

УДК 616.155.392.8-036.12-097

**АЛЛЕЛЬНЫЙ ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА HLA-DRB1
ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ МИЕЛОЛЕЙКОЗЕ****Овсянникова Е.Г., Ибраилова З.М., Заклякова Л.В., Попов Е.А.***ГБОУ ВПО «Астраханская государственная медицинская академия»,
Астрахань, e-mail: agma@astranet.ru*

Проблема резистентности к терапии гливеком у больных хроническим миелолейкозом (ХМЛ) в настоящее время находится в стадии изучения. Несмотря на значительные успехи, достигнутые в результате применения гливека, остается часть больных, не отвечающих на лечение. В работе исследуется аллельный полиморфизм гена HLA-DRB1 у больных ХМЛ, получающих терапию гливеком. Установлено, что резистентность к развитию хронического миелолейкоза маркируется наличием в фенотипе специфичности HLA-DRB1*13(06); маркерами быстрой прогрессии ХМЛ с летальным исходом являются специфичности HLA-DRB1*01 и HLA-DRB1*12(05); ген HLA-DRB1*15(02) обладает протективным эффектом и характеризует благоприятный исход ХМЛ. Иммуногенетическое исследование рекомендуется в качестве дополнительного метода определения прогноза хронического миелолейкоза.

Ключевые слова: хронический миелолейкоз, гливек, HLA-DRB1**THE ALLELIC POLYMORPHISM OF HLA-DRB1 GENE
IN CHRONIC MYELOLEUKEMIA****Ovsyannikova E.G., Ibrailova Z.M., Zaklyakova L.V., Popov E.A.***Astrakhan state medical academy, Astrakhan, e-mail: agma@astranet.ru*

The problem of resistance to glivecon therapy in patients with chronic myeloleukemia (CML) is in the process of study. The investigation deals with allelic polymorphism of HLA-DRB1 gene in patients with CML receiving glivecon therapy. It was stated that the resistance to development of chronic myeloleukemia may be marked by presence of phenotype specificity HLA-DRB1*13(06); makers of speedy progression CML with lethal outcome may be of specificity HLA-DRB1*01 and 12(05); HLA-DRB1* 15(02) gene may have protective effect and characterizes positive outcome of CML. The immunogenetic investigation may be recommended as the additional method of risk definition and prognosis of CML.

Keywords: chronic myeloleukemia (CML), glivecon, HLA-DRB1

В терапии хронического миелолейкоза (ХМЛ) в настоящее время происходит перемены глобального масштаба. На смену эмпирической терапии пришла таргетная терапия, что значительно улучшает бессобытийную и общую выживаемость больных, выводит их на недоступный ранее уровень качества жизни [3, 9]. Главным патогенетическим событием является хромосомная транслокация t(9; 22), (q34; q11). В результате образуется химерный ген BCR-ABL, продукт которого – белок p210 является тирозинкиназой с повышенной активностью. Ведущим эффектом тирозинкиназы является их способность к усилению пролиферации и снижению апоптоза в гемопоэтических предшественниках [2, 7]. Несмотря на улучшение результатов терапии ХМЛ, связанных с применением ингибиторов тирозинкиназ, полный цитогенетический ответ удается получить у 70–87% больных в хронической фазе [3, 4, 8]. Это определяет необходимость дальнейшего изучения патогенеза злокачественной трансформации клеток и опухолевой прогрессии, а также расшифровки механизмов развития резистентности к терапии ингибиторами тирозинкиназ у больных ХМЛ [10].

В настоящее время не вызывает сомнений, что процесс онкогенеза заключается в

патологических изменениях вначале на молекулярном, а затем на клеточном уровне, а предрасположенность к злокачественным новообразованиям и опухолевая прогрессия могут модифицироваться аллельными полиморфизмами различных генов [5]. Одной из наиболее полиморфных генетических систем человека является система HLA. Выявление ассоциативных связей с заболеваниями позволяет использовать продукты HLA не только в качестве маркеров наследственной предрасположенности, но и прогнозировать особенности течения заболеваний. Изучению продуктов HLA у больных гемобластозами посвящено большое количество исследований. В то же время проблема хронического миелолейкоза освещена в единичных работах. В одном из последних исследований показано, что молекулы HLA II класса более, чем молекулы HLA I класса, ассоциируются с резистентностью к развитию ХМЛ [6]. Однако не изучены ассоциативные связи генов HLA II класса у больных хроническим миелолейкозом с развитием резистентности к лечению гливеком.

Цель исследования: изучить аллельный полиморфизм гена HLA-DRB1 у больных хроническим миелолейкозом, получающих лечение гливеком, и определить

иммуногенетические маркеры предрасположенности и прогноза.

Материалы и методы исследования

Исследование проводилось на основе собственных наблюдений в период с 2006 по 2011 г. В исследование включены 50 больных ХМЛ русской национальности. Возраст больных колебался от 23 до 78 лет. Средний возраст составлял $50,3 \pm 15,0$ лет, соотношение мужчин и женщин в исследовании 1:1. Длительность лечения гливексом составила от 1 года до 5 лет. Продолжительность заболевания до начала терапии гливексом была от 0 до 87 месяцев. В качестве контрольных данных были использованы результаты генотипирования 94 доноров – жителей Астраханской области русской национальности [1].

Все больные имели клинико-морфологическое и цитогенетическое подтверждение диагноза хронического миелолейкоза. Характер ответа на лечение определялся согласно критериям Европейского общества по изучению хронического миелолейкоза European Leukemia Net (ELN-2009) [7].

В процессе работы проводились молекулярно-генетические исследования крови методом ПЦР в реальном времени (количественная оценка экспрессии химерного гена BCR-ABL типа p210), ДНК-типирование с помощью метода ПЦР (определение генов HLA II класса); исследования костного мозга: цитологические (миелограмма), цитохимические, цитогенетические (определение транслокации t(9; 22)

(q34; q11), молекулярно-цитогенетические (флуоресцентная in situ гибридизация хромосом (FISH) с ДНК зондом к слитному гену BCR-ABL).

Для определения показателя достоверности результатов был использован непараметрический критерий – χ^2 . Критерий χ^2 вычислялся по формуле Holdene, учитывая малый объем выборок, была применена модифицированная формула с поправкой Yates на непрерывность выборки. Значения χ^2 , превышающие 3,841 (что соответствует $p < 0,05$) рассматривались как показатель достоверной разницы между частотами в сравниваемых группах. Помимо показателя статистической достоверности, использовался показатель силы ассоциации – RR (relative risk) – относительный риск этиологической факции – EF (для $RR > 1$), превентивной факции – PF (для $RR < 1$). Величина RR, равная 1, указывает на отсутствие ассоциации. $RR > 1$ (положительная ассоциация) означает, что ген чаще встречается у больных; если $RR < 1$, это указывает на снижение частоты гена у больных.

Результаты исследования и их обсуждение

Нами были изучены закономерности распределения аллелей генов HLA-DRB1 у больных хроническим миелолейкозом по сравнению с контрольной группой. Распределение специфичностей представлено в табл. 1.

Таблица 1

Ассоциации аллелей HLA -DRB1 с хроническим миелолейкозом

Аллели HLA	ХМЛ $n = 50$		Контроль $n = 94$		χ^2	RR	EF	PF
	N	%	N	%				
DR B1*01	9	18	14	14,9	0,06	1,27	0,038	-
DRB1*15(02)	8	16	27	28,7	3,61	0,49	-	0,149
DRB1*16(02)	5	10	5	5,3	0,50	1,97	0,049	-
DRB1*17(03)	10	20	10	10,6	1,67	2,09	0,104	-
DRB1*04	7	14	19	20,2	1,32	0,67	-	0,067
DRB1*11(05)	17	34	31	32,9	0,00	1,05	0,017	-
DRB1*12(05)	2	4	3	3,2	0,05	1,35	0,010	-
DRB1*13(06)	11	22	36	38,3	4,71 $p < 0,05$	0,47	-	0,219
DRB1*14(06)	3	6	0	0	3,19	13,93	0,056	-
DRB1*07	17	34	30	31,9	0,00	1,10	0,032	-
DRB1*08	4	8	4	4,3	0,30	1,95	0,039	-
DRB1*09	3	6	5	5,3	0,05	1,20	0,010	-
DRB1*10	0	0	3	3,2	3,57	0,26	0	0
DRB1*x	4	8	Н/Д	Н/Д	-	-	-	-

Примечание: Н/Д – нет данных.

Как представлено в табл. 1, у больных хроническим миелолейкозом установлена статистически значимая отрицательная ассоциация со специфичностью DRB1*13, по сравнению с контрольной группой 22% против 38,3% ($RR=0,47$, $PF=0,219$, $p < 0,05$). Из этого следует, что резистентность к развитию ХМЛ в популяции русских астраханской геногеографической зоны маркируется нали-

чием в фенотипе специфичности DRB1*13. Кроме того, следует отметить, что риск развития ХМЛ в 13,93 раза выше при наличии в генофенотипе специфичности DRB1*14(06), однако различия не достигли достоверного уровня.

Далее больные были распределены по статусу: «жив»–«умер», с целью определения маркеров благоприятного и неблагоприятного прогноза ХМЛ на фоне прове-

денной терапии гливеком. На первом этапе исследовалось распределение специфичностей HLA-DRB1 у больных хроническим

миелолейкозом, успешно получавших лечение гливеком в течение 5 лет. Полученные данные представлены в табл. 2.

Таблица 2

Генный профиль HLA -DRB1 у больных ХМЛ: статус «жив»

Аллели HLA	Жив $n = 44$		Контроль $n = 94$		χ^2	RR	EF	PF
	n	%	n	%				
DRB1*01	6	13,6	14	14,9	0,21	0,91	-	0,009
DRB1*15(02)	8	18,2	27	28,7	2,36	0,57	-	0,126
DRB1*16(02)	5	11,4	5	5,3	0,85	2,27	0,063	-
DRB1*17(03)	8	18,2	10	10,6	0,91	1,87	0,085	-
DRB1*04	7	15,9	19	20,2	0,70	0,77	-	0,046
DRB1*11(05)	15	34,1	31	32,9	0,00	1,06	0,019	-
DRB1*12(05)	1	2,3	3	3,2	0,71	0,90	-	0,003
DRB1*13(06)	9	20,5	36	38,3	5,19	0,43	-	0,232
DRB1*14(06)	3	6,8	0	0	3,73	15,94	0,064	-
DRB1*07	15	34,1	30	31,9	0,00	1,11	0,034	-
DRB1*08	4	9,1	4	4,3	0,55	2,23	0,050	-
DRB1*09	3	6,8	5	5,3	0,00	1,37	0,019	-
DRB1*10	0	0	3	3,2	3,33	0,29	0	0
DRB1*х	4	9,1	Н/Д	Н/Д	-	-	-	-

Примечание: Н/Д – нет данных.

Из табл. 2 следует, что зарегистрировано достоверное снижение частоты HLA-DRB1*13(06) в группе больных ХМЛ, успешно получающих лечение по настоящее время, по сравнению с контрольной группой 20,5% против 38,3% (RR-0,43, PF-0,232, $p < 0,025$).

Это подтверждает ранее сделанное нами заключение об отрицательной ассоциации ХМЛ с данным геном. Далее мы проанализировали генный профиль HLA у больных ХМЛ, получавших лечение гливеком и умерших в результате прогрессии заболевания (табл. 3).

Таблица 3

Аллельный полиморфизм HLA -DRB1 у больных ХМЛ: статус «умер»

Аллели HLA	Умер $N = 6$		Контроль $n = 94$		χ^2	RR	EF	PF
	n	%	n	%				
DRB1*01	3	50	14	14,9	2,75	5,55	0,410	-
DRB1*15(02)	0	0	27	28,7	4,04	0,19	0	0
					$p < 0,05$			
DRB1*16(02)	0	0	5	5,3	2,39	1,25	0	0
DRB1*17(03)	2	33,3	10	10,6	1,02	4,47	0,259	-
DRB1*04	0	0	19	20,2	3,10	0,30	0	0
DRB1*11(05)	2	33,3	31	32,9	0,18	1,12	0,036	-
DRB1*12(05)	1	16,7	3	3,2	0,31	7,13	0,143	-
DRB1*13(06)	2	33,3	36	38,3	0,46	0,89	-	0,045
DRB1*14(06)	0	0	0	0	-	-	-	-
DRB1*07	2	33,3	30	31,9	0,14	1,17	0,050	-
DRB1*08	0	0	4	4,3	2,53	1,55	0	0
DRB1*09	0	0	5	5,3	2,39	1,25	0	0
DRB1*10	0	0	3	3,2	2,82	2,01	0	0
DRB1*х	0	0	Н/Д	Н/Д	-	-	-	-

Примечание: Н/Д – нет данных.

Как представлено в табл. 3, у умерших больных ХМЛ, получавших лечение гливеком, имеется достоверное снижение по сравнению с контролем частоты HLA-DRB1*15(02) – 0% против 28,7% (RR-0,19, $p < 0,025$). Из этого следует, что

ген DRB1*15(02) маркирует благоприятный прогноз ХМЛ. Необходимо отметить, что риск неблагоприятного течения ХМЛ с летальным исходом в 5,5 раза выше при наличии в генотипе группы аллелей HLA-DRB1*01 (RR-5,55, EF-0,41) и в 7,13 раза

выше при HLA-DRB1*12(05) (RR-7,13, EF-0,143), однако различия не достигли статистической значимости. Следующим шагом

нашего анализа было сравнение антигенного профиля больных ХМЛ: статус «жив» и «умер» между собой (табл. 4).

Таблица 4

Сравнение аллельного полиморфизма HLA-DRB1 у больных ХМЛ

Аллели HLA	Жив <i>n</i> = 44		Умер <i>n</i> = 6		χ^2	RR	EF	PF
	<i>N</i>	%	<i>n</i>	%				
DRB1*01	6	13,6	3	50	7,51 <i>p</i> < 0,01	0,17	-	0,043
DRB1*15(02)	8	18,2	0	0	0,30	3,03	1,122	-
DRB1*16(02)	5	11,4	0	0	0,21	1,81	0,051	-
DRB1*17(03)	8	18,2	2	33,3	2,00	0,42	-	0,215
DRB1*04	7	15,9	0	0	0,18	2,60	0,098	-
DRB1*11(05)	15	34,1	2	33,3	0,18	0,95	-	0,022
DRB1*12(05)	1	2,3	1	16,7	7,83 <i>p</i> < 0,01	0,13	-	0,136
DRB1*13(06)	9	20,5	2	33,3	1,54	0,48	-	0,194
DRB1*14(06)	3	6,8	0	0	0,07	1,10	0,006	-
DRB1*07	15	34,1	2	33,3	0,18	0,96	-	0,022
DRB1*08	4	9,1	0	0	0,001	1,44	0,028	-
DRB1*09	3	6,8	0	0	0,07	1,10	0,006	-
DRB1*10	0	0	0	0	-	-	-	-
DRB1*x	4	9,1	0	0	0,001	1,44	0,028	-

Проведённый анализ показал достоверное снижение в группе больных ХМЛ – «жив» по сравнению с группой «умер» частоты HLA-DRB1*01 – 13,6% против 50% (RR-0,17, PF-0,043, *p* < 0,01) и HLA-DRB1*12(05) – 2,3% против 16,7% (RR-0,13, PF-0,136, *p* < 0,01). Возвращаясь к табл. 2, – данные гены уже проявлялись: в 5,5 и 7,13 раз, соответственно, чаще у умерших больных, но не достигли уровня достоверности.

Анализируя табл. 2, 3, 4, можно сделать заключение, что у больных ХМЛ, получающих лечение гливеком, наличие генов HLA-DRB1*01 и HLA-DRB1*12(05) предполагает быструю прогрессию заболевания с летальным исходом.

Выводы

Резистентность к развитию ХМЛ маркируется наличием в фенотипе специфичности HLA-DRB1*13(06); маркерами быстрой прогрессии ХМЛ с летальным исходом являются специфичности HLA-DRB1*01 и HLA-DRB1*12(05); ген HLA-DRB1*15(02) обладает протективным эффектом и характеризует благоприятный исход ХМЛ; иммуногенетическое исследование может быть внедрено в практику в качестве дополнительного метода определения риска и прогноза хронического миелолейкоза; учитывая полученные данные необходимо продолжить поиск иммуногенетических маркеров прогноза течения ХМЛ

Список литературы

1. Иммуногенетические маркеры предрасположенности к лепре у русских жителей Астраханского региона / Л.В. Сароянц, М.Н. Болдырева, И.А. Гуськова и др. // Иммунология. – 2005. – №5. – С. 263–267.

2. Клиническая онкогематология: Руководство для врачей / под ред. М.А. Волковой. – М.: Медицина, 2001. – 576 с.

3. Отдаленные результаты выживаемости больных в поздней хронической фазе Ph+ хронического миелолейкоза при лечении иматиниб мезилатом (Гливек®) / О.В. Стахина, А.Г. Туркина, Г.А. Гусарова и др. // Вестник гематологии. – 2009. – Т. 5, №2. – С. 42.

4. Результаты многоцентрового исследования терапии гливеком больных хроническим миелолейкозом в хронической фазе / А.Ю. Зарицкий, Е.Г. Ломаи, О.Ю. Виноградова и др. // Гематология и трансфузиология. – Т. 52, № 2. – С. 13–17.

5. Хаитов Р.М., И.И. Дедов, М.Н. Болдырева. Новые представления о функции главного комплекса генов иммунного ответа человека // Молекулярная медицина. – 2006. – № 3. – С. 47–51.

6. Хамаганова Е.Г., Зарецкая Ю.М. Молекулярные механизмы ассоциаций HLA-системы с резистентностью к развитию хронического миелолейкоза // Гематология и трансфузиология. – 2006. – № 1. – С. 12–17.

7. Хронический миелолейкоз – до и после применения иматиниба (часть I) / Е.Г. Ломаи, Д.В. Моторин, Е.Г. Романова, А.Ю. Зарицкий // Онкогематология. – 2009. – №2. – С. 4–16.

8. Эффективность терапии иматиниба мезилатом (Гливек®) в хронической фазе миелолейкоза / А.Г. Туркина, Н.Д. Хорошко, Г.А. Дружкова и др. // Терапевтический архив. – 2003. – № 8. – С. 62–67.

9. Baccarani M., Pane F., Saglio G. Monitoring treatment of chronic myeloid leukemia // Haematologica. – 2008. – №92. – P. 161–169.

10. Resistance to tyrosine kinase inhibitors in Philadelphia chromosome-positive leukemias: Which mutations matter? / S. Soverini, M. Baccarani, I. Iacobucci, et al. // Clin Leukemia. – 2007. – №1. – P. 223–228.

Рецензенты:

Астахин А.В., д.м.н., профессор, зам. главного врача по клинико-экспертной работе ГУЗ «Александр-Мариинская областная клиническая больница», г. Астрахань;

Эсаулова Т.А., д.м.н., профессор, зав. терапевтической службой НУЗ медико-санитарной части Газпрома, г. Астрахань.

Работа поступила в редакцию 09.09.2011.