

МЕДИЧНА ГЕНЕТИКА

DOI 10.29254/2077-4214-2018-1-2-143-249-254

УДК 616.155.392-002.2:616-085:575.113.224:577.21

Дмитренко І. В., Мінченко Ж. М., Дягіль І. С.

МУТАЦІЇ КІНАЗНОГО ДОМЕНА ГЕНА *BCR/ABL1* У ХВОРИХ НА ХРОНІЧНУ МІЕЛОЇДНУ ЛЕЙКЕМІЮ З ВТОРИННОЮ РЕЗИСТЕНТНІСТЮ ДО ТЕРАПІЇ ІМАТИНІБОМДержавна установа «Національний науковий центр радіаційної медицини НАМН України»
(м. Київ)

iryna.v.dmytrenko@gmail.com

Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами. Робота є фрагментом науково-дослідної роботи відділу гематології та трансплантології Державної установи «Національний науковий центр радіаційної медицини НАМН України» за темою «Роль мутацій гену *BCR/ABL*, хромосомних, молекулярно-генетичних порушень та імуногенетичних показників у формуванні підходів до оптимізації таргетної терапії хворих на хронічну міелоїдну лейкемію у віддалений період після аварії на ЧАЕС», № державної реєстрації 0116U003574.

Вступ. Головною патогенетичною подією, яка призводить до розвитку хронічної міелоїдної лейкемії (ХМЛ), є поява в стовбуровій клітині транслокації $t(9;22)(q34;q11.2)$, що призводить до злиття гену *ABL* (довге плече хромосоми 9), з геном *BCR* (довге плече хромосоми 22) та утворенню химерного гену *BCR/ABL1* [1,2].

Дослідження патогенезу ХМЛ підготували підґрунтя для розвитку таргетної терапії цього захворювання, яка полягає у застосуванні специфічних інгібіторів тирозинкінази (ІТК). Іматиніб, перший представник інгібіторів тирозинкінази – це 2-фениламіноперимедин, який є АТФ-конкурентним інгібітором неактивної форми *BCR/ABL1* тирозинкінази [3].

Використання іматинібу в якості терапії першої лінії показало надзвичайно високу ефективність цього препарату та перетворило ХМЛ в курабельне захворювання. За даними міжнародного дослідження IRIS на 60 міс монотерапії іматинібом безпідійна виживаність пацієнтів з ХМЛ (виживаність без ознак захворювання) складала 83% [4]. Загальна виживаність на 8 років терапії перевищувала 80% [5].

Незважаючи на успіхи, досягнуті у лікуванні із застосуванням ІТК, 20-30% пацієнтів з ХМЛ практично не відповідають на терапію [4,5].

Навіть у хворих, які досягли повної цитогенетичної та великої молекулярної відповіді, зберігається ймовірність виникнення резистентності в ході лікування. За даними IRIS до кінця 7-го року спостереження до 17% пацієнтів втрачають повну цитогенетичну відповідь [4,5].

На сьогодні розвиток резистентності до терапії ІТК пов'язують з порушенням біодоступності інгібітора, активацією додаткових сигнальних шляхів злочасної трансформації клітини, присутністю персистоючого пулу лейкемічних стовбурових клітин, а також порушенням взаємодії інгібітора з тирозинкіназою внаслідок мутацій в кіназному домені гену *BCR/ABL1* [6]. Мутації призводять до заміни амінокислот у білку *BCR/ABL* і, як наслідок, до зміни конформації білка або структури активного центру *BCR/ABL*-кінази, що погіршує, або робить зовсім неможливим зв'язування інгібітора з тирозинкіназою [7]. Незважаючи на досить велику кількість робіт у цьому напрямку, залишається невирішеним питання про потенційне значення мутацій кіназного домену гену *BCR/ABL1* в механізмі розвитку резистентності до терапії інгібіторами тирозинкінази.

Мета дослідження. Визначити частоту та спектр мутацій кіназного домена гену *BCR/ABL1* у хворих на ХМЛ, які втратили відповідь на терапію, та дослідити їх роль у розвитку вторинної резистентності до терапії іматинібом.

Об'єкт і методи дослідження. Мутації кіназного домена гену *BCR/ABL1* ретроспективно досліджували у зразках периферичної крові 32 *BCR/ABL1*-позитивних пацієнтів з ХМЛ. 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 2001 по 2017 рр. Всі пацієнти надали інформовану згоду на використання їх біоматеріалу для дослідження.

Рівень відповіді на терапію іматинібом визначали відповідно до критеріїв ELNet за ступенем редукції пухлинного клону на 12 міс терапії (відповідає рівню експресії химерного гену *BCR/ABL1*) [8]. Оптимальною відповіддю вважали досягнення великої молекулярної відповіді (рівень експресії гену *BCR/ABL1* $\leq 0,1\%$), субоптимальною відповіддю (група «застереження» за ELNet) – рівень експресії гену *BCR/ABL1* від 0,1% до 1% (повна цитогенетична відповідь) і невад-

чею терапії або первинною резистентністю – рівень експресії гена *BCR/ABL1* > 1% на 12 міс. терапії іматинібом [8].

До групи спостереження увійшли 9 пацієнтів з оптимальною відповіддю та 23 пацієнта з субоптимальною відповіддю на терапію іматинібом. Вторинна резистентність визначалася як втрата повної цитогенетичної відповіді (підвищення значення рівня експресії гена *BCR/ABL1* більше 1%) або прогресія до фази акселерації або бластного кризу [8]. Медіана періоду від початку терапії іматинібом до розвитку вторинної резистентності складала 28,6 міс. (17,1 – 72,0) міс. Пацієнтів, у яких реєструвалася первинна резистентність до терапії іматинібом, було виключено із аналізу.

Всі пацієнти з групи спостереження отримували іматиніб в дозі 400 мг/добу з подальшим підвищенням дози до 800 мг/добу. Тривалість терапії іматинібом складала $Me = 33,9$ міс. (11,3 – 104,9) міс.

Медіана віку пацієнтів складала 41,5 роки (22 – 65) роки. Серед обстежених було 18 жінок та 14 чоловіків. У 30 пацієнтів при встановленні діагнозу реєструвалася хронічна фаза захворювання, у 2 пацієнтів – фаза акселерації за критеріями ELNet [8]. Медіана періоду між встановленням діагнозу та початком терапії іматинібом складала 4,0 міс. (0,3 – 95,0) міс.

Загальну РНК одержували з клітин периферичної крові шляхом фенол-хлороформної екстракції, преципітації ізопропанолом та відмивки в етанолі за загальною методикою Хомчинського [9].

Для синтезу комплементарної ДНК (кДНК) використовували гексамерні праймери та M-MuLV ревертазу (Thermo Fisher, США). Режими інкубації витримували згідно з рекомендаціями фірми-виробника. Комплементарну ДНК синтезували з 1,5 нг загальної РНК в 20 мкл реакційної суміші.

Ампліфікацію фрагменту гена *BCR/ABL1* проводили в два етапи методом «гніздової» зворотно-транскриптазної полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) згідно з рекомендаціями Soverini із співавт. [10]. На 1-му етапі ампліфікували ділянку гена *BCR/ABL1* довжиною в 1,2 тис. п.о. (тисяч пар основ), з використанням наступних праймерів: *BCR-F 5'- GAG CAG CAG AAG AAG TGT TTC AGA -3'* та *ABL-R 5'- CTC TAG CAG CTC ATA CAC CTG GG-3'*. На 2-му етапі проводили реампліфікацію, використовуючи в якості матриці ампліфікат від першого етапу та дві пари внутрішніх праймерів *F-ABL-B/R-ABL-B* і *F-ABL-C/R-ABL-C*, які поділяли досліджуваний фрагмент на ділянки довжиною 393 п.о. і 482 п.о. відповідно (табл. 1).

Використовували наступні умови ПЛР: для першого раунду після денатурації проводили 30 циклів ампліфікації в режимі 94°C – 40 сек; 60°C – 60 сек; 72°C – 60 сек. Продукт 1-го раунду ПЛР розводили у співвідношенні 1:49 та використовували 1 мкл отри-

маного розчину як матрицю для 2-го раунду ПЛР. Реампліфікацію (2-й раунд ПЛР) проводили при наступних умовах: 94°C – 10 хв.; 35 циклів: 94°C – 30 сек, 55°C – 40 сек, 72°C – 40 сек. Таким чином кіназний домен *ABL1* ампліфікувався у вигляді двох фрагментів, що перекриваються: *ABL-B* (393 п.о., містить кодони 206–335) та *ABL-C* (482 п.о., містить кодони 262–421).

Таблиця 1.

Праймери для аналізу мутацій кіназного домену гена *BCR/ABL1* [10]

Назва праймеру	Послідовність, 5'-3'	Позиція в гені	Розмір продукту, п.о.
F-ABL-B	cat cat tca acg tgt gcc gac gg	ABL (748–770)	B (393 п. о.)
R-ABL-B	ggt gca ctc cct cag gta gtc	ABL (1120–1140)	
F-ABL-C	gaa gaa ata cag cct gac ggt g	ABL (930–951)	
R-ABL-C	cgt cgg act tga tgg aga a	ABL (1393–1411)	C (482 п. о.)

Всі ПЛР реакції проводили у 50 мкл реакційної суміші, яка містила 1 од. Taq-полімерази (Thermo Fisher, США), 10x ПЛР-буфер, 100 мМ кожного дезоксинуклеотидтрифсфата, 2,5 мМ MgCl₂ (Thermo Fisher, США) та 1 мкМ кожного праймера [10].

Реакція прямого секвенування за Сангером фрагмента гена *ABL1* здійснювалася з використанням комплексу BigDye Terminator Sequencing Kit (Applied Biosystems, США) згідно з протоколом виробника на генетичному аналізаторі ABI PRISM 310 (Applied Biosystems, США). Отриману нуклеотидну послідовність порівнювали з послідовністю мРНК *ABL1* X16416 (www.ensembl.org).

Статистичний аналіз проводили з використанням пакету статистичних програм SPSS for Windows (версія 20.0). Різницю між змінними оцінювали за допомогою χ^2 -тесту та точного критерію Фішера для категоріальних та U-тесту Манна-Уїтні для безперервних змінних. Вірогідність втрати відповіді на терапію оцінювали методом Каплан-Маєйр та порівнювали за допомогою log-rank тесту. Розбіжності між параметрами, що порівнювалися, вважали статистично значущими при $p \leq 0,05$.

Результати досліджень та їх обговорення. В результаті проведеного дослідження мутації кіназного домена гена *BCR/ABL1* було виявлено у 9 з 15 пацієнтів (60%) з вторинною резистентністю та не виявлялися в групі пацієнтів, у яких зберігалася досягнута відповідь на терапію іматинібом ($p < 0,001$). Всі виявлені мутації були місенс-мутаціями, які призводили до заміни амінокислот – F317L, T315I, M244V, F359I, F359V (у 2 пацієнтів), E255K, E355G, H396R. Загалом було описано мутації у 8 кодонах (табл. 2). У 8 пацієнтів виявлялося 100% мутантного транскрипту без резидуального транскрипту дикого типу. У одного пацієнта (№ 939) реєструвався змішаний генотип з мутантним та диким типом *BCR/ABL1* транскрипту у співвідношенні 1:1.

Більшість виявлених нами мутацій (M244V, E255K, T315I, M351T, F359V) належала до найбільш поширених мутацій, зазначених Soverini із співавторами як

найбільш вірогідно асоційовані з резистентністю до іматинібу [11].

Мутації в Р-петлі (M244V та E255K) виявлялися у 2/9 (22,2%) пацієнтів. Р-петля – це консервативна ділянка з 244 по 255 амінокислоту, що відповідає за зв'язування з АТФ. Саме тут розташований АТФ-зв'язуючий карман, який є мішенню для іматиніба. За даними Branford з співав. більшість мутацій в локусі гена *BCR/ABL1*, що кодують Р-петлю, є причиною високої резистентності до іматинібу внаслідок порушення водневого зв'язку *BCR/ABL* тирозинкінази з іматинібом [12]. Порівняно з диким типом *BCR/ABL1*-кінази, мутації в ділянці Р-петлі призводять до 70-100 кратного зниження чутливості в кіназах (біохімічних) тестах та до 10 кратного зниження чутливості до іматинібу в проліферативних тестах *in vitro* [13].

В групі пацієнтів з ХМЛ з вторинною резистентністю до терапії іматинібом мутації в локусі гена *BCR/ABL1*, що кодує проміжні послідовності (треонін в позиції 315 та фенілаланін в позиції 317, які формують водневий зв'язок з іматинібом) виявлені у двох пацієнтів. Заміна фенілаланіну на лейцин в позиції 317 (Phe→Leu317; F317L) призводить до помірного зменшення чутливості до іматинібу. Проте заміна треоніна в позиції 315 на більш громіздкий та гідрофобний ізолейцин (Th315→Ile315; T315I) не тільки знищує водневий зв'язок, а й обумовлює утворення просторової перешкоди, що робить сайт недоступним не тільки для іматинібу, але й для всіх існуючих ІТК, крім понатинібу [14].

В каталітичному домені, який займає ділянку амінокислот від 351 до 359, в досліджуваній групі пацієнтів мутації виявлялися найчастіше (у 4 з 9 пацієнтів, 44,4%). Вони реєструвалися в двох кодонах – E355G та F359I/V. У одного пацієнта фенілаланін в позиції 359 замінювався на ізолейцин (Phe→Ile359; F359I), а у двох пацієнтів – на валін (Phe→Val359; F359V). Заміна фенілаланіна на ізолейцин або валін порушує водневий зв'язок між пиперазиновим кільцем іматинібу та *BCR/ABL1* тирозинкіназою. Мутації в цьому регіоні призводять до непомірно високої тирозинкіназої активності.

У одного пацієнта реєструвалася мутація в локусі гена *BCR/ABL1*, що кодує А-петлю тирозинкінази (H396R). А-петля утворена амінокислотами, розташованими в положенні від 381 по 402. Мутацій в цьому

Таблиця 2.

Мутації кіназного домена гена *BCR/ABL1*, виявлені у 9 хворих на ХМЛ з вторинною резистентністю до терапії іматинібом

Код пацієнта	Розташування	Мутація	Нуклеотидна заміна	Амінокислотна заміна
255	Р-петля	M244V	atg>gtg A>G	Met→Val244
453		E255K	gag>aag G>A	Glu→Lys255
251	Проміжні послідовності	T315I	act>att C>T	Thr→Ile315
143		F317L	ttc>ttg C>G	Phe→Leu317
754	Каталітичний домен	E355G	gaa>gga A>G	Glu→Gly355
299		F359I	ttc>atc T>A	Phe→Ile359
411		F359V	ttc>gtc T>G	Phe→Val359
586		F359V	ttc>gtc T>G	Phe→Val359
939	А-петля	H396R	cat>cgt A>G	His→Arg396

регіоні перешкоджають трансформації кінази у неактивну конформацію, яка необхідна для зв'язування з іматинібом. Такі конформаційні зміни призводять до зниження інгібуючої ефективності іматинібу.

Аналіз інгібуючої активності іматиніба за даними результатів біохімічних та проліферативних тестів *in vitro* дозволив визначити чутливість виявлених мутацій [13]. Більшість виявлених мутацій (7 випадків з 9) була помірно резистентна до іматинібу. У 2-х пацієнтів були виявлені мутації, що обумовлюють повну резистентність до іматинібу (E255K та T315I). Дані щодо чутливості виявлених мутацій в тестах *in vitro* до існуючих ІТК (нілотиніба, дазатиніба та бозутиніба) дозволяють визначити відповідний інгібітор для другої лінії терапії у пацієнтів з ХМЛ, резистентних до іматинібу. Так, згідно Soverini з співав. виявлена мутація F317L буде більш чутливою до нілотинібу, для пацієнтів з мутаціями F359I/V дазатиніб та бозутиніб більше ефективні, ніж нілотиніб, для пацієнтів з мутаціями E255K та E355G визначена більша ефективність дазатинібу, а для пацієнтів з мутаціями H396R, M244V визначають однакову ефективність нілотинібу, дазатинібу та бозутинібу [15].

При порівнянні груп пацієнтів з мутантним та диким типом гена *BCR/ABL1* не було виявлено ста-

Таблиця 3.

Клінічна характеристика хворих на ХМЛ з мутаціями та без мутацій кіназного домена гена *BCR/ABL1*

Показник	Мутантний тип <i>BCR/ABL1</i> , n=9	Дикий тип <i>BCR/ABL1</i> , n=23	p
Стать Чоловіки, n (%)	3 (33,3)	11 (47,8)	0,694
Медіана віку, роки, медіана (діапазон)	34,5 (27 - 56)	47,0 (22 - 59)	0,281
Медіана тривалості лікування до призначення іматинібу, міс., медіана (діапазон)	5,9 (0,3 - 37,8)	3,3 (2,0 - 46,5)	0,805
Глибина редукції пухлинного клону на 12 міс. терапії іматинібом згідно критеріїв ELNet: Велика молекулярна відповідь (оптимальна відповідь) Повна цитогенетична відповідь (субоптимальна відповідь)	0 (0)	9 (39,1)	0,035*
	9 (100)	14 (60,9)	

Примітка: * – статистично значуща відмінність.

тистично значущих асоціацій між віком, статтю, тривалістю лікування до призначення іматинібу та наявою мутацій (табл. 3).

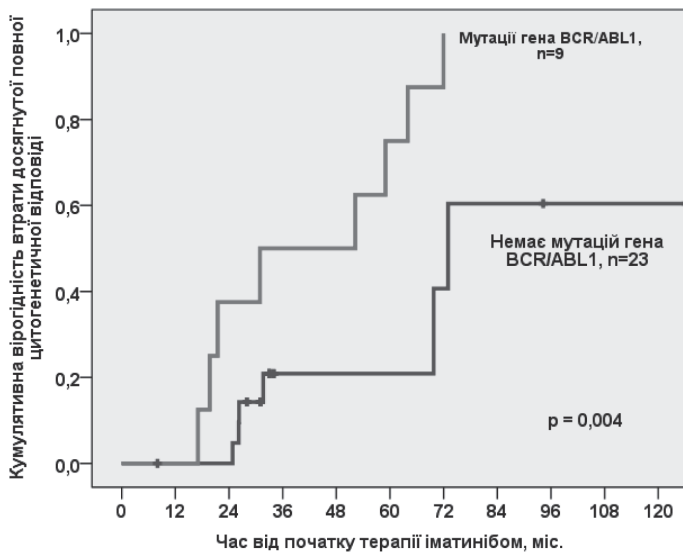


Рис. Кумулятивна вірогідність розвитку вторинної резистентності залежно від наявності мутацій кіназного домена гена *BCR/ABL1*.

При порівнянні глибини редукції пухлинного клону на 12 міс. терапії у пацієнтів з мутаціями кіназного домена гена *BCR/ABL1* та без мутацій виявлено, що оптимальну відповідь на 12 міс. терапії іматинібом мали 39,1% пацієнтів з диким типом гена *BCR/ABL1* та жодного пацієнта з мутаціями гена *BCR/ABL1* ($p=0,035$). Всі виявлені мутації реєструвалися лише у пацієнтів з субоптимальною відповіддю на терапію іматинібом та склали 39,1% (9 з 23 пацієнтів). Цей факт свідчить про те, що недостатня редукція пухлинного клону на 12 міс. терапії може асоціюватися з наявністю мутацій кіназного домена гена *BCR/ABL1*.

У 15 з 32 пацієнтів (у 2 з оптимальною відповіддю та 13 з субоптимальною відповіддю) розвинулася вторинна резистентність до терапії іматинібом. Серед них 9 пацієнтів (60%) мали мутації кіназного домена гена *BCR/ABL1*.

Для визначення внеску мутацій у розвиток вторинної резистентності аналізували вірогідність втрати досягнутої відповіді на терапію іматинібом (розвитку вторинної резистентності) залежно від наявності мутацій кіназного домена гена *BCR/ABL1* (рис.).

В результаті проведеного дослідження було виявлено статистично значуще підвищення вірогідності втрати досягнутої повної цитогенетичної відповіді на терапію іматинібом у пацієнтів з мутаціями кіназного домена гена *BCR/ABL1* порівняно із пацієнтами з диким типом гена *BCR/ABL1* (вірогідність розвитку вторинної резистентності на 24 міс. терапії складала 37% vs 0% відповідно, на 48 міс. терапії – 50% vs 21% відповідно, на 72 міс. – 100% vs 41% відповідно, $p = 0,004$). Медіана часу до розвитку вторинної резистентності у пацієнтів з мутаціями кіназного домена

гена *BCR/ABL1* складала 30,9 міс., що значуще менше порівняно з медіаною часу до розвитку вторинної резистентності у пацієнтів без мутацій кіназного домена гена *BCR/ABL1* (73,0 міс.) ($p = 0,004$).

Таким чином, мутації кіназного домена гена *BCR/ABL1* обумовлюють розвиток вторинної резистентності у хворих на ХМЛ до терапії іматинібом. Висловлюється припущення, що в пухлинній популяції ще до призначення терапії можуть існувати клітини з мутаціями [16]. Терапія іматинібом дозволяє позбавитися домінуючого клону з диким типом гена *BCR/ABL1*, в результаті чого під дією «терапевтичного пресу» відбувається селекція мутантного клону, який обумовлює розвиток резистентності до терапії. Додаткові мутації надають клітині так звані «генетичні пластичності», коли в результаті нових геномних аберацій активуються нові «резервні» сигнальні шляхи виживання, що призводять до зниження залежності тільки від одного онкогена. Зменшується кількість стандартної мішені для таргетної терапії [17]. З цієї точки зору виявлення додаткових генетичних порушень (хромосомних, генних) може свідчити про появу гетерогенних властивостей пухлини і розглядатися, як фактор, що знижує ймовірність оптимальної відповіді на терапію інгібіторами тирозинкіназ.

Висновки

1. Місенс-мутації кіназного домена гена *BCR/ABL1* (F317L, T315I, M244V, F359I, F359V у 2 пацієнтів, E255K, E355G, H396R) було виявлено у 9 з 15 пацієнтів (60%) з вторинною резистентністю.

2. Недостатня редукція пухлинного клону на 12 міс. терапії іматинібом (до рівня субоптимальної відповіді) у 39,1% пацієнтів асоціювалась з наявністю мутацій кіназного домена гена *BCR/ABL1*.

3. Наявність мутацій кіназного домена підвищує вірогідність розвитку вторинної резистентності порівняно із пацієнтами з диким типом гена *BCR/ABL1* (вірогідність розвитку вторинної резистентності на 24 міс. терапії складала 37% vs 0% відповідно, на 48 міс. терапії – 50% vs 21% відповідно, на 72 міс. – 100% vs 41% відповідно, $p = 0,004$).

4. Тип виявлених мутацій, а також інформація щодо їх чутливості у біохімічному та проліферативному тестах обумовлюють вибір інгібітора тирозинкіназ другої лінії для пацієнтів з набутою резистентністю до іматинібу.

Перспективи подальших досліджень. Поглиблене вивчення мутацій кіназного домена гена *BCR/ABL1* у хворих на ХМЛ з первинною та вторинною резистентністю до терапії інгібіторами тирозинкіназ. Використання даних щодо індивідуальної чутливості мутацій кіназного домену до різних ІТК для персоналізації клінічного застосування високо-специфічних протипухлинних препаратів в поєднанні з постійним діагностичним тестуванням їх ефективності на молекулярному рівні.

Література

1. de Klein A, van Kessel AG, Grosveld G, Bartram CR, Hagemeijer A, Bootsma D, et al. A cellular oncogene is translocated to the Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia. *Nature*. 1982;300(5894):765-7.
2. Groffen J, Stephenson JR, Heisterkamp N, de Klein A, Bartram CR, Grosveld G. Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22. *Cell*. 1984;36(1):93-9.
3. Schindler T, Bornmann W, Pellicena P, Miller TW, Clarkson B, Kuriyan J. Structural Mechanism for STI-571 Inhibition of Abelson Tyrosine Kinase. *Science*. 2000;289:1938-42.
4. Druker BJ, Guilhot F, O'Brien SG, Gathmann I, Kantarjian H, Gattermann N, et al. IRIS Investigators. Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2006;355:2408-17.
5. Deininger M, O'Brien SG, Guilhot F, Goldman JM, Hochhaus A, Hughes TP, et al. International Randomized Study of Interferon Vs STI571 (IRIS) 8-Year Follow up: Sustained Survival and Low Risk for Progression or Events in Patients with Newly Diagnosed Chronic Myeloid Leukemia in Chronic Phase (CML-CP) Treated with Imatinib [abstract]. *Blood*. 2009;114:1126.
6. Jabbour EJ, Cortes JE, Kantarjian HM. Resistance to tyrosine kinase inhibition therapy for chronic myelogenous leukemia: a clinical perspective and emerging treatment options. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2013;13(5):515-29.
7. Soverini S, Branford S, Nicolini FE, Talpaz M, Deininger MW, Martinelli G, et al. Implications of BCR-ABL1 kinase domain-mediated resistance in chronic myeloid leukemia. *Leukemia Research*. 2014;38:10-20.
8. Baccarani M, Deininger MW, Rosti G, Hochhaus A, Soverini S, Apperley JF, et al. European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia. 2013. *Blood*. 2013;122(6):872-84.
9. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analyt. Biochem*. 1987;162:156-9.
10. Soverini S, Martinelli G, Amabile M, Poerio A, Bianchini M, Rosti G, et al. Denaturing-HPLC-Based Assay for Detection of ABL Mutations in Chronic Myeloid Leukemia Patients Resistant to Imatinib. *Clinical Chemistry*. 2004;50(7):1205-13.
11. Soverini S, Colarossi S, Gnani A, Rosti G, Castagnetti F, Poerio A, 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(24):7374-9.
12. Branford S, Rudzki Z, Walsh S, Parkinson I, Grigg A, Szer J, et al. Detection of BCR-ABL mutations in patients with CML treated with imatinib is virtually always accompanied by clinical resistance, and mutations in the ATP phosphate-binding loop (P-loop) are associated with a poor prognosis. *Blood*. 2003;102(1):276-83.
13. O'Hare T, Eide CA, Deininger MW. Bcr-Abl kinase domain mutations, drug resistance, and the road to a cure for chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2007;110(7):2242-9.
14. Gorre ME, Mohammed M, Ellwood K, Hsu N, Paquette R, Rao PN, et al. Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCRABL gene mutation or amplification. *Science*. 2001;293:876-80.
15. Soverini S, Benedittis C, Mancini M, Martinelli G. Best Practices in Chronic Myeloid Leukemia Monitoring and Management. *The Oncologist*. 2016;21:626-33.
16. Apperley JF. Part I: Mechanisms of resistance to imatinib in chronic myeloid leukaemia. *The Lancet*. 2007;8:1018-29.
17. Domninskiy DA. Osnovy targetnoy terapii. *Onkogematologia*. 2012;1:46-54. [in Russian].

МУТАЦІЇ КИНАЗНОГО ДОМЕНА ГЕНА *BCR/ABL1* У ХВОРИХ НА ХРОНІЧНУ МІЕЛОЇДНУ ЛЕЙКЕМІЮ З ВТОРИННОЮ РЕЗИСТЕНТНІСТЮ ДО ТЕРАПІЇ ІМАТИНІБОМ

Дмитренко І. В., Мінченко Ж. М., Дягіль І. С.

Резюме. Визначена частота мутацій киназного домена гена *BCR/ABL1* у хворих на хронічну мієлоїдну лейкемію з вторинною резистентністю до терапії іматинібом. У 9 з 15 пацієнтів (60%) було виявлено 8 місенс-мутацій киназного домена гена *BCR/ABL1*: F317L, T315I, M244V, F359I, F359V у 2 пацієнтів, E255K, E355G та H396R. Більшість виявлених мутацій (7 випадків з 9) була помірно резистентна до іматинібу. У 2-х пацієнтів були виявлені мутації, що обумовлюють повну резистентність до іматинібу (E255K та T315I). Всі виявлені мутації реєструвалися лише у пацієнтів з субоптимальною відповіддю на терапію іматинібом та склали 39,1% (9 з 23 пацієнтів) в цій групі пацієнтів. Наявність мутацій киназного домена підвищує вірогідність розвитку вторинної резистентності порівняно із пацієнтами з диким типом гена *BCR/ABL1* ($p = 0,004$).

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

МУТАЦИИ КИНАЗНОГО ДОМЕНА ГЕНА *BCR/ABL1* У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКОЙ МИЕЛОИДНОЙ ЛЕЙКЕМИЕЙ С ВТОРИЧНОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТЬЮ К ТЕРАПИИ ИМАТИНИБОМ

Дмитренко И. В., Минченко Ж. Н., Дягиль И. С.

Резюме. Определена частота мутаций киназного домена гена *BCR/ABL1* у больных хронической миелоидной лейкемией с вторичной резистентностью к терапии иматинибом. У 9 из 15 пациентов (60%) было выявлено 8 миссенс-мутаций киназного домена гена *BCR/ABL1*: F317L, T315I, M244V, F359I, F359V у 2 пациентов, E255K, E355G и H396R. Большинство выявленных мутаций (7 случаев из 9) были умеренно резистентными к иматинибу. У 2-х пациентов были обнаружены мутации, обуславливающие полную резистентность к иматинибу (E255K и T315I). Все обнаруженные мутации регистрировались только у пациентов с субоптимальным ответом на терапию иматинибом и составляли 39,1% (9 из 23 пациентов) в этой группе пациентов. Наличие мутаций киназного домена повышает вероятность развития вторичной резистентности по сравнению с пациентами с диким типом гена *BCR/ABL1* ($p = 0,004$).

Ключевые слова: хроническая миелоидная лейкемия, резистентность, мутации *BCR/ABL1*.

BCR/ABL1 KINASE DOMAIN MUTATIONS IN PATIENTS WITH CHRONIC MYELOID LEUKEMIA WITH SECONDARY RESISTANCE TO THE IMATINIB THERAPY

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

Abstract. Study of the chronic myeloid leukemia (CML) pathogenesis have provided the basis for the development of targeted therapy of this disease using specific inhibitors of tyrosine kinases (TKI). The use of imatinib has shown the high effectiveness of this drug. However, 20-30% of CML patients are initially resistant, i.e. they practically do not respond to therapy, and 17% of patients lose the respond. The presence of BCR/ABL1 mutations in patients with CML may be responsible for the failure of the TKI treatment.

The aim of the study was to determine the frequency and range of mutations in the *BCR/ABL1* kinase domain of the in patients with CML who lost their response to therapy and to investigate role of these mutations in the development of secondary resistance to imatinib therapy. *BCR/ABL1* kinase domain mutations were retrospectively studied in 32 peripheral blood samples of BCR/ABL1-positive CML patients (9 patients with the optimal response and 23 patients with sub-optimal response to imatinib therapy) by Sanger's direct sequencing.

The median time from the start of imatinib therapy to the development of secondary resistance was 28.6 months. (17.1 – 72.0) months. Patients with primary imatinib resistance were excluded from the analysis. All patients in the observation group received imatinib 400 mg/day, with dose escalation to 800 mg/day. The duration of imatinib therapy was Me = 33.9 months (11.3 – 104.9) months. The median age of patients was 41.5 years (22 – 65) years. There were 18 women and 14 men. A chronic phase of the disease was recorded in 30 patients at the time of diagnosis, and acceleration phase – in 2 patients. The median time between diagnosis and imatinib therapy initiation was 4.0 months. (0.3 – 95.0) months.

The rate of *BCR/ABL1* kinase domain mutations in patients with chronic myeloid leukemia with secondary resistance to imatinib therapy was determined. In 8 of 15 patients (60%) identified 8 mutations in the *BCR/ABL1* kinase domain: F317L, T315I, M244V, F359I, F359V in 2 patients, E255K, E355G and H396R. Most of the detected mutations (7 out of 9) were intermediate resistant to imatinib. In 2 patients mutations caused complete resistance to imatinib (E255K and T315I). All detected mutations were registered only in patients with sub-optimal response to imatinib and amounted to 39.1% (9 out of 23 patients) in this group of patients. The presence of kinase domain mutations increases the likelihood of secondary resistance compared to patients with the wild type of the *BCR/ABL1* gene ($p = 0.004$).

Key words: chronic myeloid leukemia, resistance, *BCR/ABL1* mutations.

Рецензент – проф. Старченко І. І.
Стаття надійшла 29.03.2018 року

DOI 10.29254/2077-4214-2018-1-2-143-254-258

УДК 612.017-616-056.3

Магеррамова С. Г.

КЛИНИКО-ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОЯВЛЕНИЯ ЛОКАЛЬНО-ИНФЕКЦИОННО-ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ПРИ ТИМОМЕГАЛИИ

Институт Генетических ресурсов Национальной Академии Наук Азербайджана
(г. Баку, Азербайджан)

nauchnayastatya@yandex.ru

Связь публикации с плановыми научно-исследовательскими работами. Данная работа является фрагментом выполняемой диссертации на соискание ученой степени доктора философии по медицине «Генетические аспекты иммунного ответа при некоторых патологиях у детей раннего возраста».

Вступление. При тимомегалии (ТМ) отмечается как дисфункция гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы, так и нарушение механизмов иммуногенеза в организме ребенка [1,2,3].

У детей с ТМ наблюдается предрасположенность к развитию различных инфекционно-аллергических заболеваний. При этом, увеличенный тимус является неблагоприятным фактором, способствующим развитию тяжело протекающих, рецидивирующих инфекционно-воспалительных заболеваний (ИВЗ) [4,5,6].

До сих пор ТМ и, особенно, клиничко-иммунологические проявления локально-инфекционно-воспалительными заболеваниями (ЛИВЗ) и сепсиса у детей грудного возраста не получили должного освещения в литературе.

Цель исследования – определение роли клеточного звена иммунной системы в патогенетических механизмах развития ЛИВЗ у детей грудного возраста.

Объект и методы исследования. У 25 детей грудного возраста с ЛИВЗ на фоне ТМ, выявленной при рентгенологическом исследовании, были изучены клиничко-иммунологические особенности течения патологического процесса (основная группа). Группу сравнения составили 18 детей грудного возраста с ЛИВЗ без ТМ. В контрольную группу вошли 20 практически здоровых детей.