

ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
«РЕСПУБЛИКАНСКИЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЦЕНТР  
ТРАНСФУЗИОЛОГИИ И МЕДИЦИНСКИХ БИОТЕХНОЛОГИЙ»

Объект авторского права

УДК 616.155.392-036.11:575.1

**ВШИВКОВА**  
**Ольга Сергеевна**

**АБЕРРАЦИИ ГЕНА ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА *IKZF1*  
ПРИ В-ЛИНЕЙНЫХ ОСТРЫХ ЛИМФОБЛАСТНЫХ ЛЕЙКОЗАХ**

Автореферат диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук  
по специальности 14.01.21 – гематология и переливание крови

Минск 2023

Научная работа выполнена в государственном учреждении «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии»

**Научный руководитель:** **Мелешко Александр Николаевич,**  
кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории генетических биотехнологий научного отдела государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии»

**Официальные оппоненты:** **Слобожанина Екатерина Ивановна,**  
доктор биологических наук, член-корреспондент НАН Беларуси, главный научный сотрудник государственного научного учреждения «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси»

**Рябокоть Надежда Ивановна,**  
кандидат биологических наук, заведующий лабораторией молекулярных основ стабильности генома государственного научного учреждения «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»

**Оппонирующая организация:** Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека»

Защита состоится 7 февраля 2024 года в 14.00 на заседании совета по защите диссертаций Д 03.11.01 при государственном учреждении «Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий» по адресу: 220053, г. Минск, Долгиновский тракт, 160. Телефон ученого секретаря +375 (017) 289-87-60, e-mail: science@blood.by.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий».

Автореферат разослан 5 января 2024 года.

Ученый секретарь  
совета по защите диссертаций  
кандидат биологических наук



Е.Д.Расюк

## ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на высокие показатели выживаемости пациентов с острым лимфобластным лейкозом из В-клеток-предшественников (В-ОЛЛ) и современные режимы интенсивной химиотерапии, исход заболевания часто сложно прогнозируем, при этом рецидивы развиваются в 15–20% случаев. Основной задачей диагностического этапа при В-ОЛЛ является поиск факторов, позволяющих выделить пациентов с неблагоприятным прогнозом. Результаты многих исследований доказывают значимую роль aberrаций гена транскрипционного фактора *IKZF1* (Ikaros) в патогенезе и прогрессировании лимфобластного лейкоза [S. Vairy et. al., 2020; M. Stanulla et. al., 2020; J. M. Klcó, 2021].

Аберрации *IKZF1* разнообразны и включают моносомию 7 хромосомы, ее дериваты, потерю короткого плеча, точечные мутации и внутригенные делеции. Все перечисленные аберрации, за исключением точечных мутаций, описаны как вторичные события лейкозогенеза, приводят к потере или нарушению функций белка Ikaros и выражаются серьезными комплексными изменениями со стороны системы гемопоэза. При В-ОЛЛ наиболее распространенными молекулярно-генетическими событиями в локусе *IKZF1* являются внутригенные делеции участка размером 15–200 тысяч п. о., приводящие к потере нескольких экзонов, тогда как частота других аберраций не превышает 5%. Делеции в гене *IKZF1* определяются в среднем у 10% пациентов детского возраста с В-ОЛЛ, среди взрослых пациентов распространенность делеций увеличивается до 30–50%, а при наличии транслокации *BCR::ABL1* – до 80% [M. Stanulla et. al., 2020; Moorman, A. V., 2016]. Также известны нарушения сплайсинга, выраженные в повышенной экспрессии коротких транскриптов *IKZF1* (изоформ), которые, в подавляющем большинстве случаев, являются результатом aberrантного сплайсинга гена после делеции.

Нарушение функций *IKZF1* приводит к блокаде дифференцировки В-лимфоцитов на стадии перехода от про-В к пре-В клеткам, а полная потеря функций *IKZF1* может привести к отсутствию всего В-клеточного компартмента. Кроме того, описаны дополнительные механизмы патогенетического влияния: усиление пролиферации клеток по причине отключения контроля со стороны *IKZF1* над рядом ключевых генов, а также сверхэкспрессия антиапоптотических генов *JAK1*, *JAK3*, *STAT3* и *STAT5* в результате нарушения передачи каскада сигналов по одному из важнейших коммуникационных узлов клетки – *JAK / STAT* сигнальному пути.

Ранее предполагалось, что все пациенты с В-ОЛЛ при дисфункции *IKZF1* имеют значительно худший прогноз выздоровления, однако более поздние исследования, проведенные на крупных и репрезентативных когортах, показали, что эффект делеций *IKZF1* может зависеть от других факторов риска или интенсивности проведенного лечения. В частности, в рамках исследования COG (Children's Oncology Group) установлено, что делеции *IKZF1* определяют худший прогноз только для пациентов высокого

риска (по классификации Национального института рака, NCI), при этом не являются независимым прогностическим фактором, в отличие от уровня минимальной остаточной болезни (МОБ) и транслокации *BCR::ABL1* [Moorman, A. V., 2016]. При анализе результатов лечения пациентов с В-ОЛЛ в возрасте от 23 до 65 лет по британскому протоколу UKALL14, наличие делеций *IKZF1* не оказывало влияния на исход заболевания [R. J. Mitchell et al, 2021].

Проблемой остается диагностика aberrаций *IKZF1* в клинических условиях: вариабельность точки разрыва на хромосоме при делециях снижает чувствительность геномных методов и не позволяет оценить весь спектр значимых молекулярных событий.

Определение коротких транскриптов, которые формируются в результате делеции функционального участка *IKZF1*, может стать альтернативным способом оценки статуса гена, однако опыта применения не описано у других авторов. Таким образом, изучение роли aberrаций *IKZF1* в прогнозе В-ОЛЛ и разработка методов оценки полного спектра нарушений являются актуальными.

## **ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ**

### **Связь работы с научными программами (проектами), темами**

Диссертационное исследование выполнено в рамках научно-исследовательских работ: «Прогностическое значение aberrаций гена *IKZF1* при острых лейкозах» ГПНИ «Фундаментальные и прикладные науки – медицине», подпрограмма «Диагностика и терапия заболеваний» (2016–2019 гг., № гос. регистрации 20164420); БРФФИ «Наука-М» «Оценка устойчивости лейкозного клона к действию ингибиторов тирозинкиназ у пациентов с aberrантной экспрессией коротких изоформ гена *IKZF1*» (2016–2018 гг., № гос. регистрации 20163106); «Разработать и внедрить метод молекулярно-генетической диагностики *BCR-ABL1-like* ОЛЛ и оценить показатели прогноза при данном типе лейкоза у пациентов детского возраста, подростков и «молодых» взрослых» ГНТП «Научно-техническое обеспечение качества и доступности медицинских услуг», подпрограмма «Злокачественные опухоли» (2020–2024 гг., № гос. регистрации 20201444).

Тема исследования соответствует приоритетным направлениям научно-технической деятельности в Республике Беларусь на 2016–2020 гг., утвержденным Указом Президента Республики Беларусь от 22 апреля 2015 г. №166 (пункт 4. Медицина, фармацевтика, медицинская техника: технологии профилактики, диагностики и лечения заболеваний); от 07 мая 2020 г. №156 «О приоритетных направлениях научной, научно-технической и инновационной деятельности на 2021–2025 гг. (пункт 2. Биологические, медицинские, фармацевтические и химические технологии и производства: диагностика, медицинская профилактика и лечение инфекционных, включая вирусной этиологии, и неинфекционных заболеваний, экспертиза качества медицинской помощи).

## **Цель и задачи, объект и предмет исследования**

*Цель исследования* – оценить разнообразие aberrаций гена опухолевого супрессора *IKZF1* при В-линейных острых лимфобластных лейкозах и установить их значение в диагностике и прогнозировании течения заболевания.

*Задачи исследования:*

1. Разработать методы выявления внутригенных делеций *IKZF1* и нарушений aberrантного сплайсинга, и выбрать наиболее эффективный подход.
2. Изучить спектр продуктов альтернативного сплайсинга, частоту и типы делеций *IKZF1* у пациентов с В-ОЛЛ.
3. В экспериментах *in vitro* оценить процессы репарации и скорость клеточного цикла лейкозных клеточных линий с aberrантной экспрессией коротких изоформ, в том числе их чувствительность к воздействию цитостатических препаратов, используемых при лечении острых лимфобластных лейкозов.
4. Установить значение aberrаций *IKZF1* при прогнозировании показателей раннего ответа на терапию и риска развития рецидивов у пациентов с В-ОЛЛ.

*Объект исследования* – образцы моноклеарных клеток костного мозга пациентов с В-ОЛЛ; лейкозные клеточные линии K562 и Nalm-6.

*Предмет исследования* – структурные (внутригенные делеции) и функциональные (aberrантный сплайсинг) aberrации гена транскрипционного фактора *IKZF1*.

## **Научная новизна**

1. Впервые проведена идентификация и количественный анализ изоформ гена *IKZF1* в лейкозных клетках и моноклеарных клетках доноров костного мозга, и установлено, что для пациентов с В-ОЛЛ характерна повышенная экспрессия только трех коротких изоформ.
2. Впервые разработан способ определения aberrаций гена *IKZF1*, представляющий собой количественную оценку уровня экспрессии трех клинически значимых коротких доминантно-негативных изоформ в единой полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в реальном времени.
3. В экспериментах *in vitro* впервые продемонстрировано, что для клеточных линий K562<sup>Ik6</sup> и Nalm-6<sup>Ik6</sup>, aberrантно экспрессирующих короткую изоформу Ik 6, характерно снижение чувствительности к воздействию ингибитора тирозинкиназ (иматиниба) и увеличение чувствительности к воздействию глюкокортикоидов (преднизолон и дексаметазон), при этом повышение активности процессов репарации двойных разрывов и смещение клеточного цикла в сторону синтетической фазы свойственно только для линии K562<sup>Ik6</sup>.

4. Впервые показано, что аберрации *IKZF1* при В-ОЛЛ являются независимым прогностическим фактором развития первого рецидива для пациентов группы стандартного риска с преобладанием ранних рецидивов.

#### **Положения, выносимые на защиту**

1. Метод определения коротких изоформ Ik 6, 9 и 10 (Ik-DN) на основе мультиплексной полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в реальном времени (ОТ-ПЦР) является эффективным подходом, позволяющим быстро и наиболее полно оценить аберрации гена *IKZF1*, обладает высокой диагностической значимостью (ДЧ=90,14%, ДС=89,47%), воспроизводимостью (КВ=3,04%) и экономической эффективностью.

2. Частота выявления внутригенных делеций *IKZF1* у пациентов детского и молодого взрослого возраста с первичным В-ОЛЛ составляет 6,4%. Наиболее распространен вариант моноаллельной делеции с 3 по 6 экзоны (Ex3–6). Точки разрыва расположены в интронах в областях сигнальных последовательностей рекомбинации, варьируют в диапазоне от 50 до 500 нуклеотидов и уникальны для каждого пациента. Абберрантная экспрессия коротких изоформ Ik 6, 9, 10 регистрируется у 10,5% пациентов и, в подавляющем большинстве случаев (96,1%), является следствием выявленных внутригенных делеций.

3. Для модельных клеточных линий K562<sup>Ik6</sup> и Nalm-6<sup>Ik6</sup>, характеризующихся абберрантной экспрессией короткой изоформы Ik 6, свойственны идентичные изменения чувствительности к воздействию ингибиторов тирозинкиназ (иматиниба) и глюкокортикоидов (преднизолона и дексаметазона), при этом процессы, задействованные в модификации лекарственной устойчивости в двух типах лейкозных клеточных линий отличаются.

4. У пациентов детского и молодого взрослого возраста с В-ОЛЛ наличие аберраций *IKZF1* связано с замедлением темпа регрессии минимальной остаточной болезни на 15-й ( $p=0,022$ ) и 36-й дни терапии ( $p=0,012$ ), повышением частоты и риска развития рецидивов (5-летний показатель БСВ –  $45,0\pm 11\%$  против  $72,0\pm 3\%$  в группе с нормальным статусом гена,  $p=0,001$ ; HR= $45,0\pm 11,6\%$  против  $19,4\pm 3\%$ ,  $p=0,006$ ), преобладанием ранних рецидивов в период от 18 до 30 месяцев с момента первичного диагноза ( $p=0,027$ ). Пациенты с аберрациями *IKZF1* по критериям стратификации клинических протоколов МБ 2002 и 2008 чаще попадают в группы высокого (46,6%) и промежуточного риска (25,5%), реже – в группу стандартного риска (9,8%). При этом, для пациентов группы стандартного риска аберрации *IKZF1* являются независимым прогностическим фактором развития первого рецидива (КЧР= $66,7\pm 22,7\%$ ,  $p<0,001$ ).

#### **Личный вклад соискателя ученой степени**

Научные положения, выносимые на защиту, представляют собой результат анализа 319 образцов моноклеарных клеток костного мозга

пациентов с В-ОЛЛ различными молекулярно-генетическими и цитогенетическими методами, изучения выявленных аберраций *IKZF1* в комплексе с другими клиническими и биологическими характеристиками лейкозов, а также работы с экспериментальными моделями лейкозных клеточных линий. Все основные научные результаты диссертационной работы получены автором лично.

Совместно с научным руководителем определена тема, поставлена цель и сформулированы задачи, объем исследования, разработаны его этапы и направления, осуществлен выбор объекта, предмета и методов исследования. Диссертантом самостоятельно выполнено: анализ литературных данных, сбор клинических данных пациентов, проведение всех этапов исследования, разработка молекулярно-генетических методов и их сравнительный анализ, разработка инструкции по применению «Метод определения внутригенных делеций в гене *IKZF1* при В-клеточных острых лимфобластных лейкозах у детей и «молодых» взрослых», формулирование выводов, публикация результатов исследования.

Эксперименты по оценке биологических свойств модельных клеточных линий проведены под руководством в.н.с. лаборатории иммунологических исследований государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии» к.б.н. Т. В. Шман. Статистическая обработка данных производилась под руководством в.н.с. лаборатории биоинформатики государственного научного учреждения «Объединенный институт проблем информатики Национальной академии наук Беларуси» к.т.н., доцента Красько О. В.

Диссертантом опубликованы основные научные результаты исследования, разработана инструкция по применению, 2 рационализаторских предложения, заявка на изобретение. Доля личного участия автора в опубликовании результатов диссертации составляет 90%, в оформлении рационализаторских предложений, заявки на изобретение – 95%, в разработке и внедрении – 85%.

#### **Апробация результатов диссертации и информация об использовании ее результатов**

Результаты диссертационного исследования доложены на научных конференциях и съездах: 18th ECCO – 40th ESMO European Cancer Congress (Вена, 2015), 24th Biennial Congress of the European Association for Cancer Research (Манчестер, 2016), IX Съезде онкологов и радиологов стран СНГ и Евразии (Минск, 2016), 17-й международной научной конференции «Сахаровские чтения 2017 года: экологические проблемы XXI Века» (Минск, 2017), VIII, IX и X Межрегиональном совещании НОДГО (Москва, 2017; Санкт-Петербург, 2018; Сочи, 2019), XIV Международной конференции «Актуальные вопросы детской онкологии, гематологии и иммунологии» (Минск, 2017), Международной научно-практической конференции «Молекулярная диагностика 2018» (Минск, 2018), International symposium Acute Leukemias XVII Biology and Treatment Strategies (Мюнхен, 2019), XV

Международной конференции «Актуальные вопросы детской онкологии, гематологии и иммунологии» (Минск, 2019), I объединенном Конгрессе НОДГО и РОДО «Актуальные проблемы и перспективы развития детской гематологии-онкологии Российской Федерации» (Москва, 2020).

Соискателем самостоятельно разработана инструкция по применению, два рационализаторских предложения, заявка на изобретение. Имеются 4 акта о внедрении результатов в работу государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии».

### **Опубликованность результатов диссертации**

По материалам диссертации опубликовано 21 работа, в том числе 5 статей в научных периодических рецензируемых изданиях, соответствующих требованиям пункта 19 Положения о присуждении ученых степеней и присвоении ученых званий в Республике Беларусь, 3 статьи в рецензируемых журналах, не включенных в перечень, 1 статья в сборнике научных материалов, 12 тезисов докладов. Общий объем опубликованных материалов составляет 7,2 авторских листа. Признаны рационализаторскими 2 предложения, Министерством здравоохранения Республики Беларусь утверждена 1 инструкция по применению, подана 1 заявка на изобретение.

### **Структура и объем диссертации**

Структура и объем диссертации определены логикой исследования в последовательности решаемых задач. Диссертация состоит из перечня сокращений и обозначений, введения, общей характеристики работы, аналитического обзора литературы, материалов и методов исследования, четырех глав с изложением результатов собственных исследований, заключения и восьми приложений. Список цитируемой литературы включает 79 источников и 25 публикаций автора. Работа иллюстрирована 34 таблицами и 36 рисунками. Полный объем диссертации составляет 122 страницы.

## **ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ**

### **Материал и методы исследования**

**Характеристика пациентов.** Анализ аберраций *IKZF1* был проведен в 319 образцах моноклеарных клеток костного мозга (МНК КМ) пациентов с В-ОЛЛ: 266 из них – первично диагностированные случаи, 65 – рецидивы заболевания. Медиана возраста пациентов составила 5,7 года (0–28 лет). Все пациенты проходили лечение согласно протоколам рабочей группы Москва – Берлин (ОЛЛ-МБ 2002, 2008 и 2015) в государственном учреждении «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии».

**Материал для исследования.** В качестве материала для исследования использовали тотальную РНК и геномную ДНК, выделенные методом фенол-хлороформной экстракции из клеточных линий, МНК КМ пациентов с В-



ОЛЛ и доноров костного мозга. Доля нормальных гемопоэтических предшественников среди МНК КМ пациентов составила (Me [25Q;75Q]) 7% [17,9; 2,8].

**Методы, использованные для выявления делеций *IKZF1*.** Для выявления делеций *IKZF1* с 1 по 6 (Ex1–6) и с 3 по 6 (Ex3–6) экзоны была разработана моноплексная ПЦР. Дополнительно была разработана мультиплексная флуоресцентная ПЦР с праймерами, специфичными к «горячим точкам» 4 типов внутригенных делеций *IKZF1*: Ex1–6, Ex3–6, Ex1–7 и Ex3–7. Продукты ПЦР визуализировали путем электрофореза в 2% агарозном или 7% полиакриламидном геле, либо разделяли амплифицированные фрагменты методом капиллярного электрофореза на генетическом анализаторе (Applied Biosystems 3130, США) с последующим анализом фрагментов в программе Peak Skaner (Thermo Fisher Scientific, США). Локализацию точек разрыва при делециях и их протяженность устанавливали путем секвенирования на генетическом анализаторе и последующего выравнивания с референсной последовательностью RefSeq NM\_006060.5 гена *IKZF1* в программном обеспечении SnapGene (GSL Biotech LLC, США). Для проведения сравнительного анализа методов был использован набор для мультиплексной амплификации лигированных проб (MLPA) SALSA MLPA probemix P335 ALL-IKZF1 (MRC-Holland, Нидерланды) и зонды для интерфазной флуоресцентной *in situ* гибридизации (iFISH) Sure FISH 7p12.2 IKZF1 128kb RD (Agilent Dako, США).

**Методы оценки уровня экспрессии изоформ *IKZF1*.** Уровень экспрессии полного спектра изоформ *IKZF1* определяли количественно в 9 отдельных реакциях методом ПЦР с обратной транскрипцией в реальном времени (ОТ-ПЦР). Дизайн праймеров, зондов, отработка условий ПЦР и определение пороговых значений нормы выполнены самостоятельно. С учетом накопленных данных дополнительно разработана мультиплексная ОТ-ПЦР в реальном времени для анализа 3 коротких изоформ *IKZF1* – 6, 9 и 10 (в данной работе используется обозначение «Ik-DN»).

**Получение модельных клеточных линий и методы, использованные в экспериментах.** Использовали собственную модификацию метода лентивирусной трансдукции для получения лейкозных клеточных линий K562<sup>Ik6</sup> и Nalm-6<sup>Ik6</sup>, экспрессирующих на высоком уровне короткую изоформу Ik 6. Экспрессию трансгена подтверждали методами конфокальной микроскопии, проточной цитометрии и ОТ-ПЦР. Оценку уровня экспрессии генов репарации проводили методом ОТ-ПЦР. Чувствительность клеточных линий к цитостатическим препаратам определяли в МТТ-тесте. Кинетику клеточного цикла оценивали методом проточной цитометрии по накоплению пропидий йодида (PI).

**Статистическая обработка данных.** Сравнение количественных показателей в группах проводили с использованием критерия Манна – Уитни или t-критерия для парных выборок. При исследовании таблиц сопряженности использовался критерий хи-квадрат или точный критерий Фишера.

Бессобытийную выживаемость (БСВ) рассчитывали по методу Каплан-Майера для пациентов, достигших полной ремиссии. Кумулятивную частоту развития рецидивов (КЧР) рассчитывали методом конкурирующих рисков. Модель Кокса для БСВ применяли для определения соотношения рисков (HR). Регрессионные модели пропорционального распределения рисков Файна и Грея использовали при расчете HR для исследуемых факторов. Значение  $p < 0,05$  считали значимым для статистических выводов.

С целью оценки интегральной диагностической информативности разработанных методов использовали характеристические ROC-кривые (Receiver Operator Characteristic) с расчетом площадей под ROC-кривыми (AUC – Area Under Curve).

Анализ проводили с использованием программного обеспечения «GraphPad Prizm 6.0» и R версии 3.6 (пакеты «survival» и «cmprsk»).

### Результаты собственных исследований

#### *Методы определения аберраций IKZF1 и их сравнительный анализ.*

В данной работе проведена сравнительная оценка четырех различных методов диагностики аберраций *IKZF1* (разработанных нами ПЦР и ОТ-ПЦР в реальном времени, а также набора MLPA и зондов для iFISH).

На первом этапе исследования разработана **качественная моноплексная ПЦР** для выявления 2 наиболее распространенных внутригенных делеций *IKZF1*: с 3 по 6 кодирующий экзон (Ex3–6) и с 1 по 6 кодирующий экзон (Ex1–6). Установлено, что различные варианты внутригенных делеций *IKZF1* происходят на значительном удалении друг от друга, их поиск становится возможным в единой мультиплексной ПЦР. На основании этих данных разработана и применена **мультиплексная ПЦР для выявления 4 типов внутригенных делеций**: Ex3–6, Ex1–6, Ex1–7 и Ex3–7.

С целью оценки разнообразия изоформ *IKZF1* (Ik 1 – 10) и уровня их экспрессии относительно гена внутреннего контроля *ABL1* разработан метод на основе **ОТ-ПЦР в 9 отдельных реакциях**. Метод в дальнейшем был оптимизирован для диагностики 3 ключевых коротких изоформ **Ik 6, 9 и 10 в единой мультиплексной реакции ОТ-ПЦР**, в качестве гена внутреннего контроля использовали *GUS*. Был **введен термин «Ik-DN»**, который обозначает совокупность значимых при В-ОЛЛ коротких доминантно-негативных изоформ.

Для определения порогового значения были построены точечные диаграммы распределения уровней относительной экспрессии Ik-DN и каждой из трех изоформ в отдельности у пациентов с В-ОЛЛ и доноров КМ. Исходя из распределения случаев в логарифмической шкале, в качестве порогового уровня экспрессии Ik 6, 9 в моноплексной ОТ-ПЦР принято значение 0,2 отн. ед., для Ik 10 – 0,01 отн. ед., для Ik-DN, анализируемых в мультиплексной ОТ-ПЦР – 0,7 отн. ед. Для оценки диагностической значимости (чувствительности и специфичности) метода, пациенты с В-ОЛЛ были разделены на две группы. Первую группу составили пациенты с делециями *IKZF1*, наличие которых было подтверждено секвенированием.

Во вторую группу включены пациенты, у которых делеции *IKZF1* методом ПЦР не выявлены.

Анализ информативности выбранных пороговых значений проведен с построением характеристических ROC-кривых. При принятии порогового значения экспрессии Ik-DN за 0,7 отн. ед., чувствительность теста составила 90,14% (95%ДИ 84,01–94,50%), а специфичность – 89,47% (95%ДИ 66,86–98,70%), AUC 0,9711 (95%ДИ 0,9389–1,003),  $p < 0,0001$ . Показатели диагностической значимости моноплексной ОТ-ПЦР при установленных для каждой изоформы пороговых значениях нормы были ниже.

Аналитическая чувствительность мультиплексной ОТ-ПЦР при определении aberrантной экспрессии Ik-DN изоформ была оценена путем серии клеточных разведений и составила 0,4% клеток минорной популяции, аналитическая чувствительность ПЦР при выявлении внутригенных делеций *IKZF1* – 6,25% клеток минорной популяции.

С целью сравнения методов, доступные для анализа ядра МНК КМ пациентов с В-ОЛЛ гибридизованы с зондами для ***интерфазной флуоресцентной in situ гибридизации (iFISH)*** Sure FISH 7p12.2 *IKZF1* 128kb RD (Agilent Dako, США). Метод позволяет объективно оценить aberrации исследуемого локуса, применим для выявления делеций *IKZF1*, однако не определяет дисфункцию гена в случае aberrантного сплайсинга, что является его недостатком. Метод характеризуется высокими требованиями к качеству биологического материала, необходимостью использования центромерных зондов и высокой стоимостью.

Дополнительно для сравнения методов использован набор для ***мультиплексной амплификации лигированных проб (MLPA)*** SALSA MLPA probemix P335 ALL-*IKZF1* (MRC-Holland, Нидерланды). Всего в рамках данной работы с использованием метода MLPA было проанализировано 54 образца ДНК пациентов с первичным В-ОЛЛ, однако интерпретируемые (валидные) результаты были получены лишь для 28 образцов. Основная причина невалидных результатов – намного более высокая чувствительность MLPA к присутствию примесей в образце ДНК, чем обычных реакций ПЦР.

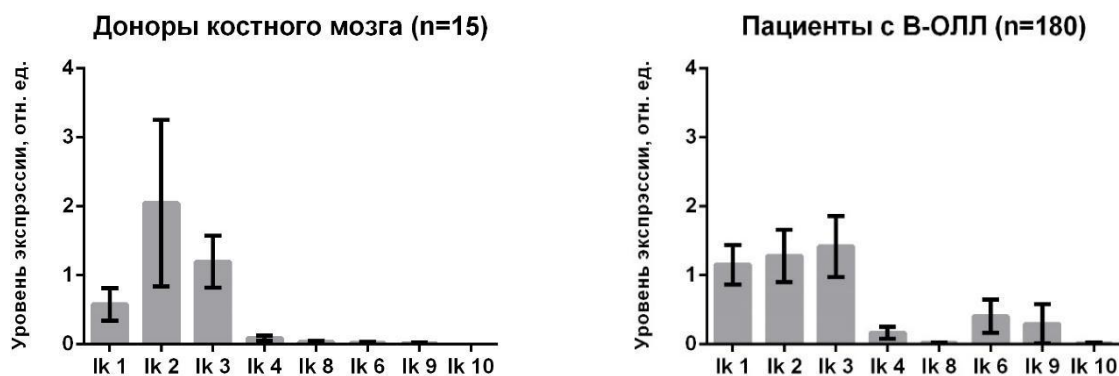
Все геномные методы, использованные в данной работе, в отличие от количественной ОТ-ПЦР, являются качественными: то есть результаты интерпретируются по принципу «обнаружено / не обнаружено» при детекции. Преимущество метода количественной оценки aberrаций заключается в том, что он лишен всех недостатков, свойственных качественным методам, а именно: позволяет выявить делеции любой протяженности независимо от расположения точки разрыва, клональности лейкоза и других факторов, осложняющих выявление aberrаций гена *IKZF1* геномными методами.

Таким образом, наиболее эффективным подходом для выявления aberrаций *IKZF1* при В-ОЛЛ является оценка экспрессии изоформ Ik-DN с использованием мультиплексной ОТ-ПЦР в реальном времени: метод является экономически эффективным, быстрым и обладает высокой

диагностической значимостью. Сопоставимым по ключевым критериям является метод ПЦР для определения наиболее распространенных делеций *IKZF1*, однако он позволяет выявить на 3,9% меньше клинически значимых нарушений гена *IKZF1*.

### Профиль экспрессии изоформ *IKZF1* и альтернативный сплайсинг

Для оценки полного спектра изоформ *IKZF1* проведен сравнительный анализ распределения их экспрессии в образцах МНК КМ 180 пациентов с В-ОЛЛ и 15 доноров (рисунок 1). При анализе экспрессии изоформ Ik 6, 9 и 10 в мультиплексной ОТ-ПЦР медиана уровня Ik-DN в лейкозных клетках пациентов составила 0,018 отн. ед., максимальное значение – 8,3 отн. ед., минимальное – 0,0001 отн. ед. Установлено, что уровень экспрессии коротких изоформ Ik-DN достоверно выше в образцах пациентов с В-ОЛЛ ( $p < 0,0001$ ) и, в подавляющем большинстве случаев, является следствием внутригенных делеций *IKZF1*.



**Рисунок 1 – Уровни относительной экспрессии для полного спектра изоформ *IKZF1* в образцах мононуклеаров костного мозга доноров (слева) и пациентов с первичным В-ОЛЛ (справа). Данные представлены в виде 95% доверительного интервала для среднего значения**

Аберрантная экспрессия короткой изоформы Ik 6 ассоциирована с наличием делеции Ex1–6, аберрантная экспрессия Ik 6+Ik 9 – с наличием делеции Ex3–6, повышенный уровень экспрессии Ik 10 может быть характерен для любой из описанных делеций. При этом изменение уровня экспрессии функциональных длинных изоформ (Ik 1, 2 и 3) не коррелировало с наличием делеций, а увеличение экспрессии других коротких изоформ (Ik 4 и 8) не было статистически достоверным. В соответствии с установленным пороговым значением 0,7 отн. ед., совокупная частота аберрантной экспрессии Ik-DN в образцах МНК КМ пациентов с первичным В-ОЛЛ составила 10,5%.

Гиперэкспрессия Ik-DN изоформ у 3,9% пациентов регистрировалась при отсутствии выявленных делеций. При наличии хотя бы одного события: делеции или гиперэкспрессии Ik-DN, транскрипционный фактор *IKZF1* считали аберрантным, то есть нефункциональным.

### Разнообразие делеций в гене *IKZF1*

Частота делеций в исследуемой когорте пациентов с первичными В-ОЛЛ составила 6,4%. Все выявленные делеции являлись моноаллельными. Наиболее часто обнаруживалась внутригенная делеция Ex3–6, реже – более крупная делеция Ex1–6. Варианты делеций Ex1–7 и Ex3–7 у пациентов исследуемой группы выявлены не были. Точки разрыва на 7 хромосоме при делеции Ex3–6 были расположены во 2 и 6 интронах, при делеции Ex1–6 – в 1 и 6 интронах, варьировали в диапазоне 50–500 нуклеотидов на 5'-конце и не более 25 нуклеотидов на 3'-конце и были уникальными для каждого пациента (рисунок 2).



1–14 – последовательности принадлежат пациентам, область делеции, включая нематричные нуклеотиды, обозначена красной заливкой; области RSS вблизи точек разрывов обозначены зеленой и голубой заливками;

Ref Seq – референсная последовательность *IKZF1* (NG\_034231.1) от 2 до 6 интрона.

**Рисунок 2 – Сравнение нуклеотидных последовательностей пациентов с первичным В-ОЛЛ при делеции Ex3–6 *IKZF1* в программе парного выравнивания SnapGene**

Размер делеций Ex3–6 варьировал от 50 735 до 50 752 п.о., размер делеции Ex1–6 составил 88 137, 88 153 и 88 549 п.о. в трех выявленных случаях. В место разрыва достраивались нематричные нуклеотиды, что, как и вариабельность точки разрыва, может затруднять специфичность некоторых геномных методов. Все точки разрыва при делециях *IKZF1* были расположены в области сигнальных последовательностей рекомбинации (RSS) или затрагивали их.

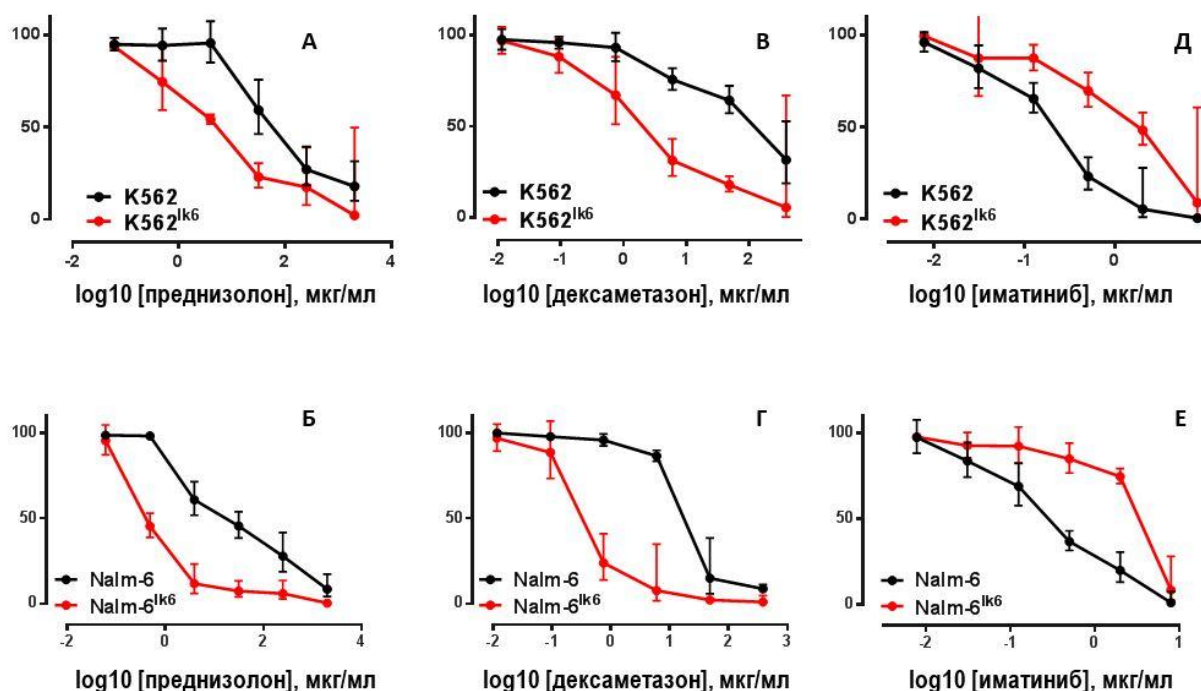
### **Модельные клеточные линии с aberrантной экспрессией короткой изоформы *IKZF1***

С использованием собственной модификации лентивирусной трансдукции были получены две модели лейкозных клеточных линий: K562<sup>Ik6</sup> и Nalm-6<sup>Ik6</sup>, экспрессирующие на высоком уровне короткую изоформу Ik 6. В качестве контроля во всех экспериментах использовали клетки линий K562 и Nalm-6, не экспрессирующие короткие изоформы. Для клеточной линии K562<sup>Ik6</sup> установлено увеличение уровня экспрессии генов *ATM* ( $p=0,02$ ), *DNA-PK* ( $p=0,018$ ) и *Ku80* ( $p=0,007$ ), ответственных за скорость репарации двойных разрывов (ДР) ДНК. Репарации ДР клеточной линии K562 в присутствии трансгена Ik 6 имеет свои особенности, что может отражаться на способности клеток восстанавливать повреждения,

произошедшие в результате воздействия на клеточный геном цитостатических препаратов.

При анализе кинетики клеточного цикла на  $16,2\% \pm 6,4$  больше клеток K562<sup>Ik6</sup> находилось в S-фазе в сравнении с K562 ( $p=0,046$ ). Для линии Nalm-6<sup>Ik6</sup> особенностей репарации ДР и клеточного цикла не выявлено ( $p \geq 0,05$ ).

В диапазоне 6 концентраций проведена оценка чувствительности клеточных линий к цитостатическим препаратам, которые применяются в протоколах лечения ОЛЛ: преднизолон, дексаметазон, винкристин, иматиниб, доксорубин, этопозид, митоксантрон, флударабин, идарубин, кладрибин. Расчет значений концентраций полублетального ингибирования (IC50) проведен по результатам 3 независимых экспериментов методом построения кривых зависимости «концентрация – эффект» (рисунок 3).



**Рисунок 3 – Кривые зависимости «концентрация – эффект» для клеточных линий K562/ K562<sup>Ik6</sup> и Nalm-6/ Nalm-6<sup>Ik6</sup> после экспозиции с преднизолоном (А, Б), дексаметазоном (В, Г) и иматинибом (Д, Е) в МТТ-тесте.**

Данные представлены как геометрические средние и 95% доверительные интервалы

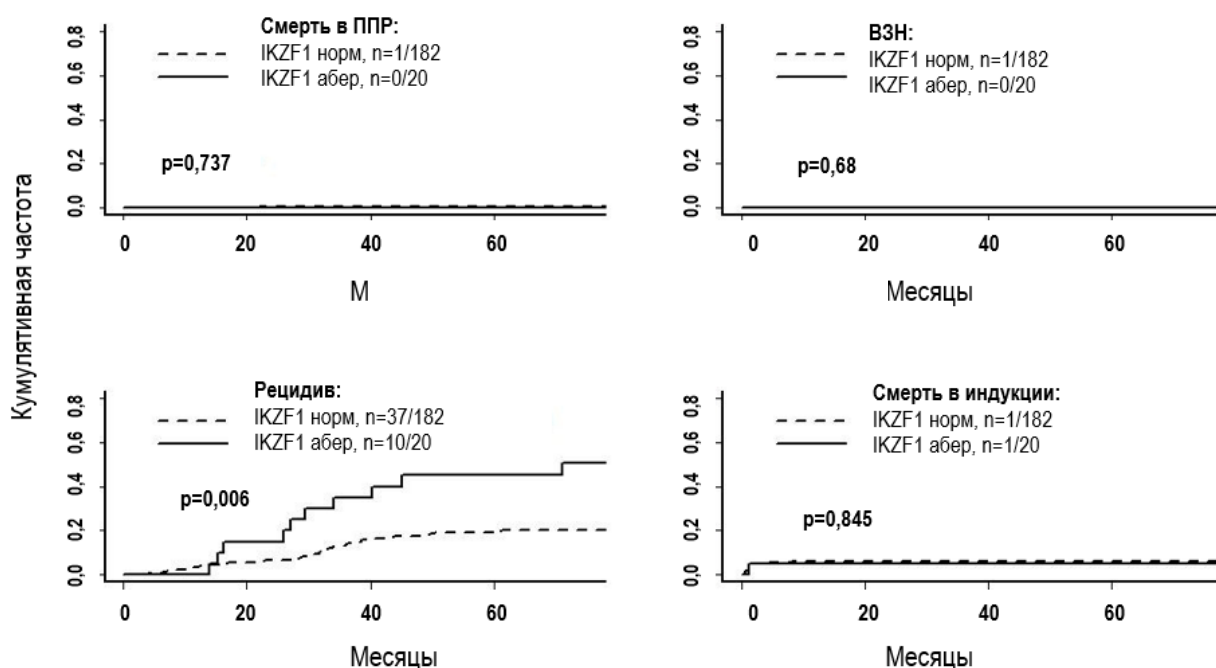
Экспрессия короткой изоформы приводила к увеличению чувствительности клеточных линий K562<sup>Ik6</sup> и Nalm-6<sup>Ik6</sup> к действию глюкокортикоидов, резистентности обеих клеточных линий к иматинибу *in vitro*, и не оказывала влияния на жизнеспособность клеточных линий при воздействии на них других препаратов, использованных в экспериментах.

### **Взаимосвязь aberrаций IKZF1 с показателями раннего ответа и частоты рецидивов при В-ОЛЛ**

Срок наблюдения при анализе БСВ у пациентов всех групп риска составил 83 месяца (6,9 года). Наличие aberrаций IKZF1 сопровождалось замедленным темпом регрессии МОБ в группе IKZF1<sup>абер</sup> в сравнении с пациентами группы IKZF1<sup>норм</sup>: на 15-й день терапии – более 1% остаточных



опухолевых клеток у 66,7% и 33,8% пациентов, соответственно ( $p=0,022$ ); на 36-й день терапии – более 0,01% остаточных опухолевых клеток у 80,0% и 44,1% пациентов, соответственно ( $p=0,012$ ). В течение периода наблюдения рецидив развился у 47 (23,3%) пациентов, у 12 пациентов – смерть на этапе индукционной терапии (5,9%), сообщалось об одной смерти в полной ремиссии (0,49%), у 1 пациента выявлено второе злокачественное новообразование (0,49%). Два пациента (0,99%) были подвергнуты цензурированию в день потери из-под наблюдения. Показатель 5-летней БСВ составил  $45,0\pm 11\%$  в группе  $IKZF1^{абер}$  по сравнению с  $72,0\pm 3,0\%$  в группе с нормальным статусом гена  $IKZF1$  ( $p=0,001$ ) (рисунок 4).



**Рисунок 4 – Кумулятивная частота рецидивов и других событий у пациентов с В-ОЛЛ (смерть в ППР – смерть в полной продолжительной ремиссии, ВЗН – второе злокачественное новообразование, смерть в индукции)**

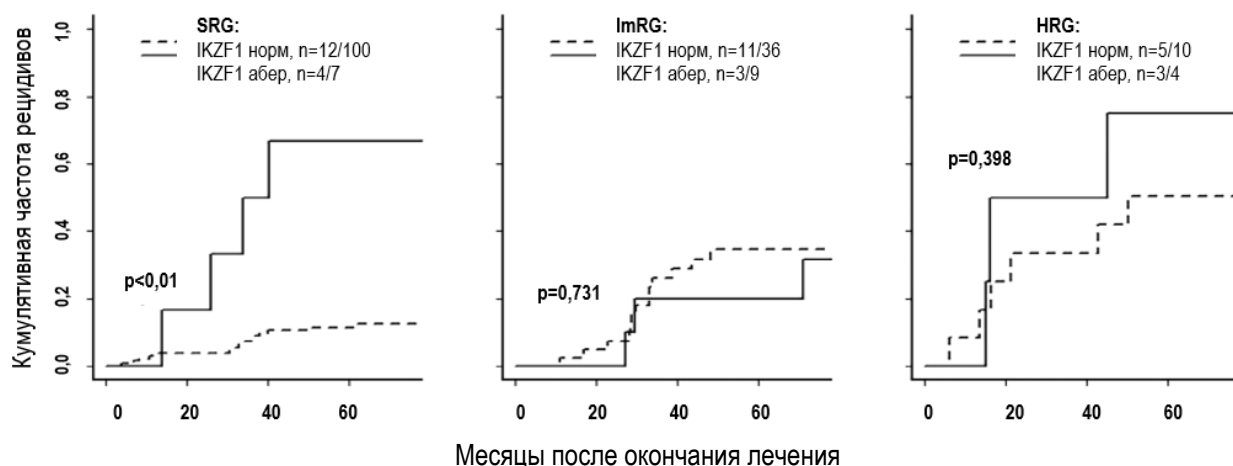
Пятилетний показатель риска развития рецидивов (HR) в группе  $IKZF1^{абер}$  составил  $45,0\pm 11,6\%$  против  $19,4\pm 3,0\%$  в группе без aberrаций ( $p=0,006$ ). Для пациентов с aberrациями  $IKZF1$  характерно преимущественно раннее развитие рецидивов – в период от 18 до 30 месяцев с момента первичного диагноза ( $p=0,028$ ).

#### **Аберрации $IKZF1$ – независимый прогностический фактор развития первого рецидива у пациентов группы стандартного риска**

С целью оценки aberrаций  $IKZF1$  как независимого фактора развития рецидивов была выделена когорта из 166 первичных пациентов с В-ОЛЛ, **вышедших в полную ремиссию**. Прогностическое значение aberrаций  $IKZF1$  было проанализировано **в соответствии с группами риска** согласно стратификации протокола ОЛЛ-МБ 2008. Аберрации  $IKZF1$  были более характерны для пациентов высокого (46,6%) и промежуточного риска (25,5%), и реже (9,8%) выявлялись у пациентов группы стандартного риска (SRG). Тем не менее, у пациентов SRG с aberrациями  $IKZF1$  частота

рецидивов была выше: 5-летний показатель КЧР составил  $66,7 \pm 22,7\%$  против  $11,6 \pm 2,9\%$  в группе с нормальным статусом гена ( $p < 0,001$ ). Для группы промежуточного риска (ImRG) показатель КЧР составил  $34,6 \pm 8,0\%$  для пациентов  $IKZF1^{\text{норм}}$  и  $20,0 \pm 13,5\%$  – для  $IKZF1^{\text{абер}}$  ( $p = 0,731$ ), у пациентов группы высокого риска (HRG) –  $50,3 \pm 15,5\%$  против  $75,0 \pm 29,2\%$  ( $p = 0,398$ ), соответственно (рисунок 5).

При оценке конкурирующих рисков, аберрации  $IKZF1$  определяли высокий риск развития рецидива только у пациентов SRG ( $p = 0,025$ ) и не являлись статистически значимым фактором для пациентов других групп риска ( $p = 0,284$  для ImRG и  $0,408$  для HRG). Для сравнения, высокий уровень МОБ на 36-й день терапии был статистически значимым фактором рецидива во всех группах риска.



SRG – группа стандартного риска, ImRG – группа промежуточного риска,  
HRG – группа высокого риска

**Рисунок 5 – Кумулятивная частота развития рецидивов у пациентов с В-ОЛЛ (n=166) разных групп риска в зависимости от статуса  $IKZF1$**

Таким образом, аберрации  $IKZF1$  являются независимым фактором, связанным с высоким риском развития рецидива у пациентов с В-ОЛЛ, стратифицированных в группу SRG согласно критериям протокола ОЛЛ-МБ 2008, а именно: инициальный лейкоцитоз менее  $30 \times 10^9 / \text{л}$ ; нет инициального поражения ЦНС; размеры селезенки менее 4 см; нет транслокаций t(4;11) или t(9;22); ремиссия достигнута к 36 дню терапии.

### **Сравнительный анализ аберраций $IKZF1$ в парных случаях первичный / рецидив. Оценка минимальной остаточной болезни**

В анализ включено 43 *парных случая* первичный В-ОЛЛ / рецидив. Показано, что популяция лейкозных клеток с аберрациями  $IKZF1$ , доминирующая при рецидиве, уже присутствовала в момент постановки диагноза до начала лечения в 100% случаев.

В рамках данного исследования нами был выявлен случай перехода одного типа делеции в другую с сохранением аберрантного статуса  $IKZF1$ . У пациента при первичном диагнозе были обнаружены 2 клона лейкозных клеток с различными делециями: Ex3–6 и Ex1–6, что подтверждено



секвенированием с аллель-специфичными праймерами и отслеживанием динамики МОБ по этим маркерам, а также идентифицированным клональным реаранжировкам Т-клеточного рецептора и гена иммуноглобулина (*IgH* и *TCR*). Уровень МОБ измеряли с помощью ОТ-ПЦР с использованием серийных разведений ( $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$ ) ДНК пациента в нормальной поликлональной ДНК. Мы обнаружили, что обе делеции *IKZF1*, диагностированные при первом проявлении заболевания, сохранялись на этапе индукционной терапии, а на этапе консолидации не определялись, как и мишени *IgH/TCR*.

При первом рецидиве у данного пациента обнаружен опухолевый клон с делецией Ex3–6, а клон с делецией Ex1–6 был элиминирован. Тем не менее, аберрантный статус гена *IKZF1* сохранен. Таким образом, делеции *IKZF1* могут быть использованы в качестве дополнительной мишени для отслеживания МОБ.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

### Основные научные результаты диссертации

1. В результате идентификации и количественного анализа изоформ гена *IKZF1* установлено, что для пациентов с В-ОЛЛ в сравнении с донорами КМ характерна повышенная экспрессия трех коротких изоформ Ik-DN (Ik 6, 9 и 10) ( $p < 0,0001$ ). Повышенная экспрессия изоформы Ik 6 ассоциирована с наличием делеции Ex1–6, экспрессия Ik 6 + Ik 9 – с наличием делеции Ex3–6, экспрессия Ik 10 может выявляться при любой из описанных делеций [1, 3, 10, 14].

2. Частота делеций *IKZF1* в исследуемой когорте пациентов детского и молодого взрослого возраста с первичными В-ОЛЛ составила 6,4%, частота aberrантной экспрессии Ik-DN – 10,5%. Aberrантная экспрессия Ik-DN изоформ у 3,9% пациентов регистрировалась при отсутствии выявленных делеций. При наличии хотя бы одного события: делеции или повышенной экспрессии Ik-DN, транскрипционный фактор *IKZF1* следует считать aberrантным [1, 3, 11].

3. Наиболее эффективным подходом для выявления aberrаций *IKZF1* при В-ОЛЛ является оценка экспрессии изоформ Ik 6, 9 и 10 (Ik-DN) с использованием мультиплексной ОТ-ПЦР в реальном времени. Метод обладает высокой диагностической значимостью (ДЧ=90,14%, ДС=89,47%), воспроизводимостью (КВ=3,04%) и экономической эффективностью. Сопоставимым по ключевым критериям является метод определения четырех наиболее распространенных делеций *IKZF1* (Ex1–6, Ex3–6, Ex1–7 и Ex3–7) с использованием ПЦР, однако он позволяет выявить на 3,9% меньше нарушений гена *IKZF1* [3, 5, 10, 12, 15, 16, 21, 24, 25].

4. Для модельной клеточной линии K562<sup>Ik6</sup> с aberrантной экспрессией короткой изоформы Ik 6 установлено смещение клеточного цикла в S-фазу и увеличение уровня экспрессии генов *ATM* ( $p=0,02$ ), *DNA-PK* ( $p=0,018$ ) и *Ku80* ( $p=0,007$ ), ответственных за скорость репарации двойных разрывов ДНК, тогда как для линии Nalm-6<sup>Ik6</sup> аналогичных закономерностей не выявлено. Для обеих клеточных линий K562<sup>Ik6</sup> и Nalm-6<sup>Ik6</sup> характерно снижение чувствительности к ингибитору тирозинкиназ (иматинибу) и увеличение чувствительности к воздействию глюкокортикоидов (преднизолон и дексаметазон) [5, 6, 13, 20, 23].

5. Делеции *IKZF1*, выявленные при первичной диагностике В-ОЛЛ, в 100% случаев определяются при первом и последующих рецидивах заболевания, и могут быть использованы в качестве дополнительного маркера для отслеживания МОБ [2].

6. Как делеции, так и aberrантная экспрессия коротких изоформ Ik 6, 9 и 10 (Ik-DN) *IKZF1* являются независимым прогностическим фактором развития первого рецидива у пациентов с В-ОЛЛ, стратифицированных по критериям протокола ОЛЛ-МБ 2008 в группу стандартного риска: 5-летний показатель кумулятивной частоты рецидивов (КЧР) составил  $66,7 \pm 22,7\%$  против  $11,6 \pm 2,9\%$  в группе с нормальным статусом гена ( $p < 0,001$ ). В группах

промежуточного (ImRG) и высокого (HRG) риска наличие aberrаций *IKZF1* способствует замедлению темпа регрессии лейкозных клеток на 15-й и 36-й дни терапии ( $p=0,022$ ), но не оказывает влияния на частоту или сроки развития рецидивов. Пациенты детского и молодого взрослого возраста с aberrациями *IKZF1*, выявленными при первичном В-ОЛЛ, имеют высокий риск развития ранних рецидивов в период с 18 до 30 месяцев с момента первичного диагноза и не связаны с повышенным риском второго рецидива или смерти после первого рецидива [4, 7, 8, 9, 17, 18, 19].

#### **Рекомендации по практическому использованию результатов**

1. Метод оценки экспрессии изоформ Ik 6, 9 и 10 в мультиплексной ОТ-ПЦР в реальном времени является наиболее эффективным подходом для выявления aberrаций *IKZF1* и рекомендован при проведении первичной диагностики В-ОЛЛ в учреждениях здравоохранения, оказывающих специализированную медицинскую помощь [25].

2. Для выявления делеций *IKZF1* рекомендован метод определения четырех наиболее распространенных вариантов (Ex1–6, Ex3–6, Ex1–7 и Ex3–7) *IKZF1* в соответствии с инструкцией по применению «Метод определения внутригенных делеций в гене *IKZF1* при В-клеточных острых лимфобластных лейкозах у детей и «молодых» взрослых» (№ 068-0519), утвержденной Министерством здравоохранения Республики Беларусь 17.05.2019 г. [22].

3. Пациентам с В-ОЛЛ целесообразно определение aberrаций *IKZF1* на этапе первичной диагностики с целью стратификации на группы прогноза рецидива заболевания. Aberrации *IKZF1* могут быть использованы в качестве маркера для отслеживания МОБ.

4. Представленные в диссертации результаты внедрены в работу государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии» (акты внедрения от 14.11.2014 г., 13.12.2019 г., 10.06.2021 г., 16.12.2022 г.).

## **СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ СОИСКАТЕЛЯ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ**

**Статьи в научных журналах, соответствующие требованиям пункта 19 Положения о присуждении ученых степеней и присвоении ученых званий в Республике Беларусь**

1. Мелешко, А.Н. Внутригенные делеции в локусе IKZF1 при остром лимфобластном лейкозе у детей / А. Н. Мелешко, О. С. Вшивкова // Лаб. диагностика. Вост. Европа. – 2014. – №4 (12). – С. 57–65.
2. Vshyukova, V.S. Changing of IKZF1 genotype during Philadelphia-negative precursor-B acute lymphoblastic leukemia progression: a short clinical case report / V. S. Vshyukova, A. N. Meleshko, N. V. Mihal, O. V. Aleinikova // Leukemia Research Reports. – 2016. – Vol. 6. – P. 15–19.
3. Vshyukova, V. Expression of aberrantly spliced oncogenic Ikaros isoforms coupled with clonal IKZF1 deletions and chimeric oncogenes in acute lymphoblastic leukemia / V. Vshyukova, A. Valochnik, A. Meleshko // Blood Cells, Molecules, and Diseases. – 2018. – Vol. 71. – P. 29–38.
4. Vshyukova, V.S. Aberrant IKZF1 gene as relapse predictor in standard-risk pediatric patients with B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia / V. S. Vshyukova, O. V. Krasko, D. A. Yanchanka, A. N. Meleshko // Int. J. of Laboratory Hematology. – 2022. – Vol. 44, №4. – P. 769–776.
5. Богатенкова, Д.А. Оценка эффективности метода мультиплексной ПЦР в реальном времени при определении коротких изоформ гена IKZF1 (Ikaros) / Д. А. Богатенкова, О. С. Вшивкова // Наука и инновации. – 2023. – № 1 (239). – С. 79–84.

### **Статьи в других рецензируемых научных журналах**

6. Вшивкова, О.С. Роль транскрипционного фактора Ikaros в нормальном гемопоэзе и лейкозогенезе: биологические и клинические аспекты / О. С. Вшивкова, А. Н. Мелешко // Успехи молекулярной онкологии. – 2015. – Т. 2, №1. – С. 13–26.
7. Мигаль, Н.В. Достижения в терапии острого лимфобластного лейкоза у молодых взрослых Республики Беларусь / Н. В. Мигаль, О. И. Быданов, А. С. Лелей, Е. А. Столярова, Л. В. Мовчан, Е. В. Волочник, О. С. Вшивкова, В. В. Дмитриев, И. В. Тарасевич, Н. Ф. Казакевич, Л. В. Артюшкевич, М. В. Белевцев, О. В. Алейникова // Гематология. Трансфузиология. Вост. Европа. – 2017. – Т. 3, №3. – С. 352–364.
8. Вшивкова, О.С. Передача aberrаций гена IKZF1 в рецидивном клоне В-линейного острого лимфобластного лейкоза / О.С. Вшивкова, А. В. Корзик, А. Н. Мелешко А.Н. // Гематология. Трансфузиология. Вост. Европа. – 2021. – Т. 7, № 4. – С. 425–435.

## Статьи в научных сборниках и материалы конференций

9. Вшивкова, О.С. Прогностическое значение aberrаций гена IKZF1 у пациентов с В-клеточным острым лимфобластным лейкозом [Электронный ресурс] / О.С. Вшивкова, А.Н. Мелешко // Достижения медицинской науки Беларуси: рецензируемый науч.-практ. ежегодник. Вып. 23 / М-во здравоохранения Респ. Беларусь, ГУ «Респ. науч. мед. б-ка»; ред.: В.И. Жарко (гл. ред.) и др. – Минск: ГУ РНМБ, 2019. – Режим доступа: [http://med.by/dmn/book.php?book=19-10\\_5](http://med.by/dmn/book.php?book=19-10_5). – Дата доступа: 22.03.2023.

## Тезисы докладов

10. Vshyukova, V. RQ-PCR analysis of Ikaros dominant-negative isoforms in diagnostics of acute lymphoblastic leukemia / V. Vshyukova, A. Meleshko // Abstracts from the 18<sup>th</sup> ECCO – 40<sup>th</sup> ESMO European Cancer Congress, Vienna, Austria, 25–29 Sept. 2015. – [Publ.] European J. of Cancer. – 2015. – Vol. 51, Suppl. S3. – P. S87.

11. Vshyukova, V. IKZF1 gene deletions are strongly associated with Ikaros dominant-negative isoforms expression in acute lymphoblastic leukemia / V. Vshyukova, A. Meleshko // Abstracts from the 24<sup>th</sup> Biennial Congress of the European Association for Cancer Research, 9–12 July 2016. – [Publ.] European J. of Cancer. – 2016. – Vol. 61, Suppl. 1. – P. S150–S151.

12. Вшивкова, О.С. Способ оценки aberrаций гена IKZF1 (Ikaros) у пациентов с острыми лимфобластными лейкозами / О. С. Вшивкова, А. Н. Мелешко // Материалы IX Съезда онкологов и радиологов стран СНГ и Евразии, Минск, 15–17 июня 2016 г. – [Опубл. в журн.] Евразийский онкологич. журнал. – 2016. – Т.4, № 2. – С. 182–183.

13. Юревич, В.В. Оценка химиоустойчивости к доксорубину и иматинибу клеточных линий с aberrантной экспрессией короткой изоформы гена IKZF1 / В. В. Юревич, О. С. Вшивкова, А. Н. Мелешко // Сахаровские чтения 2017 года: экологические проблемы XXI Века : материалы 17-й междунар. науч. конф., Минск, 18–19 мая 2017 г. / Междунар. гос. экол. ин-т им. А. Д. Сахарова Бел. гос. ун-та; редкол. : С. Е. Головатый [и др.] ; под ред. С. А. Маскевича, С. С. Позняка. – Минск : ИВЦ Минфина, 2017. – Ч. 1. – С. 257.

14. Вшивкова, О.С. Возможности молекулярной и цитогенетической диагностики aberrаций гена IKZF1 при острых лейкозах / О. С. Вшивкова, А. Н. Мелешко, Е. В. Волочник // Перспективы детской гематологии-онкологии: мультидисциплинарный подход – 2017 : сб. материалов VIII межрег. совещания НОДГО, Москва, 25–28 мая 2017 г. – [Опубл. в журн.] Росс. журнал детской гемат. и онкологии. – 2017. – Спец. номер. – С. 34.

15. Вшивкова, О.С. Оценка сверхэкспрессии коротких изоформ – информативный метод молекулярной диагностики aberrаций IKZF1 при остром лимфобластном лейкозе / О. С. Вшивкова, А. Н. Мелешко //

Перспективы детской гематологии-онкологии: мультидисциплинарный подход – 2018 : сб. материалов IX межрег. совещания НОДГО, Санкт-Петербург, 26–28 апр. 2018 г. – [Опубл. в журн.] Росс. журнал детской гемат. и онкологии. – 2018. – Спец. номер. – С. 34.

16. Вшивкова, О.С. Метод оценки aberrантной экспрессии коротких изоформ гена IKZF1 (Ikaros) при острых лейкозах / О. С. Вшивкова, А. Н. Мелешко // Молекулярная диагностика 2018 : сборник материалов Международной научно-практической конференции «Молекулярная диагностика 2018», Минск, 27–28 сентября 2018 г. / СтойМедиаПроект ; под ред. : В.И.Покровского. – Минск, 2018. – С. 236 – 237.

17. Mihal, N. Prognostic importance of IKZF1 gene deletions in patients with acute lymphoblastic leukemia / N. Mihal, V. Vshyukova, A. Meleshko // Abstracts from the International Symposium Acute Leukemias XVII, Munich, Germany, 24–27 Feb. 2019. [Publ.] Annals of Hematol. – 2019. – Vol. 98, Suppl. 1. – S. 51–52.

18. Вшивкова, О.С. Влияние применения ПЭГ-аспарагиназы в циторедуктивной фазе на отдаленные результаты лечения у пациентов с aberrациями гена IKZF1 / О. С. Вшивкова, Н. В. Мигаль, А. Н. Мелешко, О. И. Быданов // Актуальные проблемы и перспективы развития детской гематологии-онкологии в Российской Федерации : сб. материалов X конгр. НОДГО, Сочи, 25–27 апр. 2019 г. – [Опубл. в журн.] Росс. журнал детской гемат. и онкологии. – 2019. – Спец. номер. – С. 50.

19. Вшивкова, О.С. Прогностическое значение aberrаций IKZF1 у пациентов с острым лимфобластным лейкозом, лечившихся по протоколам MB 2002 и MB 2008 / О. С. Вшивкова, О. В. Красько, Н. В. Мигаль, А. Н. Мелешко // Актуальные проблемы и перспективы развития детской гематологии-онкологии в Российской Федерации : сб. материалов X конгр. НОДГО, Сочи, 25–27 апр. 2019 г. – [Опубл. в журн.] Росс. журнал детской гемат. и онкологии. – 2019. – Спец. номер. – С. 50–51.

20. Вшивкова, О.С. Оценка системы репарации лейкозных клеточных линий, характеризующихся высоким уровнем экспрессии короткой изоформы белка Ikaros / О. С. Вшивкова, Т. И. Ермилова, Т. В. Шман, А. А. Мигас, А. Н. Мелешко // Актуальные вопросы детской онкологии, гематологии и иммунологии : материалы XV Междунар. конф., Минск, 31 окт. – 1 ноя. 2019 г. – [Опубл. в журн.] Гематология. Трансфузиология. Вост. Европа. – 2019. – Том. 5, № 4. – С. 500–501.

21. Богатенкова, Д.А. Определение трёх диагностически значимых коротких изоформ гена IKZF1 (Ikaros) методом мультиплексной ПЦР в реальном времени / Д. А. Богатенкова, О. С. Вшивкова // Здоровые дети – будущее страны : сб. материалов VII конгр. с междунар. участием, Санкт-Петербург, 15–16 июня 2023 г. – [Опубл. в журн.] Forcipe. – 2023. – Том 6. – Спец. выпуск. – С. 92.

## **Инструкции по применению**

22. Метод определения внутригенных делеций в гене IKZF1 при В-клеточных острых лимфобластных лейкозах у детей и «молодых» взрослых : инструкция по применению № 068-0519 : утв. М-вом здравоохранения Респ. Беларусь 17.05.2019 / ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии и гематологии» ; О. С. Вшивкова, А. Н. Мелешко. – Минск, 2019. – 13 с.

## **Рационализаторские предложения, заявка на изобретение**

23. Увеличение выхода рекомбинантных псевдотипированных лентивирусных частиц путем котрансфекции клеточной линии НЕК293Т в присутствии полиэтиленимина: рац. предложение № 87 : утв. Сов. Министров Респ. Беларусь 14.11.2014 // ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии» от 14.11.2014. сост.: А. А. Мигас, О. С. Вшивкова.

24. Мультиплексирование ПЦР смесей для проведения единой реакции при определении коротких изоформ гена IKZF1: рац. предложение № 133 : утв. Сов. Министров Респ. Беларусь 31.05.2021 // ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии и гематологии» от 31.05.2021. сост.: О.С. Вшивкова, А.В. Корзик, А.Н. Мелешко.

25. Способ определения аберраций гена IKZF1 : заявка ВУ а20230201 / О. С. Вшивкова, А. Н. Мелешко, Д. А. Богатенкова. – Оpubл. 21.08.2023.

## РЭЗЮМЭ

### **Вшыўкова Вольга Сяргееўна Аберацыі гена транскрыпцыйнага фактару *IKZF1* пры В-лінейных вострых лімфабластных лейкозах**

**Ключавыя словы:** *IKZF1*, Ikaros, аберантны сплайсінг, дэлецыя, востры лімфабластны лейкоз (ВЛЛ).

**Мэта даследвання:** ацаніць разнастайнасць аберацый гена пухліннага супрэсару *IKZF1* пры В-лінейных вострых лімфабластных лейкозах і ўсталяваць іх значэнне ў дыягностыцы і прагназаванні захворвання.

**Метады даследавання і выкарыстаная апаратура:** лабараторныя, малекулярна-генетычныя, статыстычныя.

**Атрыманыя вынікі і іх навізна:** Для ацэнкі аберацый *IKZF1* распрацаваны метады вызначэння структурных і функцыянальных парушэнняў, праведзены іх параўнальны аналіз. Аптымальным падыходам для дыягностыкі аберацый *IKZF1* пры В-ВЛЛ з'яўляецца ацэнка экспрэсіі трох кароткіх дамінантна-негатыўных ізаформаў (Ik 6, 9 і 10) у адной мультыплекснай АТ-ПЛР.

Для лейкозных клеткавых ліній з аберрантнай экспрэсіяй кароткай ізаформы Ik 6 ўласцівыя ідэнтычныя змены адчувальнасці да ўздзеяння іматыніба і глюкакартыкоідаў, пры гэтым працэсы, задзейнічаныя ў мадыфікацыі лекавай устойлівасці ў двух тыпах клеткавых ліній адрозніваюцца.

У пацыентаў з В-ВЛЛ наяўнасць аберацый *IKZF1* звязана з запаволеннем тэмпу рэгрэсіі мінімальнай рэшткавай хваробы на 15-й і 36-й дні тэрапіі, павышэннем колькасці і рызыкі развіцця рэцыдываў з перавагай ранніх рэцыдываў у перыяд ад 18 да 30 месяцаў. Для пацыентаў групы стандартнай рызыкі аберацыі *IKZF1* з'яўляюцца незалежным прагнастычным фактарам развіцця першага рэцыдыву.

**Рэкамендацыі па выкарыстанні:** распрацаваныя метады могуць быць выкарыстаны ў лабараторнай практыцы пры ацэнцы статусу гена *IKZF1*, атрыманыя дадзеныя – для стратыфікацыі па групам рызыкі першасных пацыентаў з В-ВЛЛ.

**Галіна прымянення:** клінічная лабараторная дыягностыка вострых лімфабластных лейкозаў.



## РЕЗЮМЕ

### **Вшивкова Ольга Сергеевна** **Аберрации гена транскрипционного фактора *IKZF1*** **при В-линейных острых лимфобластных лейкозах**

**Ключевые слова:** *IKZF1*, Ikaros, аберрантный сплайсинг, делеции, острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ).

**Цель работы:** оценить разнообразие аберраций гена опухолевого супрессора *IKZF1* при В-линейных острых лимфобластных лейкозах и установить их значение в диагностике и прогнозировании течения заболевания.

**Методы исследования и использованная аппаратура:** лабораторные, молекулярно-генетические, статистические.

**Полученные результаты и их новизна:** Для оценки аберраций *IKZF1* разработаны методы определения структурных и функциональных нарушений, проведен их сравнительный анализ. Оптимальным подходом для диагностики аберраций *IKZF1* при В-ОЛЛ является оценка экспрессии трех коротких доминантно-негативных изоформ (Ik 6, 9 и 10) в одной мультиплексной ОТ-ПЦР.

Для лейкозных клеточных линий с аберрантной экспрессией короткой изоформы Ik 6 свойственны идентичные изменения чувствительности к воздействию иматиниба и глюкокортикоидов, при этом процессы, задействованные в модификации лекарственной устойчивости, в двух типах клеточных линий отличаются.

У пациентов с В-линейным ОЛЛ наличие аберраций *IKZF1* связано с замедлением темпа регрессии минимальной остаточной болезни на 15-й и 36-й дни терапии, повышением частоты и риска развития рецидивов с преобладанием ранних рецидивов в период от 18 до 30 месяцев от момента первичного диагноза. Для пациентов группы стандартного риска аберрации *IKZF1* являются независимым прогностическим фактором развития первого рецидива.

**Рекомендации по использованию:** разработанные методы рекомендованы при оценке статуса гена *IKZF1*, полученные данные – для стратификации по группам риска пациентов с первичным В-ОЛЛ.

**Область применения:** лабораторная диагностика острых лимфобластных лейкозов.

## ABSTRACT

Vshyukova Volha Sergeevna

### Aberrations of the transcription factor gene *IKZF1* in acute B-cell precursor lymphoblastic leukemia

**Key words:** *IKZF1*, Ikaros, aberrant splicing, deletions, acute lymphoblastic leukemia (ALL).

**Purpose of the study:** to evaluate the diversity of aberrations of the *IKZF1* tumor suppressor gene in B-lineage acute lymphoblastic leukemia and establish their significance in the diagnosis and prognosis of the course of the disease.

**Methods and equipment used:** laboratory, molecular genetics, statistical.

**Research results and their novelty:** To assess *IKZF1* aberrations, methods for determining structural and functional disorders were developed, and their comparative analysis was carried out. The optimal approach for diagnosing *IKZF1* aberrations in BCP-ALL is to evaluate the expression of three short dominant-negative isoforms (Ik 6, 9, and 10) in one multiplex RQ-PCR.

Leukemia cell lines with aberrant expression of the short isoform Ik 6 are characterized by identical changes in sensitivity to the effects of imatinib and glucocorticoids, while the processes involved in modifying drug resistance in the two types of cell lines differ.

In patients with BCP-ALL, the presence of *IKZF1* aberrations is associated with a slowdown in the rate of regression of minimal residual disease on the 15th and 36th days of therapy, an increase in the frequency and risk of relapses, with a predominance of early relapses from 18 to 30 months from the time of the initial diagnosis. For standard risk patients, *IKZF1* aberrations are an independent predictor of the development of the first relapse.

**Recommendations for use:** the developed methods can be used in laboratory practice in assessing the status of the *IKZF1* gene, the data obtained can be used for stratification by risk groups in patients with de-novo BCP-ALL.

**Field of applications:** clinical laboratory diagnostics of acute lymphoblastic leukemia.

Подписано в печать 03.01.2024.  
Формат 60×84/16. Бумага офсетная. Печать цифровая.  
Усл. печ. л. 1,395. Тираж 60 экз. Заказ № 1.  
ФТИ НАН Беларуси.

Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,  
распространителя печатных изданий № 2/12 от 21.11.2013.  
220084, ул. Академика Купревича, 10, г. Минск.