

АЗЕРБАЙДЖАНСКАЯ РЕСПУБЛИКА

На правах рукописи

**МОЛЕКУЛЯРНАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ
ГЕНЕТИЧЕСКИХ ВАРИАЦИЙ У БОЛЬНЫХ
ХРОНИЧЕСКИМ МИЕЛОИДНЫМ ЛЕЙКОЗОМ
В АЗЕРБАЙДЖАНЕ**

Специальность: 2409.01 – Генетика

Отрасль науки: Биология

Соискатель: **Керимова Нигяр Илдырым гызы**

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
доктора философии

Баку – 2023

Диссертация выполнена в Институте Генетических Ресурсов при Министерстве Науки и Образования Азербайджанской Республики в лаборатории “Генетики Человека” отдела “Молекулярной генетики и геномики”, в отделе “Медицинской биологии” Эгейского Университета (Измир, Турция) и в НИИ Гематологии и Трансфузиологии Министерства Здравоохранения Азербайджанской Республики.

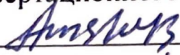
Научные руководители: Доктор философии в медицине, доцент
Асадов Чингиз Дашдемир оглы
Доктор биологических наук, доцент
Акбарова-Бен-Цви Гюнай Хафиз кызы

**Официальные
оппоненты:** Доктор биологических наук, профессор
Алиева Кямила Али Ага кызы
Доктор биологических наук, профессор
Аскерова Тахира Алемшах кызы
Доктор биологических наук, профессор
Гасымов Керим Гули оглы

Диссертационный совет FD 1.37 Высшей Аттестационной Комиссии при Президенте Азербайджанской Республики, действующий на базе Института Генетических Ресурсов Министерства Науки и Образования Азербайджанской Республики

Председатель

диссертационного совета:



Доктор биологических наук, доцент
Аббасов Мехрадж Али оглы

Ученый секретарь

диссертационного совета:



Доктор философии в биологии
Гасанова Саида Гасым кызы

Председатель научного
семинара:



Доктор биологических наук, доцент
Садыгов Гамлет Бэйкиши оглы



ВВЕДЕНИЕ

Актуальность и степень развития темы. Хронический миелоидный лейкоз (ХМЛ) представляет собой пролиферативное заболевание гемопоэтических плюрипотентных стволовых клеток. По оценкам, средняя заболеваемость ХМЛ по всему миру составляет 1,1% (0,7–1,5%)/100 000 случаев в год, статистически это 15-20% всех случаев лейкоза. В Азербайджане, среди всех видов лейкоза частота встречаемости ХМЛ достигает 17% у взрослого населения и 5,2% у детей¹.

Генетическая характеристика ХМЛ определяется наличием реципрокной транслокации $t(9;22)$ с образованием филадельфийской хромосомы (Ph). Многочисленные успешные исследования с использованием цитогенетических и молекулярных методов привели к идентификации генов, участвующих в точках разрыва $t(9; 22)$, *ABL1* и *BCR* соответственно. В результате соединения двух генов, онкоген *BCR-ABL* транскрибируется в химерную информационную РНК (иРНК). Эта иРНК, в свою очередь, транслируется в химерный белок с конститутивной тирозинкиназной активностью, которая активирует пути, связанные с клеточным циклом, и вызывает злокачественную пролиферацию миелоидных клеток.

Ингибиторы тирозинкиназы (ИТК) были специально разработаны для таргетного лечения пациентов ХМЛ, которые направлены на блокирование ферментативного действия *BCR-ABL*. Такое лечение привело к высокой частоте ремиссии и лучшей выживаемости у пациентов с ХМЛ. Первым разрешенным к клиническому применению препаратом из серии ингибиторов тирозинкиназы является иматиниб. Этот препарат до сих пор является "золотым" стандартом первой линии лечения ХМЛ в хронической фазе, благодаря высокой частоте длительного ответа и благоприятному профилю переносимости (низкой токсичности). Однако, к сожалению, нередко наблюдается резистентность к

¹ Əsədov, Z. Azərbaycanca Leykozların Epidemiologiyası / Z.Əsədov, Z.Əlimirzəyeva, A.Kərimov // Xəzər Universitetinin Nəşriyyatı, – 2012. – 183 s.

терапии иматинибом.

Исследование причин резистентности к иматинибу продемонстрировало, что у многих пациентов резистентность развивается через несколько месяцев или лет после начала лечения и обуславливается несколькими механизмами: мутацией либо амплификацией таргетного белка, модификацией лекарственного препарата, а также хромосомными aberrациями. Наиболее частыми из них являются мутации в разных участках гена *BCR-ABL*, кодирующих различные структуры *BCR-ABL*-тирозинкиназы: в каталитическом домене, АТФ-связывающей Р-петле и активирующей фосфорилирование А-петле. В результате точечные мутации нередко меняют ее пространственную конфигурацию, тем самым обрывая связь с лекарственными средств с тирозиновым карманом, провоцируя блокирование захвата АТФ *BCR-ABL*-тирозинкиназой.

Одной из возможных причин резистентности к иматинибу может быть нарушения метаболизма этого препарата в организме пациентов ХМЛ. Известно, что в процессе метаболизма чужеродных для организма химических веществ, в том числе и медикаментов участвуют белки цитохрома Р450 (*CYP*). Однонуклеотидные полиморфизмы (ОНП) в генах *CYP* могут приводить к изменениям активности белков, эффективности лечения, дополнительным побочным эффектам лекарств и даже лекарственным интоксикациям. Среди участвующих в метаболизме иматиниба в печени белков цитохрома Р450 особое значение имеют гены изосемейства *CYP3A*, в особенности *CYP3A4*, *CYP3A5* и *CYP2B6*. В последние годы появляется все больше данных, указывающих на ассоциации мутаций этих генов с риском развития онкологических заболеваний и даже с резистентностью к лечению. Среди них самыми распространенными вариациями являются полиморфизмы *CYP3A4*18*, *CYP3A5*3* и *CYP2B6*6*.

Успехи лечения ХМЛ ингибиторами тирозинкиназы различных поколений привели к тому, что некоторые больные могли обходиться без таргетной терапии. В 2022 году, оценивая терапевтический арсенал специалисты по ХМЛ предоставили

многообещающий прогноз о том, что большинство пациентов с ХМЛ будут обладать нормальной продолжительностью жизни, однако будут излечены функционально, но не молекулярно. Будущие перспективы будут направлены на потенциальное молекулярное излечение от ХМЛ, то есть достижение полной молекулярной ремиссии и ее стойкости после прекращения терапии ИТК².

Объект и предмет исследования. Объектом данного исследования являются пациенты с хроническим миелоидным лейкозом. Предметом исследования является идентификация генетических вариаций, которые могут быть ответственны за развитие болезни, а также за резистентность (первичную или вторичную) ХМЛ больных к терапии ингибитором тирозинкиназы Иматиниб Мезилатом.

Цели и задачи исследования. Целью данного исследования является изучение связи мутаций семейства генов цитохромов P450, участвующих в метаболизме ИТК, с восприимчивостью к ХМЛ и их возможной роли в формировании резистентности к терапии иматинибом, а также изучение мутаций киназного домена BCR-ABL ответственных за резистентность к первой линии лечения ХМЛ.

В задачи данного исследования входило:

1. Изучение распределение полиморфизма *CYP3A5*3* у пациентов с ХМЛ и контрольной группы.
2. Определение частоты полиморфизма *CYP3A4*18* у пациентов с ХМЛ и сравнение полученных результатов с аналогичными данными контрольной группы.
3. Исследование особенностей выявления полиморфизма *CYP2B6*6* у пациентов с ХМЛ по сравнению с результатами, полученными в контрольной группе.
4. Выявление спектра и частоты вариаций участка онкогена *BCR-ABL* кодирующего протеин *BCR-ABL*-тирозинкиназу у

² Carella, A. M. Present results and future perspectives in optimizing chronic myeloid leukemia therapy /M. A.Carella, G.Saglio, X.F.Mahon [et al.] // Haematologica, – 2018. № 6 (103), – p. 928-930.

пациентов с ХМЛ, резистентных к иматинибу.

Методы исследования. Генотипирование полиморфизмов семейства генов цитохромов P450 у пациентов с ХМЛ и контрольной группы было произведено посредством методологии полимеразной цепной реакции-полиморфизма длины рестрикционных фрагментов (ПЦР-ПДРФ). Для получения материала исследования была осуществлена экстракция ДНК с помощью специальных китов для экстракции Qiagen QIAamp DNA Blood Mini (Qiagen, Германия). После успешного проведения полимеразной цепной реакции, для метода ПДРФ были использованы специфичные для каждого полиморфизма энзимы рестрикции (New England Biolabs (NEB), Restriction Enzymes, Массачусетс, США). Полученные результаты были проанализированы путем электрофореза на 3% агарозном геле.

Биостатистический анализ данных был произведен с помощью статистического программного обеспечения SPSS (версия 22, SPSS, Чикаго, Иллинойс, США).

В качестве средства для скрининга мутаций киназного домена *BCR-ABL* был применен метод высоко-производительного секвенирования (пиросеквенирования) Qiagen PyroMark Q24 (Qiagen, Хильден, Германия). Количественная и качественная оценка выявленных клинически значимых вариаций была осуществлена на специализированном программном обеспечении PyroMark Q24 Software 2.0 (Qiagen, Хильден, Германия).

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Полиморфизм гена *CYP3A5*3* у пациентов с ХМЛ ассоциируется с повышенным риском развития ХМЛ.

2. Полиморфизм гена *CYP3A4*18* семейства цитохромов P450 связан с ответом на лечение иматинибом. Следовательно, предварительное генотипирование этого полиморфизма имеет значение для прогнозирования резистентности к терапии этим препаратом.

3. Полиморфизм гена *CYP2B6*6* семейства цитохромов P450 не связан ни с риском развития ХМЛ, ни с ответом на лечение иматинибом.

4. У пациентов с ХМЛ в Азербайджане были выявлены 5

различных видов мутаций в ключевых точках гена *BCR-ABL*; в области Р-петли мутации E255K и Y253H, в контактном сайте связывания вариация T315I и в домене SH2 мутации F359V и V299L.

Научная новизна исследования. Впервые в азербайджанской популяции, был проведен сравнительный анализ частот аллелей и генотипов полиморфизмов семейства генов цитохромов P450 у больных ХМЛ и у здоровых лиц. Выявленные частоты аллелей и генотипов полиморфизмов были проанализированы на наличие ассоциации с демографическими и клиническими параметрами.

Впервые было выявлено влияние полиморфизмов семейства генов цитохромов P450 на течение ХМЛ. Было показано, что распространенный для азербайджанской популяции однонуклеотидный полиморфизм *CYP3A5*3* ассоциируется с риском развития ХМЛ, а полиморфизм *CYP3A4*18* влияет на резистентность к лечению иматинибом.

Впервые был осуществлен детальный мутационный анализ домена киназы *BCR-ABL*, и определены мутации, являющиеся одними из основных причин резистентности к лечению иматинибом у больных ХМЛ в Азербайджане.

Научная и практическая ценность. В данном исследовании были вычислены частоты аллелей и генотипов трех самых распространенных полиморфизмов *CYP3A4*18*, *CYP3A5*3*, *CYP2B6*6*, трех различных генов *CYP3A4*, *CYP3A5*, *CYP2B6* семейства генов цитохромов P450, как у больных ХМЛ, так и у здоровых людей, что внесло свой вклад в расширение эпидемиологических знаний.

Также был проведен детальный сравнительный анализ ассоциаций между данными мутациями и демографическими либо клиническими параметрами, статистические данные, которого выявили группы риска, как для развития заболевания, так и для резистентности к терапии.

Выявленные ассоциации полиморфизмов связанные с риском развития заболевания, могут быть использованы в качестве неинвазивных биомаркеров при раннем прогнозировании риска развития ХМЛ.

Кроме того, анализ и выявление генетических полиморфизмов с использованием высокопроизводительного секвенирования у пациентов резистентных к лечению иматинибом может быть полезным при выборе правильных препаратов и подходящей дозы для пациента, что откроет возможности в применении новых методов лечения и усовершенствованию существующих методик терапии.

Изучение мутаций *BCR-ABL*, а также определение генетических механизмов устойчивости на терапию ингибиторами тирозинкиназы создаст пути для создания индивидуализированной терапии, тем самым улучшит эффективность лечения и значительно повысит выживаемость пациентов.

Апробация. Основные результаты диссертации обсуждались на следующих научных форумах:

- Конференция Юных Ученых и Студентов "Инновации и Глобальные Проблемы в Современной Биологии и Аграрных Науках" посвященная 90-летию юбилею Академика Джалала Алирза оглы Алиева (Баку, 2018).

- X Евразийский Конгресс по Гематологии и Онкологии (Иstanbul, Турция, 2019).

- XXIV Конгресс Европейской Гематологической Ассоциации (Амстердам, Нидерланды, 2019).

- II Международный Конгресс Специалистов Гематологии (Баку, 2022).

- Семинары Института Генетических Ресурсов Министерства Образования и Науки Азербайджана.

Публикации: на тему диссертации было опубликовано 10 научных трудов, из них 6 статей и 4 тезиса.

Название учреждения, где была выполнена диссертация. Диссертация была выполнена в Институте Генетических Ресурсов при Министерстве Науки и Образования Азербайджанской Республики в лаборатории "Генетики Человека" отдела "Молекулярной генетики и геномики", в отделе "Медицинской биологии" Эгейского Университета (Измир, Турция) и в НИИ Гематологии и Трансфузиологии Министерства Здравоохранения Азербайджанской Республики.

Общий объем диссертации с количеством знаков, указывающий на объем структурных разделов диссертации. Диссертация состоит из введения, шести глав, выводов, практических рекомендаций, 159 ссылок списка литературы (155 трудов зарубежных авторов) и списка сокращений. Работа представлена на 157 страницах и содержит 13 рисунков и 26 таблиц.

Количество общих символов в диссертации составляет 203428, из них: титульный лист и оглавление - 5001 символ, введение – 12056 символов, I глава – 66974 символа, II глава – 26744 символа, III глава – 13002 символа, IV глава – 12044 символа, V глава – 9055 символов, VI глава – 21572 символа, выводы – 1592 символа, практических рекомендации – 748 символов, список сокращений – 1138 символов.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В обзоре литературы диссертации была рассмотрена современная литература, касающаяся эпидемиологии, механизмов молекулярно-генетического патогенеза, а также новых методов диагностики и лечения ХМЛ.

ГЛАВА II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Материалы. Пациенты для исследования были набраны из НИИ Гематологии и Трансфузиологии им. Б.Эйвазова. В исследовании приняли участие 153 ХМЛ больных (102 резистентных и 51 не резистентных), которые проходили терапию Иматинибом (ИМ) и 100 человек для контрольной группы.

Все участники исследования принадлежали к азербайджанской этнической группе и проживали в Азербайджане на протяжении трех поколений. Пациенты, которые наряду с ХМЛ имели признаки хронических или острых заболеваний, других видов рака, печеночных или гематологических аномалий, гепатита

В или С или ВИЧ-инфекции в истории болезни - не были включены в исследование.

2.2. Методы. В диссертационной работе использовались такие методы как ДНК и РНК экстракция из периферической крови, спектрофотометрическое измерение качества и количества ДНК, полимеразная цепная реакция - полиморфизм длин рестрикционных фрагментов (ПЦР-ПДРФ), гель-электрофорез, секвенирование по Сенджеру, высокопроизводительное секвенирование (пиросеквенирование), а также ряд методов статистического анализа.

Выделение геномной ДНК проводилось с помощью специального набора для экстракции ДНК, QIAamp DNA Blood Mini (Qiagen, Хильден, Германия) в соответствии с инструкцией производителя. Последующий качественный и количественный анализы полученной ДНК были осуществлены с использованием спектрофотометра NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, Уолтем, Массачусетс, США).

Генотипирование полиморфизмов семейства цитохромов P450 было проведено методом полимеразная цепная реакция - полиморфизм длин рестрикционных фрагментов (ПЦР-ПДРФ), используя специфичные для каждого гена энзимы рестрикции. Для каждого фермента рестрикции имелись оптимальные условия реакции, которые приведены в описании, прилагаемом фирмой-изготовителем (New England Biolabs (NEB), Restriction Enzymes, Массачусетс, США). С помощью гель-электрофореза по длине фрагментов были сделаны умозаключения о наличии распространенных точечных мутаций, *CYP3A5*3*, *CYP3A4*18* и *CYP2B6*6*.

Объектом метода пиросеквенирования в данном исследовании являются 14 распространенных мутаций киназного домена BCR-ABL. Подготовительные процессы секвенирования включали в себя два последовательных этапа полимеразных цепных реакций. Интерпретация результатов исследования осуществлялась посредством программного обеспечения Pyromark Q24 Software 2.0 (Qiagen, Хильден, Германия).

Критерий хи-квадрат (χ^2) и точный критерий Фишера

применены для сравнения частот полиморфных генотипов между резистентными и не резистентными больными. Также была применена бинарная логистическая регрессия для расчета отношения шансов (ОШ) с 95% доверительными интервалами (ДИ). Все статистические тесты были двусторонними; уровень значимости определен как $p < 0,05$. Статистический анализ был выполнен с использованием статистического программного обеспечения SPSS (версия 22, SPSS, Чикаго, Иллинойс, США).

Десять процентов (10%) образцов были отобраны случайным образом для подтверждения полученных результатов путем секвенирования по Сэнджеру (Sanger Sequencing, Applied Biosystems, Массачусетс, США) и высокопроизводительным секвенированием (Next Generation Sequencing, Myseq, Illumina, Сан-Диего, США) (Рисунок 1).

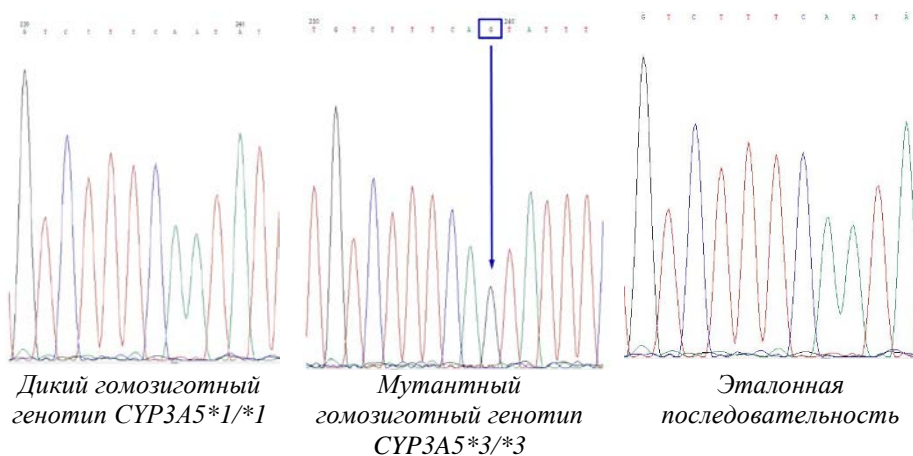


Рисунок 1. Электрофореграмма ПЦР-амплификации аллеля *CYP3A5*3*. Каждый пик представляет один нуклеотид в последовательности ДНК. Как и ожидалось, секвенирование мутантного генотипа (*CYP3A5*3/*3*) выявило замену одного основания аденина на гуанин (A>G) в интроне 3 (рисунок справа), тогда как секвенирование образца с генотипом дикого типа (*CYP3A5*1/*1*) (средний рисунок) совпадающая эталонная последовательность (левый рисунок).

ГЛАВА III. АНАЛИЗ АССОЦИАЦИЙ РАСПРОСТРАНЕННЫХ МУТАЦИЙ ГЕНОВ СЕМЕЙСТВА ЦИТОХРОМОВ P450 С ВОСПРИИМЧИВОСТЬЮ К ХРОНИЧЕСКОМУ МИЕЛОИДНОМУ ЛЕЙКОЗУ

Наиболее значимой частью молекулярного патогенеза хронического миелоидного лейкоза является постепенное накопление генетических модификаций, которые способны изменить активность ферментов, метаболизирующих лекарственные средства. Эти ферменты играют решающую роль в детоксикации ксенобиотиков и биотрансформации лекарственных средств.

Суперсемейство цитохромов P450 является важнейшим комплексом, метаболизирующим медикаменты, который трансформирует лекарства из гидрофобной формы в легко выводимое гидрофильное состояние. Таким образом, изменения в локусах цитохромов могут быть связаны с развитием рака или, наоборот, могут выступать в роли защитника от заболевания, так как участие цитохромов в метаболизме ряда противоопухолевых препаратов является подтвержденным фактом³.

Среди семейств *CYP* члены *CYP3A* в изобилии присутствуют в печени и тонком кишечнике. Метаболизм более 50% современных препаратов, канцерогенов и вредных химических веществ координируется метаболиторами *CYP3A*. У людей, экспрессирующих *CYP3A5*, 50% общего содержания *CYP3A* в печени представлено ферментом *CYP3A5*. *CYP3A4*, в свою очередь, отвечает за 40–45% всей фазы I метаболизма и играет жизненно важную роль в активности *CYP* желудочно-кишечного тракта (до 70%). Таким образом, изоформы *CYP3A5* и *CYP3A4* считаются решающими генетическими факторами

³ Керимова, Н.И. Семейство цитохромов P450: структура, функция и роль в метаболизме лекарственных препаратов // Труды Института Генетических Ресурсов Национальной Академии Наук Азербайджана, – 2022. № 2 (11), – с. 159-170.

межиндивидуальных различий в *CYP3A*-зависимом метаболизме лекарств. Цитохром P450 2B6 является одним из менее изученных изоформ семейства. Ген *CYP2B6* известен своим участием в метаболизме многих препаратов, таких как изофамин, тамоксифен, кетамин, пропофол, иматиниб, эфавиренц и даже несколько канцерогенов⁴.

Для выявления ассоциаций между распространенными полиморфизмами генов семейства цитохромов P450, в частности *CYP3A5*3*, *CYP3A4*18* и *CYP2B6*6*, и восприимчивостью к ХМЛ были успешно набраны сто пятьдесят три (153) случая ХМЛ и сто (100) здоровых добровольцев. По сравнению с другими возрастными группами большинство пациентов наблюдалось в возрастной группе > 40 лет (60%). Среди больных подавляющее большинство находилось в хронической фазе (81%), по сравнению с акселерационной (16%) и фазой бластного криза (3%). Статистически значимой связи между демографическими параметрами (пол, возраст) и происхождением ХМЛ выявлено не было ($p>0,05$).

Также, не наблюдалось статистически значимой связи между однонуклеотидными вариациями и фазой заболевания ($p>0,05$). Важно отметить, кроме того, не было выявлено статически значимых ассоциаций между исследуемыми полиморфизмами и демографическими параметрами (пол, возраст) ($p>0,05$) (Таблица 1).

Данная работа первая и на данный момент единственная, в которой была выявлена связь между распространенными полиморфизмами генов семейства цитохромов P450 и риском ХМЛ в Азербайджане⁵.

⁴ Manikandan, P. Cytochrome P450 Structure, Function and Clinical Significance: A Review / P.Manikandan, S.Nagini // Current Drug Targets, – 2018. № 1 (19), – p. 38-54

⁵ **Karimova, N.** *CYP3A5*3, CYP3A4*18 and CYP2B6*6 genotypes and chronic myeloid leukemia development in Azerbaijan* / N.Karimova, A.Asadov, A.Hasanova [et al.] // Advances in Biology & Earth Sciences, – 2023. 8 (2), – p. 204-215

Таблица 1

Характеристика пациентов исследования

Параметры	Пациенты (n=153), (%)	Контрольная группа (n=100), (%)	Значение параметра Р (χ^2)
Пол			
Мужской	79 (51.6)	46 (46)	$p=0.712$ $\chi^2=0.135$
Женский	74 (48.4)	54 (54)	
Возраст			
<20	7 (4.7)	3 (3)	$p=0.807$
20-40	54 (35.2)	37 (37)	
>40	92 (60.1)	60 (60)	
Фазы ХМЛ			
Хроническая	125 (81)		
Акселерационная	24 (16)		
Бластный криз	4 (3)		

3.1. Выявление ассоциации однонуклеотидного полиморфизма *CYP3A5*3* с предрасположенностью к ХМЛ

В современных исследованиях сообщается о большом количестве функциональных полиморфизмов семейств *CYP3A4* и *CYP3A5*. Однако известно, что среди распространенных точечных мутаций вариант *CYP3A5*3* расположенный в интроне 3 в положении 6986 (A>G, rs776746) является одним из наиболее распространенных полиморфизмов *CYP3A5*. Он создает криптический сайт сплайсинга, что, как предполагается, влияет на экспрессию белка *CYP3A5* и активность фермента.

Анализ частот *CYP3A5*3* в азербайджанской популяции не выявил гомозигот дикого типа *AA* в контрольной группе, в то время как у пациентов с ХМЛ был идентифицирован только один случай генотипа *AA* (0.7%). Частота гетерозиготного генотипа *AG* у контрольной группы составила 5%, тогда как в группе больных носителей генотипа *AG* обнаружено не было. Частоты гомозиготного мутантного генотипа *GG* и мутантного аллеля *G* были значительно повышены у больных (99,3% и 99,3% соответственно) по сравнению с контрольной группой (95% и 97,5%, соответственно). Данные различия являлись статистически значимыми ($p<0,05$).

У индивидуумов с мутантным аллелем *3 был выявлен 4-кратно повышенный риск ХМЛ (95% ДИ: от 0,7683 до 20,8246), однако различия не были статистически значимыми ($p=0,0996$) (Таблица 3.3.1).

Таким образом в данном исследовании была выявлена статистически значимая связь между однонуклеотидным полиморфизмом *CYP3A5**3 и риском развития ХМЛ. Повышение частоты полиморфного аллеля *3 провоцирует более низкую экспрессию *CYP3A5*, что может привести к нарушению механизма детоксикации ксенобиотиков и тем самым стать причиной развития (для сведения, прогрессированием ХМЛ считается переход их хронической фазы в фазу акселерации и далее в фазу бластного криза) заболевания. Кроме того, это может привести к резистентности к терапии, лекарственной токсичности и низкой выживаемости среди пациентов с ХМЛ.

По итогам данного исследования было выявлено, что полиморфизм *CYP3A5**3, являясь распространенной вариацией в азербайджанской популяции, значительно влияет на предрасположенность к развитию ХМЛ, что создает предположения о его роли в качестве генетического маркера риска развития ХМЛ.

3.2. Анализ взаимосвязи однонуклеотидного полиморфизма *CYP3A418 с предрасположенностью к ХМЛ**

Как было отмечено ранее, *CYP3A4* отвечает за метаболизм большого количества ксенобиотиков, а данный механизм включает в себя две основные группы ферментов: *CYP* Р450 фазы I и конъюгирующие ферменты фазы II. Поскольку многие из них кажутся полиморфными, они демонстрируют значительные различия в способности к детоксикации ксенобиотиков и, таким образом, вызывают предположения, связанные с их вкладом в индивидуальную предрасположенность к раку в качестве генетических модификаторов риска злокачественных опухолей *CYP3A4**18 (rs28371759, Leu293Pro) известен как наиболее распространенная аллельная вариация *CYP3A4*. Полиморфизм влияет на двунаправленную активность ферментов. Известно, что

он связан с высоким уровнем тестостерона и хлорпирифоса, но с низким оборотом мидазолама и нифедипина⁶.

По результатам исследования полиморфизма *CYP3A4*18* в Азербайджане, все индивидуумы в контрольной группе были гомозиготными по дикому типу *TT*. Частота гомозиготных генотипов дикого типа *TT* и гетерозиготных *TC* генотипов в группе больных составила 98% и 2% соответственно.

Распространенность аллелей *T* и *C* в группе больных составила 99,9% и 1% соответственно. Статистически значимой разницы между *CYP3A4*18* и восприимчивостью к ХМЛ не наблюдалось ($p=0,159$).

3.3. Выявление влияния однонуклеотидного полиморфизма *CYP2B6*6* на предрасположенность к ХМЛ

Среди полиморфизмов гена *CYP2B6*, *CYP2B6*6* (с.516G> T, rs3745274) является одним из наиболее распространенных генетических изменений, который, как стало известно, снижает печеночную экспрессию мРНК *CYP2B6* и, следовательно, общую ферментативную активность *CYP2B6*. Опираясь на последние источники, мутация ассоциируется со злокачественными опухолями различной локализации, например, с раком молочной железы и острыми лейкозами⁷.

По итогам исследования ассоциации с восприимчивостью к ХМЛ в азербайджанской популяции частота гомозиготного нормального генотипа *GG* *CYP2B6*6* для пациентов и контрольной группы составила 48,4% и 55%, соответственно. Интересно, что результаты продемонстрировали относительно близкие значения для гетерозиготного генотипа *GT* 35,3% среди пациентов и 35% для контрольной группы. Кроме того, частота гомозиготного мутантного генотипа *TT*, а также аллеля *T* была

⁶ Asadov, C. Association of *CYP3A5*3*, *CYP3A4*18* & *CYP2B6*6* polymorphisms with imatinib treatment outcome in Azerbaijani chronic myeloid leukaemia patients / C.Asadov, N.Karimova, A.Hasanova [et al.] // Indian Journal of Medical Research, – 2023. 158(2), – p. 151-160.

⁷ Berküz, M. Association of *CYP2B6* G15631T polymorphism with acute leukemia susceptibility / M,Berküz, S.Yalin // Leukemia Research, 2009. № 7 (33). С. 919–923.

Таблица 2
Частоты генотипов и аллелей ОНП СУР у пациентов и контрольной группы

ОНП, rs номер	Генотип	Частота		Риски	Значение Р	Аллель	Частота аллеля		Риски	Р
		Пациенты	Контрольная группа				Пациенты	Контрольная группа		
CYP3A5*3 rs776746	AA	0,007	0			A	0,07	0,025		
	AG	0	0,5	-		G	0,993	0,975	4 (0,7683– 20,8246)	0,0996
	GG	0,993	0,95	-						
CYP3A4*18 rs28371759	TT	0,98	1			T	0,99	1		
	TC	0,2	0	-		C	0,01	0	--	
	CC	0	0	-						
CYP2B6*6 rs3745274	GG	48,4	0,55			G	0,65	0,725		
	GT	35,3	0,35	1,2019, (0,6921– 2,0873)	0,5137	T	0,35	0,275	1,3573 (0,9188 – 2,005)	0,1249
	TT	16,3	0,1	1,8919 (0,8405– 4,2587)	0,1235					

заметно выше у пациентов с ХМЛ (16,3% и 34% соответственно), чем в контрольной группе (10% и 27,5% соответственно). Тем не менее, различия не были статистически значимыми ($p=0,2910$). Результаты анализа данных, касающихся ассоциации генотипов по отношению к клиническим параметрам, ни одна из переменных не показала значимой связи с *CYP2B6**6.

Хотя ХМЛ пациенты, несущие генотипы *GT* и *TT* и аллель *T*, были связаны со значительно более высоким риском развития хронического миелоидного лейкоза (ОШ 1,2019; 95% ДИ: 0,6921–2,0873, ОШ 1,8919, 95% ДИ: 0,8405–4,2587 и ОШ 1,3573; 95% ДИ: 0,9188–2,0053, соответственно), ассоциация не была статистически значимой (Таблица 2).

Итоги сравнительного анализа данного исследования показали, что несмотря на повышенную частоту мутантного генотипа *TT* у пациентов с ХМЛ, различия не были статистически значимыми.

ГЛАВА IV. ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ СЕМЕЙСТВА ЦИТОХРОМОВ P450 НА ИСХОД ТЕРАПИИ ИМАТИНИБОМ

ИМ был целенаправленно разработан для блокирования роста клеток экспрессирующей химерный ген *BCR-ABL*. Однако его действие было отмечено и в блокировании клеток рецептора фактора стволовых клеток тирозинкиназы *c-kit* и даже тромбоцитарного фактора роста. Введение данного препарата изменило естественное течение ХМЛ лечения.

Тем не менее, несмотря на то что иматиниб является золотым стандартом лечения заболевания, у некоторых пациентов развивается резистентность, что представляет серьезную клиническую проблему. Недавние исследования показывают, что более 25% пациентов с ХМЛ могут проявить резистентность к ИМ по крайней мере один раз в течение жизни. Среди основных причин резистентности наряду с такими механизмами как мутации или амплификация киназного домена *BCR-ABL*, активация гена множественной лекарственной

устойчивости 1 (*MDR-1*) либо генетические изменения ферментов, все чаще упоминается семейство цитохромов P450 по причине участия в метаболизме ИМ.

Данный сложный комплекс катализирует большинство реакции метаболизма лекарств, синтез холестерина, стероидов и других липидов. Фермент *CYP3A* обладает высокой степенью индукции и играет важную роль в метаболизме лекарственных средств в печени и желудочно-кишечном тракте⁸.

Следовательно, важно отметить, что ИМ в основном метаболизируется такими ферментами как *CYP3A5*, *CYP3A4*, *CYP2C9*, *CYP2B6* и *CYP1A2*. Таким образом, генетическая изменчивость среди пациентов может объяснить различия в биодоступности ИМ, влияющие на внутриклеточные и плазменные уровни, и в конечном итоге, на терапевтический ответ.

В этом исследовании связи между ответом на терапию ИМ и демографическими параметрами, такими как пол и возраст статистических значимых ассоциаций выявлено не было. Что касается клинических параметров, параметр фаз ХМЛ достоверно коррелировал с ответом на терапию ИМ ($p=0,04$).

Благодаря данному исследованию, было определено влияние распространенных однонуклеотидных полиморфизмов семейства цитохромов P450, *CYP3A5*3* (G6986A), *CYP3A4*18* (C878T) и *CYP2B6*6* (G15631T) на резистентность к терапии ИМ у больных ХМЛ в Азербайджане (Таблица 3)⁹.

⁸ Pena, M. Effect of Cytochrome P450 and ABCB1 Polymorphisms on Imatinib Pharmacokinetics After Single-Dose Administration to Healthy Subjects / M.Pena, J. Muriel, M.Saiz-Rodriguez [et al.] // Clinical Drug Investigation, – 2020. № 7 (40), – p. 617-628.

⁹ Asadov, A. Association of *CYP3A5*3*, *CYP3A4*18*, and *CYP2B6*6* Polymorphisms with Imatinib Treatment Outcome in Azerbaijani Chronic Myeloid Leukemia Patients / C.Asadov, **N.Karimova**, A.Hasanova [et al.] // Indian Journal of Medical Research, – 2023. 158 (2), – p. 151-160.

4.1. Связь между резистентностью к лечению иматинибом и однонуклеотидными полиморфизмами *CYP3A5*3* и *CYP3A4*18*

*CYP3A5*3* (A6986G, rs776746), являясь самым распространенным вариантом изоформы *CYP3A5*, играет важную роль в дефектах сплайсинга. Также важной распространенной вариацией является *CYP3A4*18* (rs28371759), которая включает в себя замену тимина (T) на цитозин (C) в положении 878 и отражается на энзиматической активности *CYP3A4*.

Важно отметить, что данные этой работы выявили значительное влияние полиморфизма *CYP3A4*18* на ответ лечения ИМ ($p=0,013$) (Таблица 3).

Таблица 3
Частоты генотипов и аллелей ОНП *CYP* у пациентов и контрольной группы

ОНП		Частота (%)		Значение P, (χ^2)
		ИМ не резистентные n= 51 (%)	ИМ резистентные n= 102 (%)	
<i>CYP3A5*3</i> (rs776746)	Генотип			p=0,478
	AA	0 (0)	1 (0,98)	
	AG	0 (0)	0 (0)	
	GG	51 (100)	101 (99,02)	p=0,316
	Аллель			
	A	0 (0)	2 (0,98)	
<i>CYP3A4*18</i> (rs28371759)	Генотип			p=0,013
	TT	48 (94.12)	102 (100)	
	TC	3 (5.88)	0 (0)	
	CC	0 (0)	0 (0)	p=0,036
	Аллель			
	T	99 (97.1)	204 (100)	
<i>CYP2B6*6</i> (rs3745274)	Генотип			p=0,737 ($\chi^2=0,610$)
	GG	24 (47.06)	50 (49.02)	
	GT	17 (33.33)	37 (36.27)	
	TT	10 (19.61)	15 (14.71)	p=0,609 ($\chi^2=0,357$)
	Аллель			
	G	65 (63.7)	137 (67.1)	
	T	37 (36.3)	67 (32.9)	

В этом исследовании частоты аллелей *CYP3A5*3*, *CYP3A4*18* составили 99,3% и 1%, соответственно. Между двумя группами пациентов частота аллеля *CYP3A5*3* (100%) не была выше среди нерезистентных больных по сравнению с резистентными (99,02%). Напротив, частота аллеля *CYP3A4*18* была значительно выше у резистентных (100%) по сравнению с нерезистентными (97,1%) ($p=0,036$).

Интересно, что для полиморфизма *CYP3A5*3* большинство больных (99,93%) в обеих группах оказались гомозиготными мутантами *GG*, и только один пациент был идентифицирован как дикий тип *AA*. Частота генотипа **3/*3* у не резистентных (100%) не сильно отличалась от таковой у нечувствительных к лечению больных (99,02%). Между тем, анализ не выявил гомозиготного мутантного генотипа *CC* по *CYP3A4*18*. Частота встречаемости гомозиготного генотипа дикого типа *TT* была значительно ниже ($p=0,013$) среди не резистентных пациентов (94,12%) по сравнению с резистентными (100%). Однако частота гетерозиготного генотипа *TC* была заметно выше у больных, ответивших на ИМ терапию (5,88% в сравнении с 0%).

Кроме того, была оценена взаимосвязь полиморфизмов с эпидемиологическими и клиническими параметрами больных ХМЛ. По итогам анализа статистически значимых различий между полиморфизмами *CYP3A5*3* и *CYP3A4*18* и возрастом, полом или фазами ХМЛ не наблюдалось.

Результаты данного исследования не продемонстрировали статистически значимые различия между *CYP3A5*3* и ответом на ИМ у пациентов с ХМЛ.

В этом исследовании было показано, что *CYP3A4*18* существенно влияет на терапию ИМ ($p=0,013$). Данный результат является предварительным доказательством того, что предтерапевтическое генотипирование *CYP3A4*18* может помочь предположить терапевтический ответ на лечение ИМ у пациентов с ХМЛ.

4.2. Оценка влияния однонуклеотидного полиморфизма *CYP2B6*6* на результаты терапии иматинибом

Являясь одним из наиболее полиморфных генов *CYP* у человека, ген *CYP2B6*, располагаясь на хромосоме 19q13.2, влияет на регуляцию транскрипции, сплайсинг, экспрессию мРНК и белков, а также на общую каталитическую активность. Распространенный вариант *CYP2B6*6* (Q172H) приводит к сложным взаимодействиям между зависимыми и независимыми от субстрата механизмами. Частоты *G15631T* (rs3745274) варьируют от 15 до 60% в разных популяциях.

Исследование продемонстрировало, что частота аллеля *CYP2B6*6* среди ХМЛ больных в Азербайджане составила 34%. Хотя аллельная частота полиморфизма *CYP2B6*6* у не резистентной группы больных была выше (36,3%), чем в резистентной (32,9%), данная разница не оказалась статистически значимой.

Интересно, что для *CYP2B6* генотипические частоты всех трех типов наследования (*GG*, *GT*, *TT*) были повышены у резистентных больных по сравнению не резистентными; тем не менее, разница не была статистически значимой.

Результаты бинарной логистической регрессии показали, что носители гетерозиготного *GT* генотипа *CYP2B6*6* демонстрируют более высокий риск приобретения резистентности (ОШ 1,04; 95% ДИ: 0,492–2,218), тогда как гомозиготный мутантный генотип *TT* демонстрировал более низкий риск невосприимчивости к препарату (ОШ 0,72; 95 % ДИ: 0,283–1,836), однако ассоциации не были статистически значимыми ($p=0,909$ и $p=0,491$ соответственно).

Статистически значимых различий между *CYP2B6*6* и демографическими и клиническими параметрами больных ХМЛ выявлено не было.

ГЛАВА V. РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ЧАСТОТ ГЕНОТИПОВ И АЛЛЕЛЕЙ ПОЛИМОРФИЗМОВ СЕМЕЙСТВА ГЕНОВ ЦИТОХРОМОВ P450 У КОНТРОЛЬНОЙ ГРУППЫ

В предыдущих главах подробно описана основная функция, а также вытекающая из нее роль семейства цитохромов P450 в организме человека. Активность ферментов *CYP3A* и *CYP2B* резко варьирует, обладая индивидуальным характером. Данная изменчивость влияет на эффективность и безопасность всех медикаментов, субстратом которых являются *CYP3A* и *CYP2B*.

Опираясь на все вышеперечисленные данные, определение частот вариантов генов цитохромов P450 является важным параметром в дальнейших фармакогенетических исследованиях и разработке новых методов индивидуализированной терапии.

5.1. Анализ распределения частот генотипов и аллелей полиморфизма *CYP3A5*3* у контрольной группы

Были проанализированы 100 образцов ДНК и определены частоты генотипов и аллелей *CYP3A5*3* методом ПЦР-ПДРФ. Частота аллеля *3 составила 0,975 (95 из 100), частота аллеля *1 – 0,025 (5 из 100). Частота гетерозиготных (*CYP3A5*1/*3*) и мутантных гомозиготных (*CYP3A5*3/*3*) генотипов составила 0,05 (5/100) и 0,95 (95/100) соответственно. *CYP3A5*1/*1* не был выявлен ни у одного азербайджанца¹⁰.

Данные значения соответствовали предсказаниям равновесия Харди-Вайнберга.

5.2. Изучение распределения частот генотипов и аллелей полиморфизма *CYP3A4*18* у здоровых добровольцев

В Азербайджане данный полиморфизм рассматривается впервые. В результате изучения распределения частот аллелей и генотипов ОНП *CYP3A4*18* среди здорового населения было выяснено, что все добровольцы (100/100) обладали диким типом по аллелю *CYP3A4*18*.

¹⁰ Karimova, N. Preliminary study of *CYP3A4*18* and *CYP3A5*3* single nucleotide polymorphisms in an Azerbaijani population / N.Karimova, A.Hasanova, B.Bayramov // Polymorphism, – 2022. № 8, – p. 1-10.

5.3. Исследование распределения частот генотипов и аллелей полиморфизма *CYP2B6*6* у контрольной группы

В исследовании были задействованы образцы ДНК ста здоровых азербайджанских добровольцев. Частота аллеля *6 составила 0,275, частота аллеля *1 – 0,725. Частоты гомозиготного (*CYP2B6*1/*1*), гетерозиготного (*CYP2B6*1/*6*) и мутантного гомозиготного (*CYP2B6*6/*6*) генотипов составляли 0,55, 0,35, и 0,1 соответственно.

Результаты этого исследования призваны способствовать улучшению менеджмента индивидуализированной терапии в Азербайджане¹¹.

ГЛАВА VI. ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОЕ СЕКВЕНИРОВАНИЕ РАСПРОСТРАНЕННЫХ МУТАЦИЙ КИНАЗНОГО ДОМЕНА *BCR-ABL*

ИТК связывают и подавляют активность киназного домена *ABL1*, и среди них иматиниб занимает особое место. ИМ значительно подавляет лейкоэмические клоны без типичной токсичности и по данной причине является общепризнанной терапией при ХМЛ. Однако, несмотря на превосходные первоначальные результаты, у некоторой группы пациентов впоследствии возникает вторичная (приобретенная) резистентность к иматинибу, о чем свидетельствует потеря их полного цитогенетического ответа. Среди пациентов с вторичной резистентностью к иматинибу у половины наблюдаются приобретенные мутации в киназном домене *BCR-ABL1*, которые нарушают связывание иматиниба с его мишенью. В настоящее время были идентифицированы более 100 мутаций в домене тирозинкиназы *BCR-ABL1*¹².

Данное исследование включает в себя скрининг 14 самых

¹¹ Karimova, N. CYP2B6 single nucleotide polymorphisms in an Azerbaijani population // Georgian Medical News, – 2022. 330, – p. 90-93.

¹² Loscocco, F. BCR-ABL Independent Mechanisms of Resistance in Chronic Myeloid Leukemia / F.Loscocco, G.Visani, S.Galimberti [et al.] // Frontiers in Oncology, – 2019. (9), – p. 939.

распространенных вариаций киназного домена у 48 ХМЛ больных резистентных к терапии Иматиниб Мезилатом. Чувствительность теста составила 5%, что схоже с другими исследованиями методом пиросеквенирования¹³ (Рисунок 2).

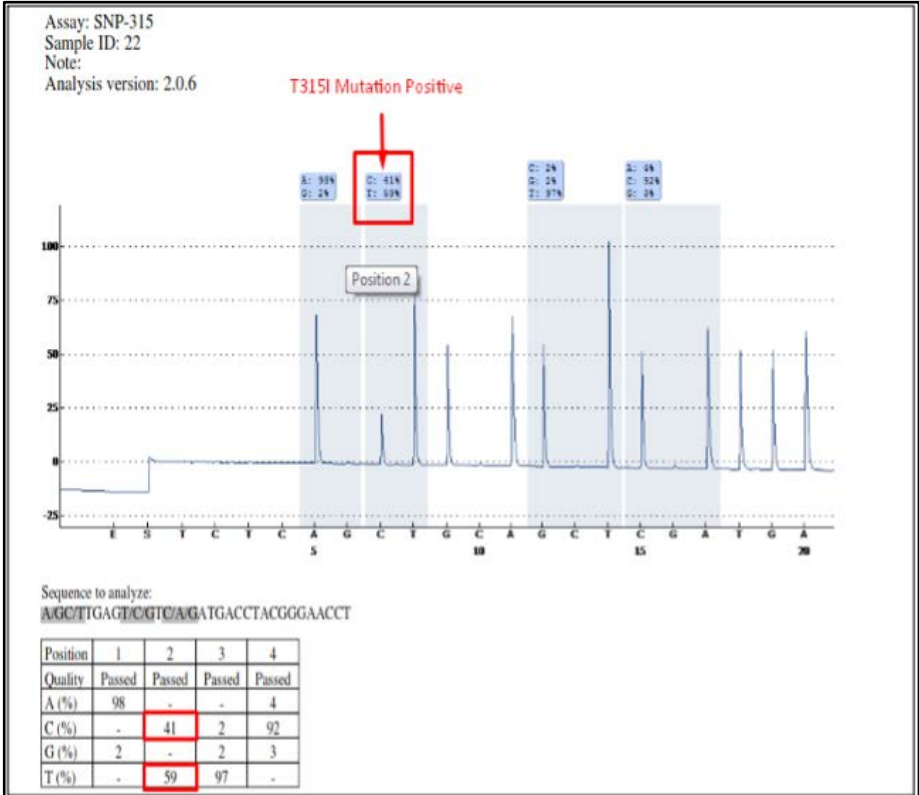


Рисунок 2. Пайрограмма, демонстрирующая обнаружение мутации T315I у больного номер 22

¹³ Schumacher, J. A pyrosequencing-based test for detection and relative quantification of the BCR-ABL1 T315I point mutation / J.Schumacher, P.Szankasi, D.Bahler [et al.] // Journal of Clinical Pathology, – 2011. № 7 (64), p. 618-625.

6.1. Анализ мутаций

В общей сложности 48 пациентов прошли анализ мутации *BCR-ABL1*, и только у 6 (12,5%) были обнаружены 5 различных вариаций киназного домена (Рисунок 3).

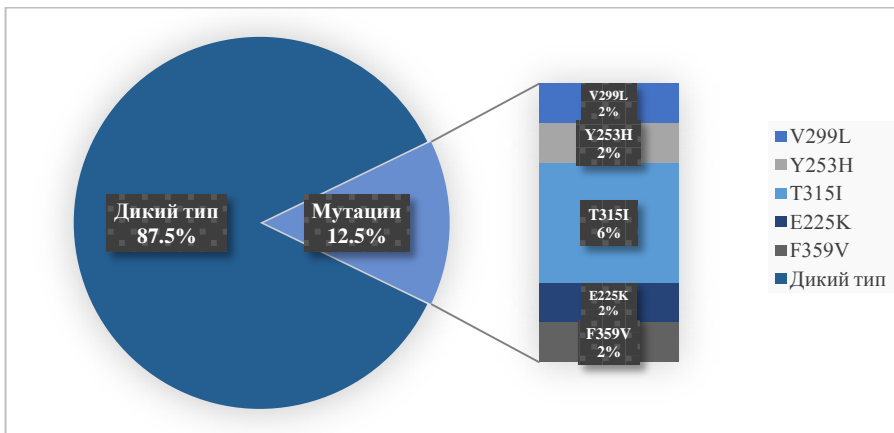


Рисунок 3. Анализ мутаций *BCR-ABL* в цифрах

Мутации, которые произошли в области Р-петли, включали вариации E255K и Y253H, что составляет 33,32% мутаций, выявленных в данном исследовании (Таблица 4). Доля мутаций в контактном сайте связывания (T315I) и домене SH2 (F359V) составляют 33,32% и 16,67%, соответственно.

Один пациент оказался носителем различных типов мутаций киназного домена (T315I и E255K). Однако в этом исследовании не удалось подтвердить, были ли эти мутации комплексными или поликлональными. Также у одного пациента была обнаружена вариация V299L (16.67%).

Было установлено, что мутация T315I составляет наибольшую долю пациентов, которые являются носителями мутаций (50%). В этом исследовании, из трех пациентов с мутацией T315I два пациента находились в стадии бластного криза и один в стадии акселерации.

Следует отметить, что один из пациентов нес вариацию T315I в сочетании с другой мутацией E255K, и в течении

Таблица 4. Распределение мутаций *BCR-ABL* среди пациентов

Расположение	Мутация	Пропорция (%)	Количество пациентов
Р-петля	Y253H	16,67	1
	E255K	16,67	1
Сайт связывания	T315I	33,32	3
SH2-домен	F359V	16,67	1
Другие	V299L	16,67	1

исследования больной скончался. Таким образом результаты этого исследования показали, что прогноз у пациентов с множественными мутациями *BCR-ABL1* неблагоприятный. Однако важно отметить, что общая выживаемость пациентов не была проанализирована в силу ограниченного числа случаев.

Область Р-петли содержала больше мутаций в сравнении с другими. Частота мутаций Р-петли нарастает в фазе акселерации и бластном кризе, а также с длительностью заболевания. Поэтому больные с ХМЛ в этих фазах имеют тенденцию к развитию резистентности к иматинибу. Действительно, оба пациента, у которых были выявлены, мутации Р-петли в данном исследовании находились в стадии акселерации.

Один из пациентов в данном исследовании выявил мутацию F359V в домене SH2. Данная мутация также играет важную роль для клинициста в решении об изменении лечения с ИМ на другие виды ИТК или даже на трансплантацию.

Также важно подчеркнуть наличие мутации V299L у одного больного в стадии бластного криза.

6.2. Преимущества пиросеквенирования как метода по обнаружению мутаций киназного домена *BCR-ABL*

Результаты данного эксперимента ярко демонстрируют, что пиросеквенирование является быстрым и надежным методом обнаружения и количественного определения мутаций киназного домена в транскриптах *BCR-ABL1*. Будет важным подчеркнуть, что данный метод также находит свое применение

в отслеживании ответов на ИТК после смены терапии. Его уникальная способность измерять мультиаллельные мутации в дополнение к его чувствительности 5% дает преимущество для количественного определения мутаций киназного домена, возникающих в гетерогенной популяции лейкозных клеток. Еще одним преимуществом является то, что метод специфичен и обеспечивает встроенный контроль качества и отрицательный контроль за прогон¹⁴.

6.3. Механизмы резистентности несвязанные с мутациями в киназном домене *BCR-ABL*

Результаты данного исследования продемонстрировали, что большинство больных (42; 87,5%) в этой выборке не являются носителями самых распространенных мутаций *BCR-ABL1*, ответственных за резистентность к терапии Иматиниб Мезилатом. Таким образом зарождаются умозаключения, что мутации *BCR-ABL*, по-видимому, не являются единственными механизмами резистентности к ИТК. Например, имеются данные что фармакокинетические факторы, а также микросреда опухолевых клеток способствует развитию либо зарождению резистентности. Кроме того, побочные эффекты ИТК также играют важную роль. К сожалению, мы не исследовали дополнительные хромосомные aberrации, которые могут быть причинами резистентности к терапии иматинибом. В настоящее время ясно, что большое количество лейкозных стволовых клеток, находящихся в нише костного мозга, находятся в состоянии покоя и устойчивы к традиционной химиотерапии. Окружающие стромальные клетки могут влиять на судьбу лейкозных стволовых клеток, способствуя остановке клеточного цикла с помощью специфических сигналов, что позволяет им сохраняться даже во время лечения ИТК. Стабилизация и регуляция стволовых клеток и их потомства вместе с

¹⁴ Alikian, M. BCR-ABL1 kinase domain mutations: Methodology and clinical evaluation / M.Alikian, G.Gerrard, P.G.Subramanian [et al.] // American Journal of Hematology, – 2012. № 3 (87), – p. 298-304.

долгосрочным гемопоэзом поддерживаются в микроокружении костного мозга паракринными и аутокринными факторами роста и цитокинами.

В последние годы появляется все больше данных о том, что иммунная система играет важную роль в ХМЛ и не только в развитии и прогрессировании заболевания, но также в прогнозе и ответе на лечение. Недавно было замечено, что ремиссия без лечения у пациентов с главным молекулярным ответом на лечение ИТК стала одной из основных целей чтобы снизить токсичность у пациентов без обнаруживаемого заболевания.

Хорошо известно, что эпигенетическая дисрегуляция так же важна, как и генетические аномалии, для возникновения, поддержания и прогрессирования рака. Растущее количество данных указывает на то, что эпигенетическая дисрегуляция также играет причинную роль в резистентности к ИТК, приводя к ускользанию лейкомического клона и распространению болезни.

Эпигенетические изменения иницируются и поддерживаются как минимум тремя различными системами, включая гистоны и их модификации, метилирование ДНК и некодирующие РНК. Гистонацетил или метилтрансферазы, или гистондеацетилазы, или деметилазы представляют собой ферменты, способные добавлять или удалять вариации в определенных аминокислотных остатках или CpG-островках в ДНК, тогда как антисмысловые транскрипты и микроРНК могут регулировать уровни мРНК и трансляцию белков. Вместе они могут напрямую регулировать транскрипцию, действуя на повреждение либо восстановление и репликацию ДНК, модулировать уровни и стабильность РНК посттранскрипционно или влиять на трансляцию белков или посттрансляционные модификации белков. Недавно была продемонстрирована связь между прогрессированием ХМЛ и резистентностью к лечению ИТК и островками CpG.

Таким образом, даже если ИТК резко изменили историю ХМЛ, современная медицина все еще далека от лечебного подхода, способного воздействовать на ЛСК и, таким образом,

вылечить большинство пациентов с ХМЛ¹⁵.

ВЫВОДЫ

1. В результате исследования распространенного полиморфизма *CYP3A5*3* семейства цитохромов P450 было выявлено, что *CYP3A5*3* значительно влияет на развитие ХМЛ, данные оказались статистически значимы ($p < 0,05$). При вычислении рисков был продемонстрирован четырехкратно повышенный риск ХМЛ (95% ДИ: от 0,7683 до 20,8246), однако различия не были статистически значимыми ($p = 0,0996$).
2. Изучение ассоциации полиморфизма *CYP3A4*18* семейства генов цитохромов P450 с резистентностью к терапии иматинибом пациентов с ХМЛ, было выявлено, что *CYP3A4*18* в значительной степени влияет на исход терапии этим ИТК ($p < 0,05$).
3. Оценка роли распространенной точечной мутации *CYP2B6*6* в процессе резистентности к терапии ИМ и в восприимчивости к ХМЛ показала, что частота гомозиготного мутантного генотипа *TT*, а также аллеля *T* была заметно выше у пациентов с ХМЛ (16,3% и 34% соответственно), чем в контрольной группе (10% и 27,5% соответственно), но различия не являются статистически значимыми ($p = 0,2910$). Также по результатам бинарной логистической регрессии, носители гетерозиготного *GT* генотипа обладали более высоким риском приобретения резистентности (ОШ 1,04; 95% ДИ: 0,492–2,218), тогда как носители гомозиготного мутантного генотипа *TT* демонстрировали более низкий риск невосприимчивости к препарату (ОШ 0,72; 95% ДИ: 0,283–1,836). Однако выявленные ассоциации не оказались статистически значимыми ($p = 0,909$ и $p = 0,491$ соответственно).

¹⁵ Poudel, G. Mechanisms of Resistance and Implications for Treatment Strategies in Chronic Myeloid Leukaemia / G.Poudel, M.Tolland, T.Hughes [et al.] // Cancers, – 2022. № 14 (14), – p. 3300.

4. В результате пиросеквенирования 48 резистентных ХМЛ больных у 6 пациентов (12,5%) были идентифицированы *BCR-ABL* мутации. Анализ вариаций выявил 5 различных видов мутаций в ключевых точках гена; в области Р-петли мутации E255K (16,67%) и Y253H (16,67%), в контактном сайте связывания вариация T315I (33,32%, самая распространенная вариация) и в домене SH2 были обнаружены мутации F359V (16,67%) и V299L (16,67%).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. На основании корреляций, полученных в результате сравнительного анализа, рекомендуется учитывать полиморфизм *CYP3A5*3* при определении тенденции к развитию ХМЛ и прогнозированию заболевания, а также мониторингу его течения.
2. Проведение генотипирования полиморфизма *CYP3A4*18* может быть использовано в качестве терапевтического предиктора резистентности к ИТК иматинибу у пациентов с ХМЛ.
3. Определение мутаций в онкогене *BCR-ABL* может быть использовано для выяснения молекулярных механизмов лекарственной устойчивости при лечении ингибиторами тирозинкиназы, особенно у пациентов на поздних стадиях ХМЛ.
4. Скрининг мутаций киназного домена *BCR-ABL* путем пиросеквенирования может использоваться в целях диагностики и формирования индивидуализированной терапии ХМЛ пациентов как с первичной, так и с вторичной резистентностью к ИМ.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Karimova, N.** Impact of P450 (CYP) Gene Families Polymorphisms on Specific Drug Response Among Chronic Myeloid Leukemia Patients in Azerbaijan // Conference of Young Scientists and Students "Innovations and Global Problems in Modern Biology and Agrarian Sciences" dedicated to the 90th anniversary of Academician Jalal Aliyev, – Baku, – 2018, – p. 136.
2. Asadov, C., **Karimova, N.**, Hasanova, A., Shirinova, A., Alimirzoyeva, Z. CYP3A5*3, CYP3A4*18 and CYP2B6 gene polymorphisms in chronic myeloid leukemia patients in Azerbaijan // Leukemia Research, Abstracts of the Xth Eurasian Hematology Oncology Congress, – Istanbul, – 2019, – p. S30.
3. Asadov, C., Hasanova, A., Shirinova, A., **Karimova, N.**, Alimirzoyeva, Z. BCR-ABL gene ABL kinase domain mutations in imatinib resistant chronic myeloid leukemia patients in Azerbaijan // HemaSphere, 24th European Hematology Oncology Association Congress, – Amsterdam, – 2019, – p. 3010.
4. **Karimova, N.** Preliminary study of CYP3A4*18 and CYP3A5*3 single nucleotide polymorphisms in an Azerbaijani population / N.Karimova, A.Hasanova, B.Bayramov // Polymorphism, – 2022. № 8, – p. 1-10.
5. **Karimova, N.** CYP2B6 single nucleotide polymorphisms in an Azerbaijani population // Georgian Medical News, – 2022. 330, – p. 90-93.
6. **Керимова, Н.И.** Семейство цитохромов P450: структура, функция и роль в метаболизме лекарственных препаратов // Труды Института Генетических Ресурсов Национальной Академии Наук Азербайджана, – 2022. № 2 (11), – с. 159-170.
7. **Karimova, N.** CYP2B6*6 SNP in an Azerbaijani population // Second Azerbaijan International Hematology Specialists Congress, – Baku, – 2022, – p. 224
8. **Karimova, N.** CYP3A5*3, CYP3A4*18 and CYP2B6*6 genotypes and chronic myeloid leukemia development in

- Azerbaijan / N.Karimova, A.Asadov, A.Hasanova [et al.] // Advances in Biology & Earth Sciences, – 2023. 8 (2), – p. 204-215
9. Asadov, A. Association of CYP3A5*3, CYP3A4*18, and CYP2B6*6 Polymorphisms with Imatinib Treatment Outcome in Azerbaijani Chronic Myeloid Leukemia Patients / C.Asadov, **N.Karimova**, A.Hasanova [et al.] // Indian Journal of Medical Research, – 2023. 158 (2), – p. 151-160.
 10. **Karimova, N.** BCR-ABL Dependent and Independent Mechanisms in Tyrosine Kinase Inhibitors Treatment Outcome / N.Karimova, R.Khalilov, A.Eftekhari [et al.] // Baku State University Journal of Life Sciences and Biology, – 2023. (*in print*)

Защита диссертации состоится "05" декабря 2023 года в 14:00 часов на заседании диссертационного совета FD 1.37, действующий на базе Института Генетических Ресурсов Министерства Науки и Образования Азербайджанской Республики

Адрес: г. Баку, AZ1106, проспект Азадлыг, 155

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института Генетических Ресурсов Министерства Науки и Образования Азербайджанской Республики

Электронная версия автореферата размещена на официальном сайте Института Генетических Ресурсов (<https://www.genres.az/>)

Автореферат разослан по соответствующим адресам "02" ноября 2023 года.

Подписано в печать: 01.11.2023

Формат бумаги: А5

Объём: 38082

Тираж: 70