DOI 10.34883/PI.2021.7.4.003
УДК 616.155.392-036.11:575.1

Вшивкова О.С., Корзик А.В., Мелешко А.Н.

Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии
и иммунологии, Минск, Беларусь

Vshyukova V., Korzik A., Meleshko A.

Belarusian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology, Minsk, Belarus

Передача aberrаций гена IKZF1 в рецидивном клоне В-линейного острого лимфобластного лейкоза

Inheritance of IKZF1 Gene Aberrations in a Recurrent Clone
of B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia

Резюме

В данном исследовании мы провели оценку aberrаций IKZF1 в парных случаях первичный – рецидив пациентов детского возраста с В-линейным острым лимфобластным лейкозом (В-ОЛЛ) с целью установить частоту и определить рациональность диагностики aberrаций при рецидивах заболевания.

Данное исследование подтверждает существующую гипотезу о вкладе aberrаций IKZF1 в развитие первого рецидива заболевания: частота aberrаций составила 10,4% у пациентов с первичным В-ОЛЛ и достигала 27,7% при рецидивах заболевания ($p=0,0005$). Наши результаты убедительно доказывают передачу aberrаций IKZF1 от первичного В-ОЛЛ к рецидиву заболевания в подавляющем большинстве случаев.

Наличие aberrаций IKZF1 является прогностическим маркером развития первого рецидива, однако нами не выявлено значимых различий в показателях бессобытийной выживаемости после первого рецидива. Таким образом, диагностика aberrаций при рецидивах В-ОЛЛ с целью прогнозирования развития второго и последующих рецидивов нецелесообразна. У пациентов с делециями IKZF1, выявленными при первичном ОЛЛ, следует ожидать и вовремя предотвращать развитие ранних рецидивов в период с 18 до 30 месяцев с момента первичного диагноза.

Ключевые слова: IKZF1, острый лимфобластный лейкоз, рецидив, клональная эволюция.

Abstract

In this study, we assessed IKZF1 aberrations in paired primary-relapse cases of pediatric patients with B-cell acute lymphoblastic leukemia (B-ALL) in order to establish the frequency and rationality of the diagnosis of aberrations in relapses of the disease.

This study confirms the existing hypothesis on the contribution of IKZF1 aberrations to the development of disease relapse: the frequency of aberrations was 10.4% in patients with primary B-ALL and reached 27.7% in relapse ($p=0.0005$). Our results convincingly prove the transfer of IKZF1 aberrations from primary ALL to relapse in the majority of cases.

The presence of IKZF1 aberrations is a prognostic marker for the development of the first relapse; however, we did not find any significant differences in event-free survival after the first relapse. Thus, the diagnosis of aberrations in ALL relapses in order to predict the development of the second and subsequent relapses is not advisable. In patients with IKZF1 deletions identified in primary ALL, early relapses should be expected and prevented in time between 18 and 30 months after the initial diagnosis.

Keywords: IKZF1, acute lymphoblastic leukemia, relapse, clonal evolution.

■ ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на высокие показатели бессобытийной выживаемости (БСВ) у пациентов с В-линейным острым лимфобластным лейкозом (В-ОЛЛ) при терапии первой линии в соответствии со стандартными протоколами, рецидивы и рефрактерные формы заболевания остаются актуальной проблемой, а в структуре онкологических заболеваний В-ОЛЛ по-прежнему является основной причиной смертности среди детей.

С точки зрения биологии, неудачи лечения можно объяснить генетической гетерогенностью первичной опухоли, ее естественной или химиоиндуцированной клональной эволюцией. Как и все виды опухолей, острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ) характеризуется последовательным приобретением генетических aberrаций, которые приводят к возникновению и поддержанию лейкемического клона. Генетические aberrации можно рассматривать как первичные (драйверные) или вторичные (дополнительные) события. Драйверные aberrации ответственны за инициирование предлейкемического клона, который, приобретая вторичные генетические изменения, трансформируется в лейкоз. Далее естественная клональная эволюция создает внутриопухолевую гетерогенность и обеспечивает прогрессию опухоли за счет выживания опухолевых клонов.

В большинстве случаев первичных нелеченых ОЛЛ обнаруживаются доминантный опухолевый клон и несколько минорных субклонов – популяций клеток, несущих мутации различных генов. Но в результате химиоиндуцированной клональной эволюции лишь один из них, выживший после терапии, становится рецидивирующим клоном, при этом 75% рецидивирующих опухолей являются потомками минорных субклонов, то есть в большинстве случаев доминантные клоны уничтожаются терапией [1–3].

Во всех клетках, составляющих лейкемический клон, присутствуют первичные aberrации, которые определяют ключевые особенности лейкоза. Вторичные aberrации появляются позже в результате эволюции лейкозного клона и приводят к сложной субклональной архитектуре ветвления. Первичные aberrации являются более надежными прогностическими маркерами, чем вторичные aberrации, вероятно, из-за того, что они определяют ключевые особенности заболевания. Таким образом, основное внимание в большинстве алгоритмов диагностики при В-ОЛЛ уделяется выявлению основных первичных aberrаций, используемых для разделения пациентов на группы риска [4]. Однако не менее важно изучение и вторичных мутаций, которые чаще всего

являются триггерами в рецидивирующих клонах и дают представление о происхождении рецидивного клона, его свойствах, а также являются «вторичным» маркером неблагоприятного исхода, но не ключевым независимым прогностическим биомаркером.

При ОЛЛ одной из важных вторичных аберраций являются внутригенные делеции гена транскрипционного фактора IKZF1 (Ikaros), которые встречаются в среднем у 15% детей при В-ОЛЛ, чаще всего – у пациентов с транслокацией BCR-ABL1 (>60%) и до 85% случаев – у пациентов с BCR-ABL1-подобным ОЛЛ. Первые исследования предполагали, что все пациенты с делецией IKZF1 имеют значительно худший прогноз и она является надежным прогностическим маркером развития первого рецидива В-ОЛЛ. Однако более поздние исследования, основанные на крупных и репрезентативных когортах, показали, что эффект делеций IKZF1 носит плейотропный характер. В частности, исследование COG (Children's Oncology Group) показало, что делеции IKZF1 определяют прогноз только для пациентов высокого риска (по классификации Национального института рака, NCI), а для пациентов стандартного риска не являются значимым фактором рецидива. Кроме того, наличие делеции IKZF1 не отменяет прогноза, связанного с другими генетическими аберрациями высокого риска. Эти выводы коррелируют с результатами исследований, в которых изучалось взаимодействие делеции IKZF1 и уровня минимальной остаточной болезни (МОБ). В нескольких исследованиях сообщается, что делеции IKZF1 не являются прогностическим фактором для пациентов с быстрым клиренсом бластных клеток [5].

Плейотропность аберраций IKZF1 закономерна, поскольку они признаны вторичным событием лейкемогенеза, отсюда вытекает, что статус гена может отличаться при постановке диагноза и рецидиве. Однако лишь в единичных исследованиях аберрации IKZF1 рассматривались при рецидивах ОЛЛ, а клональное происхождение прослежено лишь в одном исследовании под руководством Xiaotu Ma [4]. Авторами проведено глубокое секвенирование 20 образцов костного мозга (первичный/рецидив/ремиссия) пациентов детского возраста с В-ОЛЛ, и продемонстрировано, что делеции IKZF1 являются рецидив-специфическими аберрациями, присутствующими как при первичном ОЛЛ, так и при рецидивах заболевания. При этом рецидивный клон обогащен делециями IKZF1 – удельный вес клеток, несущих делеции, выше.

В данном исследовании мы провели оценку аберраций IKZF1 в парных случаях пациентов детского возраста с В-ОЛЛ двумя разными методами с целью установить частоту и определить рациональность диагностики аберраций при рецидивах заболевания.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Когорта пациентов

В исследование включено 211 пациентов с первичным В-ОЛЛ и 65 пациентов с рецидивом заболевания, среди которых 43 случая были парными (пары образцов костного мозга пациентов с первичным ОЛЛ и соответствующим рецидивом(-ами)). Среди них – 38 пар с одним (первым) рецидивом, а также 5 пар с двумя (первым и последующий) рецидивами.

Все пациенты прошли диагностику и лечение в ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии» (Минск, Беларусь) с июля 2002 года по ноябрь 2014 года. Медиана возраста первичных пациентов составила 5,2 года (1–18 лет). Все пациенты получали лечение по протоколам «Москва-Берлин» (ALL-MB 2002; ALL-MB 2008), определение групп риска и схемы лечения опубликованы ранее [6, 7].

Включение пациентов в исследование определялось наличием биологического материала и качеством образцов ДНК и РНК. Другие критерии отбора не использовались. Письменное информированное согласие на проведение исследования было получено от опекунов.

RQ-PCR анализ экспрессии изоформ Ikaros

Для проведения ПЦР в реальном времени (RQ-PCR) с целью определения уровня экспрессии изоформ Ikaros общую клеточную РНК из мононуклеарных клеток экстрагировали с помощью реагента для выделения РНК TRIReagent (Sigma-Aldrich Co LLC, США) в соответствии с инструкциями производителя. Количество и чистоту РНК определяли с помощью спектрофотометра NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, США) и гель-электрофореза. Отношение оптической плотности при 260 и 280 нм (A260/A280) более 1,8 считалось приемлемым показателем чистоты РНК. Качество образцов РНК определяли на основе визуальной оценки соотношения субъединиц рибосом 18S/28S в агарозном геле (два четко определенных пика на электрофореграмме с соотношением 18S/28S между 1,8 и 2,0).

Уровень экспрессии коротких доминантно-негативных (Ik-DN) изоформ Ikaros (Ik6, 9 и 10) количественно оценивали в 3 отдельных реакциях RQ-PCR относительно амплификации контрольного гена внутреннего контроля – тирозинкиназы Абельсона. Условия синтеза кДНК, нуклеотидные последовательности праймеров и зондов для RQ-PCR были подробно описаны ранее [8].

Геномные методы для определения внутригенных делеций IKZF1

Для определения делеций IKZF1 мы использовали следующие подходы на основе ПЦР. Во-первых, с помощью ПЦР были проверены две наиболее распространенные делеции: делеции экзонов 1–6 (ΔEx1–6) и делеции экзонов 3–6 (ΔEx3–6). Последовательности всех праймеров для анализа делеций IKZF1 перечислены ранее [8]. Продукты ПЦР в первую очередь исследовали электрофорезом в 1,5% агарозном геле. Наличие заметного бенда считали делецией. Для подтверждения результатов ПЦР последовательности очищенных из агарозного геля ампликонов секвенированы на генетическом анализаторе ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems, США) для идентификации точек разрыва.

Во-вторых, мы использовали специфическую к точкам разрыва мультиплексную флуоресцентную ПЦР с последующим фрагментным анализом. Последовательности праймеров и условия ПЦР описаны в публикации Сауе и соавт. и сконструированы таким образом, чтобы их можно было объединить в одной мультиплексной ПЦР, а длина ампликона и флуоресцентная метка позволяли идентифицировать каждый

из типов делеций $\Delta Ex1-6$, $\Delta Ex3-6$, $\Delta Ex1-7$ и $\Delta Ex3-7$ [9]. Разбавленные в 20 раз ПЦР-продукты денатурировали формамидом (Applied Biosystems, США) при 95 °C в течение 5 минут и анализировали на секвенаторе ABI 3130 (Applied Biosystems, США) с использованием программного обеспечения для анализа размера фрагментов GeneMapper (Applied Biosystems, США).

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Частота aberrаций гена IKZF1 при первично диагностированных В-ОЛЛ и рецидивах

Анализ внутригенных делеций IKZF1 был проведен в 211 образцах КМ пациентов с первичным В-линейным ОЛЛ и в 65 образцах пациентов с рецидивом заболевания. Частота делеций, выявленных геномными методами, составила 8,0% при первичных В-линейных ОЛЛ, при рецидивах частота делеций составила 20,0% ($p=0,0068$) (табл. 1, строки 1, 2).

Для оценки экспрессии коротких изоформ (Ik-DN) Ik6, 9 и 10 методом RQ-PCR было доступно 118 образцов костного мозга пациентов с первичным В-ОЛЛ и 44 образца костного мозга пациентов с рецидивом заболевания. Экспрессия Ik-DN была повышена у 12,7% пациентов с первичным В-ОЛЛ и у 29,5% – с рецидивом ($p=0,0117$) (табл. 1, строки 3, 4).

Чувствительность геномных методов для диагностики делеций IKZF1 может быть ограничена ввиду вариабельности точек разрыва, наличия редких типов делеций или хромосомных aberrаций в данном регионе. В то же время метод определения экспрессии коротких изоформ не имеет перечисленных выше технических ограничений, в связи с чем частота aberrантной экспрессии коротких изоформ в данном исследовании была выше в сравнении с частотой выявленных делеций. Тем не менее, эти два генетических события являются взаимозависимыми, и оба в равной степени могут предопределять изменение биологических свойств лейкозного клона.

Таблица 1

Частота aberrаций IKZF1 при первичном В-ОЛЛ и рецидиве заболевания

Table 1
Frequency of IKZF1 aberrations in primary B-ALL and relapse

№	Первичные	N	(%)	Рецидивы	N	(%)	p, Chi-square
1	IKZF1 делеция	17/211	8,0	IKZF1 делеция	13/65	20,0	0,0068
2	IKZF1 wt	194/211	92,0	IKZF1 wt	52/65	80,0	
3	Ik-DN+	15/118	12,7	Ik-DN+	13/44	29,5	0,0117
4	Ik-DN–	103/118	87,2	Ik-DN–	31/44	70,5	
5	IKZF1 абер.	22/211	10,4	IKZF1 абер.	18/65	27,7	0,0005
6	IKZF1 норма	189/211	89,6	IKZF1 норма	47/65	72,3	

В рамках данного исследования статус гена IKZF1 рассматривался как «аберрантный» в случае выявления делеции геномными методами или/и гиперэкспрессии коротких изоформ (табл. 1, строки 5, 6). При этом частота aberrаций гена IKZF1 составила 10,4% у первичных пациентов и достигала 27,7% при рецидивах заболевания ($p=0,0005$), что подтверждает существующую гипотезу о вкладе aberrаций IKZF1 в развитие рецидива заболевания.

Значительное увеличение удельной частоты aberrаций при рецидивах ОЛЛ, зарегистрированное в нашем анализе, подтверждает то, что присутствующий при первичной диагностике клон с aberrантным IKZF1 может провоцировать рост лейкозного клона за счет клональной экспансии и/или химиоиндуцированной клональной эволюции и стать доминирующим клоном при рецидиве.

Сравнительный анализ aberrаций IKZF1 в парных случаях первичный – рецидив

Анализ делеций IKZF1 методом ПЦР был проведен в 43 парах образцов костного мозга пациентов с первичным В-ОЛЛ и соответствующим рецидивом(-ами). Среди них – 38 пар с одним (первым) рецидивом, а также 5 пар с двумя (первый и последующий) рецидивами (табл. 2).

На рис. 1 схематично отображены данные из табл. 2: делеция IKZF1, выявленная геномными методами, в 100% случаев переходит из первичного лейкозного клона в рецидивирующий. То есть у всех пациентов,

Таблица 2
Частота передачи делеции IKZF1 от первичного лейкозного клона в последующие рецидивные клоны

Table 2
Frequency of transmission of IKZF1 deletions from the primary leukemic clone to subsequent relapses

Статус гена	Первичный ОЛЛ, n=43	Рецидив 1, n=43	Рецидив 2, n=5
IKZF1 делеция	8	8 (100%)	1 (100%)
IKZF1 норма	35	35 (100%)	4 (100%)

Рис. 1. Схематичная иллюстрация передачи делеции IKZF1 от первичного лейкозного клона в последующие рецидивные клоны

Fig. 1. Schematic illustration of the transfer of an IKZF1 deletion from a primary leukemic clone to subsequent relapses

включенных в наше исследование, популяция лейкозных клеток, доминирующая в рецидиве, уже присутствовала в момент постановки диагноза до начала лечения.

В рамках этого исследования нами был выявлен и подробно описан случай перехода одного типа делеции в другую с сохранением аберрантного статуса IKZF1 [10]. У одного из пациентов при первичном диагнозе были обнаружены два клон лейкозных клеток с различными делециями: Ex3–6 и Ex1–6, что подтверждено секвенированием локуса IKZF1 с аллель-специфичными праймерами и отслеживанием динамики минимальной остаточной болезни. При первом рецидиве у данного пациента обнаружили опухолевый клон с делецией Ex3–6, а клон с делецией Ex1–6 был элиминирован, тем не менее, аберрантный статус гена IKZF1 был сохранен.

Оценка экспрессии коротких изоформ Ik6, 9 и 10 методом RQ-PCR была проведена в 31 паре образцов костного мозга пациентов с первичным В-ОЛЛ и соответствующим рецидивом(-ами) заболевания. Среди них – 30 пар с одним (первым) рецидивом, а также 2 пары с двумя (первым и последующий) рецидивами (табл. 3).

У одного пациента (14,3%) при первичном В-ОЛЛ была зарегистрирована гиперэкспрессия коротких изоформ Ikaros, однако при рецидиве заболевания клон был элиминирован (рис. 2). Как при первичном заболевании, так и при рецидиве делеция IKZF1 геномными методами не выявлялась.

Таблица 3

Частота передачи гиперэкспрессии коротких изоформ Ikaros (Ik-DN) при первичном лейкозном клоне и соответствующих рецидивных клонах

Table 3

Frequency of transmission of overexpression of short isoforms Ikaros (Ik-DN) in the primary leukemic clone and the corresponding relapses

Экспрессия	Первичный ОЛЛ, n=31	Рецидив 1, n=30	Рецидив 2, n=2
Ik-DN+	7	6 (85,7%)	1 (100%)
Ik-DN+ /Ik-DN–	–	1 (14,3%)	0
Ik-DN–	24	23 (95,8%)	1 (100%)
Ik-DN– /Ik-DN+	–	1 (4,2%)	0

Рис. 2. Схематичная иллюстрация передачи гиперэкспрессии коротких изоформ IKZF1 от первичного лейкозного клона в последующие рецидивные клоны

Fig. 2. Schematic illustration of the transfer of overexpression of short isoforms of IKZF1 from the primary leukemic clone to subsequent relapses

При первичном заболевании была зарегистрирована гиперэкспрессия коротких изоформ Ik6 и 9, что соответствует делеции с 3-го по 6-й экзон, однако при рецидиве экспрессия коротких изоформ была в норме, что подтверждено двумя последовательными RQ-PCR. При этом методом iFISH в 24% клеток КМ при рецидиве визуализировалась делеция локуса IKZF1 (при первичном В-ОЛЛ не было доступного материала для проведения iFISH-исследования).

Этот случай можно категоризовать как делецию в минорном субклоне лейкозных клеток, обнаружение которой было невозможно геномными методами ввиду их низкой чувствительности.

Кроме того, феномен можно объяснить присутствием у пациента редких внутригенных делеций, которые невозможно выявить используемыми в нашем исследовании геномными методами (используемые праймеры не соответствуют точкам разрыва ДНК).

У другого пациента (4,2%) гиперэкспрессия коротких изоформ определялась только в рецидивном клоне. При первичном ОЛЛ делеция IKZF1 геномными методами не выявлялась, а уровень экспрессии коротких изоформ был в пределах нормальных значений. При рецидиве была зарегистрирована гиперэкспрессия короткой изоформы Ik6.

Случай можно объяснить феноменом альтернативного сплайсинга, в результате которого происходит формирование коротких изоформ при отсутствии делеции в гене. То есть гиперэкспрессия коротких изоформ может являться нормальным механизмом саморегуляции лейкозных клеток конкретного пациента.

Характеристика рецидивов

Согласно протоколу лечения, параметрами, определяющими группу риска от S1 до S4, являются время возникновения (очень ранний, ранний или поздний) и локализация рецидива (изолированный костномозговой или комбинированный).

Изолированный костномозговой рецидив регистрировали при наличии по крайней мере 25% лимфобластов в костном мозге без признаков экстрамедуллярной лейкемической инфильтрации. В случаях с доказанной экстрамедуллярной лейкемической инфильтрацией комбинированный костномозговой рецидив диагностировали при наличии более 5% лимфобластов в костном мозге.

По времени возникновения рецидивы подразделяют на очень ранний, ранний и поздний. Определение рецидивов по срокам возникновения: поздний рецидив – более 6 месяцев от момента завершения терапии первой линии; ранний – 18–30 месяцев от даты постановки первичного диагноза; очень ранний – менее 18 месяцев от даты постановки первичного диагноза.

Определение группы риска (время возникновения и место рецидива), так же как и иммунофенотип бластных клеток, являются параметрами, определяющими эту стратификацию:

- в терапевтическую группу S1 входят все пациенты с поздними изолированными внекостномозговыми рецидивами;
- терапевтическая группа S2 включает пациентов с очень ранними и ранними изолированными внекостномозговыми рецидивами,

пациентов с поздними костномозговыми non-T-ОЛЛ и пациентов с комбинированными ранними или поздними non-T-ОЛЛ;

- терапевтическая группа S3 включает всех пациентов с ранним изолированным костномозговым рецидивом non-T-ОЛЛ;
- терапевтическая группа S4: пациенты с очень ранними комбинированными или изолированными костномозговыми рецидивами, также все пациенты с костномозговым рецидивом T-ОЛЛ.

При сравнении групп пациентов по категориальным признакам использовали критерий χ^2 или критерий Фишера (табл. 4).

Для пациентов с делециями IKZF1 было характерным преимущественно раннее развитие рецидивов – в период от 18 до 30 месяцев с момента первичного диагноза ($p=0,027$). Зависимости между наличием aberrаций и локализацией рецидива не выявлено.

Проведена оценка показателей бессобытийной выживаемости (БСВ) после первого рецидива, рассчитанных по методу Каплана – Майера. Для сравнения кривых выживаемости использовали непараметрический log-rank критерий. Выживаемость рассчитывали от даты диагностики рецидива В-ОЛЛ до даты наступления неблагоприятного события или даты последнего контакта с пациентом. При оценке БСВ событиями считались: смерть в индукции, смерть в ремиссии, 2-й и последующий рецидивы, вторая опухоль, рефрактерность к терапии (non-responder). У пациентов, не достигших ремиссии, датой наступления события считалась нулевая точка (дата рецидива). Значимых различий в показателях БСВ у рецидивировавших пациентов с aberrациями IKZF1 и нормальным статусом гена выявлено не было.

Таблица 4

Распределение случаев с aberrациями IKZF1 в зависимости от терапевтических групп и параметров, их определяющих

Table 4
Distribution of cases with IKZF1 aberrations depending on therapeutic groups and parameters that determine them

Количество случаев	Тип aberrации	Очень ранний	Ранний	Поздний	S1-2	S3-4	Изолированный	Комбинированный
N=8	делеция	1	5	2	4	4	6	2
N=35	wt	10	8	17	21	14	28	7
p, Chi-square		0,34	0,0276	0,2258	0,604	0,604	0,7537	0,753
N=7	DN+	3	2	2	3	4	6	1
N=23	DN–	5	6	12	16	7	18	5
p, Chi-square		0,268	0,8964	0,273	0,199	0,199	0,6659	0,665

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Аберрации гена IKZF1 являются вторичным генетическим событием при развитии В-ОЛЛ. Иными словами, они не ответственны за инициирование предлейкемического клона и не определяют его ключевые особенности, но приводят к трансформации и прогрессированию опухолевого клона, являясь триггерами рецидивирующего клона.

Данное исследование подтверждает существующую гипотезу о вкладе aberrаций IKZF1 в развитие рецидива заболевания: частота aberrаций составила 10,4% у пациентов с первичным В-ОЛЛ и достигала 27,7% при рецидивах заболевания ($p=0,0005$). Значительное увеличение удельной частоты aberrаций при рецидивах ОЛЛ, зарегистрированное в нашем анализе, подтверждает мнение о том, что aberrантный IKZF1, присутствующий при первичной диагностике, может дать преимущество роста лейкозного клона за счет клональной экспансии и/или химиоиндуцированной клональной эволюции и стать доминирующим клоном при рецидиве.

В зависимости от метода диагностики aberrаций, у подавляющего большинства пациентов, включенных в наше исследование, лейкозный клон с aberrациями гена IKZF1 уже присутствовал в момент постановки диагноза до начала лечения. Так, с использованием геномных методов было установлено, что делеция IKZF1 в 100% случаев переходит из первичного лейкозного клона в рецидивирующий. При оценке экспрессии коротких изоформ Ik6, 9 и 10 методом RQ-PCR у одного пациента (3,3%) при первичном В-ОЛЛ была зарегистрирована гиперэкспрессия коротких изоформ Ikaros, а при рецидиве заболевания клон был элиминирован. У другого пациента (3,3%) гиперэкспрессия коротких изоформ определялась только в рецидивном клоне. Эти случаи можно категоризовать как делеции в минорном субклоне лейкозных клеток, обнаружение которых было невозможно геномными методами ввиду их ограниченной чувствительности, ввиду присутствия у пациента редких внутригенных делеций, а также феномена альтернативного сплайсинга, в результате которого происходит формирование коротких изоформ при отсутствии делеции в гене. То есть гиперэкспрессия коротких изоформ может являться нормальным механизмом саморегуляции лейкозных клеток конкретного пациента.

Результаты демонстрируют, что геномные методы характеризуются большей специфичностью при определении делеций IKZF1, а метод RQ-PCR в отдельных клинических случаях может быть менее специфичным, но более показательным при определении делеций в минорных субклонах, редких делеций или случаев альтернативного сплайсинга. Тем не менее, наши результаты убедительно доказывают передачу aberrаций IKZF1 от первичного В-ОЛЛ к рецидиву заболевания.

Несмотря на то, что наличие aberrаций IKZF1 является прогностическим маркером развития первого рецидива [8], нами не выявлено значимых различий в показателях БСВ после первого рецидива. Таким образом, aberrации IKZF1 не связаны с повышенным риском второго рецидива или смерти после первого рецидива и представляют собой только прогностический маркер первого рецидива для некоторых групп пациентов, что было показано нами ранее [8]. Диагностика aberrаций при рецидивах В-ОЛЛ с целью прогнозирования развития

второго и последующих рецидивов нецелесообразна. Однако пациенты с делециями IKZF1, выявленными при первичном В-ОЛЛ, имеют высокий риск развития ранних рецидивов в период от 18 до 30 месяцев с момента первичного диагноза, что следует учитывать в клинической практике.

Вклад авторов: концепция исследования, проведение исследования, сбор и обработка информации, написание текста, редактирование – О.С. Вшивкова; сбор и обработка информации – А.В. Корзик, концепция исследования, консультант, руководитель исследования – А.Н. Мелешко.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Ding Li, Ley T.J. (2012) Clonal evolution in relapsed acute myeloid leukaemia revealed by whole-genome sequencing. *Nature*, vol. 481, pp. 506–510.
2. Mullighan C.G., Phillips L.A., Su X. (2008) Genomic analysis of the clonal origins of relapsed acute lymphoblastic leukemia. *Science*, vol. 322, pp. 1377–1380.
3. Walter M.J., Dong Shen D., Ding L. (2012) Clonal architecture of secondary acute myeloid leukemia. *New Engl. J. Med.*, vol. 366, pp. 1090–1098.
4. Ma X., Edmonson M., Yergeau D. (2015) Rise and fall of subclones from diagnosis to relapse in pediatric B-acute lymphoblastic leukaemia. *Nat. Comm.*, vol. 6, Art. nr. 6604.
5. Moorman A.V. (2016) New and emerging prognostic and predictive genetic biomarkers in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*, vol. 101, no 4, pp. 407–416.
6. Karachunskiy A., Herold R., Stackelberg von A. (2008) Preliminary results of the multicenter randomised trial ALL-MB (Moscow-Berlin) 2002 for childhood acute lymphoblastic leukemia in Russia and Belarus. *Pediatric Blood and Cancer*, vol. 50, pp. 31.
7. Rumiantseva I., Karachunskii A., Aleinikova O. (2010) Efficiency of the ALL-MB-2002 protocol in children with acute lymphoblastic leukemia. *Ter Arkh.*, vol. 82, no 7, pp. 11–19.
8. Vshyukova V., Valochnik A., Meleshko A. (2018) Expression of aberrantly spliced oncogenic Ikaros isoforms coupled with clonal IKZF1 deletions and chimeric oncogenes in acute lymphoblastic leukemia. *Blood Cells Mol Dis.*, vol. 71, pp. 29–38.
9. Caye A., Beldjord K., Mass-Malo K. (2013) Breakpoint-specific multiplex polymerase chain reaction allows the detection of IKZF1 intragenic deletions and minimal residual disease monitoring in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*, vol. 98, pp. 597–601.
10. Vshyukova V., Meleshko A., Mihal N. (2016) Changing of IKZF1 genotype during Philadelphia-negative precursor-B acute lymphoblastic leukemia progression: a short clinical case report. *Leuk Res Rep.*, vol. 6, pp. 15–19.

Подана/Submitted: 12.10.2021

Принята/Accepted: 05.11.2021

Контакты/Contacts: vshyukova@gmail.com