

ХАРАКТЕРИСТИКА МУТАЦІЙ КІНАЗНОГО ДОМЕНУ ГЕНА *BCR/ABL1* У ПАЦІЄНТІВ З ХРОНІЧНОЮ МІСЛОЇДНОЮ ЛЕЙКЕМІЄЮ, ПЕРВИННО РЕЗИСТЕНТНИХ ДО ТЕРАПІЇ ІМАТИНІБОМ

І. В. ДМИТРЕНКО, Ж. М. МІНЧЕНКО, І. С. ДЯГІЛЬ

Державна установа «Національний науковий центр радіаційної медицини НАМН України»,
вул. Мельникова 53, м.Київ,
e-mail: iryna.v.dmytrenko@gmail.com

Розвиток хронічної мієлоїдної лейкемії (ХМЛ) пов'язують з формуванням химерного гену *BCR/ABL1* та протеїну *BCR/ABL1* з підвищеною тирозинкіназою активністю. Незважаючи на високу ефективність таргетної терапії, до 30% пацієнтів не відповідають на таку терапію і вважаються первинно резистентними. Однією з причин резистентності до терапії інгібіторами тирозинкіназ вважають наявність мутацій в кіназному домені гену *BCR/ABL1*. З метою визначення частоти та спектру мутацій кіназного домену гену *BCR/ABL1* в українській когорті пацієнтів з ХМЛ, первинно резистентних до терапії іматинібом, ретроспективно досліджували мутації кіназного домену гену *BCR/ABL1* у зразках периферичної крові 107 пацієнтів з ХМЛ. Нуклеотидну послідовність визначали методом прямого секвенування за Сангером. Мутації було виявлено у 45 із 107 (41,7%) пацієнтів з ХМЛ. У 8 пацієнтів одночасно реєструвалися по дві мутації, тому всього було виявлено 53 мутації. В 49 випадках це були місенс-мутації та у 4 випадках – делеції різних ділянок кіназного домену гену *BCR/ABL1*. Найчастіше зустрічалися місенс-мутації F359I/V (12 пацієнтів), T315I (8 пацієнтів) та G250E (6 пацієнтів). За локалізацією більшість мутацій (23 з 53) була розташована в зоні Р-петлі, 10 мутацій належало до області контактного сайту, 13 – до каталітичного домену та 6 – до регіону А-петлі. Серед виявлених мутацій 26 (49%) призводили до порушення водневого зв'язку між *BCR/ABL1*-тирозинкіназою та іматинібом. Виявлено статистично значуще скорочення загальної виживаності у пацієнтів з мутаціями кіназного домену гену *BCR/ABL1* порівняно із пацієнтами з диким типом гену *BCR/ABL1* ($p = 0,018$). Розрахована 3-річна загальна виживаність складала 83,4% (95% ДІ: 77,0% - 89,8%) та 94,3 % (95% ДІ: 91,0% - 97,3%) відповідно. Отже, мутації кіназного домену гену *BCR/ABL1* є одним з механізмів розвитку первинної резистентності у хворих на ХМЛ, які отримують терапію іматинібом. Поява мутацій гену *BCR/ABL1* погіршує прогноз відповіді на терапію іматинібом та призводить до скорочення загальної виживаності пацієнтів.

Ключові слова: хронічна мієлоїдна лейкемія, резистентність, мутації *BCR/ABL1*, інгібітори тирозинкіназ.

Вступ. Хронічна мієлоїдна лейкемія (ХМЛ) є клональним мієлопроліферативним захворюванням, яке складає 20% вперше діагностованих випадків лейкемій у дорослих (Novak et al., 2017). Її розвиток пов'язують з появою транслокації між 9-ю та 22-ю хромосомами, що призводить до формування химерного гену *BCR/ABL1* та протеїну *BCR/ABL1* з підвищеною тирозинкіназою активністю (de Klein et al., 1982; Groffen et al., 1984). Застосування таргетної терапії, спрямованої на інгібування *BCR/ABL1* тирозинкінази, стало золотим стандартом у лікуванні ХМЛ. Проте, незважаючи на доведену високу ефективність інгібіторів тирозинкіназ (ІТК), показано, що до 30% пацієнтів не відповідають на таку терапію, тобто є первинно резистентними (Druker et al., 2006). Одним з основних механізмів розвитку резистентності до терапії ІТК вважають появу мутацій в кіназному домені гену *BCR/ABL1*. Таких мутацій на сьогодні описано понад 90 (Soverini et al., 2016). Проте більшість даних стосується вивчення ролі мутацій в розвитку вторинної (придбаної) резистентності (Soverini et

al., 2006; Puligundla et al., 2017), в той час, коли залишається невирішеним питання про частоту, спектр та значення мутацій кіназного домену гену *BCR/ABL1* в розвитку первинної резистентності. Відсутні дані щодо мутацій кіназного домену гену *BCR/ABL1* в українській когорті пацієнтів з ХМЛ, первинно резистентних до терапії ІТК.

Метою дослідження було визначення частоти та спектру мутацій кіназного домену гену *BCR/ABL1* в українській когорті пацієнтів з ХМЛ, первинно резистентних до терапії іматинібом.

Матеріали та методи. Мутації кіназного домену гену *BCR/ABL1* ретроспективно досліджували у зразках периферичної крові 107 пацієнтів з ХМЛ, у яких через 12 міс. терапії іматинібом рівень експресії химерного гену *BCR/ABL1* перевищував 1%. Відповідно до критеріїв ELNet таких пацієнтів вважали первинно резистентними до терапії іматинібом (Vaccarani et al., 2013). Пацієнтів було відібрано із групи хворих на ХМЛ, які перебували під наглядом або на консультативному прийомі у відділенні радіаційної онкогематології і трансплантації стовбурових клітин Інституту

клінічної радіології Національного наукового центру радіаційної медицини за період з 2008 по 2019 рр. та надали інформовану згоду на використання їх біоматеріалу у дослідженні.

Серед обстежених пацієнтів було 47 (43,9 %) чоловіків та 60 (56,1 %) жінок. Медіана віку пацієнтів на час встановлення діагнозу складала 41 рік (від 19 до 75 років). У 98 пацієнтів на момент обстеження встановлено хронічну фазу захворювання, у 6 – фазу акселерації, у 3 – фазу бластного кризу. Для визначення фази захворювання використовували критерії ELNet (Baccarani et al., 2013). Всі пацієнти з групи спостереження отримували іматиніб в дозі 400 мг/добу з подальшим підвищенням дози до 800 мг/добу. Медіана (Me) тривалості терапії іматинібом складала 34 міс. (3 – 157) міс. Більшість пацієнтів до призначення іматинібу отримували попереднє лікування різними препаратами (гідроксисечовина, бусульфан, інтерферон). Медіана терміну лікування до призначення ІТК становила 22 міс. (0 - 130 міс.).

Нуклеотидну послідовність кіназного домену гена *BCR/ABL1* у хворих на ХМЛ, які були первинно резистентними до терапії іматинібом, визначали методом прямого сиквенування за Сангером згідно Soverini S. et al., 2004. РНК виділяли з клітин периферичної крові за методикою Хомчинського (Chomczynski and Sacchi, 1987). Синтез комплементарної ДНК (кДНК) виконували за допомогою гексамерних праймерів та M-MuLV ревертази (Thermo Fisher, США). Кіназний домен *BCR/ABL1* ампліфікували методом «гніздової» зворотно-транскриптазної полімеразної ланцюгової реакції. На 1-му етапі використовували праймери: *GAG CAG CAG AAG AAG TGT TTC AGA* та *CTC TAG CAG CTC ATA CAC CTG GG*. На другому етапі використовували в якості матриці отриманий ампліфікат та дві пари праймерів: *CAT CAT TCA ACG TGT GCC GAC GG* та *GTT GCA CTC CCT CAG GTA GTC*, а також *GAA GAA ATA CAG CCT GAC GGT G* та *CGT CGG ACT TGA TGG AGA A* (Soverini et al., 2004). Система праймерів побудована так, що для сиквенсу ампліфікується ділянка гена ABL, тільки якщо вона є складовою химерного гена BCR/ABL, який відсутній в здорових клітинах. Дикий тип гена ABL, розташований на гомологічній хромосомі, не ампліфікується та не аналізується. Умови ПЛР в 1-му та 2-му раундах витримувалися згідно Soverini et al (Soverini et al., 2004). Реакція сиквенування здійснювалася з використанням комплексу BigDye Terminator Sequencing Kit (Applied Biosystems, США) згідно з протоколом виробника на генетичному аналізаторі ABI PRISM 310 (Applied Biosystems, США). Отримані нуклеотидні послідовності

порівнювали з референсною послідовністю кДНК гена ABL1 (GenBank Accession № NM_005157.6) (www.ensembl.org).

Різницю між змінними оцінювали за допомогою χ^2 -тесту та точного критерію Фішера для категоріальних та U-тесту Манна-Уїтні для безперервних змінних (Atramentova, 2015). Вірогідність загальної виживаності розраховували за методом Kaplan-Meier та порівнювали за допомогою log-rank тесту (Sharashova et al., 2017). Подією при розрахунку загальної виживаності вважали смерть на терапії ІТК. Розбіжності між параметрами, що порівнювалися, вважали статистично значущими при $p \leq 0,05$. Статистичний аналіз проводили з використанням пакету статистичних програм SPSS for Windows (версія 20.0).

Результати та їх обговорення. В результаті прямого сиквенування кіназного домену гена *BCR/ABL1* було виявлено мутації у 45 із 107 (41,7%) пацієнтів з ХМЛ, первинно резистентних до терапії іматинібом. У 8 пацієнтів одночасно реєструвалися по дві мутації, тому всього було виявлено 53 мутації. В 49 випадках це були місенс-мутації та у 4 випадках – делеції різних ділянок кіназного домену гена *BCR/ABL1*. В більшості випадків виявлялося 100 % мутантного транскрипту без залишкового транскрипту дикого типу. Проте в 6 випадках був присутній змішаний генотип з мутантного та дикого *BCR/ABL1* транскриптів. У всіх випадках делецій реєструвався також *BCR/ABL1* транскрипт дикого типу в різних співвідношеннях. Причиною такого змішаного генотипу при аналізі пухлинної тканини мола бути не тільки гетерозиготна форма мутантного аллелю, а й наявність клонів з мутованою та немutowаною формою гена *BCR/ABL1* (що є найбільш ймовірним). Навіть при можливій наявності гомозиготи за мутантним аллелем гена *BCR/ABL1* застосований метод сиквенсу за Сангером не дозволяє з впевненістю розрізнити гетерозиготи та клони з мутованою та немutowаною формою гена *BCR/ABL1*. Тому ми визначали присутність мутацій як 100% мутантний генотип та змішаний генотип (мутантний та дикий тип *BCR/ABL1*).

Найчастіше зустрічалися наступні місенс-мутації: у 12 пацієнтів с.1075T>A або с.1075T>G (F359I/V), у 8 пацієнтів с.944C>T (T315I) та у 6 пацієнтів с.749G>A (G250E). Аналіз локалізації виявлених мутацій свідчить про те, що більшість мутацій (23 з 53 виявлених мутацій) була розташована в зоні Р-петлі. Р-петля виконує функцію зв'язування з молекулою АТФ у нормальному білку ABL. Саме вона є мішенню для іматинібу. Мутації в Р-петлі перешкоджають ефективному зв'язуванню BCR/ABL1

тирозинкінази з іматинібом або так змінюють конформацію тирозинкінази, що вона стає нездатною взаємодіяти з іматинібом (Naqvi et al., 2018; Kaleem et al., 2015).

До області контактного сайту (так званої проміжної послідовності – T315, F317) належало 10 з 53 виявлених мутацій. В переважній кількості випадків (8 мутацій) зустрічалася мутація с.944C>T (T315I), відома як високо резистентна до сучасних ІТК, крім понатинібу (Xu et al., 2017).

В каталітичному домені (ділянка амінокислот від 351 до 359), в досліджуваній групі пацієнтів мутації виявлялися в двох позиціях (с.1052T>C (M351T) та F359I/V) у 13 з 53 пацієнтів. Найчастіше зустрічалась точкова мутація в позиції 359 (12 з 53 мутацій). У 3 пацієнтів фенілаланін в позиції 359 замінювався на ізолейцин (Phe→Ile359; F359I), а у 9 пацієнтів – на валін (Phe→Val359; F359V). Висока частота мутації F359I/V була специфічною для нашої когорти пацієнтів. В дослідженнях робочих груп, які включали від 76 до 297 пацієнтів (GIMEMA CML WP та ін.), мутація F359I/V визначалася від 7 до 11% (Soverini et al., 2006; Megyesi et al., 2012). Схожа поширеність мутації F359I/V (18%) визначалась тільки польською дослідницькою групою MAPTEST (Lewandowski et al., 2009).

До регіону А-петлі (ділянка амінокислот від 381 до 402) належало 6 з 53 виявлених мутацій (точкова місенс-мутація с.1187A>G (H396R) у 5 пацієнтів та делеція 23 амінокислот між аргініном в положенні 362 та серином в положенні 385 (R362_S385del) у одного пацієнта). Для А-петлі є характерним специфічне просторове розташування, що забезпечує неактивну

конформацію BCR/ABL1. В активній «відкритій» позиції А-петля розташована на відстані від каталітичного центру BCR/ABL1-кінази. Мутацій в цьому регіоні, як в Р-петлі, перешкоджають трансформації кінази у нектівну конформацію, яка необхідна для зв'язування з іматинібом. Враховуючи факт, що іматиніб взаємодіє лише з неактивною формою BCR/ABL1-кінази, такі конформаційні зміни призводять до зниження інгібування мутантного клону (Kaleem et al., 2015).

Серед виявлених мутацій 26 (49%) призводили до порушення водневого зв'язку між BCR/ABL1-тирозинкіназою та іматинібом. Інші мутації в більший чи менший мірі дестабілізували просторове розташування BCR/ABL1-кінази, що в свою чергу перешкоджало зв'язуванню з іматинібом.

При порівнянні груп пацієнтів з мутантним та диким типом гена *BCR/ABL1* не було виявлено статистично значущих розбіжностей за віком, статтю, тривалістю лікування до призначення іматинібу та появою мутацій (табл. 1).

Для визначення прогностичної значущості мутацій кіназного домену гена *BCR/ABL1* порівнювали загальну виживаність пацієнтів в обох групах спостереження методом Каплан-Майєр. Виявлено статистично значуще скорочення загальної виживаності у пацієнтів з мутаціями кіназного домену гена *BCR/ABL1* порівняно із пацієнтами з диким типом гена *BCR/ABL1* ($p = 0,018$) (Рис.1). Розрахована 3-річна загальна виживаність у пацієнтів з мутаціями гена *BCR/ABL1* складала 83,4% (95% ДІ: 77,0% - 89,8%), а в групі з диким типом гена *BCR/ABL1* - 94,3 % (95% ДІ: 91,0% - 97,3%).

Таблиця 1.
Характеристика хворих на ХМЛ з мутаціями та без мутацій кіназного домену гена BCR/ABL1

Показник	Мутантний тип <i>BCR/ABL1</i> , n=45	Дикий тип <i>BCR/ABL1</i> , n=62	p
Стать			
Чоловіки, n (%)	24 (53,3)	23 (37,1)	0,116
Жінки, n (%)			
Медіана віку, роки, медіана (діапазон)	38 (19 - 70)	43 (21 - 75)	0,098
Фаза захворювання			
Хронічна фаза, n (%)	41 (41,8)	57 (58,2)	0,998
Фаза акселерації або фаза баластного кризу, n (%)	4 (44,4)	5 (55,6)	
Термін лікування до призначення іматинібу, n (%):			0,152
Менше 8 міс.	14 (56,0)	11 (44,0)	
8 – 36 міс.	16 (32,7)	33 (67,3)	
36 – 60 міс.	7 (36,8)	12 (63,7)	
Більше 60 міс.	8 (57,1)	6 (42,9)	

Table 1.
Characterization of patients with CML with/without kinase domain mutations of the BCR / ABL1 gene

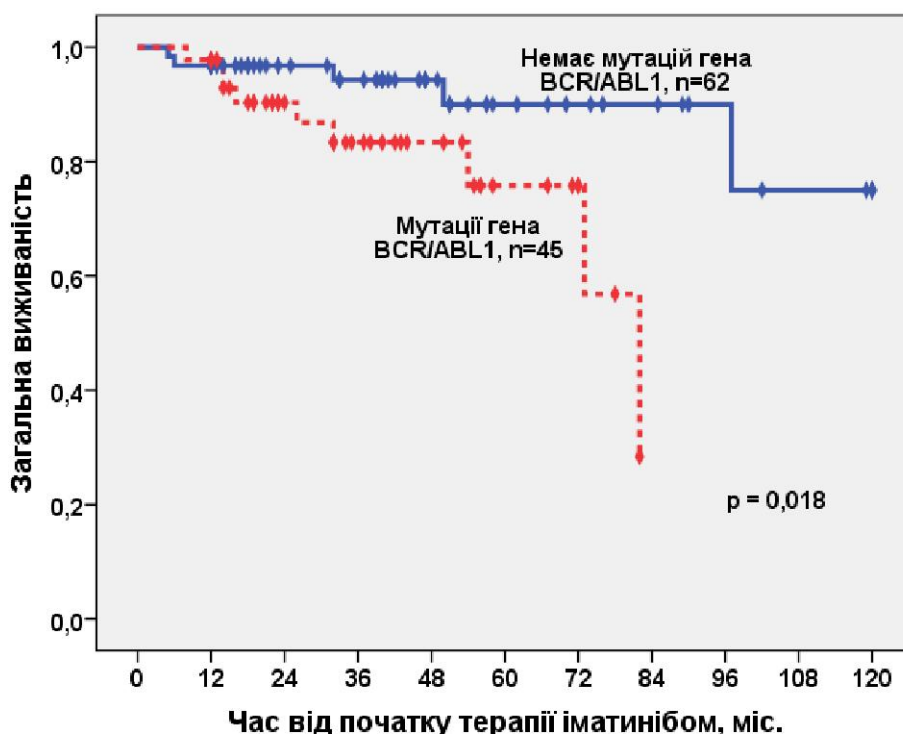


Рис. 1. Загальна виживаність пацієнтів з ХМЛ, первинно резистентних до терапії іматинібом, залежно від наявності мутацій кіназного домену гена *BCR/ABL1*

Fig. 1. Overall survival of patients with CML initially resistant to imatinib therapy, depending on the presence of the kinase domain mutations of the *BCR / ABL1* gene

Таким чином, наші результати свідчать про те, що мутації кіназного домену гена *BCR/ABL1* є одним з механізмів розвитку первинної резистентності у хворих на ХМЛ, які отримують терапію іматинібом. В нашій роботі ми виявили такі порушення у 41,7 % пацієнтів. Точкові мутації призводять до заміни амінокислот у білку *BCR/ABL1* і, як наслідок, до зміни конформації білка або структури активного центру *BCR/ABL*-кінази. Це значуще впливає на афінність до іматинібу.

Останні дані вказують на наявність невеликої кількості мутантних клонів ще в дебюті ХМЛ. За даними Kizilors A et al. використання секвенування нового покоління (next generation sequencing, NGS) дозволило виявити мутації у 21% пацієнтів при встановленні діагнозу (Kizilors et al., 2019). Висловлюється припущення про існування так званих перед-існуючих мутантних клонів з високим проліферативним потенціалом. Під впливом терапії ІТК елімінуються тільки клітини з диким типом гена *BCR/ABL1*. Мутантні клони таким чином отримують проліферативну перевагу, що призводить до відсутності відповіді на терапію ІТК та прогресії захворювання. Незважаючи на те, що в попередніх дослідженнях показано, що кількість резистентних пацієнтів статистично значуще зростає при збільшенні терміну

передлікуваності (Dmytrenko et al., 2018), ми не виявили залежності відносної частоти мутацій гена *BCR/ABL1* від терміну лікування до призначення іматинібу. Можна припустити, що лікування без застосування ІТК збільшує термін експозиції клітин під дією онкогенної *BCR/ABL* тирозинкінази, що призводить до нових пошкоджень ДНК. Однак, ймовірно, вони відбуваються не тільки в кіназному домену гена *BCR/ABL1*, а випадково по всьому геному. В результаті абсолютна кількість мутацій збільшується (про що свідчить збільшення частки резистентних пацієнтів), а відносна кількість мутацій гена *BCR/ABL1* не змінюється.

Поява мутацій гена *BCR/ABL1* не завжди напряму змінює взаємодію ІТК з *BCR/ABL* тирозинкіназою. Є дані про те, що заміна окремих амінокислот кіназного домену гена *BCR/ABL1* призводить до змінення фосфорилуючої активності мутантної тирозинкінази або активування додаткових сигнальних шляхів (Lussana et al., 2017). Можна припустити, що в частині випадків мутації гена *BCR/ABL1* є тільки маркерами загальної геномної нестабільності, а не причиною резистентності. При цьому головну роль в прогресуванні та розвитку резистентності грають *BCR/ABL1*–незалежні механізми. В будь-якому випадку принциповим є той факт, що поява мутацій гена

BCR/ABL1 драматично погіршує прогноз відповіді на терапію іматинібом, що відображається у скороченні загальної виживаності пацієнтів.

Важливим є дослідження мутаційного статусу гена *BCR/ABL1* у пацієнтів з ХМЛ, первинно резистентних до іматинібу, для своєчасної зміни терапії з урахуванням специфічності виявлених мутантних клонів. Наступні дослідження резистентних до іматинібу пацієнтів з ХМЛ доцільно фокусувати не тільки на аналізі мутацій кіназного домену гена *BCR/ABL1*, а охоплювати інші гени, залучені до лейкемогенезу.

Висновки. В когорті хворих на ХМЛ з первинною резистентністю до терапії іматинібом мутації кіназного домену гена *BCR/ABL1* виявлено у 45 із 107 (41,7%) обстежених осіб. Визначено значуще скорочення загальної виживаності пацієнтів, резистентних до терапії іматинібом, за умов наявності мутації кіназного домену гена *BCR/ABL1* порівняно із пацієнтами, у яких розвиток резистентності не супроводжувався появою мутацій. Цей факт підтверджує вагомий внесок даного феномену в механізми розвитку первинної резистентності до терапії іматинібом і дає підставу щодо віднесення мутацій кіназного домену гена *BCR/ABL1* до критеріїв негативного прогнозу перебігу захворювання, які повинні бути враховані при виборі тактики подальшого лікування.

Список літератури:

- Атраментова Л. А. Дизайн и статистика биологического исследования. – Харьков: НТМТ, 2015. – 269 с.
- Дмитренко І., Дягіль І., Мінченко Ж., Мартіна З. та ін. Прогностичні фактори відповіді на терапію інгібіторами тирозинкіназ в українській когорті пацієнтів з хронічною мієлоїдною лейкемією // Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Серія: Проблеми регуляції фізіологічних функцій. – 2018. – №24. – С. 17-24.
- Новак В. Л., Масляк З. В., Берекета Я. Д., Юришак І. М. та ін. Показники діяльності гематологічної служби в Україні в 2017 році. – Львів: ТзоВ «ЗУКЦ», 2018. – 44 с.
- Шарашова Е. Е., Холматова К. К., Горбатова М. А., Гржибовский А. М. Применение анализа выживаемости в здравоохранении с использованием пакета статистических программ SPSS // Наука и Здравоохранение. – 2017. – №5. – С. 5-28.
- Baccarani M., Deininger M. W., Rosti G., Hochhaus A. et al. European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia // Blood. – 2013. – Vol. 122, No 6. – P. 872-884. doi:10.1182/blood-2013-05-501569
- Chaitanya P. K., Kumar K. A., Stalın B., Sadashivudu G. et al. The role of mutation testing in patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase after imatinib failure and their outcomes after treatment modification: single-institutional experience over 13 years // Indian. J. Med. Paediatr. Oncol. – 2017. – Vol. 38, No 3. – P. 328–333. doi: 10.4103/ijmpo.ijmpo-115-17
- Chomczynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction // Analyt. Biochem. – 1987. – Vol. 162. – P. 156-159. doi:10.1006/abio.1987.9999
- De Klein A., Van Kessel A. G., Grosveld G., Bartram C. R., et al. A cellular oncogene is translocated to the Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia // Nature. – 1982. – Vol. 300, No 5894. – P. 765-767. doi: 10.1038/300765a0
- Druker B. J., Guilhot F., O'Brien S. G., Gathmann I. et al. IRIS Investigators. Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia // N. Engl. J. Med. – 2006. – Vol. 355. – P. 2408-2417. doi: 10.1056/NEJMoa062867. N Engl J Med 2006; doi:355:2408-2417
- Groffen J., Stephenson J. R., Heisterkamp N., de Klein A. et al. Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22 // Cell. – 1984. – Vol. 36, No 1. – P. 93-99. doi: 10.1016/0092-8674(84)90077-1
- Kaleem B., Shahab S., Ahmed N., Shamsi T.S. Chronic myeloid leukemia – prognostic value of mutations // Asian. Pac. J. Cancer. Prev. – 2015. – Vol. 16, No 17. – P. 7415-7423. doi: 10.7314/apjcp.2015.16.17.7415
- Kizilers A., Crisà E., Lea N., Passera R. et al. Effect of low-level BCR-ABL1 kinase domain mutations identified by next-generation sequencing in patients with chronic myeloid leukaemia: a population-based study // Lancet Haematol. – 2019. – Vol. 6, No 5. – P. e276-e284. doi: 10.1016/S2352-3026(19)30027-4
- Lewandowski K., Warzocha K., Hellmann A., Skotnicki A. et al. Frequency of BCR-ABL gene mutations in Polish patients with chronic myeloid leukemia treated with imatinib: a final report of the MAPTEST study // Pol. Arch. Med. Wewn. – 2009. – Vol. 119. – P. 789-794.
- Lussana F., Intermesoli T., Stefanoni P., Rambaldi A. Mechanisms of Resistance to Targeted Therapies in Chronic Myeloid Leukemia // Exp. Pharmacol. – 2018. – Vol. 249. – P. 231-250. doi: 10.1007/164-2017-81
- Meggyesi N., Kozma A., Halm G., Nahajevszky S. et al. Additional chromosome abnormalities, BCR-ABL tyrosine kinase domain mutations and clinical outcome in Hungarian tyrosine kinase inhibitor-resistant chronic myelogenous leukemia patients // Acta. Haematol. – 2012. – Vol. 127. – P. 34-42. doi: 10.1159/000331472
- Naqvi K., Cortes J. E., Luthra R., O'Brien S. et al. Characteristics and outcome of chronic myeloid leukemia patients with E255K/V BCR-ABL kinase domain mutations // Int. J. Hematol. – 2018. – Vol. 107, No 6. – P. 689-695. doi: 10.1007/s12185-018-2422-6

17. Soverini S., Colarossi S., Gnani A., Rosti G. et al. Contribution of ABL kinase domain mutations to imatinib resistance in different subsets of Philadelphia-positive patients: by the GIMEMA working party on chronic myeloid leukemia // *Clin. Cancer. Res.* – 2006. – Vol. 12. P. 7374-7379. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-06-1516
 18. Soverini S., De Benedittis C., Mancini M., Martinelli G. Best practices in chronic myeloid leukemia monitoring and management // *Oncologist.* – 2016. – Vol. 21, No 5. – P. 626-633. doi: 10.1634/theoncologist.2015-0337
 19. Soverini S., Martinelli G., Amabile M., Poerio A. et al. Denaturing-HPLC-based assay for detection of ABL mutations in chronic myeloid leukemia patients resistant to imatinib // *Clin. Chem.* – 2004. – Vol. 50, No 7. P. 1205-1213. doi: 10.1373/clinchem.2004.031112
 20. Xu P., Guo D., Shao X., Peng M. et al. Characteristics and mutation analysis of Ph-positive leukemia patients with T315I mutation receiving tyrosine kinase inhibitors // *Onco. Targets Ther.* – 2017. – Vol. 10. – P. 4731-4738. doi: 10.2147/OTT.S142482
- References:**
1. Atramentova L. A. Dizajn i statistika biologicheskogo issledovaniya. – Kharkov: NTMT; 2015. (In Russian).
 2. Dmytrenko I, Diahil I, Minchenko Zh, Martina Z et al. Prohnostychni faktory vidpovidi na terapii inhibitoramy tyrozykinaz v ukrainskii kohorti patsientiv z khronichnoiu mieloidnoiu leukemiieiu. Visnyk Kyivskoho natsionalnoho universytetu imeni Tarasa Shevchenko. Seriya: Problemy rehuliatcii fiziologichnykh funktsii. 2018; 24: 17-24. (In Ukrainian)
 3. Novak V. L., Masliak Z. V., Bereketa Ya. D., Yurchyshak I. M., Prymak S. V., Hutor T. H. . Pokaznyky diialnosti hematologichnoi sluzhby v Ukraini v 2017 rotsi. Lviv:TzoV «ZUKTs»; 2018. (In Ukrainian)
 4. Sharashova EE, Holmatova KK, GorbatoVA MA, Grzhibovskij AM. Survival analysis in health sciences using SPSS software. *Science & Healthcare.* 2017; 5: 5-28. (In Russian).
 5. Baccarani M, Deininger M W, Rosti G, Hochhaus A et al. European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia. *Blood.* 2013; 122(6): 872-884. doi:10.1182/blood-2013-05-501569
 6. Chaitanya P K, Kumar K A, Stalin B, Sadashivudu G et al. The role of mutation testing in patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase after imatinib failure and their outcomes after treatment modification: single-institutional experience over 13 years. *Indian. J. Med. Paediatr. Oncol.* 2017; 38(3): 328–333. doi: 10.4103/ijmpo.ijmpo-115-17
 7. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analyt. Biochem.* 1987; 162: 156-159. doi:10.1006/abio.1987.9999
 8. De Klein A, Van Kessel AG, Grosveld G, Bartram CR et al. A cellular oncogene is translocated to the Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia. *Nature.* 1982; 300(5894): 765-767. doi: 10.1038/300765a0
 9. Druker B J, Guilhot F, O'Brien S G, Gathmann I et al. IRIS Investigators. Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2006; 355: 2408-2417. doi: 10.1056/NEJMoa062867
 10. Groffen J, Stephenson J R, Heisterkamp N, de Klein A et al. Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22. *Cell.* 1984; 36(1): 93-99. doi: 10.1016/0092-8674(84)90077-1
 11. Kaleem B, Shahab S, Ahmed N, Shamsi TS. Chronic myeloid leukemia – prognostic value of mutations. *Asian. Pac. J. Cancer. Prev.* 2015; 16(17): 7415-7423. doi: 10.7314/apjcp.2015.16.17.7415
 12. Kizilors A, Crisà E, Lea N, Passera R et al. Effect of low-level BCR-ABL1 kinase domain mutations identified by next-generation sequencing in patients with chronic myeloid leukaemia: a population-based study. *Lancet Haematol.* 2019 May; 6(5) :e276-e284. doi: 10.1016/S2352-3026(19)30027-4
 13. Lewandowski K, Warzocha K, Hellmann A, Skotnicki A et al. Frequency of BCR-ABL gene mutations in Polish patients with chronic myeloid leukemia treated with imatinib: a final report of the MAPTEST study. *Pol. Arch. Med. Wewn.* 2009; 119: 789-794.
 14. Lussana F, Intermesoli T, Stefanoni P, Rambaldi A. Mechanisms of resistance to targeted therapies in chronic myeloid leukemia. *Exp. Pharmacol.* 2018; 249: 231-250. doi: 10.1007/164-2017-81
 15. Meggyesi N, Kozma A, Halm G, Nahajevszky S et al. Additional chromosome abnormalities, BCR-ABL tyrosine kinase domain mutations and clinical outcome in Hungarian tyrosine kinase inhibitor-resistant chronic myelogenous leukemia patients. *Acta. Haematol.* 2012; 127: 34-42. doi: 10.1159/000331472
 16. Naqvi K, Cortes J E, Luthra R, O'Brien S et al. Characteristics and outcome of chronic myeloid leukemia patients with E255K/V BCR-ABL kinase domain mutations. *Int. J. Hematol.* 2018; 107(6): 689-695. doi: 10.1007/s12185-018-2422-6
 17. Soverini S, Colarossi S, Gnani A, Rosti G et al. Contribution of ABL kinase domain mutations to imatinib resistance in different subsets of Philadelphia-positive patients: by the GIMEMA working party on chronic myeloid leukemia. *Clin. Cancer. Res.* 2006; 12: 7374-7379. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-06-1516
 18. Soverini S, De Benedittis C, Mancini M, Martinelli G. Best practices in chronic myeloid leukemia monitoring and management. *Oncologist.* 2016; 21(5): 626-633. doi: 10.1634/theoncologist.2015-0337
 19. Soverini S, Martinelli G, Amabile M, Poerio A et al. Denaturing-HPLC-based assay for detection of ABL mutations in chronic myeloid leukemia patients resistant to imatinib. *Clin. Chem.* 2004; 50(7): 1205-1213. doi: 10.1373/clinchem.2004.031112
 20. Xu P, Guo D, Shao X, Peng M et al. Characteristics and mutation analysis of Ph-positive leukemia patients with T315I mutation receiving tyrosine kinase

CHARACTERISTICS OF BCR/ABL1 KINASE DOMAIN MUTATIONS IN THE PATIENTS WITH CHRONIC MYELOID LEUKEMIA WHO ARE PRIMARY RESISTANT TO THE IMATINIB THERAPY

I. V. Dmytrenko, J. M. Minchenko, I. S. Dyagil

The chronic myeloid leukemia (CML) development is associated with the formation of the BCR/ABL1 fusion gene and the BCR/ABL1 protein with the increased tyrosine kinase activity. Despite the high efficiency of targeted therapy, up to 30% of patients do not respond on such therapy i.e. are primary resistant. The presence of BCR/ABL1 kinase domain mutations is considered to be one of the reasons of tyrosin kinase inhibitors resistance. To evaluate the frequency of BCR/ABL1 kinase domain mutations in Ukrainian cohort of CML patients with primary resistance to imatinib therapy, we retrospectively studied BCR/ABL1 kinase domain mutations in peripheral blood of 107 CML patients. The nucleotide sequence was determined by direct sequencing by Sanger. Mutations were reported in 45 of 107 (41.7%) CML patients. Two mutations at a time were revealed in 8 patients. So a total of 53 mutations were found out. Among them 49 were missense-mutations and 4 - deletions of different regions of the BCR/ABL1 kinase domain gene. The missense-mutations F359I/V (12 patients), T315I (8 patients) and G250E (6 patients) were most common. By localization, the mutations majority (23 of 53) was in the P-loop, 10 mutations - in the contact site, 13 mutations - in the catalytic domain and 6 - in the A-loop. Of the detected mutations, 26 (49%) resulted in a disruption of the hydrogen bond between BCR/ABL1-tyrosine kinase and imatinib. Significant reduction in overall survival was found in patients with BCR/ABL1 kinase domain mutations compared with patients with wild-type of BCR/ABL1 gene ($p = 0.018$). The estimated 3-year overall survival was 83.4% (95% CI: 77.0% - 89.8%) and 94.3% (95% CI: 91.0% - 97.3%), respectively. Therefore, mutations of the BCR/ABL1 kinase domain are one of the mechanisms of primary resistance in CML patients on imatinib therapy. The occurrence of BCR/ABL1 gene mutations impairs the prognosis of imatinib therapy response and leads to a reduction in the overall survival of patients.

Keywords: chronic myeloid leukemia, resistance, BCR/ABL1 mutations, tyrosine kinase inhibitors.

Отримано редколегією 21.04.2019