

На правах рукописи

Шихбабаева Джарият Исмаиловна

**ЗНАЧЕНИЕ КЛИНИЧЕСКИХ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ В
СТРАТИФИКАЦИИ РИСКОВ У БОЛЬНЫХ ИСТИННОЙ ПОЛИЦИТЕМИЕЙ**

14.01.21. - гематология и переливание крови

Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата
медицинских наук

Санкт-Петербург

2017

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства» (ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России)

Научные руководители:

Заслуженный деятель науки РФ, доктор медицинских наук, профессор

Абдулкадыров Кудрат Мугутдинович

Доктор биологических наук **Мартынкевич Ирина Степановна**

Официальные оппоненты:

Виноградова Ольга Юрьевна – доктор медицинских наук, профессор кафедры онкологии, гематологии и лучевой терапии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Министерства Здравоохранения Российской Федерации

Зубаровская Людмила Степановна – доктор медицинских наук, профессор, руководитель отдела детской онкологии, гематологии и трансплантологии научно-исследовательского института детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р.М. Горбачевой Федерального государственного бюджетного учреждения высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова» Министерства Здравоохранения Российской Федерации

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медико-хирургический Центр им. Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «__» _____ 2017 года в ____ часов
на заседании диссертационного совета Д 208.074.01 при ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России по
адресу 191024, г. Санкт-Петербург, ул. 2-я Советская, д.16.

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

Автореферат разослан «__» _____ 2017 года

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор медицинских наук

Татьяна Валентиновна Глазанова

Актуальность исследования

Истинная полицитемия (ИП) - это заболевание из группы Ph-негативных миелопролиферативных новообразований. Вплоть до 2005 г. не было информации о молекулярно-генетических диагностических маркерах ИП и диагноз устанавливался в первую очередь на основании клинико-лабораторной картины заболевания и исключения причин вторичного эритроцитоза, что, зачастую, представляло значительные сложности в связи с широкой распространенностью курения, сердечно-сосудистой патологии и ожирения в популяции.

Открытие патогенетической роли мутации *JAK2V617F* в 2005 году явилось началом новой эры в изучении миелопролиферативных новообразований, включая ИП. Обнаружение данного молекулярного маркера значительно облегчило постановку диагноза ИП и способствовало развитию направления таргетной терапии в лечении. Результатом исследований явилось включение наличия мутации *JAK2V617F* в большие диагностические критерии ИП ВОЗ в редакциях 2008 и 2016 гг. [Arber D.A. et al., 2016; Vardiman J.W. et al., 2009].

Клиническое течение ИП в сравнении с другими миелопролиферативными новообразованиями можно охарактеризовать как доброкачественное, однако риск развития осложнений, угрожающих жизни или приводящих к инвалидизации значителен.

Общая выживаемость при ИП при правильном подходе к лечению и профилактике осложнений может составлять около 20 лет, не приводя, таким образом, к значительному ограничению продолжительности жизни. Тем не менее, когда речь идет о молодых больных (с дебютом заболевания в возрасте менее 50 лет), такой показатель общей выживаемости не выглядит многообещающим. Следовательно, выявление прогностических особенностей течения заболевания, влияющих на общую выживаемость и риск развития осложнений при ИП, является жизненно важным.

Основной причиной, приводящей к инвалидизации и снижению продолжительности жизни пациентов с ИП, является склонность к тромбозам и тромбоэмболиям.

Выделяется множество факторов, влияющих на частоту развития тромбозов у больных ИП: преклонный возраст, наличие тромботических эпизодов в анамнезе, лейкоцитоз, курение, гиперхолестеринемия, сахарный диабет.

Особого внимания требуют рецидивы тромбозов, характеризующиеся более высокими рисками ограничений жизнедеятельности и летальных исходов. Для эффективной вторичной профилактики тромбоэмболических осложнений при ИП необходимо выявление значимых факторов прогноза и индивидуализации терапевтической тактики с целью гарантированного снижения риска повторных тромботических событий.

Согласно литературным данным, наличие мутации *JAK2V617F* является самостоятельным независимым фактором риска развития тромбозов при миелопролиферативных новообразованиях [Finazzi G. et al., 2007; Arellano-Rodrigo E. et al., 2006]. Однако в настоящее время остается открытым вопрос относительно вклада в этот риск величины аллельной нагрузки *JAK2V617F*, её влияния на частоту развития тромбозов, течение и исход ИП.

В последнее десятилетие в вопросах изучения происхождения тромбозов всё больше внимания уделяется такому состоянию, как наследственная тромбофилия, в том числе, и у больных ИП. Проводятся различные исследования для оценки значимости маркеров наследственной тромбофилии в развитии тромбозов у больных ИП, однако однозначные выводы об их роли ещё не сделаны. Это может быть связано с тем, что внимание исследователей приковано, главным образом, к двум генетическим аномалиям, ассоциированным с наследственной тромбофилией – мутациям в генах факторов *II* (G20210A) и *V* (FV Leiden). В то же время, при ИП большее значение могут играть наследственные факторы, связанные с изменением активности тромбоцитарного звена гемостаза, вязкости крови, состояния сосудистого эндотелия, фибринолитической активности. В этой связи, возникает необходимость исследования протромбогенных вариантов аллельного полиморфизма генов:

метилентетрагидрофолат редуктазы (*MTHFR*), фибриногена (*FI*), ингибитора активатора плазминогена (*PAI-1*), тромбоцитарного рецептора фибриногена (*GP11A*).

Не менее важными осложнениями течения ИП являются исход в постполицитемический миелофиброз и бластная трансформация. До сих пор нет информации о факторах, влияющих на развитие данных осложнений и возможности их прогнозирования. Накопление данных позволяет ставить вопрос о клинических и молекулярно-генетических особенностях ИП в роли таких факторов и прогностических маркеров.

Основными направлениями в терапии ИП являются: антиагрегантная терапия, афферентные методы (эритроцитаферез, гемоэксфузии) и циторедукция. Возможность сдерживания прогрессирования заболевания с помощью стандартной терапии (гидроксикарбамид, препараты α -интерферона) в настоящее время не доказана. В лечении ИП в последние годы началась новая эра направленной (таргетной) терапии, которая дает надежду на ответ на лечение и улучшение качества жизни у пациентов, резистентных к стандартной терапии. К сожалению, более высокая эффективность таргетных препаратов – ингибиторов янускиназ сопряжена также и с гораздо более высокой их стоимостью по сравнению с традиционной циторедуктивной терапией. Это определяет необходимость выделения категории больных, в первую очередь, нуждающихся в лечении таргетными препаратами по жизненным показаниям.

Таким образом, для обеспечения своевременной диагностики, правильного выбора терапии, своевременной смены терапии при наличии резистентности, необходима разработка комплексной программы диагностики и индивидуализации терапии ИП, с учетом молекулярно-генетических особенностей и прогностических маркеров течения заболевания.

Степень разработанности темы

Имеется большое количество данных о значимости мутации *JAK2V617F* в патогенезе ИП. Однако до настоящего времени остается неизученным вопрос относительно влияния уровня аллельной нагрузки мутантного гена *JAK2V617F* на риск тромбообразования, клиническое течение и исходы заболевания. Также не определена роль аллельной нагрузки при прогнозировании ответа на имеющиеся виды терапии.

В оценке риска тромбообразования остаются нерешенными вопросы о степени влияния наследственной тромбофилии. Большое количество исследований проведено для оценки влияния мутации гена фактора V (Лейденской мутации) и мутации в гене протромбина. При этом значительно меньше данных о значении протромбогенных вариантов генов метилентетрагидрофолат редуктазы (*MTHFR*), фибриногена (*FI*), ингибитора активатора плазминогена (*PAI-1*), тромбоцитарного рецептора фибриногена (*GP11A*).

Имеющиеся в настоящее время принципы диагностики и лечения не обеспечивают индивидуального подхода к больным ИП. Детальное изучение клинических и молекулярно-генетических факторов позволит персонализировать тактику ведения пациентов с истинной полицитемией.

Цель исследования

Оценить влияние клинических и молекулярно-генетических факторов на течение заболевания, показатели выживаемости, риск тромботических осложнений и результаты терапии у больных истинной полицитемией.

Задачи исследования

1. Оценить влияние клинических (возраст, симптомы заболевания, уровни эритроцитов, гематокрита, лейкоцитов, тромбоцитов) характеристик истинной полицитемии на частоту тромботических осложнений, развитие постполицитемического миелофиброза и выживаемость больных.

2. Определить клиническое значение уровня аллельной нагрузки *JAK2V617F* и его влияние на течение и исходы истинной полицитемии, в том числе на частоту развития тромботических осложнений.

3. Изучить особенности полиморфизма генов факторов *II* и *V*, метилентетрагидрофолат редуктазы (*MTHFR*), фибриногена (*FI*), ингибитора активатора плазминогена (*PAI-1*), тромбоцитарного рецептора фибриногена (*GP1IIA*) у больных ИП в зависимости от наличия в анамнезе эпизодов артериального или/и венозного тромбоза.

4. Разработать алгоритм определения прогноза ответа на лечение, общей выживаемости, рисков тромботических осложнений и вероятности развития постполицитемического миелофиброза на основе клинических и молекулярно-генетических проявлений истинной полицитемии.

Научная новизна исследования

Впервые в медицинской практике выявлены различия в течении заболевания, показателях выживаемости, результатах терапии больных истинной полицитемией в зависимости от клинических и молекулярно-генетических факторов и изучена ассоциативная связь между уровнем аллельной нагрузки мутантного гена *JAK2V617F* у больных истинной полицитемией и ответом на терапию, развитием тромботических осложнений и исходами заболевания. Получены новые данные о роли аллельного полиморфизма генов фактора *V* (*G1691A*, Лейденская мутация), протромбина (*FII G20120A*), гликопротеина IIIa (*T1565C*), β -субъединицы фибриногена (*G-455A*), ингибитора активатора плазминогена *PAI-1* (*-675 4G/5G*), метилентетрагидрофолатредуктазы (*C677T*), а также уровня гомоцистеина в вероятности развития тромбозов у больных истинной полицитемией. Предложены новые факторы риска течения истинной полицитемии: спленомегалия, эритроцитоз, лейкоцитоз, полиморфизм генов фактора *V* (Лейденская мутация), метилентетрагидрофолатредуктазы (*MTHFR*) и уровень гомоцистеина, аллельная нагрузка *JAK2V617F*, определяющие вероятность ответа на лечение, риск тромботических осложнений, общую выживаемость и частоту развития постполицитемического миелофиброза. Разработан усовершенствованный алгоритм определения прогноза ответа на лечение, общей выживаемости, рисков тромботических осложнений и вероятности развития постполицитемического миелофиброза на основе клинических и молекулярно-генетических проявлений истинной полицитемии.

Практическая значимость работы

Выявлены конкретные клинические и молекулярно-генетические факторы, оказывающие влияние на течение истинной полицитемии (развитие осложнений, ответ на проводимую терапию, исход заболевания, выживаемость больных). Определено влияние клинко-гематологических и молекулярно-генетических особенностей в дебюте заболевания на течение истинной полицитемии:

- эритроцитоза и спленомегалии на частоту развития постполицитемического миелофиброза;
- лейкоцитоза – на общую выживаемость;
- спленомегалии и уровня аллельной нагрузки *JAK2V617F* – на результаты терапии.

Установлено, что аллельный полиморфизм *1691A* гена фактора *V*, *677T* гена метилентетрагидрофолатредуктазы (*MTHFR*) и уровень гомоцистеина ассоциированы с высоким риском тромботических осложнений у больных истинной полицитемией.

Определены факторы неблагоприятного прогноза, на основе которых разработан алгоритм, позволяющий выделить в дебюте заболевания группу больных истинной полицитемией высокого риска.

Методология и методы исследования

В работе использованы клинко-лабораторные, морфологические, цитогенетические, молекулярно-генетические и статистические методы исследования.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Эритроцитоз и спленомегалия в дебюте заболевания ассоциированы с развитием постполицитемического миелофиброза при истинной полицитемии. У больных истинной полицитемией с лейкоцитозом $>11 \times 10^9/\text{л}$ общая выживаемость ниже, чем у больных с уровнем лейкоцитов $<11 \times 10^9/\text{л}$ в дебюте заболевания.

2. Аллельная нагрузка *JAK2V617F* более 50% в дебюте заболевания связана с меньшей эффективностью терапии истинной полицитемии.

3. Аллельный вариант *1691A* гена фактора *V*, *677T* гена *MTHFR* (метилентетрагидрофолат редуктазы) и гипергомоцистеинемия чаще встречаются у больных истинной полицитемией с тромботическими осложнениями по сравнению с больными, у которых течение заболевания не осложнено тромбозами.

4. Больные истинной полицитемией, отличающиеся в дебюте заболевания одним из следующих признаков: содержание лейкоцитов более $11,0 \times 10^9/\text{л}$, эритроцитоз более $7,3 \times 10^{12}/\text{л}$, уровень аллельной нагрузки *JAK2V617F* более 50%, наличие протромботического полиморфизма генов фактора *V* (Лейден), метилентетрагидрофолат редуказы, гипергомоцистеинемией, могут быть отнесены к группе высокого риска по ответу на лечение, частоте развития тромботических осложнений и постполицитемического миелофиброза, общей выживаемости.

Степень достоверности, публикации и апробация диссертации

Степень достоверности обусловлена проведением достаточным числом клинических наблюдений (216 пациентов), использованием современных и информативных методов исследования, адекватной статистической обработкой полученных результатов.

По теме диссертации опубликовано 8 научных работ, из которых – 2 статьи в журналах, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ для опубликования основных научных результатов диссертации на соискание ученой степени кандидата и доктора медицинских наук.

Материалы диссертации были представлены на Научном совещании Европейского общества по борьбе с лейкозами (ELN Frontiers, Берлин, Германия, 2014), 57-ом Ежегодном Собрании Американского Общества Гематологов (57th American Society of Hematology Annual Meeting, Орlando, США, 2015), 20-ом Конгрессе Европейской Гематологической Ассоциации (20th Congress of European Hematology Association, Вена, Австрия, 2015), Академии по истинной полицитемии (Москва, 2015), совещании «Общие вопросы гематологии» (Санкт-Петербург, 2015), III Конгрессе Гематологов России (Москва, 2016), Мемориальной научно-практической конференции памяти профессора К.М. Абдулкадырова «Миелопролиферативные новообразования» (Санкт-Петербург, 2016), Юбилейной научной конференции «Кафедра факультетской терапии: сохраняя традиции Боткинской школы» (Санкт-Петербург, 2016), 58-ом Ежегодном Собрании Американского Общества Гематологов (58th American Society of Hematology Annual Meeting, Сан Диего, США, 2016).

Личный вклад автора

Автором лично выполнены: анализ источников литературы, планирование диссертационного исследования, сбор анамнеза, обследование, установление диагноза, назначение терапии и последующий мониторинг лечения пациентов.

Также проведено выполнение трепанобиопсий, участие в проведении и интерпретации результатов молекулярно-генетических исследований.

Диссертантом лично проведены создание базы данных, последующий статистический анализ, обобщение и интерпретация полученных результатов исследования, подготовка к публикации тезисов и статей по теме работы. Диссертант самостоятельно представлял результаты исследования в печатных публикациях, выступлениях на научных конференциях.

Структура и объем работы

Диссертационная работа изложена на 113 страницах машинописного текста и состоит из введения, глав обзора литературы, описания методов и характеристики пациентов, результатов исследования, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Библиография содержит 120 источников литературы. Работа включает 24 рисунка и 13 таблиц.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Методы исследования и характеристика пациентов

Характеристика исследуемой группы пациентов

Первоначально была определена выборка больных ИП. Критериями постановки диагноза рассматривались критерии ВОЗ 2016 года [Arber D.A. et al., 2016]. Выборка состояла из 216 больных, в дальнейшем группы больных составлялись по тем или иным признакам, в зависимости от поставленных задач.

Для решения задач, поставленных в исследовании, были проведены следующие этапы.

Этап 1. В группах больных, разделенных по видам лечения, ответу на проводимую терапию, исходу во вторичный миелофиброз были проанализированы клинические (лейкоцитоз, тромбоцитоз, эритроцитоз, гематокрит, спленомегалия) и молекулярно-генетические (аллельная нагрузка *JAK2V617F*) параметры. Были построены графики выживаемости и исследовано влияние на выживаемость вышеуказанных параметров.

Этап 2. Выделена группа из 146 больных, у которых в дебюте заболевания была исследована аллельная нагрузка мутантного гена *JAK2V617F*. В последующем данная группа разделялась на подгруппы в зависимости от ответа на проводимую терапию, исхода в постполициитемический миелофиброз, наличия тромботических событий в течении болезни и вида тромбозов.

Этап 3. Определена выборка больных, обследованных на наличие протромбогенных вариантов генов *FV* (Лейденская мутация), протромбина, метилентетрагидрофолат редуктазы (*MTHFR*), фибриногена (*FI*), ингибитора активатора плазминогена (*PAI-1*), тромбоцитарного рецептора фибриногена (*GP1IIA*). Проанализирована общая частота наличия генов наследственной тромбофилии и статистическая значимость различий их частот в группах больных ИП с тромбозами в анамнезе (ИПТр+) и без таковых (ИПТр-), а также было проведено сравнение с контрольной группой (КГ). Группа больных с тромбозами была также разделена на 2 группы (с артериальными (ИПТрА) и венозными тромбозами (ИПТрВ)), произведено сравнение этих групп с КГ. У 36 больных исследован уровень гомоцистеина. Контрольную группу составили 228 индивидов, соответствующих по полу и возрасту исследуемому контингенту больных, не имевших в анамнезе тромботических эпизодов и проживающих в Северо-Западном регионе России. Среди них – 198 кадровых доноров крови и 30 сотрудников РосНИИГТ.

Этап 4. Обобщение полученных результатов. Были выделены клинические и молекулярно-генетические факторы, влияющие на течение ИП, которые могут быть рассмотрены в качестве неблагоприятных факторов прогноза. Были исследованы пороговые уровни статистически значимых показателей. Разработан алгоритм определения прогноза ответа на лечение, общей выживаемости, рисков тромботических осложнений и вероятности развития постполициитемического миелофиброза на основе клинических и молекулярно-генетических проявлений ИП.

Всего в исследование включено 216 больных. Диагноз ИП был установлен в период с 1980 по 2016 гг. Мужчин 95, женщин 121. Медиана возраста составила 61 год (мин – макс, 25 – 86 лет). Медиана периода наблюдения 5лет (мин – макс, 0,13 – 35 лет). Основными клиническими симптомами в дебюте заболевания были следующие: плетора - 183 (84,7%), головные боли – 105 (48,6%), слабость – 67 (31%), кожный зуд – 46 (21,3%), боли в суставах – 12 (5,6%), эритромегалгии – 8 (3,4%). У 23 (10,6%) больных в дебюте заболевания не

отмечалось никаких клинических проявлений. Показатели клинического исследования периферической крови на момент установления диагноза представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Показатели клинического исследования периферической крови больных на момент установления диагноза

Показатели клинического анализа крови	Среднее значение (95% д.и.)
Гемоглобин	187 (184-189) г/л
Эритроциты	7,2 (7,06-7,3) $\times 10^{12}/л$
Гематокрит	58,3 (57,5-59,1)
Лейкоциты	11,9 (11,2-12,5) $\times 10^9/л$
Тромбоциты	537 (503 – 571) $\times 10^9/л$

При гистологическом исследовании костного мозга в дебюте заболевания первая степень ретикулинового фиброза была выявлена у 1 (0,46%) пациента, вторая степень у 2 (0,93%) больных, у остальных больных признаков фиброза не наблюдалось.

Мутация *JAK2V617F* выявлена у 215 больных, в 12 экзоне гена *JAK2* у 1 (0,46%) больного.

Аллельная нагрузка *JAK2V617F* исследована у 146 больных, среднее значение составило – 58,2% (5,27%– 249,96%).

Общее число пациентов с тромботическими осложнениями составило 51 (24,1%), из них артериальные тромбозы наблюдались у 45 (20,8%) больных, венозные у 11 (5,1%) пациентов. У 14 (6,5%) больных отмечались повторные эпизоды тромбозов. Острое нарушение мозгового кровообращения (ОНМК) произошло у 27 пациентов, острый инфаркт миокарда (ОИМ) у 18 больных, сочетание ОНМК и ОИМ наблюдалось в 2 случаях. У 1 пациента имел место тромбоз пальцевых артерий второго пальца кисти, у 1 больной - окклюзия левой подошвенной артерии и у 3 пациентов тромбозы в системе портальной вены.

Больные получали следующие виды терапии: эритроцитаферез (монотерапия) – 21 больной (9,7%), гидроксикарбамид – 174 (80,6%) пациента, препараты интерферона альфа – 3 (1,4%) больных, в 18 (8,3%) случаях использовалась сочетанная терапия (гидроксикарбамид + интерферон альфа).

Ответ на терапию оценивали согласно критериям ELN 2014 [Barosi G. et al., 2009]. Полный клинико-гематологический (ПГО) ответ был достигнут у 33 (15,3%) больных, частичный клинико-гематологический ответ (ЧГО) у 118 (54,6%) пациентов, в 65 (30,1%) случаях ответа на лечение не было (отсутствие ответа, НО).

Исход в постполицицитемический миелофиброз был констатирован у 23 больных (10,6%). Медиана периода наблюдения до исхода в фиброз составила 12,8 (6,4 – 30,1) лет. У 2 больных наступила бластная трансформация заболевания (в том числе в одном случае бластный криз развился после исхода в миелофиброз).

Методы исследования

Обязательными исследованиями при установлении диагноза ИП были: жалобы, анамнез, объективный статус больного, размеры печени и селезенки (пальпаторно в сантиметрах от края реберной дуги); клинический анализ крови с подсчетом лейкоцитарной формулы и определением уровня тромбоцитов; гистологическое исследование костного мозга (трепанобиопсия); молекулярно-генетическое исследование периферической крови на наличие мутации *JAK2V617F*; количественная полимеразная цепная реакция (ПЦР) для исследования уровня аллельной нагрузки мутантного гена *JAK2V617F*; ультразвуковое исследование органов брюшной полости; сбор информации о наличии сопутствующих заболеваний и проводимой терапии; ПЦР-исследование аллельных полиморфизмов бти генов - Лейденская мутация в гене фактора V, мутация в гене протромбина (*FII G20120A*), полиморфизм генов гликопротеина *GPIIIa*, β -субъединицы фибриногена, ингибитора активатора плазминогена (*PAI-1*) и метилентетрагирофолат редуктазы (*MTHFR*).

Определение мутации *V617F* в гене *JAK2* проводили методом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ).

Определение процентного содержания мутантного аллеля *JAK2V617F* в образце (аллельная нагрузка) проводили с использованием «Набора реагентов для обнаружения мутации *JAK2V617F* («Синтол», Россия) согласно прилагаемой инструкции.

В работе исследован аллельный полиморфизм бти генов - Лейденская мутация в гене фактора V, мутация в гене протромбина (*FII G20120A*), полиморфизм генов гликопротеина *GPIIIa*, β -субъединицы фибриногена, ингибитора активатора плазминогена (*PAI-1*) и метилентетрагидрофолат редуктазы (*MTHFR*). Характеристика и использованные методы идентификации изученных ДНК-полиморфизмов, с указанием оригинального источника, представлены в таблице 2. Амплификацию участков геномной ДНК, содержащих указанные полиморфизмы, осуществляли на основе технологии полимеразной цепной реакции (ПЦР). Идентификацию аллельных вариантов осуществляли с помощью анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов ПЦР-продукта (метод ПЦР-ПДРФ).

Таблица 2 – Исследованные ДНК-полиморфизмы генов и методы их идентификации

Ген (условное обозначение)	Локализация	Полиморфизм	Метод	Источник
Фактор I, β -субъединица (<i>FI</i>) (фибриноген)	4q28	-455 G/A	ПЦР- ПДРФ	Thomas A. et al., 1991
Фактор II (<i>FII</i>) (протромбин)	11p11-q12	20210 G/A	ПЦР- ПДРФ	Poort S.R. et al., 1996
Фактор V (<i>FV</i>) (Лейденская мутация)	1q23	1691 G/A	ПЦР- ПДРФ	Gandrille S. et al., 1995
Ингибитор активатора плазминогена типа I (<i>PAI-1</i>)	7q21.3-q22	-675 4G/5G	ПЦР- ПДРФ	Margaglione M. et al., 1997
Гликопротеин IIIa (<i>GpIIIa</i>)	17q21.32	1565 T/C	ПЦР- ПДРФ	Bray P.F. et al., 1994
Метилентетрагидрофолат редуктаза (<i>MTHFR</i>)	1p36.3	677 C/T	ПЦР- ПДРФ	Arruda V.R. et al., 1997

Статистическая обработка данных

Полученные в процессе выполнения работы клинические результаты обрабатывались с использованием программной системы STATISTICA for Windows (версия 10), Excel 2016 для Windows.

Сопоставление частотных характеристик (пол, жалобы, симптомы, наличие тромбозов, маркеры наследственной тромбофилии, исход в миелофиброз) качественных показателей проводилось с помощью комплекса непараметрических методов χ^2 , χ^2 с поправкой Йетса (для малых групп), критерия Фишера.

Сравнение количественных параметров (возраст, период наблюдения больных, время до исхода в миелофиброз, параметры клинического анализа крови, уровень гомоцистеина и аллельной нагрузки *JAK2V617F*), в исследуемых группах осуществлялось с использованием критериев Манн-Уитни, медианного теста хи-квадрат и модуля ANOVA [Реброва О.В., 2002; Юнкеров В.И. и др., 2005].

Доверительные интервалы принципиально важных показателей в выводах рассчитывались на основе углового преобразования Фишера.

Пороговое значение показателей исследовалось с помощью метода построения классификационных деревьев и ROC-анализа.

Анализ выживаемости в соответствии с целями и задачами исследования проводился нами на основе подходов к оценке функции выживания, называемой множительной оценкой, впервые предложенной Капланом и Мейером (1958). Для сравнения нескольких групп использовался многовыборочный критерий, который представляет собой развитие критерия Вилкоксона, обобщенного Геханом, критерия Вилкоксона, обобщенного Пето, и логарифмически рангового критерия.

Визуализацию структуры исходных данных и полученных результатов их анализа проводили с помощью графических возможностей системы Statistica for Windows и модуля построения диаграмм системы Microsoft Office.

Критерием статистической достоверности получаемых выводов мы считали общепринятую в медицине величину $p < 0,05$. Устойчивый вывод о наличии или отсутствии достоверных различий мы формулировали тогда, когда мы имели одинаковые, по сути, результаты по всему комплексу применявшихся критериев.

Результаты исследования

Влияние клинических и молекулярно-генетических характеристик истинной полицитемии на частоту тромботических осложнений, ответ на терапию, развитие постполицитемического миелофиброза и выживаемость больных

Факторы, влияющие на развитие постполицитемического миелофиброза

Для решения данной задачи был проведен ретроспективный анализ по оценке факторов, влияющих на развитие постполицитемического миелофиброза у больных ИП.

Больные были разделены на 2 группы: группа 1 – у которых на определенном этапе течения болезни констатирован исход в миелофиброз; группа 2 – у которых заболевание протекало без развития постполицитемического миелофиброза.

Время до исхода в миелофиброз рассчитывалось от момента постановки диагноза ИП до подтверждения развития постполицитемического миелофиброза методом трепанобиопсии. Группа больных с исходом в миелофиброз состояла из 23 пациентов. Медиана времени до исхода в миелофиброз составила 12,8 (6,4 – 30,1) года.

Были проанализированы следующие факторы: возраст, пол, уровни эритроцитов, гематокрита, лейкоцитов, тромбоцитов, аллельной нагрузки *JAK2V617F*, наличие спленомегалии в дебюте заболевания.

Статистически значимых различий по возрасту, полу, уровню гемоглобина, лейкоцитов, тромбоцитов, гематокрита, аллельной нагрузки *JAK2V617F* в исследованных группах получено не было.

По результатам анализа статистически значимые различия в группах были получены по уровню эритроцитов. Средний уровень эритроцитов в дебюте заболевания в группе больных с развитием в последующем постполицитемического миелофиброза оказался значимо выше ($7,6 \times 10^{12}/л$), чем у пациентов без развития миелофиброза ($7,1 \times 10^{12}/л$) ($p=0,029$).

Пороговое значение эритроцитов, полученное с помощью метода построения классификационных деревьев, составило $7,3 \times 10^{12}/л$.

Данные показателей уровня эритроцитов в дебюте заболевания в группах больных с развитием постполицитемического миелофиброза и без такового представлены на рисунке 1.

Группы отличались и по наличию спленомегалии в дебюте заболевания ($p=0,04$). В группе больных с развитием постполицитемического миелофиброза чаще (56,5%) выявлялась спленомегалия в дебюте заболевания, чем в группе больных без развития постполицитемического миелофиброза (33,2%). Данные представлены на рисунке 2.

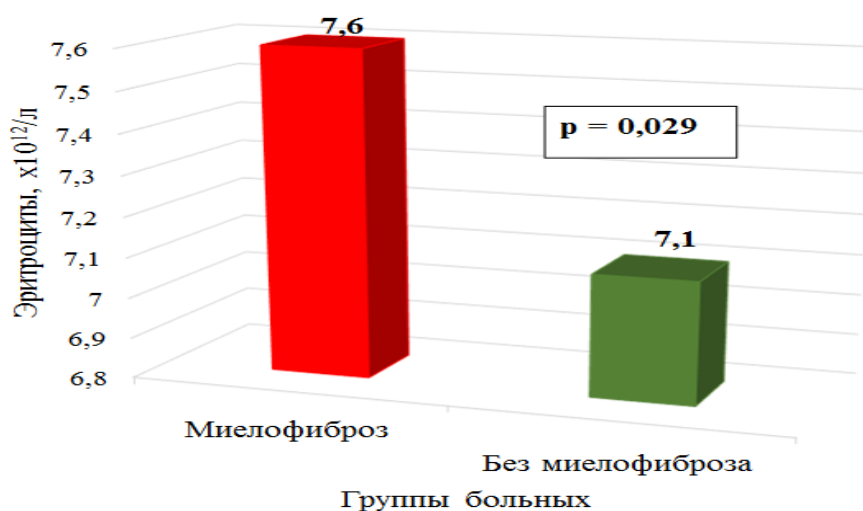


Рисунок 1 – Средние значения эритроцитов в дебюте заболевания в группах больных ИП с развитием в последующем миелофиброза и пациентов с ИП без постполицитемического миелофиброза

Различия, полученные в группах больных по уровню эритроцитов и наличию спленомегалии в дебюте ИП, свидетельствуют о взаимосвязи данных клинических параметров с развитием постполицитемического миелофиброза. Соответственно, содержание эритроцитов более $7,3 \times 10^{12}/л$ и наличие спленомегалии в дебюте заболевания могут быть рассмотрены как факторы риска развития постполицитемического миелофиброза.

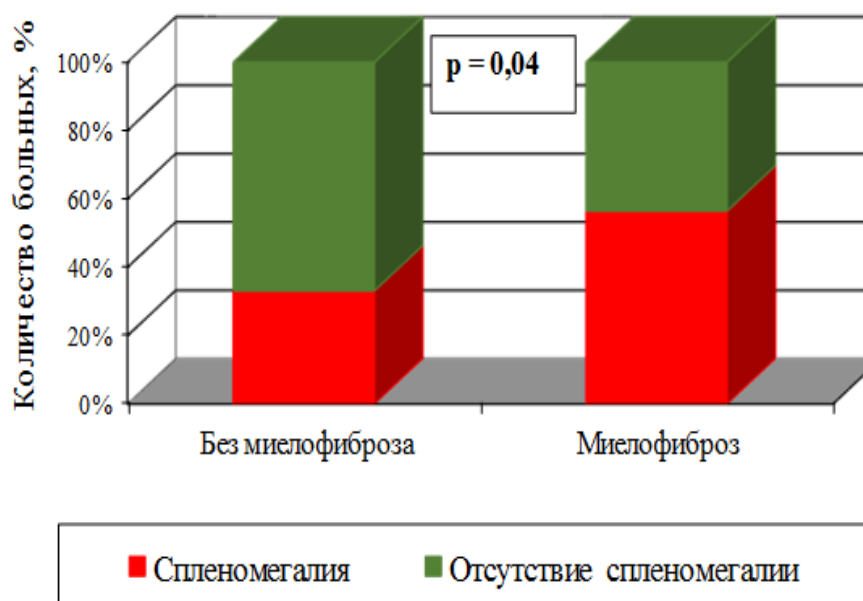


Рисунок 2 – Спленомегалия в дебюте заболевания в группах больных ИП с последующим развитием постполицитемического миелофиброза и без него

Факторы, влияющие на общую выживаемость больных ИП

В исследовании проанализировано влияние клинических (уровни гемоглобина, эритроцитов, гематокрита, лейкоцитов, тромбоцитов, спленомегалии) и молекулярно-генетических (аллельной нагрузки *JAK2V617F*) факторов в дебюте заболевания на общую выживаемость.

Общая выживаемость в исследуемой выборке представлена на рисунке 3. Медиана общей выживаемости не была достигнута.

Из всех исследованных факторов, достоверная взаимосвязь получена между общей выживаемостью и содержанием лейкоцитов в дебюте заболевания.

Для определения порогового значения уровня лейкоцитов был проведен ROC-анализ, по результатам которого было установлено значение уровня лейкоцитов, имеющее наилучший баланс чувствительности и специфичности – $11,0 \times 10^9/\text{л}$. По результатам ROC-анализа пациенты были разделены на группы по уровню лейкоцитов: 1-я группа – более $11,0 \times 10^9/\text{л}$, 2-я группа – менее $11,0 \times 10^9/\text{л}$. В результате проведенного анализа были получены данные о том, что у пациентов 2-й группы общая выживаемость достоверно выше, чем у пациентов 1-й группы ($p=0,03$) (рисунок 4).

Соответственно, уровень лейкоцитов более $11,0 \times 10^9/\text{л}$ в дебюте ИП может быть рассмотрен как неблагоприятный прогностический фактор, влияющий на общую выживаемость больных ИП.

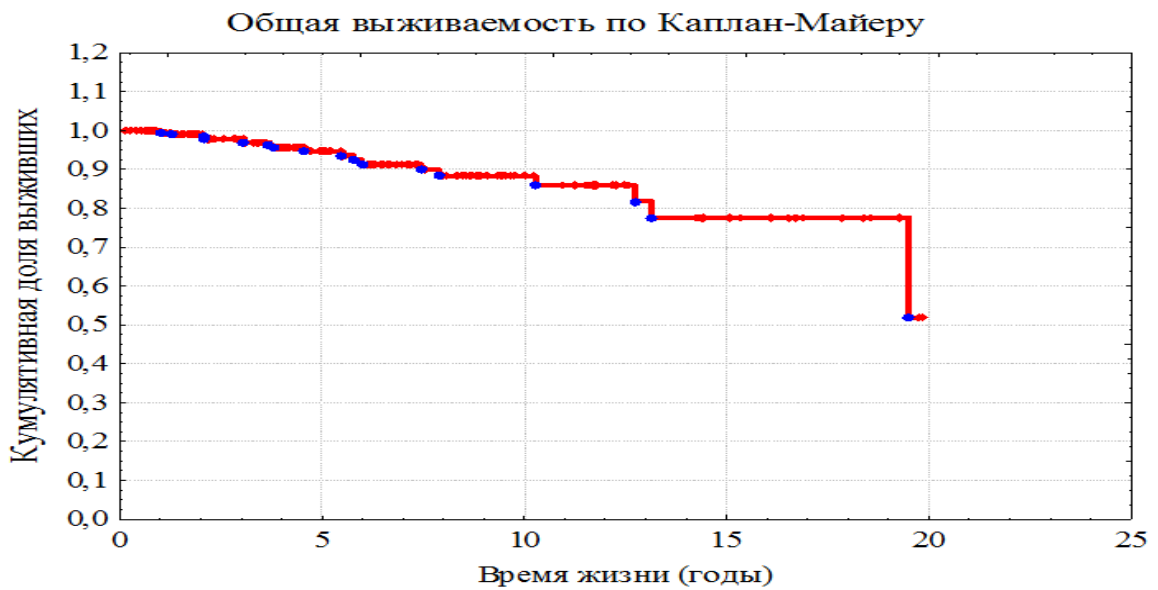


Рисунок 3 – Общая выживаемость больных ИП в исследуемой выборке

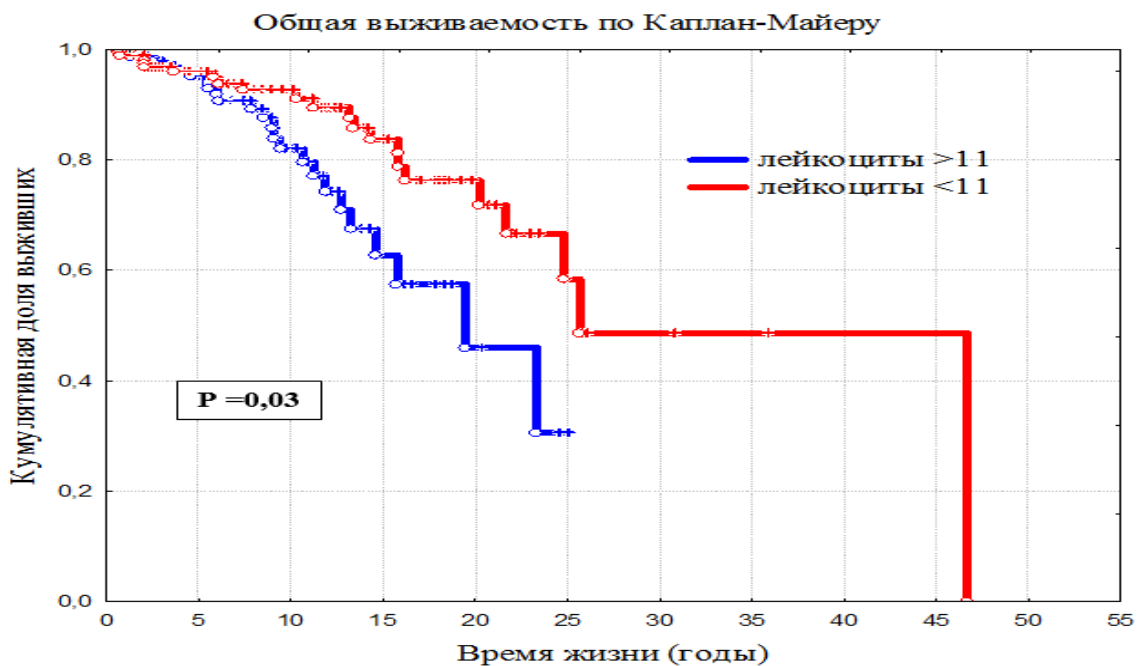


Рисунок 4 – Общая выживаемость больных ИП, разделенных на группы по уровню лейкоцитов

Оценка влияния клинических и молекулярно-генетических факторов на результаты терапии

Для выявления факторов, влияющих на результаты проводимой терапии, больные были разделены на группы в зависимости от ответа на лечение согласно критериям ELN 2014 [Barosi G. et al., 2009]: группа 1 – с полным гематологическим ответом, группа 2 – с частичным гематологическим ответом и группа 3 – с отсутствием ответа на проводимую терапию. В этих группах были изучены показатели клинического анализа крови, возраст, наличие спленомегалии.

Больные получали следующие виды терапии: 1 – монотерапия гидроксикарбамидом 174 (80,6%) больных, 2 – монотерапия препаратами α -интерферона 3 (1,4%) пациентов, 3 – монотерапия методами удаления избыточной клеточной массы (эритроцитаферез, гемоксфузии) 21 (9,7%) больной, 4 - сочетанная терапия гидроксикарбамидом и препаратами α -интерферона 18 (8,3%) пациентов. Средняя суточная дозировка гидроксикарбамида составила 0,8 г в сутки, α -интерферона – 9 млн. МЕ в сутки. Больным, получающим терапию гидроксикарбамидом и препаратами интерферона, при необходимости также проводили процедуры эритроцитафереза (гемоксфузий), антиагрегантную терапию получали почти все больные (98%).

При оценке результатов терапии согласно рекомендациям ELN (2014) полного клинико-гематологического ответа (ПГО) достигли 33 (15,3%) больных, частичного клинико-гематологического ответа – 119 (54,6%) пациентов, отсутствие ответа (НО) констатировано у 64 (30,1%) больных.

Статистически значимых различий в группах по возрасту, количеству лейкоцитов, эритроцитов, тромбоцитов, гемоглобина, гематокрита в дебюте заболевания получено не было.

Статистически значимые различия в группах были получены по наличию спленомегалии в дебюте заболевания. В группе больных с отсутствием ответа на терапию спленомегалия встречалась достоверно чаще (53,1%) чем в группе с полным гематологическим ответом (15,2%) ($p < 0,0004$). Между группами с полным гематологическим ответом и частичным гематологическим ответом получены статистические тенденции по наличию спленомегалии ($p = 0,08$). В группе больных с частичным гематологическим ответом спленомегалия в дебюте заболевания встречалась чаще (31,9%), чем в группе больных с полным гематологическим ответом (15,2%).

Частота встречаемости спленомегалии в группах больных в зависимости от ответа на терапию представлена на рисунке 5.

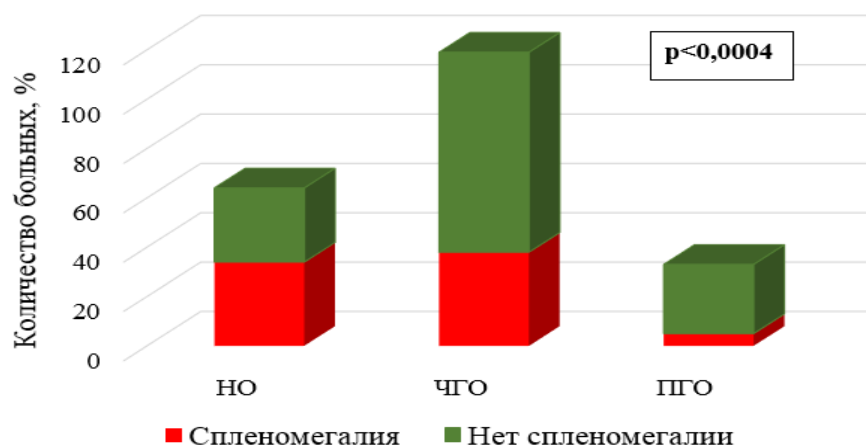


Рисунок 5 – Наличие спленомегалии в дебюте заболевания в группах больных истинной полицитемией в зависимости от ответа на терапию. Обозначения на рисунке: НО – отсутствие ответа, ЧГО – частичный клинико-гематологический ответ, ПГО – полный клинико-гематологический ответ

Изучение степени влияния аллельной нагрузки *JAK2V617F* на течение и исход истинной полицитемии, в том числе на частоту развития тромботических осложнений

Для оценки влияния уровня аллельной нагрузки *JAK2V617F* на особенности течения ИП была выделена группа больных, у которых в дебюте заболевания была исследована аллельная нагрузка мутантного гена *JAK2V617F*.

Группа состояла из 146 пациентов, в том числе 62 мужчины и 84 женщины. Медиана возраста на момент постановки диагноза составила 62 года с интервалом от 29 до 85 лет.

Для оценки влияния аллельной нагрузки *JAK2V617F* на развитие вторичного миелофиброза выборка была разделена на 2 группы.

Группа 1 – больные ИП, у которых на определенном этапе заболевания констатирован исход в постполицитемический фиброз (подтвержденный методом трепанобиопсии), группа состояла из 14 больных. Медиана времени до исхода в постполицитемический миелофиброз составила 10,0 (от 6,0 до 30,1) лет.

Группа 2 – пациенты, у которых не наблюдался исход во вторичный миелофиброз. Средний уровень аллельной нагрузки в дебюте заболевания в группе больных без развития вторичного миелофиброза составил 57,1% (95% д.и. 50,7 – 63,6), в группе больных с развитием постполицитемического миелофиброза 68,1% (95% д.и. 34,4 – 101,8). Данные представлены на рисунке 6.

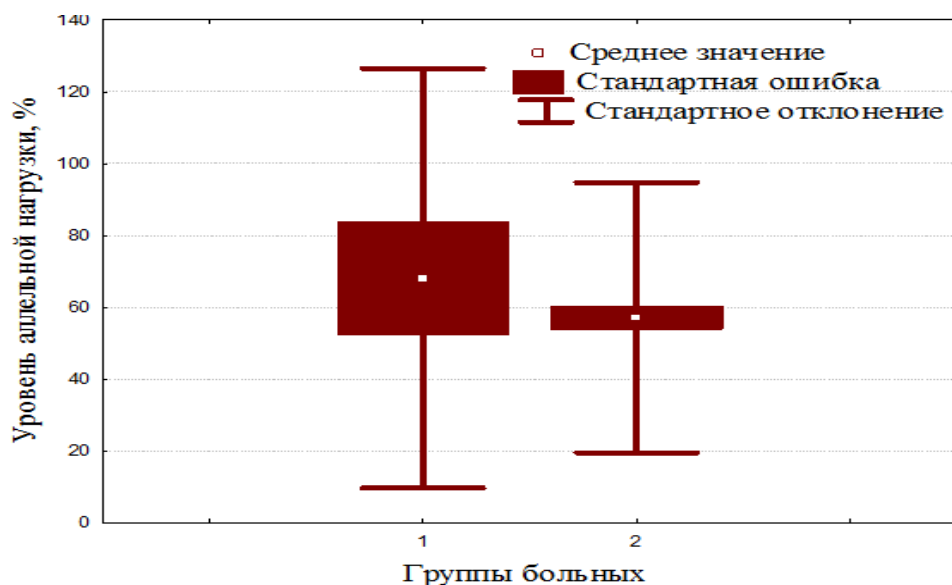


Рисунок 6 – Уровень аллельной нагрузки *JAK2V617F* у больных ИП с постполицитемическим миелофиброзом и без. Обозначение: 1 группа – больные с развитием постполицитемического миелофиброза, 2 группа – больные без постполицитемического миелофиброза

Для оценки взаимосвязи между уровнем аллельной нагрузки *JAK2V617F* и развитием тромботических осложнений больные были разделены на группы в зависимости от наличия тромбозов.

Группа больных с тромбозами (группа 1) состояла из 34 больных, из них 26 артериальных тромбозов и 8 венозных. Средний уровень аллельной нагрузки *JAK2V617F* составил 54,8% (95% д.и. 45,5 – 64,1%). Группа больных без тромбозов включала 112 больных. Средний уровень аллельной нагрузки *JAK2V617F* в группе больных без тромбозов составил 59,2% (95% д.и. 51,1 – 67,3%).

По результатам проведенного регрессионного анализа статистически значимой взаимосвязи между уровнем аллельной нагрузки и тромботическими осложнениями ($p=0,57$) у больных ИП, а также развитием вторичного миелофиброза ($p=0,33$) получено не было.

Для оценки влияния уровня аллельной нагрузки *JAK2V617F* на результаты проводимой терапии, больные были разделены на группы в зависимости от ответа на лечение согласно

критериям ELN 2014: группа 1 – с полным клинико-гематологическим ответом (ПГО), группа 2 – с частичным клинико-гематологическим ответом (ЧГО) и группа 3 – с отсутствием ответа на проводимую терапию (НО).

Больные получали следующие виды терапии: монотерапия гидроксикарбамидом 117 (80,1%) больных, монотерапия препаратами α -интерферона 3 (2,1%) пациента, монотерапия методами удаления избыточной клеточной массы (эритроцитаферез, гемоксфузии) 14 (9,6%) больных, сочетанная терапия гидроксикарбамидом и препаратами α -интерферона – 12 (8,2%) пациентов. Больным, получающим терапию гидроксикарбамидом и препаратами интерферона, при необходимости также проводили процедуры эритроцитафереза (гемоксфузий).

При оценке результатов терапии согласно рекомендациям ELN (2014) полного клинико-гематологического ответа достигли 21 (14,4%) больных, частичного клинико-гематологического ответа – 86 (58,9%) пациентов, отсутствие ответа констатировано у 39 (26,7%) больных.

По результатам проведенного анализа в группе больных с ПО среднее значение уровня аллельной нагрузки *JAK2V617F* в дебюте заболевания составило 48,5%; в группе больных с ЧГО – 57,6%; в группе больных НО – 64,5%.

Среднее значение уровня аллельной нагрузки *JAK2V617F* в группе больных с ПГО было достоверно ниже, чем в группе с отсутствием ответа ($p < 0,04$). Результаты представлены на рисунке 7.

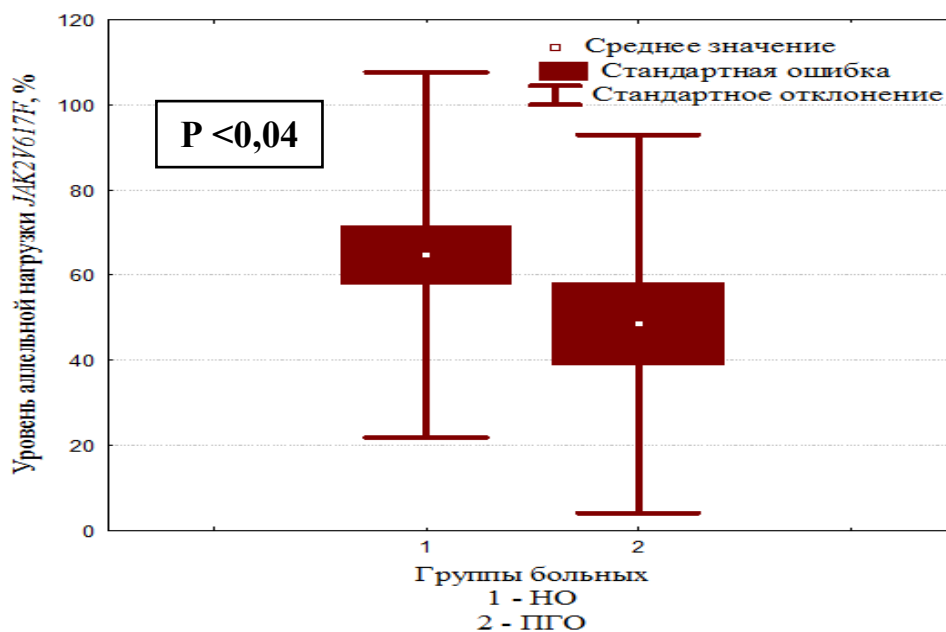


Рисунок 7 – Уровень аллельной нагрузки *JAK2V617F* в группах больных истинной полицитемией с полным клинико-гематологическим (ПГО) ответом и отсутствием ответа (НО)

Статистические тенденции по уровню аллельной нагрузки *JAK2V617F* наблюдались в группах с частичным и полным клинико-гематологическим ответом ($p = 0,1$). В группе больных с частичным клинико-гематологическим ответом уровень аллельной нагрузки *JAK2V617F* был выше (57,6%), чем в группе больных полным клинико-гематологическим ответом (48,5%).

Для определения порогового значения уровня аллельной нагрузки *JAK2V617F* был проведен ROC-анализ, по результатам которого было установлено значение уровня аллельной нагрузки *JAK2V617F*, имеющее наилучший баланс чувствительности и специфичности – 50%.

Оценка риска тромбообразования у больных истинной полицитемией с учетом генетических особенностей системы гемостаза

Группа состояла из 116 пациентов, в том числе 51 мужчина и 65 женщин. Медиана возраста на момент постановки диагноза составила 59 лет с интервалом от 23 до 81 года. Выделены группы больных ИП с тромбозами в анамнезе (ИПТр+) и без таковых (ИПТр-), проведено их сравнение с контрольной группой (КГ). Группа больных с тромбозами была разделена на 2 подгруппы: с артериальными (ИПТрА) и венозными (ИПТрВ) тромбозами. Произведено сравнение этих групп с группой больных ИП без тромбозов, с КГ и между собой. У 36 больных был исследован уровень гомоцистеина.

Тромботические осложнения наблюдались у 42 больных (36,2%), в том числе у 31 артериальный и 11 – венозный тромбозы, 13 (11,2%) больных перенесли инфаркт миокарда (ОИМ) (из них у 2 пациентов повторные инфаркты), 17 (14,7%) пациентов имели острое нарушение мозгового кровообращения (ОНМК) (у 4 пациентов наблюдались повторные эпизоды ОНМК). У одного пациента произошел тромбоз пальцевых артерий кисти, у одной пациентки помимо ОИМ, также имел место тромбоз левой подошвенной артерии. У 11 пациентов наблюдались повторные тромбозы.

Характеристики и различия по частоте выявления протромботических вариантов аллельных полиморфизмов исследуемых генов между общей группой больных ИП и КГ в таблице 3.

Таблица 3 – Сравнение частоты встречаемости аллельных полиморфизмов в общей группе больных истинной полицитемией и контрольной группе

		Частота встречаемости генотипа, % (n)		P
		Группа больных ИП (n=116)	Контрольная группа (n=228)	
Фактор V (<i>FV</i>) (Лейденская мутация)	GA	1,7 (2)	4,4 (10)	0,17
	GG	98,3 (114)	95,6 (218)	
Протромбин	GA	1,7 (2)	2,2 (5)	0,56
	GG	98,3 (114)	97,8 (223)	
<i>MTHFR</i>	TT+CT	60,3 (70)	49,6 (113)	0,04
	CC	39,7 (46)	50,4 (115)	
Фактор I (<i>FI</i>) (фибриноген)	AA+GA	50 (58)	44,3 (101)	0,19
	GG	50 (58)	55,7 (127)	
Ингибитор активатора плазминогена (<i>PAI-1</i>)	4G4G+4G5G	83,6 (97)	82,4 (188)	0,47
	5G5G	16,4 (19)	17,6 (40)	
Гликопротеин IIIA (<i>GP3a</i>)	CC+TC	19 (27)	32,9 (75)	0,04
	TT	81 (89)	67,1 (153)	

Примечание: протромботический вариант аллельных полиморфизмов генов в таблицах выделен жирным шрифтом

Характеристики и различия по частоте выявления протромботических вариантов аллельных полиморфизмов исследуемых генов между группой больных ИП с наличием тромбозов в анамнезе и КГ представлены в таблице 4.

Согласно полученным данным между группой больных ИП и контрольной группой статистически значимые различия получены в генах *MTHFR* и *GP3a* ($p < 0,05$). Между группой больных ИП с тромбозами и контрольной группой статистически значимо различалась частота встречаемости протромботических вариантов гена *MTHFR* ($p = 0,03$).

Протромботические варианты гена *MTHFR* значительно чаще встречались в общей группе больных ИП, а также в группе больных ИП с тромбозами по сравнению с контрольной группой, что может свидетельствовать о клинической значимости наличия протромботического варианта гена *MTHFR* в развитии тромбозов у больных ИП.

Более высокая частота встречаемости протромботического варианта гена *GP3a* в контрольной группе по сравнению с группой больных ИП не позволяет сделать определенных выводов и требует дальнейшего изучения.

Статистические тенденции ($p=0,13$) были получены при сравнении частоты встречаемости мутаций генов *FV* (Лейденская мутация) и протромбина при сравнении групп больных ИП с тромбозами и без таковых. Мутации в гене *FV* и гене протромбина чаще встречались в группе больных с тромбозами.

Таблица 4 – Сравнение частоты встречаемости аллельных полиморфизмов в группе больных истинной полицитемией с тромбозами и в контрольной группе

		Частота встречаемости генотипа, % (n)		P
		Группа больных ИП с тромбозами (n=41)	Контрольная группа (n=228)	
Фактор V (<i>FV</i>) (Лейденская мутация)	GA	4,8 (2)	4,4 (10)	0,58
	GG	95,2 (40)	95,6 (218)	
Протромбин	GA	4,8 (2)	2,2 (5)	0,3
	GG	95,2 (40)	97,8 (223)	
<i>MTHFR</i>	TT+CT	66,7 (28)	49,6 (113)	0,03
	CC	33,3 (14)	50,4 (115)	
Фактор I (<i>FI</i>) (фибриноген)	AA+GA	50 (21)	44,3 (101)	0,3
	GG	50 (21)	55,7 (127)	
Ингибитор активатора плазминогена (<i>PAI-1</i>)	4G4G+4G5G	81 (34)	82,4 (188)	0,48
	5G5G	19 (8)	17,6 (40)	
Гликопротеин IIIA (<i>GP3a</i>)	CC+TC	19 (8)	32,9 (75)	0,06
	TT	81 (34)	67,1 (153)	

Сравнение частоты встречаемости протромботических вариантов генов в группах с артериальными тромбозами, венозными тромбозами и группой больных ИП без тромбозов представлены в таблице 5.

Статистические тенденции получены по частоте встречаемости мутации в гене протромбина ($p=0,08$) и протромботического варианта гена *MTHFR* ($p=0,07$) между группами с артериальными тромбозами и группой больных без тромбозов. В группе больных с артериальными тромбозами частота встречаемости данных полиморфизмов была выше, чем в группе больных ИП без тромботических осложнений.

Статистически значимые различия ($p=0,02$) получены по частоте встречаемости Лейденской мутации между группой больных с венозными тромбозами и группой больных ИП без тромбозов. В группе больных с венозными тромбозами частота встречаемости данной мутации была выше, чем в группе больных без тромбозов.

Между группами больных с артериальными и венозными тромбозами статистические тенденции получены по частоте встречаемости Лейденской мутации ($p=0,06$) и

протромботическим вариантам гена *MTHFR* ($p=0,09$). В группе больных с венозными тромбозами чаще встречалась Лейденская мутация, а в группе больных с артериальными тромбозами чаще наблюдали протромботический вариант гена *MTHFR*.

При сравнении группы больных ИП с артериальными тромбозами с контрольной группой получены статистически значимые различия по гену *MTHFR* ($p=0,007$), а при сравнении группы больных ИП с венозными тромбозами с КГ – статистические тенденции по гену *FV* ($p=0,09$). Полученные результаты детализируют предшествующие результаты исследования и подтверждают возможное влияние протромботического варианта гена *MTHFR* на развитие артериальных тромбозов, и значение Лейденской мутации в развитии венозных тромбозов у больных ИП. Кроме того, не исключается влияние мутации в гене протромбина на развитие артериальных тромбозов у больных ИП.

Таблица 5 – Частота встречаемости аллельных полиморфизмов в группах больных с артериальными (ИПТрА), венозными (ИПТрВ) тромбозами и группы больных истинной полицитемией без тромбозов (ИПТр-)

		ИПТрА (n=31)	ИПТр- (n=74)	р	ИПТрВ (n=11)	ИПТр- (n=74)	Р
Возраст, медиана (интервал)		59 (39-75)	59 (31-81)		46 (23-60)	59 (31-81)	
Мужчины		11	36	0,3	5	36	1,0
Женщины		20	39		6	39	
Фактор V (<i>FV</i>) (Лейденская мутация)	GA	0	0	1,0	2	0	0,02
	GG	31	74		9	74	
Протромбин	GA	2	0	0,08	0	0	1,0
	GG	29	74		11	74	
<i>MTHFR</i>	TT+CT	23	42	0,07	5	42	0,35
	CC	8	32		6	32	
Фактор I (<i>FI</i>) (фибриноген)	AA+GA	16	37	0,5	5	37	0,51
	GG	15	37		6	37	
Ингибитор активатора плазминогена (<i>PAI-1</i>)	4G4G+4G5G	25	63	0,38	9	63	0,53
	5G5G	6	11		2	11	
Гликопротеин IIIА (<i>GP3a</i>)	CC+TC	6	19	0,34	2	19	0,45
	TT	25	55		9	55	

Группы больных ИП с тромбозами и без статистически значимо отличались друг от друга по уровню гомоцистеина ($p=0,0001$). В группе больных с тромбозами средний уровень гомоцистеина составил 16,5 мкмоль/л, в группе больных без тромбозов - 10,7 мкмоль/л. При сравнении групп больных с наличием полиморфизма гена *MTHFR* и без него также были получены статистически значимые различия по уровню гомоцистеина ($p=0,00007$). В группе больных с наличием протромботического варианта гена *MTHFR* он составил 16,5 мкмоль/л, а в группе с нормальным генотипом 10,3 мкмоль/л.

Новые прогностические факторы ответа на лечение, общей выживаемости и вероятности развития постполицитемического миелофиброза на основе клинических и молекулярно-генетических проявлений заболевания

Согласно полученным данным можно выделить особенности ИП в дебюте заболевания, оказывающие статистически значимое влияние на развитие постполицитемического миелофиброза:

- уровень эритроцитов более $7,3 \times 10^{12}/л$ увеличивает вероятность развития постполицитемического миелофиброза;
- наличие спленомегалии (пальпаторно или по данным ультразвукового исследования) является фактором, увеличивающим вероятность развития вторичного миелофиброза.

Пациенты с уровнем лейкоцитов менее $11 \times 10^9/л$ в дебюте заболевания отличались более продолжительной общей выживаемостью по сравнению с группой больных с уровнем лейкоцитов более $11 \times 10^9/л$ в дебюте заболевания ($p=0,03$).

Пациенты, у которых в дебюте заболевания уровень аллельной нагрузки составил более 50%, прогностически неблагоприятны в плане ответа на стандартное лечение.

У больных с отсутствием ответа спленомегалия имела место чаще (34 из 64х больных – 53,1%), чем в группе с ПГО (5 из 33х больных – 15,2%), что позволяет использовать спленомегалию в качестве неблагоприятного прогностического фактора ответа на терапию.

При оценке риска основной причины летальности – развития тромботических осложнений у больных ИП с учетом оценки генетического состояния системы гемостаза, были получены данные о том, что у больных ИП с тромбозами частота встречаемости протромботических вариантов гена *MTHFR* была выше (68,3%) по сравнению с контрольной группой (49,6%) ($p = 0,01$), а также у больных ИП с артериальными тромбозами (74,2%) по сравнению с контрольной группой (49,6%) ($p < 0,05$).

При сравнении групп больных с артериальными и венозными тромбозами, частота встречаемости протромботического варианта гена *MTHFR* была выше (74,2%), чем у больных с венозными тромбозами (50%), но не достигла уровня статистической значимости, вероятно, в связи с количеством наблюдений в сравниваемых выборках ($p=0,09$).

Были также получены данные о значении Лейденской мутации и мутации в гене протромбина в развитии тромботических осложнений у больных ИП. В группе больных с венозными тромбозами частота встречаемости мутации в гене *FV* (Лейденской мутации) была значимо ($p=0,02$) выше (18,2%) по сравнению с группой больных ИП без тромбозов (0%), а также выше, чем в группе больных с артериальными тромбозами (0%) ($p=0,06$), и в КГ (4,4%) ($p=0,09$). Частота встречаемости мутации в гене протромбина была выше (6,5%) в группе больных ИП с артериальными тромбозами в анамнезе, по сравнению с группой больных ИП без тромбозов (0%) ($p=0,08$).

Помимо этого, уровень гомоцистеина в группе больных с протромботическим вариантом гена *MTHFR* (16,5 мкмоль/л) был значимо выше, чем у больных без данного полиморфизма (10,3 мкмоль/л) ($p=0,0001$). Также в группе больных с тромбозами уровень гомоцистеина (16,5 мкмоль/л) был значимо выше, чем в группе больных без тромбозов (10,7 мкмоль/л) ($p=0,00007$). Полученные данные позволяют рассматривать наличие протромботического варианта гена *MTHFR*, мутаций в гене *FV* и гипергомоцистеинемию как факторы риска развития тромботических осложнений у больных ИП.

В зависимости от наличия тех или иных факторов риска, необходимо индивидуальное решение вопроса о ведении больного с ИП. В том числе, решение вопроса о более агрессивной стандартной циторедуктивной терапии, индивидуальном подходе к антиагрегантной и антикоагулянтной терапии в зависимости от генетического состояния системы гемостаза и наличия тромботических событий, а также при отсутствии ответа на стандартную терапию или развитии постполицитемического миелофиброза, своевременное назначение таргетной терапии.

На рисунке 8 представлен предлагаемый нами алгоритм ведения больных ИП в зависимости от клинических и молекулярно-генетических факторов.

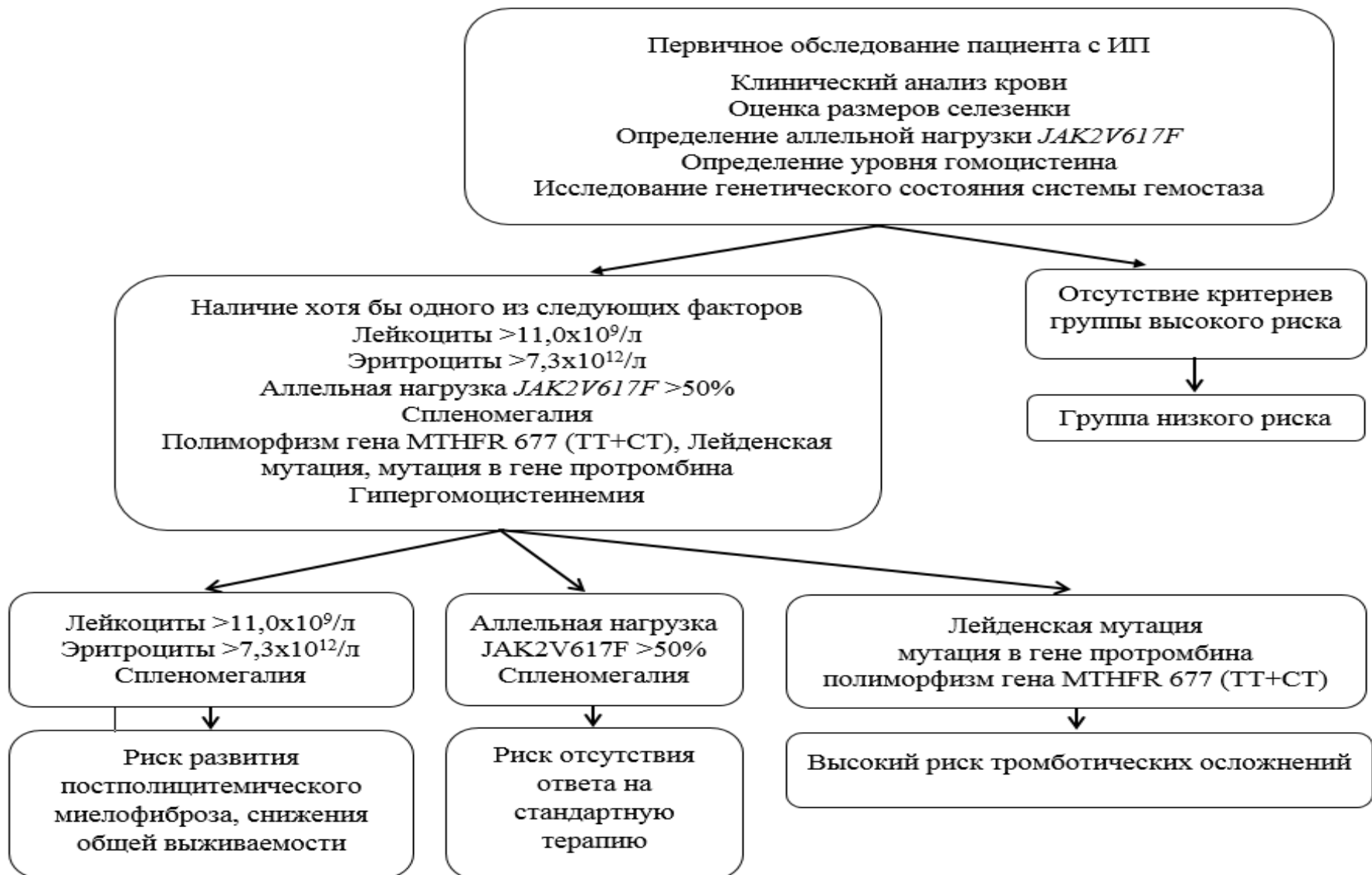


Рисунок 8 – Алгоритм оценки риска у больных ИП с учетом клинических и молекулярно-генетических факторов

Выводы

1. Больные истинной полицитемией, испытывающие развитие постполицитемического миелофиброза, имеют более высокий уровень эритроцитов в дебюте заболевания ($p=0,04$) (пороговый уровень эритроцитов $7,3 \times 10^{12}/л$) и чаще спленомегалию ($p=0,029$), чем больные со стабильным хроническим течением заболевания. Пациенты, страдающие истинной полицитемией с уровнем лейкоцитов при первичной диагностике менее $11,0 \times 10^9/л$ имеют более высокую общую выживаемость ($p=0,03$) по сравнению с больными, у которых уровень лейкоцитов в дебюте заболевания составил более $11,0 \times 10^9/л$. Частота спленомегалии при первичном обследовании у больных истинной полицитемией с отсутствием гематологического ответа на проводимую терапию был выше ($p=0,0004$), чем у больных с полным гематологическим ответом.

2. Пациенты с истинной полицитемией, не имеющие гематологического ответа на лечение, имеют уровень аллельной нагрузки *JAK2V617F* в дебюте заболевания выше ($p<0,04$) (пороговый уровень 50%), чем больные, достигающие в результате лечения полного гематологического ответа.

3. Установлено наличие ассоциативной связи между носительством аллеля *1691A* гена фактора *V*, *677T* гена *MTHFR*, уровнем гомоцистеина и риском развития тромботических осложнений у больных ИП.

4. Уровень лейкоцитов более $11,0 \times 10^9/л$, эритроцитов – более $7,3 \times 10^{12}/л$, аллельная нагрузка *JAK2V617F* более 50%, спленомегалия, полиморфизм гена *MTHFR* *677* (ТТ+СТ), полиморфизм *1691A* гена фактора *V* (Лейденская мутация), гипергомоцистеинемия являются прогностически неблагоприятными факторами клинического течения и эффективности терапии истинной полицитемии.

Практические рекомендации

1. У больных истинной полицитемией с уровнем эритроцитов более $7,3 \times 10^{12}/л$ и спленомегалией в дебюте заболевания необходимо учитывать высокий риск развития постполицитемического миелофиброза, уменьшение общей выживаемости можно ожидать у пациентов с истинной полицитемией, имеющих уровень лейкоцитов в дебюте заболевания более $11,0 \times 10^9/л$.

2. В дебюте заболевания у больных истинной полицитемией необходимо исследовать уровень аллельной нагрузки *JAK2V617F*, уровень более 50% рекомендуется рассматривать в качестве неблагоприятного прогностического фактора ответа на терапию.

3. Больным истинной полицитемией целесообразно определять профиль генов фактора *V*, протромбина, метилентетрагидрофолатредуктазы, и уровень гомоцистеина. При наличии варианта *677T* гена *MTHFR* *677*, мутации в гене *FV* (Лейденской мутации), повышении уровня гомоцистеина необходимо расценивать таких пациентов с истинной полицитемией как имеющих высокий риск развития тромботических осложнений.

4. В клинической практике при ведении больных истинной полицитемией целесообразно использовать разработанный алгоритм определения прогноза ответа на лечение, общей выживаемости, рисков тромботических осложнений и вероятности развития постполицитемического миелофиброза, основанный на клинических и молекулярно-генетических характеристиках истинной полицитемии.

Список работ по теме диссертации, опубликованных в рецензируемых научных изданиях

1. Шихбабаева, Д.И. Таргетная терапия больных истинной полицитемией / Д.И. Шихбабаева, В.А. Шуваев, И.С. Мартынкевич и др. // Вопросы онкологии. – 2016. – Т.62, № 4. – С. 386-393.
2. Шихбабаева, Д.И. Генетические маркеры наследственной тромбофилии и риск тромботических осложнений у больных истинной полицитемией / Д.И. Шихбабаева, Л.Б. Полушкина, В.А. Шуваев и др. // Клиническая онкогематология. – 2017. – Т. 10, №1. – С. 85 – 92.

Список работ, опубликованных в других изданиях

1. Shikhabaeva, D.I. Polycythemia Vera - Analysis of Diagnostic and Treatment Results on Population Level / D.I.Shikhabaeva, V. A. Shuvaev, I. S. Martynkevich et al. // ELN Frontiers Meeting «Where science meets clinical practice» . – 2014. – Abstract book. – P. 36.
2. Абдулкадыров, К.М. Современные представления о диагностике и лечении истинной полицитемии / К.М. Абдулкадыров, В. А. Шуваев, И. С. Мартынкевич и др. // Вестник Гематологии. – 2015. – Т.11, №1. – С. 4-46.
3. Shikhabaeva, D.I. Clinical characteristics of Polycythemia Vera patients, receiving different types of therapy // D.I. Shikhabaeva, V.A. Shuvaev, I.S. Martynkevich et al. // 20th Congress of European Hematology Association, 11-14 June 2015, Vienna, Austria, E1352. Haematologica. – Vol. 100(s1) – June 2015. – P. 541.
4. Шихбабаева, Д.И. Собственный опыт наблюдения и лечения больных истинной полицитемией / Д.И. Шихбабаева, В.А. Шуваев, И.С. Мартынкевич и др. // Вестник гематологии. – 2015. – Т. 11, № 4. – С. 13-20
5. Shikhabaeva D. The influence of hemostasis genetic features on thrombosis rates in patients with polycythemia vera / D.I.Shikhabaeva, V.A. Shuvaev, S.I. Kapustin et al. // Blood (57th ASH Annual Meeting Abstracts). – 2015. – Vol. 126, №23. – P. 5180
6. Shikhabaeva, D. Influence of JAK2V617F allele burden on hematological response in the treatment of polycythemia vera / D. Shikhabaeva, V. Shuvaev, R. Golovchenko // Blood. – 2016. – Vol. 128. – P. 5475.

Список сокращений и условных обозначений

ВОЗ	Всемирная организация здравоохранения
ИП	истинная полицитемия
МПН	миелопролиферативное новообразование
НО	отсутствие клинико-гематологического ответа
НТ	наследственная тромбофилия
ОИМ	острый инфаркт миокарда
ОНМК	острое нарушение мозгового кровообращения
ПГО	полный клинико-гематологический ответ
ПМФ	первичный миелофиброз
ПЦР	полимеразная цепная реакция
ЧГО	частичный клинико-гематологический ответ
<i>FI</i>	ген фибриногена
<i>FII</i>	ген протромбина
<i>FV</i>	ген фактора 5
<i>GPIIIa</i>	ген тромбоцитарного рецептора фибриногена
JAK2	янускиназа
<i>JAK2V617F</i>	мутация в гене янускиназы рецепторов цитокинов
<i>MTHFR</i>	ген метилентетрагидрофолат редуктазы
<i>PAI-1</i>	ген ингибитора активатора плазминогена