереносимости ИМ или по желанию больного.

Медиана общей выживаемости в группе пациентов с ХМЛ получающих ИТК1 не достигнута. В группе получающих ИТК1,2 пятилетняя выживаемость 83,5%, выживаемость без прогрессии 66,7%. Эти составила данные соответствуют результатам полученным примерно в тот же период (2012) К. М. (ОВ-86,4%, ВБП-67,5%) и несколько Абдулкадыровым и соавт. показателей полученных в работах H.M.Kantarjian (2012) и результатов более поздних исследований: E.Alsobhi (2015), A. C. Лямкина (2020) [87].

Последующий комплексный молекулярно-генетический мониторинг проводился у 114 пациентов с ХМЛ, мужчин-55, женщин-59 (1:1,1), с медианой возраста 52 года (от 15 до 76 лет) и медианой длительности терапии ИТК1 65,5 мес (от 6 до 105 месяцев). Пациенты, имеющие длительные, многократные перерывы в лечении и принимающие не адекватные дозы ИМ были исключены из дальнейшего исследования.

По рекомендации ELN (2013) ЦГО проводится в течение первого года терапии ИТК и является критерием прогноза ответа на лечение, особенно после 6 месяцев терапии. За этот период пациенты с ХМЛ должны достичь БЦО, который объединяет полный и частичный ЦО в соответствии с национальными клиническими рекомендациями под редакцией В. Г. Савченко [33].

Данные цитогенетического исследования оценивались нами после 6 месяцев непрерывной терапии ИТК1 у 101 пациента с ХМЛ, данные МО у 114. С учетом полученных данных и довольно широким разбросом экспрессии гена BCR::ABL в группах с различным цитогенетическим ответом, мы провели

сравнительный корреляционный анализ между уровнем экспрессии *BCR::ABL* и процентным содержанием Ph-позитивных клеток. Коэффициент ранговой корреляции Спирмена для этих параметров у 77 больных XMЛ составил 0,82 (р <0,0001). Следовательно, полученные нами данные не противоречат другим исследованиям и свидетельствуют, что цитогенетический и молекулярный мониторинг терапии больных XMЛ имеет очень большое значение и требует индивидуализированной оценки этих показателей.

В дальнейшем при анализе полученных данных 114 пациентов с ХМЛ, исследовании мутаций и генетических ассоциаций мы разделили пациентов на 2 группы: с оптимальным ответом (n=50) и не ответивших на проводимое лечение ИТК (n=64).

Оптимальным ответом считалось достижение к 6 месяцам лечения: ПГО, ПЦО, ЧЦО,  $BCR::ABL\ 1-10\%$  и менее. К 12 месяцам и более наличие ПГО, ПЦО, БМО, ГМО,  $BCR::ABL\ 0,1-1\%$  и менее.

Резистентными к терапии считались пациенты, не достигшие к 6 месяцам менее ЧЦО, BCR::ABL более 10%, к 12 месяцам отсутствие или потеря ПГО, ПЦО, БМО, BCR::ABL более 1%.

О наличии мутаций в тирозинкиназном домене *BCR::ABL* и дополнительных хромосомных аберраций в основе механизмов резистентности к терапии пациентов с ХМЛ описано во многих литературных источниках [239, 240, 253]. В работе М. С. Фоминых и соавт. [12] была разработана программа прогнозирования эффективности таргетной терапии больных ХМЛ, основанная на оценке уровня экспрессии гена *BCR::ABL*, дополнительных хромосомных аберраций и мутации гена *BCR::ABL*.

Следовательно, ранняя идентификация мутаций гена *BCR::ABL* и изучение частоты встречаемости их в разных регионах, позволяет своевременно выявить факторы риска неблагоприятного прогноза течения заболевания, ответа на проводимую терапию и назначить адекватное лечение с целью получения ее максимальной эффективности [124].

Изучение профиля мутаций киназного домена в гене *BCR::ABL* у больных XMЛ в нашем исследовании показал, что в PБ у пациентов, резистентных к терапии ИТК1, встречаются четыре мутации, из них две *T3151 и M351T* в виде компаунд-мутации. В 100% случаев при бластном кризе и в фазу акселерации выявлялись мутации, из них более 55% - наиболее неблагоприятные: T3151 в моно режиме или в сочетании с *M351T*. В хронической фазе только у 17% больных XMЛ встречались все четыре вида мономутаций, из них наиболее часто (20%) выявлялась мутация *M351T* с умеренным снижением чувствительности к ИМ. Выявление региональных особенностей возникновения мутаций у пациентов с XMЛ, имеет важное значение для долговременного прогноза развития устойчивости и более успешного планирования и смены терапии. А дальнейшее изучение различных причин резистентности к терапии ИТК больных XMЛ, в том числе генетических, помогут раскрыть новые механизмы их возникновения.

В нашей работе было показано, что в РБ у 32% резистентных пациентов с неудачей к терапии ИТК, имеющих высокий уровень экспрессии гена BCR::ABL, выявляются такие мутации киназного домена гена *BCR::ABL* как: T315I, M351T, M244V и H396R. Наиболее высокий уровень экспрессии химерного гена наблюдался у пациентов с компаунд-мутацией Т315І+М351Т. При бластном кризе и в фазу акселерации в 100% случаев выявлялись мутации, из них более 55% - наиболее неблагоприятные: Т315І в монорежиме или в сочетании с М351Т. В хронической фазе только у 17% больных ХМЛ встречались все четыре вида моно мутаций с умеренным снижением чувствительности к ИМ. При этом частотой 20%, мутация M351T встречалась c являлась самой распространенной мутацией [70, 86].

Высокий уровень экспрессии *BCR::ABL*-транскрипта на фоне терапии ИМ косвенно может указывать на наличие мутаций в гене *BCR::ABL*, а, значит, молекулярный мониторинг можно использовать и в качестве скрининговой стратегии мутационного анализа. А выявление частоты встречаемости мутаций и

их комбинаций позволяет на ранних этапах переключаться на новые схемы лечения [11, 42, 53, 249].

По литературным данным, частота мутации *М351Т* в целом коррелирует с нашими результатами. Так, в исследовании GIMEMA из Италии (Italian Group for Hematologic Malignancies of the Adult), частота данной мутации встречалась у 12% больных ХМЛ, в исследовании из Франции у 12,5% пациентов [133, 250]. У больных ХМЛ из г. Ростова частота мутации *Т3151* составляла 4%, а в Германии - 6% [46, 114]. В этих работах анализировались пациенты с первичной резистентностью к иматинибу, что, возможно, и стало причиной достаточно низкой частоты выявления этой мутации [18, 77, 239].

В обзоре *BCR::ABL* зависимых и независимых механизмов резистентности к лечению ИТК Е.J. Jabbour и соавт. [194] ставят задачи по разработке стратегий лечения с первичной и вторичной устойчивостью к современным методам терапии.

Однако, признаки резистентности могут быть и в отсутствии мутаций, а возникновение мутаций может и не быть связано с появлением резистентности к ИМ. Следовательно, возможно наличие дополнительных механизмов образования резистентного к лекарственному препарату фенотипа [161, 194, 225].

Н.Т. Nguyen и соавт. [244], изучая эту проблему во Вьетнаме показали, что назначение ИТК нивелирует влияние классических прогностических факторов и требует разработки новых подходов к оценке риска для больных ХМЛ. Поэтому поиск причин неудачи лечения и преодоления резистентности терапии ИТК остается актуальной проблемой рутинной практики не только в целом, но и в различных регионах. Возникновение устойчивости к ИТК является следствием взаимодействия многих факторов. Эти факторы включают в себя схему лечения, фармакодинамику ИТК, генетические изменения, мутации ВСЯ::АВL киназного домена или комбинацию из этих факторов [69, 240].

Поскольку неудача к терапии ИТК может возникать и при отсутствии мутаций *BCR::ABL*, необходимо изучение новых механизмов и фенотипов

резистентности к лечению, например, участвующих в метаболизме ИТК генов, абберантной экспрессии онкогенов и супрессоров опухолевого роста у больных XMЛ [36, 56, 172, 212, 233]. Изучение полиморфизма arg399gln гена xrcc1 в патогенезе хронических миелопролиферативных заболеваний проводилось А.С. Горбенко и соавт. [66]. Поиск новых маркеров эффективности терапии ингибиторами тирозинкиназ при хроническом миелолейкозов методом полноэкзомного секвенирования проводила Э. П. Адильгереева и соавт. [56]. Сочетание транслокации BCR::ABL1 и мутации JAK2V617F у больных хроническим миелолейкозом с анализом кинетики транскрипта и аллельной нагрузки при терапии ингибиторами тирозинкиназ опубликовано в 2020 году А.О. Абдуллаевым [73].

Некоторыми авторами выявлены ассоциации полиморфизма гена СҮРЗА5 (гз 7776746) и гена hOCT1 M408V (гз628031) в зависимости от терапии ИМ, хотя представленные результаты не всегда были однозначны [127, 172, 188, 233]. В нашем исследовании мы попытались установить связь полиморфизмов этих генов с критериями риска, резистентностью к лечению ИТК и общей выживаемостью пациентов в многонациональной Республике Башкортостан. Однако, изучение влияния этногенетических особенностей пациентов на полученные результаты не проводилось, в связи с малочисленностью выборки. Следовательно, необходимо дальнейшее изучение патогенетических механизмов формирования заболевания, прогнозирование течения, разработка индивидуализированного подхода к проводимой терапии в различных регионах.

Существует феномен - множественной лекарственной резистентности (Multiple drug resistance – MDR). MDR часто является результатом нарушения активного АТФ-зависимого транспорта из клеток лекарственных препаратов посредством переносчиков из семейства транспортеров ATP-binding cassette (ABC). У человека ABC-транспортеров описано более 18, а их исследований при XMЛ не так много и часто они противоречивы [201].

Известно, что иматиниб и дазатиниб являются лигандами транспортеров ABCB1 и ABCG2 в лейкемических клетках. В то же время некоторые авторы

описывают ИМ как ингибитор ABCG2, что вносит определенные противоречия по отношению его роли в развитии резистентности к проводимой терапии ИТК [99, 170, 185]. Поэтому, вопрос о том, какой из этих транспортеров является особенно значимым для развития резистентности клеток к ИМ при ХМЛ остается неизвестным [131, 184, 186].

В исследованиях Gromicho и соавт. [147] было показано, что в большинстве резистентных клеточных линий были сверх экспрессированы следующие белки переносчики: *ABCB1, ABCG2, MVP, и SLC22A1*. И это указывает на важную их роль в развитии различной чувствительности к лекарственным препаратам. Возможно, резистентный к ИТК фенотип может быть опосредован сначала одним доминантным переносчиком, но с повышением дозы лекарственного препарата происходит переключение с этого транспортера на дополнительные ABC транспортеры, экспрессирующиеся в опухоли.

Меж индивидуальная вариабельность ответа на лечение среди пациентов ХМЛ привела к поиску механизмов ответственных за такую вариабельность. Так в работах D. Кіт и соавт. [127] было показано, что, используя новый подход с несколькими генами-кандидатами, ответственными за фармакокинетику ИМ, можно предсказать результаты лечения ХМЛ. В этих исследованиях проведен скрининг 16 однонуклеотидных полиморфизмов (SNR) в пяти генах у 229 пациентов с XMЛ. Установлено, что генотип GG в ABCG2 (rs2231137), генотип АА в СҮРЗА5 (rs 7776746) были в значительной степени ассоциированы с неэффективным лечением ИМ, а генотип GG в SLC22A2 (rs683369) в поздней стадии коррелировал с высоким уровнем потери ответа или неудачей терапии [127]. В 2016 году N. Maddin и соавт. опубликовали данные о том, что пациенты из Малайзии, несущие гетерозиготный AG и гомозиготный вариант GG генотипа СҮРЗА5 были ассоциированы со значительно меньшим риском развития резистентности к иматинибу [188]. Другие авторы в когорте 106 пациентов ХМЛ показали, что два полиморфизма гена *CYP3A5* (rs 7776746) и гена *hOCT1 M408V* (rs628031) были достоверно связаны с полным цитогенетическим ответом

(ПЦГО) через 6 месяцев и полным молекулярным ответом (ПМО) через 12 месяцев лечения [172].

Наши исследования показали, что в отличие от литературных данных в выборке пациентов из РБ не встречался генотип АА в *CYP3A5* (гs 7776746) ассоциированный с резистентностью к ИТК, а между больными с разными критериями риска, разной эффективностью лечения ИТК не было обнаружено достоверных изменений в распределении частот аллелей и генотипов *CYP3A5*.

Несмотря на большое число опубликованных статей, связанных с исследованием полиморфизма генов, участвующих в фармакогенетике и фармакодинамике ИТК, неоптимальным ответом больных ХМЛ на таргетную терапию ИТК, до сих пор точно неизвестно, какой из них является самым решающим для приобретения резистентности клетками ХМЛ к иматинибу.

Распределение частот генотипов полиморфного варианта rs683369 в гене переносчике органических катионов (hOCT1) между группами пациентов РБ с разной эффективностью лечения показало, что генотип G\*G\* встречался реже, но был ассоциирован с наименьшей продолжительностью жизни пациентов, генотип \*C\*C достоверно чаще выявлялся у пациентов с ХМЛ с оптимальным ответом на лечение по сравнению с больными резистентными к лечению. Частота встречаемости генотипа \*C\*G, по нашим данным, была почти в два раза выше у больных ХМЛ, резистентных к терапии ИТК.

Нами был выполнен анализ ассоциации показателей полиморфного локуса локуса гs683369 гена *hOCT1* с показателями критериев риска, сочетающих показатель возраста, размеров селезенки, уровень тромбоцитов и других показателей крови (1-низкий риск, 2-помежуточный риск, 3-высокий риск). Выявлена статистически значимая зависимость, а следовательно, и клиникогенетическая ассоциация между этими показателями (р <0,001) (используемый метод: Хи-квадрат Пирсона). Так при низком риске процентная доля локуса СС составила 95,7%, при промежуточном риске- 71,9%, при высоком-25,9%. Наибольшая доля локуса GC-74,1% пришлась на высокий риск и 28,1% на промежуточный. Эта зависимость подтверждает, что наличие генотипа СС

полиморфного локуса rs683369 гена *hOCT1* является не только благоприятным прогностическим признаком по ответу на лечение ИТК, выживаемость пациентов с ХМЛ, но и свидетельствует о наиболее низком риске развития неблагоприятного прогноза течения заболевания. Полученные данные не соответствуют результатам А N.A. Hamed и соавт. [233], так они не нашли ассоциации полиморфизма гена *hOCT1* C480G с ответом на лечение пациентов из Египта [233]. Однако, они вполне сопоставимы с данными других авторов, где генотип \*G\*G (480C> G (F160L), в гене (rs683369) в прогрессирующей стадии ХМЛ коррелировал с высокой вероятностью появления резистентности к терапии [127].

В работах М. Gromicho и соавт. [147] было обнаружено, что в большинстве изученных ими резистентных клеточных линий были сверхэкспрессированы несколько белков переносчиков, а именно *ABCB1*, *ABCG2*, *MVP и hOCT-1*.

Учитывая, что транспорт лекарственных препаратов в клетку может быть опосредован геном переносчиков органических катионов (hOCT1) и может влиять на эффективность лечения ИМ, в рамках нашего исследования также проанализирована взаимосвязь уровня экспрессии гена hOCT1 и гена ABCG2 в лейкоцитах периферической крови пациентов с ХМЛ, в контрольной группе здоровых лиц, клеточной линии К562 и при разном ответе на терапию ИТК.

В клеточной линии K562, так же как и в контрольной группе нами обнаружен низкий уровень экспрессии гена hOCT. При этом в группе больных с ХМЛ получающих терапию ИТК он оказался наиболее высоким (р <0,05), однако статистически значимых различий в уровне экспрессии гена hOCT1 в лейкоцитах периферической крови у пациентов с резистентностью к терапии и оптимальным ответом на ИТК не было выявлено. Вероятно, активность гена переносчика hOCT1 при ХМЛ зависит от концентрации ИМ в крови и требует дальнейших углубленных исследований.

Уровень экспрессии гена ABCG2 у больных ХМЛ на терапии ИТК также был наиболее высоким. У пациентов, ответивших на лечение ИТК он был достоверно выше по сравнению с выборкой контроля ((р <0,05). Полученные

данные свидетельствуют, о возможном участии гена *ABCG2*, являющегося детерминантой внутриклеточной концентрации лекарственных препаратов, в метаболизме ИТК при ХМЛ и его влиянии на исход терапии пациентов ХМЛ.

Уровень экспрессии гена hOCT1 и гена ABCG2 показали линейный характер зависимости на терапию ИТК, что свидетельствуют, об их несомненном участии в метаболизме препаратов ИТК при ХМЛ.

Таким образом, исследование полиморфного локуса rs683369 гена hOCT1 в отличие от rs776746 гена СҮРЗА5 имеет прогностическое значение в оценке течения, эффективности лечения ИТК больных ХМЛ в РБ. Так, частота выше у больных ХМЛ встречаемости генотипа \*С\*G была значимо резистентных к терапии ИТК, генотип G\*G\* встречался реже и был BCR::ABL, ассоциирован высокой экспрессией гена с наименьшей продолжительностью жизни, а наличие генотипа С\*С\* оказалось благоприятным общей выживаемости больных. Полученные данные ДЛЯ течения, зависимость подтверждает, что наличие генотипа СС является не только благоприятным прогностическим признаком по ответу на лечение ИТК, выживаемость пациентов с ХМЛ и свидетельствует о наиболее низком риске развития неблагоприятного прогноза течения заболевания. Анализ литературных данных и наше исследование позволяют предположить, что развитие заболевания, также, как и проявление потенциального препарат-резистентного фенотипа является скорее всего мульти факториальным процессом и требует дальнейшего изучения проблемы лекарственной резистентности при ХМЛ. исследование клинико-генетических ассоциаций ХМЛ раскрывает некоторые патогенетические механизмы развития резистентности к терапии ИТК больных ХМЛ, определяет индивидуализированный подход к ведению и мониторированию пациентов, определению прогноза, течения и определению персонифицированной тактики в лечении ХМЛ.

### **ВЫВОДЫ**

- 1. Установлено, что за период 2000-2020гг в Республике Башкортостан количество пациентов с хроническим миелолейкозом в регионе значительно увеличилось за счет повышения заболеваемости в 2 раза и роста распространенности в 5 раз после внедрения ИТК, что указывает на повышение эффективности диагностики и лечения за этот период. Показатели смертности от ХМЛ существенно не изменились.
- 2. Клинико-гематологическая характеристика пациентов с ХМЛ в Республике Башкортостан не выявила каких-либо значимых региональных особенностей заболевания и соответствовала критериям оценки Российской части популяционного исследования EUTOS. Также выявляется преимущественно хроническая фаза ХМЛ (96%), низкий и промежуточный риск прогресса заболевания по J.Sokal (78,3%), низкая регистрируемая заболеваемость в старших возрастных группах (20%).
- 3. Обнаружено, что у пациентов с резистентным течением и высоким уровнем экспрессии гена *BCR::ABL*, на фоне лечения ингибиторами тирозинкиназ, выявляются следующие мутации киназного домена гена *BCR::ABL: M351T, T315I, M244V и H396R*. Наиболее высокий средний уровень экспрессии химерного гена наблюдался у пациентов с компаунд-мутацией *T315I+M351T* (медиана экспрессии 442,3%), а также пациентов с часто встречаемой мутацией *M351T* (медиана экспрессии 94,6%).
- 4. Анализ клинико-генетических ассоциаций частот генотипов полиморфных вариантов генов *CYP3A5* и *hOCT1* у больных XMЛ показал, что генотип  $C^*C^*$  полиморфного локуса rs683369 гена *hOCT1* является не только благоприятным прогностическим признаком по ответу на лечение ИТК, выживаемость пациентов, но и свидетельствует о наиболее низком риске развития неблагоприятного прогноза течения заболевания ( $\chi$ 2=3,94, p=0,04, OR=0,38). Генотип  $G^*C^*$  ассоциирован с высоким риском неблагоприятного прогноза, резистентностью к терапии ИТК ( $\chi$ 2=3,92, p=0,04, OR=2,67).

Достоверных клинико-генетических ассоциаций с распределением частот аллелей и генотипов полиморфного локуса (rs776746) гена СҮРЗА5 не получено.

5. Уровнь экспрессии гена *hOCT1* и гена *ABCG2* в лейкоцитах периферической крови пациентов с ХМЛ, в сравнении с контролем и линией клеток К562, показал на их зависимость от терапии ИТК, а следовательно, и опосредованное участие в их метаболизме.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

- 1. Значимый рост контингента пациентов с XMЛ за последние годы в РБ требует рационального планирования бюджетного финансирования и совершенствования организации медицинской помощи путем повышения эффективности диагностики, прогностических факторов, проведения мониторинга и лекарственного обеспечения ИТК.
- 2. Для определения прогноза течения и ответа на лечение ИТК при ХМЛ комплексное исследование, включающее в себя определение генотипа полиморфного локуса rs683369 гена *hOCT1* в дебюте заболевания будет способствовать повышению уровня стратификации рисков.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

аллоТГСК – трансплантация аллогенных гемопоэтических стволовых клеток

БК – бластный криз

БМО – большой молекулярный ответ

ГлМО – глубокий молекулярный ответ

ДХА – дополнительные хромосомные аберрации

ИТК – ингибиторы тирозинкиназ

ИТК1 – ингибиторы тирозинкиназ первого поколения

ИТК2 – ингибиторы тирозинкиназ второго поколения

ИФ-α – интерферон-альфа

МО – молекулярный ответ

МинЦО – минимальный цитогенетический ответ

мРНК – матричная РНК

МЦО – малый цитогенетический ответ

ПГО – полный гематологический ответ

ПЦО – полный цитогенетический ответ

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПЦР-РВ – количественная ПЦР в реальном времени

РБ - Республика Башкортостан

РБЛ – ремиссия без лечения

СЦИ – стандартное цитогенетическое исследование

ТКМ – трансплантация костного мозга

 $\Phi A - \varphi$ аза акселерации

ХМЛ – хронический миелоидный лейкоз

ХФ – хроническая фаза

ЦО – цитогенетический ответ

ЧЦО – частичный цитогенетический ответ

АВСG2 - АТФ-зависимый мембранный транспортер G2

BCR::ABL – химерный ген, результат транслокации между 9 и 22 хромосомами

BCR::ABL — белок с повышенной тирозинкиназной активностью, продукт гена BCR- ABL

*CYP3A5* - цитохром P450

ELN – Европейская организация по лечению лейкозов (European Leukemia Net)

ESMO – Европейское общество медицинской онкологии (European Society for Medical Oncology)

FISH – флуоресцентная гибридизация in situ (Fluorescence in situ hybridization)

IS — международная шкала количественной оценки уровня химерного транскрипта *BCR::ABL* (International Scale)

hOCT1 - переносчик органических катионов первого типа

NCCN – Национальная онкологическая сеть США (National Comprehensive Cancer Network)

Ph – филадельфийская хромосома

Ph+ – клетки, содержащие филадельфийскую хромосому

Ph— - клетки, не содержащие филадельфийскую хромосому

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Абдулкадыров, К.М. Дазатиниб: 10 лет применения в мировой клинической практике/ К.М. Абдулкадыров, В. А. Шуваев, И.С. Мартынкевич // Онкогематология. -2016. Т. 11, № 1. С. 24-33.
- 2. Анализ мутаций в гене BCR::ABL у больных хроническим миелолейкозом с высокой экспрессией гена в Республике Башкортостан / Н. Р. Рябчикова, И.Р. Минниахметов, Г. Ш. Сафуанова, Э.К. Хуснутдинова // Вестник гематологии. 2017. № 3. С. 84.
- 3. Анализ эффективности ингибиторами тирозинкиназ в третьей линии терапии у пациентов с хронической фазой хронического миелолейкоза / Е.Г. Ломаиа, А.Ю. Зарицкий, В. А. Шуваев [и др.] // Вестник гематологии. 2017. Т. 13, № 2. С. 57–58.
- 4. Быкова, А.В. Взаимосвязь полиморфизма генаUGT1A1 с частотой возникновения гипербилирубинемии у больных с хроническим миелолейкозом, получающих терапию нилотинибом / А. В. Быкова, А. Г. Туркина, Г. А. Гусарова // Гематология и трансфузиология. 2018. Т. 63, № 1. С. 8–15.
- 5. Варшавский, А.В. Клинико-эпидемиологическая характеристика гемобластозов в Республике Башкортостан: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.01.21 / Варшавский Антон Вячеславович. Уфа. 2011. 22 с.
- 6. Виноградова, О.Ю. Клиническая эволюция хронического миелолейкоза в процессе лечения ингибиторами тирозинкиназ: автореф. дис. ... д-ра мед. наук: 14.01.21 / Виноградова Ольга Юрьевна. М., 2011. 39 с.
- 7. Виноградова, О.Ю. Организация терапии хронического миелолейкоза. Первый общероссийский регистр больных хроническим миелолейкозом: анализ и перспективы / О. Ю. Виноградова, А.Г. Туркина, Н.Д. Хорошко // Гематология и трансфузиология. 2008. Т. 53, № 5. С. 54–58.
- 8. Виноградова, О.Ю. Проблемы организации лечения хронического миелолейкоза в России / О. Ю. Виноградова, С. М. Куликов, С. М. Куцев // Клиническая онкогематология. 2011. T. 4, № 4. C. 292–97.

- 9. Власова, Ю.Ю. Риск-адаптированная терапия пациентов хроническим миелолейкозом с мутацией Т3151: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.01.21 / Власова Юлия Юрьевна. СПб., 2018. 22 с.
- 10. Влияние молекулярно-генетических и цитогенетических факторов на эффективность аллогенной трансплантации костного мозга у больных хроническим миелолейкозом / А. В. Горбунова, Т. Л. Гиндина, Е. В. Морозова [и др.] // Клиническая онкогематология. 2013. Т. 6, № 4 С. 445–50.
- 11. Влияние различных хромосомных аномалий в Ph-позитивных клетках костного мозга на течение хронического миелолейкоза при терапии ингибиторами тирозинкиназ / О. Ю. Виноградова, Е. А. Асеева, А. В. Воронцова [и др.] // Онкогематология. − 2012. − № 4. − С. 24–34.
- 12. Влияние сочетанного обнаружения дополнительных хромосомных аномалий в Рн-положительных клетках и мутаций гена *BCR::ABL* на выживаемость у пациентов с хроническим миелолейкозом при терапии ингибиторами тирозинкиназ / М. С. Фоминых, О. А. Шухов, В. А. Шуваев [и др.] // Гематология. Трансфузиология. Восточная Европа. − 2017. − Т. 3, № 4. − С. 919–920.
- Возилова, А.В. Диагностика хронических лейкозов с применением методов молекулярной цитогенетики. Особенности методологии / А. В. Возилова // Медицинская генетика. 2018. Т. 17, № 2. С. 24–28.
- 14. Волкова, М.А. Гливек революция в терапии хронического миелолейкоза / М. А. Волкова // Фарматека. 2003. Т. 77, № 14. С. 39–47.
- 15. Волкова, М.А. Клиническая онкогематология: руководство для врачей / М. А. Волкова. 2-е изд., перераб. и доп. М.: Медицина, 2007. 1120 с.
- 16. Волкова, М.А. Новые возможности в терапии хронического миелолейкоза: дазатиниб / М. А. Волкова // Клиническая онкогематология: фундаментальные исследования и клиническая практика. -2008. Т. 1, № 3. С. 218–226.

- 17. Волкова, М.А. Терапия хронических лейкозов в 21 веке / М. А. Волкова // Эффективная фармакотерапия в онкологии, гематологии и радиологии. -2009. -№ 2. C. 2-7.
- 18. Выбор терапии первой линии хронического миелолейкоза: моделирование клинико-экономических факторов / В. А. Шуваев, К. М. Абдукадыров, И. С. Мартынкевич [и др.] // Клиническая онкогематология. 2015. Т. 8, № 1. С. 78—83.
- 19. Гематология: национальное руководство / под ред. О.А. Руковицина. М.: ГОЭТАР Медиа, 2015. 776 с.
- 20. Голенков, А.К. Эффективность программы лечения хронического миелолейкоза гливеком в широкой клинической практике / А. К. Голенков, Л. Л. Высоцкая, Е. В. Трифонова // Альманах клинической медицины. 2008. Т. 18. С. 9–13.
- 21. Давыдов, М.И. Заболеваемость злокачественными новообразованиями населения России и стран СНГ в 2007 г. / М. И. Давыдов, Е. М. Аксель // Вестник РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН. 2009. Т. 20, № 3 (прил. 1). С. 52—90.
- 22. Дазатиниб в первой и второй линиях терапии хронического миелолейкоза: эффективность, безопасность жизни пациентов / Т. И. Ионова, Н.Б. Булиева, О.Ю. Виноградова [и др.] // Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика. 2017. Т. 10, № 2. С. 206–217.
- 23. Дополнительные хромосомные аберрации у пациентов с хроническим миелолейкозом / И. С. Мартынкевич, Л. С. Мартыненко, М. П. Иванова [и др.] // Гематология и трансфузиология. 2007. Т. 52, № 2. С. 28–35.
- 24. Ефремова, О.В. Особенности заболеваемости хроническим миелолейкозом в Алтайском крае / О. В. Ефремова, А. Н. Мамаев, В.А. Елыкомов // Сибирский научный медицинский журнал. 2019. Т. 39, № 2. С. 99–103.

- 25. Заболеваемость хроническим миелолейкозом в 6 регионах России по данным популяционного исследования 2009 2012 / С. М. Куликов, О. Ю. Виноградова, Е. Ю. Челышева [и др.] // Терапевтический архив. 2014. Т. 86,  $N_{\odot}$  7. С. 24—30.
- 26. Зельцер, А.Н. Молекулярно-генетическая характеристика хронического миелоидного лейкоза / А. Н. Зельцер, Е. В. Бурнашева, Ю. В. Шатохин // Журнал фундаментальной медицины и биологии. 2016. № 1. С. 4–14.
- 27. Изменения в клетках предшественницах стромального микроокружения костного мозга больных хроническим миелолейкозом в дебюте заболевания и в ходе лечения / Н. А. Петинати, И. Н. Шипунова, А. Е. Бигильдеев [и др.] // Гематология и трансфузиология. 2019. Т. 64, № 4. С. 424—435.
- 28. Исследование уровня экспрессии генов WT1 и HMGA2 при хронических миелопролиферативных заболеваниях / М. А. Столяр, А. С. Горбенко, М.А. Михалев [и др.] //Лабораторная служба. 2018. Т. 7, № 4. С. 26–31.
- 29. Качество жизни больных хроническим миелолейкозом на фоне лечения ингибиторами тирозинкиназы I ИII поколения (обзор литературы) / Е. Ю. Федорова, К. В. Наумова, С. П. Кривова [и др.] // Аспирантский вестник Поволжья. 2016. № 1–2. С. 120–125.
- 30. Качество жизни больных хроническим миелолейкозом при длительной терапии ингибиторами тирозинкиназ / П. С. Красикова, Т. И. Ионова, Г. Б. Кучма [и др.] // Гематология и трансфузиология. 2018. Т. 63,  $\mathbb{N}$  1. С. 145.
- 31. Киялбекова, Ж.А. Результаты лечения больных детей с хроническим миелолейкозом / Ж. А. Киялбекова, А. Д. Исманбекова, А. А. Мусатаева // Онкология и радиология Казахстана. 2019. Приложение. С. 82.
- 32. Клиническая и гематологическая характеристика больных хроническим миелолейкозом в современных условиях: результаты Российской

- части международного проспективного популяционного исследования eutos population-based cml study / О. В. Лазарева, А. Г. Туркина, Е. Ю. Челышева [и др.] // Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика. 2017. Т. 10, № 1. С. 65–74.
- 33. Клинические рекомендации по диагностике и лечению хронического миелолейкоза / колл. авт. под ред. акад. В. Г. Савченко. Режим доступа: https://npngo.ru/uploads/media\_document/278/f173f164-2927-4bfd-85cf-45fda23453fb.pdf
- 34. Клинические рекомендации по диагностике и лечению хронического миелолейкоза / А. Г. Туркина, А.Ю. Зарицкий, В.А. Шуваев [и др.] // Клиническая онкогематология. 2017. Т. 10, № 3. С. 294–316.
- 35. Копнин, Б.П. Мишени действия онкогенов и опухолевых супрессоров: ключ к пониманию базовых механизмов канцерогенеза / Б.П. Копнин // Биохимия. 2000. Т. 65. С. 5–33.
- 36. Копнин, Б.П. Опухолевые супрессоры и мутаторные гены / Б.П. Копнин // Канцерогенез. М.: Медицина, 2004. С. 125–156.
- 37. Коробкин, Е.А. Хронический миелолейкоз актуальные вопросы комплаентности пациентов к проведению стандартной терапии I линии / Е. А. Коробкин, Ю. В. Губина, М. Н. Захарова // Вестник Челябинской областной клинической больницы. 2017. Т. 35, № 1. С. 41–43.
- 38. Коррекция нейтропении и тромбоцитопении, обусловленных терапией ингибиторами тирозинкиназ при хроническом миелолейкозе / В. А. Шуваев, М. С. Фоминых, И. С. Мартынкевич [и др.] // Онкогематология. 2013. № 4. С. 7–12.
- 39. Куцев, С.И. Генетический мониторинг таргетной терапии хронического миелоидного лейкоза: автореф. дис. ... д-ра мед. наук: 03.00.15: 14.00.29 / Куцев С. И. М., 2009. 39 с.
- 40. Куцев, С.И. Значение анализа мутаций гена BCR::ABL в оптимизации таргетной терапии хронического миелолейкоза / С. И. Куцев, М. В. Вельченко // Клиническая онкогематология. 2008a. Т. 1, № 3. С. 190—199.

- 41. Куцев, С.И. Молекулярно-генетический мониторинг терапии хронического миелолейкоза ингибиторами тирозинкиназ / С. И. Куцев, М. В. Вельченко, А. Н. Зельцер // Онкогематология. 2008b. № 4. С. 17–25.
- 42. Куцев, С.И. Роль мутаций гена BCR::ABL в развитии рефрактерности к иматинибу у пациентов с хроническим миелолейкозом / С. И. Куцев, М. В. Вельченко, А. Н. Зельцер // Клиническая онкогематология. 2009. Т. 1,  $\mathbb{N}$  4. С. 303-309.
- 43. Миниахметов, И.Р. Анализ изменений нуклеотидной последовательности в гене BCR/ABL1 у больных ХМЛ из Республики Башкортостан / И.Р. Миниахметов, Н. Р. Рябчикова, Д. В. Исламгулов // Медицинская генетика. -2011. -№ 10. -C. 15–16.
- 44. Многолетняя терапия хронического миелолейкоза ингибиторами тирозинкиназ: оценка токсичности препаратов и резистентность к первой линии терапии / В. Н. Ядрихинская, И. И. Мулина, Т. Н. Александрова [и др.] // Якутский медицинский журнал. 2017. Т. 58, № 2. С. 62–64.
- 45. Молекулярная диагностика хронического миелолейкоза / А. В. Мисюрин, Е. В. Аксенова, А.А. Крутов [и др.] // Гематология и трансфузиология. -2007. № 2. C. 35–40.
- 46. Молекулярный мониторинг эффективности терапии больных хроническим миелолейкозом в России / М. В. Дубина, Д. А. Куевда, Т. Е. Хомякова [и др.] // Современная онкология. 2010. Т. 12. С. 11–17.
- 47. Мусерская, М. Н. Аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток у больного с хроническим миелолейкозом в фазе бластного криза с первичной резистентностью к ингибиторам тирозинкиназ первого и второго поколения / М. Н. Мусерская, Т. А. Киселёва // Здравоохранение Чувашии. 2018. № 2. С. 13–17.
- 48. Овсепян, В.А Роль полиморфизмов генов глутатион-S-трансфераз М1 (GSTM1) и Т1 (GSTT1) в развитии и прогрессировании хронического миелолейкоза, а также ответа на терапию иматинибом / В. А. Овсепян, А. С.

- Лучинин, Т. П. Загоскина // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. -2014. Т. 158, № 8. С. 210–213.
- 49. Опыт и перспективы клинического применения бозутиниба у пациентов с хроническим миелейкозом / В. А. Шуваев, О. Ю. Виноградова, И. С. Мартынкевич [и др.] // Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика. − 2018. − Т. 11, № 4. − С. 288–294.
- 50. Отдаленные результаты терапии дазатинибом и анализ особенностей течения плеврального выпота у больных в поздней хронической фазе хронического миелолейкоза после неудачи лечения иматинибом / Г. А. Гусарова, А. Г. Туркина, А. В. Воронцова [и др.] // Сибирский научный медицинский журнал. 2014. Т. 34, № 6. С. 27–36.
- 51. Отдаленные результаты терапии ингибиторами тирозинкиназ у больных хроническим миелолейкозом в ранней и поздней хронической фазе. / О. А. Шухов, А. Г. Туркина, Е. Ю. Челышева [и др.] // Клиническая онкогематология. 2016. Т. 9, № 3. С. 368.
- 52. Панева, М.А. Эффективность терапии Хронического миелолекоза ингибиторами тирозинкиназы по данным анализа популяционного регистра Омской области / М. А. Панева, М. Н. Иванюк, А. А. Заставная // Вестник гематологии. 2019. Т. 15, № 3. С. 47–48.
- 53. Персонализация терапии хронического миелолейкоза-прогностическое значение индивидуальной динамики уровня  $BCR::ABL \ / M. C.$  Фоминых, К. М. Абдулкадыров, А. Г. Туркина [и др.] // Гематология и трансфузиология. 2016. Т. 6, № 1. С. 4–10.
- 54. Петрова, А. Н. Ремиссия без лечения у больных хроническим миелолейкозом: обзор литературы / А. Н. Петрова, Е. Ю. Челышева, А. Г. Туркина // Онкогематология. 2019. Т. 14, № 3. С. 12–22.
- 55. Печенкина, А. А. Механизм формирования филадельфильской хромосомы и ее роль в развитии хронического миелоидного лейкоза / А. А. Печенкина // Молодой ученый. 2018. Т. 211, № 25. С. 183–187.

- 56. Поиск новых маркеров эффективности терапии ингибиторами тирозинкиназ при хроническом миелолейкозв методом полноэкзомного секвенирования / Э. П. Адильгереева, А. В. Лавров, С. А. Смирнихина [и др.] // Гематология и трансфузиология. 2018. Т. 63, № 2. С. 134–143.
- 57. Полноэкзомные делеции гена ABL1 у больных с хроническим миелолейкозом как фактор резистентности к ингибиторам тирозинкиназ / И. А. Михайлов, О. Ю. Нестерова, А. О. Абдуллаев [и др.] // Гематология и трансфузиология. 2018. Т. 63, № 1. С. 81.
- 58. Предварительные результаты проспективного исследования по ведению больных хроническим миелолейкозом с глубокой молекулярной ремиссией без терапии / Е. Ю. Челышева, А. Г. Туркина, О. А. Шухов [и др.] // Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика. 2017. Т. 10, № 4. С. 585–586.
- 59. Раннее выявление цитогенетического рецидива при динамическом исследовании уровня BCR::ABL-транскрипта у больного хроническим миелолейкозом / Е. Ю. Челышева, А. Г. Туркина, А.В. Мисюрин [и др.] // Гематология и трансфузиология. 2007. № 2. С. 50—51.
- 60. Регистр больных хроническим миелолейкозом в Российской Федерации: от наблюдательного исследования к оценке эффективности терапии в клинической практике / А. Г. Туркина, Н. В. Новицкая, А. К. Голенков // Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика. − 2017. − Т, 10, № 3. С. 390–401.
- 61. Результаты многоцентрового исследования терапии гливеком больных хроническим миелолейкозом в хронической фазе / А.Ю. Зарицкий, Э.Г. Ломаиа, О. Ю. Виноградова [и др.] // Гематология и трансфузиология. − 2007. − № 2. − С. 13–17.
- 62. Результаты наблюдения без терапии ингибиторами тирозинкиназ у больных хроническим миелолейкозом с глубоким молекулярным ответом / Е. Ю. Челышева, А. Г. Туркина, В. А. Шуваев [и др.] // Гематология и трансфузиология. 2016. № 1, прил. 1.-C.80.

- 63. Результаты наблюдения за пациентами с хроническим миелолейкозом с глубоким молекулярным ответом без терапии ингибиторами тирозинкиназ: исторический опыт и данные проспективного многоцентрового исследования / Е. Ю. Челышева, А. Н. Петрова, О.А. Шухов [и др.] // Гематология и трансфузиология. − 2020. − Т. 65, № 1. − С. 52.
- 64. Роль белка *BCR::ABL* в лейкозогенезе / Г.Д. Телегеев [и др.] // Экспериментальная онкология. − 1999. − Т. 21. − С. 182−194.
- 65. Роль молекулярно-генетических методов исследования в диагностике онкогематологических заболеваний у пациентов с хроническим миелейкозом / Н.С. Лазорко, Н. Т. Сиордия, Е. Н. Горюнова [и др.] // Вестник гематологии. 2019. Т. 15,  $\mathbb{N}$  2. С. 43–44.
- 66. Роль полиморфизма arg399gln гена xrcc1 в патогенезе хронических миелопролиферативных заболеваний / А. С. Горбенко, М. А. Столяр, Т. Н. Субботина [и др.] // Гематология и трансфузиология. 2016. Т. 61, № 3. С. 143—145.
- 67. Роль селективности ингибиторов тирозинкиназ в развитии побочных эффектов при терапии хронического миелолейкоза / А. А. Зейфман, Е. Ю. Челышева, А. М. Пурина [и др.] // Клиническая онкогематология. 2014. Т. 7, № 1. С. 16—27.
- 68. Российский регистр по лечению хронического миелоидного лейкоза в рутинной клинической практике: итоги многолетней работы / А. Г. Туркина, А. К. Голенков, Л.И. Напсо [и др.] // Эффективная фармакотерапия. 2015. № 10. С. 8–13.
- 69. Рябчикова, Н.Р. Эпидемиология хронического миелолейкоза в Республике Башкортостан / Н. Р. Рябчикова, Г. Ш. Сафуанова, В. И. Никуличева // Клиническая онкогематология. 2018. Т. 11. С. 349–353.
- 70. Сафуанова, Г.Ш. Эпидемиология хронического миелолейкоза в Республике Башкортостан и организация терапии / Г. Ш. Сафуанова, А. Б. Бакиров, В. И. Никуличева // Медицинский вестник Башкортостана. 2017. № 3. С. 142—145.

- 71. Синдром отмены терапии ингибиторами тирозинкиназ у больных хроническим миелолейкозом в проспективном клиническом исследовании по наблюдению в ремиссии без лечения / А. Н. Петрова, Е. Ю. Челышева, О. А. Шухов [и др.] // Гематология и трансфузиология. 2020. Т. 65, № 1. С. 94.
- 72. Случай вариантной транслокации Т (3;9;22) (P24;Q34;Q11) при хроническом миелоидном лейкозе / Х.Я. Каримов, К.Т. Бобоев, Б.Р. Алланазарова [и др.] // Вопросы онкологии. 2018. Т. 64, № 6. С. 810—814.
- 73. Сочетание транслокации BCR::ABL1 и мутации JAK2V617F у больных хроническим миелолейкозом: кинетика транскрипта и аллельная нагрузка при терапии ингибиторами тирозинкиназ / А. О. Абдуллаев, А.А. Одилов, Е. А. Степанова [и др.] // Гематология и трансфузиология. 2020. Т. 65,  $\mathbb{N}$  S1. С. 55—56.
- 74. Стандартизация молекулярной диагностики хронического миелолейкоза / Е. В. Аксенова, А.А. Крутов, И. Н. Солдатова [и др.] // Клиническая онкогематология. 2010. N 2. C. 160–165.
- 75. Тактика ведения больных хроническим миелолейкозом во время беременности (анализ данных литературы и практические рекомендации) / Е. Ю. Челышева, А. Г. Туркина, Е. С. Полушкина [и др.] // Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика. 2019. Т. 12, № 2. С. 202–210.
- 76. Терапия хронического миелолейкоза согласно современным рекомендациям: результаты пилотного проспективного исследования «Ранняя Индукционная Терапия и Мониторинг (РИТМ)» / О. А. Шухов, А. Г. Туркина, Е. Ю. Челышева [и др.] // Вестник гематологии. 2019. Т. 15, № 2. С. 69.
- 77. Тихонова, В.В. Резистентность хронического миелолейкоза к ингибиторам тирозинкиназ: 10 лет изучения профиля мутаций гена BCR::ABL в России (2006—2016 гг.) / В.В. Тихонова, М.А. Исаков, В.А. Мисюрин // Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика. 2018. Т. 11, № 3. С. 227—233.

- 78. Тугузбаева, Г.Ф. Гемобластозы в Башкирской АССР: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14. 00. 05 / Тугузбаева Г. Ф. М., 1974. 24 с.
- 79. Туркина, А.Г. Протокол диагностики и лечения хронического миелолейкоза / А. Г. Туркина, О. А. Шухов, Е. Ю. Челышева // Алгоритмы диагностики и протоколы лечения заболеваний системы крови: в 2 т. М., 2018. С. 741–775.
- 80. Туркина, А.Г. Стратегия терапии хронического миелолейкоза: возможности и перспективы / А. Г. Туркина, Е. Ю. Челышева // Терапевтический архив. -2013. Т. 85, № 7. С. 4-9.
- 81. Туркина, А.Г. Цитогенетический и молекулярный ответ ранние маркеры эффективности терапии Гливеком больных Ph+-хроническим миелолейкозом / А. Г. Туркина, Е. Ю. Челышева // Фарматека. 2004. № 18. С. 95.
- 82. Фармакоэкономический анализ ремиссии хронического миелолейкоза без лечения / В. А. Шуваев, К. М. Абдулкадыров, А. Г. Туркина [и др.] // Гематология и трансфузиология. 2015. № 4. С. 14–20.
- 83. Федеральные клинические рекомендации по диагностике и терапии хронического миелолейкоза. / К. М. Абдулкадыров, А. О. Абдуллаев, Л. Б. Авдеева [и др.] // Вестник гематологии. 2013. Т. 9, № 3. С. 4–40.
- 84. Хронический миелолейкоз в работе врача общей практики / В. В. Скворцов, А. В. Тумаренко, С. С. Байманкулов, Б. Н. Левитан // Терапевт. 2019.  $N_2$  1. С. 57—62.
- 85. Хронический миелолейкоз: многолетний опыт таргетной терапии / К.М. Абдулкадыров, В. А. Шуваев, И. С. Мартынкевич [и др.] // Клиническая онкогематология. 2016. Т. 9, № 1. С. 54–60.
- 86. Хронический миелолейкоз: молекулярный мониторинг в клинической практике / Н. Р. Рябчикова, И. Р. Минниахметов, Г. Ш. Сафуанова [и др.] // Онкогематология.  $2013. N_2 1. C. 1-16.$
- 87. Хронический миелолейкоз: Эпидемиология и пятнадцатилетние результаты терапии в Новосибирской области / А. С. Лямкина, Л. М. Маслова, О.

- В. Науменко [и др.] // Сибирский научный медицинский журнал. 2020. Т. 40,
   № 1. С. 31–38.
- 88. Царева, Е.Г. Гемобластозы в Республике Башкортостан автореф.: дис. ... канд. мед. наук / Царева Е. Г. Уфа, 1999. 23 с.
- 89. Частота встречаемости мутаций киназного домена гена BCR::ABL у больных хроническим миелолейкозом, резистентных к терапии иматинибом / А.В. Мисюрин, Е.Н. Мисюрина, В. В. Тихонова [и др.] // Российский биотерапевтический журнал. 2016. Т. 15, № 4. С. 102–109.
- 90. Челышева, Е.Ю. Проблема приверженности терапии хронического миелолейкоза: понять пациента и найти решения / Е. Ю. Челышева, А.В. Галактионова, А.Г. Туркина // Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика. 2013. Т. 6, № 2. С. 157–165.
- 91. Челышева, Е.Ю. Мутации гена *BCR::ABL* при хроническом миелоидном лейкозе / Е.Ю. Челышева, О.А. Шухов, О.В. Лазарева // Клиническая онкогематология. 2012. Т. 5. С. 13–20.
- 92. Четверина, Е.В. Диагностика онкологических заболеваний, ассоциированных с хромосомными транслокациями / Е.В. Четверина, А.Б. Четверин // Успехи биологической химии. 2010. № 50. С. 387–446.
- 93. Шухов, О.А. Молекулярная и цитогенетическая характеристика Ph- позитивного клона у больных хроническим миелолейкозом при длительном воздействии ингибиторов тирозинкиназ: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.01.21 / Шухов Олег Александрович. М., 2015. 26 с.
- 94. Экспрессия гена *BCR::ABL*1 у пациентов с хроническими миелпролиферативными заболеваниями с признаками прогрессироания / Л.А. Кесаева, Е.Н. Мисюрина, Д.С. Марьин [и др.] // Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика. 2018. Т. 11, № 4. С. 354—359.
- 95. Эпидемиологическое исследование хронического миелолейкоза у взрослого населения Нижегородской области за период 1980-2003гг. / С.А.

- Волкова, О.В. Ковалишена, М.В. Прыткова [и др.] // Гематология и трансфузиология. -2005. Т. 50, № 2. С. 8-13.
- 96. Эффект OT терапии иматинибом ПО данным клиникоэпидемиологического мониторинга хронического миелолейкоза В нижегородской области за период 2000-2010г. / С.А. Волкова, О.В. Ковалишина, Е.А. Гостюжова [и др.] // Гематология и трансфузиология. – 2011. – Т. 56, № 4. – C. 17–19.
- 97. A 10-year median follow-up study after allogeneic stem cell transplantation for chronic myeloid leukemia in chronic phase from HLA-identical sibling donors / M. Robin, P. Guardiola, A. Devergie [et al.] // Leukemia. -2005. Vol. 19,  $\mathbb{N}_{2}$  9. P. 1613-20.
- 98. A worldwide observational registry collecting longitudinal data on management of |chronic myeloid leukemia patients (The WORLD CML Registry)-2nd Annual interim analizis / R. Pasguini, J. Cortes, H.M. Kantarjian [et al.] // Blood.  $-2010.-Vol.\ 116,\ No.\ 21.-P.\ 2292.$
- 99. Abcg2 Overexpression Represents a Novel Mechanism for Acquired Resistance to the Multi-Kinase Inhibitor Danusertib in BCR::ABL-Positive Cells In Vitro / S. Balabanov, A. Gontarewicz, G. Keller [et al.] // PLoS One. 2011. Vol. 6,  $Noldsymbol{0}$  4. P. e19164.
- 100. Aberrant methylation of the death-associated protein kinase 1 (DAPK1) CpG island in chronic myeloid leukemia / J. Qian, Y. Wang, J. Lin [et al.] // Eur. J. Haematol. 2008. Vol. 82. P. 119-123.
- 101. Abruzzese, E. Back to the future: Treatment-free remission and pregnancy in chronic myeloid leukemia / E. Abruzzese // Eur. J. Haematol. 2019. Vol. 102, N 2. P. 197–199.
- 102. Active transport of imatinib into and out of cells: implications for drug resistance / J. Thomas, L. Wang, R.E. Clark [et al.] // Blood. -2004. Vol. 104, N 12. P. 3739-3745.
- 103. Activity of a specific inhibitor of the *BCR::ABL* tyrosine kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia with the

- Philadelphia chromosome / B.J. Druker, C.L. Sawyers, H. Kantarjian [et al.] // N. Engl. J. Med. 2001. Vol. 344, No 14. P. 1038-1042.
- 104. Acute myeloid leukemia in the real world: why population-based registries are needed / G. Juliusson, V. Lazarevic, A. Horsterdt [et al.] //Blood. 2012. Vol. 119, №17. P. 3890-99.
- 105. Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation Is an Effective Salvage Therapy for Patients with Chronic Myeloid Leukemia Presenting with Advanced Disease or Failing Treatment with Tyrosine Kinase Inhibitors / A.P. Nair [et al.] // Biol. Blood Marrow Transplant. 2015. Vol. 21, № 8. P. 1437–1444.
- 106. Allogeneic stem cell transplantation for blast crisis CML in TKI era, analysis of pre-transplant variables on transplant outcome / F. Nicolini, L. Modolo, N. Raus [et al.] // Blood. 2010. Vol. 116. P. 2266.
- 107. Allogeneic stem-cell transplan- tation provides excellent results in advanced stage chronic myeloid leukemia with major cytogenetic response to pretransplant imatinib therapy / M. Weisser, M. Schleuning, C. Haferlach [et al.] // Leuk. Lymphoma. -2007. Vol. 48, N 2. P. 295-301.
- 108. Allogeneic transplantation in chronic myeloid leukemia and the effect of tyrosine kinase inhibitors on survival, a quasi-experimental study / M. Ozen, C. Ustun, B. Ozturk [et al.] // Turkish J. Hematol. -2017. Vol. 34, N0 1. P. 16-26.
- 109. Assessment of imatinib as first-line treatment of chronic myeloid leukemia: 10–year survival results of the randomized CML study IV and impact of non-CML determinants / R. Hehlmann, M. Lauseker, S. Saußele [et al.] // Leukemia. 2017. Vol. 31, No 11. P. 2398-406.
- 110. Austin, G.M. The effect on lymphocyte subsets of decreasing/stopping tyrosine kinase inhibitor therapy in chronic myeloid leukaemia: data from the DESTINY trial / G.M. Austin, K. Knight, J. Bell // Brit. J. Haematol. 2019. Vol. 185. P. 752-806.
- 111. Autografting in chronic myeloid leukemia: a metaanalysis of six randomized trials / S.M. Richards, J. Apperley, A. Carella [et al.] // Haematologica. 2005. Vol. 90, suppl. 2. P. 152-3.

- 112. BCR rearrangement-negative chronic myelogenous leukemia revisited / R. Kurzrock, C.E. Bueso-Ramos, H. Kantarjian [et al.] // J. Clin. Oncol. 2001. Vol.19. P. 2915-2926.
- 113. *BCR::ABL* expression levels determine the rate of development of resistance to imatinib mesylate in chronic myeloid leukemia / D.J. Barnes, D. Palaiologou, E. Panousopoulou [et al.] // Cancer Res. 2005. Vol. 65, № 19. P. 8912-8919.
- 114. *BCR::ABL* messenger RNA levels continue to decline in patients with chronic phase chronic myeloid leukemia treated with imatinib for more than 5 years and approximately half of all first-line treated patients have stable undetectable *BCR::ABL* using strict sensitivity criteria / S. Branford, J.F. Seymour, A. Grigg [et al.] // Clin. Cancer Res. 2006. Vol. 13, №23. P. 7080–5.
- 115. Borrow, J. Guidelines for Mutation Analysis of BCR/ABL Kinase Domain / J. Borrow // WMRGL. 2007. P. 1-32.
- 116. Bosutinib (BOS) as third-line therapy for chronic phase (CP) chronic myeloid leukemia (CML) following failure with imatinib (IM) and dasatinib (DAS) or nilotinib (NIL) / T.H. Brummendorf, J.E. Cortes, H. Kantarjian [et al.] // J. Clin. Oncol. − 2011. Vol. 29, № 15 Suppl. − P. 6535.
- 117. Bosutinib is active in chronic phase chronic myeloid leukemia after imatinib and dasatinib and/or nilotinib therapy failure / J. Khoury, J.E. Cortes, H. Kantarjian [et al.] // Blood. − 2012. − Vol. 119, №15. − P. 3403-12.
- 118. Branford, S. Monitoring after successful therapy for chronic myeloid leukemia / S. Branford // ASH Annual Meeting and Exposition. 2012. P. 105-110.
- 119. Breccia, M. Second-generation tyrosine kinase inhibitors before allogeneic stem cell transplantation in patients with chronic myeloid leukemia resistant to imatinib / M. Breccia // Leuk. Res. 2010. Vol. 34, № 2. P. 143–147.
- 120. Calabretta, B. The biology of CML blast crisis / B. Calabretta, D. Perrotti // Blood. -2004. Vol. 103, N 11. P. 4010-4022.

- 121. Campiotti, L. Imatinib discontinuation in chronic myeloid leukaemia patients with undetectable *BCR::ABL* transcript level: A systematic review and a meta-analysis / L. Campiotti // Eur. J. Cancer. 2017. Vol. 77. P. 48–56.
- 122. Cayssials, E. The -7 chromosomal abnormalities with signs of myelodysplasia in chronic myeloid leukemia as a major red signal / E. Cayssials, F. Guilhot // Haematologica. -2019. Vol. 104, N 6. P. 1096-1098.
- 123. Chronic myeloid leukaemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up / A. Hochhaus, S. Saussele, G. Rosti [et al.] // Ann. Oncol. -2017. Vol. 41, No 4. P. 51.
- 124. Chronic myeloid leukemia: an update of concepts and management recommendations of European LeukemiaNet / M. Baccarani, J. Cortes, F. Pane [et al.] // J. Clin. Oncol. 2009. Vol. 27. P. 6041-6051.
- 125. Clinical features and outcomes in chronic myeloid leukemia with T315I mutation / Y.Y. Vlasova, E.V. Morozova, O.A. Shukhov [et al.] // Cell Ther. Transplant. -2017. Vol. 6, N 2. P. 26-35.
- 126. Clinical Implications of Discordant Early Molecular Responses in CML Patients Treated with Imatinib / S. Stella, V. Zammit, S. R. Vitale [et al.] // Int. J. Mol. Sci. -2019. Vol. 20, No 3. P. 2226.
- 127. Clinical Relevance of a Pharmacogenetic Approach Using Multiple Candidate Genes to Predict Response and Resistance to Imatinib Therapy in Chronic Myeloid Leukemia / D. Kim, L. Sriharsha, W. Xu [et al.] // Clin. Cancer Res. 2009. Vol. 15, №14. P. 4750-4758.
- 128. Clinical relevance of a pharmacogenetic approach using multiple candidate gene polymorphisms to predict response and resistance to imatinib mesylate therapy in chronic myeloid leukemia / D.H. Kim, L. Sriharsha, W. Xu [et al.] // Blood (ASH Annual Meeting Abstracts). 2007. Vol. 110. Abstr. 737.
- 129. Coexistence of breakpoint cluster region-Abelson1 rearrangement and Janus kinase 2 V617F mutation in chronic myeloid leukemia: A case report / S. Dulucq, J.-F. Jiang, F.-X. Jin, W. Cheng // World J. Clin. Cases. 2019. Vol. 7, № 9. P. 1087-1092.

- 130. Comparison of nilotinib and imatinib in patients (pts) with newly diagnosed chronic myeloid leukemia in chronic phase (CML-CP): ENESTnd beyond one year / R.A. Larson, P.D. le Coutre, J. Reiffers [et al.] // J. Clin. Oncol.  $-2010. \text{Vol. } 28, \, \text{No. } 15. \text{P. } 6501.$
- 131. Complex interaction of BCRP/ABCG2 and imatinib in *BCR::ABL*expressing cells: BCRP-mediated resistance to imatinib is attenuated by imatinib-induced reduction of BCRP expression / T. Nakanishi, K. Shiozawa, B.A. Hassel, D.D. Ross // Blood. 2006. Vol. 108. P. 678-684.
- 132. Constitutive overexpression of P-glycoprotein, rather than breast cancer resistance protein or organic cation transporter 1, contributes to acquisition of imatinib-resistance in K562 cells / C. Hirayama, H. Watanabe, R. Nakashima [et al.] // Pharm. Res. 2008. Vol. 25. P. 827-835.
- 133. Contribution of ABL Kinase Domain Mutations to Imatinib Resistance in Different Subsets of Philadelphia-Positive Patients: By the GIMEMAWorking Party on Chronic Myeloid Leukemia / S. Soverini, S. Colarossi, A. Gnan [et al.] // Clin. Cancer Res. 2006. Vol. 12, № 24. P. 7374-7379.
- 134. Cortes, J. Natural history and staging of chronic myelogenous leukemia / J. Cortes // Hematol. Oncol. Clin. North Am. 2004. Vol. 18. P. 569-584.
- 135. Cortes, J.E. The impact of dasatinib on pregnancy outcomes / J.E. Cortes, E. Abruzzese, E. Chelysheva // Am. J. Hematol. 2015. Vol. 90, № 12. P. 1111-5.
- 136. Cross, N.C. Molecular monitoring of chronic myeloid leukemia: principles and interlaboratory standardization / N.C. Cross, A. Hochhaus, M.C. Mu-'ller // Ann. Hematol. -2015. -Vol. 94, Nole 2. -P. 219-25.
- 137. Crystal structures of the kinase domain of c-Abl in complex with the small molecule inhibitors PD173955 and imatinib (STI-571) / B. Nagar, W.G. Bornmann, P. Pellicena [et al.] // Cancer Res. − 2002. − Vol. 62, № 15. − P. 4236-4243.

- 138. Cytogenetic and molecular responses and outcome in chronic myelogenous leukemia: need for new response definitions / H. Kantarjian, S. O'Brien, J. Shan [et al.] // Cancer. 2008. Vol. 112, № 4. P. 837-845.
- 139. Dasatinib in Imatinib-Resistant Philadelphia Chromosome—Positive Leukemias / M. Talpaz, N.P. Shah, H. Kantarjian [et al.] // N. Engl. J. Med. 2006. Vol. 354, № 24. P. 2531-41.
- 140. Dasatinib in the treatment of chronic myeloid leukemia in accelerated phase after imatinib failure: The START a trial / J.F. Apperley, J.E. Cortes, D.W. Kim [et al.] // J. Clin. Oncol. − 2009. − Vol. 27, № 21. − P. 3472-9.
- 141. Dasatinib induces complete hematologic and cytogenetic responses in patients with imatinib-resistant or -intolerant chronic myeloid leukemia in blast crisis / J. Cortes, P. Rousselot, D. Kim [et al.] // Blood. − 2007. − Vol. 109, № 8. − P. 3207-13.
- 142. Dasatinib induces notable hematologic and cytogenetic responses in chronic-phase chronic myeloid leu- kemia after failure of imatinib therapy / A. Hochhaus, H.M. Kantarjian, M. Baccarani [et al.] // Blood. 2007. Vol. 109, № 6. P. 2303-9.
- 143. Dasatinib or imatinib in newly diag- nosed chronic phase chronic myeloid leukemia: 2-year follow-up from a randomized phase 3 trial (DASISION) / H.M. Kantarjian, N.P. Shah, J.E. Cortes [et al.] // Blood.  $-2011.-Vol.\ 119,\ No.\ 5.-P.\ 1123-9.$
- 144. Deep molecular response is reached by the majority of patients treated with imatinib, predicts survival, and is achieved more quickly by optimized high-dose imatinib: results from the randomized CML-study IV / R. Hehlmann, M.C. Mu 'ller, M. Lauseker [et al.] // J. Clin. Oncol. − 2014. − Vol. 32, № 5. − P. 415-23.
- 145. Denaturing-HPLC-based assay for detection of ABL mutations in chronic myeloid leukemia patients resistant to Imatinib / S. Soverini, G. Martinelli, M. Amabile [et al.] // Clin. Chem. 2004. Vol. 50. P. 1205-1213.

- 146. Detection of major *BCR::ABL* gene expression at a very low level in blood cells of some healthy individuals / C. Biernaux, M. Loos, A. Sels [et al.] // Blood. 1995. Vol. 86. P. 3118-3122.
- 147. Development of imatinib and dasatinib resistance: dynamics of expression of drug transporters ABCB1, ABCC1, ABCG2, MVP, and SLC22A1 / M. Gromicho [et al.] // Leuk. Lymphoma. 2011. Vol. 52, № 10. P. 1980-1990.
- 148. Diagnostic performance of the molecular BCRABL1 monitoring system may impact on inclusion of CML patients in stopping trials / B. Spiess, S. Rinaldetti, N. Naumann [et al.] // PLoS One. − 2019. − Vol. 14, № 3. − P. e0214305.
- 149. Differences in treatment and monitoring of chronic myeloid leukemia with regard to age, but not sex: Results from a population-based study / M. Lauseker, R. Gerlach, W. Worseg [et al.] // Eur. J. Haematol. 2019. Vol. 103. P. 362-369.
- 150. Discontinuation of tyrosine kinase inhibitor therapy in chronic myeloid leukaemia (EURO-SKI): a prespecified interim analysis of a prospective, multicentre, non-randomised, trial / S. Saussele, J. Richter, J. Guilhot [et al.] // Lancet Oncol.  $-2018. N_{\odot} 4. P. 1470.$
- 151. Discontinuation of tyrosine kinase inhibitor therapy in chronic myeloid leukaemia (EURO-SKI): a prespecified interim analysis of a prospective, multicentre, non-randomised, trial / S. Saussele, J. Richter, J. Guilhot [et al.] // Lancet Oncol.  $-2018.-Vol.\ 9,\ No.\ 6.-P.\ 747-57.$
- 152. Dynamic modeling of imatinib treated chronic myeloid leukemia: functional insights and clinical implications / I. Roeder, M. Horn, I. Glauche [et al.] // Nat. Med. -2006. Vol. 12, N0 10. P. 1181-1184.
- 153. Early molecular response predicts outcomes in patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase treated with frontline nilotinib or imatinib / T.P. Hughes, G. Saglio, H.M. Kantarjian [et al.] // Blood. − 2014. − Vol. 123, № 9. − P. 1353-60.
- 154. Early switch to second-line tyrosine kinase inhibitor in chronic myeloid leukemia patients failing to achieve early molecular response / A.J. Klil-Drori, H. Yin, L. Azoulay [et al.] // Am. J. Hematol. − 2017. − Vol. 92, № 10. − P. 602-4.

- 155. Efficacy and Safety of Imatinib in Paediatric CML a Single Centre Study / C. Smeding, A. Szydlo, K. Pieluszczak [et al.] // In vivo 33. 2019. № 2. P. 869-875.
- 156. Epigenetic down-regulation of BIM expression is associated with reduced optimal responses to imatinib treatment in chronic myeloid leukaemia / E. Jose-Eneriza, X. Agirrea, A. Jimenez-Velascob [et al.] // Eur. J. Cancer. -2009. Vol. 45, N0 10. P. 1877-1889.
- 157. Epigenetic regulation of human cancer/testis antigen gene, HAGE, in chronic myeloid leukemia / J. Roman-Gomez, A. Jimenez-Velasco, X. Agirre [et al.] // Haematologica. 2007. Vol. 92, № 2. P. 153–162.
- 158. Epigenetic regulation of PRAME gene in chronic myeloid leukemia / J. Roman-Gomez, A. Jimenez-Velasco, X. Agirre [et al.] // Leukemia Res. 2007. Vol. 31. P. 1521–1528.
- 159. European Leukemia Net recommendations for the management and avoidance of adverse events of treatment in chronic myeloid leukaemia / J.L. Steegmann [et al.] // Leukemia. 2016. Vol. 30, № 8. P. 1648–1671.
- 160. European Leukemia Net recommendations for the management of chronic myeloid leukemia 2013 / M. Baccarani, M.W. Deininger, G. Rosti [et al.] // Blood. -2013. Vol. 122, N 6. P. 872-84.
- 161. Evidence that resistance to nilotinib may be due to *BCR::ABL*, Pgp, or Src kinase overexpression / F.X. Mahon, S. Hayette, V. Lagarde [et al.] // Cancer Res. 2008. Vol. 68. P. 9809-9816.
- 162. Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia. Recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet / M. Baccarani, G. Saglio, J. Goldman [et al.] // Blood. 2006. Vol. 108. P. 1809-1820.
- 163. Expanding Nilotinib Access in Clinical Trials (ENACT) / F.E. Nicolini, A.G. Turkina, Z.-X. Shen [et al.] // Cancer. 2012. Vol. 118, № 1. P. 118-26.
- 164. Expression of the uptake drug transporter hOCT1 is an important clinical determinant of the response to imatinib in chronic myeloid leukemia / L.

- Wang, A. Giannoudis, S. Lane [et al.] // Clin. Pharmacol. Ther. 2008. Vol. 83. P. 258-264.
- 165. Extensive pleural and pericardial effusion in chronic myeloid leukemia during treatment with dasatinib at 100 mg or 50 mg daily / M.-T. Krauth, S. Herndlhofer, M.-T. Schmook [et al.] // Haematologica. 2011. Vol. 96, № 1. P. 163-6.
- 166. Fausel, C. Targeted Chronic Myeloid Leukemia Therapy: Seeking a Cure / C. Fausel // J. Manag. Care Pharm. 2007. Vol. 13, № 8. P. S8-S12.
- 167. Final 5-Year Study Results of DASISION: The Dasatinib Versus Imatinib Study in Treatment-Naive Chronic Myeloid Leukemia Patients Trial / J. Cortes, G. Saglio, H. Kantarjian [et al.] // J. Clin. Oncol. 2016. Vol. 34, № 20. P. 2333-41.
- 168. Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia / D.J. Druker, F. Guilhot, S.G. O'Brien [et al.] // N. Engl. J. Med. 2006. Vol. 355. P. 2408-2417.
- 170. Functional ABCG2 is overexpressed on primary CML CD34+ cells and is inhibited by imatinib mesylate / N.E. Jordanides, H.G. Jorgensen, T.L. Holyoake [et al.] // Blood. -2006. Vol. 108, N 4. P. 1370-1373.
- 171. Gambacorti-Passerini, C. Long-term efficacy and safety of bosutinib in patients with advanced leukemia following resistance/intolerance to imatinib and other tyrosine kinase inhibitors / C. Gambacorti-Passerini // Am. J. Hematol. 2015. Vol. 90, № 9. P. 755–768.
- 172. Genetic variations of hOCT1 gene and CYP3A4/A5 genes and their association with imatinib response in Chronic Myeloid Leukemia / S. Vaidya, K. Ghosh, C. Shanmukhaiah [et al.] // Eur. J. Pharmacol. − 2015. − Vol. 765, № 15. − P. 124-130.

- 173. Gillet, J.P. Chemotherapy-induced resistance by ATP-binding cassette transporter genes / J.P. Gillet, T. Efferth, J. Remacle // Biochim. Biophys. Acta. − 2007. − № 1775. − P. 237-262.
- 174. Goldman, J. Why do chronic myelogenous leukemia stem cells survive allogeneic stem cell transplantation or imatinib: does it really matter? / J. Goldman, M. Gordon // Leuk. Lymphoma. 2006. Vol. 47. P. 1-7.
- 175. Goldman, J.M. Chronic myeloid leukemia-still a few questions / J.M. Goldman // Exp. Hematol. 2004. Vol. 32. P. 2-10.
- 176. Hehlmann R, On behalf of the European Leukemia Net. Chronic myeloid leukemia/R. Hehlmann, A. Hochhaus, M. Baccarani // Lancet. 2007. Vol. 370, № 9584. P. 342-50.
- 177. High frequency of point mutations clustered within the adenosine triphosphate-binding region of BCR/ABL in patients with chronic myeloid leukemia or Ph-positive acute lymphoblastic leukemia who develop imatinib (STI571) resistance / S. Branford, Z. Rudzki, S. Walshet [et al.] // Blood. 2002. Vol. 99. P. 3472-3475.
- 178. hOCT 1 and resistance to imatinib / L.C. Crossman, B.J. Druker, M.W. Deininger [et al.] // Blood. 2005. Vol. 106, № 3. P. 1133-1134.
- 179. Homozygous inactivation of the NF1 gene in bone marrow cells from children with neurofibromatosis type 1 and malignant myeloid disorders / L. Side, B. Taylor, M. Cayouette [et al.] // N. Engl. J. Med. 1997. Vol. 336. P. 1713-1720.
- 180. Hughes, T. Molecular monitoring of *BCR::ABL* as a guide to clinical management in chronic myeloid leukaemia / T. Hughes, S. Branford // Blood Rev. 2006. Vol. 20. P. 29-41.
- 181. Hughes, T.P. Moving treatment-free remission into mainstream clinical practice in CML / T.P. Hughes, D.M. Ross // Blood. 2016. Vol. 128, № 1. P. 17-23.
- 182. Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia / S.G. O'Brien, F. Guilhot, R.A. Larson [et al.] // N. Engl. J. Med. -2003. Vol. 348, N0 11. P. 994-1004.

- 183. Imatinib induces durable hematologic and cytogenetic responses in patients with accelerated phase chronic myeloid leukemia: Results of a phase 2 study / M. Talpaz, R.T. Silver, B.J. Druker [et al.] // Blood. 2002. Vol. 99. P. 1928.
- 184. Imatinib mesylate (STI571) is a substrate for the breast cancer resistance protein (BCRP)/ABCG2 drug pump / H. Burger, H. van Tol, A.W. Boersma [et al.] // Blood. 2004. Vol. 104. P. 2940-2942.
- 185. Imatinib mesylate and nilotinib (AMN107) exhibit high-affinity interaction with ABCG2 on primitive hematopoietic stem cells / C. Brendel, C. Scharenberg, M. Dohse [et al.] // Leukemia. 2007. Vol. 21. P. 1267-1275.
- 186. Imatinib mesylate is a potent inhibitor of the ABCG2 (BCRP) transporter and reverses resistance to topotecan and SN-38 in vitro / P.J. Houghton, G.S. Germain, F.C. Harwood [et al.] // Cancer Res. 2004. Vol. 64. P. 2333-2337.
- 187. Imatinib pharmacokinetics and its correlation with response and safety in chronic-phase chronic myeloid leukemia: a subanalysis of the IRIS study / R.A. Larson, B.J. Druker, F. Guilhot [et al.] // Blood. 2008. Vol. 111. P. 4022-4028.
- 188. Impact of CYP3A4\*18 and CYP3A5\*3 Polymorphisms on Imatinib Mesylate Response Among Chronic Myeloid Leukemia Patients in Malaysia / N. Maddin, A. Husin, S.H. Gan [et al.] // Oncol. Ther. 2016. Vol. 4. P. 303-314.
- 189. Impact of second decline rate of *BCR::ABL*1 transcript on clinical outcome of chronic phase chronic myeloid leukemia patients on imatinib first-line / S. Dulucq, G. Etienne, S. Morisset [et al.] // Ann. Hematol. 2019. Vol. 98. P. 1159-1168.
- 190. In chronic myeloid leukemia patients on second-line tyrosine kinase inhibitor therapy, deep sequencing of *BCR::ABL*1 at the time of warning may allow sensitive detection of emerging drug-resistant mutants / S. Soverini, C. De Benedittis, F. Castagnetti [et al.] // BMC Cancer. 2016. Vol. 16. P. 572-578.
- 191. Inactivation of HOXA Genes by Hypermethylation in Myeloid and Lymphoid Malignancy is Frequent and Associated with Poor Prognosis / G. Strathdee, T.L. Holyoake, A. Sim [et al.] // Clin. Cancer Res. − 2007. − Vol. 13, № 17. − P. 5048-5055.

- 192. Inhibition of Phosphotyrosine Phosphatase 1B Causes Resistance in. *BCR::ABL*-Positive Leukemia Cells to the ABL Kinase Inhibitor STI571 / N. Koyama, S. Koschmieder, S. Tyag [et al.] // Clin. Cancer Res. − 2006. − № 12. − P. 2025-2031.
- 193. International Randomized Study of Interferon Vs SYI571 8- Year Follow / M. Deininger [et al.] // Blood. 2009. Vol. 114, № 22. P. 2000.
- 194. Jabbour, E.J. Resistance to Tyrosine Kinase Inhibition Therapy for Chronic Myelogenous Leukemia: A Clinical Perspective and Emerging Treatment Options / E.J. Jabbour, J.E. Cortes, H.M. Kantarjian // Clin. Lymphoma Myeloma Leuk. -2013. Vol. 13, No. 5. P. 515-529.
- 195. Johansson, B. Cytogenetic and molecular genetic evolution of chronic myeloid leukemia / B. Johansson, T. Fioretos, F. Mitelman // Acta Haematol. 2002. Vol. 107, № 2. P. 76-94.
- 196. Kaeda, S.A. Cytogenetic and molecular monitoring of residual desease in chronic myeloid leukemia / S.A. Kaeda, A. Chase, J.M. Goldman // Acta Hematol. 2002. Vol. 107. P. 64-75.
- 197. Keller, G. Bosutinib: A dual SRC/ABL kinase inhibitor for the treatment of chronic myeloid leukemia / G. Keller, P. Schafhausen, T.H. Brummendorf // Expert. Rev. Hematol. 2009. Vol. 2, № 5. P. 489-97.
- 198. Killing of leukemic cells with a BCR/ABL fusion gene by RNA interference (RNAi) / M. Wilda, U. Fuchs, W. Wossmann [et al.] // Oncogene. 2002. Vol. 21. P. 5716–5724.
- 199. Kinetic of chronic myeloid leukaemia (CML) prevalence in Nothern France since the introduction of imatinib / S. Corn [et al.] // Clin. Oncol. 2011. Vol. 26. P. 2008.
- 200. Komarova, N.L. Effect of cellular quiescence on the success of targeted CML therapy / N.L. Komarova, D. Wodarz // PLoS One. − 2007. − Vol. 2, № 10. − P. E990.
- 201. Lage, H. An overview of cancer multidrug resistance: a still unsolved problem / H. Lage // Cell Mol. Life Sci. 2008. Vol. 65. P. 3145-3167.

- 202. Lee, S.E. Prognostic factors for outcomes of allogeneic stem cell transplantation in chronic phase chronic myeloid leukemia in the era of tyrosine kinase inhibitors / S.E. Lee // Hematology. 2014. Vol. 19, № 2. P. 63–72.
- 203. Lessard, L. The two faces of PTP1B in cancer / L. Lessard, M. Stuible, M.L. Tremblay // Biochim. Biophys. Acta. − 2010. − № 1804. − P. 613-619.
- 204. Life expectancy of patients with chronic myeloid leukemia approaches the life expectancy of the general population / H. Bower, M. Bjorkholm, P.W. Dickman [et al.] // J. Clin. Oncol. 2016. Vol. 34. P. 2851-2857.
- 205. Long-term benefits and risks of frontline nilotinib vs imatinib for chronic myeloid leukemia in chronic phase: 5-year update of the randomized ENESTnd trial / A. Hochhaus, G. Saglio, T.P. Hughes [et al.] // Leukemia. -2016. Vol. 30,  $\mathbb{N}_{2}$  5. P. 1044-54.
- 206. Long-Term Follow-Up of the French Stop Imatinib (STIM1) Study in Patients With Chronic Myeloid Leukemia / G. Etienne, J. Guilhot, D. Rea [et al.] // J. Clin. Oncol. 2017. Vol. 35, № 3. P. 298-305.
- 207. Long-term outcome of chronic myeloid leukemia patients treated frontline with imatinib / F. Castagnetti, G. Gugliotta, M. Breccia [et al.] // Leukemia. 2015. Vol. 29, № 9. P. 1823-31.
- 208. Long-term outcome of patients with newly diagnosed chronic myeloid leukemia: A randomized comparison of stem cell transplantation with drug treatment / A. Gratwohl, M. Pfirrmann, A. Zander [et al.] // Leukemia. 2016. Vol. 30, № 3. P. 562-9.
- 209. Long-term prognostic significance of early molecular response to imatinib in newly diagnosed chronic myeloid leukemia: an analysis from the International Randomized Study of Interferon and STI571 (IRIS) / T. Hughes, A. Hochhaus, S. Branford [et al.] // Blood. 2010. Vol. 116. P. 3758-3765.
- 210. Loss of p53 impedes the antileukemic response to *BCR::ABL* inhibition / H.G. Wendel, E. de Stanchina, E. Cepero [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2006. Vol. 103, № 19. P. 7444-7449.

- 211. Lyn regulates BCR::ABL and Gab2 tyrosine phosphorylation and c-Cbl protein stability in imatinib-resistant chronic myelogenous leukemia cells / J. Wu, F. Meng, H. Lu [et al.] // Blood. -2008. Vol. 111,  $\mathbb{N}$ 2 7. P. 3821-3829.
- 212. Mahon, F.X. Discontinuation of tyrosine kinase therapy in CML / F.X. Mahon // Ann. Hematol. 2015. Vol. 94, № 2. P. 187.
- 213. Mechanism of resistance to anticancer drugs: the role of the polymorphic ABC transporters ABCB1 and ABCG2 / E.R. Lepper, K. Nooter, J. Verweij [et al.] // Pharmacogenomics. 2005. Vol. 6. P. 115-138.
- 214. Molecular and chromosomal mechanisms of resistance to imatinib (STI571) therapy / A. Hochhaus, S. Kreil, A.S. Corbin [et al.] // Leukemia. 2002. Vol. 16, № 11. P. 2190-2196.
- 215. Molecular techniques for the personalised management of patients with chronic myeloid leukaemia / M. Alikian, R.P. Gale, J.F. Apperley [et al.] // Biomol. Detect. Quantific. -2017. -Vol. 11, N04. -P. 20.
- 216. Monitoring CML patients responding to treatment with tyrosine kinase inhibitors: review and recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR::ABL transcripts and kinase domain mutations and for expressing results / T. Hughes, M. Deininger, A. Hochhaus [et al.] // Blood. 2006. Vol. 108,  $N_{\odot}$  1. P. 28-37.
- 217. Myeloablative vs reduced-intensity conditioning allogeneic hematopoietic cell transplantation for chronic myeloid leukemia / S. Chhabra, K.W. Ahn, Z.H. Hu [et al.] // Blood Adv. -2018. Vol. 2, N0 2. P. 2922-36.
- 218. Next-generation sequencing for sensitive detection of *BCR::ABL*1 mutations relevant to tyrosine kinase inhibitor choice in imatinib-resistant patients / S. Soverini, C.D. Benedittis, K.M. Polakova [et al.] // Br. J. Haematol. 2016. Vol. 173. P. 337–349.
- 219. Nilotinib in imatinib-resistant CML and Philadelphia chromosome-positive ALL / H. Kantarjian, F. Giles, L. Wunderle [et al.] // N. Engl. J. Med. 2006. Vol. 354, № 24. P. 2542.
  - 220. Nilotinib is superior to imatinib as first-line therapy of chronic

- myeloid leukemia: the ENESTnd study / F.J. Giles, G. Rosti, P. Beris [et al.] // Expert. Rev. Hematol. -2010. Vol. 3,  $N_2$  6. P. 665-73.
- 221. Novel Tyrosine Kinase Inhibitor Therapy Before Allogeneic Stem Cell Transplantation in Patients with Chronic Myeloid Leukemia / L. Silva, J. Cortes, E. Jabbour [et al.] // Blood. 2008. Vol. 112, № 11. P. 2154.
- 222. Nowell, P.C. Discovery of the Philadelphia chromosome: a personal perspective / P.C. Nowell // J. Clin. Invest. 2007. Vol. 117, № 8. P. 2033-2035.
- 223. OCT-1-mediated influx is a key determinant of the intracellular uptake of imatinib but not nilotinib (AMN107): reduced OCT-1 activity is the cause of low in vitro sensitivity to imatinib / D.L. White [et al.] // Blood. 2006. Vol. 108. P. 697-704.
- 224. O'Hare, T. BCR::ABL kinase domain mutations, drug resistance, and the road to a cure for chronic myeloid leukemia / T. O'Hare, C.A. Eide, M. Deininger // Blood. -2007. Vol. 110, Nole 7. P. 2242-9.
- 225. Okabe, S. Characteristics of dasatiniband imatinib-resistant chronic myelogenous leukemia cells / S. Okabe, T. Tauchi, K. Ohyashiki // Clin. Cancer Res. 2008. Vol. 14. P. 6181-6186.
- 226. Overall survival with ponatinib versus allogeneic stem cell transplantation in Philadelphia chromosome-positive leukemias with the T315I mutation / F.E. Nicolini, G.W. Basak, D.-W. Kim [et al.] // Cancer. -2017. Vol. 123,  $N_{\odot}$  15. P. 2875-80.
- 227. Patient-reported outcomes in the phase 3 BFORE trial of bosutinib versus imatinib for newly diagnosed chronic phase chronic myeloid leukemia / J.E. Cortes, C. Gambacorti-Passerini, M.W. Deininger [et al.] // J. Cancer Res. Clin. Oncol. 2019. Vol. 145. P. 1589-1599.
- 228. Pehlivan, M. sFRP1 promoter methylation is associated with persistent Philadelphia chromosome in chronic myeloid leukemia / M. Pehlivan, Z. Sercan, H.O. Sercan // Leukemia Res. 2008. Vol. 33, № 8. P. 1062-1067.
- 229. Performance of Sokal and Eutos scores for predicting cytogenetic and molecular response in newly diagnosed chronic myeloid leukemia-chronic phase

- patients on imatinib / S. Ganguly, K.C. Lakshmaiah, L.A. Jacob [et al.] // Ind. J. Hematol. Blood Transfus. 2017. Vol. 33. P. 82-86.
- 230. Pharmacokinetics and cellular uptake of imatinib and its main metabolite CGP74588 / P. Le Coutre, K.A. Kreuzer, S. Pursche [et al.] // Cancer Chemother. Pharmacol. -2004. Vol. 53, N 4. P. 313-323.
- 231. Philadelphia chromosome–positive leukemias: from basic mechanisms to molecular therapeutics / R. Kurzrock, H. Kantarjian, B. Druker [et al.] // Ann. Int. Med. 2003. Vol. 138. P. 819-830.
- 232. Pleural Effusion in Dasatinib-Treated Patients With Chronic Myeloid Leukemia in Chronic Phase: Identification and Man- agement / J.E. Cortes, C.A. Jimenez, M.J. Mauro [et al.] // Clin. Lymph. Myel. Leuk. − 2017. − Vol. 17, № 2. − P. 78-82.
- 233. Polymorphism of Human Organic Cationic Transporter 1 (C80G) in Egyptian Chronic Myeloid Leukemia Patients on Imatinib / N.A. Hamed, A.M. Ghanem, H. Neanea [et al.] // Am. J. Mol. Biol. − 2018. − Vol. 8, № 2. − P. 83-91.
- 234. Predicting complete cytogenetic response and subsequent progression-free survival in 2060 patients with CMLon imatinib treatment: the EUTOS score / J. Hasford, M. Baccarani, V. Hoffmann [et al.] // Blood. -2011. Vol. 118, No. 3. P. 686-92.
- 235. Primitive, quiescent, Philadelphia-positive stem cells from patients with chronic myeloid leukemia are insensitive to STI571 in vitro / S.M. Graham, H.G. Jørgensen, E. Allan [et al.] // Blood. − 2002. − Vol. 99, № 1. − P. 319-325.
- 236. Prognosis of long-term survival considering disease-specific death in patients with chronic myeloid leukemia / M. Pfirrmann, M. Baccarani, S.Saussele [et al.] // Leukemia. -2016. Vol. 30, N0 1. P. 48–56.
- 237. Prognostic discrimination in "good-risk" chronic granulocytic leukemia / J.E. Sokal, E.B. Cox, M. Baccarani [et al.] // Blood. 1984. Vol. 63, № 4. P. 789–799.
- 238. Prognostic factors for overall survival in patients with chronic myeloid leukemia treated with imatinib at the National Cancer Institute Mexico, from 2000 to

- 2016 / J. Ylescas-Soria, A.H. de la Torre-Lujan, L.A. Herrera [et al.] // Cancer Med. 2019. Vol. 8. P. 2942-2949.
- 239. Quintas-Cardama, A. Mechanisms of Primary and Secondary Resistance to Imatinib in Chronic Myeloid Leukemia / A. Quintas-Cardama, H. Kantarjian, J. Cortes // Cancer Control. 2009. Vol. 16, № 2. P. 122-131.
- 240. Quintas-Cardama, A. Molecular biology of *BCR::ABL*1–positive chronic myeloid leukemia / A. Quintas-Cardama, J. Cortes // Blood. 2009. Vol. 113, № 8. P. 1619-1630.
- 241. Real Life Rates of Disease Monitoring in Clinical Practice in Europe / E. Morra [et al.] // Blood. 2007. Vol. 118. Abstr. 1959.
- 242. Response and Outcomes to Nilotinib at 24 Months in Imatinib-Resistant Chronic Myeloid Leukemia Patients in Chronic Phase (CML-CP) and Accelerated Phase (CML-AP) with and without *BCR::ABL* Mutations / J.P. Radich, G. Martinelli, A. Hochhaus [et al.] // Blood. − 2015. −Vol. 114, № 22. − P. 1130.
- 243. Response definitions and European Leukemianet Management recommendations / M. Baccarani, F. Castagnetti, G. Gugliotta [et al.] // Best Pract. Res. Clin. Haematol. 2009. Vol. 22. P. 331-341.
- 244. Results of treatment of chronic myeloid leukemia with imatinib from the Vietnam National Institute of Hematology and Blood Transfusiology / H.T. Nguyen, A.T. Nguyen, T.T. Nguyen [et al.] // Hematol. Transfusiol. -2018. Vol. 63, Nole 1. P. 31-43.
- 245. Risk stratifi cation of chromosomal abnormalities in chronic myelogenous leukemia in the era of tyrosine kinase inhibitor therapy / W. Wang, J.E. Cortes, G. Tang [et al.] // Blood. 2016. Vol. 127, № 22. P. 2742–50.
- 246. Savona, M. Getting to the stem of chronic myeloid leukaemia / M. Savona, M. Talpaz // Nat. Rev. Cancer. 2008. Vol. 8. P. 341–350.
- 247. Selection and characterization of *BCR::ABL* positive cell lines with differential sensitivity to the tyrosine kinase inhibitor STI571: diverse mechanisms of

- resistance / F.X. Mahon, M.W. Deininger, B. Schultheis [et al.] // Blood. 2000. Vol. 96, № 3. P. 1070-1079.
- 248. Sessions, J. Chronic Myeloid Leukemia in 2007 / J. Sessions // J. Manag. Care Pharm. 2007. Vol. 13, suppl. S-a. P. S4-S7.
- 249. Several BCR::ABL kinase domain mutants associated with imatinib mesylate resistance remain sensitive to imatinib / A. Corbin, P. La Rose, E. Stoffregen [et al.] // Blood. -2003. Vol. 101, No. 11. P. 4611-4614.
- 250. Several types of mutations of the Abl gene can be found in chronic myeloid leukemia patients resistant to STI571, and they can pre-exist to the onset of treatment / C. Roche-Lestienne, V. Soenen-Cornu, N. Grardel-Duflos [et al.] // Blood. 2002. Vol. 100. P. 1014.
- 251. Shah, N.P. Clinical feature of pulmonary arterial hypertension in patients receiving dasatinib / N.P. Shah, N. Wallis, H.W. Farber // Am. J. Hematol. − 2015. Vol. 90, № 11. P. 1060-4.
- 252. Shah, N.P. Dasatinib in imatinib-resistant or -intolerant chronic-phase, chronic myeloid leukemia patients: 7-year follow-up of study CA180-034 / N.P. Shah, N. Wallis, H.W. Farber // Am. J. Hematol. 2016. Vol. 91, № 9. P. 869–874.
- 253. Six-year follow-up of patients receiving imatinib for the first-line treatment of chronic myeloid leukemia / A. Hochhaus, S.G. O'Brien, F. Guilhot [et al.] // Leukemia. 2009. Vol. 23. P. 1054-1061.
- 254. Sokal, J.E. Preferential inhibition by cytarabine of CFU-GM from patients with chronic granulocytic leukemia / J.E. Sokal, S.S. Leong, G.A. Gomez // Cancer. 1987. Vol. 99. P. 197.
- 255. Standartisation and quality control studies of «real-time» quantitative reverse transcryptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia. A Europe Against Cancer program / J. Gabert, E. Beillard, V.H. van der Velden [et al.] // Leukemia. 2003. Vol. 17. P. 2318-2357.
- 256. Survival of patients with chronic phase chronic myeloid leukemia after failed response to interferon-alfa / D. Marin, S. Marktel, R. Szydlo [et al.] // Lancet.  $-2003. N_{\odot} 362. P. 617-619.$

- 257. Systematic review and meta-analysis of standard-dose imatinib vs. high-dose imatinib and second generation tyrosine kinase inhibitors for chronic myeloid leukemia / V.S. Hoffmann, J. Hasford, M. Deininger [et al.] // J. Cancer Res. Clin. Oncol. 2017. Vol. 143, № 7. P. 1311–1318.
- 258. The BCR gene and Philadelphia chromosome-positive leukemogenesis / E. Laurent, M. Talpaz, H. Kantarjian, R. Kurzrock // Cancer Res. 2001. Vol. 61. P. 2343-2355.
- 259. The concept of treatment-free remission in chronic myeloid leukemia / S. Saussele, J. Richter, A. Hochhaus, F.X. Mahon // Leukemia. 2016. Vol. 30, № 8. P. 1638–47.
- 260. The Structure of Dasatinib (BMS 354825) Bound to Activated ABL Kinase Domain Elucidates its inhibitory Activity against imatinib Resistant ABL Mutants / J.S. Tokarski, J.A. Newitt, J.Y. Chieh [et al.] // Cancer Res. 2006. Vol. 66. P. 5790-5797.
- 261. The Target UK study: Real-world evidence of molecular response to tyrosine kinase inhibitors supports European Leukemia Net 2013 recommendations for the management of chronic myeloid leukaemia / D. Milojkovic, R.E. Clarck, J.L. Byrne [et al.] // Blood. -2017. Vol. 130,  $N_{\odot}$  1. P. 2892.
- 262. Though imatinib plasma levels are associated with both cytogenetic and molecular responses to standard-dose imatinib in chronic myeloid leukemia / S. Picard, K. Titier, G. Etienne [et al.] // Blood. 2007. Vol. 109. P. 3496-3499.
- 263. TIDEL-II: first-use of imatinib in CML with early switch to nilotinib for failure to achieve time-dependent molecular tatpefe / D.T. Yeung, M.P. Osborn, D.L. White [et al.] // Blood. -2015. Vol. 125, N 6. P. 915-23.
- 264. Treatment and outcome of 2904 CML patients from the EUTOS population-based registry / V.S. Hoffmann, M. Baccarani, J. Hasford [et al.] // Leukemia. -2017. Vol. 31, N 3. P. 593-601.
- 265. Treatment-free remission after second-line nilotinib in patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase: results from a single-group, phase 2, open-

label study / F.X. Mahon, C. Boquimpani, D.W. Kim [et al.] // Ann. Intern. Med. – 2018. - Vol. 168, Nol. 7. - P. 461-70.

266. Tyrosine kinase inhibitor resistance in chronic myeloid leukemia cell lines: investigating resistance pathways / C. Tang, L. Schafranek, D.B. Watkins [et al.] // Leuk. Lymphoma. -2011. - Vol. 52, N0 11. - P. 2139-47.