




RS Global
Journals

Scholarly Publisher
RS Global Sp. z O.O.
ISNI: 0000 0004 8495 2390

Dolna 17, Warsaw, Poland 00-773
Tel: +48 226 0 227 03
Email: editorial_office@rsglobal.pl

JOURNAL	World Science
p-ISSN	2413-1032
e-ISSN	2414-6404
PUBLISHER	RS Global Sp. z O.O., Poland
ARTICLE TITLE	МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНІ МЕХАНІЗМИ РОЗВИТКУ ГОСТРОЇ ЛІМФОБЛАСТНОЇ ЛЕЙКЕМІЇ У ДІТЕЙ ТА ЇХ КОРЕКЦІЯ ALLIC BFM 2009 ЦИТОСТАТИЧНОЮ ТЕРАПІЄЮ
AUTHOR(S)	Винницька Олена Андріївна
ARTICLE INFO	Vynnytska O. A. (2021) Molecular and Genetic Mechanisms of Development of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia and Their Correction ALLIC BFM 2009 by Cytostatic Therapy. World Science. 1(62). doi: 10.31435/rsglobal_ws/30012021/7400
DOI	https://doi.org/10.31435/rsglobal_ws/30012021/7400
RECEIVED	13 November 2020
ACCEPTED	11 January 2021
PUBLISHED	16 January 2021
LICENSE	 This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License .

© The author(s) 2021. This publication is an open access article.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНІ МЕХАНІЗМИ РОЗВИТКУ ГОСТРОЇ ЛІМФОБЛАСТНОЇ ЛЕЙКЕМІЇ У ДІТЕЙ ТА ЇХ КОРЕКЦІЯ ALLIC BFM 2009 ЦИТОСТАТИЧНОЮ ТЕРАПІЄЮ

Винницька Олена Андріївна,

аспірант, Кафедра Педіатрії і Неонатології, Факультет Післядипломної Освіти, Львівський Національний Медичний Університет імені Данила Галицького, Львів, Україна

DOI: https://doi.org/10.31435/rsglobal_ws/30012021/7400

ARTICLE INFO

Received: 13 November 2020

Accepted: 11 January 2021

Published: 16 January 2021

KEYWORDS

children acute lymphoblastic leukemia, chimeric genes AF4/MLL, BCR/ABL, E2A/PBX1, TEL/AML, leukocytes, hemoglobin, translocation.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the prognostic value of the relationship between genetic abnormalities and clinical and laboratory parameters of peripheral blood and bone marrow in children with acute lymphoblastic leukemia (ALL).

Material and methods. 105 children diagnosed with ALL were examined (average age 6 years). To detect chromosomal translocations AF4/MLL t(4; 11) (q23; p23), BCR/ABL t(9; 22) (q34; q11), E2A/PBX1 t(1; 19) (q23; p13) and TEL/AML t(12; 21) (q13; q22) the method of polymerase chain reaction with reverse transcription (RT-PCR) was applied. PCR was performed with specific primers for the appropriate chromosomal aberrations. Detection of PCR products was performed by electrophoresis in 2% agarose gel. Determination of minimal residual disease (MRD) was performed by multiparameter flow cytometry using monoclonal antibodies.

Results. Among patients, the incidence of ALL is most pronounced in children aged 3 to 6 years - 37 people (35.2%) and aged 6 to 9 years - 26 people (24.8%). The highest incidence was found among patients with chromosomal translocation TEL / AML - 22 (21%) of patients with a median age 5 years. In second place, the frequency of mutations is the translocation of E2A / PBX1. BCR / ABL translocation was less common - 1.9% of patients, but the expression of this gene indicates a bad course of the disease, as patients after cytostatic therapy under the ALLIC BFM 2009 program had a recurrence. Recurrence has also been observed in patients with TEL/AML chromosomal translocation.

Determination of MRD showed its increased level in patients with chromosomal aberrations BCR / ABL and TEL/AML throughout the treatment phase. In addition, patients in these groups were diagnosed with initial leukocytosis followed by leukopenia after a course of chemotherapy. Patients of all groups showed a decrease in hemoglobin.

Conclusion. The biggest changes in clinical and laboratory parameters were found between patients with chromosomal translocations BCR/ABL and TEL/AML, as evidenced by the development of relapses in patients of these groups. The low level of association between karyotype disorders, with the formation of AF4/MLL and E2A/PBX1, and clinical and laboratory parameters in patients with GLL may indicate that the isolated clonal disorders are independent prognostic factors for the course of the disease.

Citation: Vynnytska O. A. (2021) Molecular and Genetic Mechanisms of Development of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia and Their Correction ALLIC BFM 2009 by Cytostatic Therapy. *World Science*. 1(62). doi: 10.31435/rsglobal_ws/30012021/7400

Copyright: © 2021 Vynnytska O. A. This is an open-access article distributed under the terms of the **Creative Commons Attribution License (CC BY)**. The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Вступ. Гостра лімфобластна лейкемія (ГЛЛ) діагностується в основному в дітей і підлітків, що робить її одним з найпоширеніших дитячих онкологічних захворювань [1]. В основі розвитку гострих лейкемій лежать порушення функціонування нормальних генів у клітинах-попередниках гемопоєзу. Причиною формування злоякісного клону можуть бути генні мутації, хромосомні аберації, блокування регуляції функціонування генів [2]. Однією з ознак лейкемій, зокрема ГЛЛ, є хромосомна транслокація – специфічна хромосомна аберація,

яка полягає в обміні сегментами між двома, зазвичай негомологічними, хромосомами. Хромосомна транслокація виникає як результат пошкодження ДНК внаслідок ендегенних та екзогенних генотоксичних факторів та відсутності повної репарації пошкоджених ділянок. Збалансовані транслокації призводять до обміну генетичним матеріалом між хромосомами. З точки зору механізму трансформації результатом такого обміну можуть стати дві принципово різні події: утворення химерного гена, продуктом експресії якого є химерний білок, що володіє онкогенними властивостями [3].

Генні модифікації можуть відбуватися на транскрипційно активних ділянках ДНК, а транскрипти фузійного гена, як правило, відносяться до біополімерів, які є регуляторами клітинного циклу, факторами транскрипції, сигнальними трансдукційними молекулами, рецепторами або імуноглобулінами [4].

Основними хромосомними транслокаціями при ГЛЛ є AF4/MLL t(4;11)(q23;p23), BCR/ABL t(9;22)(q34;q11), E2A/PBX1 t(1;19)(q23;p13), TEL/AML t(12;21)(q13;q22). Подальша експресія зазначених химерних генів призводить до синтезу химерних протеїнів, структурно-функціональні властивості яких змінені. Такі протеїни набувають онкогенних властивостей [5].

На сьогоднішній день молекулярно-генетична діагностика лейкемій набуває все більшого значення, однак питання діагностичного і прогностичного значення транслокацій та пов'язаних з ними химерних генів AF4/MLL, BCR/ABL, E2A/PBX1 та TEL/AML у перебігу гострих лейкемій у дітей, залишається відкритим. Окрім того, залишаються незрозумілими механізми участі химерних протеїнів, що кодуються гібридними генами AF4/MLL, BCR/ABL, E2A/PBX1 та TEL/AML, у розвитку ГЛЛ в дитячому віці.

Розуміння молекулярно-генетичних механізмів розвитку ГЛЛ дозволить встановити ступінь злоскісності процесу та виявити групу ризику щодо рецидивів, що дасть можливість вибрати відповідну схему хіміотерапії.

Мета дослідження: визначити спектр та експресію химерних генів як маркерів молекулярно-генетичної діагностики гострої лімфобластної лейкемії у дітей та оцінити їх роль в перебігу захворювання та ефективності цитостатичної терапії.

Матеріали та методи. Групу обстеження склали 105 дітей, у яких був встановлений діагноз ГМЛ. Середній вік пацієнтів становив 6 років з коливаннями від 12 місяців до 18 років.

Діагноз ГЛЛ встановлювали відповідно до критеріїв Класифікації пухлин кровотворної та лімфоїдної тканин [6]. Виявлення захворювання проводили перед початком хіміотерапії з врахуванням: фізикального огляду пацієнтів; інструментальних досліджень (комп'ютерної томографії грудної клітки, ультразвукової діагностики органів черевної порожнини і малого тазу); клініко-лабораторних досліджень (загальний аналіз крові, біохімічний аналіз крові, коагулограма); досліджень клітин кісткового мозку та новоутворення (цитохімічні, імунофенотипові, цитогенетичні).

Після застосування програмної поліхіміотерапії ALL IC-BFM 2009 усіх пацієнтів поділили на дві групи: I група – пацієнти, у яких спостерігалася повна ремісія захворювання, яку оцінювали на 33-й день лікування за протоколом; II група – пацієнти, у яких, після проведення курсу поліхіміотерапії, були виявлені рецидиви. Діагноз рецидиву для пацієнтів з ГЛЛ встановлювали при наявності більше 5% бластних клітин в кістковому мозку або виявленні лейкемічного ураження будь-якого іншого органу-мішені відповідно до прийнятих стандартів діагностики.

На біологічному матеріалі хворих (клітини кісткового мозку), який відібраний до початку лікування та після проведення курсу цитостатичної поліхіміотерапії ALL IC-BFM 2009 проведено визначення хромосомних транслокацій на визначення химерних генів. Під час аналізу пацієнти були досліджені на наступні хромосомні аберації t(4;11) AF4/MLL, t(9;22) BCR/ABL, t(1;19) E2A/PBX, t(12;21) TEL/AML1.

Визначення генних гібридів проводили за допомогою FISH-дослідження з використанням ДНК-зондів та методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР).

Приготування препаратів для FISH-дослідження здійснювали шляхом нанесення суспензії клітин на предметне скло. За допомогою світлового мікроскопа визначали ділянку з достатньою кількістю ядер, на яку наносили 1,5 мкл ДНК-зонда (приготовленого згідно інструкції виробника Cytocell aquarius, Німеччина). У дослідженнях використовували такі ДНК-зонди: LPH 081 AF4/MLL Translocation; LPH 007 BCR/ABL Translocation; LPH 079 E2A/PBX1 Translocation; LPH 012 TEL/AML Translocation.

Після нанесення відповідних зондів, предметне скло накривали покривним склом, по периметру якого наносили клей для запобігання проникнення повітря. Денатурацію препарату і зонда проводили при $t=73^{\circ}\text{C}$ протягом 2 хв, гібридизацію виконували при $t = 37^{\circ}\text{C}$ не менше 16 годин. Після завершення гібридизації надлишок ДНК-зонда видаляли промивкою предметного скла в розчині 0,4 SSC / 0,3% NP-40 протягом 2 хв при $t = 73^{\circ}\text{C}$ у водяній бані, потім протягом хвилини в розчині 2 SSC / 0,1% NP-40 при кімнатній температурі. Для фарбування ядер, після висушування скла, на препарат наносили розчин DAPI [7]. Візуалізацію сигналів проводили під флуоресцентним мікроскопом.

Для виявлення рівня експресії злитих генів AF4/MLL, BCR/ABL, E2A/PBX1 та TEL/AML застосовували метод ПЛР. ПЛР проводили з використанням комплементарної ДНК (кДНК), отриманої реакцією зворотної транскрипції (ЗТ) з РНК за допомогою AMV транскриптази (Promega, США).

Виділення геномної ДНК з клітин кісткового мозку проводили стандартним фенольним методом [8], який полягає у денатурації та екстракції білків органічними розчинниками (фенол, хлороформ) та переході ДНК у водний розчин. З водних розчинів ДНК осаджується додаванням етанолу чи пропанолу. Денатурацію дволанцюгової ДНК проводили при температурі $92-95^{\circ}\text{C}$. Ампліфікацію ДНК проводили в пробірках з реакційною сумішшю, яка містила 3 мкл ДНК, 1 мкМ відповідного праймеру, 15 мкл розчинника. Для синтезу нового ланцюга ДНК використовували термостабільну ДНК-полімеразу в стандартному Taq-буфері (виробник New England Biolabs Inc.) при температурі 72°C . Потім реакційну суміш охолоджували при 4°C , перемішували і додавали 10 мкл реакційної суміші для зворотної транскрипції, яка містила 4 мкл 5-кратного буфера для 1-ї нитки ДНК, 2 мкл 0,1 М DTT, 1 мкл суміші праймерів (концентрація 200 мМ), 1 мкл дезоксинуклеотидтрифосфатів dNTP) в концентрації 10 мМ, 1 мкл обратної транскриптази вірусу лейкозу мишей. Далі реакційну суміш нагрівали при 37°C 90 хв, потім при 70°C протягом 15 хв і охолоджували при 4°C . У результаті реакції ЗТ отримали кДНК, яку в подальшому використовували для ПЛР. В ПЛР використовували олігонуклеотид-праймер для AF4/MLL, BCR/ABL, E2A/PBX1 та TEL/AML. Продукти ампліфікації візуалізували за допомогою методу горизонтального електрофорезу в 2% агарозному гелі. Для визначення кількості продуктів ампліфікації використовували програму TotalLab 120.

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою програмних пакетів "Statistica for Windows 8.0" (Statsoft, USA). Порівняння параметричних показників за умови нормальності розподілу виконували за допомогою t-критерію Стьюдента. При оцінюванні рівня достовірності P, відмінності вважалися достовірними при $P < 0,05$.

Результати та їх обговорення. ГЛЛ характеризується накопиченням ракових попередників лімфоїдних клітин В- і Т-ліній в кістковому мозку і крові. Генетичні зміни в цих незрілих лімфоїдних клітинах порушують їх здатність до самовідновлення і викликають зупинку процесів диференціації, що призводить до їх злоякісної трансформації. У розвитку ГЛЛ беруть участь онкогени, які є продуктами транслокації хромосом, зокрема продукт транслокації хромосом 4 і 11 ($t(4;11)$), що кодує химерний білок AF4-MLL, а також BCR-ABL, E2A-PBX1, TEL-AML1 [9]. Надекспресія цих генів призводить до порушення регуляції процесів транскрипції та синтезу білків, що беруть участь в гематопоезі, що лежить в основі розвитку лейкемії.

Аналіз результатів хромосомних порушень показав, що хромосомні аберації мали місце у 22 % пацієнтів до проведення курсу хіміотерапії (рис. 1).

Найменші транслокаційні зміни у геномі хворих дітей з ГЛЛ стосувалися химерного гена AF4/MLL $t(4;11)(q23;p23)$, оскільки зазначений химерний ген був виявлений у 1 % пацієнтів (рис.1).

Відомо, що транслокація із залученням генів 11 хромосоми (MLL) має несприятливий прогноз у розвитку ГЛЛ, що може свідчити про необхідність у таких пацієнтів аlogenної трансплантації кісткового мозку [10]. Серед усіх генетичних аберацій гена MLL найбільш частою є хромосомна транслокація $t(4; 11) (q21; q23)$. Ця транслокація призводить до утворення злитих білків AF4-MLL. Продукти експресії гена AF4-MLL володіють гістоновою метилтрансферазною активністю, особливо по відношенні до гістонів H3 – H3K4 і H3K79. Модифіковані гістони змінюють властивості хроматину та можуть посилювати процеси проліферації клітин [11]. Отже, підвищення експресії онкогену AF4-MLL сприяє змінам транскрипційних процесів і епігенетичних сигнатур в масштабі всього геному [12]. На підставі

наших даних можна припустити, що обидва механізми дії химерного білка AF4-MLL є ключовими в процесах розвитку лейкемії.

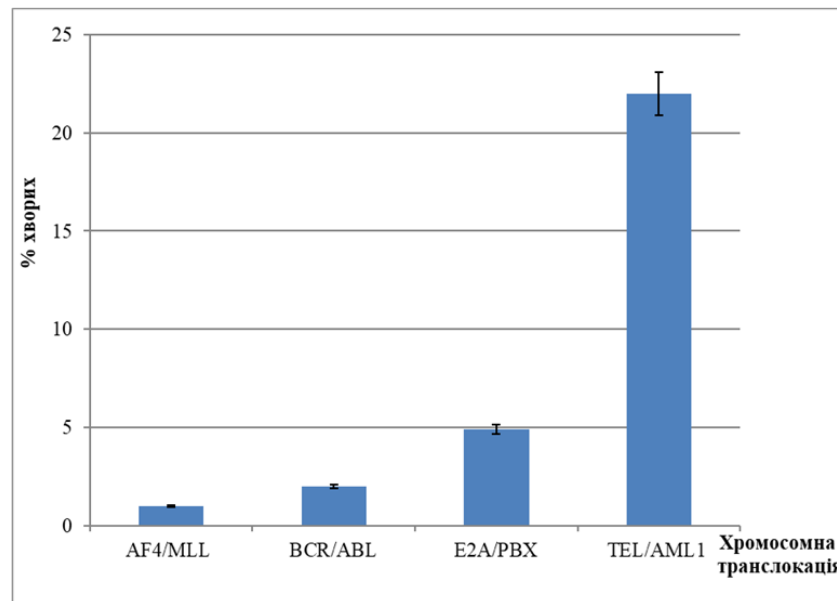


Рис. 1. Розподіл пацієнтів з гострою лімфобластною лейкемією за наявністю хромосомних аберацій

Аналіз мутаційного статусу в клітинах кісткового мозку дітей з ГЛЛ показав наявність інших химерних генів. Встановлено, що у 2 % дітей хворих ГЛЛ виявлений химерний ген BCR/ABL t(9;22)(q34;q11) (рис.1), який формується в результаті реципрокної транслокації між 9 та 22 хромосомами. Гібридний білок, який утворюється в результаті експресії цього гену, є конститутивно активною тирозинкіназою, яка має здатність фосфорилувати білки. Постійна активність BCR/ABL-тирозинкінази робить клітину здатною до безкінечного поділу та уникати впливу факторів росту, що викликає її надлишкову проліферацію. Ідентифікація BCR/ABL-тирозинкінази свідчить про онкогенну трансформацію клітин [13].

У значно більшого відсотка дітей спостерігається наявність химерних генів E2A/PBX1 та TEL/AML. Так, ідентифікація злитого гена E2A/PBX1 t(1;19)(q23;p13) спостерігається у 5 % хворих ГЛЛ, а гена TEL/AML t(12;21)(q13;q22) – у 21,5 % (рис.1).

Утворений химерний білок E2A-PBX1 володіє онкогенними властивостями. На N-кінці білка E2A-PBX1 знаходяться 2 домени активації (activation domain, AD), які походять із фактора транскрипції E2A, а на С-кінці – кооперативний домен HOX і ДНК-зв'язуючий гомеодомен фактора транскрипції PBX. Онкогенні властивості сильно конститутивного транскрипційного активатора E2A-PBX1 зумовлені наявністю в його складі цих 3-х доменів, і особливо AD, який взаємодіє з гістонацетилтрансферазами SAGA і CBP/p300 і у такий спосіб бере участь в епігенетичній регуляції експресії генів [14].

Як видно з отриманих результатів, при ГЛЛ хромосомні аберації найчастіше зустрічаються в результаті транслокацій генів TEL і AML (21,5 %) (рис.1). Гени TEL і AML кодують ядерні транскрипційні фактори, які відіграють лімітуючу роль в нормальному гемопоезі. Їх злиття призводить до виникнення і розвитку лейкозу шляхом порушення нормальної функції TEL і / або зниження рівня експресії гена AML1 [15].

Після проведення курсу ALLIC BFM 2009 цитостатичної хіміотерапії у 11,76 % дітей був виявлений рецидив захворювання, тоді як у 88,23 % пацієнтів спостерігалася повна ремісія. Результати досліджень хромосомних аберацій у досліджуваних групах пацієнтів показали відмінності у наявності транслокацій генів. Так, у пацієнтів із виявленими рецидивами ідентифікувалися хромосомні транслокації таких генів: AF4/MLL виявлено у 9 % хворих з рецидивами; BCR/ABL – у 9 % хворих з рецидивами; E2A/PBX1 – у 9 % хворих з рецидивами; ген TEL/AML у пацієнтів з рецидивами не ідентифікувався (рис.2).

З отриманих даних видно, що ключову роль у розвитку рецидивів ГЛЛ мають досліджувані нами три хромосомні транслокації відповідних локусів хромосом – AF4/MLL

t(4;11)(q23;p23), BCR/ABL t(9;22)(q34;q11) та E2A/PBX1 t(1;19)(q23;p13). Очевидно продукти експресії цих генів відіграють важливу роль не лише в трансформації гемопоетичних клітин з підвищенням їхньої проліферації та зниження здатності до апоптозу, але й сприяють резистентності пухлинних клітин до дії цитостатиків. Клітини пухлинного (лейкемічного) клону можуть мати нестабільний геном, у результаті чого у химерних генах AF4/MLL, BCR/ABL та E2A/PBX1 можуть відбутися мутації, які призведуть до зміни конформації онкогенних білків, у результаті чого цитостатики втрачають здатність блокувати онкогени та посилену проліферацію клітин, які, у свою чергу, набувають резистентності до препарату [9]. Тому, вкрай необхідним є своєчасне виявлення нечутливості пухлинних клітин при ГЛЛ до цитостатиків, що дозволить провести корекцію лікувальної тактики хворого. Відсутність онкогену TEL/AML1 у хворих ГЛЛ з рецидивами вказує на його другорядну роль у розвитку ускладнень досліджуваної патології.

Аналіз спектру хромосомних транслокацій у пацієнтів з повною ремісією захворювання після проведення цитостатичної терапії ALLIC BFM 2009 показав повну відсутність химерного гена AF4/MLL. Встановлений факт свідчить про сприятливий прогноз захворювання, оскільки одночасно з транслокаціями, що зачіпають локус 11q23, в ядрах пухлинних клітин хворих ГЛЛ можуть спостерігатися додаткові хромосомні поломки – виявляються +X, +8, і (7) (q10), аномалії 7p і 9p. До числа вторинних хромосомних поломок, що зустрічаються синхронно з t (4; 11), входять +X, +8 і del (6q). Тому, відсутність химерного гена AF4/MLL вказує на ефективність проведеної цитостатичної терапії [16].

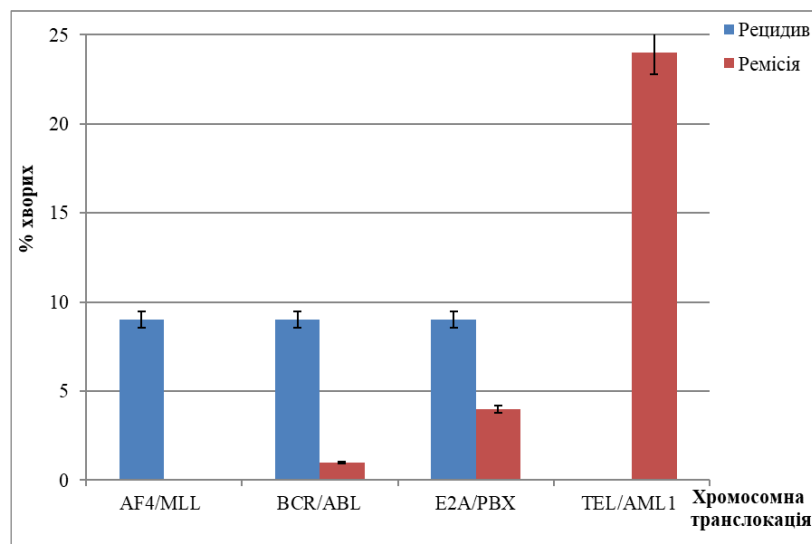


Рис. 2. Спектр хромосомних транслокацій у пацієнтів з рецидивами та ремісією гострої лімфобластної лейкемії після проведення курсу цитостатичної терапії ALLIC BFM 2009

Водночас, у пацієнтів з повною ремісією ідентифікуються химерні гени BCR/ABL – у 1% пацієнтів з ремісією, E2A/PBX1 – у 4% пацієнтів з ремісією та TEL/AML1 – у 24% пацієнтів з ремісією. Наявність химерних генів у пацієнтів з повною ремісією може свідчити про ризик повторного онкогенезу. Однак, важливу роль у цьому процесі належить саме експресії химерних онкогенів з синтезом онкобілків. Щоб перевірити дане припущення нами досліджено спектр експресії химерних генів як маркерів молекулярно-генетичної діагностики ГЛЛ та ефективності цитостатичної терапії в умовах рецидиву та повної ремісії захворювання.

Участь хромосомних аберацій у канцерогенезі полягає не тільки у злитті нуклеотидних послідовностей різних генів, а саме у експресії химерних онкогенів і, як наслідок, у появі в клітинах чужорідних білків – онкобілків, які можуть бути онкомаркерами при ГЛЛ. Тому, саме експресія химерних генів лежить в основі виникнення рецидивів та вказує на ефективність проведеної тактики лікування онкозахворювання.

Для визначення статусу онкогенів був проведений аналіз експресії всіх чотирьох онкогенів. Для виявлення експресії химерних генів у клітинах кісткового мозку дітей з ГЛЛ використовували стандартну ПЛР в реальному часі з праймерами AF4/MLL, BCR/ABL, E2A/PBX1 та TEL/AML1, що призводило до синтезу фрагментів ДНК відповідної ділянки транслокації хромосом і, відповідно, онкогенів, а також мРНК.

Результати досліджень показали, що до лікування у всіх пацієнтів з ГЛЛ, які були носіями химерних генів, спостерігалася їхня експресія в реальному часі, що свідчить про їхню активність *in vivo* та синтез химерних протеїнів (рис. 3).

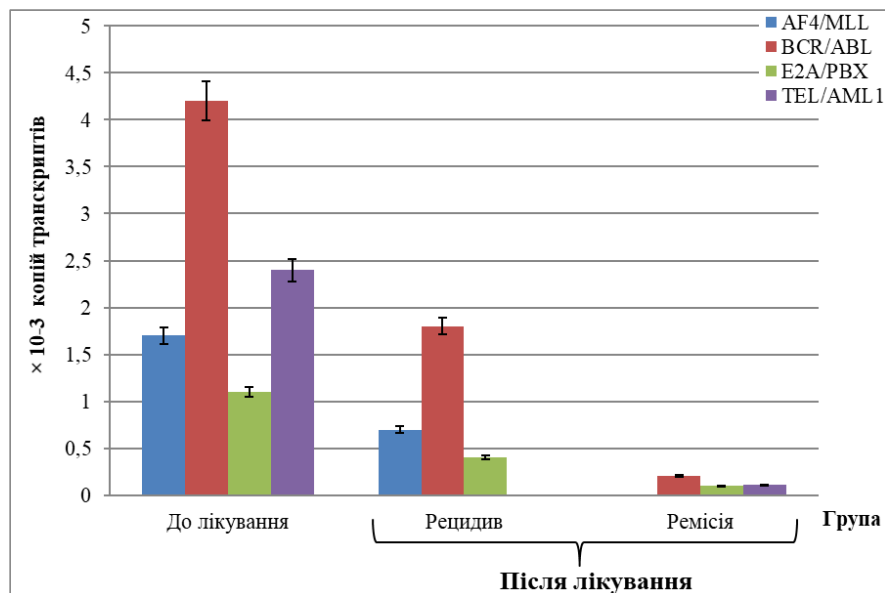


Рис. 3. Експресія онкогенів AF4/MLL, BCR/ABL, E2A/PBX1 та TEL/AML у клітинах кісткового мозку дітей з гострою лімфобластною лейкемією після проведення курсу ALLIC BFM 2009 цитостатичної терапії

Молекулярно-генетичне дослідження кісткового мозку пацієнтів з ГЛЛ за допомогою ПЛР у реальному часі показало, що найвища експресія спостерігається в онкогена BCR/ABL, оскільки виявлено $4,2 \pm 0,65 \times 10^{-3}$ копій мРНК онкогена BCR/ABL відносно контрольного гена ABL1. Встановлений факт вказує, що ген BCR/ABL є ключовим патогенетичним фактором розвитку переважної кількості випадків ГЛЛ у дітей. Після проведення курсу ALLIC BFM 2009 цитостатичної терапії експресія цього гена знижується у 20 разів в пацієнтів з повною ремісією та у 2,3 рази у хворих, в яких спостерігався рецидив захворювання (рис.3). Значне зниження експресії онкогена BCR/ABL під час повної ремісії захворювання свідчить про ефективність вибраної терапії для досліджуваної групи хворих, що необхідно враховувати при розробці методів моніторингу індивідуальної відповіді пацієнта на застосовану нами терапію. Високий рівень експресії онкогена BCR/ABL у пацієнтів з рецидивами може бути наслідком мутацій в химерному гені, що свідчить про резистентність клітин пухлинного клону до дії цитостатиків.

Аналіз результатів досліджень показав, що до лікування ГЛЛ на високому рівні виявлена експресія онкогена TEL/AML (рис.3). Однак, враховуючи той факт, що після проведення ALLIC BFM 2009 хіміотерапії у пацієнтів з рецидивами цей онкоген не ідентифікується (рис.2), але виявлений у 24 % пацієнтів з повною ремісією, то цей показник не можна вважати цінним маркером діагностики рецидивів ГЛЛ. Водночас, ідентифікований химерний ген TEL/AML у пацієнтів з повною ремісією проявляє досить низьку активність, так як його експресія, виявлена ПЛР в реальному часі, становить $1,1 \pm 0,25 \times 10^{-3}$ копій мРНК (рис.3). Відомо, що взаємна транслокація t(12; 21) (q13;q22) відбувається вже внутрішньоутробно на ранніх термінах формування попередників В-клітин і химерний ген виявляється у здорових новонароджених, що може призвести до встановлення долейкемії [17]. Очевидно, тому в дітей з повною ремісією найчастіше виявляється зазначений онкоген. Однак, низька експресія онкогена TEL/AML свідчить про сприятливий перебіг захворювання.

Наступним за рівнем експресії з чотирьох досліджуваних онкогенів трансформованих клітин є химерний ген AF4/MLL, що утворюється злиттям фрагментів двох генів – AF4 (4q21) та MLL (11q23) [18]. Встановлено, що цей ген експресується у дітей як до лікування ГЛЛ, так і в дітей, у яких виявлені рецидиви після проведення хіміотерапії, що свідчить про ключову роль цього онкогену в розвитку рецидивів та патогенезі ГЛЛ [19]. У дітей, в яких виявлена повна ремісія, онкоген AF4/MLL не експресується (рис.3).

У дітей з ГЛЛ до лікування найнижча експресія, серед досліджуваних онкогенів, спостерігається для онкогена E2A/PBX1 (рис.3). Утворення химерного генного продукту E2A/PBX1 свідчить про дисфункціонування В-клітин, оскільки ізольований ген E2A кодує базовий фактор транскрипції helix-loop-helix, що належить ДНК Е-box-зв'язуючих білків у В-клітинах [20]. За умов повної ремісії експресія E2A/PBX1 знижується у 11 разів після проведення курсу ALLIC BFM 2009 хіміотерапії. Водночас, у пацієнтів з рецидивами захворювання експресія E2A/PBX1 знижується лише у 2,7 рази (рис.3). Отримані результати підтверджують гіпотезу, що химерний онкобілок E2A-PBX1 – продукт експресії онкогена E2A/PBX1, в комплексі з гістонацетилтрансферазою CBP/p300 і факторами ремоделювання хроматичної родини SWI / SNF (SMARCA4 та SMARCC2) відіграє роль сильного транскрипційного активатора, який бере участь у підвищенні експресії генів HOXA, білкові продукти яких володіють потужними канцерогенними властивостями [20].

Висновки. Отже, у дітей, хворих гострою лімфобластною лейкемією, в геномі ідентифікуються хромосомні транслокації у вигляді утворених химерних онкогенів – AF4/MLL t(4;11)(q23;p23), BCR/ABL t(9;22)(q34;q11), E2A/PBX1 t(1;19)(q23;p13), TEL/AML t(12;21)(q13;q22). Частота виявлення хромосомних аберацій найвища для онкогена TEL/AML, який ідентифікувався у 24 % пацієнтів з ГЛЛ, а найнижча для онкогена AF4/MLL – у 1 % пацієнтів. Застосування цитостатичної терапії ALLIC BFM 2009 у 88,23 % пацієнтів призводить до повної ремісії, а у 11,76 % дітей виявлений рецидив захворювання. При цьому спостерігаються зміни в спектрі хромосомних транслокацій та експресії химерних генів. Під час ремісії не експресується онкоген AF4/MLL, а експресія всіх інших досліджуваних нами онкогенів знаходиться на низькому рівні. За умов рецидиву захворювання відсутня експресія онкогена TEL/AML та виявлена висока експресія химерного гена BCR/ABL. Тому, найбільше прогностичне значення має генна трансформація BCR/ABL t(9;22)(q34;q11), найвища експресія якого виявлена в кістковому мозку при встановленні діагнозу ГЛЛ та зберігається на високому рівні в пацієнтів з рецидивами.

Встановлені нами специфічні генетичні порушення у дітей з ГЛЛ можуть лежати в основі молекулярно-генетичної діагностики ГЛЛ. Тому, при оцінці відповіді пацієнта на цитостатичну терапію необхідно своєчасно провести молекулярно-генетичне дослідження кісткового мозку для виявлення химерних генів, зокрема BCR/ABL, рівня його експресії та дослідження мутації в кіназному домені цього гена. Це дасть можливість судити не тільки про ступінь злоякісності новоутворення, але й дозволить ідентифікувати несприятливий прогноз рецидивів у онкохворих та дозволить підібрати відповідну тактику лікування.

ЛІТЕРАТУРА

1. Bhojwani, D., Yang, J.J., & Pui, C.H. (2015). Biology of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pediatric Clinics of North America*, 62(1), 47-60. DOI: 10.1016/j.pcl.2014.09.004.
2. Desai, P., Mencia-Trinchant, N., Savenkov, O., Simon, M.S., Cheang, G., Lee, S. et al. (2018). Somatic mutations precede acute myeloid leukemia years before diagnosis. *Nature Medicine*, 24(7), 1015-1023. DOI: 10.1038/s41591-018-0081-z.
3. Adams, J., & Nassiri, M. (2015). Acute promyelocytic leukemia: a review and discussion of variant translocations. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 139(10), 1308-13. DOI: 10.5858/arpa.2013-0345-RS.
4. Barwick, B.G., Neri, P., Bahlis, N.J., Nooka, A.K., Dhodapkar, M.V., Jaye, D.L. et al. (2019). Multiple myeloma immunoglobulin lambda translocations portend poor prognosis. *Nature Communications*, 10(1), 1911. DOI: 10.1038/s41467-019-09555-6.
5. Malouf, C., & Ottersbach, K. (2018). Molecular processes involved in B cell acute lymphoblastic leukaemia. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 75(3), 417-446. DOI: 10.1007/s00018-017-2620-z.
6. Jaffe, E., Harris, N., Stein, H. et al. (2002). World health organization classification of tumors. pathology and genetics of tumors of hematopoietic and lymphoid tissues. In S.H. Swerdlow, E. Campo, N.L. Harris, E.S. Jaffe, S.A. Pileri, H. Stein et al. (Eds.). *Annals of Oncology* (4th ed., vol. 13, pp. 490-491). Retrieved from <https://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/Who-Classification-Of-Tumours/WHO-Classification-Of-Tumours-Of-Haematopoietic-And-Lymphoid-Tissues-2017>
7. Маниатис Т., Фриг Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. Москва: Мир, 1984. 480 с. [Maniatis, T., Frig, E., & Sambrook, J. (1984). *Methods of genetic engineering. Molecular cloning*. Moscow: Mir.].
8. Молекулярная клиническая диагностика. Методы / пер с англ.; под ред. Херрингтона С., Макги Дж. Москва: Мир, 1999. [Herrington, S., & McGee, G. (Eds.). (1999). *Molecular clinical diagnostics. Methods*. Moscow: Mir.].

9. Ajuba, I.C., Madu, A.J., Okocha, C., Ibegbulam, O.G., Okpala, I., & Nna, O.E. (2016). Frequency and clinical impact of ETV6/RUNX1, AF4-MLL, and BCR/ABL fusion genes on features of acute lymphoblastic leukemia at presentation. *Nigerian Journal of Clinical Practice*, 19(2), 237-41. DOI: 10.4103/1119-3077.164351.
10. Bueno, C., Calero-Nieto, F.J., Wang, X., Valdés-Mas, R., Gutiérrez-Agüera, F., Roca-Ho, H. et al. (2019). Enhanced hemato-endothelial specification during human embryonic differentiation through developmental cooperation between AF4-MLL and MLL-AF4 fusions. *Haematologica*, 104(6), 1189-1201. DOI: 10.3324/haematol.2018.202044.
11. Godfrey, L., Kerry, J., Thorne, R., Repapi, E., Davies, J.O., Tapia, M. et al. (2017). MLL-AF4 binds directly to a BCL-2 specific enhancer and modulates H3K27 acetylation. *Experimental Hematology*, 47, 64-75. DOI: 10.1016/j.exphem.2016.11.003.
12. Prieto, C., Marschalek, R., Kühn, A., Bursen, A., Bueno, C., & Menéndez, P. (2017). The AF4-MLL fusion transiently augments multilineage hematopoietic engraftment but is not sufficient to initiate leukemia in cord blood CD34⁺ cells. *Oncotarget*, 8(47), 81936-81941. DOI: 10.18632/oncotarget.19567.
13. Scherr, M., Kirchhoff, H., Battmer, K., Wohlan, K., Lee, C.W., Ricke-Hoch, M. et al. (2019). Optimized induction of mitochondrial apoptosis for chemotherapy-free treatment of BCR-ABL+acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, 33(6), 1313-1323. DOI: 10.1038/s41375-018-0315-6.
14. Duque-Afonso, J., Lin, C.H., Han, K., Wei, M.C., Feng, J., Kurzer, J.H. et al. (2016). E2A-PBX1 remodels oncogenic signaling networks in b-cell precursor acute lymphoid leukemia. *Cancer Research*, 76(23), 6937-6949. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-16-1899.
15. Zhao, X., Gao, C., Cui, L., Li, W., Liu, S., Zhang, R. et al. (2019). Quantitative monitoring of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia using TEL-AML1 fusion transcript as a marker. *Pediatric Investigation*, 2(4), 223-229. DOI: 10.1002/ped4.12098.
16. Chessells, J.M., Harrison, C.J., Kempinski, H. et al. (2002). Clinical features, cytogenetics and outcome in acute lymphoblastic and myeloid leukaemia of infancy: report from the MRC Childhood Leukaemia working party. *Leukemia*, 16(5), 776-84. DOI: 10.1038/sj.leu.2402468.
17. Laurentiis, A., Hiscott, J., & Alcalay, M. (2015). The TEL-AML1 fusion protein of acute lymphoblastic leukemia modulates IRF3 activity during early B-cell differentiation. *Oncogene*, 34(49), 6018-28. DOI: 10.1038/onc.2015.50.
18. Castaño, J., Herrero, A.B., Bursen, A., González, F., Marschalek, R., Gutiérrez, N.C. et al. (2016). Expression of MLL-AF4 or AF4-MLL fusions does not impact the efficiency of DNA damage repair. *Oncotarget*, 7(21), 30440-52. DOI: 10.18632/oncotarget.8938.
19. Prange, K.H.M., Mandoli, A., Kuznetsova, T., Wang, S.Y., Sotoca, A.M., Marneth, A.E. et al. (2017). MLL-AF9 and MLL-AF4 oncofusion proteins bind a distinct enhancer repertoire and target the RUNX1 program in 11q23 acute myeloid leukemia. *Oncogene*, 36(23), 3346-3356. DOI: 10.1038/onc.2016.488.
20. Patel, D., Chinaranagari, S., & Chaudhary, J. (2015). Basic helix loop helix (bHLH) transcription factor 3 (TCF3, E2A) is regulated by androgens in prostate cancer cells. *American Journal of Cancer Research*, 5(11), 3407-21.