

На правах рукописи

РЯБЧИКОВА НАИРА РАФАЭЛЕВНА

**КЛИНИКО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ АССОЦИАЦИИ
ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ МИЕЛОЛЕЙКОЗЕ**

14.01.21 (3.1.28) – гематология и переливание крови

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Санкт-Петербург
2022

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор
Ивановна

Никуличева Валентина

Официальные оппоненты:

Анна Григорьевна Туркина, доктор медицинских наук, профессор, заведующий клинико-диагностическим отделением гематологии миелопролиферативных заболеваний, Федерального государственного бюджетного учреждения Гематологический научный центр Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Олег Анатольевич Рукавицын, доктор медицинских наук, профессор, начальник гематологического центра Федерального государственного бюджетного учреждения «Главный военный клинический госпиталь им. академика Н. Н. Бурденко» Министерства обороны Российской Федерации

Ведущая организация.

Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Московской области «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М. Ф. Владимирского».

Защита состоится «26» сентября 2022 г. в ____ часов на заседании диссертационного совета Д 208.074.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства» (ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России) по адресу: 191024, г. Санкт-Петербург, улица 2-я Советская, д. 16.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке института и на сайте ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России (www.bloodscience.ru).

Автореферат разослан «_» 2022 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор медицинских наук

Татьяна Валентиновна Глазанова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. 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, Чельшева Е.Ю.2020). В странах Европы и Северной Америки ХМЛ встречается гораздо чаще, чем в странах Азии (Kim 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, Vaccarani 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 проявляться 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, Pfirmann 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 ХМЛ 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. В настоящее время все основные сведения, накопленные исследователями в мировой практике по эпидемиологии, принципах диагностики, лечения и мониторинга взрослых пациентов ХМЛ в России представлены рабочей группой экспертов в клинических рекомендациях 2020г. Однако, 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, перерывов в лечении, развитии мутаций и др. (Виноградова О.Ю. 2012; Чельшева Е.Ю. 2013, Туркина А.Г. 2018, Тихонова В.В. 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; Миннихметов 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. 2017). А исследования по изучению однонуклеотидных полиморфизмов генов (SNR) при ХМЛ 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 связи этих полиморфизмов с критериями риска, резистентностью к терапии и общей выживаемостью больных в Республике Башкортостан (РБ) (Vaidya S. 2015, Maddin N. 2016, Named N. A. 2018, Адильгереева Э. П. 2018).

Таким образом, дальнейшее изучение эпидемиологических показателей ХМЛ на различных территориях, в том числе многонациональной Республике Башкортостан (РБ) – регионе с развитой нефтехимической промышленностью, позволяет сравнить их с показателями России и других стран. Выявление частоты встречаемости различных мутаций и их комбинаций на разных территориях дает возможность прогнозировать течение заболевания и оптимизировать терапию. А исследование полиморфизма генов, участвующих в фармакогенетике и фармакодинамике ингибиторов тирозинкиназ с изучением клинико-генетических ассоциаций, позволит уточнить некоторые механизмы патогенеза данной патологии, оптимизировать прогноз и индивидуализировать терапию.

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 уровня экспрессии генов множественной лекарственной устойчивости (*ABCG2*, *hOCT1*) в лейкоцитах периферической крови больных хроническим миелолейкозом на терапии ингибиторами тирозинкиназ, клеточной линии K562 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 ХМЛ 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 отличие от контроля и клеточной линии K562, 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 оказания 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, патогенезу, 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 (184 пациента) и комплекс современных методов исследования. В работе 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.

2. Клинико-гематологическая характеристика больных с ХМЛ в Республике Башкортостан по сравнению с данными Российского 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 *CG* полиморфного варианта *rs683369* гена *hOCT1* ассоциировано с высоким критерием риска, прогрессированием заболевания и достоверным снижением общей выживаемости пациентов с ХМЛ на терапии ИТК. Генотип *CC* 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 *CYP3A5* не получено.

5. Выявленные изменения уровня экспрессии генов *hOCT1 и ABCG2* в лейкоцитах периферической крови пациентов с ХМЛ получающих ИТК, в отличие от контроля и клеточной линии K562, свидетельствуют об участии генов переносчиков лекарственных препаратов в метаболизме таргетных препаратов.

Степень достоверности и апробация результатов. 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.

Основные положения диссертации доложены и обсуждены на: Республиканской конференции молодых ученых РБ «Медицинская наука» (Уфа, 2011; 2012), II 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 научно-практической конференции «Совершенствование гематологической помощи населению РБ» в рамках Недели здравоохранения РБ (Уфа, 2016), на Межрегиональной научно-практической конференции «Актуальные вопросы гематологии» (Уфа, 2017), IX Всероссийском съезде Онкологов России (Уфа, 2017).

Внедрение результатов исследования в практику. Основные положения диссертационного исследования внедрены в работу гематологических отделений ГБУЗ «Республиканская клиническая больница им Г. Г. Куватова», ГБУЗ «Городская клиническая

больница №13». Полученные результаты используются в программе тематического усовершенствования врачей терапевтов, гематологов на кафедре терапии и общей врачебной практики с курсом гериатрии ИДПО ФГБОУ ВО «БГМУ» Минздрава России.

Публикации по теме диссертации. По теме диссертации опубликовано 20 научных работ, в том числе 9 статей в журналах, включенных в перечень рецензируемых изданий, рекомендованных ВАК Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, 1 статья в зарубежных изданиях.

Структура 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, из них отечественных - 96, зарубежных авторов - 170.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материал и методы исследования: Исследование проводили на базе кафедры терапии и общей врачебной практики с курсом гериатрии ИДПО ФГБОУ ВО «БГМУ» Минздрава России, гематологического отделения ГУЗ РКБ им Г.Г. Куватова и отдела геномики Института биохимии и генетики УНЦ РАН (г.Уфа) в период с 2010 по 2020 годы.

Настоящее исследование выполнено в соответствии со стандартами надлежащей клинической практики (Good Clinical Practise) и принципами Хельсинкской 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: Наличие ХМЛ, подтвержденное цитогенетическим и/или молекулярным анализом и выявленной филадельфийской хромосомой (Ph). - Возраст пациентов старше 15 лет. - Текущая терапия пациентов ХМЛ. - Подписанное информированное согласие.

Критерии не включения общие: - Отсутствие Ph при постановке диагноза. - Наличие клинически значимой сопутствующей патологии (другие онкологические заболевания, тяжелые хронические заболевания внутренних органов в стадии обострения, психические расстройства). - Состояние после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток.

Критерии не включения в дополнительные группы: - Недостаточная комплаентность и перерывы в лечении ИТК. - Не адекватно назначенные дозы ИТК. - Отказ пациента и невозможность проведения мониторинга.

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 (ИМ). Верификация диагноза ХМЛ, терапия и критериальная оценка ответа на лечение проводились согласно рекомендациям Европейского общества по лечению лейкозов (ELN 2016). Оценка критериев риска проведена по J.Sokal, Euro.

Этапы, материал, объем и методы исследования представлены в таблице 1.

Таблица 1 - ДИЗАЙН ИССЛЕДОВАНИЯ

Этапы исследования	Материал, объем исследования	Методы исследования
Эпидемиологические исследования: распространенность, заболеваемость и смертность	Ретроспективный анализ больных ХМЛ за период 2000-2020 гг в РБ	Стандартные описательно-оценочные (дескриптивные) методы.
Клинико-гематологическая характеристика больных в РБ и сравнение с группой больных ХМЛ в Российском исследовании EUTOS	184 больных ХМЛ РБ, 197 больных в Российском исследовании EUTOS	Сбор анамнеза, общеклинические, гематологические, лабораторные и инструментальные методы исследования (в соответствии со стандартами по диагностике и лечению больных ХМЛ).
Изучение цитогенетического, молекулярного и мутационного статуса	114 больных ХМЛ	Стандартное цитогенетическое исследование или FISH, метод ПЦР в режиме реального времени, метод секвенирования кДНК гена <i>BCR::ABL</i> типа p210
Анализ полиморфных локусов генов <i>CYP3A5</i> , <i>hOCT1</i> , <i>ABCG2</i> и их клинико-генетические ассоциации	114 пациентов ХМЛ	Анализ полиморфных локусов генов осуществляли методом ПЦР синтеза ДНК и ПДРФ

Группы были сопоставимы по полу и возрасту.

Анализ эпидемиологических показателей. с изучением заболеваемости, распространенности и смертности, больных ХМЛ в РБ осуществлен по результатам клинико-эпидемиологического мониторинга за период 2000–2020гг. с использованием, в том числе, ретроспективных данных, стандартных описательно-оценочных (дескриптивных) методов. В Государственном комитете Республики Башкортостан по статистике были получены сведения о численности популяции населения.

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) с морфологическим анализом лейкограммы, изучение миелограммы - для оценки костномозгового кроветворения. Биохимические исследования включали оценку общего белка плазмы крови, глюкозы, общего холестерина, активности ферментов АЛТ, АСТ. Проводились рентгенография органов грудной клетки, ЭКГ, УЗИ органов брюшной полости.

Для подтверждения диагноза ХМЛ пациентам проводилось стандартное цитогенетическое исследование костного мозга с определением филадельфийской хромосомы. При отсутствии метафазных пластинок при стандартном цитогенетическом исследовании клеток костного мозга дополнительно проводили флуоресцентную *in situ* гибридизацию хромосом (FISH). Результаты исследований представлены в соответствии с Международной цитогенетической номенклатурой (Shaffer L.G. et al., 2009). При постановке диагноза и в процессе мониторинга терапии ХМЛ проводили количественную оценку экспрессии химерного гена *BCR::ABL* типа p210 молекулярно-генетическим методом ПЦР в режиме реального времени. Для постановки реакции обратной транскрипции использовали наборы реагентов ОНКОСКРИН 1-1-Q (ООО «ГеноТехнология»).

Анализ мутаций гена *BCR::ABL* выполнялся с помощью определения нуклеотидной последовательности методом секвенирования кДНК гена *BCR::ABL* в соответствии с рекомендациями Branford S. et al. [2006]. 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, согласно рекомендациям производителя.

Статистическая обработка полученных данных проводилась 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 M и средней ошибки m . Достоверность различий оценивалась с помощью критерия Стьюдента (t). Различие между сравниваемыми показателями считалось статистически значимым при $p < 0,05$. Для выяснения зависимости между показателями применялся корреляционный анализ Пирсона с определением достоверности. Равенство дисперсий распределений признаков проверяли при помощи критерия Левена, в противном случае использовали U -критерий 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 2×2 рассчитывали с использованием критерия χ^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 оценивали с использованием критерия Шапиро-Уилка. Для оценки продолжительности жизни в зависимости от генотипа полиморфных локусов генов был проведен анализ выживаемости методом Каплана—Мейера. Статистическая обработка данных осуществлялась с использованием программы GraphPad Prism 3.0, GraphPad Software.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

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 $0,48 \pm 0,08$ на 100 000 населения (по данным ВОЗ-0,7). Динамика заболеваемости за двадцатилетний период представлена на рисунке 1.

Средний пятилетний показатель первичной заболеваемости за последние 15 лет значимо не изменился ($p > 0,05$) и составил $0,57 \pm 0,12$ (в 2005-2010гг), $0,67 \pm 0,10$ (в 2010-2015гг), $0,48 \pm 0,11$ (в 2015-2020гг). Однако, за период 2000 и 2005гг он был гораздо ниже и составлял $0,28 \pm 0,22$.



Рисунок 1 - Первичная заболеваемость ХМЛ по РБ за период 2000-2020 гг. (на 100 000 населения).

Если рассматривать период с 2000 до 2008гг., до внедрения в терапию ИТК (Государственная регистрация ИМ в России -2006г) и систематического определения Ph+, отмечается не равномерное распределение показателей заболеваемости по годам от 0,1 до 0,6 на 100 000 населения, средний показатель за восьмилетний период составил $0,36 \pm 0,12$ на 100 000 населения. Вероятнее всего, это связано с не достаточным 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 0,8 на 100 000 населения, а средний показатель повысился практически в два раза до $0,65 \pm 0,09$ 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 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 ИМ в РБ (Государственная регистрация первого дженерика в России – 2010г) и одновременное нарушение системы регулярного мониторингования и диагностики Ph-хромосомы в закрепленных лабораториях, поддерживаемых фирмой производителем оригинального препарата иматиниба – Гливек. 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.

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 2).



Рисунок 2 - Распространенность хронического миелолейкоза в РБ за период 2000-2020 гг. (на 100 000 населения).

Показатель смертности хроническим миелолейкозом по РБ за 2000-2020гг. колебался в разные года от 0,17 до 0,39 на 100 000 населения (Рисунок 3). Однако, средне-пятилетний показатель смертности за 20 лет оставался относительно стабильным, и разница была статистически незначимой ($p > 0,05$). Эти данные свидетельствуют о том, что показатель смертности значимо не зависел в РБ от внедрения современных методов диагностики и лечения больных с ХМЛ.

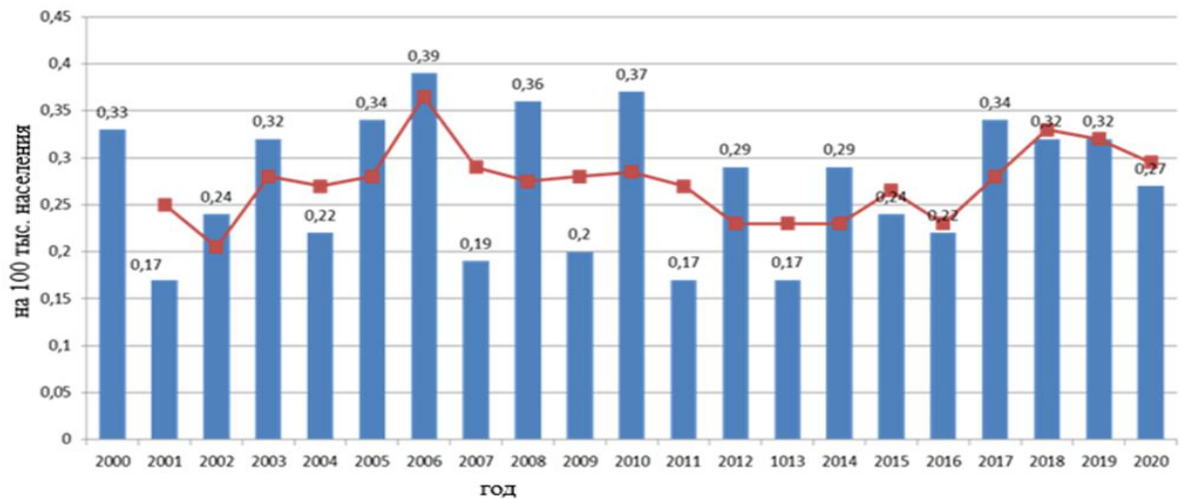


Рисунок 3 - Смертность от хронического миелолейкоза по РБ за период 2000-2020гг. (на 100 000 населения)

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

резистентных к терапии ИТК и прогрессия заболевания даже на фоне терапии ИТК приводит к их гибели. Полученные данные свидетельствуют об актуальности проблемы и необходимости дальнейших исследований по изучению региональных особенностей и патогенеза развития ХМЛ, поиска причин неудачи лечения ИТК, преодоления резистентности терапии, выявление прогностических факторов течения и исхода заболевания.

С целью выявления региональных особенностей клинико-лабораторные данные 184 пациентов ХМЛ в РБ на этапе постановки диагноза сравнивались с результатами российской части международного многоцентрового проспективного популяционного исследования EUTOS, включающего 197 пациентов (Population-based CML Study, 2017) (таблица 2)

Таблица 2. Характеристика пациентов с ХМЛ в РБ и российской части исследования EUTOS

Всего n (%) Исследование	184 (100%) РБ	197(100%) EUTOS
Мужчин n (%)	96 (52,2%)	100 (50,7%)
Женщин n (%)	88 (47,8%)	97 (49,3%)
Соотношение М/Ж	1,1/1,0	1:1
Город/село n (%)	56% / 44%	-
Возраст Me лет (от - до)	54,6 (15–82)	50 (18–82)
Этническая принадлежность: n (%)		-
Русские/Татары	53 (28,8%)/ 99 (53,8%)	
Башкиры/	22 (11,9%)	
Чуваши/ Таджики	8 (4,4%)/ 2 (1,1%)	
Профессиональные вредности n (%)	81 (44,0%)	-
Вредные привычки (курение) n (%)	49 (27%)	48 (25%)
Семейный статус: женат/замужем	126 (69%)	21 (12,8%)
Образование (высшее и среднее) n(%)	97 (53%)	166 (91%)
Фазы n (%) : ХФ/ФА/ БК	177 (96,2%)/6 (3,3%)/1 (0,5%)	184(94%)/12(6%)/1(1%)
Сплено- и гепатомегалия n (%)	109(59%) / 81 (44%)	111(56%) / 81(41%)
Факторы риска по J.Sokal / Euro n (%)		
Низкий	63 (34,0%) / 120 (65,0%)	60(33%) / 74(40%)
Промежуточный	81 (44,0%) / 51 (28,0%)	63 (34%) / 76(41%)
Высокий	40 (22,0%) / 13 (7,0%)	57(31%) / 30(17%)
Степень по шкале ECOG/WHO		
0	68 (37%)	79 (40%)
1	94 (51%)	92 (47%)
2	15 (8%)	14(7%)
3	5 (3%)	6 (3%)
4	2 (1%)	6 (3%)

В возрастной группе 50–60лет отмечалось наибольшее количество зарегистрированных случаев ХМЛ в РБ и снижение их после 70 лет (Рисунок 4). Эти данные согласуются с показателями российского регистра, однако по данным мировой статистики, этот показатель растет в старших возрастных группах.

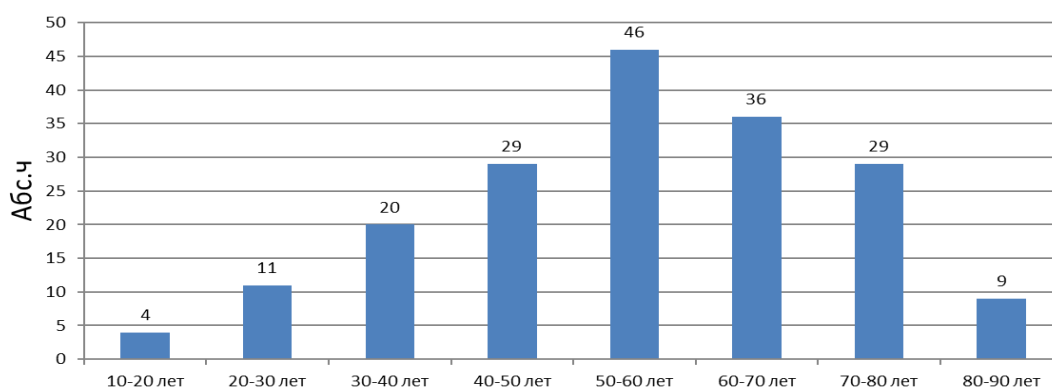


Рисунок 4. - Структура больных хроническим миелолейкозом в РБ по возрасту (абс.ч).

В целом в обоих исследованиях группы были сопоставимы по основным характеристикам. Так же как и в Российском исследовании (87%) EUTOS у 88 % больных РБ отмечена не высокая степень активности (ECOG 0–1 балл). По критериям риска J.Sokal, Euro в Российском исследовании показатели высокого риска на 10% выше, хотя общая тенденция превалирования низкого и промежуточного риска сохраняется и в том и другом исследовании (таблица2).

В нашем исследовании, практически 100% пациентов указывали на наличие слабости в той или иной степени против 77% в другой группе. По-видимому, данный симптом не является специфическим и имеет больше субъективный характер. Наличие большего процента зарегистрированных жалоб в нашем исследовании: слабость, похудание, боли в костях, частые инфекции, скорее свидетельствует о более позднем от начала заболевания первичном обращении пациентов к врачу. Жалобы представлены в сравнении с Российскими данными на рисунке 5.

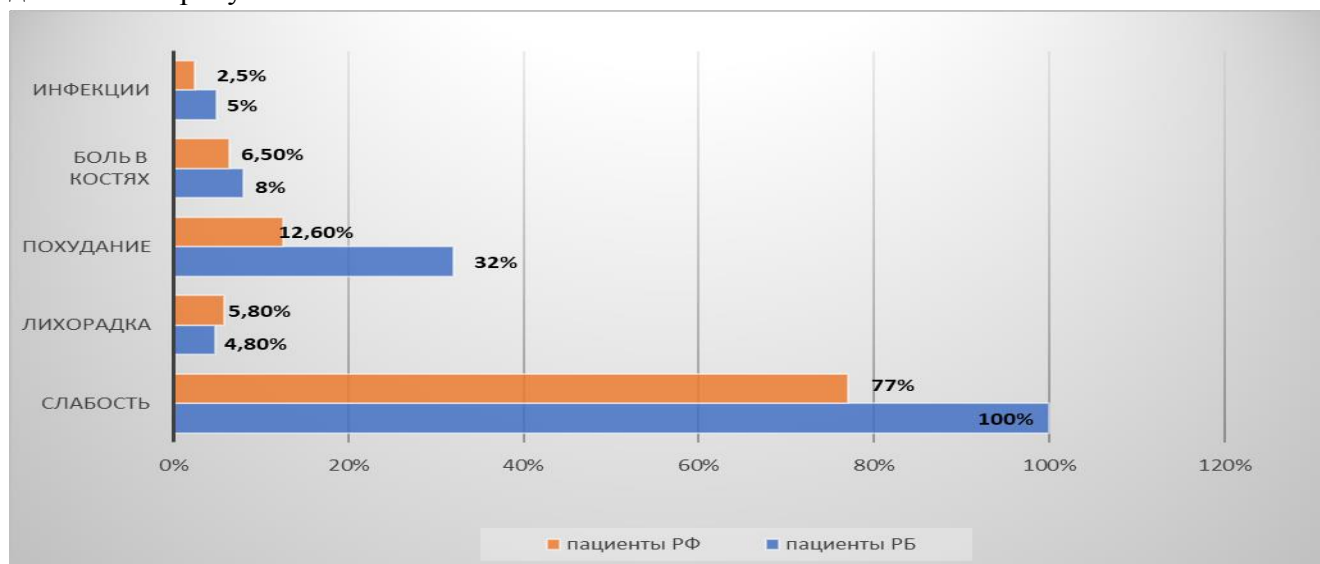


Рисунок 5 - Жалобы пациентов с ХМЛ в РБ (n-184) и исследовании EUTOS (n-119).

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 встречалась на 17% реже: 31% против 48%. Процент сопутствующей сердечно-сосудистой патологии в РБ также был несколько ниже 16% против 19% больных в РБ. Что касается заболеваний печени, почек, сахарного диабета, то они встречались несколько чаще, но не достигали статистически значимых величин 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 значительно меньше: 5,4% против 19%. Это можно объяснить тем, что в исследование не включались пациенты с хроническими заболеваниями в стадии обострения и опухолевыми заболеваниями.

Клинико-гематологическая характеристика (показатели ОАК, миелограммы) пациентов с ХМЛ в РБ не выявила каких-либо значимых региональных особенностей заболевания, что позволило организовать диагностику, наблюдение и лечение этой категории больных в РБ по Российским и общемировым стандартам.

Анализ проводимой терапии на момент исследования показал, что из 184 больных ХМЛ ИМ 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 и, по желанию, 2 пациента с хорошим ответом не были переведены на базисную терапию (эти пациенты были исключены из анализа). Распределение пациентов по текущим дозам ИМ было 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 гидроксикарбамид с интерфероном.

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 приверженностью больных. Переносимость ИМ 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), что потребовало отмены препарата и соответствовало данным мировой литературы.

По результатам 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, оптимальный ответ при лечении ИТК1 в ХФ получен у 102 (69%) пациента и не удалось его получить у 46 (31%). Первичная резистентность к ИМ наблюдалась у 36 (24,3%) и вторичная у 10 (6,7%). 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 МО (4,0-5,0 Ig) 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 сопоставимы с учетом имеющихся моментов нарушения дозового и таймингового режимов в реальной клинической практики.

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 ИТК2 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.

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 тот же период (2012г) К. М. Абдулкадыровым и соавт. (ОВ-86,4%, ВБП-67,5%) и несколько ниже показателей полученных в работах Н. М. Kantarjian (2012) и результатов более поздних исследований: Е. Alsobhi (2015), А.С. Лямкина (2020).

Анализ данных проводимой терапии, не достижение целевых значений ЦГ к 6 и МО к 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 для оценки эффективности лечения ИТК1 и выявления резистентности к проводимой терапии, анализа полиморфизма генов и клинико-генетических ассоциаций, нами были исключены 70 пациентов (38%), имеющих многократные и длительные перерывы в лечении ИТК.

Мониторинг ЦГО проводился нами после 6 месяцев непрерывной терапии ИТК1 у 101 пациента с ХМЛ, МО у 114. ХФ была диагностирована у 82 пациентов (81,2%), из них 76 (92,7%) получали ИМ в дозе 400 мг/с (92,7%) и только 6 пациентов (7,3%) -600 мг/с. 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/с, 12 пациентов (75%) по 600 мг/с и 3 (18,75%) по 800 мг/с. В фазе БК 3 пациента с ХМЛ получали этот препарат в дозе 400, 600 и 800 мг/с. Поскольку эффективность терапии ИМ на различных этапах развития заболевания напрямую зависит от адекватно назначенной дозы, 3 пациента, получавшие ИМ 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.

Из 15 больных, получавших ИМ в дозе 600–800 мг/с в ФА за этот период, только один (6,7%) достиг ПЦО, а 4 пациентов - ЧЦО (26,6%). Следовательно, можно считать, что в ФА 33,3% анализируемых пациентов с ХМЛ достигли оптимального ответа. Что касается неудачи в терапии или отсутствие цитогенетического ответа, то она была зарегистрирована у всех 3 больных 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 в этой группе не достигли оптимального ЦГО.

С учетом довольно широкого разброса экспрессии гена *BCR-ABL* в группах с различным цитогенетическим ответом, медиана экспрессии гена *BCR-ABL*, проведенная методом ПЦР-РВ, составила 23,77% (0–316,8%) или 1,5 lg. Мы провели сравнительный корреляционный анализ между уровнем экспрессии *BCR-ABL* и процентным содержанием Rh-позитивных клеток. Коэффициент ранговой корреляции Спирмена для этих параметров у 77 больных ХМЛ составил 0,8 ($p < 0,0001$). 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%.

Изучение профиля мутаций киназного домена в гене *BCR::ABL* у больных ХМЛ в нашем исследовании показало, что у 32% пациентов, резистентных к терапии ИТК1 встречались 4 миссенс-мутации: *T315I*, *M351T*, *M244V* и *H396R* (рисунок 6), из них две *T315I* и *M351T* в виде компаунд-мутации (таблица 3)

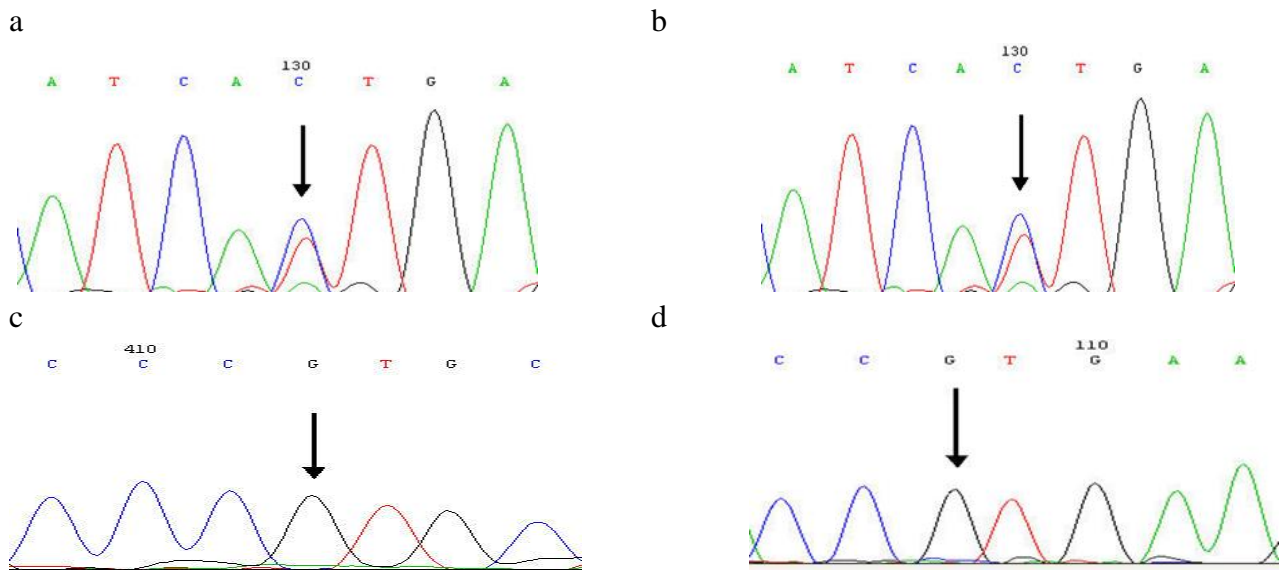


Рисунок 6 - Мутации *T315I*(a), *M351T*(b), *H396R* (c), *M244V* (d) в образцах к ДНК в гене *BCR::ABL*

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). Так, в 100% случаев при БК и в ФА выявлялись неблагоприятные мутации: *T315I* в монорежиме или в сочетании с *M351T*. В ХФ только у 17% больных встречались все четыре вида мутаций, из них наиболее часто (20%) выявлялась мутация *M351T* с умеренным снижением чувствительности к ИМ, а компаунд-мутации и мутация *T315I* не были обнаружены.

Таблица 3 - Частота встречаемости мутаций *BCR-ABL* у пациентов хроническим миелолейкозом в Республике Башкортостан

Фаза ХМЛ	Количество пациентов	% мутаций	<i>M35IT</i>	<i>M315I</i>	<i>M244V</i>	<i>H396R</i>
ХФ	N=41	17	4	1	1	1
ФА	N=6	100	3	2	-	-
	-	-	1		-	-
БК	N=3	100	-	1	-	-
	-	-	2		-	-

Таким образом, 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 помогут раскрыть новые механизмы их возникновения.

Нами проанализировано распределение частот генотипов полиморфного локуса rs776746 изофермента P3A5 цитохрома p450 (*CYP3A5*), для оценки его влияния на фармакокинетику ИТК и возможную лекарственную устойчивость при ХМЛ (таблица 4).

Таблица 4 - Частота встречаемости аллелей и генотипов полиморфного варианта rs776746 в гене *CYP3A5* у больных с ХМЛ с различным ответом на терапию ИТК.

Аллель, генотип		Пациенты с ХМЛ	Пациенты с неудачей терапии ИТК	Пациенты с оптимальным ответом на терапию ИТК
<i>G</i>	n_i	194	110	65
	$p_i \pm s_p$	85,84±2,32	85,94±3,07	85,53±4,04
	$\chi^2(P)$	-	0,006 (0,93)	
<i>A</i>	n_i	32	18	11
	$p_i \pm s_p$	14,16±2,32	14,06±3,07	14,47±4,04
	$\chi^2(P)$	-	0,006 (0,93)	
<i>G/G</i>	n_i	81	46	27
	$p_i \pm s_p$	71,68±4,24	71,88±5,62	73,68±7,14
	$\chi^2(P)$	-	0,007 (0,92)	
<i>G/A</i>	n_i	32	18	11
	$p_i \pm s_p$	28,32±4,24	28,12±5,62	28,95±7,36
	$\chi^2(P)$	-	0,007 (0,92)	
<i>A/A</i>	n_i	-	-	-
	$p_i \pm s_p$	-	-	-
	$\chi^2(P)$	-	-	
	N	113	64	38

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

продолжительности жизни больных ХМЛ в зависимости от генотипа полиморфного локуса rs776746 гена *CYP3A5* (рисунок 7). Средняя продолжительность жизни у больных с генотипом GA составила - 190,3±15,1 месяца, с генотипом GG - 154,9±7,2 месяца.

Различия в продолжительности жизни пациентов ХМЛ в зависимости от генотипа полиморфного локуса rs776746 гена *CYP3A5* не достигли уровня статистической значимости (Лонг-ранг тест, $p=0,755$). Ассоциаций полиморфного варианта rs776746 в гене изофермента цитохрома р450 *CYP3A5* у больных ХМЛ с критериями риска, ответом на лечение и выживаемостью не выявил достоверных статистических закономерностей ($p>0,05$).

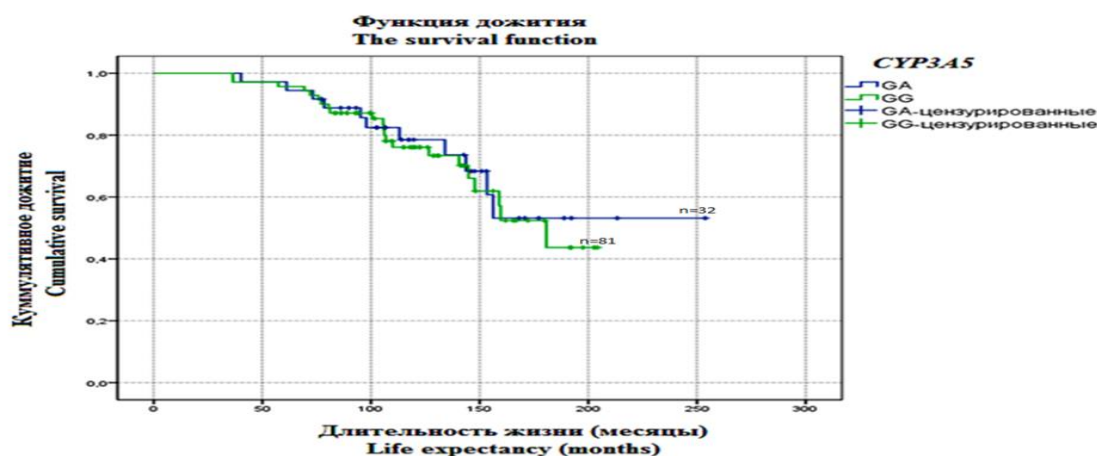
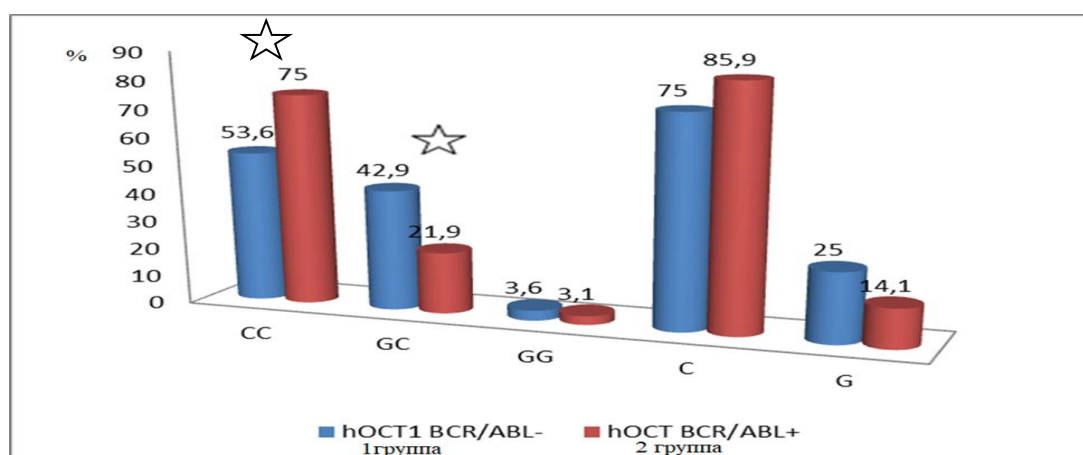


Рисунок 7 - Общая выживаемость пациентов ХМЛ в зависимости от генотипа полиморфного локуса rs776746 гена *CYP3A5*.

Известно, что влияние переносчиков органических катионов *hOCT1* (human organic cation transporter) очень важно в регуляции внутриклеточной доступности лекарственных препаратов. У большинства пациентов ХМЛ с эффективным ответом на лечение ИТК генотип CC 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 8).



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

2 группа - больные с оптимальным ответом на терапию ИТК - n=32

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

Рисунок 8 – 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 CG 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)).

Анализ выживаемости методом Каплана—Мейера в зависимости от генотипа полиморфного локуса rs683369 гена *hOCT1* показал статистически значимые различия в группах (Лонг-ранг тест, $p=0,018$) (Рисунок 9).

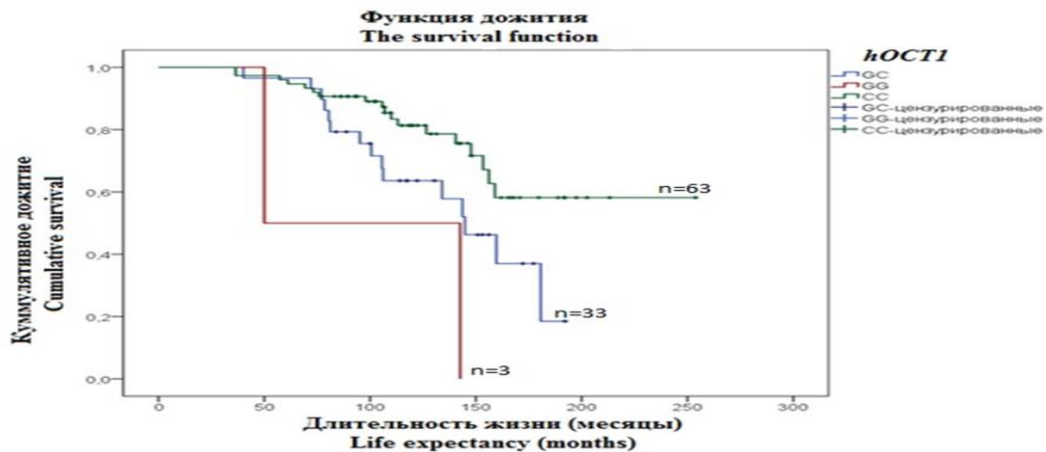


Рисунок 9 - Общая выживаемость больных ХМЛ в зависимости от генотипа полиморфного локуса rs683369 гена *hOCT1*.

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 CC она не была достигнута на момент проведения исследования.

Нами выявлена статистически значимая зависимость, а следовательно, и клиничко-генетическая ассоциация между полиморфизмом гена *hOCT1* и критериями риска: возрастом, размерами селезенки, уровнем тромбоцитов и др ($p < 0,001$) (используемый метод: Хи-квадрат Пирсона) (Рисунок 10).

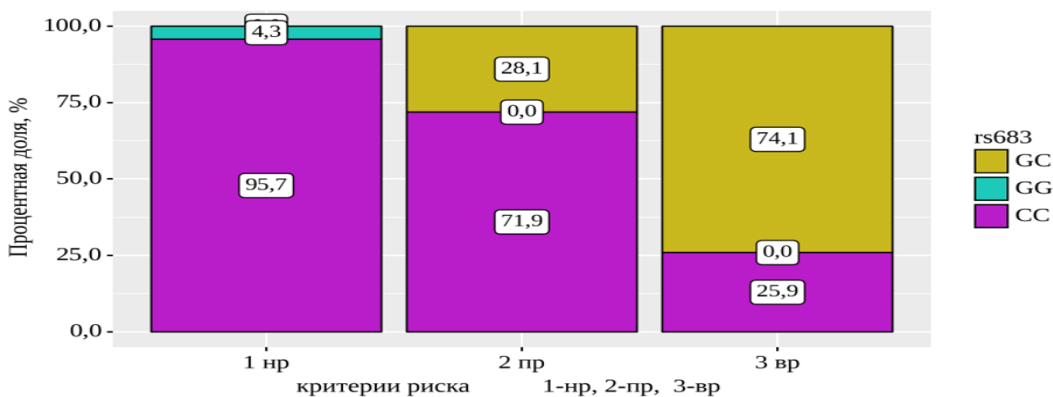


Рисунок 10. Зависимость показателя полиморфного локуса rs683369 гена *hOCT1* от показателя критерий риска (1-низкий риск, 2-позапромежуточный риск, 3-высокий риск).

Эта зависимость подтверждает, что наличие генотипа CC 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 мониторингованию пациентов, определению прогноза течения и персонализированной тактики лечения ХМЛ.

Учитывая, что транспорт лекарственных препаратов в клетку может быть опосредован генами множественной лекарственной устойчивости и переносчиков органических катионов *hOCT1* и *ABCG2*, а также влиять на эффективность лечения ИМ, нами проанализирована взаимосвязь уровня экспрессии данных генов в лейкоцитах периферической крови пациентов с ХМЛ, в контрольной группе здоровых лиц, клеточной линии K562 и при разном ответе на терапию ИТК.

Оказалось, что в лейкоцитах крови здоровых лиц средний уровень экспрессии гена *hOCT1* был существенно ниже ($p < 0,05$) чем в группе с резистентным течением заболевания ($1,38 \pm 0,37$ против $2,49 \pm 0,38$). Такая же тенденция прослеживалась при сравнении с группой с оптимальным ответом на лечение ИТК ($1,38 \pm 0,37$ против $2,27 \pm 0,39$, $p < 0,05$) (рисунок 11).

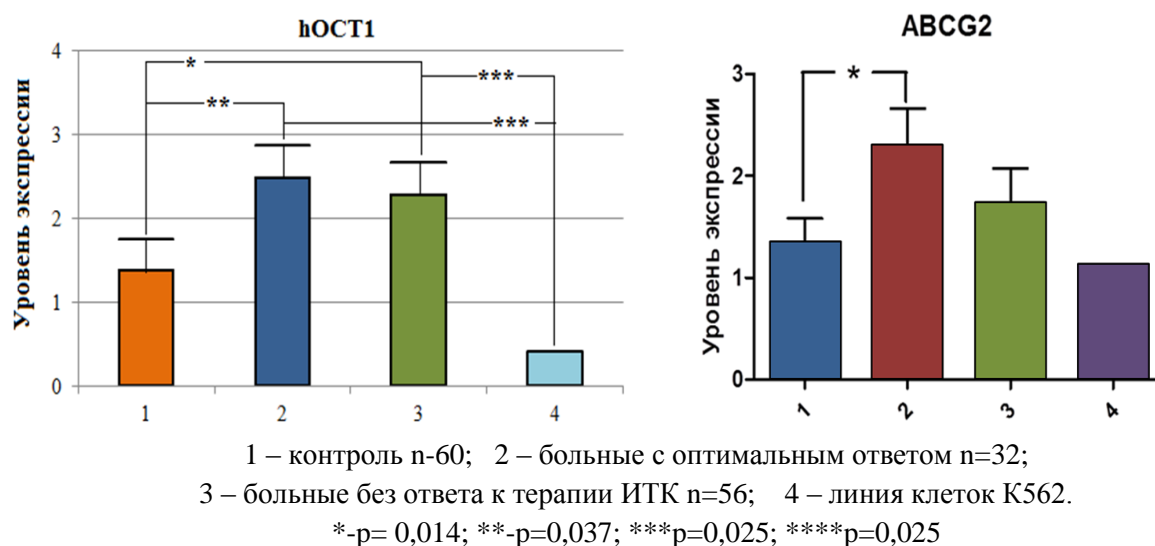


Рисунок 11 – Уровень экспрессии гена *hOCT1* и *ABCG2* у больных хроническим миелолейкозом с различным ответом на терапию, в контрольной группе и линии клеток K562.

В клеточной линии K562 нами обнаружен самый низкий уровень экспрессии гена *hOCT1*. В контрольной группе наблюдалась такая же тенденция. В группе больных с ХМЛ он оказался наиболее высоким, 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.

Аналогичные показатели получены при анализе уровня экспрессии гена *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 K562.

На рисунке 11 видно, что в лейкоцитах периферической крови уровень экспрессии гена *ABCG2* между резистентными к терапии больными ($1,73 \pm 0,34$) и контрольной группой

(1,34±0,23), а также между резистентными больными и больными с оптимальным ответом (2,29±0,36) статистически значимых различий не было обнаружено $p > 0,05$.

У пациентов же, ответивших на лечение ИТК уровень экспрессии данного гена был достоверно выше (2,29±0,36) по сравнению с выборкой контроля ($p=0,036$). Полученные данные свидетельствуют, об опосредованном участии гена *hOCT1 ABCG2* в метаболизме препаратов ИТК при ХМЛ.

Таким образом, в нашем исследовании изучение полиморфизма генотипов полиморфного локуса rs776746 в гене *CYP3A5* не показал статистически значимых клинико-генетических ассоциаций при ХМЛ. При этом уровень экспрессии гена *hOCT1* и гена *ABCG2* (переносчики органических катионов) показали зависимость на терапию ИТК, а полиморфизм гена *hOCT1* четко ассоциировался как наиболее значимый критерий для оценки прогноза течения, ответа на терапию ИТК и выживаемости пациентов с ХМЛ. Настоящее исследование клинико-генетических ассоциаций при ХМЛ раскрывает некоторые патогенетические механизмы развития резистентности к терапии ИТК больных ХМЛ, определяет индивидуализированный подход к определению прогноза, течения и персонафицированной тактики ведения пациентов с 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.
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 ХМЛ показал, что генотип С*С* 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*С* 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 *CYP3A5* не получено.
5. Уровень экспрессии гена *hOCT1* и гена *ABCG2* в лейкоцитах периферической крови пациентов с ХМЛ, в сравнении с контролем и линией клеток K562, показал на их зависимость от терапии ИТК, а, следовательно, и опосредованное участие в их метаболизме.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Значимый рост контингента пациентов с ХМЛ 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 и раннего переключения терапии.

СПИСОК НАУЧНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:

В журналах, рекомендованных ВАК Министерства науки и высшего образования Российской Федерации:

1. Миннихметов И.Р. Молекулярные основы патогенеза и фармакогенетики хронического миелолейкоза / И.Р. Миннихметов, Д.В. Исламгулов, А.С. Карунас, Н.Р. Рябчикова, Э.К. Хуснутдинова // Медицинская генетика. – 2009. – №10. – С.3–12
2. Миннихметов И.Р. Анализ мутации T3151 в гене BCR-ABL1 у больных хроническим миелолейкозом из Республики Башкортостан / И.Р. Миннихметов, Д.В. Исламгулов, Н.Р. Рябчикова, А.С. Карунас, Э.К. Хуснутдинова // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2011. – Т.13. – №5 (3). – С.263–267.
3. Исламгулов Д.В. Анализ изменений нуклеотидной последовательности в гене BCR-ABL1 у больных хроническим миелолейкозом из Республики Башкортостан / Д.В. Исламгулов, Н.Р. Рябчикова, А.С. Карунас, Э.К. Хуснутдинова // Медицинская генетика. – 2011. – №10. – С.15-16
4. Молекулярно-генетическое исследование хронического миелолейкоза в Республике Башкортостан / И.Р. Миннихметов, Д.В. Исламгулов, Н.Р. Рябчикова, А.С. Карунас, Э.К. Хуснутдинова // Медицинская генетика. – 2011. – №12. – С. 22–29.
5. Рябчикова Н.Р. Молекулярный мониторинг хронического миелолейкоза / Н.Р. Рябчикова, И.Р. Миннихметов, Г.Ш. Сафуанова и др. // Онкогематология. – 2013. – №1. – С.7-16
6. Рябчикова Н.Р. Эпидемиология хронического миелолейкоза в Республике Башкортостан / Н.Р. Рябчикова, Г.Ш. Сафуанова, В.И. Никуличева // Клиническая онкогематология. – 2018. – № 11 (4). – С. 349–353.
7. Сафуанова Г.Ш. Клинический случай терапии пациента хронический миелолейкозом с мутацией BCR-ABLY253H и сопутствующей патологией / Г.Ш. Сафуанова, Н.Р. Рябчикова, Г.А. Гайсарова, Е.Г. Царева, Д.Р. Сафуанова // Архив внутренней медицины. – 2019. – № 3. – С. 229–234.
8. Сафуанова Г.Ш. Прогностическое значение полиморфных вариантов генов CYP3A5 и hOCT1 у больных хроническим миелолейкозом в Республике Башкортостан / Г.Ш. Сафуанова, Н.Р. Рябчикова, Э. К. Хуснутдинова // Гематология и трансфузиология. – 2019. – Т. 64, № 2. – С. 165–174.
9. Рябчикова Н.Р. Анализ влияния полиморфных вариантов гена hOCT1 на терапию и продолжительность жизни больных хроническим миелолейкозом / Н.Р. Рябчикова, Г.Ш. Сафуанова, И.Р. Миннихметов, Д.Р. Сафуанова // Гематология и трансфузиология. – 2020. – Т.65, № 1. – С. 213.

В прочих журналах:

10. Рябчикова Н.Р. Хронический миелолейкоз у лиц пожилого возраста в Республике Башкортостан / Н.Р. Рябчикова, И.Р. Миннихметов, Г.Ш. Сафуанова, А.Б. Бакиров, Б.А. Бакиров // Вестник С-Петербургской государственной медицинской академии им. И.И. Мечникова. Специальный выпуск. – 2009. – № 2/1(31). – С293-294
11. Сафуанова Г.Ш. Опыт работы школы больных хроническим миелолейкозом и результативность их лечения иматинибом в Республике Башкортостан / Г.Ш. Сафуанова, Н.Р. Рябчикова, Б.А. Бакиров // Здоровье семьи-XXI век. Материалы XIV международной конференции 2010 г. 28 апреля – 5 мая, часть 1. Римини, Италия, изд-во «От и до». – С.368-369

12. Сафуанова Г.Ш. Клинико-гематологическая характеристика больных миелолейкозом в г. Уфе / Г.Ш. Сафуанова, Н.Р. Рябчикова, // Сб. научных трудов 10-й юбилейной Республиканской конференции молодых ученых РБ «Медицинская наука-2011». – Уфа. – 2011. – С. 188–189.
13. Сафуанова Г.Ш. Медико-социальные аспекты изучения больных хроническим миелолейкозом в республике Башкортостан / Г.Ш. Сафуанова, Н.Р. Рябчикова, Т.Р. Киреев, М.М. Абуляков // Материалы 10 юбилейной Республиканской конференции молодых ученых РБ «Медицинская наука-2011». – Уфа. – 2011. -С.201–204.
14. Исламгулов Д.В. Поиск мутации T3151 в гене BCR-ABL1 у больных хроническим миелолейкозом из Республики Башкортостан / Д.В. Исламгулов, Н.Р. Рябчикова, А.С. Карунас, Э.К. Хуснутдинова // Биомика. II Всероссийская школа-конференция молодых ученых УНЦ РАН и Волго-Уральского региона по физико-химической биологии и биотехнологии.– 2011.– Т. 1. – №2. – С. 80–81.
15. Сафуанова Г.Ш. Хронический миелолейкоз диагностика, лечение, мониторинг [текст] / Г.Ш. Сафуанова, Н.Р. Рябчикова, В.И. Никуличева, А.Б. Бакиров и др. // Методические рекомендации МЗ РБ – Уфа. – 2012. – 22 с.
16. Рябчикова Н.Р. Клинико-эпидемиологические показатели хронического миелолейкоза в Республике Башкортостан / Н.Р. Рябчикова, Г.Ш. Сафуанова, С.Т. Фазлыева, Д.А. Гараева // Материалы международной конференции молодых ученых «Медицинская наука-2012». – Уфа. – 2012. – С.215-220.
17. Рябчикова Н.Р. Клинико-гематологическая характеристика больных хроническим миелолейкозом в Республике Башкортостан / Н.Р. Рябчикова, Г.Ш. Сафуанова, А.Б. Бакиров, М.М. Акбуляков // Медицинский вестник Башкортостана. – 2014. – Т. 9. – №1. – С. 22–25.
18. Рябчикова Н.Р. Эпидемиология хронического миелолейкоза в Республике Башкортостан и организация терапии / Н.Р. Рябчикова, Г.Ш. Сафуанова, А.Б. Бакиров, В.И. Никуличева // Медицинский вестник Башкортостана. – 2017. – Т. 12. – №3(69). – С. 142–145
19. Рябчикова Н.Р. Анализ мутаций в гене BCR-ABL у больных хроническим миелолейкозом с высокой экспрессией гена в Республике Башкортостан / Н.Р. Рябчикова, И.Р. Миннихаев, Г.Ш. Сафуанова, Э.К. Хуснутдинова // Вестник гематологии. – 2017. – №3. – С.84
20. Ryabchikova N.R. Epidemiological indicators of chronic myeloleukosis in the republic of Bashkortostan for the period 2000-2020/ N.R. Ryabchikova, G.S. Safuanova, A.A. Latypova, D.R. Safuanova // The XV International Science Conference «Trends in the development of practice and science», 2021 – December 28 – 31, Oslo, Norway. – P.181-185.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- БК – бластный криз
- БМО – большой молекулярный ответ
- ГМО – глубокий молекулярный ответ
- ИМ -иматиниб
- ИТК – ингибиторы тирозинкиназ, 1- первого поколения, 2- второго поколения
- МО – молекулярный ответ
- МЦО – малый цитогенетический ответ
- ПГО – полный гематологический ответ
- ПЦО – полный цитогенетический ответ
- ПЦР – полимеразная цепная реакция
- РБ - Республика Башкортостан
- ФА – фаза акселерации
- ХМЛ – хронический миелоидный лейкоз
- ХФ – хроническая фаза
- ЦО – цитогенетический ответ
- ЧЦО – частичный цитогенетический ответ
- ABCG2 - АТФ-зависимый мембранный транспортер G2
- BCR::ABL – химерный ген, результат транслокации между 9 и 22 хромосомами
- CYP3A5 - цитохром P450
- ELN – Европейская организация по лечению лейкозов (European Leukemia Net)
- FISH – флуоресцентная гибридизация in situ (Fluorescence in situ hybridization)
- hOCT1 - переносчик органических катионов первого типа
- Ph – филадельфийская хромосома