РОЛЬ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИХ ТРАНСЛОКАЦІЙ У ПЕРВИННІЙ ВІДПОВІДІ НА ЛІКУВАННЯ ДІТЕЙ, ХВОРИХ НА ГОСТРУ ЛІМФОБЛАСТНУ ЛЕЙКЕМІЮ, ЗА ПРОГРАМОЮ ALLIC BFM 2009

Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, Україна

У роботі проведено кореляційний аналіз між кількістю бластних клітин у кістковому мозку та периферичній крові, а також досліджено залежність відсотка бластів від наявності молекулярно-генетичних транслокацій (AF4/MLL, BCR/ABL1, TEL/AML, E2A/PBX1) у пацієнтів з гострою лімфобластною лейкемією за умов лікування за програмою ALLIC-BFM 2009.

Мета роботи. Встановити взаємозв'язок між кількістю бластних клітин у кістковому мозку та периферичній крові залежно від наявності молекулярно-генетичних транслокацій для раннього виявлення відповіді.

Матеріали та методи. Групу обстеження склали 105 дітей у віці від 12 місяців до 16 років (медіана віку становила 6 років). Серед обстежених було 62 хлопчики (59,0%) та 43 – дівчинки (41,0%). У всіх пацієнтів був встановлений діагноз гостра лімфобластна лейкемія.

Результати. За допомогою кореляційного аналізу встановлено високий ступінь взаємозв'язку між кількістю бластних клітин у кістковому мозку та периферичній крові, оскільки коефіцієнт кореляції (r) дорівнював 0,87. Показано, що підвищення кількості бластних клітин залежить від наявності хромосомних транслокацій. Найвища кількість бластів до початку лікування спостерігається у пацієнтів з BCR/ABL1 та E2A/PBX1 транслокаціями, у яких вміст бластів у кістковому мозку становив 97 та 96% відповідно, а в периферичній крові – 67 та 73% відповідно.

Встановлено, що застосування хіміотерапії за програмою ALLIC BFM 2009 призводить до зниження кількості бластних клітин у кістковому мозку та крові з мінімальними показниками на 33-й день лікування. Показано, що під час проведення хіміотерапії на всіх етапах лікування (8-, 15, 33-й день) найвищий відсоток бластних клітин як у кістковому мозку, так і крові зберігається у пацієнтів з хромосомними транслокаціями BCR/ABL1 та E2A/PBX1. У пацієнтів з транслокацією AF4/MLL ефективність терапії виявилася найвищою, оскільки на 33-й день лікування бластні клітини у кістковому мозку не візуалізувалися.

Висновки. Під час дослідження первинної відповіді пацієнтів з гострою лімфобластною лейке-

мією на індукційне лікування за програмою ALLIC BFM 2009 виявлено залежність кількості бластних клітин кісткового мозку та крові від виду хромосомної аберації. Найвищою стійкістю до хіміотерапії володіють пацієнти з BCR/ABL1 та E2A/PBX1 молекулярно-генетичними транслокаціями, меншою – пацієнти з AF4/MLL та TEL/AML, про що свідчить наявність та відсутність бластних клітин у периферичній крові відповідно на 33-й день лікування.

Встановлення взаємозв'язку між цитогенетичними та молекулярно-генетичними ознаками пухлинного клону допоможе встановити ступінь злоякісності процесу, а також групу ризику щодо перебігу хвороби. Визначення залежності перебігу гострих лейкемій від молекулярно-генетичних транслокацій дасть можливість в подальшому модифікувати програму лікування.

Ключові слова: бластні клітини, химерні гени AF4/MLL, BCR/ABL, E2A/PBX1, TEL/AML; транслокація, гостра лімфобластна лейкемія у дітей, кістковий мозок, кров.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дана робота є фрагментом НДР «Вивчення впливу екологосоціальних та мікроеко-соціальних чинників на розвиток патологічного стану у дітей шляхом удосконалення методів ранньої діагностики, лікування, профілактики», № держ. реєстрації 1119U100141, шифр Ін.1900/0001/19.

Вступ. Гостра лімфобластна лейкемія (ГЛЛ) належить до захворювань онкогематологічних, що характеризуються злоякісною проліферацією незрілих лімфоїдних клітин кісткового мозку. При цьому неопластичним процесом можуть уражатися різні тканини й органи [1]. Тому, актуальним завданням сучасної медичної науки є удосконалення методів діагностики та лікування цього типу злоякісних новоутворень.

Проліферація попередників лімфоцитів може відбуватися за рахунок порушення міжклітинної сигналізації та шляхів апоптозу [2]. До неконтрольованого поділу популяції лімфобластних клітин можуть призвести мутації протоонкогену [3]. У результаті мутацій, які часто супроводжуються хромосомною транслокацією, утворюються так звані

химерні гени, експресія яких призведе до синтезу химерних білків з онкогенними властивостями [4]. Оскільки ідентифікувати хромосомні транслокації досить складно, а химерні гени виявляються у невеликого відсотка хворих, то це спонукало нас до пошуку інших пухлинних маркерів, які б мали пряму залежність від хромосомних транслокацій та являли собою зручну мішень для детекції лімфоїдної клональності [5]. До таких маркерів можна віднести бластні клітини, які не здатні повноцінно функціонувати та заміщають собою нормальні еритроцити, тромбоцити і лейкоцити [6].

Враховуючи той факт, що в пацієнтів з ГЛЛ підвищений відсоток бластних клітин [7], то визначення їхньої кількості в кістковому мозку та периферичній крові лежить в основі позитивного результату, отриманого при скринінгових дослідженнях. Окрім того, практично відсутні роботи по дослідженню взаємозв'язку між кількістю бластів у кістковому мозку та периферичній крові та утворенням химерних генів як маркерів клональності.

Встановлення кореляційного взаємозв'язку між кількістю бластних клітин у кістковому мозку та периферичній крові, а також його залежність від наявності та виду молекулярно-генетичних транслокацій, дозволить на ранніх етапах діагностувати захворювання, провести моніторинг та передбачити ефективність цитостатичної терапії. Окрім того, це дозволить вносити корективи не лише у діагностичний, але й лікувальний процеси, оскільки сучасна діагностика гострих лейкемій у дітей повинна включати дані про генетичні зміни, від яких залежать властивості пухлини та особливості перебігу захворювання. Це дасть можливість розробки відповідної схеми дослідження генетичних порушень у таких хворих через визначення властивостей пухлини.

Мета роботи. Встановити взаємозв'язок між кількістю бластних клітин у кістковому мозку та периферичній крові залежно від наявності молекулярно-генетичних транслокацій для раннього виявлення відповіді на індукційне цитотоксичне лікування за програмою ALLIC BFM 2009.

Матеріал та методи дослідження. Групу обстеження склали 105 дітей у віці від 12 місяців до 16 років (медіана віку становила 6 років), які знаходились на лікуванні в гематологічних відділеннях КНП ІОР «Івано-Франківська дитяча обласна клінічна лікарня, КНП ЧОР «Чернівецька обласна дитяча лікарня» та КНП РОР «Рівненська обласна клінічна лікарня» з 11.05.2012 до 13.06.2016 р. Контроль за віддаленими результатами припинено 1.07.2019 р. Серед обстежених було 62 хлопчики (59,0%) та 43– дівчинки (41,0%). У всіх пацієнтів був встановлений діагноз ГЛЛ.

Дослідження виконані з дотриманням основних положень «Правил етичних принципів проведення наукових медичних досліджень за участю людини», затверджених Гельсінською декларацією (1964-2013 pp.), ICH GCP (1996 p.), Директиви ЄЕС № 609 (від 24.11.1986 p.), наказів МОЗ України № 690 від 23.09.2009 p., № 944 від 14.12.2009 p., № 616 від 03.08.2012 p. Дослідження виконувалося з мінімальними психологічними втратами з боку пацієнтів. На проведення досліджень була отримана поінформована згода батьків дітей.

Діагностику захворювання проводили із застосуванням таких методів візуалізації як: рентгенографія органів грудної клітки; ультразвукове дослідження; комп'ютерна або магнітно-резонансна томографія голови, органів грудної клітки, черева. Для встановлення діагнозу гострої лейкемії враховували клінічну картину, дані аналізу периферичної крові та усім хворим проводили пункцію кісткового мозку із цитологічним дослідженням аспірату з підрахунком відсотка бластних клітин. Окрім основних діагностичних методів, визначали наявність або відсутність хромосомних аномалій та експресію прогностично важливих онкогенів.

Лімфоїдну приналежність бластів кісткового мозку і крові виявляли за допомогою морфологічного, цитохімічного та імунофенотипового досліджень.

Залежно від наявності молекулярно-генетичної транслокації, пацієнтів розділили на такі групи: I – пацієнти, у яких при молекулярно-генетичному та цитогенетичному дослідженнях виявлено транслокацію AF4/MLL t(4;11); II – пацієнти, з виявленою транслокацією BCR/ABL t(9;22); III – пацієнти з транслокацією TEL/AML t(12;21); IV – пацієнти, у яких виявлена транслокація E2A/PBX1 t(1;19).

Лікування хворих проводилося за програмою ALLIC BFM 2009 з врахуванням стандартних протоколів інтенсивної поліхіміотерапії. Відповідь на цитостатичну терапію аналізували на 8-, 15- та 33-й день від початку лікування. При цьому оцінювали особливості перебігу захворювання.

Визначення експресії химерних генів AF4/MLL, BCR/ABL, TEL/AML, E2A/PBX1 проводили за допомогою двораундової "гніздової" ЗТ-ПЛР. Для ампліфікації генів використовували праймери, які входили до складу комерційних наборів. Утворені продукти ампліфікації візуалізували методом електрофорезу в 2% агарозному гелі [8].

Імунофенотипування бластних клітин ґрунтувалося на детальному вивченні антигенів мембрани і цитоплазми злоякісних клітин, тобто виявленні експресії на бластних клітинах лінійно-специфічних і стадієспецифічних маркерів, за допомогою панелі моноклональних антитіл (МКАТ). Дослідження імунофенотипу бластних клітин у зразках

аспірата кісткового мозку та крові проводили методом проточної цитофлуориметрії з використанням моноклональних антитіл на апараті FACScan (Becton Dickinson, США) в гейті бластних клітин, які ідентифікували за фізичними параметрами світлорозсіювання [9]. Проточний цитометр FACScan для кожної клітини дозволяє враховувати 5 параметрів: 3 параметри флуоресценції залежно від застосовуваних флуорохромів та 2 параметри світлорозсіювання – пряме світлорозсіювання (FSC) (відображає розмір клітин) та бічне світлорозсіювання (SSC) (характеризує внутрішньоклітинну структуру) [10]. Враховували рекомендації фірми-виробника з калібруванням проточного цитометра CaliBRITE Beads, програмним забезпеченням AutoCOMP та за умови негативного ізотипового контролю. Панель MKAT була підібрана таким чином, щоб можна було охарактеризувати різні лінії та стадії лімфопозу та зіставити з ними фенотипові ознаки бластних клітин у обстежених хворих на ГЛЛ.

Аналіз та обробку цифрового матеріалу здійснювали за допомогою методів математичної статистики. Для визначення взаємозв'язків між показниками з нормальним розподілом використовували кореляційний аналіз, розраховуючи коефіцієнт кореляції Пірсона. Для визначення форми взаємозв'язків між показниками застосовували регресійний аналіз. На основі отриманих математичних моделей визначили прогнозні значення певних показників. Для всіх показників статистично вірогідною вважалася величина $p < 0,05$. Комп'ютерну обробку даних проводили за допомогою програми Microsoft Excel та програмних пакетів SYSTAT (версія 10.0) і STATISTIKA (версія 7.0).

Результати дослідження та їх обговорення. В основі діагностики та класифікації гострих лейкозів лежать цитологічні та цитохімічні ознаки бластних клітин. Зокрема, в основі діагностики ГЛЛ лежить виявлення залишкових патологічних клітин аномального клону, які не розпізнаються морфологічно. За допомогою методу імунофенотипування було виявлено підвищення кількості морфологічно недиференційованих бластних клітин як у кістковому мозку, так і у периферичній крові пацієнтів з ГЛЛ, що може свідчити про пряму залежність між цими показниками.

У результаті досліджень виявлено взаємозв'язок між показником кількості бластних клітин у кістковому мозку та периферичній крові. Так, розрахувавши коефіцієнт кореляції Пірсона, встановлено високий ступінь взаємозв'язку кількістю бластних клітин між кістковим мозком та кров'ю, оскільки коефіцієнт кореляції дорівнював 0,87 ($p < 0,05$) (рис. 1).

Використовуючи регресійний аналіз, була створена математична модель типу $y=f(x)$. В якості

Рис. 1. Кореляційний взаємозв'язок між кількістю бластних клітин кісткового мозку та аналогічним показником периферичної крові

незалежної змінної X виступає показник кількості бластних клітин кісткового мозку, а в якості залежної змінної Y – показник кількості бластних клітин периферичної крові. Таким чином, за допомогою математичної моделі можна визначати усереднене значення показників периферичної крові, виходячи з фактичних значень відповідних показників кісткового мозку. Так, для показника кількості бластних клітин математична модель мала такий вигляд: $Y = 0,8271X + 24,116$ (рис. 1). Значення коефіцієнта апроксимації $R^2 = 0,7641$ вказує на високий ступінь достовірності підбраної функції.

Таким чином, використання кореляційного аналізу вказує на високий ступінь взаємозв'язків між підвищенням кількості бластних клітин у периферичній крові з їхньою кількістю у кістковому мозку. Підвищена кількість бластних клітин свідчить про прогресування ГЛЛ під час набуття клітинами лейкоемічного клону. Встановлений факт може бути пов'язаний з хромосомними абераціями недиференційованих бластних клітинах, які призводять до неконтрольованого поділу попередників лімфоцитів та розвитку новоутворення. Відкритим залишається, які саме молекулярно-генетичні транслокації більшою мірою сприяють розвитку пухлинного клону з підвищенням кількості бластних клітин у кістковому мозку та периферичній крові.

Результати проведених досліджень показали, що підвищення кількості бластних клітин у кістковому мозку більшою мірою спостерігається при хромосомних транслокаціях BCR/ABL t(9;22) та E2A/PBX1 t(1;19) (рис. 2). Так, кількість бластних клітин у кістковому мозку перевищувала значення 95% при зазначених геномних транслокаціях (рис. 2).

Очевидно, реципрокна транслокація t(9;22) (q34;q11) з утворенням філадельфійської хромосоми, лежить в основі злоякісної трансформації гемопоетичних стовбурових клітин [11, 12], про що свідчить висока кількість бластних клітин ($97 \pm 8,5\%$) у кістковому мозку. Продуктом експресії

Рис. 2. Відсоток бластних клітин у зразках аспірата кісткового мозку дітей з гострою лімфобластною лейкемією залежно від молекулярно-генетичних транслокацій

химерного гена BCR/ABL1 є патологічний білок, який володіє тирозинкіназною активністю [13]. Посилення тирозинакіназної активності нового білка активує компоненти мітогенактивуючих протеїнкіназ (МАПК), стимулюючи, тим самим, неконтрольовану проліферацію лейкоцитів та порушуючи процес апоптозу [14]. Встановлений факт може бути одним з діагностичних ознак ГЛЛ.

По мірі розвитку онкогематологічного процесу ГЛЛ стає все більш агресивною і пацієнт набуває додаткових хромосомних змін: трисомії хромосом, другу філадельфійську хромосому, мутації інших протоонкогенів і мутації генів-супресорів [15]. Окрім, транслокації BCR/ABL1, кількість бластних клітин різко підвищується і при транслокації E2A/PBX1 t(1;19) – 96±11,4%. Підвищення бластних клітин у пацієнтів з транслокаціями AF4/MLL та TEL/AML виявлялося на рівні 86±4,4% та 91±10,8% відповідно.

Отже, при ГЛЛ виявлений зв'язок між хромосомними аномаліями, зокрема транслокаціями BCR/ABL1 та E2A/PBX1, та кількістю бластних клітин кісткового мозку. Підвищення у кістковому мозку

Рис. 3. Кількість бластних клітин у периферичній крові дітей з гострою лімфобластною лейкемією залежно від молекулярно-генетичних транслокацій

ку пулу раних клітин-попередників сприяє тому, що вони у великій кількості потрапляють у кровотік, сприяючи появі у периферичній крові пацієнта малодиференційованих бластних клітин (рис. 3). Так, встановлено, що у крові пацієнтів з хромосомними транслокаціями BCR/ABL1 та E2A/PBX1 вміст бластних клітин знаходився на рівні 67±0,78% та 73±9,8% відповідно (рис. 3).

Оскільки кількість бластних клітин кісткового мозку та крові має пряму кореляційну залежність (рис. 1), то підвищення кількості бластів у крові відбувається за рахунок їх виходу з кісткового мозку в кровотік. Поява малодиференційованих гемопоетичних клітин у периферичній крові пацієнта має ключове значення в патогенезі ГЛЛ.

Потрапляння у кровотік раних клітин-попередників свідчить про прогресування ГЛЛ, а під час хіміотерапії підвищення їхньої кількості може вказувати на набуття клітинами лейкемічного клону стійкості до хіміотерапії. Тому, актуальною проблемою сучасної гематології залишається вибір ефективної протипухлинної хіміотерапії. Однією із перспективних схем лікування є лікування за протоколом ALLIC BFM 2009.

Дослідження кількості бластних клітин у кістковому мозку та периферичній крові може вказувати на швидкість отримання оптимальної відповіді на хіміотерапію у пацієнтів з ГЛЛ.

Аналіз кількості бластних клітин у кістковому мозку показав, що по мірі проведення хіміотерапії за програмою ALLIC BFM 2009 їх кількість у кістковому мозку знижується у пацієнтів всіх досліджуваних груп (рис. 4). Однак, на всіх етапах лікування кількість бластних клітин залишається вищою у пацієнтів з хромосомними транслокаціями BCR/ABL1 та E2A/PBX1. У пацієнтів з хромосомною транслокацією AF4/MLL ефективність терапії виявилася найвищою, оскільки на 33-й день лікування бластні клітини у кістковому мозку не візуалізувалися (рис. 4).

Рис. 4. Залежність кількості бластних клітин кісткового мозку від молекулярно-генетичних транслокацій під час цитотоксичного лікування за програмою ALLIC BFM 2009

Кількість бластних клітин у пацієнтів з транслокацією TEL/AML була нижчою порівняно з ідентичним показником пацієнтів з хромосомними транслокаціями BCR/ABL1 та E2A/PBX1 (рис. 4). Встановлений факт свідчить про те, що складні поломки в каріотипі клітин пухлинного клону, а саме транслокації BCR/ABL1 та E2A/PBX1, є несприятливою прогностичною ознакою перебігу гострого лейкемічного процесу в дітей, незважаючи на наявність відповідних прогностично сприятливих клональних порушень [16].

Зниження проліферації недиференційованих клітин пухлинного клону у кістковому мозку при ГЛЛ свідчить про позитивну відповідь пацієнтів на застосування ALLIC BFM 2009 терапію. При цьому на позитивні зміни у первинній відповіді дітей на індукційне лікування за програмою ALLIC BFM 2009 можуть свідчити і показники бластних клітин у периферичній крові. Так, за умов проведення хіміотерапії у периферичній крові пацієнтів з ГЛЛ всіх досліджуваних груп знижується кількість бластних клітин (рис. 5). Однак, інтенсивність зниження кількості бластних клітин залежить від виду молекулярно-генетичної транслокації. Встановлено, що більшою мірою зниження кількості бластних клітин у крові спостерігається у пацієнтів з AF4/MLL, у яких вже на 8-й день лікування бластних клітин у крові не виявлено (рис. 5). Встановлений факт може вказувати на те, що клон пухлинних клітин з транслокацією AF4/MLL найчутливіший до хіміопрепаратів, які застосовуються під час лікування ГЛЛ за програмою ALLIC BFM 2009.

У пацієнтів з транслокацією TEL/AML на 33-й день лікування не виявлено бластних клітин у крові (рис. 5), що свідчить про припинення проліферації клітин пухлинного клону в кістковому мозку. У пацієнтів з хромосомними транслокаціями BCR/ABL1 та E2A/PBX1 відсоток бластних клітин у периферичній крові суттєво знижується протягом проведення курсу хіміотерапії, однак бластні клітини з периферичної крові повністю не зникають після проведення курсу хіміотерапії. Так, у пацієнтів з виявленою транслокацією BCR/ABL1 кількість бластів становила 1,2%, а з транслокацією E2A/PBX1 – 0,9% (рис. 5). Встановлений факт може свідчити про продовження проліферації пухлинних клітин у кістковому мозку після проведення одного курсу хіміотерапії, що вказує на ризик розвитку

Рис. 5. Залежність кількості бластних клітин крові від молекулярно-генетичних транслокацій під час цитотоксичного лікування за програмою ALLIC BFM 2009

рецидивів у пацієнтів із виявленими химерними генами.

Отже, підвищення кількості бластних клітин у крові хворих на ГЛЛ із молекулярно-генетичними транслокаціями BCR/ABL1 та E2A/PBX1 вказує на незадовільну відповідь пацієнтів на терапію, що може бути пов'язане із втратою чутливості лейкемічних клітин до дії хіміопрепаратів. Це свідчить про їхню високу проліферативну активність. Саме цей факт має важливе значення при формуванні первинної відповіді пацієнтів на індукційне лікування за програмою ALLIC BFM 2009 у дітей, хворих на ГЛЛ.

Висновки та перспективи подальших досліджень. Під час дослідження первинної відповіді пацієнтів з ГЛЛ на лікування за програмою ALLIC BFM 2009 виявлено залежність кількості бластних клітин кісткового мозку та крові від виду хромосомної аберації. Найвищою стійкістю до хіміотерапії володіють пацієнти з BCR/ABL1 та E2A/PBX1 молекулярно-генетичними транслокаціями, меншою – пацієнти з AF4/MLL та TEL/AML, про що свідчить наявність та відсутність бластних клітин у периферичній крові відповідно.

Встановлення взаємозв'язку між цитогенетичними та молекулярно-генетичними ознаками пухлинного клону допоможе встановити ступінь злоякісності процесу, а також групу ризику щодо перебігу хвороби. Визначення залежності перебігу гострих лейкемій від молекулярно-генетичних транслокацій дасть можливість в подальшому модифікувати програму лікування.

References

- Chen X, Zheng J, Zou Y, Song C, Hu X, Zhang C. IGF binding protein 2 is a cell-autonomous factor supporting survival and migration of acute leukemia cells. *J Hematol Oncol.* 2013 Oct 08; 6(1): 72-82. doi: 10.1186/1756-8722-6-72
- Chiarini F, Lonetti A, Evangelisti C, Buontempo F, Orsini E, Evangelisti C, et al. Advances in understanding the acute lymphoblastic leukemia bone marrow microenvironment: From biology to therapeutic targeting. *Biochim Biophys Acta.* 2016 Mar; 1863(3): 449-463. doi: 10.1016/j.bbamer.2015.08.015

3. Pui CH, Roberts KG, Yang JJ, Mullighan CG. Philadelphia chromosome-like acute lymphoblastic leukemia. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.* 2017 Aug 01; 17(8): 464-470. doi: 10.1016/j.clml.2017.03.299
4. Jain S, Abraham A. BCR-ABL1-like B-acute lymphoblastic leukemia/lymphoma: a comprehensive review. *Arch Pathol Lab Med.* 2020 Oct 23; 144(2): 150-155. doi: 10.5858/arpa.2019-0194-RA
5. Cernan M, Szotkowski T, Pikalova Z. Mixed-phenotype acute leukemia: state-of-the-art of the diagnosis, classification and treatment. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2017; 161(3): 234-241. doi: 10.5507/bp.2017.013
6. Agarwal A, Bolosky WJ, Wilson DB, Eide CA, Olson SB, Fan G, et al. Differentiation of leukemic blasts is not completely blocked in acute myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2019 Nov 21; 116(49): 24593-24599. doi: 10.1073/pnas.1904091116
7. Mikosik A, Henc I, Ruckemann-Dziurdzińska K, Frąckowiak JE, Płoszyńska A, Balcerska A, et al. Increased μ -calpain activity in blasts of common B-precursor childhood acute lymphoblastic leukemia correlates with their lower susceptibility to apoptosis. *PLoS One.* 2015 Aug 28; 10(8): e0136615. doi: 10.1371/journal.pone.0136615
8. Garibyan L, Avashia N. Polymerase chain reaction. *J Invest Dermatol.* 2013 Mar 01; 133(3): 1-4. doi: 10.1038/jid.2013.1
9. Theunissen P, Mejsstrikova E, Sedek L, van der Sluijs-Gelling AJ, Gaipa G, Bartels M, et al. Standardized flow cytometry for highly sensitive MRD measurements in B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 2017 Jan 19; 129(3): 347-357. doi: 10.1182/blood-2016-07-726307
10. Glier H, Novakova M, Te Marvelde J, Bijkerk A, Morf D, Thurner D, et al. Comments on EuroFlow standard operating procedures for instrument setup and compensation for BD FACS Canto II, Navios and BD FACS Lyric instruments. *J Immunol Methods.* 2019 Dec; 475: 112680. doi: 10.1016/j.jim.2019.112680
11. Kashiwagi S, Fujioka Y, Kondo T, Satoh AO, Yoshida A, Fujioka M, et al. Localization of BCR-ABL to stress granules contributes to its oncogenic function. *Cell Struct Funct.* 2019; 44(2): 195-204. doi: 10.1247/csf.19033
12. Sontakke P, Carretta M, Jaques J, Brouwers-Vos AZ, Lubbers-Aalders L, Yuan H, et al. Modeling BCR-ABL and MLL-AF9 leukemia in a human bone marrow-like scaffold-based xenograft model. *Leukemia.* 2016 Apr 29; 30(10): 2064-2073. doi: 10.1038/leu.2016.108
13. Boer JM, Steeghs EM, Marchante JR, Boeree A, Beaudoin JJ, Beverloo HB, et al. Tyrosine kinase fusion genes in pediatric BCR-ABL1-like acute lymphoblastic leukemia. *Oncotarget.* 2017; 8(3): 4618-4628. doi: 10.18632/oncotarget.13492
14. Ferreira AF, Moura LG, Tojal I, Ambrósio L, Pinto-Simões B, Hamerschlag N, et al. ApoptomiRs expression modulated by BCR-ABL is linked to CML progression and imatinib resistance. *Blood Cells Mol Dis.* 2014 Jun-Aug; 53(1-2): 47-55. doi: 10.1016/j.bcmd.2014.02.008
15. Abruzzo LV, Herling CD, Calin GA, Oakes C, Barron LL, Banks HE, et al. Trisomy 12 chronic lymphocytic leukemia expresses a unique set of activated and targetable pathways. *Haematologica.* 2018 Dec; 103(12): 2069-2078. doi: 10.3324/haematol.2018.190132
16. Messina M, Chiaretti S, Wang J, Fedullo AL, Peragine N, Gianfelici V, et al. Prognostic and therapeutic role of targetable lesions in B-lineage acute lymphoblastic leukemia without recurrent fusion genes. *Oncotarget.* 2016 Mar 22; 7(12): 13886-901. doi: 10.18632/oncotarget.7356

УДК 616. 155.392-036.11

РОЛЬ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ ТРАНСЛОКАЦИЙ В ПЕРВИЧНОМ ОТВЕТЕ НА ЛЕЧЕНИЕ ДЕТЕЙ С ОСТРОЙ ЛИМФОБЛАСТНОЙ ЛЕЙКЕМИЕЙ ПО ПРОГРАММЕ ALLIC BFM 2009

Винницкая Е. А., Дорош О. И., Дубей Л. Я., Дубей Н. В.

Резюме. В работе проведен корреляционный анализ между уровнем бластных клеток в костном мозге и периферической крови, а также исследована зависимость уровня бластов от наличия молекулярно-генетических транслокаций (AF4/MLL, BCR/ABL1, TEL/AML, E2A/PBX1) у пациентов с острой лимфобластной лейкемией в условиях применения ALLIC-BFM 2009 цитостатической терапии.

Цель работы. Установить взаимосвязь между количеством бластных клеток в костном мозге и периферической крови в зависимости от наличия молекулярно-генетических транслокаций для раннего выявления ответа на индукционное лечение по программе ALLIC BFM 2009.

Материалы и методы. Группу обследования составили 105 детей в возрасте от 12 месяцев до 16 лет (медиана возраста составила 6 лет). Среди обследованных было 62 мальчиков (59,0%) и 43 девочки (41,0%). У всех пациентов был установлен диагноз острая лимфобластная лейкемия.

Результаты. С помощью корреляционного анализа установлена высокая степень взаимосвязи между уровнем бластных клеток в костном мозге и периферической крови, поскольку коэффициент корреляции (r) равен 0,87. Показано, что повышение количества бластных клеток зависит от наличия

хромосомных транслокаций. Самое высокое количество бластов наблюдается у пациентов с BCR/ABL1 и E2A/PBX1 транслокациями, в которых содержание бластов в костном мозге составил 97 и 96% соответственно, а в периферической крови – 67 и 73% соответственно.

Установлено, что проведение лечения по программе ALLIC BFM 2009 приводит к снижению количества бластных клеток в костном мозге и крови с минимальными показателями на 33-й день лечения. Показано, что при химиотерапии высокий уровень бластных клеток наблюдается у пациентов с хромосомными транслокациями BCR/ABL1 и E2A/PBX1. У пациентов с транслокацией AF4/MLL эффективность терапии оказалась высокой, поскольку на 33-й день лечения бластные клетки в костном мозгу не визуализировались.

Выводы. Во время исследования первичного ответа пациентов с острой лимфобластной лейкемией на химиотерапию по программе ALLIC BFM 2009 выявлена зависимость уровня бластных клеток костного мозга и крови от вида хромосомных aberrаций. Самой высокой устойчивостью к химиотерапии обладают пациенты с BCR/ABL1 и E2A/PBX1 молекулярно-генетическими транслокациями, меньше – пациенты с AF4/MLL и TEL/AML, о чем свидетельствует наличие и отсутствие бластных клеток в периферической крови соответственно.

Установление взаимосвязи между цитогенетическими и молекулярно-генетическими признаками опухолевого клона дает возможность установить степень злокачественности процесса, а также группу риска в плане течения болезни. Определение зависимости течения острых лейкозов от молекулярно-генетических транслокаций даст возможность в дальнейшем модифицировать программу лечения.

Ключевые слова: бластные клетки, причудливые гены AF4/MLL, BCR/ABL, E2A/PBX1, TEL/AML; транслокация, острая лимфобластная лейкемия у детей, костный мозг, кровь.

UDC 616. 155.392-036.11

The Role of Molecular Genetic Translocations in the Initial Response to the Treatment under the ALLIC BFM 2009

Program in Children Patients with Acute Lymphoblastic Leukemia

Vynnytska O. A., Dorosh O. I., Dubey L. Ya., Dubey N. V.

Abstract. The correlation analysis between the number of blast cells in bone marrow and peripheral blood was performed, and the dependence of blast percentage on the presence of molecular genetic translocations (AF4/MLL, BCR/ABL1, TEL/AML, E2A/PBX1) in patients with acute lymphoblastic leukemia (ALL) under the conditions of ALLIC-BFM 2009 cytostatic therapy was researched.

The purpose of the study was to establish a relationship between the number of blast cells in bone marrow and peripheral blood depending on the presence of molecular genetic translocations for early detection of induction treatment by ALLIC BFM 2009.

Materials and methods. The survey group consisted of 105 children aged 12 months to 16 years (median age was 6 years). Among those surveyed were 62 boys (59.0%) and 43 girls (41.0%). All patients were diagnosed with acute lymphoblastic leukemia.

Results and discussion. Correlation analysis revealed a high degree of correlation between the number of blast cells in the bone marrow and peripheral blood, as the correlation coefficient (r) is 0.87. It is shown that the increase in the number of blast cells depends on the presence of chromosomal translocations. The highest number of blasts was observed in patients with BCR/ABL1 and E2A/PBX1 translocations, in whom the content of blasts in bone marrow was 97 and 96%, respectively, and in peripheral blood – 67 and 73%, respectively.

It was found that treatment under the ALLIC BFM 2009 program leads to a decrease in the number of blast cells in the bone marrow and blood with minimal values on the 33rd day of treatment. It has been shown that the highest levels of blast cells during chemotherapy are observed in patients with chromosomal translocations BCR/ABL1 and E2A/PBX1. In patients with AF4/MLL translocation, the efficacy of therapy was the highest because no blast cells in the bone marrow were visualized on day 33 of treatment.

The study of the primary response of patients with acute lymphoblastic leukemia to induction treatment according to the ALLIC BFM 2009 program revealed the dependence of the level of blast cells of bone marrow and blood on the type of chromosomal aberration. Patients with BCR/ABL1 and E2A/PBX1 have the highest resistance to chemotherapy with molecular genetic translocations, and patients with AF4/MLL and TEL/AML have the lowest resistance, as evidenced by the presence and absence of blast cells in the peripheral blood, respectively.

Conclusion. Establishing the relationship between cytogenetic and molecular genetic features of the tumour clone will help determine the degree of malignancy of the process, as well as the risk group for the course of the disease. Determining the dependence of acute leukemia on molecular genetic translocations will make it possible to further modify the treatment program.

Keywords: blast cells, chimeric genes AF4/MLL, BCR/ABL, E2A/PBX1, TEL/AML, translocation, acute lymphoblastic leukemia in children, bone marrow, blood.

ORCID and contributionship:

Olena A. Vynnytska: 0000-0003-1119-2485 ^{B,D,E}

Olga I. Dorosh: 0000-0002-5919-9371 ^{A,C}

Leonid Y. Dubey: 0000-0003-1094-6708 ^{E, F}

Natalia V. Dubey 0000-0003-1094-6708 ^{A,E}

A – Work concept and design, B – Data collection and analysis,
C – Responsibility for statistical analysis, D – Writing the article,
E – Critical review, F – Final approval of the article

CORRESPONDING AUTHOR

Vynnytska Olena Andriivna

Danylo Halytsky Lviv National Medical University,

Department of Pediatrics and Neonatology, Faculty of Postgraduate Education

69, Pekarska St., Lviv 79010, Ukraine

tel 0976753072, e-mail: katerinalavra@gmail.com

The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of coauthors of the article.

Received: 31.03.2021 p.

Рекомендована до друку на засіданні редакційної колегії після рецензування