

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
ИМЕНИ В. А. АЛМАЗОВА» МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

ЧИТАНАВА ТАМАРА ВАНГЕЛЬЕВНА

ФАКТОРЫ ПРОГНОЗА ЭФФЕКТИВНОСТИ ТЕРАПИИ ИНГИБИТОРАМИ
ТИРОЗИНКИНАЗ ВТОРОГО ПОКОЛЕНИЯ В ТРЕТЬЕЙ ЛИНИИ ТЕРАПИИ
ХРОНИЧЕСКОЙ ФАЗЫ ХРОНИЧЕСКОГО МИЕЛОИДНОГО ЛЕЙКОЗА

Диссертация

на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

3.1.28. Гематология и переливание крови

Научный руководитель:

Ломаиа Елза Галактионовна

кандидат медицинских наук, доцент

Санкт-Петербург – 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
Актуальность темы исследования	5
Степень разработанности темы	7
Цель исследования	8
Задачи исследования	8
Научная новизна исследования	8
Теоретическая и практическая значимость работы	9
Методология и методы исследования	10
Положения, выносимые на защиту	10
Степень достоверности и апробация результатов	11
Соответствие диссертации паспорту научной специальности	12
Личный вклад автора	12
Внедрение результатов исследования	12
Объем и структура работы	13
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	14
1.1 Ингибиторы тирозинкиназ. Механизм действия	14
1.2 Механизмы резистентности к терапии ИТК	16
1.3 Роль НК клеток в развитии резистентности к ИТК	24
1.4 Роль гаплотипов KIR рецепторов в развитии резистентности	27
1.5 Ингибиторы тирозинкиназ второго поколения в третьей линии	29
1.6 Ингибиторы тирозинкиназ третьего поколения и STAMP-ингибитор в третьей линии	35
ГЛАВА 2. ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	37
2.1 Характеристика группы пациентов	37
2.2 Методы исследования	42
2.2.1 Статистическая обработка данных	42
2.2.2 Лабораторные методы исследования НК клеток	43
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	49

3.1	Оценка результатов терапии ИТК второго поколения в третьей линии терапии	49
3.1.1	Оценка гематологического ответа	49
3.1.2	Оценка цитогенетического ответа	49
3.1.3	Оценка молекулярного ответа.....	55
3.2	Прогрессия заболевания и выживаемость на терапии ингибиторами тирозинкиназ второго поколения в третьей линии.....	60
3.2.1	Беспрогрессивная выживаемость на терапии ИТК 2-го поколения в третьей линии терапии.....	60
3.2.2	Общая выживаемость на терапии ИТК 2-го поколения в третьей линии терапии	66
3.3	Факторы прогноза эффективности терапии ИТК 2-го поколения в третьей линии терапии.....	74
3.4	Экспрессия активирующих и ингибирующих рецепторов НК клеток в разных группах пациентов ХФ ХМЛ.....	76
3.5	Оценка гаплотипов KIR рецепторов и их влияние на достижение ПЦО, ОВ и БПВ у пациентов с ХФ ХМЛ	85
3.6	Оценка статуса пациентов на последнем визите	90
3.7	Алгоритм третьей линии терапии пациентов в хронической фазе ХМЛ	92
	ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ СОБСТВЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ	94
	ЗАКЛЮЧЕНИЕ	100
	ВЫВОДЫ	102
	ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	104
	ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ.....	105
	СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	106
	СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	107
	ПРИЛОЖЕНИЕ А	125
	ПРИЛОЖЕНИЕ Б.....	127
	ПРИЛОЖЕНИЕ В	129

ПРИЛОЖЕНИЕ Г	131
ПРИЛОЖЕНИЕ Д	133

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Хронический миелоидный лейкоз (ХМЛ) представляет собой злокачественное новообразование, характеризующееся неконтролируемым ростом клеток миелоидного происхождения и их пролиферацией в периферической крови. Патогенез заболевания связан с транслокацией между хромосомами 9 и 22, часть гена *ABL* переносится с 9 хромосомы на длинное плечо 22 хромосомы, где сливается с геном *BCR* в результате которой образуется aberrантная хромосома 22, называемая Филадельфийской (Ph) [103]. На молекулярном уровне эта транслокация создает онкоген *BCR::ABL*, продуцирующий три различных по молекулярной массе вида белка, обладающих тирозинкиназной активностью [88, 42].

Терапия ХМЛ основана на использовании ряда небольших молекул, ингибиторов тирозинкиназ (ИТК), такие как иматиниб – препарат 1-го поколения, дазатиниб, нилотиниб, бозутиниб – препараты 2-го поколения. В настоящее время в Российской Федерации зарегистрированы препарат третьего поколения – понатиниб от 24.01.2022 под регистрационным номером ЛП-№ (007819) (РГ-RU) и первый STAMP-ингибитор асциминиб от 24.01.2023г под регистрационным номером ЛП-№(001723)-(РГ-RU). Появление ИТК в лечении ХМЛ значительно изменило исход заболевания. Выживаемость пациентов приблизилась к общепопуляционной [15]. Более того, почти половина пациентов достигают глубокого молекулярного ответа (ГМО), около 10 % больных со стабильным ГМО сохраняют достигнутый ответ и после отмены ИТК. В настоящее время тысячи пациентов по всему миру находятся в ремиссии без терапии [15].

При этом, проблема резистентности к терапии ИТК все еще остается актуальной. Около 30 % и 50 % больных оказываются резистентными к первой или второй линиям терапии ИТК соответственно [43; 63, 54; 58, 57; 113; 2]. Доступность же препаратов третьего поколения и STAMP-ингибитора пока не так высока, особенно в рамках региональных квот.

Как в международных, так и в российских клинических рекомендациях, при неудаче двух и более линий ИТК пациент должен быть рассмотрен как кандидат для аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (аллоТГСК) или направлен на третью и более линию терапии ИТК 3-го поколения (критерии оценки ответов на терапию ИТК во второй линии представлены в приложении А) [6, 66]. Однако, большинство пациентов не могут быть направлены на аллоТГСК из-за возраста, сопутствующих заболеваний или отсутствия оптимального донора. Кроме того, есть данные, свидетельствующие об отсутствии преимущества по общей выживаемости (ОВ) между аллоТГСК и продолжением консервативной терапии ИТК [138]. При этом по мере использования очередного ИТК нарастает вероятность селекции клонов с новыми генетическими aberrациями и, следовательно, повышается риск трансформации в фазу акселерации (ФА) и/или бластный криз (БК).

Наиболее изученными генетическими aberrациями, как основными механизмами резистентности, являются мутации гена *BCR::ABL*. Однако, мутации в хронической фазе определяются менее чем у половины пациентов. Альтернативным механизмом резистентности считается появление генетических перестроек вне гена *BCR::ABL*. Наряду с этим, на настоящий момент активно изучается роль ускользания лейкоэмических клеток при ХМЛ от противоопухолевого иммунного ответа в развитии неэффективности ИТК. Наибольший интерес представляют НК клетки, в особенности гаплотипы рецептора KIR на НК клетках [12]. Изучение функционального статуса НК клеток и особенностей гаплотипов его рецепторов у пациентов с резистентностью к ИТК может быть основой для разработки противоопухолевой терапии при ХМЛ с целью преодоления резистентности к ИТК. Выявление группы пациентов с неблагоприятным прогнозом на ИТК в третьей линии позволит на раннем этапе направить пациента на аллоТГСК, тем самым сокращая сроки дорогостоящей, но малоэффективной терапии. Это приведет к повышению ОВ пациентов ХМЛ, а также сокращению расходов здравоохранения на лечение пациентов ХМЛ.

Степень разработанности темы

Эффективность терапии ИТК 2-го поколения в третьей линии терапии была изучена в небольших исследованиях разных центров по всему миру. По данным различных исследований, достижение ПЦО колебалось от 11 % в исследовании нилотиниба в третьей линии [54], до 84 % в исследовании бозутиниба в третьей линии [54]. Достижение БМО от 13 % в исследовании дазатиниба в третьей линии [54] до 64 % в исследовании бозутиниба в третьей линии [66]. Выбор продолжения консервативной терапии в качестве третьей линии сопряжен с рядом факторов, таких как: коморбидность пациента, возраст, мутационный статус киназного домена гена *BCR::ABL*. На настоящий момент активно обсуждается вопрос эффективности аллоТГСК по сравнению с консервативной терапией в третьей линии у пациентов в ХФ, в особенности без мутации T315I. Прямых сравнений данных групп очень мало. В работе Lomaia E., et al (2022) были представлены данные сравнения группы консервативной терапии в третьей линии, n=73 и группы аллоТГСК в ХФ ХМЛ, независимо от линий терапии, n=66 [88]. С появлением ИТК 3го поколения, все чаще обсуждается вопрос отсрочки аллоТГСК ввиду высокой эффективности консервативной терапии и независимости результатов трансплантации от количества линий предшествующей терапии в ХФ ХМЛ [3]. Доступность понатиниба и асциминиба в РФ, особенно в региональном здравоохранении не так высока, поэтому выбор ИТК 2-го поколения в третьей линии должен быть основан на прогностических для каждого пациента факторах.

Что касается противоопухолевого ответа у пациентов с ХМЛ и ролью НК клеток в развитии резистентности, описаны работы по исследованию данного вопроса у пациентов в дебюте заболевания, после терапии иматинибом в первой линии и после терапии дазатинибом в первой линии. Так, у пациентов, предлеченных иматинибом, количество активирующих НКp46 рецепторов экспрессируется значимо больше, нежели в группе пациентов, предлеченных дазатинибом. Однако, ни экспрессия ингибирующих, ни активирующих рецепторов не связана с ответом на терапию [19]. Противоположные результаты

терапии у предлеченных дазатинибом [63], где была выявлена высокая экспрессия активирующего NKG2D.

Цель исследования

Оптимизация терапии пациентов в хронической фазе хронического миелоидного лейкоза после неудачи двух линий ингибиторов тирозинкиназ на основании выявленных факторов прогноза.

Задачи исследования

1. Изучить частоту и скорость достижения полного гематологического ответа, полного цитогенетического ответа, большого молекулярного ответа, параметров общей и беспрогрессивной выживаемости на терапии ингибиторами тирозинкиназ 2-го поколения в третьей линии у пациентов в хронической фазе хронического миелоидного лейкоза;

2. Оценить влияние НК-клеточного иммунного ответа на достижение полного цитогенетического ответа на терапии ингибиторами тирозинкиназ 2-го поколения в третьей линии у пациентов в хронической фазе хронического миелоидного лейкоза;

3. Выявить предикторы благоприятного прогноза достижения полного цитогенетического ответа/молекулярного ответа 2 на терапии ингибиторами тирозинкиназ 2-го поколения в третьей линии у пациентов в хронической фазе хронического миелоидного лейкоза;

4. Разработать алгоритм терапии третьей линии пациентов в хронической фазе хронического миелоидного лейкоза на основе выявленных клинико-лабораторных факторов прогноза.

Научная новизна исследования

Впервые в рамках ретроспективно-проспективного исследования применения ИТК второго поколения в третьей линии терапии определены клинико-лабораторные

факторы благоприятного и неблагоприятного прогноза достижения оптимального ответа на третьей линии терапии, что позволило определить группу пациентов, для которых продолжение консервативной терапии ИТК 2-го поколения в третьей линии может быть наиболее эффективным.

Впервые проведена оценка НК-клеточного иммунного ответа у пациентов с оптимальным ответом, резистентных к терапии ИТК 2-го поколения в третьей линии, а также здоровых доноров.

Разработан комплексный алгоритм терапии третьей линии у пациентов в хронической фазе ХМЛ после неудачи двух линий ИТК.

Теоретическая и практическая значимость работы

По результатам работы доказано высокое влияние полного цитогенетического ответа, достигнутого на терапии третьей линии, на вероятность общей и беспрогрессивной выживаемости.

Факторами, влияющими на достижение полного цитогенетического ответа на третьей линии терапии, являются различная глубина цитогенетического ответа (Мин/м, ЧЦО, ПЦО) на первых двух линиях терапии, а также до начала третьей линии, молекулярный ответ ($>1-10\%$) на момент начала третьей линии.

Персонализированный отбор пациентов перед выбором терапии третьей линии, в том числе с использованием данных факторов, позволит отобрать группу пациентов, для которых продолжение консервативной терапии сопряжено с хорошим прогнозом качества и продолжительности жизни.

В случае отсутствия цитогенетического ответа до и на момент начала ИТК в третьей линии, высокой молекулярной нагрузки ($>10\%$) на момент начала ИТК в третьей линии, рекомендовано направление пациента на выполнение аллотГГСК.

Разработанный алгоритм терапии третьей линии внедрен в работу отделения для оказания специализированной медицинской помощи онкологическим больным консультативно-диагностического центра ФГБУ «НМИЦ им В. А. Алмазова» Минздрава России и отделения онкологии, гематологии и трансплантологии для подростков и взрослых НИИ детской онкологии, гематологии и трансплантологии

имени Р. М. Горбачевой ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. ак. И. П. Павлова Минздрава России.

Методология и методы исследования

Научная методология диссертационного исследования основывается на системном подходе к изучаемой проблеме, и комплексном рассмотрении процессов патогенеза и терапии заболеваний крови опухолевой природы. В работе использованы клинические, статистические и общенаучные методы исследования (наблюдение, измерение, тестирование гипотез). В экспериментальной части работы использованы методы ПЦР исследования, проточной цитофлюориметрии, электрофореза в агарозном геле.

Положения, выносимые на защиту

1. Эффективность ингибиторов тирозинкиназ второго поколения в третьей линии терапии пациентов в хронической фазе хронического миелоидного лейкоза невысокая – всего около трети пациентов достигают полного цитогенетического ответа. В большинстве случаев пациенты получают полный цитогенетический ответ в течение первого года терапии. Достижение полного цитогенетического ответа достоверно снижает риск прогрессии в продвинутые фазы и повышает общую выживаемость;

2. Параметры НК-клеточного иммунного ответа не влияли на достижение полного цитогенетического ответа, не отличались у здоровых доноров, пациентов с оптимальным ответом и резистентных к терапии ИТК 2-го поколения в третьей линии пациентов;

3. Факторами, благоприятно влияющими на достижение полного цитогенетического ответа, являются достижение какого-либо цитогенетического ответа (минимального/малого цитогенетического ответа, частичного цитогенетического ответа, полного цитогенетического ответа) на предшествующих линиях терапии ингибиторов тирозинкиназ, наличие цитогенетического ответа (минимального/малого цитогенетического ответа,

частичного цитогенетического ответа) на момент начала третьей линии терапии и/или наличие молекулярного ответа на момент начала терапии ингибиторами тирозинкиназ в третьей линии менее или равно 10 %. Какой-либо цитогенетический ответ или уровень транскрипта гена $BCR::ABL \leq 10\%$ на момент начала терапии ингибиторами тирозинкиназ 2-го поколения в третьей линии достоверно увеличивает общую и беспрогрессивную выживаемость;

4. Разработанный на основании факторов прогноза достижения полного цитогенетического ответа алгоритм терапии третьей линии позволит более эффективно и своевременно направлять пациентов для продолжения консервативной терапии или проведения аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток.

Степень достоверности и апробация результатов

Полученные результаты были представлены в виде стендовых и устных докладов, тезисов на конференциях, конгрессах, съездах: 62-м съезде Американского общества гематологов (Virtual, 2020г), IV-ом научно-практической конференции «Актуальные вопросы высоко-технологичной помощи в терапии» (Санкт-Петербург, 2020), на 25-м конгрессе Европейского общества гематологов (Virtual, 2020г), на 17-м съезде Европейского общества по изучению лейкозов (Манхейм, 2021г), IV-ом инновационном медицинском форуме (Санкт-Петербург, 2021г), IV-ом инновационном медицинском форуме (Санкт-Петербург, 2021г), на VI-ом Конгрессе гематологов (Москва, 2022г), на VI-ом Конгрессе гематологов (Москва, 2022г), 1-м дискуссионном клубе им А.Ю. Зарицкого (Санкт-Петербург, 2022), на 64-м съезде Американского общества гематологов (СанДиего, 2022г), на 29-ой встрече европейских лидеров в области изучения хронического миелолейкоза (Неаполь, 2023г), 2-м дискуссионном клубе им А.Ю. Зарицкого (Санкт-Петербург, 2023).

По теме диссертации опубликовано 15 печатных работ: 6 полнотекстовых статей, все из них в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК для публикации результатов диссертационных исследований; 7 тезисов, 2

свидетельства на регистрацию базы данных №2022623097 от 25.11.2022г и программы для ЭВМ №2022663973 от 21.07.2022г.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации соответствуют паспорту специальности 3.1.28. – Гематология и переливание крови. Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования специальности 3.1.28. – Гематология и переливание крови, а именно: п. 6 и п. 13.

Личный вклад автора

Автором лично проведены планирование ретроспективной и ретроспективно-перспективной части исследования. Проведен анализ данных литературы, сбор и анализ данных историй болезни, амбулаторных карт, выписок из медицинской документации, сформулированы цель и задачи исследования. Диссертант непосредственно участвовал в организации логистики биоматериала, выполнении лабораторных исследований НК клеток. Автором подготовлена электронная база данных, осуществлены статистическая обработка, интерпретация полученных результатов, сформулированы выводы и практические рекомендации, подготовлены материалы к публикациям.

Внедрение результатов исследования

Результаты диссертационного исследования внедрены в практическую деятельность отделения для оказания специализированной медицинской помощи онкологическим больным консультативно-диагностического центра ФГБУ «НМИЦ им В. А. Алмазова» Минздрава России и отделения онкологии, гематологии и трансплантологии для подростков и взрослых НИИ детской онкологии, гематологии и трансплантологии имени Р. М. Горбачевой ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. ак. И. П. Павлова Минздрава России.

Объем и структура работы

Диссертация изложена на 133 страницах машинописного текста, иллюстрирована 32 рисунками и 18 таблицами. Работа состоит из введения, обзора литературы, методов исследования и клинической характеристики пациентов, результатов собственных исследований, обсуждения результатов, заключения, выводов, практических рекомендаций. Библиографический указатель содержит 144 литературных источников: 9 отечественных и 135 зарубежных.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Ингибиторы тирозинкиназ. Механизм действия

Хронический миелоидный лейкоз – клональное миелопролиферативное новообразование, характеризующееся усиленной пролиферацией гранулоцитарного ростка миелопоэза, с сохранением возможности дифференцировки гранулоцитов до зрелых форм. Частота встречаемости ХМЛ 1–1.5 случая на 100,000 населения в год, преимущественно в возрасте между 50 и 60 годами, пол не имеет значения [66]. Заболевание обусловлено реципрокной транслокацией $t(9;22)(q34;q11.2)$, называемой Ph⁺ хромосомой в плюрипотентной стволовой клетке. В результате этой транслокации происходит слияние гена *ABL* с оставшейся на хромосоме 22 частью гена *BCR*. Выделяют три разных региона, в зависимости от места разрыва гена *BCR*, первый *M-BCR* (major breakpoint cluster region), *m-BCR* (minor breakpoint cluster region), *μ-BCR* (micro breakpoint cluster region), продуцируется белок разной молекулярной массы, обладающий тирозинкиназной активностью. Наиболее часто 210 кД – p210 в 95% случаев, 190кД – p190 в 3%, 230кД – p230 соответственно в 2% случаях [44, 135, 136]

Таким образом, *BCR::ABL1* играет ключевую роль в патогенезе хронического миелоидного лейкоза (ХМЛ), и в течение последних двух десятилетий его исследовали в качестве лекарственной мишени для ингибиторов тирозинкиназ (ИТК) [86].

Ингибиторы тирозинкиназы (ИТК) представляют собой группу фармакологических агентов, которые нарушают пути передачи сигналов протеинкиназ несколькими способами ингибирования:

- Тип 1: конкурентно связывается с АТФ-связывающим сайтом каталитически активной тирозинкиназы. Расположение последовательности Asp-Phe-Gly (DFG нуклеотидов) в ингибиторах типа I таково, что остаток аспартата обращен к каталитически активному сайту киназы.
- Тип 2: связываются и стабилизируют киназный домен в неактивном состоянии. Расположение последовательности нуклеотидов DFG в ингибиторах II

типа выступает снаружи сайта связывания АТФ. Из-за вращения DFG многие ингибиторы типа II могут использовать области, прилегающие к сайту связывания АТФ, которые были бы недоступны в другом случае.

- Тип 3: не взаимодействуют с АТФ-связывающим карманом. Ингибиторы III типа связываются исключительно с аллостерическими карманами, прилегающими к АТФ-связывающей области.

- Тип 4: связываются с аллостерическими сайтами, удаленными от АТФ-связывающего кармана.

- Тип 5: относятся к подмножеству ингибиторов тирозинкиназ, которые проявляют все перечисленные способы связывания [125].

Ингибиторы тирозинкиназ, применяемые в терапии ХМЛ относятся к первому, второму и четвертому типам. АТФ-конкурентные ингибиторы конкурируют с АТФ за связывание с киназным доменом *ABL1* через промежуток между N- и C-концевыми сайтами. Поскольку инактивированные конформации различных киназ очень похожи, они были основной мишенью ИТК, таких как иматиниб, nilотиниб и понатиниб (ингибирование 2-го типа) [120]. С другой стороны, дазатиниб и бозутиниб могут связываться с активной конформацией АТФ-связывающего кармана и ингибировать активность тирозинкиназы (ингибирование типа 1). В 2003 году группа исследователей Kuriyan J and Superti-Furga G et al (2003) [62, 99] сообщили, что миристоильная группа участвует в ауторегуляции *ABL1* и близкородственной киназы *ABL2* [32]. Молекула асциминиба связывается специфически с участком *ABL1* в области миристоилового кармана, тем самым переводя киназу в неактивное состояние. Асциминиб связывается с внутренним «карманом связывания миристора» в С-области киназного домена *ABL1*, миристоильная группа, которая ковалентно присоединена к N-концу *ABL1*, индуцирует сборку доменов SH3 и SH2 таким образом, чтобы в собранном неактивном состоянии они лишали киназный домен конформационной гибкости [97, 99].

Иматиниб и nilотиниб являются более селективными ИТК, чем понатиниб и ИТК I типа, бозутиниб и дазатиниб. Все эти препараты имеют разные профили

ингибирования, приводящие к ингибированию многих других киназ [93, 94]. Однако, к мутации T315I резистентны почти все ИТК 1 и 2 типа, кроме понатиниба и первого STAMP-ингибитора асциминиба [83]. Понатиниб связывается с *BCR::ABL* с другой конформационной стороны, не соединяясь с тирозином в положении 315, таким образом, преодолевая резистентность к этой мутации [104]. Асциминиб активен при большинстве мутаций *BCR::ABL1* в связи с тем, что он аллостерически связывается с *ABL1*, не включающим АТФ-связывающий карман. В доклинических экспериментах также подтверждена его способность ингибировать генно-инженерные клеточные линии, соответствующие мутациям в гене *BCR::ABL1*, включая и мутацию T315I.

1.2 Механизмы резистентности к терапии ИТК

Несмотря на многочисленные успехи в создании различных по механизмам типов ингибиторов тирозинкиназ, количество пациентов, резистентных к 2м или более ИТК достигает по разным оценкам от 20 до 40% [100, 77, 66], механизмы резистентности до сих пор активно изучаются.

Резистентностью принято считать неэффективность лечения ИТК. Различают первичную, когда ответ не достигается на том или ином ИТК, вторичную, когда ответ был достигнут, но впоследствии утрачен.

Согласно уровням ответа резистентность может быть: первичная и вторичная гематологическая, первичная и вторичная цитогенетическая, первичная и вторичная молекулярная [85].

Согласно механизмам резистентности:

BCR::ABL зависимые:

- мутации *ABL1* киназного домена;
- гиперэкспрессия *BCR::ABL1*;
- дополнительные хромосомные aberrации (ДХА) в Ph⁺ клоне

BCR::ABL независимые механизмы:

- низкий комплаенс;
- нарушение транспорта молекул «в» и «из» клетки;

- активация альтернативных путей;
- концентрация ИТК в плазме;
- нечувствительность к ИТК стволовых клеток (LSC);
- другие соматические точечные мутации *ASXL*, *RUNX1*, *IDH1,2*, *WT1*, *TP53*, *TET2*, *CBL*, *NRAS*, *KRAS*;
- нарушения транскрипции, редактирования и трансляции РНК;
- иммунологические причины (ускользание лейкозных клеток от противоопухолевого иммунного надзора, роль миелоидных супрессорных клеток, НК клеток).

Мутации ABL1 киназного домена

Одним из параметров геномной нестабильности при ХМЛ выступает наличие мутаций киназного домена гена *BCR::ABL*. На настоящий момент описано более 90 видов точечных мутаций киназного домена гена *BCR::ABL*, выявленных у больных ХМЛ с резистентностью к иматинибу или полученных в экспериментах *in vitro* [7].

Мутации располагаются в разных структурных субъединицах киназного домена:

- (1) сайт прямого связывания (Y253F/H, T315I, F317L и др.);
- (2) фосфатсвязывающая петля (Р-петля), например, G250E, Y253F/H, Q255H/R способны приводить к нарушению пространственной структуры *BCR::ABL* и переводу киназы в активную конформацию, что может послужить ключевым фактором снижения ингибирования мутантного клона;
- (3) активационная петля (А-петля). Мутации активационной петли киназного домена (H396R, V379I, L387M) также способны изменить пространственное расположение структуры петли и перевести белок в активную конформацию;
- (4) каталитическая петля (С-петля), M351T, E355G, F359V могут активировать тирозинкиназную активность.

Мутации в киназном домене тирозинкиназы *BCR::ABL* наблюдаются у более чем 50% пациентов ХМЛ с резистентностью и чаще встречаются у пациентов со вторичной резистентностью [48; 65; 74; 82]. Наиболее значимыми клинически для

выбора ИТК второго поколения у больных ХМЛ являются 6 мутаций: V299L, F317L/V/I/C, T315A, Y253H, E255K/V, F359V/C.

Первое сообщение о значимости мутационного статуса гена *BCR::ABL* описано при неэффективности иматиниба в 2001 году, когда Sawyers и его коллеги описали механизм избегания *BCR::ABL1* от ингибирования путем изменения формы кармана для связывания с иматинибом [58]. Описанная мутация приводит к аминокислотной замене в положении 315 в *BCR::ABL* из треонина (Т) в группу изолейцина (I) [128]. Мутация T315I активирует не только тирозинкиназу *BCR::ABL*, но и многие другие киназы, благодаря созданию протяженного гидрофобного фрагмента, сохраняющего свою активную конформацию. В том числе данная мутация препятствует связыванию ИТК первого и второго поколения в области АТФ-связывающего кармана [92].

В диссертационном исследовании Шухова О.А. было показано достоверно значимое влияние результатов мутационного статуса в киназном домене гена *BCR::ABL* на частоту прогрессий и общую выживаемость пациентов. Общая выживаемость в подгруппах с и без мутаций составили 16,7 % против 84 %, $p=0,014$. Вероятность БПВ в группе с мутациями киназного домена *BCR::ABL* значимо ниже, чем в группе с мутациями 52 % и 94 % соответственно [9].

Учитывая наличие абсолютной резистентности к таргетным препаратам, неоднократно проводились исследования с целью оценки влияния этой мутации на общую выживаемость. Так, в работе Nicolini et al. с момента начала иматиниба при медиане наблюдения 39,2 месяца (6,367,2 мес.) общая выживаемость в ФА и БК значимо ниже у пациентов с мутациями Р-петли (28,3 мес.) и мутацией T315I (12,6 мес.) по сравнению с другими, а при многофакторном анализе в ХФ значительно хуже показатели БПВ пациентов с мутацией T315I ($p = 0,014$) [102].

На настоящий момент в терапии пациентов с мутацией T315I существует не только опция аллоТГСК, но также консервативная терапия (понатиниб, асциминиб). Так, по данным исследования RASCЕ, при применении понатиниба 45 мг в сутки в третьей линии терапии ХМЛ у пациентов с мутацией T315I ПЦО и БМО достигнуты у 66 и 56 % пациентов соответственно [38]. Согласно результатам

исследования эффективности асциминиба в России у пациентов, включенных в программу управляемого доступа препарата (МАР), 20/50 (40 %) с мутацией T315I эффективность лечения асциминибом в дозе 200 мг 2 раза в сутки в программе МАР оказалась достаточно близка к результатам I фазы клинического исследования в когорте больных ХМЛ с мутацией T315I [5]. В клиническом исследовании у пациентов с мутацией T315I вероятность достижения ПЦО/МО2 через 2 года терапии составила 62,2 % [68]. Согласно данным российских исследователей, вероятность достижения ПЦО к 24 мес. у больных с мутацией T315I 63 % [5].

Несмотря на значительные успехи в терапии пациентов с T315I новыми поколениями ИТК (понатинибом и асциминибом), доступность этих препаратов на настоящий момент в разных регионах страны значительно различается. Актуальность аллогенной трансплантации у данной группы пациентов неоспорима. Согласно результатам исследования Nicolini et al., двухлетняя ОВ пациентов с мутацией T315I после аллоТГСК составляла всего 59 % [100]. В диссертационном исследовании Ю.Ю. Власовой вероятность 5-летней общей выживаемости у пациентов с мутацией T315I в первой хронической фазе после аллоТГСК составила 42 % [1].

Помимо панрезистентной мутации T315I выявлены и другие мутации, приводящие к неэффективности терапии ИТК 2-го поколения. Так, терапия дазатинибом неэффективна при наличии мутаций V299L, F317I/L. В то же время неудача терапии нилотинибом возможна у пациентов с заменой аминокислотных остатков Y253 и E255. Интересно, что существуют мутации, развитие которых наоборот способствует эффективности ИТК. Так, мутация F359C/V обуславливают эффективность терапии дазатинибом, а мутация F317L терапии нилотинибом.

Гиперэкспрессия гена *BCR::ABL*

Механизмы, благодаря которым осуществляется гиперэкспрессия *BCR::ABL*, остаются до конца невыясненными. Впервые гиперэкспрессию *BCR::ABL* подтвердили на моделях животных еще в 2000 году [84]. В 2011 году была выдвинута гипотеза о связи между гиперэкспрессией *BCR::ABL* и развитием

мутаций киназного домена гена *BCR::ABL* [130], предполагая, что этот механизм может представлять собой первый шаг к развитию резистентности. Кроме того, гиперэкспрессия *BCR::ABL*, по-видимому, усиливает самообновление лейкемических стволовых клеток [10].

Дополнительные хромосомные aberrации (ДХА) в Ph⁺ клоне

Наличие ДХА можно наблюдать при постановке диагноза примерно у 5 % или менее пациентов в ХФ ХМЛ, как показано в нескольких исследованиях [23, 108]. Согласно рекомендациям European LeukemiaNet от 2020г наличие ДХА при постановке диагноза следует рассматривать как «предупреждающий» признак для пациентов с ранней ХФ, требующий более тщательного наблюдения за этой подгруппой пациентов [66]. Появление ДХА во время лечения обозначается как клональная эволюция (КЭ) и связана с прогрессией заболевания, поскольку частота ДХА выше в поздних фазах, фазе акселерации (~30%) и бластном кризе (~80%) [66]. Однако, ДХА представляют собой гетерогенный набор аномалий кариотипа с разной частотой и разной прогностической значимостью. Наиболее распространенными ДХА, участвующими в эволюции кариотипа, являются трисомия 8 (наиболее частая), вторая Ph-хромосома, изохромосома 17 (i(17q)) и трисомия 19 [38]. Редкими цитогенетическими аномалиями являются трисомии хромосом 17 и 21, моносомии хромосом 7, 17 и 21, транслокации t(3;12), t(4;6), t(2;16) и t(1; 21), отсутствие Y-хромосомы. Прогностическое значение ДХА у пациентов с ХМЛ в ХФ до сих пор обсуждается. В то время как некоторые исследования связывали наличие ДХА с ухудшением выживаемости без прогрессирования и/или общей выживаемости [135], другие не смогли найти какой-либо значимой связи [121, 75].

Из *BCR::ABL* независимых причин резистентности, наиболее изучены альтернативные сигнальные пути, лейкемические стволовые клетки, другие соматические точечные мутации *ASXL*, *RUNX1*, *IDH1,2*, *WT1*, *TP53*, *TET2*, *CBL*, *NRAS*, *KRAS*; нарушения транскрипции, редактирования и трансляции РНК, иммунологические причины (ускользание лейкозных клеток от

противоопухолевого иммунного надзора, роль миелоидных супрессорных клеток, НК клеток).

Активация альтернативных путей

Механизмом устойчивости к ИТК является активация альтернативных сигнальных путей, таких как *PI3K/AKT*, *JAK/STAT*, *Ras/MAPK* и *SRC*, которые компенсируют супрессию *BCR::ABL* [10; 25; 48; 57, 136]. Как следствие, клетки продолжают пролиферировать, несмотря на эффективное ингибирование *BCR::ABL1*. Клиническая значимость этого независимого от *ABL1* механизма резистентности заключается в том, что некоторые пациенты с ХМЛ могут быть невосприимчивы ко всем имеющимся ИТК.

Лейкемические стволовые клетки (LSC)

Еще при изучении причин рецидивов после выхода в ремиссию без терапии после долгосрочного глубокого молекулярного ответа, появляется все больше гипотез, объясняющих связь этих рецидивов с внутренней биологией стволовых клеток ХМЛ, которые довольно часто могут быть устойчивыми к ИТК [90; 116. 60, 61]. Лейкемические стволовые клетки представляют собой *CD34+/CD38-CD26+* пул клеток, входящих в клон *BCR::ABL1* положительных и составляют менее 1 % от всех стволовых клеток *CD34+* на момент диагностики заболевания [31]. Доступные ИТК, предназначенные только для зрелых пролиферирующих клеток, могут быть недостаточно эффективны для эрадикации этого пула клеток.

Они остаются в состоянии покоя во время лечения и представляют собой резерв *BCR::ABL* положительных клеток, находящихся в специфических нишах костного мозга [31]. Пролиферация этих клеток не зависит от активности *BCR::ABL*, как было показано во многих экспериментах на мышах [61, 33]. Этот факт вызвал поиски LSC-селективных путей, независимых от киназы *BCR::ABL1*. На сегодняшний день предполагается, что ряд внутриклеточных и внеклеточных путей и механизмов вносят вклад в устойчивый к ИТК фенотип LSC, и многие из этих путей могут быть потенциальными мишенями для терапии. Среди

внутриклеточных механизмов наиболее широко исследованы пути *FOXo* [100, 107], *Sonic Hedgehog* [46] и *Wnt/ β -catenin* [112]. Однако, считается, что взаимодействие с микроокружением костного мозга не менее важно для выживания LSC. *CD44/E-селектин* [79], *галектин-3 (Gal-3)* [139], *CXCR4/CXCL12* [125], все они были предложены для улучшения самообновления LSC. И последнее, но не менее важное: было высказано предположение, что изменение иммунного надзора в микроокружении костного мозга может играть роль в предотвращении эрадикации LSC [97].

Соматические мутации

Помимо точечных мутаций киназного домена гена *BCR::ABL1*, были описаны другие генные мутации, характерные преимущественно для острых лейкозов. Наиболее распространенные в рамках миелоидного БК (от 20 % до 30 %), включали ген-супрессор опухоли *TP53*, картирование в 17p13.1 [12]. Мутация *TP53* обнаруживается у пациентов с ХМЛ в БК в 30 % случаев. Гипотеза состоит в том, что мутация *TP53* может стать предиктором прогрессии [26].

Точечные мутации в ДНК-связывающей области гена *RUNX1* впервые были описаны в связи с трисомией 21 при некоторых миелоидных БК. Более позднее исследование на большой когорте китайских пациентов с ФА ХМЛ и БК ХМЛ выявило миссенс-, нонсенс-мутации и мутации со сдвигом рамки считывания *RUNX1*, демонстрирующие сниженную трансактивационную активность и/или доминантно-негативную функцию по сравнению с *RUNX1* дикого типа в 12 % случаев [140]. В мышинной модели было обнаружено, что мутации *RUNX1* нарушают миелоидную дифференцировку, приводя к еще большему количеству мутаций [140]. Схожие результаты были получены и по другим соматическим мутациям, например миссенс, нонсенс, сдвиг рамки считывания *ASXL1*, *RUNX1*, *IKZF1*, *BCOR*, *BCORL1*, *GATA2*, *PHF6*, *SETD1B*, *SETD2*, *U2AF1*, *IDH1/2*, *KMT2D* и *XPO1* также предшествовали прогрессии заболевания [2425].

Нарушения транскрипции, редактирования и трансляции РНК

Подход с массовым параллельным секвенированием РНК выявил повышенную экспрессию аденозиндезаминазы, действующей на dsRNA-1 (*ADAR-1*), в клетках-предшественниках, полученных из первичных образцов пациентов с БК ХМЛ. *ADAR-1* выполняет редакционную функцию мРНК, создавая или устраняя донорные и акцепторные сайты сплайсинга и внося изменения в последовательность мРНК.

МикроРНК, действуя посредством спаривания оснований с комплементарными последовательностями в молекуле мРНК, приводят к деградации мРНК. Новые данные свидетельствуют о том, что изменения микроРНК, введенные на уровне пре-микроРНК путем аминокислотной замены А-с-1 с помощью *ADAR-1*, могут быть ответственны за изменения в транскриптоме, управляющим LSC [142]. Было обнаружено, что повышенная экспрессия и активность *ADAR-1* опосредуются активируемой воспалительными цитокинами передачей сигналов *JAK/STAT*, а также передачей сигналов *BCR::ABL* [141].

Иммунологические причины (ускользание лейкозных клеток от противоопухолевого иммунного ответа, роль миелоидных супрессорных клеток, НК клеток).

При ХМЛ, как и при других злокачественных новообразованиях, происходит так называемое ускользание лейкозной клетки от противоопухолевого иммунного ответа. Согласно результатам различных исследователей, особенно страдает звено врожденной иммунной системы, а именно НК клетки. В статье Chen et al. наблюдали, что у впервые диагностированных пациентов с ХМЛ доля НК-клеток значительно снижается, а их функция нарушается. После терапии иматинибом, ни количество, ни функции НК клеток не восстановились [29], что противоречит данным Zitvogel et al., где показано улучшение функциональной способности НК клеток к продукции интерферона-гамма, а также расширение пула НК клеток после терапии иматинибом [143].

По данным других авторов инвариантные НКТ-клетки (iNKT) на момент постановки диагноза были нефункциональны. Только после достижения полного

цитогенетического ответа наблюдалось восстановление их количества и функциональной способности [110].

В исследовании Vachy et al. показано, что регуляторные Т-клетки (Tregs) значительно выше у пациентов с ХМЛ с высоким риском Sokal [18]. Повышают пул Т-регуляторных клеток миелоидные супрессорные клетки.

Миелоидные супрессорные клетки представляют собой гетерогенную популяцию незрелых клеток миелоидного происхождения, в группе выделяют три подгруппы: гранулоцитарные миелоидные супрессорные клетки, моноцитоидные миелоидные супрессорные клетки и ранние миелоидные супрессорные клетки. Данный пул клеток присутствует в небольшом количестве у здоровой популяции, расширение миелоидных супрессоров в основном отмечено при воспалительных заболеваниях и опухолевых процессах. Фенотип клеток CD11b+, CD33+, HLA-DR-Low, для гранулоцитарной фракции также характерно CD15+, а для моноцитоидной CD14+. Эти клетки характеризуются способностью подавлять цитотоксическую функцию Т-лимфоцитов, увеличивать пул Т-регуляторных клеток, подавлять функцию НК клеток. Супрессивная активность MDSC опосредована рядом механизмов: повышенным производством активных форм кислорода, в том числе повышенным производством реактивного кислорода, локальное истощение запасов аргинина и истощения запасов цистеина, который требуется для антигенпрезентирующих клеток, продукции аргиназы-1, которая подавляет пролиферацию НК-клеток и секрецию IFN- γ [52, 105, 46, 115, 38, 129]

1.3 Роль НК клеток в развитии резистентности к ИТК

Механизмы ускользания лейкозной клетки от иммунного ответа на настоящий момент представляются наиболее актуальными для изучения в целях поиска новых мишеней для терапии резистентных форм ХФ ХМЛ. Нарушения в работе НК клеточной цитотоксичности, как одного из механизмов неспецифического ответа на инфекционные и опухолевые агенты, может также служить основой для развития резистентности опухолевого клона, в особенности лейкозных стволовых клеток в нишах костного мозга.

Способность NK клеток отличать инфицированные и злокачественно трансформированные клетки от нормальных клеток зависит от экспрессии на них ингибирующих и активирующих рецепторов [131].

В NK клетках обнаружены 4 основных рецепторных семейства. Семейство лектинов С-типа, иммуноглобулиноподобных рецепторов киллерных клеток (KIR), лейкоцитарных иммуноглобулиноподобных рецепторов (LIR), семейство рецепторов естественной цитотоксичности (NCR). Если говорить о первых трех семействах, то они обладают как активирующими, так и ингибирующими свойствами, однако семейство естественной цитотоксичности обладает лишь активирующими функциями [105, 29, 50].

Ингибирующие рецепторы распознают МНС-I, который часто экспрессируется в здоровых клетках, но редко обнаруживается в злокачественных, в то время как активирующие рецепторы NK-клеток распознают структуры, присутствующие как в нормальных, так и в опухолевых клетках. С увеличением стимуляции активирующих рецепторов, увеличивается и число лигандов, позволяя активирующим путям усиливать и доминировать над ингибирующими, что обеспечивает NK-клетки способностью разрушать клетки, которые экспрессируют молекулы МНС-I [49, 41].

Три активирующих рецептора цитотоксичности (NKp30, NKp46, NKG2D) [110, 108] были предложены как специфичные для классических NK-клеток. При взаимодействии с лигандами на клетках-мишенях эти рецепторы вызывают активацию NK-опосредованного цитолиза.

В различных исследованиях острого миелоидного лейкоза показана сниженная экспрессия активирующих рецепторов NKp30, NKp46, DNAM-1, CD244 и CD94/NKG2C на NK-клетках у большей части пациентов. Это снижение может быть вызвано хроническим воздействием их лигандов на лейкемические бласты, то есть истощением рецепторного аппарата NK клеток. Анализ лигандов для рецепторов, активирующих NK-клетки, показал, что лейкемические бласты большинства пациентов экспрессируют большое количество лигандов, активирующих NK-клетки [118]. Анализ экспрессии NK-рецепторов у пациентов с

ХМЛ показал, что у получавших иматиниб пациентов наблюдалось повышение активирующих рецепторов NK клеток (NKp30, NKp46, NKp80 и NKG2D), в то время как у пациентов, получавших дазатиниб, наблюдалось увеличение экспрессии ингибирующих рецепторов KIR [19].

KIR-рецепторы, включающие как активирующие, так и ингибирующие субдомены, взаимодействуют с HLA I класса и участвуют в регуляции функциональной активности NK-клеток, проводя активирующий или ингибирующий сигнал.

Выполнение эффекторных функций NK-клеток зависит от особенностей строения трансмембранных и цитоплазматических участков KIR-рецептора.

Морфологически эти рецепторы различаются длиной "хвоста". Так, активирующие рецепторы имеют короткую пептидную цепь, в то время как ингибирующие – длинную. Соотношение генов, кодирующих данные рецепторы, меняется в зависимости от унаследованного гаплотипа: гомозиготного AA или гетерозиготного Вх. Несмотря на их различный состав, существуют четыре рецептора, характерные для каждого гаплотипа. Различаются же они числом KIR-генов. Так, в AA-гаплотип входят 7 уникальных последовательностей: одна кодирует активирующий рецептор, остальные – ингибирующий. В Вх-гаплотипе существует различное множество как активирующих, так и ингибирующих генов рецепторов [95].

Длинный цитоплазматический участок имеет в своем составе один или два ингибирующих тирозинсодержащих иммунорецепторных мотива (ITIM), которые проводят ингибирующий сигнал. Взаимодействие рецептора с молекулой HLA I класса приводит к фосфорилированию тирозиновых остатков в ITIM. После чего происходит активация тирозинфосфатаз SHP-1 и SHP-2, которые, в свою очередь, блокируют процессы фосфорилирования, связанные с активацией клеток, что приводит к ингибированию NK-опосредованной цитотоксичности и секреции цитокинов [96].

В работах по изучению экспрессии ингибирующих рецепторов CD158b и NKG2A у пациентов с ОМЛ, ХМЛ, экспрессия была выше в группах резистентных

к дазатинибу пациентов, а также в группах с М3 и М2 подвариантами острого миелоидного лейкоза. Эти результаты очень похожи на результаты других исследователей, [122] в случае солидных опухолей раковые клетки секретируют цитокины, которые разрушают активирующие лиганды с последующей гиперэкспрессией ингибирующих молекул. Эти результаты могут объяснить возможный механизм ускользания от иммунного надзора [119].

1.4 Роль гаплотипов KIR рецепторов в развитии резистентности

Иммуноглобулиноподобные рецепторы киллерных клеток (KIR) играют ключевую роль в регуляции цитолитической активности естественных киллеров. KIR-система чрезвычайно полиморфна, проявляется полиморфизм в количестве и составе генов, разнообразии их аллельных подвариантов и особенностей экспрессии. Мишенями для KIR-рецепторов являются антигены HLA I класса. KIR и HLA расположены соответственно на разных хромосомах и наследуются независимо друг от друга. Полиморфизм KIR-генов и сочетания KIR-HLA являются основополагающим иммуногенетическим фактором, играющим существенную роль в предрасположенности и/или развитии резистентности к инфекционным, аутоиммунным и онкологическим заболеваниям [131].

На настоящий момент выявлено 17 различных локусов гена KIR (в том числе два псевдогена *KIR2DP1* and *KIR3DP1*), которые обуславливают 2 наиболее известных KIR-гаплотипа, обозначаемых как А и В. В основе каждого гаплотипа А или В стоит четыре каркасных гена: *KIR2DL4*, *KIR3DL2*, *KIR3DL3* и *KIR3DP1*. Гаплотип А обычно неизменен в своей генной организации, используя до восьми генов: каркасные и *KIR2DL1*, *KIR2DL3*, *KIR2DS4* and *KIR3DL1*. Гаплотип Вх определяет наличие одного или нескольких генов, кодирующих активность *KIRs*, *KIR2DS1/2/3/5*, *KIR3DS1* и гены, кодирующие ингибирующие *KIR*, *KIR2DL5A/B* и *KIR2DL2* [95, 80] (рисунок 1).

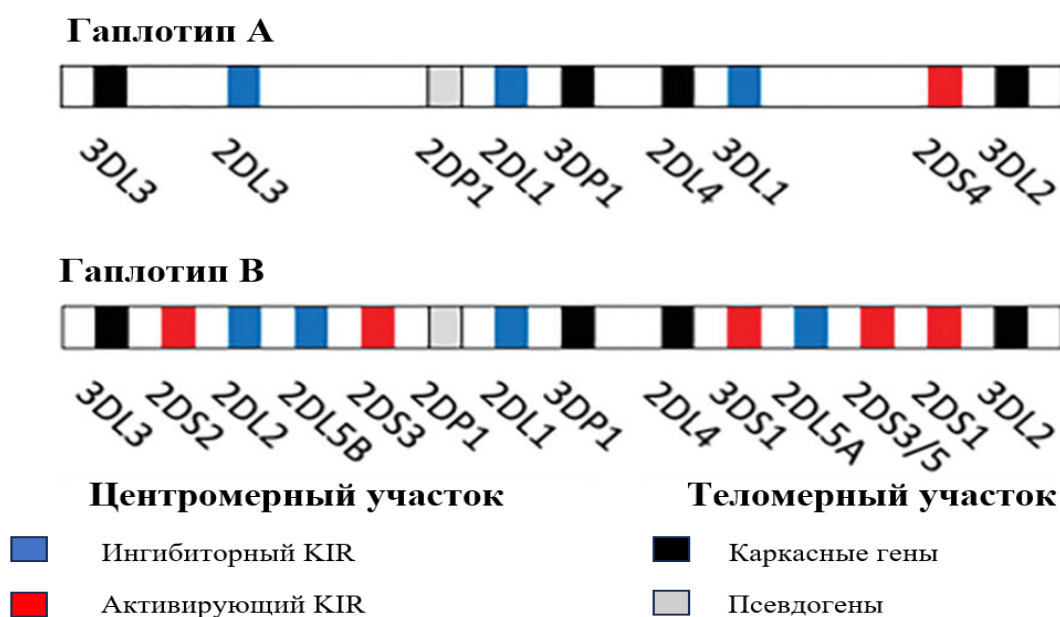


Рисунок 1 – Гены KIR содержат центромерные и теломерные участки, в результате чего образуются гаплотипы KIR А и В

Генотипирование KIR проводилось у пациентов, получавших дазатиниб и иматиниб. В случае иматиниба в первой линии, гаплотип Вх существенно снижал достижение ПЦО на терапии ИТК в первой линии. В частности *KIR2DS1*, был выявлен как наиболее негативный фактор прогноза недостижения ПЦО на первой линии терапии. Не обнаружено значительного влияния KIR-гаплотипов на достижение полного цитогенетического ответа и общую, беспрогрессивную выживаемость у пациентов, принимавших дазатиниб в первой линии терапии. В частности, *KIR2DS1* не был отрицательным прогностическим фактором, а двухлетняя вероятность достижения ПЦО и БМО для *KIR2DS1*-положительных пациентов статистически не отличалась от *KIR2DS1*-негативных пациентов, а именно 100 % по сравнению с 93,6 % ($p=0,09$) и 74,0 % против 74,9 % ($p=0,77$) соответственно. Эти данные свидетельствуют о том, что дазатиниб может преодолевать отрицательное прогностическое влияние *KIR2DS1* на достижение ПЦО у пациентов в первой линии терапии хронической фазы ХМЛ. Однако, не было представлено данных о негативном или благоприятном прогностическом влиянии гаплотипа Вх или А на достижение или недостижение ПЦО во второй и третьей линиях терапии ХМЛ [13]. Также должны быть учтены данные о

превалирующих типах гаплотипов в той или иной этнической группе, возможны даже различия в странах. Так, в Японии и Италии превалирует гаплотип А, как в популяции здоровых доноров, так и в популяции пациентов с гемобластозами [126, 21]. В России такой анализ данных не проводился.

1.5 Ингибиторы тирозинкиназ второго поколения в третьей линии

На настоящий момент в арсенале врачей-гематологов существует значительный выбор терапевтической тактики при неудаче двух линий ИТК:

- Перевод на ИТК 2-го поколения в третьей линии;
- Перевод на ИТК 3го поколения, например, понатиниб (ввоз в Россию оригинального препарата запрещен);
- Перевод на первый STAMP-ингибитор, асциминиб (не входит на настоящий момент в перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов);
- Выполнение аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток

Как выбрать верную тактику? Какие риски стоит оценивать? Каков алгоритм действий врача, при неудаче двух линий ИТК?

Во-первых, необходимо выполнить:

- 1) оценку мутационного статуса киназного домена гена *BCR::ABL*, если она еще не была выполнена после первой неудачи ИТК;
- 2) консультация пациента в трансплантационном центре: типирование пациентов высоким разрешением и инициация поиска донора как в российском, так и в международном регистрах, типирование родственников ближайшей линии родства;
- 3) оценку соматического статуса и степени компенсации сопутствующей патологии, в особенности оценку сердечно-сосудистых факторов риска.

На рисунке 2 представлен предложенный алгоритм действий врача при неудаче (непереносимости или резистентности) 2х линий ИТК (молекулярный ответ $>1\%$, отсутствие ПЦО по данным ЦГ).

Как мы видим, в случае отсутствия мутации T315I, при высоком риске посттрансплантационной летальности (приложения Б, В), наличии высокого риска сердечно-сосудистых осложнений (ССО), недоступности на настоящий момент асциминиба, понатиниба, следует отдать предпочтение ИТК 2-го поколения, учитывая при этом мутационный статус киназного домена гена *BCR::ABL*.

На настоящий момент эффективность ИТК 2-го поколения в третьей линии терапии была рассмотрена во многих центрах по всему миру. Эффективность в целом оценивается, от 24–53 % достижений полного цитогенетического ответа, от 16–40 % достижений больших молекулярных ответов [37].

Дазатиниб в третьей линии терапии

В исследовании Vosi et al. третью линию терапии получали 13 человек, 1 в ФА, 12 в ХФ, из них дазатиниб получали 9 пациентов в ХФ, 5-летняя общая выживаемость в целом в группе составила 77 % 5-летняя, 6/9 (67 %) пациентов достигли ПЦО, 1/9 (11 %) достигли БМО [23].

В исследовании Garg et al. третью линию терапии получали 48 пациентов. Большая часть пациентов в ХФ 25/48 (52 %), в ФА 10/48 (21 %), в БК 13/48 (27 %) пациент. Дазатиниб получали 34/48 (70 %) пациентов. Медиана бессобытийной выживаемости 20 месяцев. Полный цитогенетический ответ получили 5/16 (31 %) пациентов в ХФ на дазатинибе, 2/8 (25 %) в ФА, 2/10 (20 %) в БК. Большой молекулярный ответ получили 2/16 (12,5 %), 1/8 (12,5 %), 1/10 (10 %) в ХФ, ФА, БК, соответственно [54].

В работе Ibrahim et al. включено 26 пациентов в ХФ ХМЛ, из них 20 пациентов получали в качестве третьей линии терапии дазатиниб. 30-месячная кумулятивная частота ПЦО и БМО составила 32.4 %, и 21.1 %, соответственно. Также в работе представлен результат многофакторного анализа значимости факторов благоприятного прогноза достижения ПЦО на ИТК в третьей линии

терапии – предшествующий какой-либо ЦО был единственным фактором благоприятного прогноза (минимальный/малыйЦО, частичный ЦО или ПЦО) когда-либо на ИТК 1 и 2й линиях [72].

Нилотиниб в третьей линии терапии

В исследовании Giles et al. 60 пациентов с Ph + ХМЛ-ХФ/ФА были включены в исследование приема нилотиниба в дозе 400 мг 2 раза в сутки. Медиана продолжительности наблюдения составила 12 месяцев. Терапию нилотинибом в третьей линии продолжили 22 пациента. Полный цитогенетический ответ был достигнут в 9 (24 %) случаев. Вероятностная 18-месячная общая выживаемость на терапии нилотинибом составила 86 % в хронической фазе и 80 % в фазе акселерации. Вероятностная 18-месячная беспрогрессивная выживаемость составила 59 % [56, 57].

В исследовании Rossi et al. включено 82 пациента в хронической фазе, нилотиниб в третьей линии получали 48 больных: 38 больных в ХФ (79 %), 8 больных в фазе акселерации (16,6 %) и 2 больных в БК (4 %). Полный цитогенетический ответ был достигнут у 14 (17,1 %) пациентов. Большой молекулярный ответ у 13 (15,9 %) пациентов. Трансформация заболевания произошла у 3 пациентов (21 %). При медиане наблюдения 14 месяцев, продолжили терапию нилотинибом 33 пациента. При медиане общей выживаемости 46 (15–300) мес, 12 (14,6 %) умерли от прогрессирования заболевания, связанного с появлением мутации T315I [116].

В работе Ribeiro et al. включено 25 пациентов, 18 в ХФ, 7 в ФА, из них 16 получали нилотиниб в третьей линии. Полный цитогенетический ответ был достигнут в 13 % случаев, 24 % достигли БМО в ХФ. Вероятностная 5-летняя общая, беспрогрессивная, бессобытийная выживаемость составила 86 %, 54 %, и 22 %, соответственно, у пациентов ХФ ХМЛ, и 66 %, 66 % и 0 % у пациентов в ФА ХМЛ [114].

Бозутиниб в третьей линии терапии

Впервые оценка эффективности бозутиниба была оценена в I/II фазах клинического исследования. В целом, в условиях терапии третьей и четвертой линий, кумулятивные показатели полного гематологического ответа и большого цитогенетического ответа составили 74 % и 40 % соответственно, в том числе 32 % пациентов, достигших/сохранивших полный цитогенетический ответ (вновь достигнутый, 26 %) [54].

В совместном исследовании García-Gutiérrez et al. с группой исследователей из Лондонской больницы Хаммерсмит в третью линию терапии бозутинибом было включено 62 пациента в хронической фазе. Вероятность получения ПЦО и БМО у пациентов, резистентных к двум предыдущим линиям терапии составляли только 25 % и 14 %, соответственно. Другая картина в подгруппах пациентов с непереносимостью двух предшествующих линий терапии, достижение ПЦО и БМО увеличились до 94 % и 42 %, соответственно [54].

В работе Шуваева В.А. и др. была оценена эффективность терапии бозутинибом как во второй, так и в третьей и четвертой линиях терапии. В качестве третьей линии терапии бозутиниб получали 18 пациентов. Из них 8/18 (44 %) достигли полного цитогенетического ответа, 6/18 (33 %) достигли большого молекулярного ответа. На момент проведения анализа терапия бозутинибом продолжалась у 22 (43 %) пациентов. Причинами прекращения терапии стали в большинстве случаев резистентность 39 %, непереносимость составила 10 %. В данном исследовании погибла только одна пациентка в бластном кризе с мутацией *T315I* [8].

Имеющиеся результаты многоцентровых исследований использования ИТК 2-го поколения в третьей линии терапии показывают не самые оптимистичные долгосрочные результаты. Однако, в данных исследованиях были оценены результаты терапии не только хронической фазы, но и пациентов в ФА, БК, что значительно уменьшает вероятность достижения оптимальных ответов в целом по данным статистических исследований. Также неоднородные данные получены в отношении факторов благоприятного и неблагоприятного прогноза эффективности

терапии ИТК 2-го поколения в третьей линии. С появлением новых ингибиторов тирозинкиназ представлялось возможным как можно дольше откладывать вопрос о выполнении трансплантации гемопоэтических стволовых клеток, однако, ограниченный доступ новых ИТК заставляет нас искать новые пути решения вопроса о продолжении консервативной терапии ИТК 2-го поколения или проведении аллоТГСК.

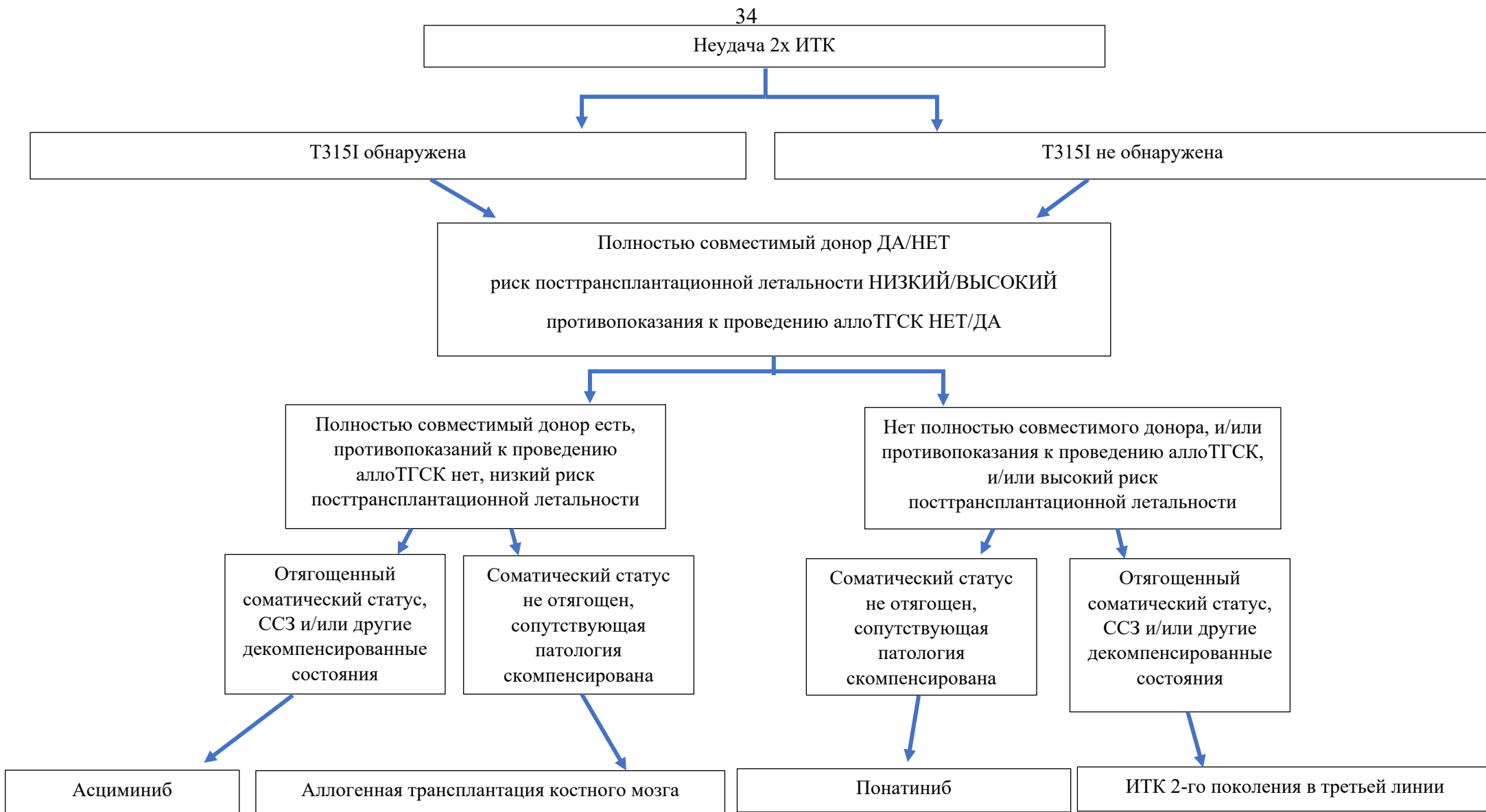


Рисунок 2 – Алгоритм действий врача при неудаче (непереносимости или резистентности) 2х линий ИТК (молекулярный ответ >1%, отсутствие ПЦО по данным ЦГ)

1.6 Ингибиторы тирозинкиназ третьего поколения и STAMP-ингибитор в третьей линии

Понатиниб в третьей линии

Понатиниб – ИТК третьего поколения, одобренный для пациентов с ХМЛ, резистентных к двум и более линиям ИТК, для пациентов с мутациями T315I. Согласно международным и российским клиническим рекомендациям, понатиниб предпочтительнее альтернативного ИТК второго поколения у пациентов без значимых сердечно-сосудистых факторов риска [6, 37, 66]. По результатам клинического исследования RACE из 270 пациентов в ХФ ХМЛ: 159 (60 %) достигли большого цитогенетического ответа (БЦО), из которых 144 (54 %) достигли ПЦО; 108 (40 %) достигли БМО; и 64 (24 %) достигли МО4,5. Медиана времени до достижения БЦО, ПЦО и БМО среди тех, кто достиг ответа, составило 2,8, 2,9 и 5,5 месяцев, соответственно [38].

Сравнительную характеристику ИТК 2-го поколения в третьей линии и понатиниба в третьей линии провели исследователи из MD Anderson Cancer Center Jabbour et al (2023), где было показано, что из 173 оцениваемых пациентов, получавших понатиниб, 89 (52 %) достигли 2 + -log снижения исходных транскриптов (20 % 2+ -log снижение и 32 % 3 + -log снижение). Среди 128 оцениваемых пациентов, получавших ИТК 2-го поколения, 44 (34 %) достигли 2 + -log снижения исходных транскриптов (13 % 2-log снижение и 21 % 3 + -log снижение). При медиане наблюдения 46 месяцев 3-летняя выживаемость без прогрессирования составила 59 % при использовании ИТК 2-го поколения и 83 % при приеме понатиниба ($p < 0,001$). Трехлетняя общая выживаемость составила 83 % для ИТК 2-го поколения и 87 % для понатиниба ($p = 0,03$). По данным многофакторного анализа, терапия третьей линии понатинибом была единственным независимым фактором, связанным с лучшей выживаемостью ($p = 0,003$) [76].

Асциминиб в третьей линии

Первый STAMP-ингибитор, благодаря альтернативному карману связывания, активный в отношении *T315I* мутации. Согласно результатам клинического исследования ASCSEMBL, где были включены пациенты после неудачи двух линий ИТК, в группу монотерапии был включен 141 пациент в ХФ ХМЛ и 9 пациентов в ФА ХМЛ. Максимально переносимая доза не была определена, но рекомендуемая доза для расширения составила 40 мг два раза в день для пациентов без мутации *T315I* и 200 мг два раза в день для пациентов с мутацией *T315I*. У пациентов без мутации *T315I* 92 % пациентов без ПГО на исходном уровне достигли ПГО; 60 % пациентов достигли БЦО; 54 % пациентов без ПЦО на исходном уровне достигли ПЦО; и 36 % пациентов достигли БМО через 12 месяцев [70, 68].

По результатам сравнительного исследования Atallah et al. (2023) к 6 и 12 месяцам, частота достижения ПЦО среди пациентов, получавших асциминиб, составила 41 % и 46 %, соответственно, что статистически значимо выше пациентов, получающих нилотиниб/дазатиниб, где достижение ПЦО к 6 и 12 месяцам составило 15 % и 31 % [16].

На настоящий момент еще не проведено прямых сравнений эффективности асциминиба и ИТК 2-го поколения в третьей линии.

Интересным для исследования будет являться прямое сравнение результатов терапии ИТК 2-го поколения в группах пациентов с молекулярным ответом менее или равно 10 % на момент начала терапии третьей линии с результатами терапии асциминибом и понатинибом в третьей линии.

ГЛАВА 2. ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Характеристика группы пациентов

В ретроспективно-проспективное исследование было включено 131 пациент и 20 здоровых доноров.

Ретроспективная часть исследования включала анализ амбулаторных карт, историй болезни пациентов в первой ХФ ХМЛ, получающих третью линию терапии ИТК второго поколения из 6 центров Санкт-Петербурга и Ленинградской области: ФГБУ НМИЦ им В.А. Алмазова, ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России, СПб ГБУЗ «Городская клиническая больница № 15», СПб ГБУЗ «Городская клиническая больница № 31, ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. И.П. Павлова НИИ ДОГиТ им. Р.М. Горбачевой, ГБУЗ «ЛОКБ». Анализ ретроспективных данных был инициирован в декабре 2018 года и завершен в феврале 2023г [3].

Ретроспективно-проспективная часть исследования характеризовалась определением экспрессии НК клеток методом проточной цитофлуорометрии и ПЦР анализом гаплотипов рецепторов KIR только пациентов, наблюдавшихся и/или наблюдающихся в ФГБУ «НМИЦ им В.А. Алмазова» на момент инициации третьей линии терапии и здоровых доноров (40 пациентов и 20 здоровых доноров), у которых были доступны биообразцы в Биобанке ФГБУ «НМИЦ им В.А. Алмазова» на момент терапии ИТК 2-го поколения в третьей линии терапии.

Проведение исследования было одобрено на заседании этического комитета ФГБУ "НМИЦ им. В.А. Алмазова" (протокол №040112-22).

Критерии включения для отбора пациентов в данную работу были следующими:

- Пациенты с ХМЛ в ХФ ≥ 18 лет;
- Пациенты, получающие или получившие третью линию терапии ХМЛ ингибиторами ИТК второго поколения;
- с доступными клиническими данными (не менее 80 % объема данных), необходимыми для выполнения исследования.

- отсутствием ПЦО или уровнем $BCR::ABL < 1\%$ по международной шкале (IS).

Критериями исключения служили:

- Пациенты с ХМЛ с фазой акселерации и/или бластного криза в анамнезе;
- Пациенты, которым когда-либо выполнялась трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) и/или солидных органов;
- Пациенты, получающие экспериментальный препарат в рамках третьей линии терапии;
- Пациенты с активным онкозаболеванием или со вторичным опухолевым процессом в анамнезе (в течение 5 последних лет);
- Пациенты, получавшие иммуномодулирующую, иммуносупрессивную терапию в течение 5 последних лет;
- Пациенты с известной активной инфекцией ВГВ, ВГС, ВИЧ-инфекцией;
- Пациенты с известными аутоиммунными заболеваниями, диффузными заболеваниями соединительной ткани (ДЗСТ);
- Пациенты с активной острой и хронической инфекцией, тяжелыми соматическими заболеваниями.

Группа здоровых доноров была отобрана из доноров периферической крови Станции переливания крови ФГБУ «НМИЦ им В.А. Алмазова», подписавших согласие на биобанкирование биообразцов периферической крови. Форма информированного согласия для биобанкирования биообразцов (периферической крови, моноклеаров, сыворотки, плазмы) была одобрена этическим комитетом ФГБУ «НМИЦ им В.А. Алмазова».

Данным критериям соответствовали 100 пациентов из 131, так как у 31 пациента на момент инициации третьей линии был достигнут полный цитогенетический ответ. Соответственно, в исследование были включены только 100 пациентов (мужчины, $n=39/100$ (39 %)). На момент начала терапии третьей

линии ИТК медиана возраста пациентов составляла 51 (21–88) год. Большинство пациентов (69/100, 69 %) были младше <60 лет. Терапией первой линии для большинства пациентов (n=97 (97 %)) был иматиниб. В качестве терапии второй линии ИТК применялись нилотиниб, дазатиниб, иматиниб и бозутиниб у 71 (71 %), 23 (23 %), 1 (1 %) и 5 (5 %) пациентов, соответственно. Медиана времени от момента постановки диагноза ХМЛ, от начала первой и второй линий таргетной терапии до начала терапии третьей линии ИТК составила: 61,5 (7–316) месяцев, 46 (7–156) месяцев и 17 (2,5–96) месяцев, соответственно. Результаты предшествующей терапии первой и второй линий ИТК у пациентов группы исследования представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Результаты предшествующей терапии первой и второй линий ИТК

Характеристика пациентов, n=100		На ИТК1	На ИТК2	На ИТК1+2
Ме времени, (разброс), мес		22 (2–145)	15 (1,5–96)	45 (6–156)
Наилучшие ответы, n (%)	Нет ПГО	14 (14 %)	14 (14 %)	2 (2 %)
	ПГО, без ЦО	39 (39 %)	38 (38 %)	34 (34 %)
	Мин/мЦО	16 (16 %)	14 (14 %)	12 (12 %)
	ЧЦО	9 (9 %)	13 (13 %)	17 (17 %)
	ПЦО	16 (16 %)	13 (13 %)	22 (22 %)
	БМО	6 (6 %)	8 (8 %)	13 (13 %)
	МО \geq 4	0	0	0
Время до наилучшего ответа, Ме (разброс), мес		6 (1–67)	5 (1–24)	5 (1–67)

Продолжение таблицы 1

Характеристика пациентов, n=100	На ИТК1	На ИТК2	На ИТК1+2
Мутации, n (%)	9/33 (27 %)	24/56 (43 %)	33/89 (37 %)
	G250E-3	L248V-1	14/100 (14 %)
	E255K-1	E355A-1	мутационный
	E255V-1	G250E-4	анализ
	M351T-1	E255V-1	выполнен во
	D363Y-1	Y253F-1	время третьей
	H396P-1	Q252H-1	линии
	Q252H+E255K-1	Y253H-6	терапии (у 2х
		F311C-2	повторно);
		T315I-1	Мутации,
		F317L-3	выявленные
		F359C-1	на третьей
		T315I+Y253H-1	линии
		F317L+F359V-1	терапии будут
			описаны в
			результатах
			исследования;
			6/100 (6 %)
			мутационный
			анализ не был
			выполнен
			никогда;
			9/94 (10 %)
			выполнено 2
			и более раз
* Дополнительные хромосомные aberrации, n = 19/100 (19%)			

Продолжение таблицы 1

Характеристика пациентов, n=100	На ИТК1	На ИТК2	На ИТК1+2
Сокращения:			
ИТК – ингибиторы тирозинкиназ			
ПГО – полный гематологический ответ			
ЦО – цитогенетический ответ			
Ме – медиана			
Мин/мЦО – минимальный или малый цитогенетический ответ			
Мес – месяцы			
ЧЦО – частичный цитогенетический ответ			
ПЦО – полный цитогенетический ответ			
БМО – большой молекулярный ответ			
МО ≥ 4 – глубокий молекулярный ответ			

Причинами отмены терапии первой линии ИТК были: резистентность у 89 (89 %) и токсичность у 11 (11 %) пациентов. Медиана длительности терапии ИТК в 1-й линии у пациентов с резистентностью составила 24 (3–145) месяца, у пациентов с непереносимостью ИТК 14 (2–40,5) месяцев. Причинами отмены ИТК во второй линии терапии стали: резистентность в 80 (80 %) и токсичность в 20 (20 %) случаях. Медиана продолжительности терапии второй линии составила 16 (2–96) месяцев и 9 (1,5–50) месяцев у пациентов с резистентностью и у пациентов с непереносимостью ИТК, соответственно.

Мутационный анализ проводился у 94/100 (94 %) за все время, 33/94 (35 %), 56/94 (60 %), 14/94 (15 %) пациентов при неэффективности первой, второй линий, а также в начале третьей линии терапии, соответственно. Обращает на себя внимание, что исследование мутаций *BCR::ABL* последовательно при неэффективности первой и второй линий терапии у тех же пациентов, то есть полное следование рекомендациям по исследованию мутационного статуса, было проведено только у 9/94 больных (10 %). Мутации *BCR::ABL* были

идентифицированы у 33/89 (37 %) пациентов после первых двух линий и у 11/14 (78 %) пациентов на третьей линии терапии, в том числе у 5-х пациентов было выявлено по 2 мутации, идентифицированных за три линии терапии, у одного пациента 3 мутации. Итого, у 42/94 (45 %) пациентов были выявлены мутации в разный период времени в течение первых трех линий терапии.

Дополнительные хромосомные aberrации были выявлены у 19/100 (19 %) пациентов после неудачи терапии ИТК первой и/или второй линий.

Характеристики ответов на лечение у пациентов непосредственно перед началом терапии ИТК в третьей линии представлены в таблице 2. Определение критериев фаз ХМЛ и ответов на терапию соответствовали национальным рекомендациям и рекомендациям Европейской сети лейкозов 2020 [66, 6].

При отсутствии результатов цитогенетического исследования уровень транскрипта гена *BCR::ABL* < 1 % расценивался как признак наличия ПЦО [80].

Таблица 2 – Характеристика пациентов перед началом терапии третьей линии ИТК

Характеристика пациентов n=100		
Наилучший ответ	отсутствие ПГО, n (%)	35 (35 %)
	ПГО без ЦО, n (%)	33 (33 %)
	Мин/мЦО, n (%)	16 (16 %)
	ЧЦО, n (%)	16 (16 %)

Группа здоровых доноров составила 20 человек, из них 18/20 (90 %) мужчины. Медиана возраста на момент взятия образцов для биобанкирования составила 32 (23–59) года.

2.2 Методы исследования

2.2.1 Статистическая обработка данных

В качестве первичных показателей эффективности оценивали вероятность достижения ПГО, ПЦО, БМО.

Для оценки типа распределения количественных переменных использовали W-критерий Шапиро-Уилка. Во всех случаях распределение переменных было

отличным от нормального. Непрерывные переменные представлены в виде медианы и размаха. Категориальные переменные представлены в виде абсолютных значений и процента. Различия между качественными переменными оценивали с использованием критерия χ^2 , а различия между количественными непрерывными переменными с использованием U-критерия Манна-Уитни.

Общая выживаемость (ОВ) определялась как время от начала терапии ИТК 3-й линии до смерти или последнего визита для живых пациентов. Беспрогрессивная выживаемость (БПВ) определялась как время от начала терапии ИТК 3-й линии до прогрессии заболевания в ФА или БК или до последнего визита для пациентов без прогрессии или смерти (в зависимости от того, какое событие произошло раньше) [111, 7877]. Вероятность достижения ОВ и БПВ рассчитывали по методу Каплана-Майера. Вероятность достижения ответа оценивали с использованием функции кумулятивной частоты (CIF). Сравнения CIF осуществляли с помощью критерия Грея. Для оценки значимости различий в выживаемости между группами пациентов использовали логранговый критерий. Влияние возможных факторов риска на вероятность достижения ПЦО оценивали с использованием однофакторного и многофакторного регрессионного анализа Кокса.

Потенциальные предикторы для множественного регрессионного анализа отбирали на основании клинической оценки и обзора литературных данных [127].

Сравнительная характеристика НК клеток, ТНК клеток, НК клеток с экспрессией KIR и NKp46 между 3 группами пациентов с оптимальным ответом, резистентных к терапии третьей линии и здоровых доноров, ввиду ненормального распределения данных, оценивалась с помощью критерия Краскела-Уоллиса.

2.2.2 Лабораторные методы исследования НК клеток

Ввиду того, что большая часть образцов пациентов, проходивших третью линию терапии в ФГБУ «НМИЦ им В.А. Алмазова» были забанкированы в виде мононуклеаров периферической крови (PBMC), было решено выполнить

иммунофенотипирование НК клеток именно из имеющихся доступных образцов РВМС.

Выделение мононуклеаров периферической крови (РВМС)

Периферическую кровь собирали в вакуумные пробирки с ЭДТА (Vacuette, Австрия). Доставляли в лабораторию при соблюдении температурного режима от 4° до 25°С. Образцы с признаками гемолиза, большими сгустками не брались в исследование и запрашивался повторный образец. Раствор фикола, (производство ПанЭко, Россия, #P053) по 10 мл наливали в пробирки объемом 50 мл. Далее разведённую в 2 раза стерильным буфером PBS (производство БиоЛот, Россия, #1245) кровь медленно наслаивали сверху, не допуская смешивания. После этого пробирку центрифугировали 400g 40 минут, температура 20°С. В процессе центрифугирования над поверхностью фикола должно образоваться светлое кольцо в интерфазе, представляющее из себя взвесь мононуклеаров. Взвесь мононуклеаров отбирали в отдельную пробирку и разводили стерильным PBS до 50 мл. Затем центрифугировали 10 минут с ускорением 300g и удаляли супернатант. Осадок ресуспендировали вновь до 50 мл PBS и центрифугировали 300g 10 минут повторно и удаляли супернатант. Осадок ресуспендировали и добавляли раствор DMSO (диметилсульфоксид), (производство ПанЭко, Россия, #Ф135) 1 мл, затем замораживали в криобанке при температуре – 180°С.

Для размораживания и последующей работы с мононуклеарами периферической крови криовиалу размораживали на водяной бане и добавляли в пробирку с 5 мл 10 % RPMI (производство ПанЭко, Россия, #С330Е), предварительно нагретую также на водяной бане. Далее пробирку центрифугировали со скоростью 300g 10 минут, затем удаляли супернатант. Осадок ресуспендировали и добавляли 1 мл стерильного раствора PBS. Таким образом, проба была готова к дальнейшим исследованиям.

Проточная цитофлюорометрия

Применялась для иммунофенотипирования НК, ТНК клеток и оценки экспрессии их активирующих и ингибирующих рецепторов из фракции периферических мононуклеаров.

Иммунофенотипический анализ в ЦКДЛ ФГБУ НМИЦ им. В. А. Алмазова проводился на проточном цитометре BD FACS Calibur. Прибор регулярно проходил процедуры настройки компенсаций, калибровочные процедуры, сервисное обслуживание, внутренний и внешний контроль качества. Пробоподготовка осуществлялась по стандартному протоколу: инкубация клеток РВМС с моноклональными антителами в течение 15 минут при комнатной температуре, отмывка раствором Cell Wash. Для оценки количества НК, ТНК клеток, активирующего рецептора НКp46 (CD335), ингибирующего рецептора KIR (CD158 e1/e2) использовалась панель с применением моноклональных антител производства Becton Dickinson (США) и Beckman (США), приведенная в таблице 3. Анализ проводился с помощью программного обеспечения Cell Quest. Целевым значением при сборе было 100 000 событий. Термины dim (слабая), bright (яркая), moderate (умеренная) использовались для описания интенсивности экспрессии маркера по сравнению с нормальными лимфоцитами. Вследствие того, что НКp46 и KIR были мечены одним флюорохромом, для оценки их экспрессии использовались 2 пробирки РВМС от одного пациента или донора, в каждую из пробирок добавлялись 3 одинаковых антитела (CD16+56,45,3) и в первую пробирку добавлялся KIR (CD158 e1/e2), во вторую НКp46 (CD335)

Таблица 3 – Панель для диагностики НК, ТНК клеток. Экспрессии НКp46 и KIR рецепторов на НК клетках

Флюорохромы	FITC	PerCP5.5	PE	APC
Антитела	CD3	CD45	CD16+56	KIR (CD158)
	CD3	CD45	CD16+56	НКp46 (CD335)

Продолжение таблицы 3

Флюорохромы	FITC	PerCP5.5	PE	APC
Сокращения: FITC–изотиоцианат флуоресцеина; PE–фикоэритрин; PerCP–Су5.5-перидинин хлорофилл протеинцианин 5.5; APC–аллофикоцианин; CD–кластер дифференцировки.				

Стратегия гейтирования была спроектирована на основании исследований (Bayigga et al., 2014, Frutoso et al., 2020, Björklund et al., 2010) [19, 51, 21]. На рисунке 3 показана схема гейтирования на примере одного из пациентов.

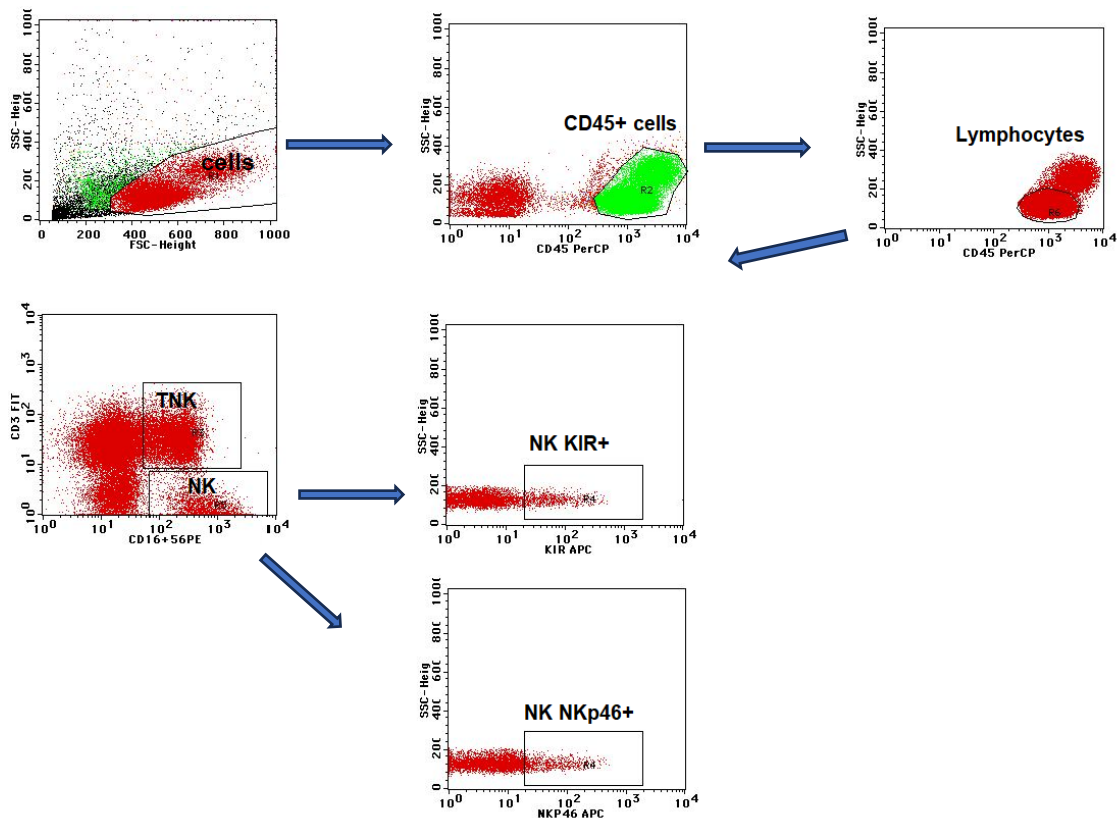


Рисунок 3 – Схема гейтирования NK, TNK клеток, экспрессии KIR, NKp46 рецепторов

Оценка гаплотипов KIR рецепторов

Выделение ДНК

Выделяли ДНК из цельной крови пациентов и здоровых доноров (вакутейнер с ЭДТА) с помощью набора Extract DNABlood (производство Евроген, Россия, #BC111M). Подробная инструкция представлена в приложении Г.

ПЦР-набор для определения гаплотипов KIR (производство Miltenyi Biotec, Германия, #130-092-584). Набор состоял из 24 планшеток (в каждом по 3 ряда) и 24 буферов. В 22 лунку закапывали 25 мкл буфера в качестве негативного контроля. Затем 25 мкл ДНК пациента добавляли в 575 мкл буфера. Из образца (буфер+ДНК), раскапывали по 25 мкл в каждую лунку с 1 по 21. Затем на приборе Bio-RadT100 согласно протоколу в инструкции к ПЦР KIR выставляли программу (95°C – 60 секунд, 94°C – 20 секунд, 63°C – 20 секунд, 72°C – 90 секунд) – 28 циклов.

Электрофорез в агарозном геле

Электрофорез проводили в 1% агарозном геле на 1x TAE с бромистым этидием, камеру для горизонтального электрофореза заполняли 1x TAE. Перед нанесением в лунки образцы смешивали с буфером для нанесения. Режим электрофореза: напряжение 120В, 40мА, 60 мин. Для определения длины фрагментов использовали маркер длин фрагментов ДНК 1 kV ladder (производство Евроген, Россия, #NL001). На рисунке 4 показан пример электрофореза в геле.

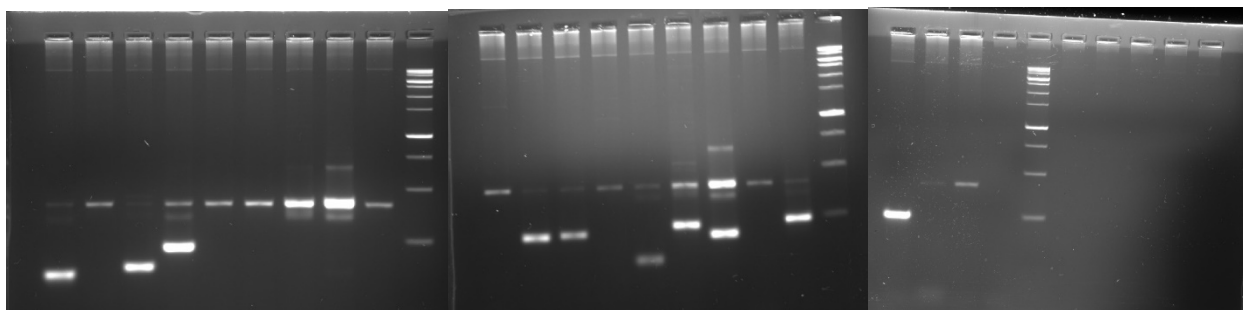
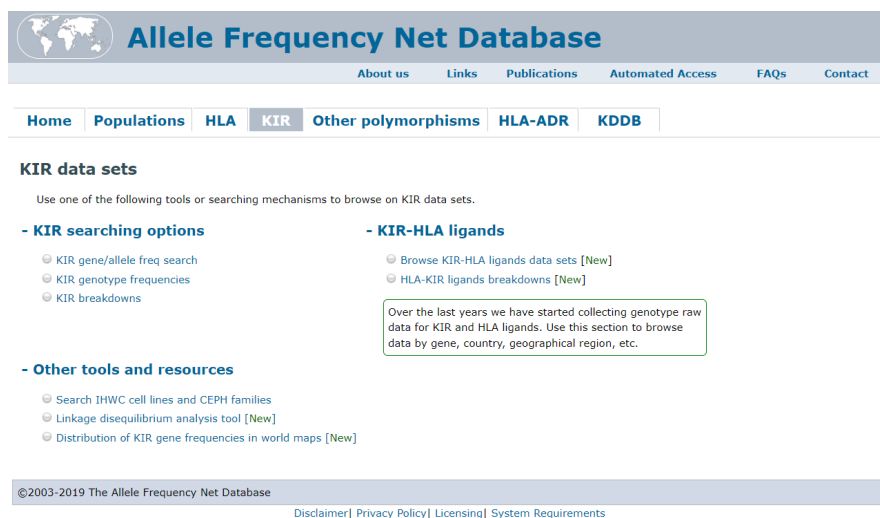


Рисунок 4 – Электрофорез KIR рецепторов в агарозном геле

Результаты оценивались согласно инструкции к ПЦР набору. Бланк результатов представлен в приложении Д.

Определение гаплотипов осуществлялось в программе для ЭВМ <http://www.allelefrequencies.net/kir.asp>, (рисунок 5), разработанной в 2009 году командой ученых Ливерпульского Университета Middleton D. и Gonzelez F. [95].



The screenshot shows the 'Allele Frequency Net Database' website. The header includes a globe icon and the site name. Below the header is a navigation menu with links: 'About us', 'Links', 'Publications', 'Automated Access', 'FAQs', and 'Contact'. A secondary menu highlights 'Home', 'Populations', 'HLA', 'KIR', 'Other polymorphisms', 'HLA-ADR', and 'KDDB'. The main content area is titled 'KIR data sets' and contains the following sections:

- KIR data sets**
Use one of the following tools or searching mechanisms to browse on KIR data sets.
- KIR searching options**
 - KIR gene/allele freq search
 - KIR genotype frequencies
 - KIR breakdowns
- KIR-HLA ligands**
 - Browse KIR-HLA ligands data sets [New]
 - HLA-KIR ligands breakdowns [New]
- Other tools and resources**
 - Search IHWC cell lines and CEPH families
 - Linkage disequilibrium analysis tool [New]
 - Distribution of KIR gene frequencies in world maps [New]

A callout box on the right side of the 'KIR-HLA ligands' section states: 'Over the last years we have started collecting genotype raw data for KIR and HLA ligands. Use this section to browse data by gene, country, geographical region, etc.'

The footer contains the copyright notice: '©2003-2019 The Allele Frequency Net Database' and links for 'Disclaimer', 'Privacy Policy', 'Licensing', and 'System Requirements'.

Рисунок 5 – Определение гаплотипов KIR рецепторов в программе для ЭВМ

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1 Оценка результатов терапии ИТК второго поколения в третьей линии терапии

На момент сбора данных, медиана длительности терапии ИТК 2-го поколения в третьей линии составила 22 (1–153) мес, медиана времени от ИТК в третьей линии до последнего визита составила 60 (3–179) мес, от диагноза до последнего визита 125 (27–434) мес, соответственно. Всего 4 пациента были потеряны из-под наблюдения, медиана времени наблюдения которых составила 29 (5–79) мес. В качестве третьей линии пациенты получали дазатиниб, нилотиниб, бозутиниб в 60 (60 %), 20 (20 %), 20 (20 %) случаях, соответственно.

3.1.1 Оценка гематологического ответа

Полного гематологического ответа не было достигнуто исходно у 35 пациентов. У 24/35 (68,5 %) ПГО достигнут при медиане времени до достижения 3 (0,5 – 16) мес.

Впоследствии ПГО был утрачен у 13/24 (54 %) пациентов, достигших ПГО на третьей линии при медиане времени до утраты 4 (1–91) мес и у 6/65 (9 %) пациентов с ПГО исходно до терапии третьей линии при медиане времени до утраты 8 (4 – 33) мес, $p < 0,001$.

3.1.2 Оценка цитогенетического ответа

При медиане времени терапии ИТК в третьей линии 22 (1–153) мес, полный цитогенетический ответ и/или МО2 [80] был достигнут у 35/100 (35 %) пациентов. Медиана времени до достижения ответа составила 5 (1–22) месяцев. Большинство пациентов 23/35 (66 %) достигли ПЦО/МО2 в течение первых 6 месяцев терапии ИТК в третьей линии. Вероятность достижения ПЦО (МО2) к 6, 12 и 24 месяцам составила 27 % (ДИ 0,70–0,87), 41 % (ДИ 0,51–0,73), 51 % (ДИ 0,38–0,64), соответственно (рисунок 6).

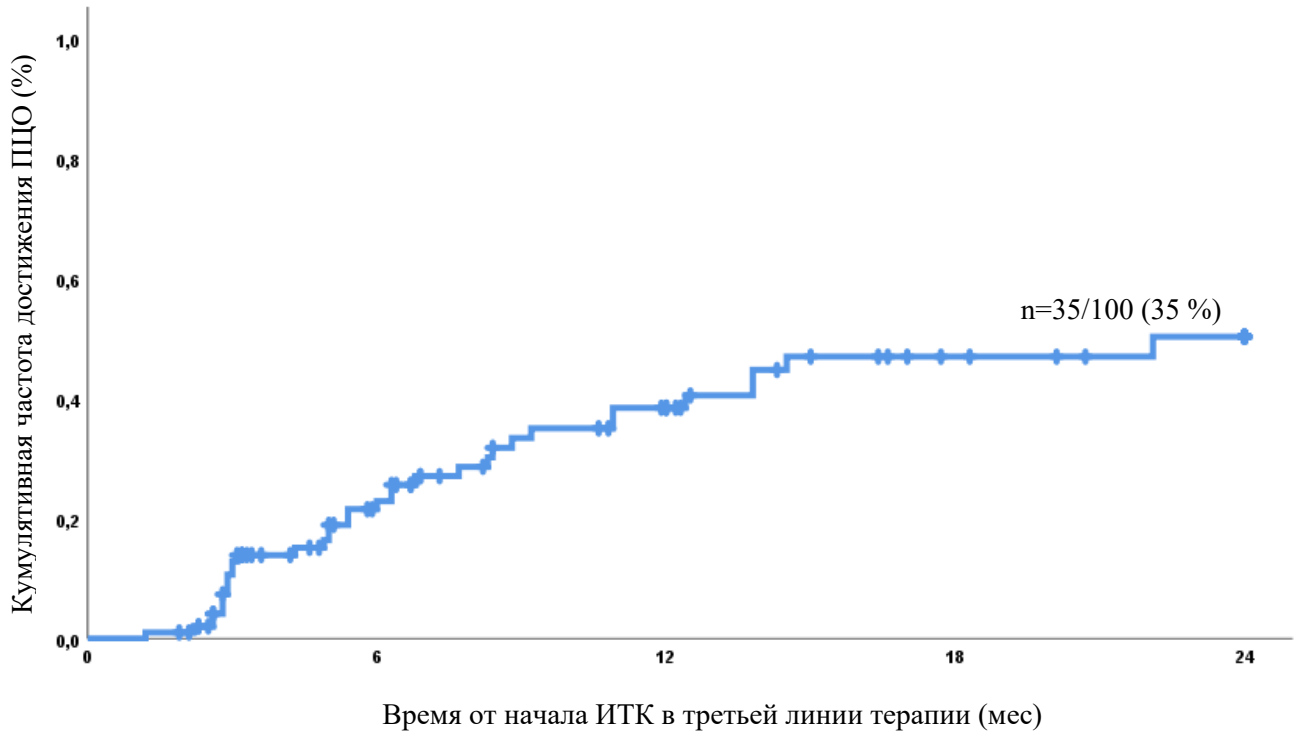


Рисунок 6 – Достижение ПЦО/МО2 у пациентов на ИТК в третьей линии терапии

Выполнена оценка достижения ПЦО/МО2 в зависимости от исходного уровня ответа на момент инициации третьей линии терапии (рисунок 7).

Медиана времени терапии ИТК в третьей линии для пациентов без ПГО, с ПГО, но без ЦО, любым ЦО (Мин/мЦО или ЧЦО) составили 21 (1–119,5), 18 (1–153), 30 (6–140) и 33 (3,5–121) месяцев, соответственно.

Полный цитогенетический ответ достигнут у 31/65 (48 %) с ПГО на момент инициации третьей линии ИТК и у 4/35 (11 %) пациентов без ПГО на исходном уровне ($p=0,000$). Вероятность достижения ПЦО к 6, 12 и 24 месяцам составила 39 %, 58 %, 66 %, соответственно у пациентов с ПГО и 8 %, 8 %, 23 %, соответственно, у пациентов без ПГО. Медиана времени достижения ПЦО в этих группах не достигнута.

Не наблюдалось различий в группах пациентов без ПГО и с ПГО, но без какого-либо ЦО (мин/мЦО/ЧЦО) ($p=0,233$). Вероятность достижения ПЦО/МО2 к 6, 12 и 24 месяцам составила 8 %, 8 %, 23 %, соответственно, в группе без ПГО и

19 %, 30 %, 30 %, соответственно, у пациентов без какого либо ЦО (мин/мЦО/ЧЦО). Медиана времени достижения ПЦО в этих группах не достигнута.

При этом, частота достижения ПЦО была значительно выше у пациентов с любым исходным цитогенетическим ответом (мин/мЦО, ЧЦО), чем у пациентов без ЦО исходно или без ПГО ($p=0,000$). Вероятность достижения ПЦО/МО2 к 6, 12 и 24 месяцам в группе с любым цитогенетическим ответом (мин/мЦО/ЧЦО) составила 57 %, 80 %, 90 %, соответственно.

Между группами с мин/мЦО и ЧЦО наблюдается также статистически значимая разница ($p=0,047$). Все пациенты с ЧЦО достигли ПЦО/МО2 на третьей линии терапии ИТК второго поколения. Вероятность достижения ПЦО к 6, 12 и 24 месяцам составила 49 %, 59 %, 73 %, соответственно, в группе пациентов с мин/мЦО и 63 %, 94 %, 100 %, соответственно, в группе с ЧЦО на момент начала ИТК в третьей линии. Медиана времени достижения ПЦО в группе с мин/мЦО достигнута и составляет 9 мес (ДИ 4,5–13,0). Медиана времени достижения ПЦО в группе с ЧЦО достигнута и составляет 5 мес (ДИ 3,5–6,2).

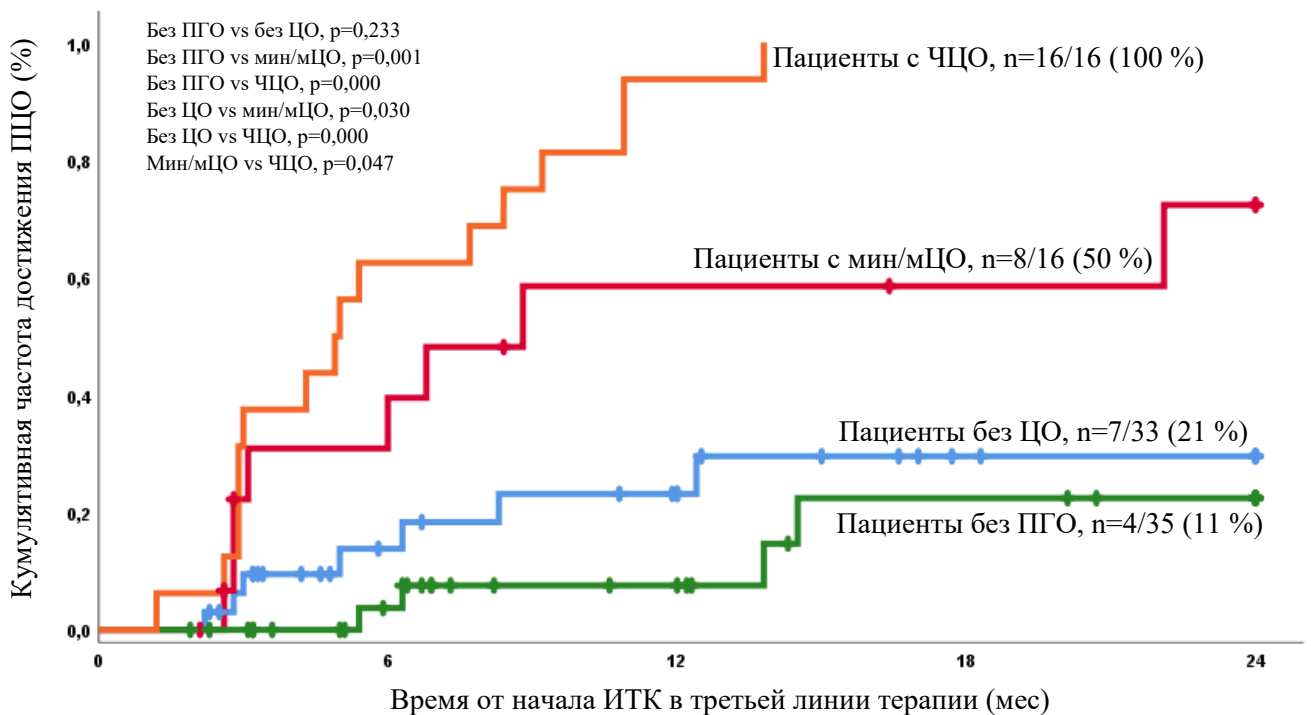


Рисунок 7 – Достижение ПЦО/МО2 у пациентов на ИТК в третьей линии терапии в зависимости от глубины ответа на момент начала ИТК в третьей линии

Кумулятивная частота достижения ПЦО/МО2 у пациентов с различным уровнем цитогенетического ответа на момент начала третьей линии терапии представлена в таблице 4.

Таблица 4 – Кумулятивная частота достижения ПЦО/МО2 на ИТК в третьей линии в зависимости от исходной глубины цитогенетического ответа

Кумулятивная частота ПЦО, n (%) в разных группах к 6, 12, 24 месяцам	Пациенты без ПГО исходно, n=35	Пациенты без ЦО исходно, n=33	Пациенты с Мин/мЦО исходно, n=16	Пациенты с ЧЦО исходно, n=16	p
К 6 месяцам	8 % (0,89–1,00)	19 % (0,74–1,00)	49 % (0,47–0,99)	63 % (0,19–0,70)	0,047
К 12 месяцам	8 % (0,82–1,00)	30 % (0,61–0,95)	59 % (0,2–0,83)	94 % (0,01–0,41)	0,030
К 24 месяцам	23 % (0,59–1,00)	30 % (0,53–0,92)	73 % (0,09–0,79)	100 % (1,00–1,00)	0,001

Существенная статистически значимая разница была выявлена в группах с разным уровнем молекулярного ответа на момент начала третьей линии терапии ($p=0,000$). Вероятность достижения ПЦО к 6, 12 и 24 месяцам составила 15 %, 21 %, 28 %, соответственно, в группе пациентов с молекулярным ответом более 10 % и 53 %, 77 %, 88 %, соответственно, в группе с молекулярным ответом менее или равно 10 % (рисунок 8). Медиана времени до ответа достигнута в группе с молекулярным ответом менее или равно 10 % и составляет 6 мес (ДИ 2,4–9,5).

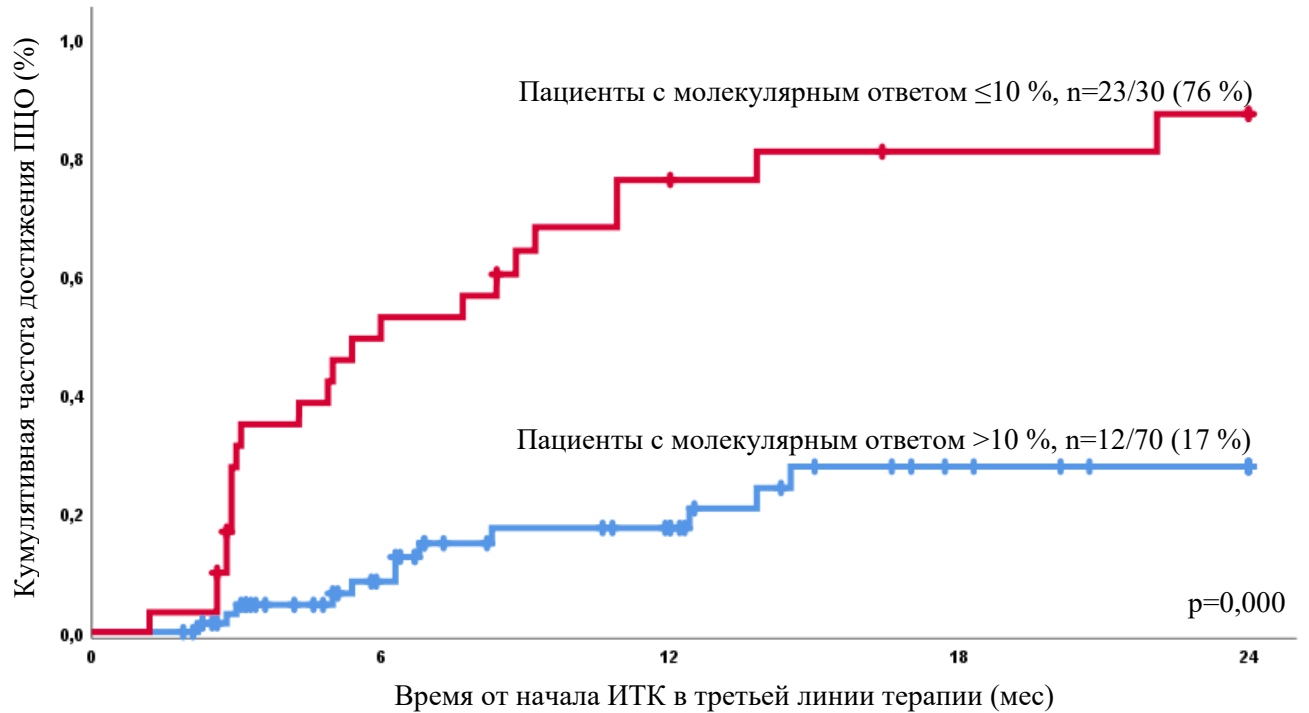


Рисунок 8 – Достижение ПЦО/МО2 у пациентов с разным уровнем молекулярного ответа на момент инициации ИТК в третьей линии терапии

Кумулятивная частота достижения ПЦО/МО2 у пациентов с различным уровнем молекулярного ответа на момент инициации третьей линии терапии представлена в таблице 5.

Таблица 5 – Кумулятивная частота достижения ПЦО/МО2 на ИТК в третьей линии в зависимости от исходной глубины молекулярного ответа

Кумулятивная частота ПЦО, n (%)	Пациенты с молекулярным ответом $\leq 10\%$, n=30	Пациенты с молекулярным ответом $>10\%$, n=70	p
К 6 месяцам	53 % (0,34–0,72)	15 % (0,84–0,99)	0,001
К 12 месяцам	77 % (0,12–0,47)	21 % (0,72–0,93)	0,000
К 24 месяцам	88 % (0,04–0,39)	28 % (0,59–0,88)	0,000

За время терапии третьей линии – было выявлено 11 мутаций киназного домена гена *BCR::ABL* (у одного пациента повторно подтверждена та же мутация *E255V*). При этом, в 8/11 (73 %) случаев была зарегистрирована мутация T315I. Всего мутация T315I была выявлена в 10/42 (24 %) случаев. ПЦО/МО2 достигнут всего у 9/42 (21 %) пациентов с мутациями в сравнении с 22/52 (42 %) у пациентов без мутаций ($p=0,005$), у 6 пациентов мутационный статус никогда не был оценен. Вероятность достижения ПЦО/МО2 к 6, 12 и 24 месяцам составила 37 %, 53 %, 58 %, соответственно, в группе пациентов без мутаций и 14 %, 18 %, 35%, соответственно, в группе мутациями (рисунок 9). Медиана времени достижения ПЦО в группе без мутаций достигнута и составляет 11 мес (ДИ 5,5–16,3). Медиана времени достижения ответа в группе с мутациями не достигнута.

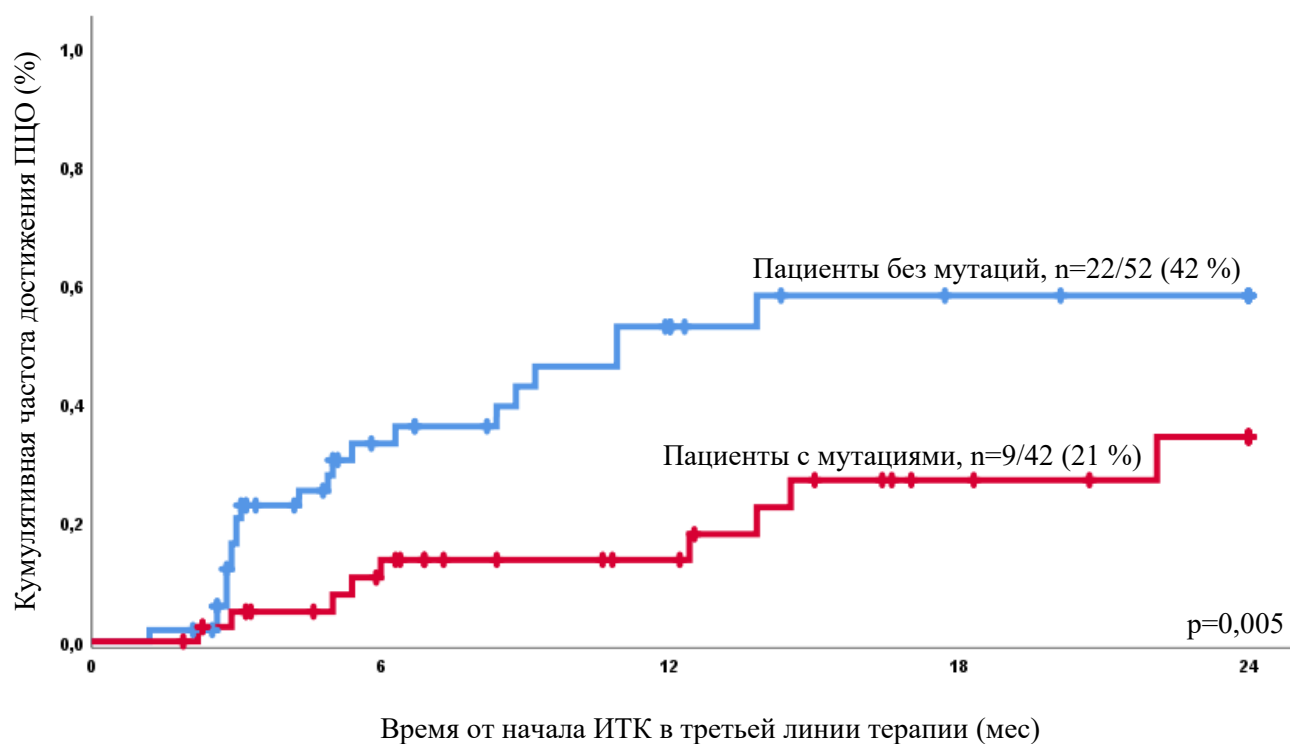


Рисунок 9 – Достижение ПЦО/МО2 у пациентов с мутациями и без мутаций на ИТК в третьей линии терапии

Утрата ПЦО/МО2 наблюдалась в 13/35 (37%) случаев. Медиана времени до утраты составила 20 (3–46) месяцев.

На последнем визите ПЦО/МО2 сохранялся в 1/4 (25 %), 4/7 (57 %), 5/8 (62,5 %) и 12/16 (75 %) случаев, соответственно, в группах без ПГО, с ПГО, но без ЦО, с мин/мЦО, с ЧЦО.

3.1.3 Оценка молекулярного ответа

Большой молекулярный ответ был достигнут в 21/100 (21 %) случаев. Из 21 пациента, у 11 (52 %) достигнут МО4,5. Медиана времени до достижения составила 9 (3–32) месяцев. Большая часть пациентов достигла БМО (МО4,5) в первые 24 месяца терапии, один пациент достиг ответа к 32 месяцам. Вероятность достижения БМО к 12 и 24 месяцам составила 17 % (ДИ 0,74–0,91), 29 % (ДИ 0,60–0,83), соответственно (рисунок 10).

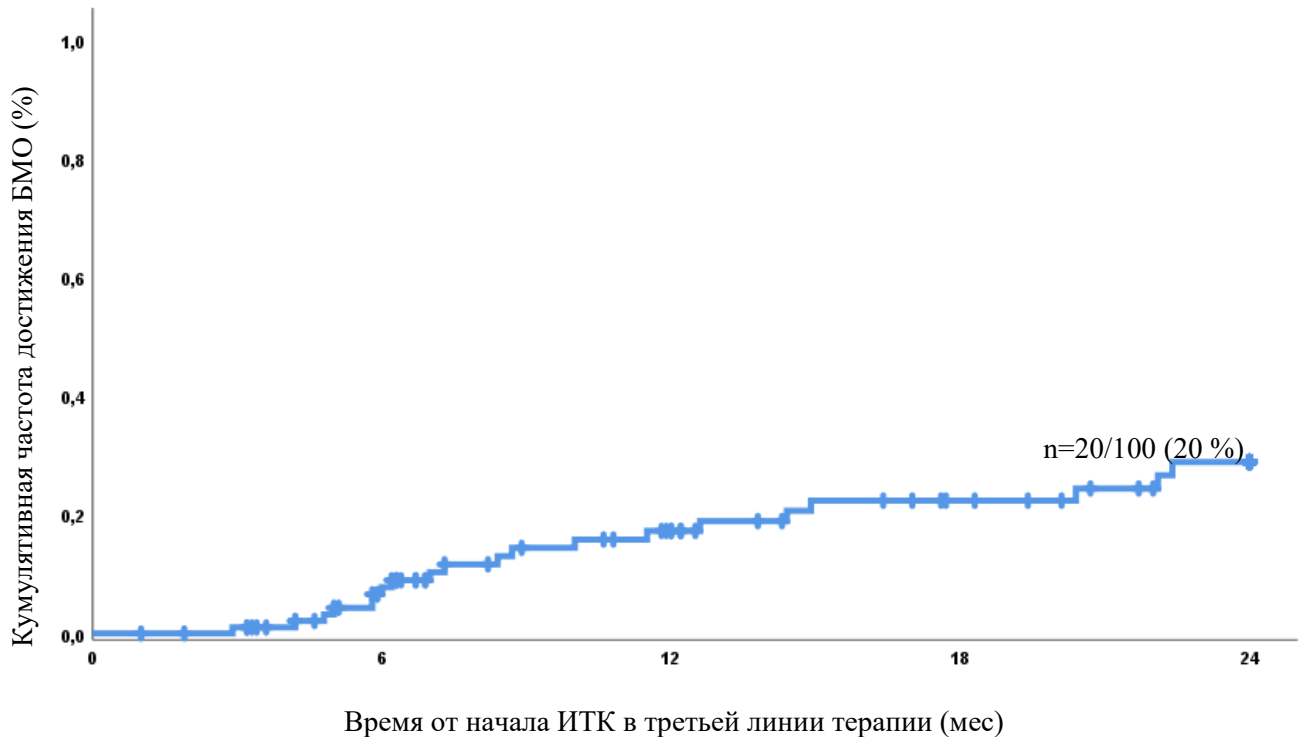


Рисунок 10 – Достижение БМО у пациентов на ИТК в третьей линии терапии

Выполнена оценка достижения БМО в зависимости от исходного уровня ответа на момент инициации третьей линии терапии (рисунок 11).

Большой молекулярный ответ достигнут у 4/33 (12 %) в группе без какого-либо цитогенетического ответа (мин/мЦО или ЧЦО) с медианой времени до

достижения 21 (5–32) мес, у 5/16 (31 %) в группе с минимальным/малым ЦО при медиане времени до достижения 10 (5–22) мес и у 12/16 (75 %) в группе с ЧЦО при медиане до достижения ответа 7 (3–15) мес. Ни у одного пациента без ПГО на момент инициации третьей линии не достигнут БМО. Статистически значимой разницы между группами с минимальным/малым цитогенетическими ответами и группой без цитогенетического ответа нет. Вероятность достижения БМО к 12 и 24 месяцам составила 4 %, 19 %, соответственно, у пациентов без ЦО, 21 %, 42 %, соответственно, у пациентов с мин/мЦО, 66 %, 82 %, соответственно, у пациентов с ЧЦО на момент инициации третьей линии.

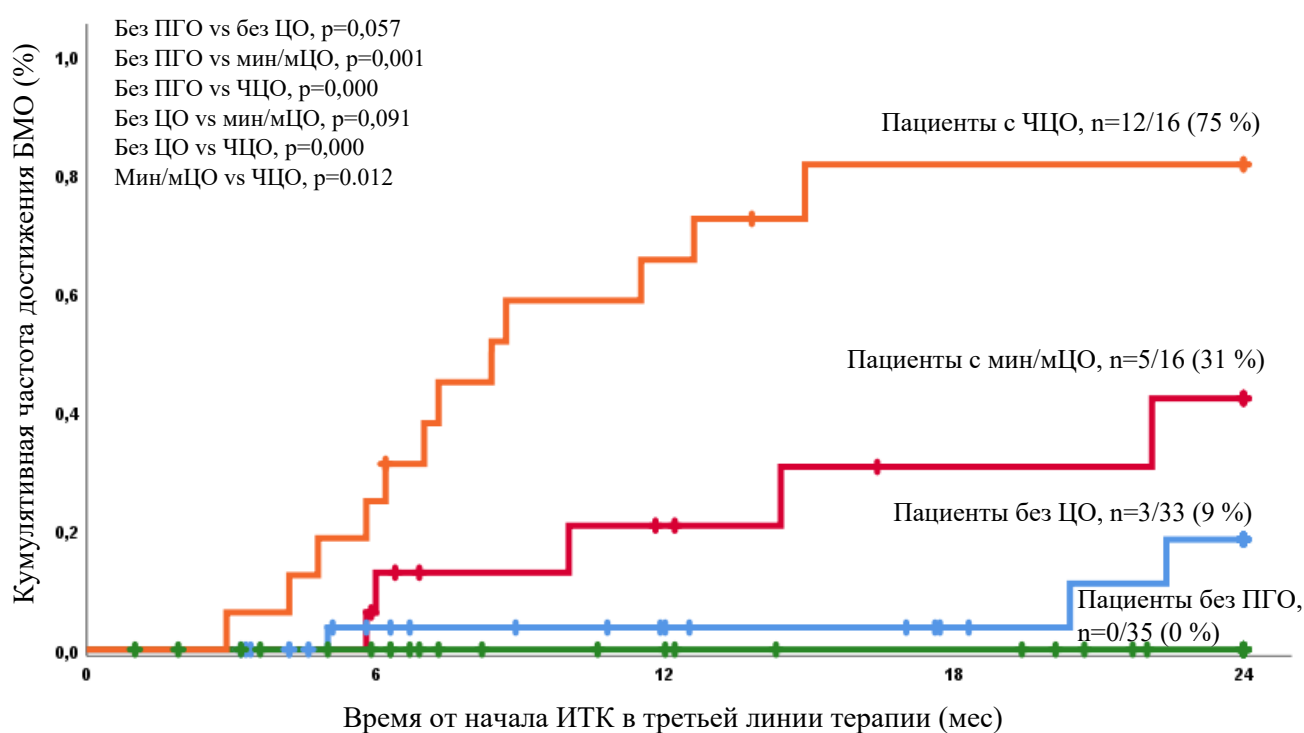


Рисунок 11 – Достижение БМО у пациентов на ИТК в третьей линии терапии в зависимости от глубины ответа на момент инициации ИТК в третьей линии

Кумулятивная частота достижения БМО у пациентов с различным уровнем цитогенетического ответа на момент инициации третьей линии терапии представлена в таблице 6.

Таблица 6 – Кумулятивная частота достижения БМО на ИТК в третьей линии в зависимости от исходной глубины цитогенетического ответа

Кумулятивная частота БМО, n (%) в разных группах к 12, 24 месяцам	Пациенты без ПГО исходно (ДИ), n=35	Пациенты без ЦО исходно (ДИ), n=33	Пациенты с Мин/мЦО исходно (ДИ), n=16	Пациенты с ЧЦО исходно (ДИ), n=16	p
К 12 месяцам	0	4 % (0,89–1,00)	21 % (0,60–1,00)	66 % (0,17–0,69)	0,012
К 24 месяцам	0	19 % (0,63–1,00)	42 % (0,34–0,69)	82 % (0,06–0,58)	0,001

Существенная статистически значимая разница была выявлена в группах с разным уровнем молекулярного ответа на момент инициации третьей линии терапии ($p=0,000$). Вероятность достижения БМО к 12 и 24 месяцам составила 22 %, 11 %, соответственно, в группе пациентов с молекулярным ответом более 10 % и 46 %, 62 %, соответственно, в группе с молекулярным ответом менее или равно 10 % (рисунок 12).

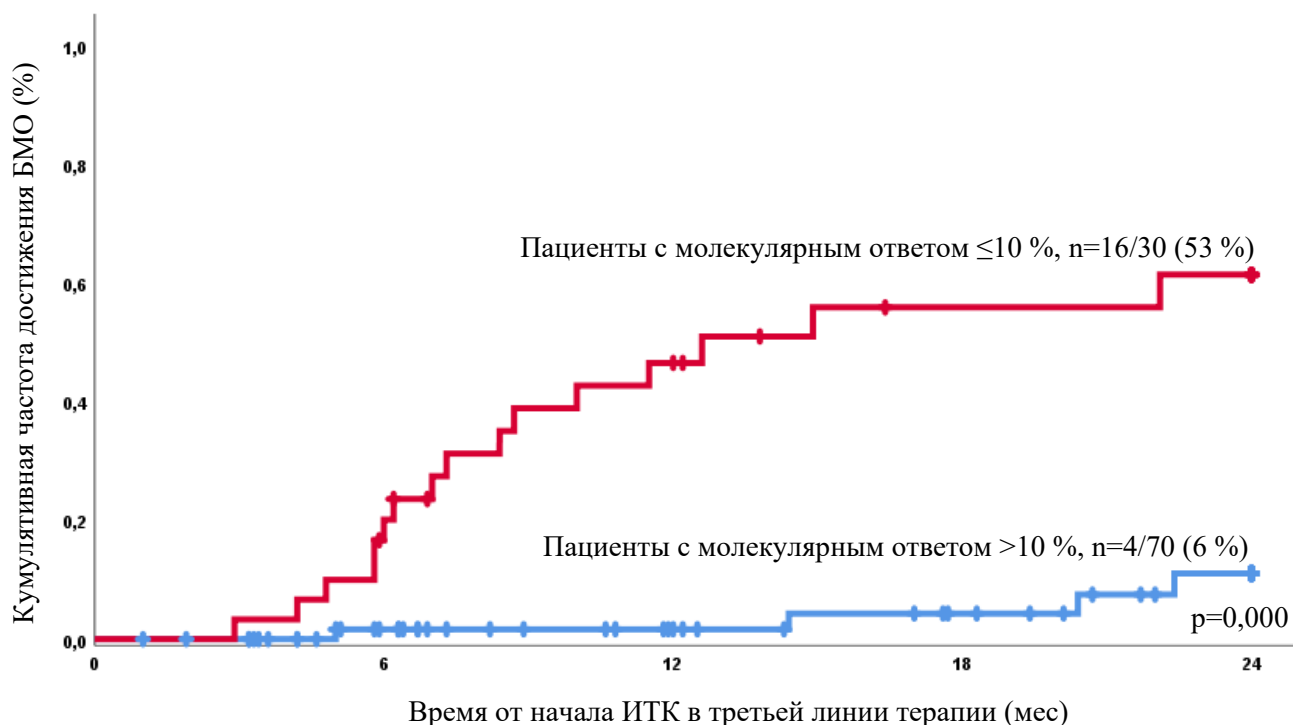


Рисунок 12 – Достижение БМО у пациентов с разным уровнем молекулярного ответа на момент инициации ИТК в третьей линии терапии

Кумулятивная частота достижения БМО у пациентов с различным уровнем молекулярного ответа на момент инициации третьей линии терапии представлена в таблице 7.

Таблица 7 – Кумулятивная частота достижения БМО на ИТК в третьей линии в зависимости от исходной глубины молекулярного ответа

Кумулятивная частота ПЦО, n (%)	Пациенты с молекулярным ответом $\leq 10\%$ (ДИ), n=30	Пациенты с молекулярным ответом $>10\%$ (ДИ), n=70	p
К 12 месяцам	46 % (0,37–0,75)	22 % (0,95–1,00)	0,000
К 24 месяцам	62 % (0,23–0,64)	11 % (0,78–1,00)	0,001

БМО достигнут всего у 5/42 (12 %) пациентов с мутациями в сравнении с 13/52 (25 %) пациентов без мутаций (p=0,074), у 6 пациентов мутационный статус никогда не был оценен. Вероятность достижения БМО к 12 и 24 месяцам составила

53 %, 58 %, соответственно, в группе пациентов без мутаций и 18 %, 35%, соответственно, в группе с мутациями (рисунок 13).

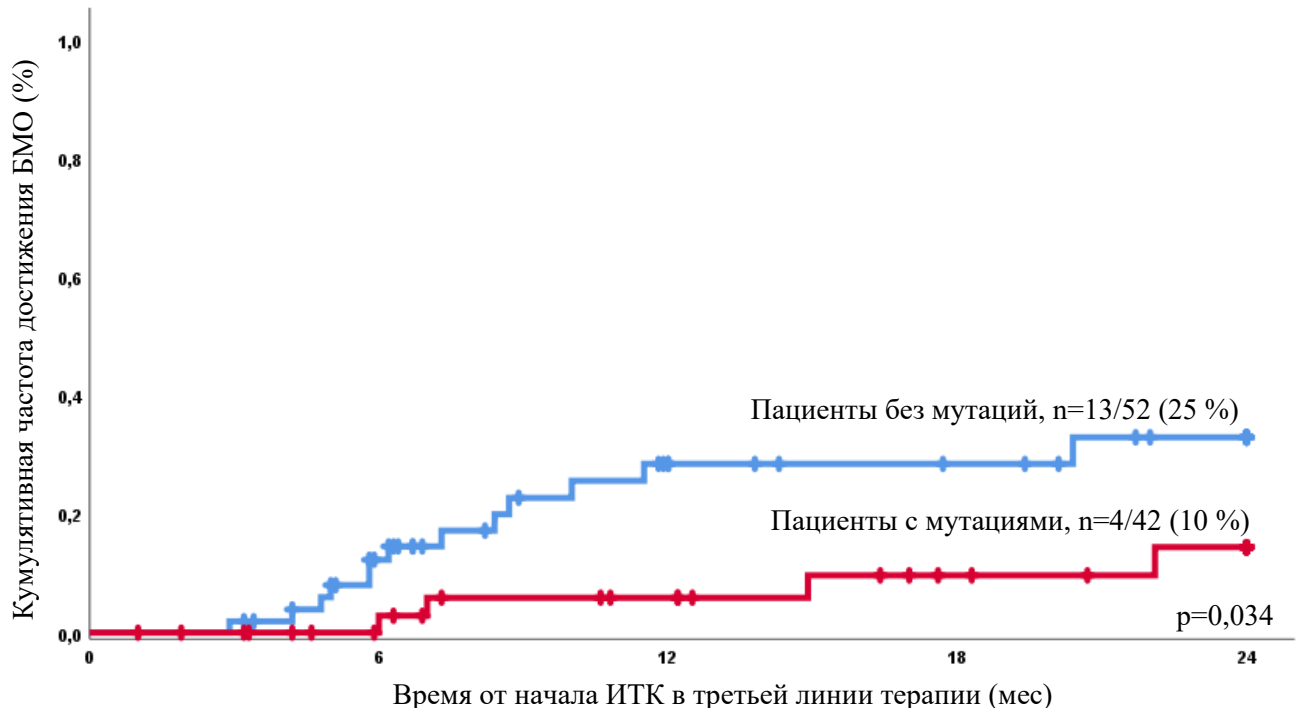


Рисунок 13 – Достижение БМО у пациентов с мутациями и без мутаций на ИТК в третьей линии терапии

Утрата ответа произошла всего у 3/21 (14 %) пациентов при медиане времени до утраты 20 (3,5 – 40) месяцев.

3.2 Прогрессия заболевания и выживаемость на терапии ингибиторами тирозинкиназ второго поколения в третьей линии

3.2.1 Беспрогрессивная выживаемость на терапии ИТК 2-го поколения в третьей линии терапии

За время наблюдения от третьей линии до последнего визита 60 (3–179) мес, у 27/100 (27 %) пациентов зарегистрирована прогрессия в ФА и/или БК. Из них, у 10/27 прогрессия произошла во время терапии третьей линии. Медиана времени до прогрессии составила 12 (4–38,5) месяцев. В 17/27 (63 %) случаев прогрессия зарегистрирована после отмены ИТК в третьей линии, медиана времени до прогрессирования составила 34 (9–110) месяца. Более четверти (7/27; 26 %) прогрессий произошли в течение первого года терапии ИТК третьей линии, что касается остальных случаев, то 4/27 (15 %), 7/27 (26 %), 5/27 (19 %) и 4/27 (15 %) были зарегистрированы в течение второго, третьего, от 3 до 5 лет, и более 5 лет наблюдения соответственно.

Как уже было отмечено, медиана времени терапии ИТК в третьей линии для пациентов без ПГО, с ПГО, но без ЦО, Мин/мЦО, ЧЦО составили 21 (1–119,5), 18 (1–153), 30 (6–140) и 33 (3,5–121) месяцев, соответственно. Как и ожидалось, большинство случаев прогрессий в ФА/БК зарегистрировано у пациентов без ПГО на исходном уровне ($n=17/35$; 48,5 %). Скорость трансформации была ниже в группе с ПГО, но без ЦО (8/34; 23,5 %), чем в группе без ПГО (17/35 (48,5 %); $p=0,031$). У пациентов с любым уровнем ЦО (мин/мЦО и ЧЦО) на момент начала третьей линии аналогичные темпы прогрессирования. Таким образом, ФА и БК были диагностированы у 2/16 пациентов (12,5 %) с мин/мЦО и 0/16 (0 %) пациентов с ЧЦО соответственно ($p=0,191$).

В анализ беспрогрессивной выживаемости было включено 35 событий: 27/100 (27 %) прогрессий и 8/100 (8 %) смертей, 3/8 (37,5 %) произошедшие вследствие осложнений после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток и 5/8 (62,5 %) смертей по другим причинам: сердечно-сосудистые заболевания ($n=3$), вторичные неопластические процессы ($n=1$) и инфекция SARS-CoV-2 ($n=1$).

Вероятностная 6-месячная, 1-летняя, 2-летняя, 3-летняя БПВ составили 97 % (ДИ 0,87–0,98), 91 % (ДИ 0,76–0,91), 82 % (ДИ 0,61–0,81), 75 % (ДИ 0,58–1,00), соответственно.

На рисунке 14 представлен график вероятности беспрогрессивной выживаемости до 96 месяцев. За это время в общей группе произошло 24 прогрессии и 8 смертей, еще 3 прогрессии произошли в 98, 102 и 110 месяцев в группе пациентов без ПГО, с молекулярным ответом более 10 % и без мутаций.

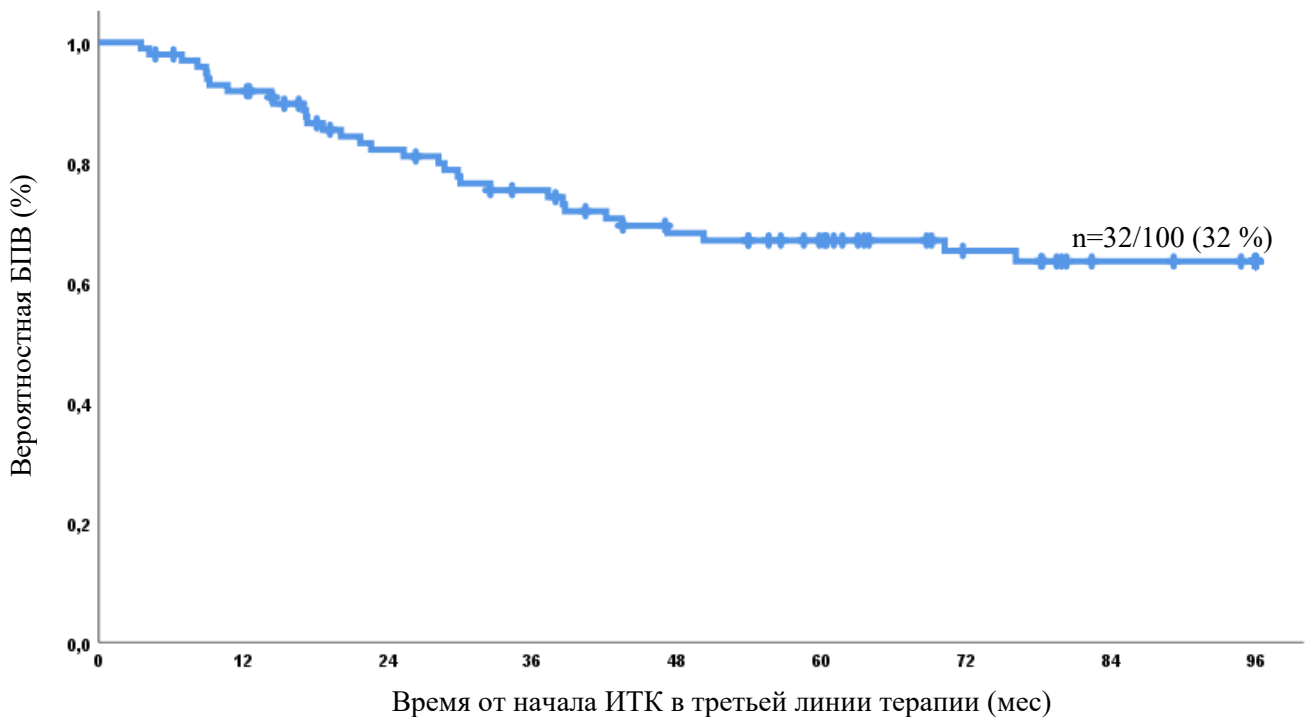


Рисунок 14 – Беспрогрессивная выживаемость в общей группе у пациентов на ИТК в третьей линии терапии

В группе пациентов без ПГО зарегистрировано 17/35 (49 %) прогрессий, 3/35 (9 %) смертей после осложнений аллоТГСК, 2/35 (6 %) смертей по другим причинам. Медиана БПВ в группе без ПГО достигнута и составляет 21 (ДИ 2–84) мес. В группе с ПГО, но без ЦО 8/33 (24 %) прогрессий, 2/33 (6 %) смертей по другим причинам. Медиана БПВ не достигнута в этой группе. В группе с мин/мЦО 2/16 (12,5 %) прогрессий, смертей не зарегистрировано. Медиана БПВ в этой группе не достигнута. В группе с ЧЦО 1/16 (6 %) смерть по другим причинам.

Медиана БПВ в этой группе не достигнута. Ожидаемая БПВ была достаточно высокой, без статистически значимых различий в группах с каким-либо ЦО (мин/мЦО vs ЧЦО) ($p=0,6$). Вероятностная БПВ низкая в группах без ПГО и без ЦО (рисунок 15).

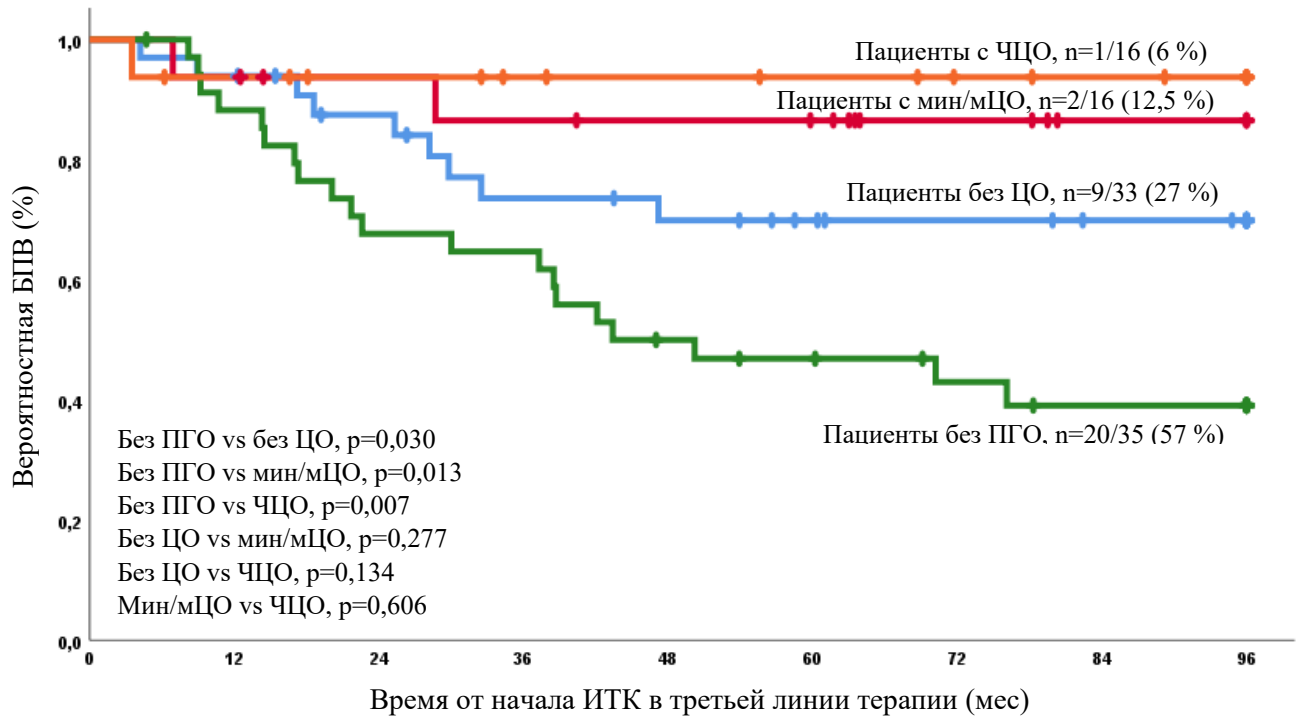


Рисунок 15 – Вероятность БПВ в разных группах пациентов в зависимости от исходного цитогенетического ответа на ИТК в третьей линии

Вероятностные БПВ в группах с различным уровнем цитогенетического ответа представлены в таблице 8.

Таблица 8 – Вероятностная БПВ в группах пациентов с различным уровнем цитогенетического ответа на момент инициации третьей линии терапии

Вероятность БПВ, n (%)	Пациенты без ПГО исходно (ДИ), n=35	Пациенты без ЦО исходно (ДИ), n=33	Пациенты с Мин/мЦО исходно (ДИ), n=16	Пациенты с ЧЦО исходно (ДИ), n=16	p
К 6 месяцам	97 % (0,77–0,99)	97 % (0,85–1,00)	93 % (1,00–1,00)	93 % (0,82–1,00)	0,204
К 12 месяцам	88 % (0,57–0,89)	93 % (0,74–0,99)	93 % (0,81–1,00)	93 % (0,82–1,00)	0,030
К 24 месяцам	67 % (0,36–0,72)	87 % (0,56–0,92)	93 % (0,81–1,00)	93 % (0,82–1,00)	0,007
К 36 месяцам	64 % (0,30–0,68)	73 % (0,42–1,00)	86 % (0,76–1,00)	93 % (0,76–1,00)	0,006

Существенная статистически значимая разница была выявлена в группах с разным уровнем молекулярного ответа на момент начала третьей линии терапии ($p=0,003$). Вероятность БПВ к 6, 12, 24, 36 месяцам составили 98 %, 91 %, 77 %, 68 %, соответственно, в группе пациентов с молекулярным ответом более 10 % и 93 %, 93 %, 93 %, 93 %, соответственно, в группе с молекулярным ответом менее или равно 10 % (рисунок 16).

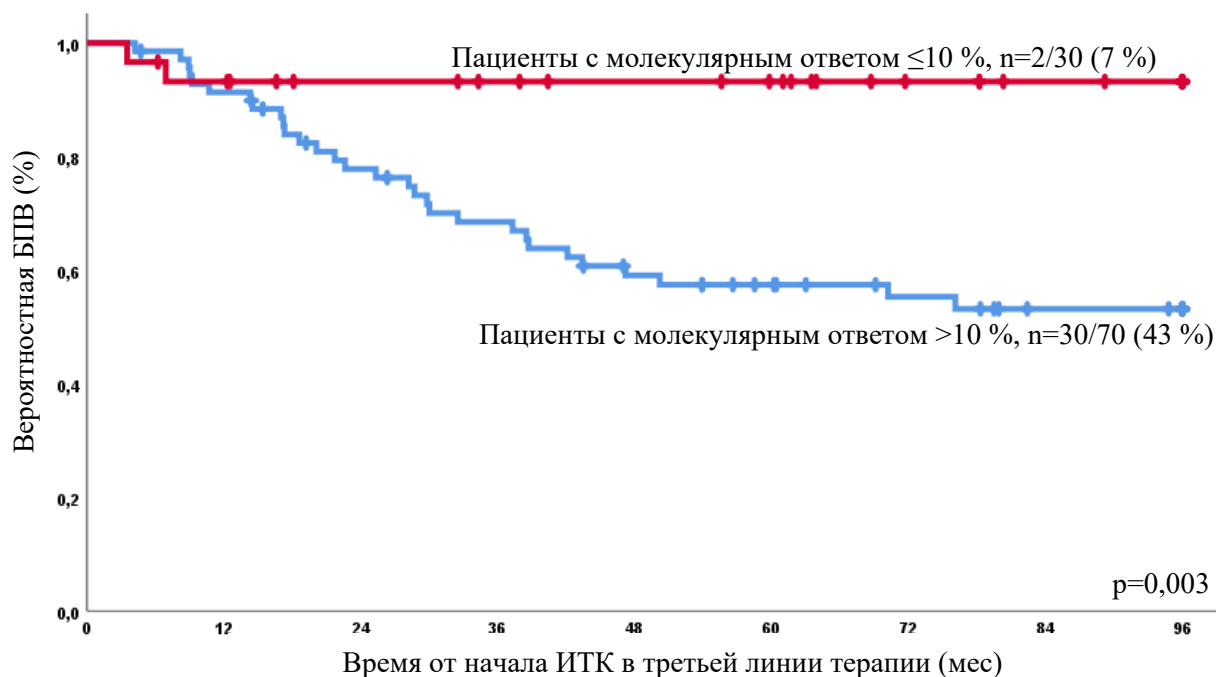


Рисунок 16 – Вероятность БПВ у пациентов с разным уровнем молекулярного ответа на момент инициации ИТК в третьей линии терапии

Вероятность БПВ у пациентов с различным уровнем молекулярного ответа на момент инициации третьей линии терапии представлена в таблице 9.

Таблица 9 – Вероятность БПВ у пациентов с различным уровнем молекулярного ответа на момент инициации третьей линии терапии

Вероятность БПВ, n (%)	Пациенты с молекулярным ответом $\leq 10\%$ (ДИ), n=30	Пациенты с молекулярным ответом $>10\%$ (ДИ), n=70	p
К 6 месяцам	93 % (0,90–1,00)	98 % (0,84–0,98)	0,001
К 12 месяцам	93 % (0,84–1,00)	91 % (0,69–0,89)	0,000
К 24 месяцам	93 % (0,84–1,00)	77 % (0,49–0,75)	0,001
К 36 месяцам	93 % (0,84–1,00)	68 % (0,36–0,85)	0,003

Прогрессии в ФА/БК зарегистрированы у 16/52 (31%) пациентов без мутаций и у 16/42 (38%) с мутациями (p=0,899), у 6 пациентов мутационный статус

никогда не был оценен. Вероятность БПВ к 6, 12, 24, 36 месяцам составила 96 %, 90 %, 81 %, 74 % соответственно, в группе пациентов без мутаций и 97 %, 92 %, 80 %, 73 %, соответственно, в группе с мутациями (рисунок 17).

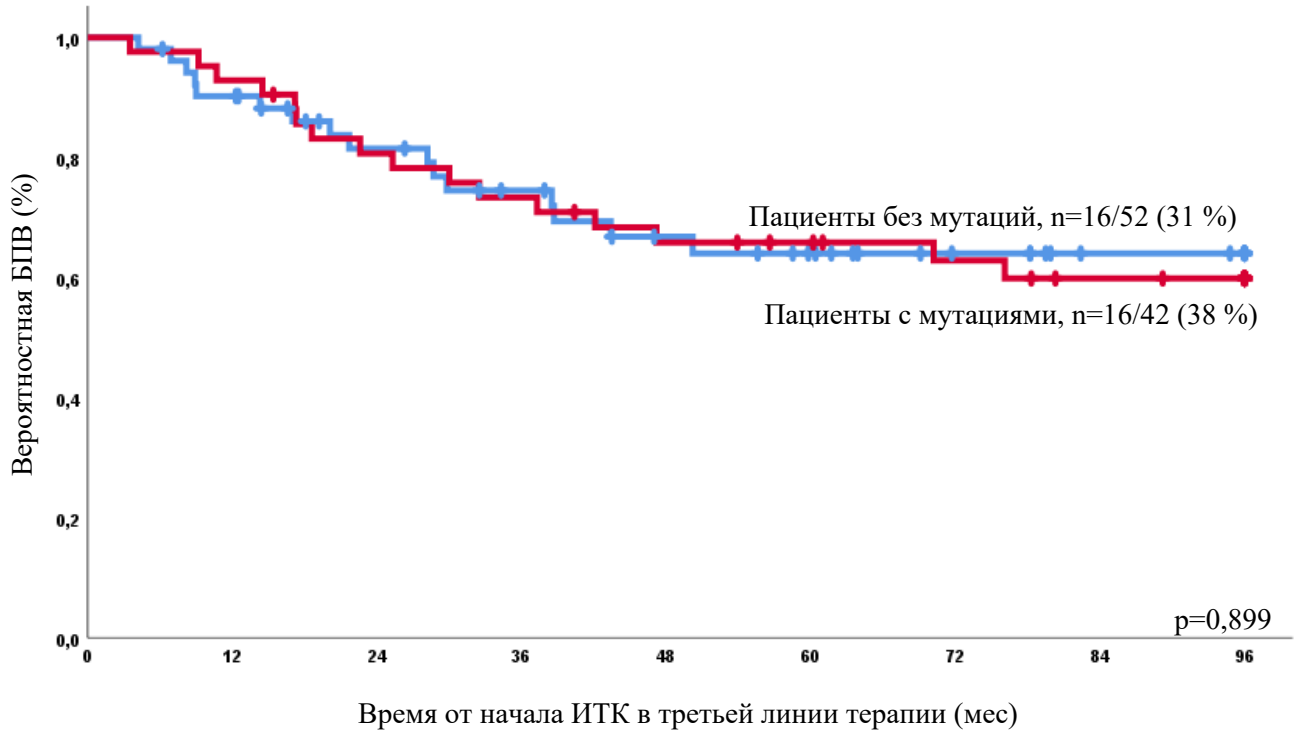


Рисунок 17 – Вероятность БПВ у пациентов с мутациями и без мутаций на ИТК в третьей линии терапии

Прогрессии в ФА/БК зарегистрированы у 2/35 (6 %) пациентов с полным цитогенетическим ответом на ИТК в третьей линии и у 30/65 (46 %) без ПЦО/МО2 на ИТК в третьей линии ($p=0,000$). Вероятность БПВ к 6, 12, 24, 36 месяцам составила 96 %, 89 %, 74 %, 64 % соответственно, в группе пациентов без ПЦО/МО2 и 97 %, 97 %, 97 %, 97 %, соответственно, в группе с ПЦО/МО2 (рисунок 18).

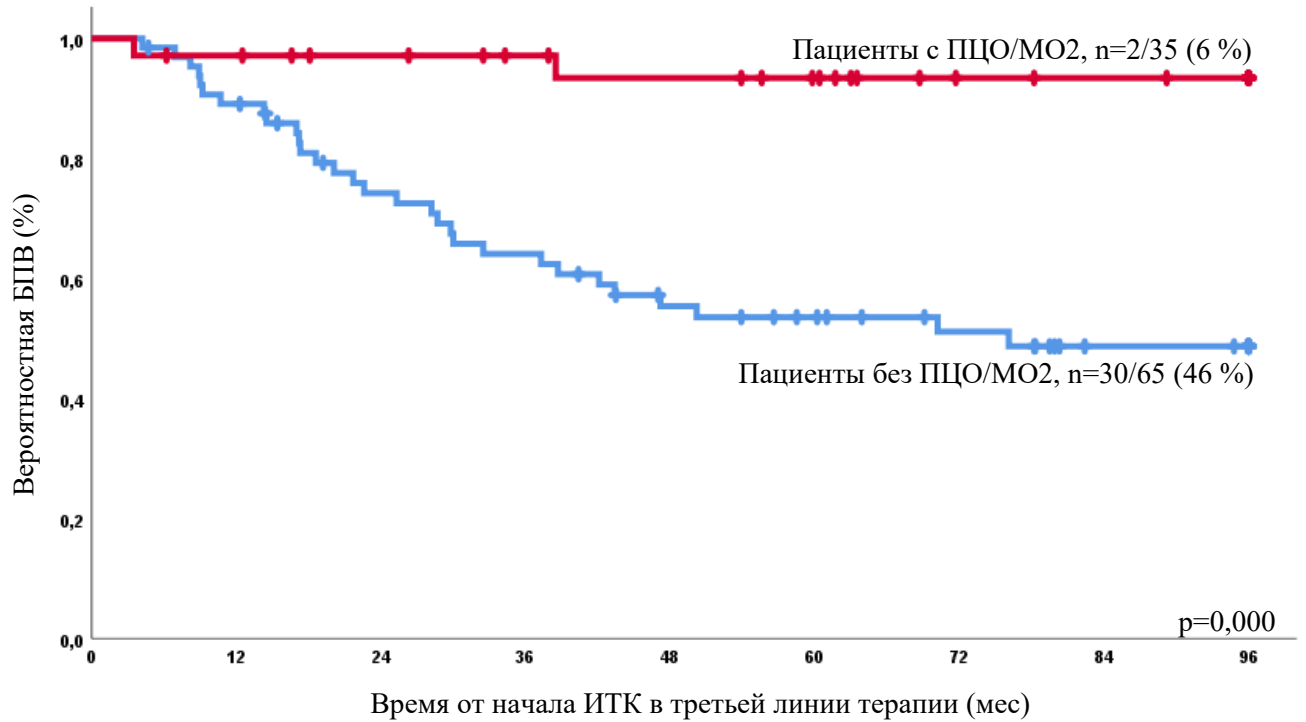


Рисунок 18 – Вероятность БПВ у пациентов с ПЦО/МО2 и без ПЦО/МО2 на ИТК в третьей линии терапии

3.2.2 Общая выживаемость на терапии ИТК 2-го поколения в третьей линии терапии

При медиане времени наблюдения от начала терапии третьей линии до последнего визита 60 (3–179) мес произошло 32/100 (32%) летальных исходов, 21 из которых был связан с прогрессированием ХМЛ, 6 после осложнений аллоТГСК (n=3, аллоТГСК было выполнено из-за БК), 5 смертей произошли по другим причинам [сердечно-сосудистые заболевания, n=3; другие злокачественные новообразования, n=1; и инфекция SARS-CoV-2, n=1]. Лекарственная токсичность не привела к летальному исходу ни в одном случае. Причины смертей в группах в зависимости от глубины исходного ответа представлены в таблице 10. Медиана времени до смерти составила 28 (3,5–114) месяцев. Смертельные случаи на фоне терапии ИТК третьей линии наблюдались у 8 из 32 (25 %) случаев. Медиана времени до смерти составила 30 (3,5–76) месяцев. После отмены терапии третьей линии отмечено 24/32 (75 %) случаев смерти, при медиане времени до смерти 27

(8–113) месяцев. Смертельные случаи наблюдались у 1/32 (3 %), 5/32 (16 %), 8/32 (25 %), 7/32 (22 %), и 11/32 (34 %) случаев через 6, 12, 24, 36 и более 36 месяцев от терапии третьей линии, соответственно.

Вероятностная ОВ в общей группе составила 99 % (ДИ 0,97–1), 93 % (ДИ 0,89–0,98), 85 % (ДИ 0,78–0,92) и 77 % (ДИ 0,65–0,85) к 6, 12, 24, 36 месяцам, соответственно (рисунок 19).

Таблица 10 – Причины летальных исходов в группах пациентов с разным цитогенетическим ответом на момент начала третьей линии терапии

Причины смертей	Пациенты без ПГО, n=35	Пациенты без ЦО, n=33	Пациенты с мин/мЦО, n=16	Пациенты с ЧЦО, n=16	Все	p
Прогрессия	15	8	1	0	24	<0,01
Осложнения после аллоТГСК	3	0	0	0	3	
По другим причинам	2	2	0	1	5	
Все	20	10	1	1	32	

На рисунке 19 представлен график вероятности общей выживаемости до 96 месяцев. За это время в общей группе произошло 30 смертей, еще 2 смерти произошли на 100, 103 месяце в группе пациентов без ПГО, и без ЦО, с молекулярным ответом более 10 %.

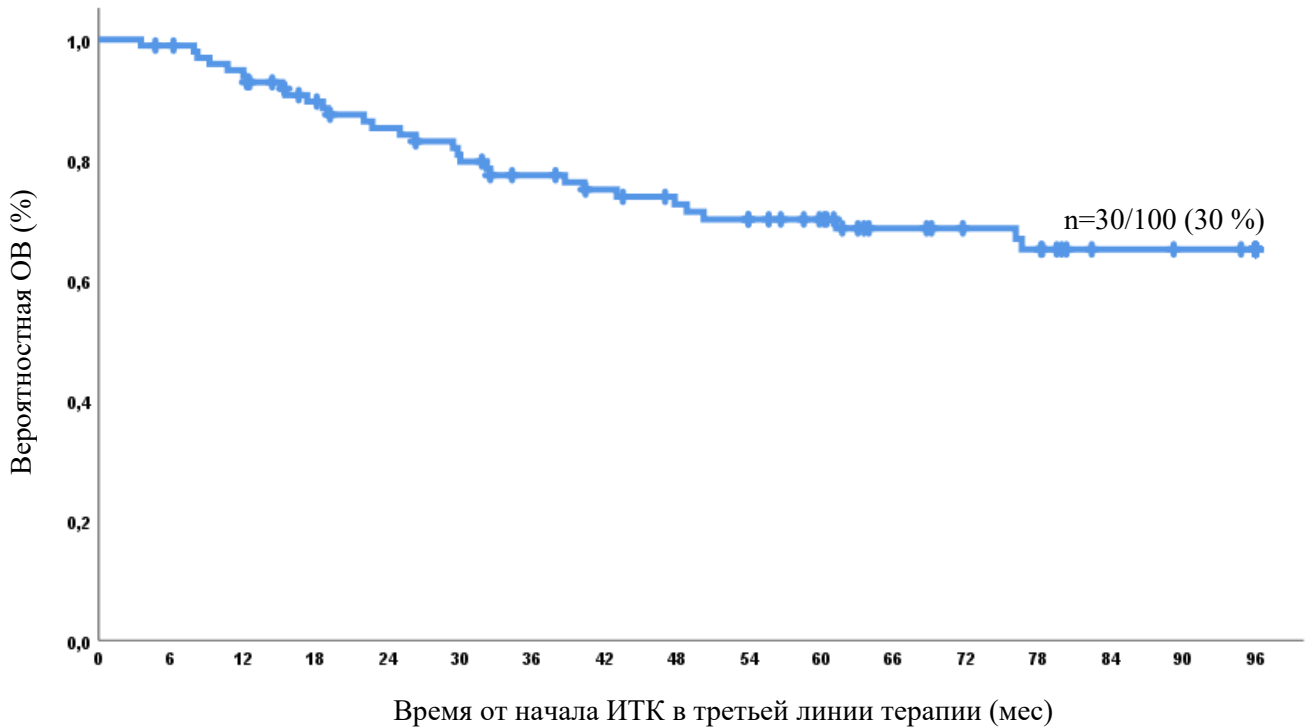


Рисунок 19 – Общая выживаемость в общей группе у пациентов на ИТК в третьей линии терапии

В группе пациентов без ПГО зарегистрировано 20/35 (57 %) смертей, из них 3/20 (15 %) смертей после осложнений аллоТГСК, 2/20 (10 %) смертей по другим причинам. Медиана ОВ в группе без ПГО достигнута и составляет 22 (ДИ 18–104) мес. В группе с ПГО, но без ЦО 10/33 (30 %) смертей, из них 8/10 (80 %) смертей после прогрессий, 2/10 (20 %) смертей по другим причинам. Медиана ОВ не достигнута в этой группе. В группе с мин/мЦО 1/16 (6 %) смертей по причине прогрессирования. Медиана ОВ в этой группе не достигнута. В группе с ЧЦО 1/16 (6 %) смерть по другим причинам. Медиана ОВ в этой группе также не достигнута. Ожидаемая ОВ была достаточно высокой, без статистически значимых различий в группах с каким-либо ЦО (мин/мЦО vs ЧЦО) ($p=0,9$). Вероятностная ОВ низкая в группах без ПГО и без ЦО (рисунок 20).

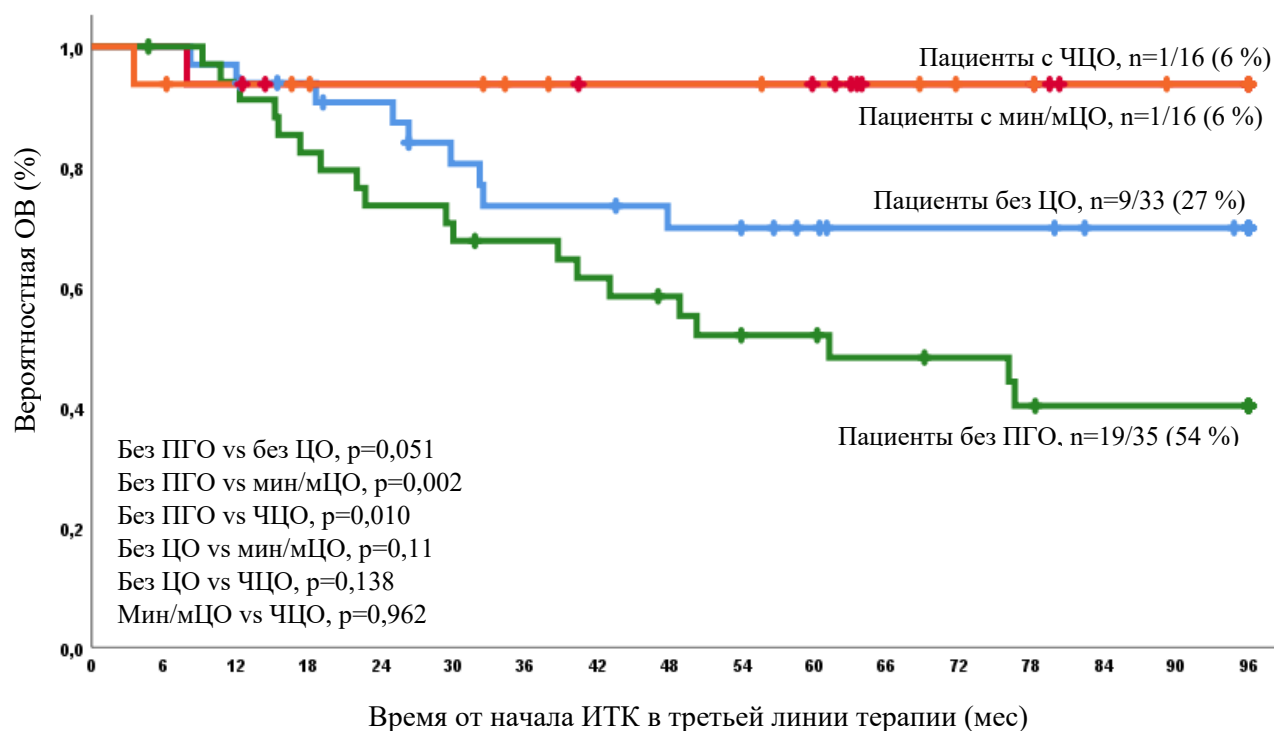


Рисунок 20 – Вероятность ОВ в разных группах пациентов в зависимости от исходного цитогенетического ответа на ИТК в третьей линии

Вероятностные ОВ в группах с различным уровнем цитогенетического ответа представлены в таблице 11.

Таблица 11 – Вероятностная ОВ в группах пациентов с различным уровнем цитогенетического ответа на момент инициации третьей линии терапии

Вероятность ОВ, n (%)	Пациенты без ПГО исходно (ДИ), n=35	Пациенты без ЦО исходно (ДИ), n=33	Пациенты с Мин/мЦО исходно (ДИ), n=16	Пациенты с ЧЦО исходно (ДИ), n=16	p
К 6 месяцам	100 % (1,00–1,00)	97 % (0,90–1,00)	93 % (0,95–1,00)	93 % (0,82–1,00)	0,960
К 12 месяцам	91 % (0,86–1,00)	93 % (0,86–1,00)	93 % (0,82–1,00)	93 % (0,82–1,00)	0,198

Продолжение таблицы 11

Вероятность ОВ, n (%)	Пациенты без ПГО исходно (ДИ), n=35	Пациенты без ЦО исходно (ДИ), n=33	Пациенты с Мин/мЦО исходно (ДИ), n=16	Пациенты с ЧЦО исходно (ДИ), n=16	p
К 24 месяцам	73 % (0,60– 0,90)	90 % (0,81– 1,00)	93 % (0,82– 1,00)	93 % (0,82– 1,00)	0,050
К 36 месяцам	67 % (0,58– 0,85)	73 % (0,60– 0,97)	93 % (0,82– 1,00)	93 % (0,82– 1,00)	0,007

Существенная статистически значимая разница была выявлена в группах с разным уровнем молекулярного ответа на момент инициации третьей линии терапии ($p=0,005$). Вероятность ОВ к 6, 12, 24, 36 месяцам составили 100 %, 92 %, 82 %, 71 %, соответственно, в группе пациентов с молекулярным ответом более 10 % и 96 %, 93 %, 93 %, 93 %, соответственно, в группе с молекулярным ответом менее или равно 10 % (рисунок 21).

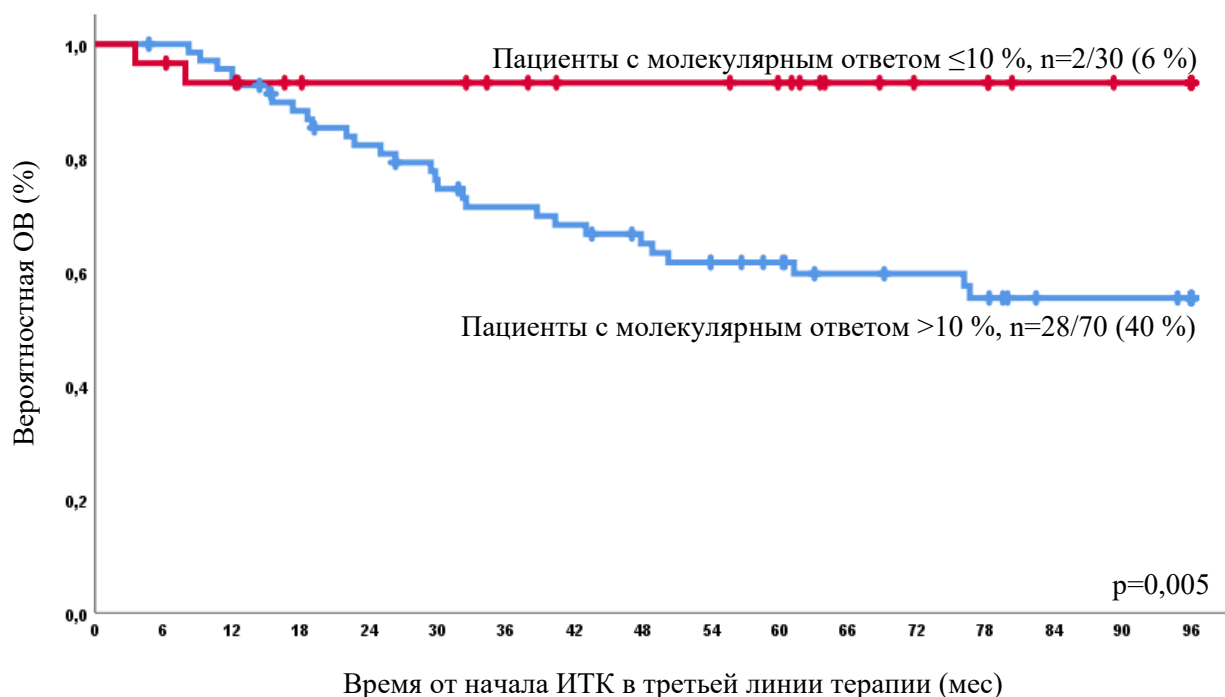


Рисунок 21 – Вероятность ОВ у пациентов с разным уровнем молекулярного ответа на момент начала ИТК в третьей линии терапии

Вероятность ОВ у пациентов с различным уровнем молекулярного ответа на момент начала третьей линии терапии представлена в таблице 12.

Таблица 12 – Вероятность ОВ у пациентов с различным уровнем молекулярного ответа на момент начала третьей линии терапии

Вероятность ОВ, n (%)	Пациенты с молекулярным ответом ≤ 10 % (ДИ), n=30	Пациенты с молекулярным ответом >10 % (ДИ), n=70	p
К 6 месяцам	93 % (0,90–1,00)	98 % (0,95–1,00)	0,102
К 12 месяцам	93 % (0,84–1,00)	91 % (0,88–0,99)	0,051
К 24 месяцам	93 % (0,84–1,00)	77 % (0,73–0,91)	0,003
К 36 месяцам	93 % (0,84–1,00)	68 % (0,70–0,90)	0,000

Смерти зарегистрированы у 14/52 (27 %) пациентов без мутаций и у 18/42 (43 %) с мутациями ($p=0,899$), у 6 пациентов мутационный статус никогда не был оценен. Вероятность ОВ к 6, 12, 24, 36 месяцам составила 100 %, 90 %, 83 %, 78 % соответственно, в группе пациентов без мутаций и 97 %, 92 %, 85 %, 73 %, соответственно, в группе с мутациями (рисунок 22).

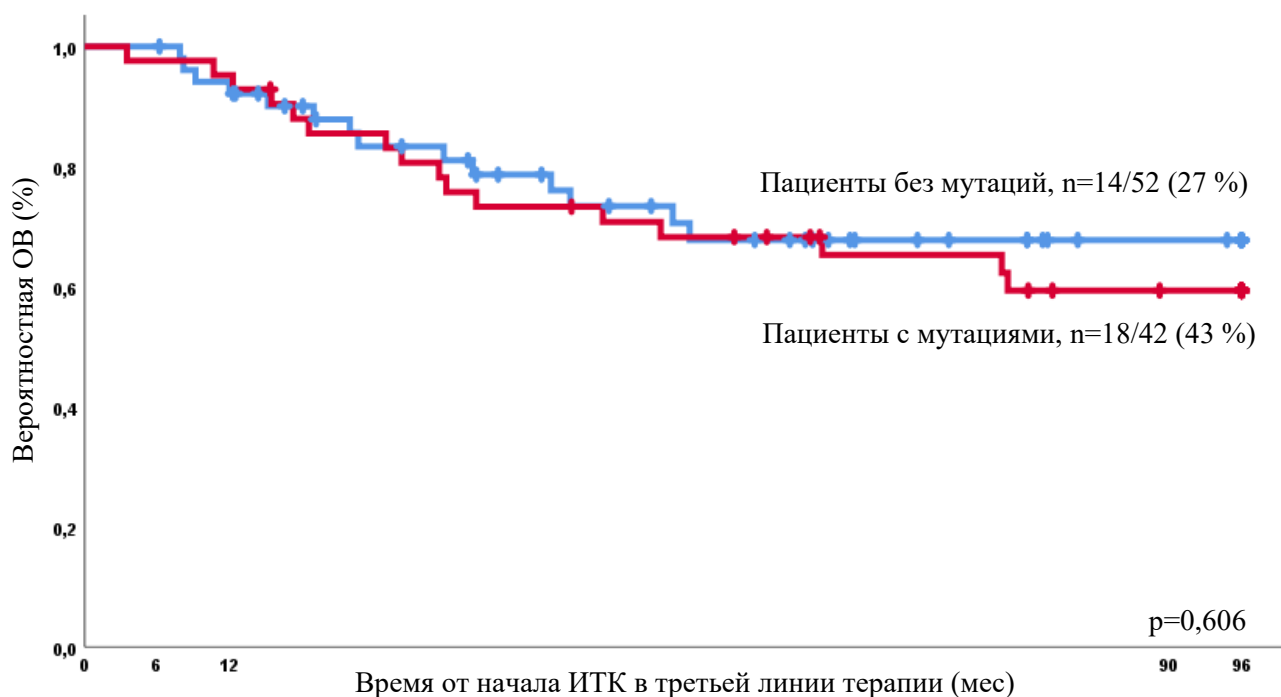


Рисунок 22 – Вероятность ОВ у пациентов с мутациями и без мутаций на ИТК в третьей линии терапии

Смерти зарегистрированы у 2/35 (6 %) пациентов с полным цитогенетическим ответом на ИТК в третьей линии и у 28/65 (43 %) без ПЦО на ИТК в третьей линии ($p=0,000$). Вероятность ОВ к 6, 12, 24, 36 месяцам составила 100 %, 90 %, 79 %, 67 % соответственно, в группе пациентов без ПЦО и 97 %, 97 %, 97 %, 97 %, соответственно, в группе с ПЦО (рисунок 23).

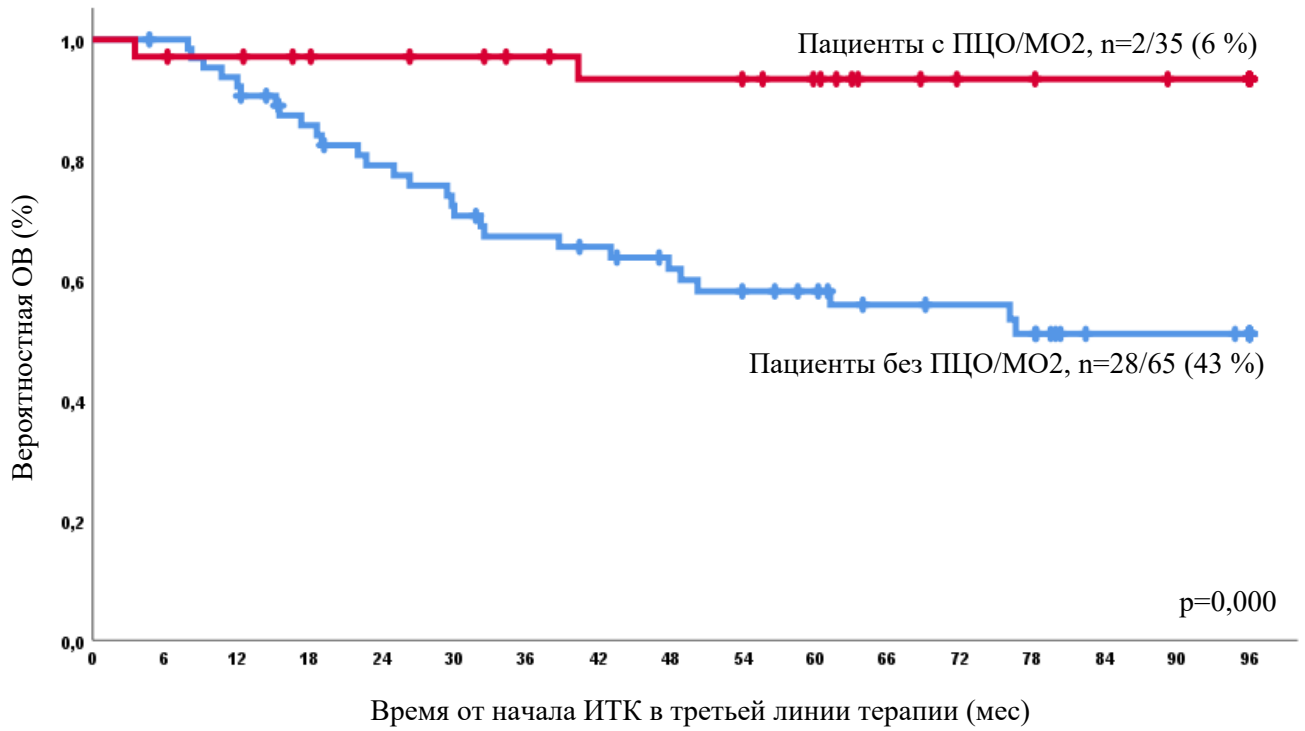


Рисунок 23 – Вероятность ОВ у пациентов с ПЗО/МО2 и без ПЗО/МО2 на ИТК в третьей линии терапии

3.3 Факторы прогноза эффективности терапии ИТК 2-го поколения в третьей линии терапии

Результаты однофакторного регрессионного анализа, представленные в таблице 13, выявили, что факторы, связанные с достижением ПЦО на ИТК второго поколения в третьей линии, были следующими:

1. Достижение ПЦО на 1й линии терапии, $p < 0,001$
2. Достижение какого-либо цитогенетического ответа на ИТК 2й линии, $p = 0,006$
3. Наличие какого-либо ЦО на 1й или 2й линиях терапии, $p = 0,001$
4. Наличие ПГО перед ИТК в третьей линии, $p = 0,001$
5. Наличие какого-либо ЦО перед ИТК в третьей линии терапии, $p < 0,001$
6. Молекулярный ответ менее или равно 10% перед ИТК в третьей линии, $p < 0,001$
7. Мутационный статус когда-либо до и на момент начала ИТК в третьей линии, $p = 0,007$

Таблица 13 – Однофакторный регрессионный анализ риска достижения полного цитогенетического ответа на терапии ИТК 2-го поколения в третьей линии

Предиктор	ОШ [95% ДИ]	P
Мужской пол	1.04 [0.52; 2.08]	0.90
Возраст на момент начала ИТК 3 линии (на каждые 10 лет)	0.97 [0.76; 1.24]	0.84
Возраст на момент начала ИТК 3 линии > 60 лет	0.89 [0.42; 1.90]	0.76
Время от диагноза до ИТК 3 линии (на каждый год)	0.999 [0.99; 1.005]	0.78

Продолжение таблицы 13

Предиктор		ОШ [95% ДИ]	P
Лучший ответ на терапии ИТК 1 линии	ПГО	1.72 [0.38; 7.68]	0.48
	Какой-либо ЦО	3.15 [0.74; 13.44]	0.12
Время от ИТК 1 до ИТК 3 линии (на каждый год)		0.997 [0.99; 1.01]	0.55
Цитогенетический ответ перед терапией ИТК 2 линии	ЦО/ПЦО	3.25 [1.67; 6.31]	<0.001
Причина отмены ИТК 2 линии	резистентность	0.82 [0.38; 1.76]	0.61
Лучший ответ на терапии ИТК 2 линии	ПГО	1.44 [0.15; 13.84]	0.75
	Какой-либо ЦО	16.68 [2.27; 122.6]	0.006
Какой-либо ЦО на терапии ИТК 1 или 2 линии		10.80 [2.59; 45.08]	0.001
ПГО перед ИТК 3 линии		5.46 [1.93; 15.49]	0.001
Какой-либо ЦО перед ИТК 3 линии		7.14 [3.48; 14.65]	<0.001
МО ≤10% перед ИТК 3 линии		6.12 [3.03; 12.35]	<0.001
Хромосомные аномалии на терапии ИТК 3 линии		0.71 [0.29; 1.70]	0.44
Мутации		0.34 [0.16; 0.75]	0.007
НК клетки		1,30 [0.76; 2.88]	0,89

В многофакторный регрессионный анализ Кокса включены факторы, имеющие наиболее сильное влияние по результатам однофакторного регрессионного анализа. Результаты представлены в таблице 14.

Таблица 14 – Многофакторный регрессионный анализ вероятности достижения полного цитогенетического ответа на ИТК 2-го поколения в третьей линии

Предиктор	ОШ [95% ДИ]	P	Value	Wald Statistic	Pr>Chi2
Какой-либо ЦО (Мин/мЦО/ЧЦО/ПЦО) на ИТК 1 или 2й линий	3,93 [0.81; 18.99]	0.01	1,37	1,70	0,08
Какой-либо ЦО (Мин/мЦО, ЧЦО) перед ИТК в 3ей линии	4,35 [1.83; 10.32]	0.05	1,47	3,34	0,00
Мутации	0.51 [0.23; 1.13]	0.10	0,67	-1,65	0,09

По результатам многофакторного анализа выявлено только два фактора, положительно влияющих на достижение ПЦО на ИТК в третьей линии – цитогенетический ответ до ИТК в третьей линии, цитогенетический ответ на первой и второй линиях терапии.

3.4 Экспрессия активирующих и ингибирующих рецепторов НК клеток в разных группах пациентов ХФ ХМЛ

Чтобы установить, как влияет количественная характеристика НК клеток и экспрессия активирующих и ингибирующих рецепторов на НК клетках на достижение оптимального ответа на ИТК в третьей линии, анализ был проведен в трех группах в зависимости от достижения/недостижения большого цитогенетического ответа (БЦО Ph+ 0-35 %) на ИТК в третьей линии. Контрольную группу составили 20 здоровых доноров.

Группа здоровых доноров была отобрана из доноров периферической крови Станции переливания крови ФГБУ «НМИЦ им В.А. Алмазова», подписавших согласие на биобанкирование биообразцов периферической крови.

В исследование были включены 40 пациентов на ИТК 2-го поколения в третьей линии и 20 здоровых доноров, (мужчины, n=36 (60 %)). На момент начала терапии третьей линии, медиана возраста пациентов составляла 53 (26–70) года. Медиана возраста здоровых доноров на момент взятия биообразцов составила 32 (23–59) года. Терапией первой линии для большинства пациентов (n=38 (95 %)) был иматиниб. В качестве терапии второй линии ИТК применялись нилотиниб, дазатиниб, иматиниб и бозутиниб у 23 (57,5 %), 13 (32,5 %), 1 (2,5 %) и 3 (7,5 %) пациентов, соответственно. Медиана времени от момента постановки диагноза ХМЛ, от начала первой и второй линий таргетной терапии до начала терапии третьей линии ИТК составила: 61,5 (7–316) месяцев, 50 (7–156) месяцев и 16 (2,5–96) месяцев, соответственно. В качестве третьей линии ИТК применялись бозутиниб, нилотиниб, дазатиниб у 5 (12,5 %), 13 (32,5 %), 22 (55 %). Характеристика групп пациентов до начала третьей линии представлена в таблице 15.

Таблица 15 – Результаты предшествующей терапии первой и второй линий ИТК

Характеристика пациентов, n=40	Пациенты с БЦО на ИТК 3й линии, n=20	Пациенты, резистентные к терапии ИТК в 3ей линии, n=20	Всего, n=40
Ме времени терапии 1й линии, (разброс), мес	36 (2–87)	12 (2–145)	18 (2–145)
Ме времени терапии 2й линии, (разброс), мес	16 (5–96)	11 (2–80)	14 (2–96)

Продолжение таблицы 15

Характеристика пациентов, n=40		Пациенты с БЦО на ИТК 3й линии, n=20	Пациенты, резистентные к терапии ИТК в 3ей линии, n=20	Всего, n=40
Наилучшие ответы на первых двух линиях ИТК, n (%)	Нет ПГО	0 (0 %)	1 (5 %)	1 (2,5 %)
	ПГО, без ЦО	5 (25 %)	11 (55 %)	16 (40 %)
	Мин/мЦО	2 (10 %)	1 (5 %)	3 (7,5 %)
	ЧЦО	4 (20 %)	2 (10 %)	6 (15 %)
	ПЦО	6 (30 %)	3 (15 %)	9 (22,5 %)
	БМО	3 (15 %)	2 (10 %)	5 (12,5 %)
	МО \geq 4	0	0	0
Время до наилучшего ответа, Ме (разброс), мес		8 (3–61,5)	3 (1–16)	5 (1–61,5)
Мутации, n (%)		8/14* (40 %) G250E–2 E355A–1 F311L–1 F317L+L248V–1 T315I+Y253H–1 L248V–1 F359C–1 *у 6 пациентов мутационный статус не был выполнен	12/20 (60 %) D363Y–1 E255V–1 Q252H–1 M351T–1 Q252H+E255K+ F317L–1 Y253H–1 G250E–1 T315I–4 F317L–1	20/34 (59 %)

Продолжение таблицы 15

Характеристик а пациентов, n=40	Пациенты с БЦО на ИТК 3й линии, n=20	Пациенты, резистентные к терапии ИТК в 3ей линии, n=20	Всего, n=40
<p>Сокращения:</p> <p>ИТК – ингибиторы тирозинкиназ</p> <p>ПГО – полный гематологический ответ</p> <p>ЦО – цитогенетический ответ</p> <p>Ме – медиана</p> <p>Мин/мЦО – минимальный или малый цитогенетический ответ</p> <p>Мес – месяцы</p> <p>ЧЦО – частичный цитогенетический ответ</p> <p>ПЦО – полный цитогенетический ответ</p> <p>БМО – большой молекулярный ответ</p> <p>МО ≥ 4 – глубокий молекулярный ответ</p>			

Характеристики ответов на лечение у пациентов непосредственно перед началом терапии ИТК в третьей линии представлены в таблице 16. Определение критериев фаз ХМЛ и ответов на терапию соответствовали национальным рекомендациям и рекомендациям Европейской сети лейкозов 2020 [6, 66].

Таблица 16 – Характеристика пациентов перед началом терапии третьей линии ИТК

Характеристика пациентов n=40		Пациенты, резистентные к терапии ИТК в 3ей линии, n=20	Пациенты с БЦО на ИТК в 3й линии, n=20
Наилучший ответ	отсутствие ПГО, n (%)	8 (40 %)	3 (15 %)
	ПГО без ЦО, n (%)	11 (55 %)	8 (40 %)
	Мин/мЦО, n (%)	1 (5 %)	2 (16 %)
	ЧЦО, n (%)	0 (0 %)	7 (35 %)

Характеристика групп пациентов на терапии ИТК в 3й линии, включая оценку экспрессии НК клеток представлена в таблице 17.

При отсутствии результатов цитогенетического исследования уровень транскрипта гена *BCR::ABL* < 1 % расценивался как признак наличия ПЦО [84].

Таблица 17 – Характеристика групп пациентов на ИТК в 3й линии

Характеристика пациентов n=40		Пациенты с БЦО на ИТК в 3й линии, n=20	Пациенты, резистентные к терапии ИТК в 3ей линии, n=20
Наилучший ответ на ИТК в третьей линии	отсутствие ПГО, n (%)	-	3 (15 %)
	ПГО без ЦО, n (%)	-	15 (75 %)
	Мин/мЦО, n (%)	-	2 (10 %)
	ЧЦО, n (%)	5 (25 %)	-
	ПЦО, n (%)	5 (25 %)	-
	БМО, n (%)	10 (50 %)	-
Время до наилучшего ответа, Ме (разброс), мес		7 (2–45)	8 (3–28)
Отмена терапии третьей линии, n (%)		12 (60 %)	20 (100 %)
Длительность терапии ИТК в третьей линии в целом в группе		35 (5–119,5)	12 (1–28)
Прогрессии в ФА/БК на терапии ИТК в 3й линии, n (%)		0	6 (30 %)
Смерти на терапии ИТК в 3й линии, n (%)	ХМЛ	0	5/8 (62,5 %)
	Другая причина		2/8 (25 %)
	Осложнения аллоТГСК		1/8 (12,5 %)
НК клетки, (%), Ме (разброс)		11 (3–29,5)	6,7 (0,6–24)
ТНК клетки, (%), Ме (разброс)		5,4 (1–17)	4,5 (1,6–23)

Продолжение таблицы 17

Характеристика пациентов n=40	Пациенты с БЦО на ИТК в 3й линии, n=20	Пациенты, резистентные к терапии ИТК в 3ей линии, n=20
NK клетки с экспрессией NKp46, (%), Ме (разброс)	0,7 (0,2–8,0)	0,5 (0–46)
NK клетки с экспрессией KIR, (%), Ме (разброс)	0,2 (0,1–5,3)	0,3 (0–15)

В группе здоровых доноров, количество NK клеток 8,6 % (1–17), количество TNK 5 % (0,1–14), NK клетки с экспрессией NKp46 0,5 % (0–1,6), NK клетки с экспрессией KIR составили 0,5 % (0–2,5).

Поскольку распределение данных было отличным от нормального, для множественных сравнений между 3 группами использовали непараметрический критерий Краскела-Уоллиса.

Количественная характеристика общей группы NK клеток в разных группах представлена на рисунке 24.

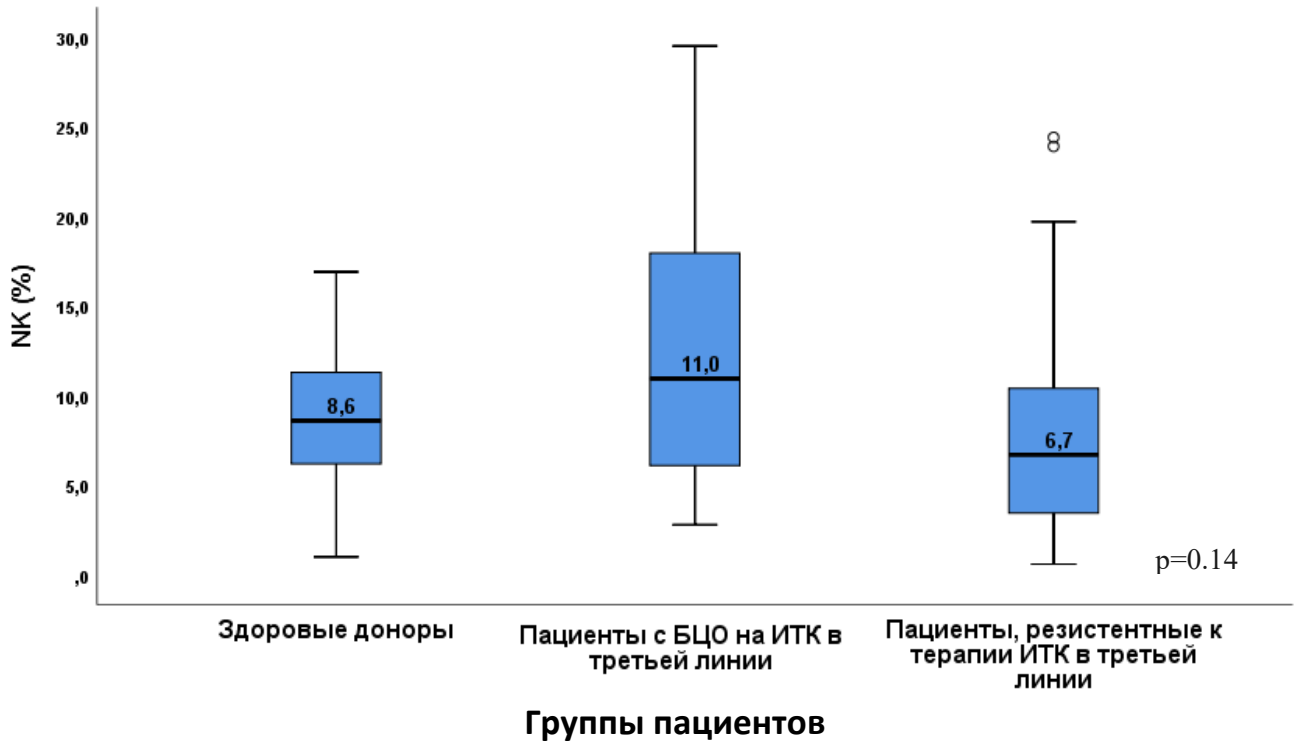


Рисунок 24 – Сравнительная характеристика количества НК клеток у здоровых доноров, пациентов с БЦО на ИТК в третьей линии и пациентов, резистентных к терапии ИТК в третьей линии

Среди групп пациентов нет достоверных различий в количественной характеристике НК клеток, наблюдается тенденция к росту НК клеток у пациентов, с оптимальным ответом.

Количественная характеристика общей группы ТНК клеток в разных группах представлена на рисунке 25.

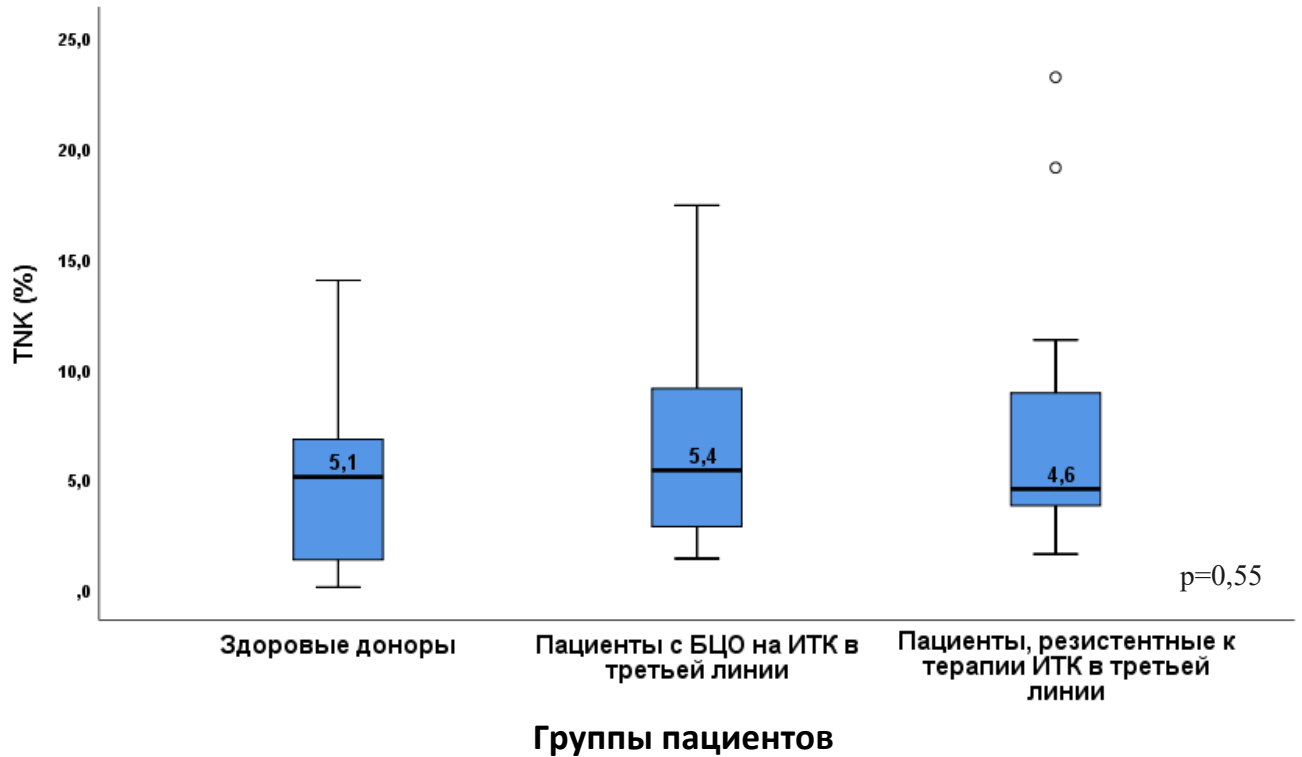
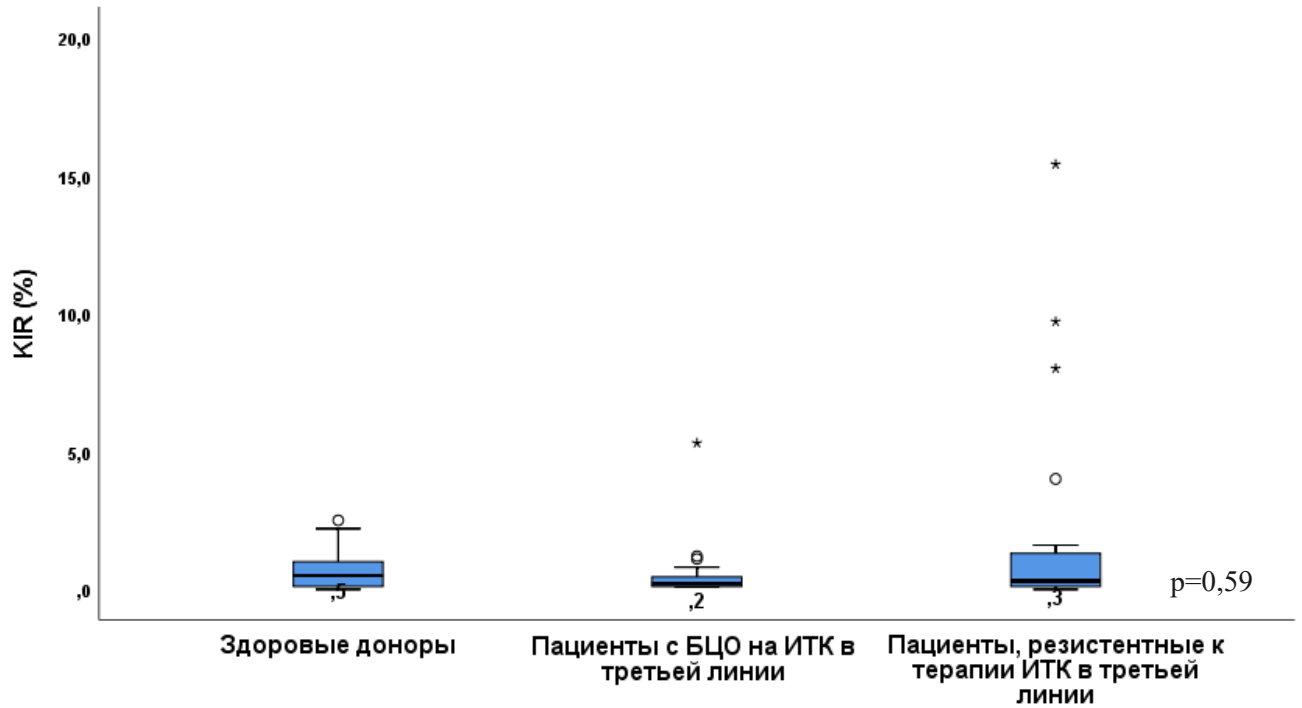


Рисунок 25 – Сравнительная характеристика количества TNK клеток у здоровых доноров, пациентов с БЦО на ИТК в третьей линии и пациентов, резистентных к терапии ИТК в третьей линии

Среди групп пациентов нет достоверных различий в количественной характеристике TNK клеток.

Количественная характеристика общей группы NK клеток с экспрессией KIR в разных группах представлена на рисунке 26.



Группы пациентов

Рисунок 26 – Сравнительная характеристика количества НК клеток с экспрессией KIR рецепторов у здоровых доноров, пациентов с БЦО на ИТК в третьей линии и пациентов, резистентных к терапии ИТК в третьей линии

Среди групп пациентов нет достоверных различий в количественной характеристике НК клеток, экспрессирующих KIR рецепторы.

Количественная характеристика общей группы НК клеток с экспрессией NKp46 в разных группах представлена на рисунке 27.

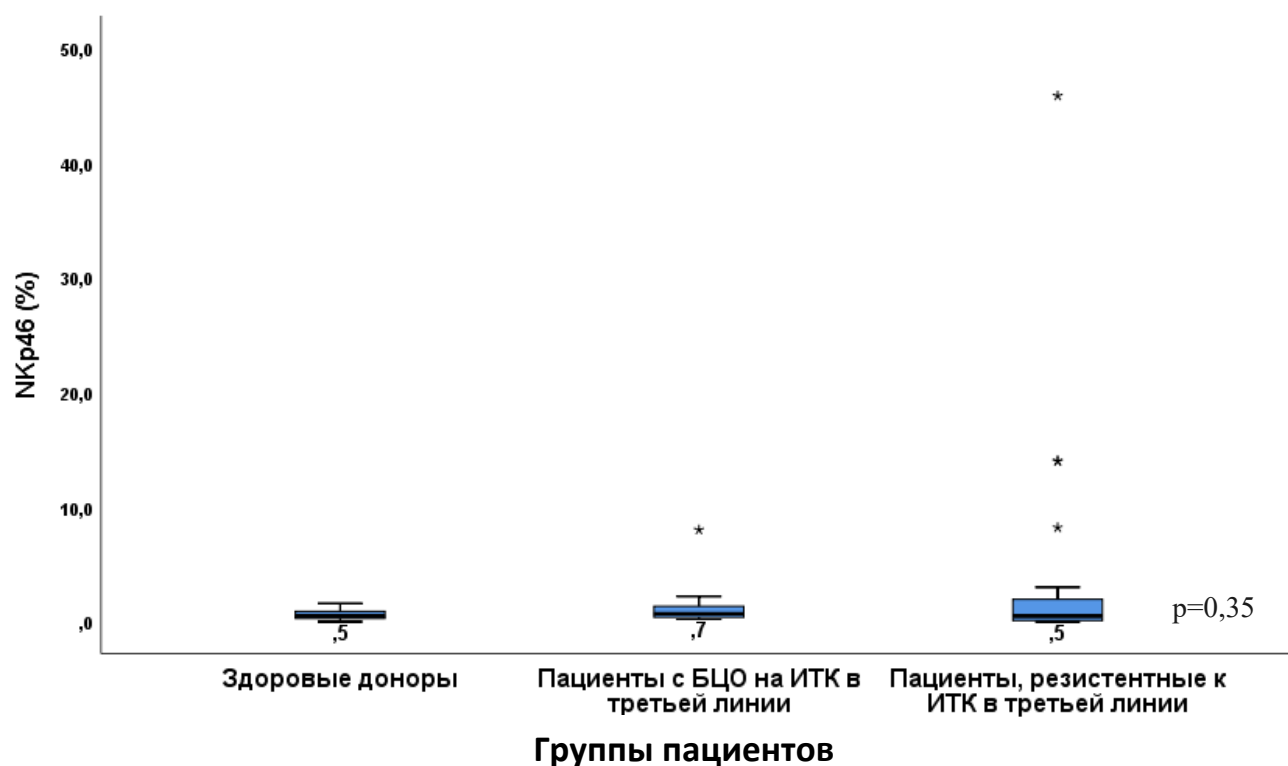


Рисунок 27 – Сравнительная характеристика количества НК клеток с экспрессией НКр46 рецепторов у здоровых доноров, пациентов с БЦО на ИТК в третьей линии и пациентов, резистентных к терапии ИТК в третьей линии

Среди групп пациентов нет достоверных различий в количественной характеристике НК клеток, экспрессирующих НКр46 рецепторы.

3.5 Оценка гаплотипов KIR рецепторов и их влияние на достижение ПЦО, ОВ и БПВ у пациентов с ХФ ХМЛ

Две группы пациентов и группа здоровых доноров представлена одной этнической группой, что является одним из значимых факторов для сравнительной оценки гаплотипов KIR рецепторов. В таблице 18 представлены данные по активирующим и ингибирующим аллелям KIR, гаплотипам KIR среди групп пациентов и здоровых доноров.

Таблица 18 – Сравнение генов KIR, количества активирующих или ингибирующих аллелей KIR, генотипов KIR в группах пациентов с оптимальным ответом, резистентных пациентов, здоровых доноров

KIR		Группа здоровых доноров, n=20, n (%)	Пациенты с БЦО на ИТК в третьей линии, n=20, n (%)	Пациенты, резистентные к терапии ИТК в третьей линии, n=20, n (%)	p
Активирующие KIR	<i>KIR2DS1</i>	6 (30 %)	8 (40 %)	9 (45 %)	0,61
	<i>KIR2DS2</i>	10 (20 %)	13 (65 %)	8 (40 %)	0,28
	<i>KIR2DS3</i>	3 (15 %)	6 (30 %)	6 (30 %)	0,45
	<i>KIR2DS4</i>	13 (65 %)	19 (95 %)	11 (55 %)	0,02
	<i>KIR2DS5</i>	1 (5 %)	5 (25 %)	4 (20 %)	0,21
	<i>KIR3DS1</i>	2 (10 %)	9 (45 %)	6 (30 %)	0,04
Ингибирующие KIR	<i>KIR2DL1</i>	20 (100 %)	19 (95 %)	18 (90 %)	0,35
	<i>KIR2DL2</i>	10 (50 %)	13 (65 %)	9 (45 %)	0,42
	<i>KIR2DL3</i>	19 (95 %)	16 (80 %)	16 (80 %)	0,31
	<i>KIR2DL4</i>	18 (90 %)	20 (100 %)	19 (95 %)	0,58
	<i>KIR2DL5</i>	8 (40 %)	9 (45 %)	5 (25 %)	0,39
	<i>KIR3DL1</i>	6 (30 %)	11 (55 %)	12 (60 %)	0,13
	<i>KIR3DL2</i>	9 (45 %)	19 (95 %)	17 (85 %)	0,01
	<i>KIR3DL3</i>	20 (100 %)	18 (90 %)	19 (95 %)	0,35
Количество активирующих KIR	0	2 (10 %)	1 (5 %)	1 (5 %)	0,76
	1	8 (40 %)	3 (15 %)	7 (35 %)	0,19
	>2	10 (50 %)	16 (80 %)	12 (60 %)	0,14
Количество ингибирующих KIR	6	17 (85 %)	10 (50 %)	3 (65 %)	0,01
	7	2 (10 %)	8 (40 %)	5 (25 %)	0,09
	8	1 (5 %)	2 (10 %)	2 (10 %)	0,83

Продолжение таблицы 18

Генотипы (гаплотипы) KIR	AA	4 (20 %)	3 (15 %)	6 (30 %)	0,50
	Bx	16 (80 %)	17 (85 %)	14 (70 %)	1,00

Среди пациентов ХМЛ и здоровых доноров, есть значимые различия в количественной характеристике аллелей, ингибирующих KIR рецепторов. Большее количество у здоровых доноров по сравнению с пациентами с оптимальным ответом и резистентными пациентами ($p < 0,05$). Также значимые различия в экспрессии двух активирующих аллелей гена KIR (*KIR2DS4*, *KIR3DS1*), $p < 0,05$. Из значимых ингибирующих аллелей гена KIR, статистически достоверное различие наблюдалось у пациентов с ХМЛ по сравнению со здоровыми донорами в экспрессии *KIR3DL2* аллеля ($p < 0,05$), при этом, экспрессия не отличалась между пациентами с оптимальным ответом 19/20 (95 %) и пациентами, резистентными к терапии 17/20 (85 %) ($p = 0,25$). Не наблюдалось значимых различий в гаплотипах KIR рецепторов в группах здоровых доноров, пациентов ХМЛ с оптимальным ответом и пациентов, резистентных к терапии.

В отношении достижения ПЦО на ИТК в третьей линии в зависимости от гаплотипов KIR рецепторов, несмотря на значимое расхождение кривых на рисунке 28, статистически значимых различий выявлено не было ($p = 0,096$). Всего было достигнуто 15/40 (37,5 %) ПЦО в общем в двух группах. В группе с гаплотипом А у 1/9 (11 %) пациентов достигнут ПЦО/МО2. В группе с гаплотипом Bx у 14/31 (45 %) достигнут ПЦО/МО2. Вероятность достижения ПЦО к 6, 12 и 24 месяцам составила 12 %, 12 %, 12 %, соответственно, в группе пациентов с гаплотипом А и 34 %, 54 %, 61 %, соответственно, в группе с гаплотипом Bx. Медиана времени достижения ПЦО в группе с гаплотипом Bx достигнута и составляет 12 мес (ДИ 5–20) мес.

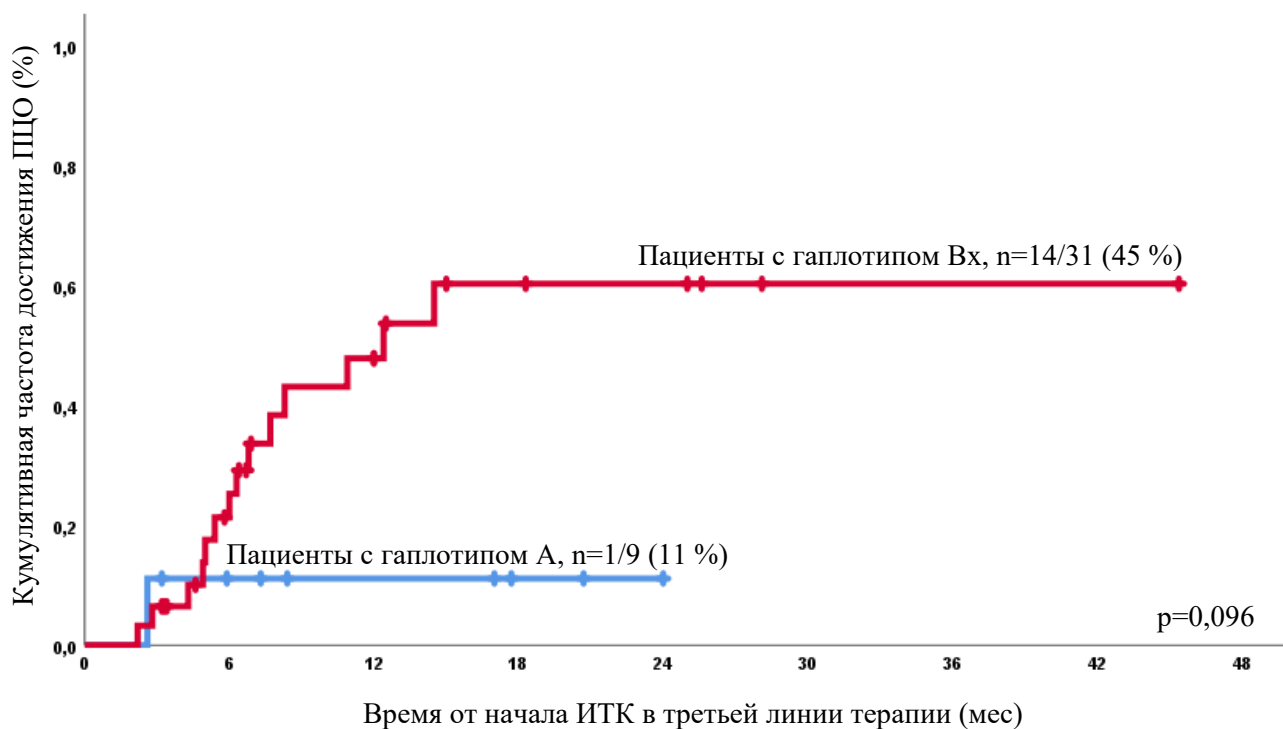


Рисунок 28 – Достижение ПЦО/МО2 на терапии ИТК в третьей линии у пациентов гаплотипами А и Вх КIR рецепторов

У большей части пациентов с ХМЛ, как и у здоровых доноров наблюдался Вх гаплотип КIR рецепторов. Примечательно, что одинаковое количество смертей было выявлено в группе пациентов с гаплотипом А 4/9 (45 %), и с гаплотипом Вх 4/31(13 %), $p=0,008$.

Общая выживаемость у пациентов с разными гаплотипами КIR рецепторов представлена на рисунке 29.

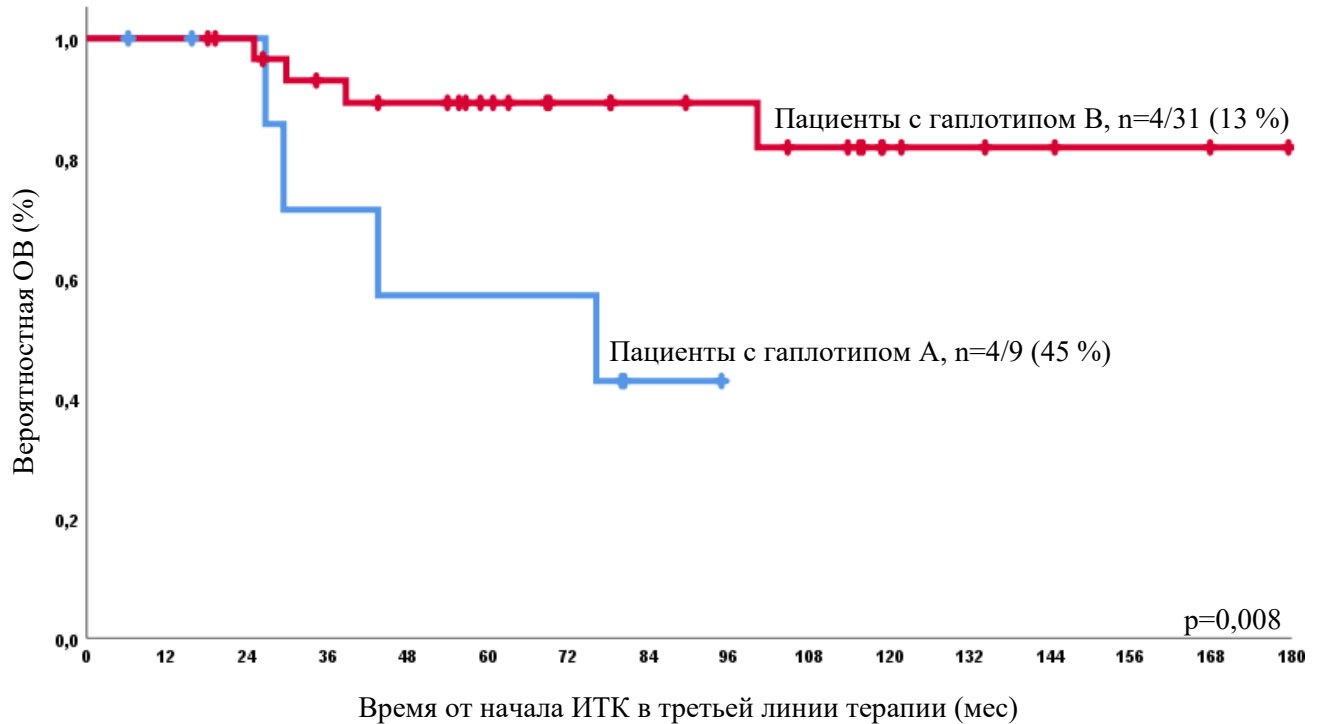


Рисунок 29 – Вероятность ОВ у пациентов с гаплотипом А и гаплотипом В на терапии ИТК 2-го поколения в третьей линии

Медиана ОВ достигнута в подгруппе с гаплотипом Вх и составила 76 (24–159) мес.

Количество прогрессий в подгруппе гаплотипа А 4/4 (100 %), в подгруппе гаплотипа Вх 2/4 (50 %), 2 смерти по другой причине (сердечно-сосудистые заболевания и смерть в результате SARS-CoV-2). Беспрогрессивная выживаемость у пациентов с разными гаплотипами KIR рецепторов представлена на рисунке 30.

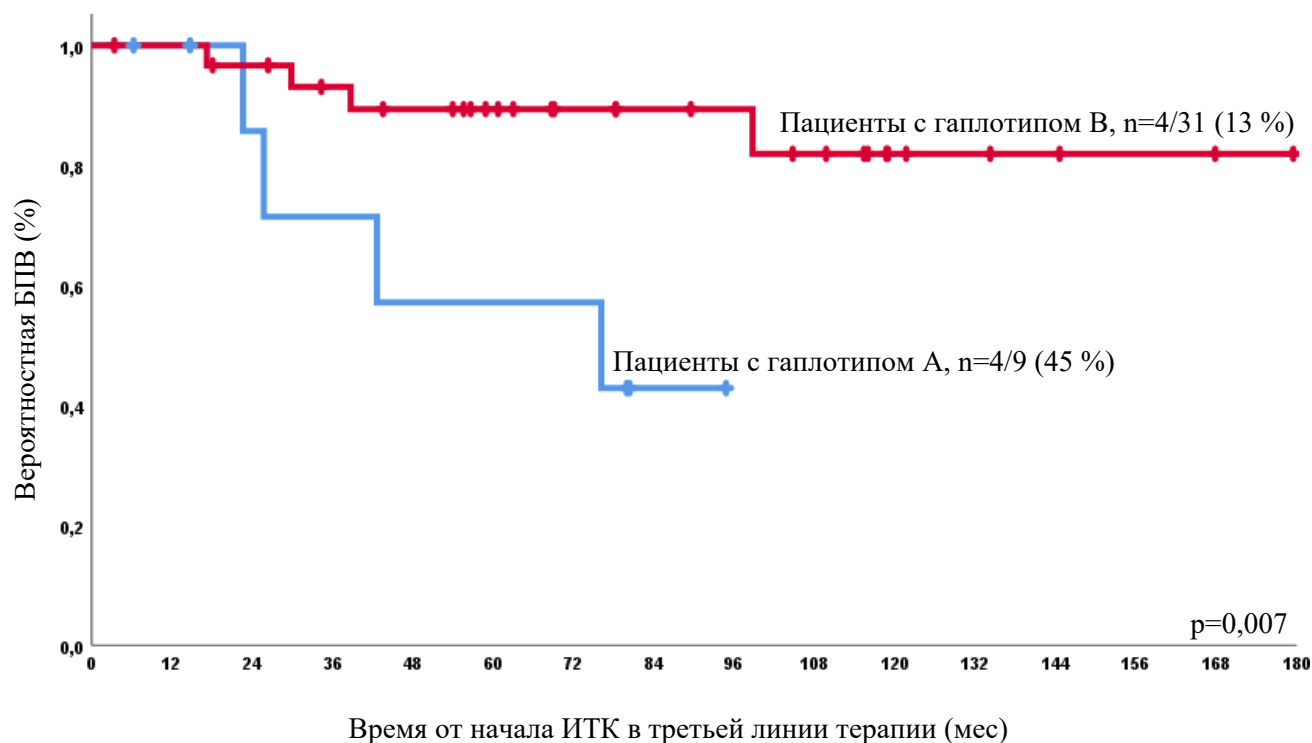


Рисунок 30. Вероятность БПВ у пациентов с гаплотипом А и гаплотипом В на терапии ИТК 2-го поколения в третьей линии.

Медиана БПВ достигнута в подгруппе с гаплотипом А и составила 76 (24–162) мес.

3.6 Оценка статуса пациентов на последнем визите

При медиане времени терапии ИТК в третьей линии 22 (1–153) мес, терапию третьей линии завершили 80/100 (80 %) пациентов во всей группе. Отмена ИТК из-за резистентности, смерти, не связанной с ХМЛ, токсичностью ИТК и ремиссией без лечения произошла в 64/80 (78 %), 5/80 (7 %), 10/80 (13 %) и 1/80 (2 %) случаев соответственно.

Таким образом, 20/100 (20 %) пациентов продолжали ИТК в третьей линии.

Долгосрочные результаты терапии в общей группе представлены на рисунке

31.

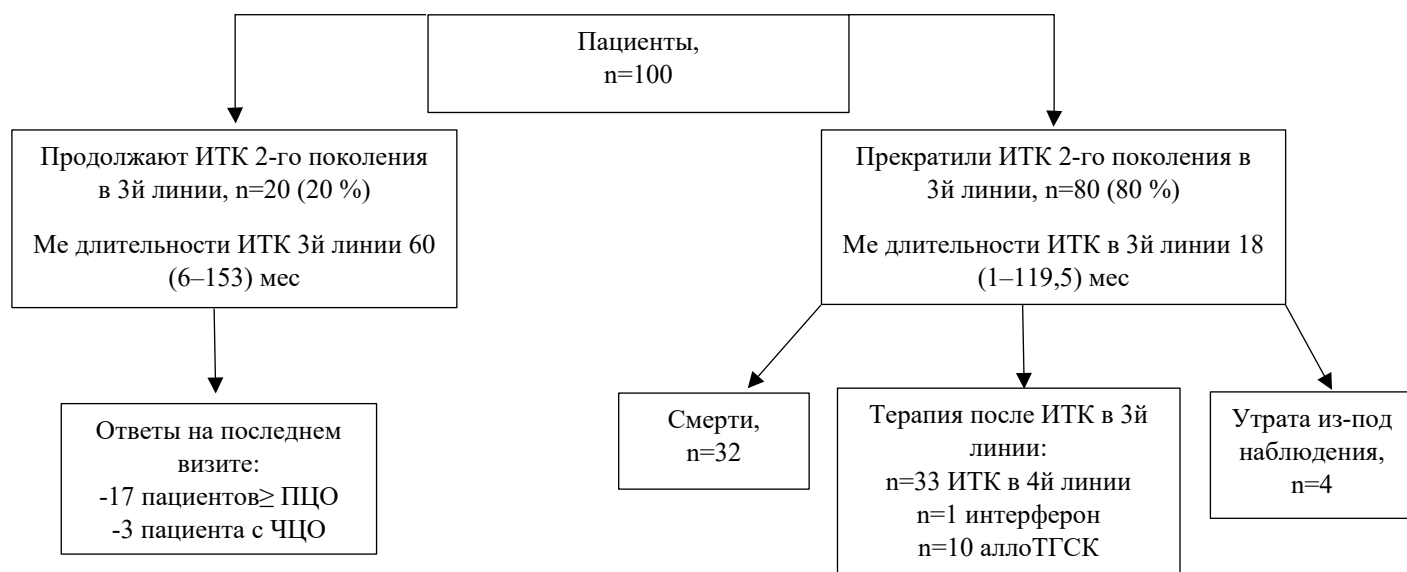


Рисунок 31 – Отдаленные результаты терапии пациентов на последнем визите

На третьей линии терапии ИТК 2-го поколения 35/100 (35 %) пациентов достигли ПЦО/МО2, 18/35 (51 %) из которых прекратили терапию третьей линии. Причинами отмены были следующими: прогрессирование в 1/18 (6 %), смерть по другим причинам (сердечно-сосудистые заболевания) у 1/18 (6 %), ремиссия без терапии у 1/18 (6 %), вторичная молекулярная резистентность в 1/18 (6 %), вторичная цитогенетическая резистентность у 11/18 (61 %) и токсичность у 3/18 (17 %).

На последнем визите, среди пациентов с ПЦО у 16 из 17 (94 %) пациентов наблюдался БМО или лучший молекулярный ответ.

3.7 Алгоритм третьей линии терапии пациентов в хронической фазе ХМЛ

Согласно результатам исследования, как общая, так и беспрогрессивная выживаемость были значимо выше в группе с ПЦО/МО2 на ИТК в третьей линии, нежели пациентов, не достигших данный ответ, 3х-летняя БПВ составила 97 % против 64 % в группах пациентов с и без ПЦО/МО2 на третьей линии ($p=0,000$), 3х-летняя ОВ составила 97 % против 67 % в группах пациентов с и без ПЦО/МО2 на третьей линии ($p=0,000$).

Выявленные в результате однофакторного и многофакторного анализов предикторы достижения ПЦО, как суррогатного маркера ОВ и БПВ, на ИТК 2-го поколения в третьей линии терапии использованы в разработанном алгоритме третьей линии терапии хронической фазы ХМЛ.

В общей группе пациентов, ПЦО достигнут в 35 % случаев при медиане времени до достижения 5 (1–22) месяцев. Наибольшее количество достигнутых ПЦО было зарегистрировано в подгруппе с мин/мЦО и ЧЦО на момент начала третьей линии терапии, в подгруппах с молекулярным ответом ≤ 10 % на момент начала третьей линии терапии, а также у пациентов без клинически значимых мутаций киназного домена гена *BCR::ABL*.

Факторами, значимо влияющими на достижение оптимального ответа в третьей линии терапии являлись: достижение какого-либо цитогенетического ответа на 1й или 2й линиях терапии, $p=0,001$; наличие ПГО перед ИТК в третьей линии, $p=0,001$; наличие какого-либо ЦО перед ИТК в третьей линии терапии, $p<0,001$; молекулярный ответ менее или равно 10% перед ИТК в третьей линии, $p<0,001$; мутационный статус когда-либо до и на момент начала ИТК в третьей линии, $p=0,007$.

Таким образом, представляется возможным отобрать группу пациентов, как для продолжения консервативной терапии, так и для немедленного рассмотрения вопроса о проведении аллоТГСК.

Предложенный алгоритм выбора терапии третьей линии пациентов ХФ ХМЛ представлен на рисунке 32.

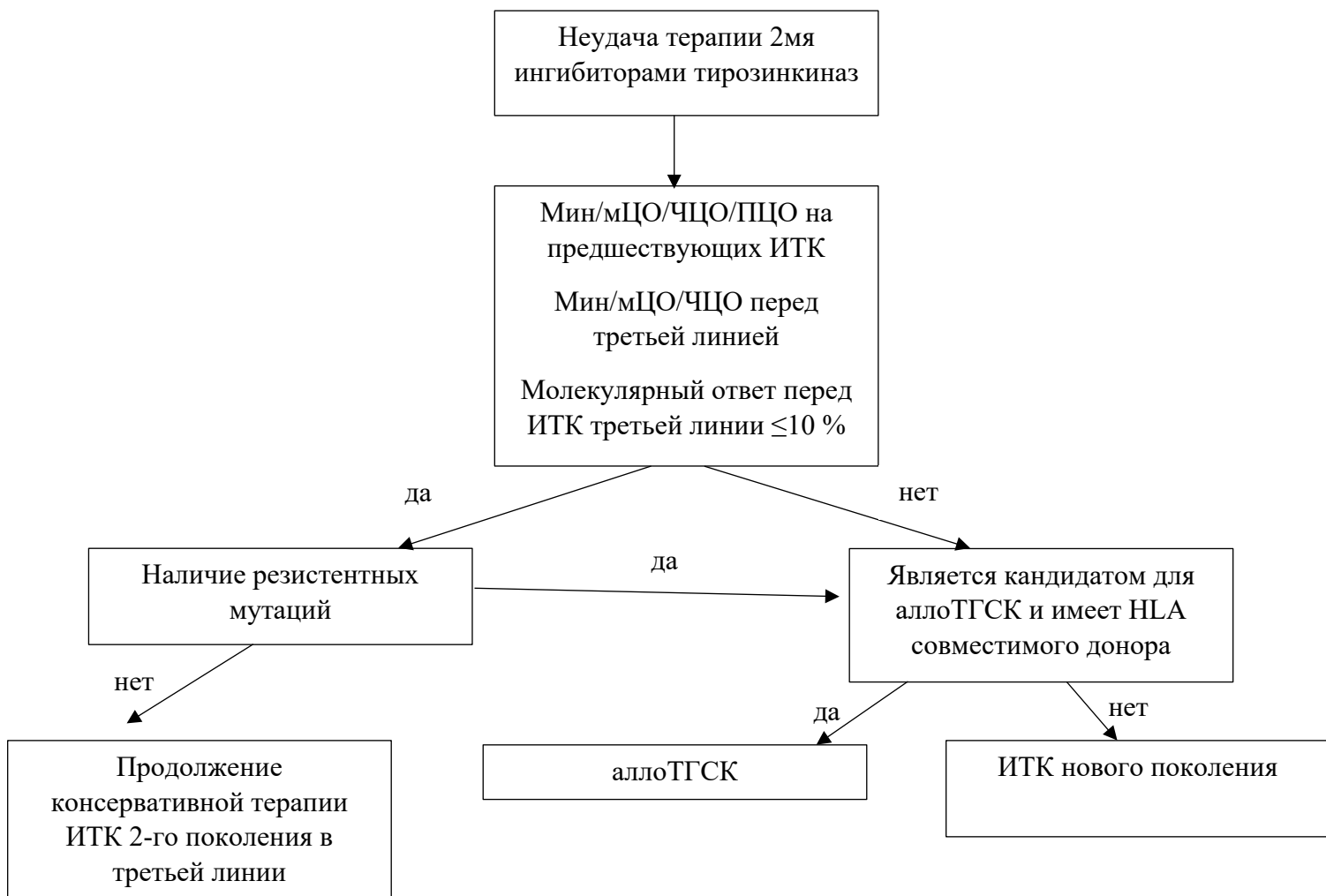


Рисунок 32 – Алгоритм выбора терапии третьей линии пациентов ХФ ХМЛ

Таким образом, при наличии какого-либо цитогенетического ответа на предшествующих линиях терапии, а также с молекулярным ответом $\leq 10\%$, при отсутствии резистентных мутаций, терапия ингибиторами тирозинкиназ 2-го поколения в третьей линии оправдана и может являться эффективной терапевтической тактикой, в случае отсутствия гематологического, цитогенетического ответов, с молекулярным ответом $>10\%$, а также при наличии резистентных мутаций на момент начала третьей линии терапии пациентов следует рассматривать в качестве кандидатов для аллоТГСК или ИТК нового поколения в третьей линии терапии ХФ ХМЛ.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ СОБСТВЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Появление ингибиторов тирозинкиназ существенно изменило показания к аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток в хронической фазе хронического миелоидного лейкоза (ХМЛ). Так, в работе Chalandon Y (2023) было показано отсутствие значимых различий в ОВ, БПВ после аллоТГСК в первой хронической фазе (ХФ1) для пациентов, предлеченных несколькими линиями ИТК и не зависело от поколений ИТК, предшествовавших аллоТГСК. Значимо влияли на данные показатели только: > ХФ1 по сравнению с ХФ1 и индекс Карновского > 80 по сравнению с ≤ 80 . В работе подчеркнута также важность тщательного выбора кандидатов на аллоТГСК [27]. Сложность в принятии решения о выполнении аллоТГСК в первой хронической фазе существует даже при наличии Т315I. Это было показано во многих работах зарубежных и российских авторов [73, 4]. Применение консервативной лекарственной терапии позволяет сохранить контроль над заболеванием, и, следовательно, проведение аллоТГСК в этом случае не является терапией первого выбора [37]. В диссертационном исследовании Ю.Ю. Власовой 5-летняя ОВ в группах аллоТГСК и фармакологической терапии составила 42% ($p=0,7$) [1].

На настоящий момент не вызывает сомнений тактика терапии неудачи или непереносимости ИТК первого поколения иматиниба. Использование ИТК второго поколения во 2-й линии у пациентов с ХФ ХМЛ позволяет достичь отдаленных результатов. Так, 4-летние ОВ и ВБП составили 78 и 57 % соответственно в работе Giles F (2013) [56], а 6-летняя БПВ — 49 % в работе Shah N (2014) [124].

Какие терапевтические опции можно использовать при неудаче двух линий ИТК и чем руководствоваться в данном случае? Существует ли группа пациентов, у которых терапия 3-й линии ИТК оказалась бы достоверно эффективной. С появлением ИТК третьего поколения в реальной практике возможности лекарственной терапии в 3-й линии увеличиваются и данный вопрос будет подниматься все чаще.

Однако, на настоящий момент в большинстве регионов РФ недоступны препараты третьего поколения (понатиниб/асциминиб). Таким образом, результаты нашего исследования могут быть полезны в принятии решения дальнейшей терапевтической тактики.

Эффективность 3-й линии терапии ИТК в нашем исследовании была сопоставима с данными других центров.

Большинство пациентов нашей выборки получали дазатиниб и nilотиниб в качестве ИТК третьей линии. Бозутиниб был препаратом выбора только у 20 % пациентов. В нашей стране препарат был зарегистрирован гораздо позже других ИТК и были доступны для меньшего числа пациентов. Понатиниб на момент сбора данных исследования не был зарегистрирован в РФ.

В исследовании Ломаиа ЕГ (2016) из 53 пациентов, 21 % пациентов с ПЦО на ИТК 2-го поколения в третьей линии ХФ ХМЛ продолжили терапию. 2-летняя ОВ составила 67%. Не было отмечено случаев смерти среди пациентов с БЦО на ИТК в третьей линии [87].

В настоящем исследовании, также достижение ПЦО/МО2 было значимым маркером как для БПВ, так и для ОВ. Среди 35 пациентов с ПЦО только один пациент умер из-за прогрессирования в ФА/БК и еще один пациент умер по причине, не связанной с ХМЛ. Как БПВ, так и ОВ были значимо выше в любой момент времени у пациентов с ПЦО/МО2 на ИТК в третьей линии, нежели без ПЦО/МО2. В этих группах пациентов 5-летняя ВВП и ОВ были 93 % против 52 % и 93 % против 55 % соответственно ($p < 0,05$). По результатам нашего исследования, у 27/100 (27 %) была зарегистрирована прогрессия в продвинутые фазы. Прогрессирование в БК наблюдалось в основном среди пациентов без ПГО на момент инициации терапии [$n=17/35$ (48,5 %)]. Только два случая прогрессии в подгруппе с мин/мЦО [2/16 (12,5 %)]. Прогрессий в подгруппе с ЧЦО на момент инициации третьей линии не отмечено. Аналогичные результаты были показаны Garg R (2009) где прогрессия в ФА/БК была зарегистрирована у 12 из 48 (25 %) пациентов. Среди которых большая часть 8/12 (67 %) не достигла какого-либо цитогенетического ответа [54]. В статье Ribeiro B (2015) среди 18 больных ХФ

ХМЛ только 3/18 (16 %) спродигрессировали в БК на терапии третьей линии [113]. В работе Khan M (2017) показана значимость глубины ответа на предшествующую терапию (ПЦО, БМО) с лучшими показателями ОВ на третьей линии согласно результатам однофакторного анализа, а по результатам многофакторного анализа – только достижение БМО когда-либо до третьей линии играло существенную роль в улучшении кривой ОВ на третьей линии [79].

В нашем исследовании \geq БМО достигнуты у 21/35 (60 %) больных с ПЦО. Все пациенты были живы на момент последнего визита, из продолживших терапию третьей линии у 16 из 17 (94 %) пациентов сохранялся стабильный \geq БМО. Наиболее значимым как для ОВ, так и для БПВ являлся молекулярный ответ на момент инициации терапии третьей линии ≤ 10 %. 5-летняя ОВ была значимо выше в группе пациентов с молекулярным ответом ≤ 10 % по сравнению с подгруппой с молекулярным ответом > 10 %, что составило 93 % vs 60 %.

В работе Ongoren S (2018) сообщено, что больше половины пациентов, получавших ИТК в третьей линии, достигли ПЦО [11/21 (52 %)], и только один пациент утратил ПЦО на терапии третьей линии [1/11 (9 %)] [106].

Достижение ПЦО (МО2) является сильным суррогатным маркером общей выживаемости на ИТК в третьей линии. Какие факторы способствуют его достижению?

Как в однофакторный, так и в многофакторный регрессионный анализ Кокса были включены все факторы, характеризующие пациентов до начала терапии ИТК 2-го поколения в третьей линии, глубина ответа на момент инициации третьей линии, мутационный статус, а также наличие ДХА. В однофакторном анализе наиболее значимыми факторами являлись: достижение ПЦО на 1й линии терапии, $p < 0,001$; достижение какого-либо цитогенетического ответа на ИТК 2й линии, $p = 0,006$; наличие какого-либо ЦО на 1й или 2й линиях терапии, $p = 0,001$; наличие ПГО перед ИТК в третьей линии, $p = 0,001$; наличие какого-либо ЦО перед ИТК в третьей линии терапии, $p < 0,001$; молекулярный ответ менее или равно 10 % на ИТК в третьей линии, $p < 0,001$; мутационный статус когда-либо до и на момент начала ИТК в третьей линии, $p = 0,007$. Однако, в результате многофакторного анализа,

значимость сохранили только два фактора прогноза – цитогенетический ответ до начала ИТК в третьей линии, цитогенетический ответ на первой и второй линиях.

Среди четырех групп пациентов с различными ответами на момент инициации третьей линии, лучшие результаты были достигнуты в группах с каким-либо ЦО. Таким образом, ПЦО/МО2 был достигнут у 24 из 32 (75 %) пациентов с любым уровнем ЦО по сравнению с 11 из 68 (16 %) пациентов без ЦО ($p=0,0001$). Эти результаты были сопоставимы с результатами исследования Ibrahim et al. (2010), в котором показано, что 30-месячная кумулятивная частота достижения ПЦО в подгруппах с ЦО и без него исходно составил 71 % и 0 %, соответственно ($p=0,0005$) [72].

Значение глубины цитогенетического ответа перед терапией третьей линии также оценивалось в исследовании Bosi G. (2019), где среди 13 пациентов с неудачей 2х линий ИТК, 6/13 (46 %) с цитогенетическим ответом на момент начала третьей линии достигли более глубокого цитогенетического ответа и более высокой общей выживаемости на терапии третьей линии [22]. Большая часть пациентов с ПЦО на третьей линии достигли ответа в течение первого года терапии. Вероятность достижения ПЦО (МО2) к 6, 12 и 24 месяцам составила 27 % (ДИ 0,70–0,87), 41 % (ДИ 0,51 – 0,73), 51 % (ДИ 0,38 – 0,64) соответственно.

Предшествующий ЦО являлся наиболее важным прогностическим фактором достижения ПЦО на третьей линии терапии, что также доказывает и Ibrahim A (2010), достижение ПЦО на первых двух линиях ИТК было единственным фактором, влияющим на достижение ответа [72].

Бозутиниб в третьей и четвертой линиях терапии также показал значительную эффективность в подгруппах пациентов с каким-либо цитогенетическим ответом на момент начала бозутиниба. ПЦО достигнут у 94 % (31/33) пациентов с каким-либо ЦО на момент начала терапии бозутинибом, по сравнению с 25 % (7/28) пациентов без какого-либо ЦО на момент начала бозутиниба [53]. В исследовании Russo R. (2013) пациенты, которые достигли ЦО на иматинибе, с низким или промежуточным риском Sokal, имели более высокую вероятность достижения ПЦО на терапии ИТК в третьей линии ($p < 0,001$) [117].

Исходные факторы цитогенетического и молекулярного ответов значимо влияли на БПВ и ОВ. 5-летняя ОВ на терапии третьей линии в общей группе в нашем исследовании составила 68 %. В работе Ribeiro B (2015) более высокая 5-летняя ОВ в ХФ ХМЛ (86 %) [113]. В исследовании Cortes J (2016) 4-летняя ОВ среди пациентов, получавших бозутиниб в третьей линии, была 78% [33].

Мы могли бы предположить, что некоторым пациентам требуется больше времени для достижения ответа на ИТК третьей линии. Это могут быть пациенты с клинически значимыми мутациями гена *BCR::ABL*, особенно мутациями T315I. В нашем исследовании, ПЦО/МО2 достигнут всего у 9/42 (21 %) пациентов с мутациями в сравнении с 22/52 (42 %) у пациентов без мутаций ($p=0,005$). Что говорит о необходимости своевременного определения мутационного статуса и своевременной смены терапии на более чувствительный к данной мутации ИТК.

В проведенном нами исследовании нет данных о значимости количественной характеристики НК клеток, ТНК клеток, НК клеток с ко-экспрессией KIR или NKp46, что подтверждают результаты работы Vinotto G (2014), в которой показаны совершенно разнонаправленные результаты количественной характеристики активирующих и ингибирующих рецепторов НК клеток. Так, у пациентов, предлеченных иматинибом, количество активирующих NKp46 рецепторов экспрессируется значимо больше, нежели в группе пациентов, предлеченных дазатинибом. Наоборот, в группе предлеченных дазатинибом больше экспрессируется ингибирующих KIR рецепторов, кодируемых геном *KIR2DL1*. Однако, ни экспрессия ингибирующих, ни активирующих рецепторов не связана с ответом на терапию [20]. В статье Almeida J (2019) наоборот, показана значимость влияния ТНК клеток у пациентов, получающих ИТК, в основном второго поколения. Снижено количество ТНК клеток, однако повышена в них экспрессия активирующих рецепторов NKp44. Пациенты, достигшие в этом исследовании БМО и глубже показали более низкую экспрессию активирующих ТНК клетки рецепторов, в частности NKp44 [14].

Касаемо гаплотипов KIR рецепторов, в нашем исследовании, у большей части пациентов как с оптимальным ответом на терапию, так и резистентных к

терапии, преобладает гаплотип В, в том числе и среди здоровых доноров. Возможно, данный гаплотип КIR рецепторов распространен среди всего населения России, однако, данного анализа проведено не было. При этом, ОВ и БПВ среди пациентов с гаплотипом Вх была значимо выше, нежели у пациентов с гаплотипом А. Может ли это говорить о неблагоприятном прогнозе гаплотипа А для пациентов ХМЛ? В литературе встречаются несколько иные данные. Так, в статье Nasa G (2013) представлены данные о благоприятном прогнозе гаплотипа А, меньшем количестве ингибирующих КIR рецепторов при достижении БМО [81]. В нашем исследовании, у пациентов, резистентных к терапии, меньшее количество ингибирующих КIR рецепторов. Однако, следует отметить несколько интересных факторов. Есть значимые различия в рецепторном аппарате активирующих аллелей КIR рецепторов *KIR2DS4*, *KIR3DS1* ($p < 0,05$). Также, есть значимые различия в экспрессии ингибирующего аллеля рецептора *KIR3DL2* ($p < 0,05$), значимо больше экспрессии у пациентов с ХМЛ, нежели здоровых доноров. Всего, количество ингибирующих аллелей КIR более 6 наблюдается у здоровых доноров чаще, чем у пациентов с оптимальным ответом и резистентных пациентов ($p < 0,05$).

В литературе встречаются исследования, оценивающие влияние КIR рецепторов на достижение полного молекулярного ответа (БМО и глубже) через 2 года терапии ИТК 2-го поколения в первой линии, оценка производилась в сравнении со здоровыми донорами: *KIR2DL4* ($p = 0,032$); *KIR2DS4* ($p < 0,001$); *KIR3DL1* ($p = 0,003$); и *KIR3DL2* ($p = 0,021$). Повышенная экспрессия данных аллелей была сопряжена с достижением БМО и глубже [130]. В нашем исследовании, пациенты, с повышенной экспрессией аллеля *KIR3DL2*, $n = 36$ достигли ПЦО в 14/36 (38 %), что значимо выше в сравнении с пациентами, не экспрессирующими *KIR3DL2*, $n = 4$, 1/4 (25 %) ($p < 0,05$). Таким образом, значимость экспрессии аллеля *KIR3DL2* может быть обсуждена как фактор благоприятного риска достижения ПЦО/МО2 на ИТК в третьей линии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на успехи в терапии ХМЛ, благодаря появлению ингибиторов тирозинкиназ, около половины пациентов не отвечает на терапию первой линии, еще четверть не отвечает на терапию второй линии. Наиболее очевидными причинами резистентности являются мутации киназного домена гена *BCR::ABL*.

Однако, мутации зарегистрированы лишь у половины резистентных пациентов. Актуальным на настоящий момент является поиск причин ускользания от противоопухолевого иммунного ответа. Основным звеном противоопухолевого иммунного ответа являются НК клетки. Именно их количественные и качественные характеристики мы изучили в своей работе.

Терапевтические опции для пациентов, резистентных к терапии 2х линий или с непереносимостью терапии 2х линий составляют: аллогенную трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток или терапию ингибиторами тирозинкиназ 3го поколения. Однако, на настоящий момент в большинстве регионов РФ недоступны препараты третьего поколения (понатиниб/асциминиб), а выбор кандидата для трансплантации также является очень сложным, связанным с тщательной оценкой риска посттрансплантационной летальности. В случае противопоказаний к проведению аллоТГСК или недоступности ИТК 3го поколения, возможно рассмотрение вопроса о терапии ИТК 2-го поколения в третьей линии.

Данная проблема служит основанием для совершенствования алгоритмов выбора терапии, изучения факторов благоприятного прогноза достижения ПЦО/МО2 на ИТК 2-го поколения в третьей линии терапии, а также изучения НК клеток для разработки принципиально новых молекул, эффективных у резистентных пациентов.

В представленном нами исследовании продемонстрировано, что терапия ингибиторами тирозинкиназ второго поколения в третьей линии может являться терапевтической опцией для пациентов с цитогенетическим ответом когда-либо на первой и/или второй линиях терапии (мин/мЦО, ЧЦО, ПЦО), с цитогенетическим

ответом (мин/мЦО, ЧЦО) перед третьей линией терапии, с молекулярным ответом менее или равно 10 % перед началом третьей линии терапии.

Роль NK-клеточного иммунного ответа в развитии резистентности лейкозного клона не доказана. Статистически значимой разницы в количестве NK, TNK, активирующих и ингибирующих рецепторов NK клеток не отмечено в группах пациентов с оптимальным ответом на ИТК в третьей линии, резистентных к ИТК в третьей линии пациентов, а также здоровых доноров.

На основании результатов представленного исследования, даны характеристики пациентов, для которых терапия ИТК 2-го поколения в третьей линии терапии может обладать высокой эффективностью.

ВЫВОДЫ

1. Частота достижения полного гематологического ответа на ИТК 2-го поколения в третьей линии составила 68,5 %, при медиане времени до достижения 3 (0,5–16) месяца, полного цитогенетического /молекулярного ответа 2 составила 35 %, при медиане времени до достижения 5 (1–22) месяцев, большого молекулярного ответа 21 %, при медиане времени до достижения 9 (3–32) месяцев. Вероятностная 3-летняя общая и беспрогрессивная выживаемость в общей группе составили 77 % и 75 %. Наилучшие результаты общей и беспрогрессивной выживаемости были достигнуты в группе пациентов с полным цитогенетическим ответом на третьей линии терапии и составили 97 %.

2. В характеристике основных звеньев НК-клеточного иммунного ответа не отмечено достоверных различий в группах пациентов с оптимальным ответом, резистентных к терапии третьей линии и здоровых доноров ($p=0,14$).

3. Факторами благоприятного прогноза достижения полного цитогенетического ответа явились: цитогенетический ответ (минимальный/малый, частичный, полный цитогенетические ответы) когда-либо на терапии ингибиторами тирозинкиназ первой и второй линий, цитогенетический ответ (минимальный/малый, частичный цитогенетические ответы) на момент начала третьей линии терапии, молекулярный ответ ≤ 10 % на момент начала третьей линии терапии;

4. Разработан алгоритм третьей линии терапии пациентов в хронической фазе хронического миелоидного лейкоза, основанный на факторах прогноза достижения полного цитогенетического ответа: при наличии какого-либо цитогенетического ответа на предшествующих линиях терапии, а также с молекулярным ответом ≤ 10 %, при отсутствии резистентных мутаций, терапия ингибиторами тирозинкиназ 2-го поколения в третьей линии оправдана и может являться эффективной терапевтической тактикой, в случае отсутствия гематологического, цитогенетического ответов, с молекулярным ответом более 10 %, а также при наличии резистентных мутаций на момент начала третьей линии

терапии пациентов следует рассматривать в качестве кандидатов для аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток или ингибиторов нового поколения в третьей линии терапии хронической фазы хронического миелоидного лейкоза.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

- При выборе терапевтической тактики после неудачи двух линий терапии в хронической фазе хронического миелоидного лейкоза следует, кроме мутационного статуса киназного домена гена *BCR::ABL*, рассмотреть следующие факторы: наличие или отсутствие цитогенетического ответа (минимальный/малый, частичный, полный цитогенетические ответы) на ИТК 1 и/или 2 линий терапии, наличие или отсутствие цитогенетического ответа (минимальный/малый, частичный цитогенетические ответы) перед началом терапии третьей линии, а также молекулярный ответ перед началом терапии третьей линии;
- НК-клеточный иммунный ответ не влиял на достижение полного цитогенетического ответа. Выполнение оценочных тестов НК-клеточного иммунного ответа не оправдано для прогностической оценки эффективности терапии ингибиторами тирозинкиназ в третьей линии;
- При наличии цитогенетического ответа на первой и/или второй линиях терапии, перед третьей линией терапии, а также при молекулярном ответе менее или равно 10 %, терапия ингибиторами тирозинкиназ второго поколения в третьей линии оправдана и может являться эффективной терапевтической тактикой. При отсутствии вышеперечисленных факторов, целесообразно направить пациента на аллогенную трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток или терапию новыми ингибиторами тирозинкиназ.

ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Результаты, полученные в рамках проведенного диссертационного исследования, подчеркивают необходимость продолжения изучения прогностических факторов и систем, учитывающих биологические параметры хронического миелоидного лейкоза, противоопухолевого иммунного ответа и самого пациента с целью совершенствования персонифицированного подхода к терапии третьей и более линий хронической фазы хронического миелоидного лейкоза. Актуальными темами для дальнейшего изучения являются:

1. Сравнение эффективности терапии ингибиторов тирозинкиназ 2-го поколения, асциминиба, понатиниба в третьей линии у пациентов с благоприятными факторами прогноза достижения полного цитогенетического ответа на третьей линии терапии.
2. Сравнение эффективности терапии третьей линии ингибиторами тирозинкиназ 2-го поколения, 3-го поколения и STAMP-ингибитора с аллоТГСК в третьей линии хронической фазы хронического миелоидного лейкоза.
3. Влияние дополнительных хромосомных aberrаций и мутационного статуса киназного домена гена *BCR::ABL* на активность противоопухолевого иммунного ответа, в частности на НК-клеточное звено.
4. Разработка унифицированного алгоритма терапевтической тактики и обследования у пациентов с ХМЛ при неудаче 2х и более линий ингибиторов тирозинкиназ.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АллоТГСК	аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток
БК	бластный криз
БМО	большой молекулярный ответ
ИТК	ингибиторы тирозинкиназ
Мин/мЦО	минимальный и/или малый цитогенетический ответ
ОВ	общая выживаемость
ПМО	полный (глубокий) молекулярный ответ
ПЦО	полный цитогенетический ответ
ФА	фаза акселерации
ХМЛ	хронический миелолейкоз
ХФ	хроническая фаза
ЧЦО	частичный цитогенетический ответ
<i>BCR::ABL</i>	гибридный белок (англ. fusion protein), название образовано слиянием «BCRbreakpoint cluster region» и «ABLAbelson»
ELN	European LeukemiaNet (Европейское сообщество по изучению лейкозов)
KIR	иммуноглобулиноподобные рецепторы киллерных клеток
LIR	лейкоцитарный иммуноглобулиноподобный рецептор
MHC-I	главный комплекс гистосовместимости I класса
NCR	семейство рецепторов естественной цитотоксичности
Ph-хромосома	филадельфийская хромосома

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Власова Ю. Ю. Риск-адаптированная терапия пациентов хроническим миелолейкозом с мутацией T315I: автореф. дис.к-та мед.наук 14.01.21 / Ю. Ю. Власова – Санкт-Петербург, 2018-107 с
2. Лазорко Н. С. Ингибиторы тирозинкиназ второго поколения и их токсичность у больных в хронической фазе хронического миелолейкоза / Н. С. Лазорко, Е. Г. Ломаиа, А. Ю. Зарицкий и др. // Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика. – 2015. – Т. 8. – №. 3. – С. 302-308.
3. Ломаиа Е. Г. Предикторы эффективности третьей линии терапии ингибиторами тирозинкиназ у пациентов с хронической фазой хронического миелоидного лейкоза: результаты многоцентрового исследования / Е. Г. Ломаиа, В. А. Шуваев, Т. В. Читанава и др. // Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика. – 2022. – Т. 15. – №. 3. – С. 271-281.
4. Морозова Е. В. Хронический миелолейкоз: роль аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток в лечении пациентов в эру ингибиторов тирозинкиназ: автореф. дис...д-ра мед. наук, 3.1.28 / Е. В. Морозова – Санкт-Петербург, 2023, 207 с.
5. Туркина А. Г. Асциминиб у больных хроническим миелолейкозом, не имеющих альтернативных методов лечения: результаты исследования в рамках программы расширенного доступа MAP (Managed Access Program, NCT04360005) в России / А. Г. Туркина, Е. А. Кузьмина, Е. Г. Ломаиа и др. // Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика. – 2023. – Т. 16. – №. 1. – С. 54-68.
6. Туркина А. Г. Национальные клинические рекомендации по диагностике и лечению хронического миелоидного лейкоза / Ассоциация содействия развитию гематологии и трансплантологии костного мозга

«Национальное гематологическое общество». – 2020. – URL: https://npngo.ru/biblioteka/klinicheskie_rekomendatsii_2020_god

7. Чельшева Е. Ю. Мутации киназного домена гена BCR-ABL при хроническом миелолейкозе / Е. Ю. Чельшева, О. А. Шухов, О. В. Лазарева и др. // Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика. – 2012. – Т. 5. – №. 1. – С. 13-21.

8. Шуваев В. А. Опыт и перспективы клинического применения бозутиниба у пациентов с хроническим миелолейкозом / 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.

9. Шухов О.А. Молекулярная и цитогенетическая характеристика Ph-позитивного клона у больных хроническим миелоидным лейкозом при длительном воздействии ингибиторов тирозинкиназ: автореф. дис. ... кан. мед.наук/ О.А. Шухов. – М., 2015. – С. 19–21.

10. Abrahamsson A. E. Glycogen synthase kinase 3 β missplicing contributes to leukemia stem cell generation / A. E. Abrahamsson, I. Geron, J. Gotlib et al. // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2009. – Т. 106. – №. 10. – С. 3925-3929.

11. Agarwal A. Effects of plerixafor in combination with BCR-ABL kinase inhibition in a murine model of CML / A. Agarwal, A. G. Fleischman, C. L. Petersen et al. // Blood, The Journal of the American Society of Hematology. – 2012. – Т. 120. – №. 13. – С. 2658-2668.

12. Ahuja H. Alterations in the p53 gene and the clonal evolution of the blast crisis of chronic myelocytic leukemia / H. Ahuja, M. Bar-Eli, S. H. Advani et al. // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1989. – Т. 86. – №. 17. – С. 6783-6787.

13. Ali S. et al. Dasatinib may overcome the negative prognostic impact of KIR2DS1 in newly diagnosed patients with chronic myeloid leukemia / S. Ali, R.

Sergeant, S. G. O'Brien, L. Foroni et al. // *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. – 2012. – T. 120. – №. 3. – C. 697-698.

14. Almeida J. S. NKT-like (CD3⁺ CD56⁺) cells in chronic myeloid leukemia patients treated with tyrosine kinase inhibitors / J. S. Almeida, P. Couceiro, N. López-Sejas et al. // *Frontiers in immunology*. – 2019. – T. 10. – C. 458998.

15. Atallah E. Update on Treatment-Free Remission in CML / E. Atallah // *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia*. – 2021. – T. 21. – C. S156-S157.

16. Atallah E. Matching-adjusted indirect comparison of asciminib versus other treatments in chronic-phase chronic myeloid leukemia after failure of two prior tyrosine kinase inhibitors / E. Atallah, M. J. Mauro, A. Hochhaus et al. // *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. – 2023. – T. 149. – №. 9. – C. 6247-6262

17. Baccarani M. European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013 / M. Baccarani, M. W. Deininger, G. Rosti et al. // *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. – 2013. – T. 122. – №. 6. – C. 872-884.

18. Bachy E. Quantitative and functional analyses of CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ regulatory T cells in chronic phase chronic myeloid leukaemia patients at diagnosis and on imatinib mesylate / E. Bachy, J. Bernaud, P. Roy et al. // *British journal of haematology*. – 2011. – T. 153. – №. 1. – C. 139-143.

19. Bayigga L. High CD56⁺⁺ CD16-natural killer (NK) cells among suboptimal immune responders after four years of suppressive antiretroviral therapy in an African adult HIV treatment cohort / L. Bayigga, R. Nabatanzi, P. N. Sekiziyivu et al. // *BMC immunology*. – 2014. – T. 15. – C. 1-8.

20. Binotto G. Comparative analysis of NK receptor and T-cell receptor repertoires in patients with chronic myeloid leukemia treated with different tyrosine kinase inhibitors / G. Binotto, L. Frison, E. Boscaro et al. // *Blood*. – 2014. – T. 124. – №. 21. – C. 5508.

21. Björklund A. T. NK cells expressing inhibitory KIR for non-self-ligands remain tolerant in HLA-matched sibling stem cell transplantation / A. T. Björklund,

M. Schaffer C. Fauriat et al. // *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. – 2010. – T. 115. – №. 13. – C. 2686-2694.

22. Bontadini A. Distribution of killer cell immunoglobulin-like receptors genes in the Italian Caucasian population / A. Bontadini, M. Testi, M. C. Cuccia et al. // *Journal of Translational Medicine*. – 2006. – T. 4. – C. 1-9.

23. Bosi G. R. What happens to intolerant, relapsed or refractory chronic myeloid leukemia patients without access to clinical trials? / G. R. Bosi, L. M. Fogliatto, T. E. V. Costa et al. // *Hematology, Transfusion and Cell Therapy*. – 2019. – T. 41. – №. 3. – C. 222-228.

24. Bozkurt S. Prognostic importance of additional cytogenetic anomalies in chronic myeloid leukemia / S. Bozkurt, B. Uz, Y. Buyukasik, Y. et al // *Medical oncology*. – 2013. – T. 30. – C. 1-8.

25. Branford S. Integrative genomic analysis reveals cancer-associated mutations at diagnosis of CML in patients with high-risk disease / S. Branford, P. Wang, D. T. Yeung et al. // *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. – 2018. – T. 132. – №. 9. – C. 948-961.

26. Burchert A. Compensatory PI3-kinase/Akt/mTor activation regulates imatinib resistance development / A. Burchert, Y. Wang, D. Cai et al. // *Leukemia*. – 2005. – T. 19. – №. 10. – C. 1774-1782.

27. Cavalcanti G. B. Implications of Gene and p53 Protein Alterations in Determining Progression of Chronic Myeloid Leukemia Phases / G. B Cavalcanti, E. Pereira, M. A. M. Sheiner et al. // *Blood* – 2004 – 4348-4348.

28. Chalandon Y. Allogeneic hematopoietic cell transplantation in patients with CML chronic phase in the era of third generation tyrosine kinase inhibitors: a retrospective study by the Chronic Malignancies Working Party of the EBMT / Y. Chalandon, G. Sbianchi, L. Gras et al. // *American Journal of Hematology*. – 2022.

29. Chen C. I. U. NK cells are dysfunctional in human chronic myelogenous leukemia before and on imatinib treatment and in BCR–ABL-positive mice / C. I. Chen, S. Koschmieder, L. Kerstiens et al. // *Leukemia*. – 2012. – T. 26. – №. 3. – C. 465-474.

30. Chiorean E. G. BCR/ABL alters the function of NK cells and the acquisition of killer immunoglobulin-like receptors (KIRs) / E. G. Chiorean, S. J. Dylla, K. Olsen et al. // *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. – 2003. – T. 101. – №. 9. – C. 3527-3533.
31. Chomel J. C. Leukemic stem cell persistence in chronic myeloid leukemia patients with sustained undetectable molecular residual disease / J. C. Chomel, M. L. Bonnet, N. Sorel et al. // *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. – 2011. – T. 118. – №. 13. – C. 3657-3660.
32. Colicelli J. ABL tyrosine kinases: evolution of function, regulation, and specificity / J. Colicelli // *Science signaling*. – 2010. – T. 3. – №. 139. – C. re6-re6.
33. Corbin A. S. Human chronic myeloid leukemia stem cells are insensitive to imatinib despite inhibition of BCR-ABL activity / A. S. Corbin, A. Agarwal, M. Loriaux et al. // *The Journal of clinical investigation*. – 2011. – T. 121. – №. 1. – C. 396-409.
34. Cortes J. E. Long-term bosutinib for chronic phase chronic myeloid leukemia after failure of imatinib plus dasatinib and/or nilotinib / J. E. Cortes, H. J. Khoury, H. M. Kantarjian et al. // *American journal of hematology*. – 2016. – T. 91. – №. 12. – C. 1206-1214.
35. Cortes J. E. Ponatinib in refractory Philadelphia chromosome-positive leukemias / J. E. Cortes, H. Kantarjian, N. P. Shah et al. // *New England Journal of Medicine*. – 2012. – T. 367. – №. 22. – C. 2075-2088.
36. Cortes J. E. A phase 2 trial of ponatinib in Philadelphia chromosome-positive leukemias / J. E. Cortes, D. W. Kim, J. L. Pinilla-Ibarz et al. // *New England Journal of Medicine*. – 2013. – T. 369. – №. 19. – C. 1783-1796.
37. Cortes J. Third-line therapy for chronic myeloid leukemia: current status and future directions / J. Cortes, F. Lang // *Journal of Hematology & Oncology*. – 2021. – T. 14. – №. 1. – C. 44.
38. Cortes J. E. Ponatinib efficacy and safety in Philadelphia chromosome-positive leukemia: final 5-year results of the phase 2 PACE trial / J. E. Cortes, D. W. Kim, J. L. Pinilla-Ibarz et al. // *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. – 2018. – T. 132. – №. 4. – C. 393-404.

39. Cortes J. E. Prognostic significance of cytogenetic clonal evolution in patients with chronic myelogenous leukemia on imatinib mesylate therapy / J. E. Cortes, M. Talpaz, F. Giles et al. // *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. – 2003. – T. 101. – №. 10. – C. 3794-3800.
40. Corzo C. A. Mechanism regulating reactive oxygen species in tumor-induced myeloid-derived suppressor cells / C. A. Corzo, M. J. Cotter, P. Cheng et al. // *The Journal of Immunology*. – 2009. – T. 182. – №. 9. – C. 5693-5701.
41. Cruz-Munoz M. E. Do NK cells always need a license to kill? / M. E. Cruz-Munoz, A. Veillette // *Nature Immunology*. – 2010. – T. 11. – №. 4. – C. 279-280.
42. D'Antonio J. Chronic myelogenous leukemia / J. D'Antonio // *Clinical Journal of Oncology Nursing*. – 2005. – T. 9. – №. 5. – C. 535.
43. Deininger M. International randomized study of interferon vs STI571 (IRIS) 8-year follow up: sustained survival and low risk for progression or events in patients with newly diagnosed chronic myeloid leukemia in chronic phase (CML-CP) treated with imatinib / M. Deininger, S. G. O'Brien, F. Guilhot et al. // *Blood*. – 2009. – T. 114. – №. 22. – C. 1126.
44. Deininger M. The molecular biology of chronic myeloid leukemia / M. W. Deininger, J. M. Goldman, J. V. Melo et al. // *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. – 2000. – T. 96. – №. 10. – C. 3343-3356.
45. Dhut S. BCR-ABL and BCR proteins: biochemical characterization and localization / S. Dhut, T. Chaplin, B. D. Young // *Leukemia*. – 1990. – T. 4. – №. 11. – C. 745-750.
46. Dierks C. Expansion of Bcr-Abl-positive leukemic stem cells is dependent on Hedgehog pathway activation / C. Dierks, R. Beigi, G. R. Guo et al. // *Cancer cell*. – 2008. – T. 14. – №. 3. – C. 238-249.
47. Dolcetti L. Hierarchy of immunosuppressive strength among myeloid-derived suppressor cell subsets is determined by GM-CSF / L. Dolcetti, E. Peranzoni, S. Ugel et al. // *European journal of immunology*. – 2010. – T. 40. – №. 1. – C. 22-35.
48. Donato N. J. BCR-ABL independence and LYN kinase overexpression in chronic myelogenous leukemia cells selected for resistance to STI571 / N. J. Donato,

J. Y. Wu, J. Stapley et al. // *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. – 2003. – T. 101. – №. 2. – C. 690-698.

49. Ernst J. Mapping and analysis of chromatin state dynamics in nine human cell types / J. Ernst, P. Kheradpour, T. S. Mikkelsen et al. // *Nature*. – 2011. – T. 473. – №. 7345. – C. 43-49.

50. Farag S. S. Natural killer cell receptors: new biology and insights into the graft-versus-leukemia effect / S. S. Farag, T. A. Fehniger, L. Ruggeri et al. // *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. – 2002. – T. 100. – №. 6. – C. 1935-1947.

51. Frutoso M. OMIP-070: NKp46-based 27-color phenotyping to define natural killer cells isolated from human tumor tissues / M. Frutoso, F. Mair, M. Prlic // *Cytometry Part A*. – 2020. – T. 97. – №. 10. – C. 1052-1056.

52. Gabrilovich D. I. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system / D. I. Gabrilovich, S. Nagaraj // *Nature reviews immunology*. – 2009. – T. 9. – №. 3. – C. 162-174.

53. García-Gutiérrez V. Current treatment options for chronic myeloid leukemia patients failing second-generation tyrosine kinase inhibitors / V. García-Gutiérrez, J. C. Hernández-Boluda // *Journal of Clinical Medicine*. – 2020. – T. 9. – №. 7. – C. 2251.

54. García-Gutiérrez V. Safety and efficacy of bosutinib in fourth-line therapy of chronic myeloid leukemia patients / V. García-Gutiérrez, D. Milojkovic, J. C. Hernandez-Boluda et al. // *Annals of Hematology*. – 2019. – T. 98. – C. 321-330.

55. Garg R. J. The use of nilotinib or dasatinib after failure to 2 prior tyrosine kinase inhibitors: long-term follow-up / R. J. Garg, H. Kantarjian, S. O'Brien et al. // *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. – 2009. – T. 114. – №. 20. – C. 4361-4368.

56. Giles F. J. Nilotinib in imatinib-resistant or imatinib-intolerant patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase: 48-month follow-up results of a phase II study / F. J. Giles, P. D. Le Coutre, J. Pinilla-Ibarz et al. // *Leukemia*. – 2013. – T. 27. – №. 1. – C. 107-112.

57. Giles F. J. Nilotinib is active in chronic and accelerated phase chronic myeloid leukemia following failure of imatinib and dasatinib therapy / F. J. Giles, E. Abruzzese, G. Rosti et al. // *Leukemia*. – 2010. – T. 24. – №. 7. – C. 1299-1301.
58. Gioia R. Quantitative phosphoproteomics revealed interplay between Syk and Lyn in the resistance to nilotinib in chronic myeloid leukemia cells / R. Gioia, C. Leroy, C. Drullion et al. // *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. – 2011. – T. 118. – №. 8. – C. 2211-2221.
59. Gorre M. E. Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification / M. E. Gorre, M. Mohammed, K. Ellwood et al. // *Science*. – 2001. – T. 293. – №. 5531. – C. 876-880.
60. Graham S. M. 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, The Journal of the American Society of Hematology*. – 2002. – T. 99. – №. 1. – C. 319-325.
61. Hamilton A. Chronic myeloid leukemia stem cells are not dependent on Bcr-Abl kinase activity for their survival / A. Hamilton, G. V. Helgason, M. Schemionek et al. // *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. – 2012. – T. 119. – №. 6. – C. 1501-1510.
62. Hantschel O. A Myristoyl/phosphotyrosine switch regulates c-Abl / O. Hantschel, B. Nagar, S. Guettler et al. // *Cell*. – 2003. – T. 112. – №. 6. – C. 845-857.
63. Hara R. NKG2D gene polymorphisms are associated with disease control of chronic myeloid leukemia by dasatinib / R. Hara, M. Onizuka, E. Matsusita et al. // *International journal of hematology*. – 2017. – T. 106. – C. 666-674.
64. Hehlmann R. 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. Saubele et al. // *Leukemia*. – 2017. – T. 31. – №. 11. – C. 2398-2406.
65. Hochhaus A. Molecular and chromosomal mechanisms of resistance to imatinib (STI571) therapy / A. Hochhaus, S. Kreil, A. S. Corbin et al. // *Leukemia*. – 2002. – T. 16. – №. 11. – C. 2190-2196;

66. Hochhaus A. European LeukemiaNet 2020 recommendations for treating chronic myeloid leukemia / A. Hochhaus, M. Baccarani, R. T. Silver et al. // *Leukemia*. – 2020. – T. 34. – №. 4. – C. 966-984.

67. Hochhaus A. Nilotinib vs nilotinib plus pegylated interferon α (Peg-IFN) induction and nilotinib or Peg-IFN maintenance therapy for newly diagnosed BCR-ABL1 positive chronic myeloid leukemia patients in chronic phase (TIGER study): the addition of Peg-IFN is associated with higher rates of deep molecular response / A. Hochhaus, A. Burchert, S. Saussele et al. // *Blood*. – 2019. – T. 134. – C. 495.

68. Hochhaus A. Asciminib vs bosutinib in chronic-phase chronic myeloid leukemia previously treated with at least two tyrosine kinase inhibitors: longer-term follow-up of ASCEMBL / A. Hochhaus, D. Réa, C. Boquimpani et al. // *Leukemia*. – 2023. – T. 37. – №. 3. – C. 617-626

69. Hughes T. Asciminib provides durable molecular responses in patients (pts) with chronic myeloid leukemia in chronic phase (CML-CP) with the T315I mutation: updated efficacy and safety data from a phase I trial / T. Hughes, J. E. Cortes, D. Rea et al. // *HemaSphere*. – 2022. – C. 1149-1150.

70. Hughes T. P. Asciminib in chronic myeloid leukemia after ABL kinase inhibitor failure / T. P. Hughes, M. J. Mauro, J. E. Cortes et al. // *New England Journal of Medicine*. – 2019. – T. 381. – №. 24. – C. 2315-2326

71. Iacobucci I. Achieving a major molecular response at the time of a complete cytogenetic response (CCyR) predicts a better duration of CCgR in imatinib-treated chronic myeloid leukemia patients / I. Iacobucci, G. Saglio, G. Rosti et al. // *Clinical Cancer Research*. – 2006. – T. 12. – №. 10. – C. 3037-3042.

72. Ibrahim A. R. Efficacy of tyrosine kinase inhibitors (TKIs) as third-line therapy in patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase who have failed 2 prior lines of TKI therapy / A. R. Ibrahim, C. Paliompeis, M. Bua et al. // *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. – 2010. – T. 116. – №. 25. – C. 5497-5500.

73. Innes A. J. Chronic myeloid leukemia–transplantation in the tyrosine kinase era / A. J. Innes, J. F. Apperley // *Hematology/Oncology Clinics*. – 2014. – T. 28. – №. 6. – C. 1037-1053.
74. Irani Y. D. Successful treatment-free remission in chronic myeloid leukaemia and its association with reduced immune suppressors and increased natural killer cells / Y. D. Irani, A. Hughes, J. Clarkson et al. // *British Journal of Haematology*. – 2020. – T. 191. – №. 3. – C. 433-441.
75. Jabbour E. Frequency and clinical significance of BCR-ABL mutations in patients with chronic myeloid leukemia treated with imatinib mesylate / E. Jabbour, H. Kantarjian, D. Jones et al. // *Leukemia*. – 2006. – T. 20. – №. 10. – C. 1767-1773;
76. Jabbour E. J. The outcomes of patients with chronic myeloid leukemia treated with third-line BCR:: ABL1 tyrosine kinase inhibitors / E. J. Jabbour, K. Sasaki, F. G. Haddad et al. // *American journal of hematology*. – 2023. – T. 98. – №. 4. – C. 658-665
77. Johansson B. Abberant cytogenetic evolution pattern of Philadelphia-positive chronic myeloid leukemia treated with interferon-alpha / B. Johansson, T. Fioretos, R. Billström et al. // *Leukemia*. – 1996. – T. 10. – №. 7. – C. 1134-1138.
78. Kantarjian H. M. Nilotinib is effective in patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase after imatinib resistance or intolerance: 24-month follow-up results / H. M. Kantarjian, F. J. Giles, K. N. Bhalla et al. // *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. – 2011. – T. 117. – №. 4. – C. 1141-1145.
79. Khan M. Response and outcomes of third-line tyrosine kinase inhibitor therapy on patients with chronic phase chronic myeloid leukemia / M. Khan, H. M. Kantarjian, J. Ning et al. // *Blood*. – 2017. – T. 130. – C. 2882.
80. Krause D. S. Requirement for CD44 in homing and engraftment of BCR-ABL–expressing leukemic stem cells / D. S. Krause, K. Lazarides, U. H. von Andrian // *Nature medicine*. – 2006. – T. 12. – №. 10. – C. 1175-1180.
81. La Nasa G. Homozygosity for killer immunoglobulin-like receptor haplotype A predicts complete molecular response to treatment with tyrosine kinase inhibitors in

chronic myeloid leukemia patients / G. La Nasa, G. Caocci, R. Littera et al. // *Experimental hematology*. – 2013. – T. 41. – №. 5. – C. 424-431.

82. Lahaye T. Response and resistance in 300 patients with BCR-ABL–positive leukemias treated with imatinib in a single center: A 4.5-year follow-up / T. Lahaye, B. Riehm, U. Berger // *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*. – 2005. – T. 103. – №. 8. – C. 1659-1669;

83. Laneuville P. Comparative in vitro cellular data alone are insufficient to predict clinical responses and guide the choice of BCR-ABL inhibitor for treating imatinib-resistant chronic myeloid leukemia / P. Laneuville, C. DiLea, O. Q. Yin et al. // *Journal of Clinical Oncology*. – 2010. – T. 28. – №. 11. – C. e169-e171.

84. Lauseker M. Equivalence of BCR-ABL transcript levels with complete cytogenetic remission in patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase / M. Lauseker, B. Hanfstein, C. Haferlach et al. // *Journal of cancer research and clinical oncology*. – 2014. – T. 140. – C. 1965-1969.

85. le Coutre P. Induction of resistance to the Abelson inhibitor STI571 in human leukemic cells through gene amplification / P. le Coutre, E. Tassi, M. Varella-Garcia et al. // *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. – 2000. – T. 95. – №. 5. – C. 1758-1766.

86. Lee H. Target spectrum of the BCR-ABL tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia / H. Lee, I. N. Basso, D. D. H. Kim // *International journal of hematology*. – 2021. – T. 113. – №. 5. – C. 632-641.

87. Lomaia E. Efficacy of tyrosine kinase inhibitors in third line therapy in chronic phase chronic myeloid leukemia / E. Lomaia, A. Zaritskey, V. Shuvaev et al. // *Blood*. – 2015. – 126:4051–1.

88. Lomaia E. Comparative Characteristics of the Effectiveness of Tyrosine Kinase Inhibitors Vs Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation in the Chronic Phase of Chronic Myeloid Leukemia / E. Lomaia, T. Chitanava, Y. Vlasova et al. // *Blood*. – 2022. – T. 140. – №. Supplement 1. – C. 12192-12193.

89. Lugo T. G. Tyrosine kinase activity and transformation potency of BCR-ABL oncogene products / T. G. Lugo, A. M. Pendergast, A. J. Muller et al. // *Science*. – 1990. – T. 247. – №. 4946. – C. 1079-1082.
90. Lussana F. Mechanisms of resistance to targeted therapies in chronic myeloid leukemia / F. Lussana, T. Intermesoli, P. Stefanoni et al. // *Mechanisms of drug resistance in cancer therapy*. – 2018. – C. 231-250.
91. Mahon F. X. Discontinuation of imatinib in patients with chronic myeloid leukaemia who have maintained complete molecular remission for at least 2 years: the prospective, multicentre Stop Imatinib (STIM) trial / F. X. Mahon, D. Réa, J. Guilhot et al. // *The lancet oncology*. – 2010. – T. 11. – №. 11. – C. 1029-1035;
92. Manley P. W. The specificity of asciminib, a potential treatment for chronic myeloid leukemia, as a myristate-pocket binding ABL inhibitor and analysis of its interactions with mutant forms of BCR-ABL1 kinase / P. W. Manley, L. Barys, S. W. Cowan-Jacob // *Leukemia research*. – 2020. – T. 98. – C. 106458.
93. Manley P. W. Extended kinase profile and properties of the protein kinase inhibitor nilotinib / P. W. Manley, P. Drucekes, G. Fendrich et al. // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*. – 2010. – T. 1804. – №. 3. – C. 445-453.
94. Manley P. W. Progress in the Discovery of BCR-ABL Kinase Inhibitors for the Treatment of Leukemia / P. W. Manley, N. J. Stiefl // *Cancer II*. – 2018. – C. 1-37.
95. Marin D. KIR2DS1 genotype predicts for complete cytogenetic response and survival in newly diagnosed chronic myeloid leukemia patients treated with imatinib / D. Marin, I. H. Gabriel, S. Ahmad et al. // *Leukemia*. – 2012. – T. 26. – №. 2. – C. 296-302.
96. Middleton D. The extensive polymorphism of KIR genes / D. Middleton, F. Gonzelez // *Immunology*. – 2010. – T. 129. – №. 1. – C. 8-19.
97. Middleton D. Natural killer cells and their receptors / D. Middleton, M. Curran, L. Maxwell // *Transplant immunology*. – 2002. – T. 10. – №. 2-3. – C. 147-164.

98. Mumprecht S. Programmed death 1 signaling on chronic myeloid leukemia-specific T cells results in T-cell exhaustion and disease progression / S. Mumprecht, C. Schürch, J. Schwaller // *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. – 2009. – T. 114. – №. 8. – C. 1528-1536.
99. Nagar B. Structural basis for the autoinhibition of c-Abl tyrosine kinase / B. Nagar, O. Hantschel, M. A. Young // *Cell*. – 2003. – T. 112. – №. 6. – C. 859-871.
100. Naka K. TGF- β -FOXO signalling maintains leukaemia-initiating cells in chronic myeloid leukaemia / K. Naka, T. Hoshii, T. Muraguchi et al. // *Nature*. – 2010. – T. 463. – №. 7281. – C. 676-680.
101. Nicolini F. E. Expanding Nilotinib Access in Clinical Trials (ENACT) An open-label, multicenter study of oral nilotinib in adult patients with imatinib-resistant or imatinib-intolerant philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leukemia in the chronic phase / F. E. Nicolini, A. Turkina, Z. X. Shen et al. // *Cancer*. – 2012. – T. 118. – №. 1. – C. 118-126.
102. Nicolini F. E. Mutation status and clinical outcome of 89 imatinib mesylate-resistant chronic myelogenous leukemia patients: a retrospective analysis from the French intergroup of CML (Fi (ϕ)-LMC GROUP) / F. E. Nicolini, S. Corm, Q. H. Le et al. // *Leukemia*. – 2006. – T. 20. – №. 6. – C. 1061-1066.
103. Nowell P. C. Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes / P. C. Nowell, D. A. Hungerford // *Journal of the National Cancer Institute*. – 1960. – T. 25. – №. 1. – C. 85-109.
104. O'Hare T. AP24534, a pan-BCR-ABL inhibitor for chronic myeloid leukemia, potently inhibits the T315I mutant and overcomes mutation-based resistance / T. O'Hare, W. C. Shakespeare, X. Zhu et al. // *Cancer cell*. – 2009. – T. 16. – №. 5. – C. 401-412.
105. Oliveira A. A. Atividade antileucêmica das células natural killer (NK) / A. A. Oliveira, H. R. Diamond // *Revista Brasileira de Cancerologia*. – 2008. – T. 54. – №. 3. – C. 297-305.
106. Ongoren S. Third-line treatment with second-generation tyrosine kinase inhibitors (dasatinib or nilotinib) in patients with chronic myeloid leukemia after two

prior TKIs: real-life data on a single center experience along with the review of the literature / S. Ongoren, A. E. Eskazan, V. Suzan et al. // *Hematology*. – 2018. – T. 23. – №. 4. – C. 212-220.

107. Ostrand-Rosenberg S. Myeloid-derived suppressor cells: linking inflammation and cancer / S. Ostrand-Rosenberg, P. Sinha // *The Journal of Immunology*. – 2009. – T. 182. – №. 8. – C. 4499-4506.

108. Pellicano F. The antiproliferative activity of kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia cells is mediated by FOXO transcription factors / F. Pellicano, M. T. Scott, G. V. Helgason et al. // *Stem cells*. – 2014. – T. 32. – №. 9. – C. 2324-2337.

109. Pende D. Identification and molecular characterization of NKp30, a novel triggering receptor involved in natural cytotoxicity mediated by human natural killer cells / D. Pende, S. Parolini, A. Pessino et al. // *The Journal of experimental medicine*. – 1999. – T. 190. – №. 10. – C. 1505-1516.

110. Pessino A. Molecular cloning of NKp46: a novel member of the immunoglobulin superfamily involved in triggering of natural cytotoxicity / A. Pessino, S. Sivori, C. Bottino et al. // *The Journal of experimental medicine*. – 1998. – T. 188. – №. 5. – C. 953-960.

111. Pfirrmann M. Recommendations to meet statistical challenges arising from endpoints beyond overall survival in clinical trials on chronic myeloid leukemia / M. Pfirrmann, A. Hochhaus, M. Lauseker et al. // *Leukemia*. – 2011. – T. 25. – №. 9. – C. 1433-1438.

112. Ratajczak B. The presence of additional cytogenetic aberrations in chronic myeloid leukemia cells at the time of diagnosis or their appearance on tyrosine kinase inhibitor therapy predicts the imatinib treatment failure / B. Ratajczak, A. Przybyłowicz-Chalecka, J. Czerwińska-Rybak et al. // *Leukemia Research*. – 2023. – T. 132. – C. 107349.

113. Reya T. A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells / T. Reya, A. W. Duncan, L. Ailles et al. // *Nature*. – 2003. – T. 423. – №. 6938. – C. 409-414.

114. Ribeiro B. F. Treatment with dasatinib or nilotinib in chronic myeloid leukemia patients who failed to respond to two previously administered tyrosine kinase inhibitors-a single center experience / B. F. Ribeiro, E. Miranda, D. M. D. Albuquerque et al. // *Clinics*. – 2015. – T. 70. – C. 550-555.

115. Rodriguez P. C. Arginase I production in the tumor microenvironment by mature myeloid cells inhibits T-cell receptor expression and antigen-specific T-cell responses / P. C. Rodriguez, D. G. Quiceno, J. Zabaleta et al. // *Cancer research*. – 2004. – T. 64. – №. 16. – C. 5839-5849

116. Rossignol A. Evidence for BCR-ABL-dependent dysfunctions of iNKT cells from chronic myeloid leukemia patients / A. Rossignol, A. Levescot, F. Jacomet et al. // *European Journal of Immunology*. – 2012. – T. 42. – №. 7. – C. 1870-1875.

117. Rossi A. R. Outcome of 82 chronic myeloid leukemia patients treated with nilotinib or dasatinib after failure of two prior tyrosine kinase inhibitors / A. R. Rossi, M. Breccia, E. Abruzzese et al. // *Haematologica*. – 2013. – T. 98. – №. 3. – C. 399.

118. Sanchez-Correa B. Human NK cells in acute myeloid leukaemia patients: analysis of NK cell-activating receptors and their ligands / B. Sanchez-Correa, S. Morgado, I. Gayoso et al. // *Cancer Immunology, Immunotherapy*. – 2011. – T. 60. – C. 1195-1205.

119. Sandoval-Borrego D. Overexpression of CD158 and NKG2A inhibitory receptors and underexpression of NKG2D and NKp46 activating receptors on NK cells in acute myeloid leukemia / D. Sandoval-Borrego, M. C. Moreno-Lafont, E. A. Vazquez-Sanchez et al. // *Archives of medical research*. – 2016. – T. 47. – №. 1. – C. 55-64.

120. Sawyers C. L. Chronic myeloid leukemia / C. L. Sawyers // *New England Journal of Medicine*. – 1999. – T. 340. – №. 17. – C. 1330-1340.

121. Schindler T. Structural mechanism for STI-571 inhibition of abelson tyrosine kinase / T. Schindler, W. Bornmann, P. Pellicena et al. // *Science*. – 2000. – T. 289. – №. 5486. – C. 1938-1942.

122. Schoch C. Occurrence of additional chromosome aberrations in chronic myeloid leukemia patients treated with imatinib mesylate / C. Schoch, T. Haferlach, W. Kern et al. // *Leukemia*. – 2003. – T. 17. – №. 2. – C. 461-463.

123. Schreiber R. D. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion / R. D. Schreiber, L. J. Old, M. J. Smyth et al. // *Science*. – 2011. – T. 331. – №. 6024. – C. 1565-1570.
124. Shah N. P. Long-term outcome with dasatinib after imatinib failure in chronic-phase chronic myeloid leukemia: follow-up of a phase 3 study / N. P. Shah, F. Guilhot, J. E. Cortes et al. // *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. – 2014. – T. 123. – №. 15. – C. 2317-2324.
125. Shah M. Preservation of quiescent chronic myelogenous leukemia stem cells by the bone marrow microenvironment / M. Shah, R. Bhatia // *Biological Mechanisms of Minimal Residual Disease and Systemic Cancer*. – 2018. – C. 97-110.
126. Shindo T. Allelic polymorphisms of KIRs and antitumor immunity against chronic myeloid leukemia / T. Shindo, H. Ureshino, H. Kojima // *Immunological Medicine*. – 2021. – T. 44. – №. 2. – C. 61-68.
127. Shipe M. E. Developing prediction models for clinical use using logistic regression: an overview / M. E. Shipe, S. A. Deppen, F. Farjah et al. // *Journal of thoracic disease*. – 2019. – T. 11. – №. Suppl 4. – C. S574.
128. Soverini S. ABL mutations in late chronic phase chronic myeloid leukemia patients with up-front cytogenetic resistance to imatinib are associated with a greater likelihood of progression to blast crisis and shorter survival: a study by the GIMEMA Working Party on Chronic Myeloid Leukemia / S. Soverini, G. Martinelli, G. Rosti et al. // *Journal of clinical oncology*. – 2005. – T. 23. – №. 18. – C. 4100-4109.
129. Srivastava M. K. Myeloid-derived suppressor cells inhibit T-cell activation by depleting cystine and cysteine / M. K. Srivastava, P. Sinha, V. K. Clements et al. // *Cancer research*. – 2010. – T. 70. – №. 1. – C. 68-77.
130. Tang C. Tyrosine kinase inhibitor resistance in chronic myeloid leukemia cell lines: investigating resistance pathways / C. Tang, L. Schafranek, D. B. Watkins et al. // *Leukemia & lymphoma*. – 2011. – T. 52. – №. 11. – C. 2139-2147.
131. Ureshino H. Allelic polymorphisms of KIR s and HLA s predict favorable responses to tyrosine kinase inhibitors in CML / H. Ureshino, T. Shindo, H. Kojima et al. // *Cancer immunology research*. – 2018. – T. 6. – №. 6. – C. 745-754.

132. Vivier E. Functions of natural killer cells / E. Vivier, E. Tomasello, M. Baratin et al. // *Nature immunology*. – 2008. – T. 9. – №. 5. – C. 503-510.
133. Vivier E. et al. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells / E. Vivier, D. H. Raulet, A. Moretta et al. // *Science*. – 2011. – T. 331. – №. 6013. – C. 44-49.
134. Wang Y. Adaptive secretion of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) mediates imatinib and nilotinib resistance in BCR/ABL+ progenitors via JAK-2/STAT-5 pathway activation / Y. Wang, D. Cai, C. Brendel et al. // *Blood*. – 2007. – T. 109. – №. 5. – C. 2147-2155.
135. Wang W. Risk stratification 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, The Journal of the American Society of Hematology*. – 2016. – T. 127. – №. 22. – C. 2742-2750.
136. Wetzler M. et al. Subcellular localization of Bcr, Abl, and Bcr-Abl proteins in normal and leukemic cells and correlation of expression with myeloid differentiation / M. Wetzler, M. Talpaz, R. A. Van Etten et al. // *The Journal of clinical investigation*. – 1993. – T. 92. – №. 4. – C. 1925-1939.
137. Wu P. FDA-approved small-molecule kinase inhibitors / P. Wu, T. E. Nielsen, M. H. Clausen // *Trends in pharmacological sciences*. – 2015. – T. 36. – №. 7. – C. 422-439.
138. Xu L. P. Allogeneic stem cell transplantation for patients with T315I BCR-ABL mutated chronic myeloid leukemia / L. P. Xu, Z. L. Xu, X. H. Zhang et al. // *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. – 2016. – T. 22. – №. 6. – C. 1080-1086.
139. Yamamoto-Sugitani M. Galectin-3 (Gal-3) induced by leukemia microenvironment promotes drug resistance and bone marrow lodgment in chronic myelogenous leukemia / M. Yamamoto-Sugitani, J. Kuroda, E. Ashihara et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2011. – T. 108. – №. 42. – C. 17468-17473.

140. Zhang B. Altered microenvironmental regulation of leukemic and normal stem cells in chronic myelogenous leukemia / B. Zhang, Y. W. Ho, Q. Huang et al. // *Cancer cell*. – 2012. – T. 21. – №. 4. – C. 577-592.
141. Zhao L. J. Functional features of RUNX1 mutants in acute transformation of chronic myeloid leukemia and their contribution to inducing murine full-blown leukemia / L. J. Zhao, Y. Y. Wang, G. Li et al. // *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. – 2012. – T. 119. – №. 12. – C. 2873-2882.
142. Zipeto M. A. ADAR1 activation drives leukemia stem cell self-renewal by impairing Let-7 biogenesis / M. A. Zipeto, A. Sadarangani, N. P. D. Santos et al. // *Cell stem cell*. – 2016. – T. 19. – №. 2. – C. 177-191.
143. Zipeto M. ADAR1-mediated microRNA regulation and blast crisis leukemia stem cell generation in chronic myeloid leukemia / M. Zipeto, Q. Jiang, L. C. Robertson et al. // *Cancer Research*. – 2014. – T. 74. – №. 19_Supplement. – C. 1912-1912.
144. Zitvogel L. Immunological off-target effects of imatinib / L. Zitvogel, S. Rusakiewicz, B. Routy et al. // *Nature Reviews Clinical Oncology*. – 2016. – T. 13. – №. 7. – C. 431-446.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Приложение А. Критерии ответа на ИТК в качестве второй и более линии терапии

Продолжительность лечения ИТК 2 линии	Характеристика ответа		
	Целевой уровень ответа	Предостережение	Неудача
До лечения		Гематологическая резистентность к иматинибу, цитогенетическая резистентность к ИТК 1 линии, высокий риск	
3 месяца	$BCR::ABL \leq 10\%$ и/или $< 65\%$ (МЦО)	$BCR::ABL > 10\%$ и/или Ph+ 65–95 % (МинЦО)	Отсутствие ПГО или Ph+ >95 % или новые мутации $BCR::ABL$
6 месяцев	$BCR::ABL \leq 10\%$ и/или Ph+	Ph+ 36–65 % (МЦО)	$BCR::ABL > 10\%$ и/или Ph+ >65 % и/или новые мутации $BCR::ABL$
12 месяцев	$BCR::ABL < 1\%$ и/или Ph+ 0 % ПЦО	$BCR::ABL 1–10\%$ и/или Ph+ 1–35 % (ЧЦО)	$BCR::ABL > 10\%$ и/или Ph+ >35 % и/или новые мутации $BCR::ABL$

Продолжение приложения А

Продолжительность лечения ИТК 2 линии	Характеристика ответа		
	Целевой уровень ответа	Предостережение	Неудача
В любое последующее время	<i>BCR::ABL</i> ≤0,1 % (БМО)	ДХА в Ph- клетках: -7 или 7q- или <i>BCR::ABL</i> >0,1 %	потеря ПГО или потеря ПЦО подтвержденная потеря БМО* появление мутаций <i>BCR::ABL</i> ДХА в Ph+ клетках
<p>Сокращения:</p> <p>ИТК – ингибиторы тирозинкиназ</p> <p>ПГО – полный гематологический ответ</p> <p>МинЦО – минимальный цитогенетический ответ Ph-хромосома в 66–95 % метафаз (Ph+ 66–95 %)</p> <p>МЦО – малый цитогенетический ответ Ph-хромосома в 36–65 % метафаз (Ph+ 36–65 %)</p> <p>ЧЦО – частичный цитогенетический ответ Ph-хромосома в 1–35 % метафаз (Ph+ 1–35 %)</p> <p>ПЦО – полный цитогенетический ответ Ph-хромосома в метафазах не определяется (Ph+ 0 %)</p> <p>БМО – большой молекулярный ответ – соотношение <i>BCR::ABL/ABL</i> ≤0,1 % и >0,01 % по международной шкале (IS)</p> <p>ДХА – дополнительные хромосомные aberrации</p> <p>Ph+ – клетки, содержащие филадельфийскую хромосому</p>			

*подтвержденная потеря БМО: уровень *BCR::ABL* >0,1 % в двух и более последовательных анализах, в одном из которых *BCR::ABL* >1 %.

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Приложение Б. Расчет трансплантационного риска по шкале EBMT

Факторы риска	Характеристика факторов риска	Баллы
Возраст	< 20 лет	0
	20–40 лет	1
	> 40 лет	2
Статус заболевания ¹	Ранний	0
	Промежуточный	1
	Развернутый	2
Время от постановки диагноза до ТГСК ²	< 12 мес	0
	> 12 мес	1
Донор	HLA-идентичный сиблинг	0
	Неродственный донор	1
Пол донора и реципиента	Донор–женщина, реципиент–мужчина	1
	Другие сочетания	0

Сокращения:

EBMT – Европейское общество по трансплантации костного мозга (European Group for Blood and Marrow Transplantation)

ТГСК – трансплантация гемопоэтических стволовых клеток

¹ не применяется у пациентов с апластической анемией (АА).

Ранний – острый лейкоз (ОЛ) в первой полной ремиссии (ПР1); миелодиспластический синдром (МДС) в ПР1 или без предшествующего лечения;

ХМЛ в 1-й хронической фазе (ХФ); Неходжкинская лимфома (НХЛ) нелеченая или в ПР1; Множественная миелома (ММ) нелеченая или в ПР1.

Промежуточный – ОЛ во второй полной ремиссии (ПР2); ХМЛ за исключением ХФ 1 и бластного криза (БК); МДС в ПР2 или частичной ремиссии (ЧР); НХЛ в ПР2, ЧР или стабилизация заболевания; ММ в ПР2, ЧР или стабилизация заболевания.

Развернутый – ОЛ в других стадиях кроме ПР1 и ПР2; ХМЛ БК; МДС во всех других стадиях; НХЛ во всех других стадиях; ММ во всех других стадиях.

² НЕ применяется у пациентов в ПР1

Пятилетняя летальность, связанная с трансплантацией, согласно шкале риска EBMT 55% с 6-7 баллами 38-52% с 3-5 баллами и 15-30% от 0 до 2 баллов.

ПРИЛОЖЕНИЕ В

Приложение В. Расчет трансплантационного риска по шкале HCT-CI

Статус	Баллы
Дыхательная система	
ОФВ1 66–80 % или одышка при небольшой физической нагрузке	2
ОФВ1 \leq 65 % или одышка в покое или потребность в кислородной поддержке	3
Сердечно-сосудистая система	
Мерцательная аритмия или трепетание предсердий, синдром слабости синусового узла или желудочковые аритмии	1
Ишемическая болезнь сердца, застойная сердечная недостаточность, инфаркт миокарда или фракция выброса менее 50 %	1
Пороки сердца за исключением пролапса митрального клапана	1
Желудочно-кишечный тракт	
Хронический гепатит, билирубин до 1,5 нормы или АЛТ либо АСТ до 2,5 нормы	1
Цирроз, билирубин более 1,5 нормы или АЛТ либо АСТ более 2,5 нормы	3
Болезнь Крона или язвенный колит	1
Язвенная болезнь, требующая лечения	2
Нарушение обмена	
Сахарный диабет, требующий лечения	1
Индекс массы тела > 35 кг/м ²	1
Неврологический статус	
Транзиторная ишемическая атака или острое нарушение мозгового кровообращения в анамнезе	1
Психический статус	
Депрессия или тревога, требующие консультации психиатра или лечения	1
Мочевыделительная система	
Концентрация креатинина сыворотки > 176 мкмоль/л, диализ или почечный трансплантат	2

Продолжение приложения В

Статус	Баллы
Системные заболевания	
Системная красная волчанка, ревматоидный артрит, полимиозит и другие болезни соединительной ткани, требующие лечения	2
Инфекции	
Инфекционные осложнения, требующие терапии до и после трансплантации	1
Онкологические заболевания	
Любые опухоли в анамнезе, кроме рака кожи (исключая меланому)	3
<p>Сокращения:</p> <p>НСТ-СІ – индекс коморбидности, специфичной для трансплантации гемопоэтических клеток (The Hematopoietic Cell Transplantation-Specific Comorbidity Index)</p> <p>ОФВ1 – объём форсированного выдоха за первую секунду манёвра форсированного выдоха</p> <p>АЛТ – аланинаминотрансфераза</p> <p>АСТ – аспартатаминотрансфераза</p>	

Низкий риск – 0 баллов; промежуточный риск – 1-2 балла; высокий риск – 3-4 балла; крайне высокий – 5 и более баллов.

ПРИЛОЖЕНИЕ Г

Приложение Г. Алгоритм выделения ДНК из периферической крови

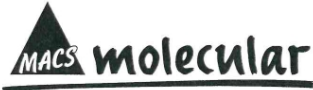
Набор Extract DNABlood от евроген (протокол)
4 пустых пробирки типа эппендорф, по 1,5 мл, а также еще одну пустую пробирку типа эппендорф 1,5 мл (для смеси для лизиса) приготовить
Размораживаем пробирку с кровью пациента, бережно переворачиваем 8-10 раз
В каждую из 4 эппендорфов добавляем 100 мкл размороженной крови пациента
далее готовим смесь для лизиса. В дополнительный эппендорф анести 40 мкл протеиназы К- и 400 мкл лизирующего раствора (примечание: протеиназа К в сухом виде хранится в наборе ровно столько, сколько срок годности набора), в жидком виде на -20 гр С на год, а при +4 гр только месяц.
Если разморозили ту пробирку, которая была на -20, то уже класть обратно на -20 нельзя. Размораживается только 1 раз. Далее только +4 до месяца хранения.
Готовую смесь для лизиса пипетируем и переворачиваем
В каждую из 4 пробирок с кровью внести по 110 мкл смеси для лизиса
Кровь далее перемешиваем, переворачиваем 3-5 раз. а затем 3-5 секунд на вортэксе
Инкубируем в термостате 10 минут при температуре 56 гр С и в течение инкубации перемешиваем 3 раза на вортэксе 3-5 секунд. Между перемешиваниями 3 минуты
В каждую из пробирок вносим по 100 мкл этилового спирта 95%
Перемешиваем на вортэксе 3-5 секунд каждую
В каждую из пробирок внести 400 мкл связывающего раствора М
Сначала переворачиваем 3-5 раз и потом снова вортэксируем
Взяли одну колонку, поместили ее в собирательную пробирку
Вносим в фильтр. колонку 100 мкл (то есть содержимое 1ой пробирки)
Ставим в центрифугу, режим откручивания: 12 тыс оборотов грт, 0,5 мин, температура 20 гр С
Содержимое собирательной пробирки выливаем
Вносим содержимое 2ой пробирки в ту же фильтрующую колонку
Ставим в центрифугу и повторяем пункт 16
Повторить пункты 15 и 16 еще с двумя пробирками

Продолжение приложения Г

Набор Extract DNABlood от евроген (протокол)
После 4й порции мы все выливаем, затем в эту же фильтрующую колонку вносим 700 мкл промывочного раствора
Центрифугируем 0,5 мин. 12 тыс оборотов в мин грм. температура 20 гр С.
То, что отфильтровалось вылить
В эту же пробирку снова внести 700 мкл и отцентрифугировать
Повторить все тоже самое, что и в пункте в 21 и 22 еще 2 раза
Переносим колонку в чистый эппендорф 1,5 мл в открытом виде держим 5 минут при комнатной температуре и выключаем свет в боксе (оторвать крышку от эппендорфа)
Берем элюирующий раствор и ставим в термостат в течение 10 минут при 56 гр С
В высушенную фильтрующую колонку вносим 50 мкл р-ра элюирующего, предварительно прогретого
Центрифугируем 0,5 мин 12 тыс оборотов грм. Температура 20 гр С
Повторяем все тоже самое, что и в п. 28 и 29, только с отфильтрованной жидкостью (не выливаем) еще 5 раз
После этого еще раз откручиваем (уже 1 минуту), уже не переливаем то, что отфильтровали через эту же фильтрующую колонку
Переливаем в новый эппендорф с крышкой
Идем мерить ДНК

ПРИЛОЖЕНИЕ Д

Приложение Д. Бланк оценки гаплотипов KIR рецепторов после электрофореза



Evaluation Form — KIR Typing Kit

Picture of agarose gel

Lot no. _____

Sample ID _____

Operator _____

Date _____

KIR typing results (+/-)

Gel lane	Gene name and allele specificity	Amplicon size (bp)	Plate pos.	Typing 1	Plate pos.	Typing 2	Plate pos.	Typing 3	Plate pos.	Typing 4
1	2DL1 *001-2, *00301, *0030201-2, *00303, *0040101-2, *00402, *005-10	148	A1		A4		A7		A10	
2	2DL2 *00101, *002, *0030101-3, *004-5	145	B1		B4		B7		B10	
3	2DL3 *001-7	161	C1		C4		C7		C10	
4	2DL4 *00101-2, *0010301-2, *00104-5, *00201-2, *003-4, *00501-2, *00601-2, *007, *008010-4, *0080201-2, *009-12	221	D1		D4		D7		D10	
5	2DL5alt; 2DL5A *0010101-2, *00102-5, *0050101-2; 2DL5B *0020101-3, *003-4, *00601-2, *007, *00801-2, *009-11	136	E1		E4		E7		E10	
6	2DL5A *0010101-2, *00103-5 (does not detect *00102, *0050101, *0050102)	DNA: ~1820 RNA: 325 ^f	F1		F4		F7		F10	
7	2DL5B *0020101-3, *003-4, *00601-2, *007, *00801-2, *009-11	DNA: ~1805 RNA: 286 ^f	G1		G4		G7		G10	
8	2DS1 *001, *0020101-3, *00202, *00301-2, *004-8	148	H1		H4		H7		H10	
9	2DS2 *0010101-4, *00102-4, *00103-4, *002-5	177	A2		A5		A8		A11	
10	2DS3 *00101-4, *002, *003N, *004	172	B2		B5		B8		B11	
11	2DS4del *0030101-2, *004-9	204	C2		C5		C8		C11	
12	2DS4ins *0010101-3, *00102-3	209	D2		D5		D8		D11	
13	2DS5 *001, *0020101-3, *003-7, *00801	179	E2		E5		E8		E11	
14	3DL1 *00101-2, *002, *00401-2, *00501-2, *006-9, *01501-2, *016, *01701-2, *018-23, *024N, *025-44, *051-53, *056-57, *059-61	131	F2		F5		F8		F11	
15	3DL2 *00101, *00103, *002, *00301, *004-6, *0070101-2, *008, *00901-2, *010-22	232	G2		G5		G8		G11	
16	3DL3 *00101-3, *00201-7, *0030101-2, *00401-2, *005, *00601-2, *007, *00801-2, *00901-2, *010, *01101-2, *012, *01301-7, *01401-5, *015-31	204	H2		H5		H8		H11	
17	3DS1 *010-12, *01301-2, *014, *045-48, *049N, *050, *055, *058	149	A3		A6		A9		A11	
18	2DP1 *00101-2, *0020101-2, *003	240	B3		B6		B9		B12	
19	3DP1 *001-2, *00301-2, *004-6	237	C3		C6		C9		C12	
20	Genomic DNA control for contamination	260	D3		D6		D9		D12	
21	Positive control (β-actin)	400	E3		E6		E9		E12	
22	Negative control	-	F3		F6		F9		F12	

^f Product size depends on starting material (genomic DNA or RNA/cDNA).

Unless otherwise specifically indicated, all Miltenyi Biotec products and services are for research use only and not for therapeutic and diagnostic use. MACS is a registered trademark of Miltenyi Biotec GmbH. Copyright © 2014 Miltenyi Biotec GmbH. All rights reserved.

L082-100001