

УДК 616.155.392.2; 616-006.446

Эволюция опухолевых клонов при остром лимфобластном лейкозе взрослых

С. Ю. Смирнова¹, Ю. В. Сидорова¹, Н. В. Рыжикова¹, К. А. Сычевская², Е. Н. Паровичникова¹, А. Б. Судариков^{1*}

¹Гематологический научный центр Министерства здравоохранения РФ, 125167, Москва, Новый Зыковский пр-д, 4

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, факультет фундаментальной медицины, 119192, Москва, Ломоносовский просп., 31, корп. 5

*E-mail: dusha@blood.ru

Поступила в редакцию 10.02.2016

Принята к печати 01.04.2016

РЕФЕРАТ Нестабильность клонального состава популяции опухолевых клеток при острых лимфобластных лейкозах (ОЛЛ) усложняет процесс контроля минимальной остаточной болезни (МОБ) и эффективности терапии по установленным в дебюте заболевания мишеням, специфичным для данного пациента. Основные работы, в которых изучали эволюцию опухолевых клеток со сменой клональных реаранжировок генов *TCR* и *IG* в рецидиве заболевания, выполнены на детских ОЛЛ. Данные для взрослых больных ОЛЛ ограничены, тогда как ОЛЛ у взрослых и детей имеют различия в особенностях биологии и прогноза заболевания. Цель нашей работы состояла в изучении клональных реаранжировок генов *IG* и *TCR* и их стабильности у взрослых больных с ОЛЛ. Реаранжировки выявляли методом ПЦР по протоколу BIOMED-2 с последующим анализом фрагментов. У 83% пациентов выявили несоответствие клональных реаранжировок в дебюте и рецидиве заболевания. Клональная эволюция может быть одним из механизмов опухолевой прогрессии. Не исключена изначальная неоднородность состава опухолевых клеток, и в то время как одни клоны исчезают под воздействием терапии, другие, не распознанные из-за недостаточной чувствительности метода, приобретают способность к пролиферации. Кроме того, в течение заболевания реаранжировки могут меняться благодаря сохраняющейся активности рекомбиназного комплекса, что приводит к появлению опухолевых клонов *de novo*. Изучение механизмов клональной эволюции, способности терапии влиять на процессы клональной эволюции позволит выделить новые прогностические факторы, разработать тактику диагностики МОБ, расширит современные представления о механизмах онкогенеза.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА острый лимфобластный лейкоз, рецидив, ПЦР, реаранжировки генов *IG*, реаранжировки генов *TCR*.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ МОБ – минимальная остаточная болезнь; ОЛЛ – острый лимфобластный лейкоз; ПЦР-РВ – ПЦР в реальном времени; TCR – Т-клеточный рецептор; TCRG, TCRB, TCRD – Т-клеточные рецепторы γ , β и δ соответственно; IG – иммуноглобулин; IGH – тяжелая цепь иммуноглобулина; IGHK – легкая цепь иммуноглобулина.

ВВЕДЕНИЕ

Острые лейкозы представляют собой гетерогенную группу опухолевых заболеваний кроветворной ткани, характеризующихся поражением костного мозга морфологически незрелыми (бластными) кроветворными клетками. В зависимости от принадлежности опухолевых клеток к той или иной линии гемопоэза, острые лейкозы принято разделять на острые лимфобластные и острые миелобластные лейкозы. Без терапии течение заболевания быстро прогрессирующее и всегда заканчивается смертью больного.

Наиболее часто причиной смерти являются тяжелые инфекционные и геморрагические осложнения, обусловленные замещением нормальной кроветворной ткани бластными клетками.

Основная цель терапии любых форм лейкозов – эрадикация опухолевого клона, восстановление нормального кроветворения и достижение длительной безрецидивной выживаемости больных. Введение в клиническую практику цитостатических препаратов в конце 60-х годов позволило достичь полной ремиссии у 85–95% детей с ОЛЛ [1]. При этом важным

прогностическим фактором является возраст, бессобытийная выживаемость детей варьирует в разных возрастных группах от 83–97% (1–5 лет) до 49–66% (10–15 лет). На сегодняшний день Российской исследовательской группой по лечению острых лимфобластных лейкозов (RALL) показано, что в группах взрослых больных моложе 30 лет 5-летняя безрецидивная выживаемость составила 71.5%, в то время как у больных 30–55 лет этот показатель был ниже – 61.8% [2]. Показано, что взрослые и дети, больные ОЛЛ, отличаются не только выживаемостью, но также биологическими свойствами и прогнозом заболевания [3, 4]. В частности, к группе благоприятного прогноза у взрослых относят Т-клеточный вариант заболевания, в то время как у детей этот вариант считается прогностически неблагоприятным. Кроме того, у взрослых чаще выявляют прогностически неблагоприятные хромосомные aberrации (t(9;22), t(4;11)), миелоидные антигены на мембране опухолевых клеток, в дебюте заболевания чаще определяют гиперлейкоцитоз, чаще диагностируют Т-клеточный иммунофенотип [3, 4].

Другой важный прогностический фактор при ОЛЛ – остаточное количество опухолевых клеток в костном мозге, или минимальная остаточная болезнь (МОБ). Оценка МОБ рассматривается не только как независимый фактор прогноза, но и как критерий разделения пациентов на группы риска развития рецидива [5–7]. Для оценки МОБ наиболее пригодны количественные методики с максимальным уровнем чувствительности (10^{-4} – 10^{-5}), такие, как ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) с использованием праймеров, специфичных для данного пациента, и многоцветная проточная цитофлуориметрия. Оценка МОБ у пациентов с ОЛЛ методом ПЦР основана на определении клональных реаранжировок генов Т-клеточных рецепторов (TCR) и иммуноглобулинов (IG) в опухолевых клетках и подборе пациент-специфичных праймеров к CDR3-области этих генов [8].

Клональные реаранжировки генов IG и TCR находят у 98% пациентов с В-ОЛЛ и у 95% больных с Т-ОЛЛ [9]. Поскольку в опухолевых клетках, полученных от разных больных, обнаруживают различные хромосомные aberrации, только перестроенные гены IG и TCR считаются универсальными маркерами, позволяющими отслеживать опухолевые клоны практически у всех больных в течение болезни/терапии. Само по себе выявление клональности не является критерием для постановки диагноза ОЛЛ. Клональные реаранжировки иногда обнаруживают и при реактивных (неопухолевых) процессах воспалительного, инфекционного или аутоиммунного генеза. Как правило, в этих случаях

клональный продукт определяется на поликлональном фоне. Дифференциальная диагностика опухолевой и неопухолевой лимфопрлиферации представляет определенную сложность при некоторых лимфомах, грибковидном микозе, синдроме Сезари, однако, исследование клональности при ОЛЛ, когда в периферической крови большинство лимфоцитов (> 20%) представлены опухолевыми клетками, таких затруднений не вызывает.

ПЦР-РВ с пациент-специфичными праймерами, подобранными к уникальной по нуклеотидной последовательности V-D-J-области клонально перестроенных генов IG или TCR, позволяет с высокой чувствительностью (10^{-4} – 10^{-5}) оценить остаточное количество опухолевых клеток у пациентов с ОЛЛ [10]. Однако данные, полученные при изучении клональных перестроек в дебюте и рецидиве ОЛЛ у детей, свидетельствуют о том, что реаранжировки генов IG и TCR могут изменяться в течение заболевания, т.е. в рецидиве заболевания часть выявленных клональных реаранжировок исчезает и/или появляются новые реаранжировки. Необходимо отметить, что речь идет именно о частичной смене клональных реаранжировок, так как полная смена генных реаранжировок IG и TCR в рецидиве указывает на возникновение вторичного ОЛЛ [11, 12]. Частичные различия клональных реаранжировок в дебюте и рецидиве наблюдаются у 67–70% детей с В-ОЛЛ и 45–50% детей с Т-ОЛЛ [13–15]. Данные об эволюции опухолевых клонов у взрослых с ОЛЛ весьма ограничены [11]. У Szczepanski и соавт. приведены результаты оценки генов TCR у 9 взрослых с Т-ОЛЛ [11]. Показано, что в целом стабильность генов TCR при взрослом Т-ОЛЛ выше (97%), чем при детском Т-ОЛЛ (86%) [11]. При этом реаранжировки генов IG в дебюте и рецидиве заболевания не изучали.

Смена клональных реаранжировок, т.е. клональная эволюция опухоли, может приводить к потере мишени для исследования МОБ и ложноотрицательным результатам. Таким образом, приемлемость той или иной реаранжировки для изучения МОБ при ОЛЛ определяется не только частотой ее выявления, но и стабильностью. Основные данные изучения стабильности и частоты различных реаранжировок при В-ОЛЛ и Т-ОЛЛ суммированы в табл. 1 [5–11, 15–19].

Перестройки генов δ -цепи TCR (TCRD) – самая ранняя из генных перестроек в Т-лимфоцитах. Клональные перестройки генов TCRD встречаются примерно в 55% случаев Т-ОЛЛ [20], генов γ -цепи TCR (TCRG) – у 95% пациентов [21], генов β -цепи TCR (TCRB) – у 92% пациентов. Стабильность реаранжировок TCRB при рецидивах Т-ОЛЛ у детей была ниже стабильности γ - и δ -цепей – 80 vs 86

Таблица 1. Стабильность и частота выявления клональных реаранжировок при В-ОЛЛ и Т-ОЛЛ [7]

Ген	Реаранжировка	В-ОЛЛ				Т-ОЛЛ	
		Частота, %		Стабильность, %		Частота, %	Стабильность, %
		моно	олиго	моно	олиго		
IGH	VH-JH (полные)	93	30-40	88	47	5	НТ
	DH-JH (неполные)	20	50-60	57	38	23	НТ
	Все IGH	98	40	85	44	23	НТ
IGK	Vκ-Kde	45	5-10	95	40	0	НП
	Интрон RSS-Kde	25	5-10	86	0	0	НП
	Все Kde	50	5-10	95	40	0	НП
TCRB	VB-JB (полные)	21	10-15	89	60	77	79
	DB-JB (неполные)	14	10-15	67	0	55	80
	Все TCRB	33	10-15	81	43	92	80
TCRG	VG-JG	55	15	75		95	86
TCRD	VD-JD или DD-JD1	< 1	НП	НП	НП	50	100
	VD2-DD3 или DD2-DD3	40	20-25	86	26	55	100
	Все TCRD	40	20-25	86	26	55	100

Примечание. НТ – не тестировали, НП – неприменимо.

и 100% соответственно (см. табл. 1) [11]. Несмотря на высокую частоту обнаружения и высокую стабильность, моноклональные перестройки генов γ-цепи являются не самой удачной мишенью для контроля МОБ, поскольку имеют короткий фрагмент нуклеотидной вставки [22]. Согласно опубликованным данным, Т-ОЛЛ чаще, чем В-ОЛЛ, оказывается устойчивым к терапии и положительным по МОБ [23]. Выявлена высокая стабильность реаранжировок генов IGK (95%) при В-ОЛЛ у детей, завершенных V-D-J-реаранжировок генов IGH (88%), TCRB (89%) и TCRD (86%), относительно высокая стабильность реаранжировок генов TCRG (75%) и низкая стабильность неполных (D-J) перестроек генов IGH (57%) и неполных перестроек генов TCRB (67%) (табл. 1). Кроме того, в значительной части случаев детского В-ОЛЛ (26–30%) изначально определяется олигоклональный характер реаранжировок [13–15]. При ОЛЛ возможно присутствие клональных продуктов с незавершенной реаранжировкой генов и производных от них клональных продуктов с завершёнными реаранжировками, что объясняется действием V(D) J-рекомбиназ и «текущим» продолжающимся процессом реаранжировок генов иммуноглобулинов и TCR в ранних клетках-предшественниках [11, 15,

24]. Чаще других олигоклональность (наличие двух и более клонов) выявляют в генах IGH: полные реаранжировки – в 30–40% случаев, неполные – в 50–60%, гены δ-цепи TCR – в 20–25% случаев (табл. 1). Олигоклональные реаранжировки не рекомендовано использовать в качестве мишени для оценки МОБ: они нестабильны и часто дают ложноотрицательные результаты.

Эволюцию опухолевых клеток (смену клональных реаранжировок генов TCR и IGH) в рецидиве заболевания изучали в основном на детском ОЛЛ. Данные для взрослых больных ОЛЛ весьма ограничены. Учитывая то, что ОЛЛ у взрослых и детей имеют разные биологические свойства и прогноз заболевания, цель нашего исследования состояла в изучении характера клональных реаранжировок генов иммуноглобулинов и Т-клеточных рецепторов и их стабильности у взрослых с В-ОЛЛ и Т-ОЛЛ, проходивших лечение в Гематологическом научном центре МЗ РФ.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Пациенты и образцы

В исследование включено 63 больных ОЛЛ: 34 – с В-клеточным вариантом ОЛЛ, в том числе два

Таблица 2. Краткая характеристика пациентов с ОЛЛ

Возраст	19–59 (М 28)
Пол, м/ж	32/31
В-ОЛЛ/Т-ОЛЛ/бифенотипический вариант	34/28/1
Число рецидивов (В-ОЛЛ/Т-ОЛЛ)	6 (4/2)
Время до рецидива, мес.	5.4–11.6 (М 6.2)

Примечание. М – медиана возраста.

с Ph+ ОЛЛ; 28 – с Т-клеточным вариантом ОЛЛ и один с бифенотипическим вариантом ОЛЛ (табл. 2). Всем больным проводили стандартное цитогенетическое исследование, FISH-исследование клеток костного мозга с флуоресцентными зондами t(9;22) и t(4;11) (табл. 3). Нормальный кариотип имели 20 из 63 пациентов, у 17 из 63 не было митозов, у шести выявлены различные изменения хромосомы 9 и/или 22. Транслокация t(9;22) обнаружена методом FISH, а химерный транскрипт BCR/ABL (p190) идентифицирован молекулярно-генетическим методом (Ph+ В-ОЛЛ). У пяти больных методом FISH выявлена транслокация t(4;11), а с помощью ПЦР химерный транскрипт MLL-EP515. У семи больных найдены множественные хромосомные аномалии: у четверых – трисомия 21. Исследовали ДНК, полученную из всех 63 образцов костного мозга в дебюте заболевания. Возраст пациентов 19–59 лет (медиана – 28). У шести из 63 пациентов изучали клональные реаранжировки в дебюте и рецидиве заболевания. Время до рецидива составило от 5.4 до 11.6 месяцев. Больных наблюдали в отделении химиотерапии гемобластозов и депрессий кроветворения Гематологического научного центра (далее ГНЦ). Диагнозы устанавливали в соответствии с классификацией ВОЗ. Согласие на обработку данных получено от всех пациентов, включенных в исследование. Кровь здоровых доноров получена на станции переливания крови ГНЦ.

Анализ клональности по реаранжировкам генов IG/TCR

Лейкоциты и ДНК из периферической крови выделяли как описано ранее [25]. Концентрацию ДНК определяли спектрофотометрически. Образцы ДНК хранили при -20°C. В- и Т-клеточную клональность определяли с использованием мультиплексных систем праймеров BIOMED-2 для фрагментного анализа [26]. В-клеточную клональность оценивали по перестройкам генов тяжелых цепей IGH (VH–JH–

FR1/FR2/FR3/ DH–JH), легкой цепи κ IGK (Vk–Jk/Vk–KDE/IntronRSS–KDE). Т-клеточную клональность оценивали по перестройкам генов Т-клеточных рецепторов TCRG (VG–JG), TCRB (VB–JB/DB–JB), TCRD (VD–JD/DD2–JD/VD–DD3/DD2–DD3). Все локусы генов IG и TCR анализировали при помощи мультиплексных реакций с большим количеством праймеров, разделенных на несколько пробирок в соответствии с рекомендациями протокола BIOMED-2 (см. краткое описание в табл. 4). Для амплификации генов TCRB использовали коммерческий набор TCRB Gene Clonality Assay ABI Fluorescence Detection (Invivoscribe Technologies, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Смесь (25 мкл) для ПЦР генов IGH, IGK и TCRG, TCRD содержала 5 пмоль каждого праймера («Синтол», Россия), 100–200 нг ДНК и 12.5 мкл 2 ×PCRMasterMix (Promega, США). Амплификацию проводили на автоматическом термоциклере DNAEngine (BioRad, США). Условия ПЦР: 95°C (7 мин), затем 35 циклов – 95°C (45 с), 60°C (45 с), 72°C (45 с) и 72°C (10 мин). В качестве положительного (клонального) контроля использовали клеточные линии Jurkat и Daudi, в качестве поликлонального контроля – мононуклеары периферической крови здоровых доноров. Для фрагментного анализа ПЦР-продуктов использовали автоматический анализатор нуклеиновых кислот ABIPRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США). С этой целью 2 мкл разведенного в 20 раз ПЦР-продукта смешивали с 10 мкл Hi-Di формамида (Applied Biosystems, США) и 0.04 мкл GeneScan 500-LIS Size Standard (Applied Biosystems, США). После денатурации при 95°C в течение 3 мин и последующего охлаждения 10 мкл смеси вносили в лунку 96-луночной плашки и проводили капиллярный электрофорез высокого разрешения на полимере POP-4 (Applied Biosystems, США). Флуоресценцию амплификатов и их профиль оценивали при помощи компьютерной программы GeneMapper v.4.0 (Applied Biosystems, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Клональные реаранжировки изучены у 34 пациентов с В-клеточным вариантом ОЛЛ, 28 пациентов с Т-клеточным вариантом, одного с бифенотипическим вариантом заболевания. Частоты клональных реаранжировок генов γ -, β - и δ -цепей TCR и генов тяжелой и легкой цепей IG при В- и Т-вариантах ОЛЛ представлены в табл. 5. У пациента с бифенотипическим вариантом выявлена биаллельная реаранжировка (два пика) генов TCRG и олигоклональная (четыре пика) генов TCRD. У пациентов с В-клеточным вариантом ОЛЛ наиболее часто встречались реаранжировки генов тяжелой

Таблица 3. Результаты стандартного цитогенетического исследования (СЦИ) и FISH-анализа транслокаций t(4;11) и t(9;22) у пациентов с ОЛЛ

Пациент	Вариант ОЛЛ	СЦИ, FISH, ПЦР
1	В-II	Нет митозов
2	В-I	Нормальный кариотип
3	В-I	der(7)add(p22),-8?,der(9),i(q10),der(14),add(q32?),+mar der(9)?(17)cp/46, XX [3]
4	В-I	Добавочный материал на коротком плече хромосомы 10, трисомия хромосом X, 12 и 22, FISH t(4;11), выявлен MLL-EPS15 методом ПЦР
5	В-I	55XX, производное хромосом 3 и 11, делеция короткого плеча хромосомы 12 и длинного плеча хромосомы 13
6	В-I	Нормальный кариотип
7	В-I	Нормальный кариотип
8	В-I	Нет митозов, FISH t(4;11), выявлен MLL-EPS15 методом ПЦР
9	В-II	В 80% ядер выявлен дополнительный сигнал от локуса гена <i>IGH</i> (14q32) (трисомия хромосомы 14? другая транслокация с вовлечением локуса гена <i>IGH</i>)
10	В-II	Нормальный кариотип
11	В-II	Нет митозов
12	В-II	53XY?+X,+4,+6,+14,+21,+21,+mar [10]
13	В-II	Нормальный кариотип
14	В-II	Нет митозов
15	В-II	Нет митозов
16	В-II	В 15% по два дополнительных сигнала от локусов генов <i>ABL</i> (9q34) и <i>BCR</i> (22q11), тетрасомия хромосом 9 и 22?
17	В-II	Трисомия 21
18	В-II	Нормальный кариотип
19	В-II	Трисомия 21
20	В-II	Трисомия 21, моносомия 13
21	В-II	Нормальный кариотип
22	В-II	Нет митозов
23	В-II	Нормальный кариотип
24	В-II	Нормальный кариотип
25	В-II	Нормальный кариотип
26	В-III	Две клетки с del (11), FISH t(4;11), выявлен MLL-EPS15 методом ПЦР
27	В-III	Нормальный кариотип
28	В-III	47XX +5 (5q31)
29	В-III	54X,?+X,Y,+4,+5,+6,?-7,+14,+21,+22,+?mar или r i(7)(q10) или i(8)(q10),+mar [19],46XY
30	В-III	+8+11+21
31	В-Ph+	Нет митозов, FISH t(9;22), выявлен <i>BCR-ABL</i> методом ПЦР
32	В-Ph+	Нормальный кариотип, FISH t(9;22), выявлен <i>BCR-ABL</i> методом ПЦР
33	В-II	Нет митозов
34	В-II	Нет митозов
35	T-I	46XY[2]/90-92,XXYY,=mar [10]
36	T-I	Нет митозов
37	T-I	11q23 перестроен, FISH t(4;11), выявлен MLL-EPS15 методом ПЦР
38	T-I	Нормальный кариотип
39	T-I	del9(p13)
40	T-I	Нет митозов
41	T-I	Нормальный кариотип
42	T-I	15.5% трисомия, в 45% тетрасомия в локусе гена <i>PMLL\11q23</i> , FISH t(4;11), выявлен MLL-EPS15 методом ПЦР
43	T-I	Нормальный кариотип
44	T-II	Нормальный кариотип
45	T-II	Нормальный кариотип
46	T-II	Нормальный кариотип
47	T-II	Нет митозов
48	T-II	Делеция длинного плеча хромосомы 5? или транслокация t(5;?), производные хромосом 2, 4, 5, 7, 22 и 17 (с вовлечением гена <i>p53</i>)
49	T-II	Трисомия хромосомы 8
50	T-II	(47, XY,+8 (20))
51	T-II	Нормальный кариотип
52	T-II	Нет митозов
53	T-III	Нормальный кариотип
54	T-III	47, XY+mar [20]
55	T-III	der (1)add(p36)?dup(p31p36)?{20}; моносомия 9 или делеция локуса 9q34
56	T-III	Нет митозов
57	T-III	Производное хромосомы 11, делеция длинного плеча хромосомы 6
58	T-III	Нет митозов
59	T-III	Нет митозов
60	T-III	Нет митозов
61	T-IV	t(6;17) +20
62	T-I	del 11q23
63	Бифенотипический вариант заболевания	47, XY, der(2)add(p24-25),+5, del(7)(q22),del(13)(q11-q34),+14[6]/46, XY [4]

Примечание: **жирным шрифтом** выделены пациенты, у которых констатирован рецидив заболевания, выявляли реаранжировки генов Т-клеточных рецепторов и иммуноглобулинов в дебюте и рецидиве заболевания.

Таблица 4. Описание мультиплексных реакций и ПЦР-праймеров по протоколу BIOMED-2

Ген	Набор праймеров	Прямые праймеры	Обратные праймеры (меченые)	Длина продуктов, п.н.
IGH	A	VH1-7 (FR1)	JHcons FAM	310–360
	B	VH1-7 (FR2)	JHcons FAM	250–295
	C	VH1-7 (FR3)	JHcons FAM	100–170
	E	DH1-6	JHcons TAMRA	110–290 и 390–420
	D	DH7	JHcons TAMRA	100–130
IGK	A	Vκ1/6-7	Jκ1-4, Jκ5 FAM	120–300
	B	Vκ1/6-7, INTR	KDE-FAM	210–390
TCRD	D1	Dδ2,Vδ1-Vδ6	Jδ1FAM, Jδ2R6G, Jδ3TAMRA, Jδ4ROX	120–280
	D2	Dδ2,Vδ1-Vδ6	Dδ3FAM	130–280
TCRG	GA	Vγ1f, Vγ10	Jγ1/2FAM, Jp1/2 R6G	145–255
	GB	Vγ9, Vγ11	Jγ1/2FAM, Jp1/2 R6G	80–220
TCRB	A	Vβ2-Vβ24	Jβ1.1, Jβ1.6HEX, Jβ2.2, Jβ2.6, Jβ2.7FAM	240–285
	B	Vβ2-Vβ24	Jβ2.1, Jβ2.3, Jβ2.4, Jβ2.5 FAM	240–285
	C	Dβ1, Dβ2	Jβ1.1, Jβ1.6HEX, Jβ2.1, Jβ2.7FAM	170–210 285–325

Таблица 5. Частота (%) выявления клональных реаранжировок генов γ-, β- и δ-цепей TCR и генов тяжелой и легкой цепей IG при В- и Т-вариантах ОЛЛ

Реаранжировки		В-ОЛЛ (n = 34)	Т-ОЛЛ (n = 28)
TCRG	VG–JG	76.5 (n = 26)	89.3 (n = 25)
TCRB	VB–JB (полные)	26.5 (n = 9)	50 (n = 14)
	DB–JB (неполные)	23.5 (n = 8)	46.4 (n = 13)
	Все TCRB	38.2 (n = 13)	60.7 (n = 17)
TCRD	VD–JD/DD2–JD	17.6 (n = 6)	53.6 (n = 15)
	VD–DD3/DD2–DD3	47.1 (n = 16)	32.1 (n = 9)
	Все TCRD	55.9 (n = 19)	64.3 (n = 18)
IGH	VH–JHFR1/FR2/FR3 (полные)	73.5 (n = 25)	7.1 (n = 2)
	DH–JH (неполные)	26.5 (n = 9)	25 (n = 7)
	Все IGH	82.4 (n = 28)	28.6 (n = 8)
IGK	Vκ–Jκ	26.5 (n = 9)	0 (n = 0)
	Vκ–KDE/IntronRSS–KDE	26.5 (n = 9)	3.6 (n = 1)
	Все IGK	38.2 (n = 13)	3.6 (n = 1)

цепи IG (82.4%) и γ-цепи TCR (76.5%), реаранжировки генов β-цепи TCR и генов κ-цепи IG обнаружены в 38.2% случаев, генов δ-цепи TCR – в 55.9%. У 89.3% пациентов с Т-клеточным вариантом ОЛЛ выявлены перестройки генов γ-цепи TCR. Перестройки генов δ-цепи выявлены в 64.3% случаев, генов β-цепи – в 60.7% случаев. Реже остальных при Т-ОЛЛ встречались перестройки IGH – 28.6%. Перестройка генов легкой κ-цепи иммуноглобулина Vκ/KDE найдена в одном случае Т-ОЛЛ. Наши данные по частоте клональных генных реаранжировок IG и TCR несколько отличаются от данных международных исследований, что мы связываем с небольшим размером вы-

борки. Олигоклональные реаранжировки (три и более клональных пика) наблюдались как при В-ОЛЛ (IGH у 12% (4 из 34) пациентов, TCRD у 18% (6 из 34) пациентов), так и при Т-ОЛЛ (TCRD у 32% (9 из 28) пациентов).

У шести пациентов клональные реаранжировки исследовали в дебюте и рецидиве заболевания. Всего в дебюте заболевания выявлено 17 клональных реаранжировок генов TCR и 5 клональных реаранжировок генов IG. В рецидиве заболевания выявлено шесть клональных реаранжировок генов TCR и три клональные реаранжировки генов IG, которые отличались от выявленных в дебюте (табл. 6).

Таблица 6. Клональные продукты, выявленные в дебюте и рецидиве у шести пациентов с диагнозом ОЛЛ

Пациент / диагноз	№ 1 Т-ОЛЛ		№ 2 Т-ОЛЛ		№ 3 В-ОЛЛ		№ 4 В-ОЛЛ		№ 5 В-ОЛЛ		№ 6 В-ОЛЛ	
	Д	Р	Д	Р	Д	Р	Д	Р	Д	Р	Д	Р
TCRG-GA	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+
TCRG-GB	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+
TCRB-A	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
TCRB-B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
TCRB-C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TCRD-D1	+	+	+	+ 1	+	+	+	+	+	+	-	-
TCRD-D2	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-
IGH-A/ IGH-B/ IGH-C	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+ 1	+	+
VK-A	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-
VK-B	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-

Примечание. «+» – моноклональная реаранжировка, «-» – поликлональная реаранжировка, «+1» – изначальная клональная реаранжировка выявляется с дополнительной, отличной от выявленной в дебюте заболевания, Д – дебют заболевания, Р – рецидив заболевания.

У двух пациентов с В-клеточным вариантом заболевания отмечена потеря одной из клональных реаранжировок, выявленных в дебюте, при одновременном появлении новых реаранжировок (пациенты № 5 на рис. 1 и № 6 в табл. 6). У одной пациентки с диагнозом раннего Т-ОЛЛ клональные реаранжировки генов γ -, β - и δ -цепей TCR, выявленные в дебюте заболевания, полностью совпадали с клональными реаранжировками в рецидиве (№ 1). У одного пациента с диагнозом Т-ОЛЛ, при полном сохранении клональных перестроек, выявленных в дебюте, отмечено появление новых реаранжировок (№ 2). У одного пациента в рецидиве заболевания сохранились только две из семи реаранжировок, выявленных в дебюте (рис. 2, № 4). У одного пациента в дебюте В-ОЛЛ выявлена только одна клональная реаранжировка генов δ -цепи TCR, которая сохранилась в рецидиве, но появились несколько новых, в том числе клональные реаранжировки генов IGH и генов легкой κ -цепи IG.

Нами показано, что у всех пациентов в рецидиве ОЛЛ сохранился хотя бы один клональный продукт из выявленных в дебюте (табл. 6). Это подтверждает данные, согласно которым даже при развитии позднего рецидива ОЛЛ у детей (более чем через 5 лет с момента констатации ремиссии) сохраняется хотя бы один исходный клональный продукт [27]. В нашей работе у пяти из шести (83%) пациентов отмечено несоответствие клональных реаранжировок в дебюте и рецидиве заболевания. Даже при столь

небольшой выборке мы наблюдали клональную эволюцию в рецидиве заболевания, что делает актуальным вопрос о первоначальном выборе мишени для количественного определения МОБ. Для минимизации риска ложноположительных результатов принято использовать как минимум две независимые мишени с высокой стабильностью. Однако на практике не ко всем мишеням удается подобрать пациент-специфичный праймер, который обладает нужной специфичностью и чувствительностью. Прежде всего, это касается незавершенных реаранжировок или генных реаранжировок, где отсутствует D-сегмент, например TCRG ($V\gamma$ - $J\gamma$). Нами обнаружена потеря пациент-специфичных мишеней, выявленных у трех пациентов в дебюте заболевания. Для того чтобы зафиксировать минорные субклоны в дебюте заболевания и оценить их поведение на фоне проводимой терапии, мы решили повысить первоначальную чувствительность метода. При помощи праймеров, специфичных к семействам V и J, мы повторно исследовали первоначальный материал на предмет наличия клонов, возникших в рецидиве. Использование таких праймеров увеличивает чувствительность определения опухолевых клеток с 10^{-1} до 10^{-2} – 10^{-3} . Однако даже при такой чувствительности субклоны не были обнаружены в дебюте, что свидетельствует о малом размере субклонов и подтверждает данные других исследований. Так, в 77% (35 из 45) случаев детского В-ОЛЛ клоны с но-

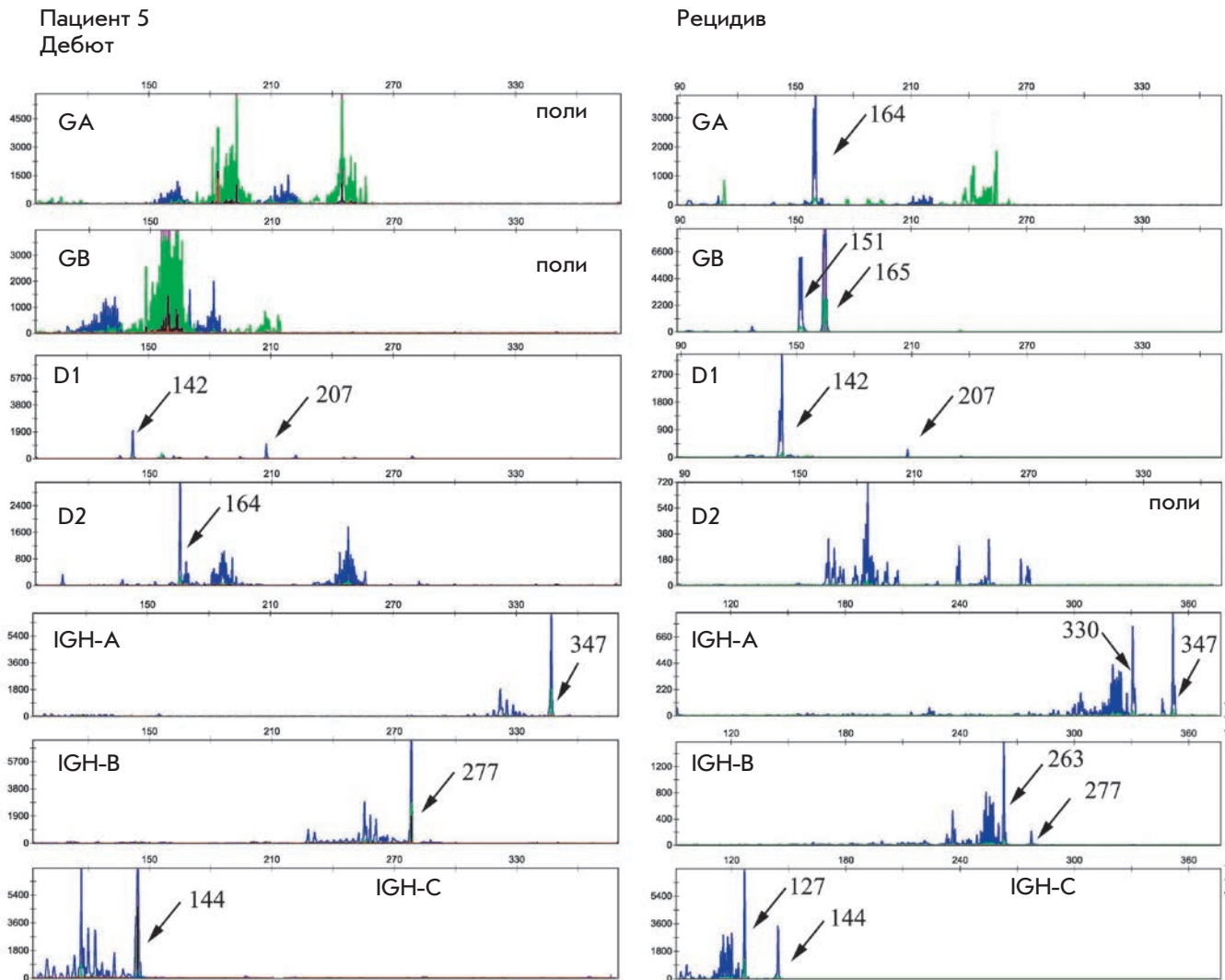


Рис. 1. Данные фрагментного анализа продуктов амплификации генов *TCRG*, *TCRD*, *IGH* пациента № 5 в дебюте и рецидиве заболевания. В дебюте выявлено два клональных продукта длиной 142 и 207 п.н. (указаны стрелками) реаранжировки генов *TCRD*, клональный продукт 347 п.н. реаранжировки генов *IGH*. В рецидиве заболевания у данного пациента сохранились исходные клональные реаранжировки генов *TCRD* и тяжелой цепи *IGH*, при этом появились новые клональные реаранжировки генов γ -цепи TCR (*TCRGA* – 164 п.н., *TCRGB* – 151, 165 п.н.), тяжелой цепи IG (*IGHA* – 330 п.н., *IGHB* – 263 п.н., *IGHC* – 127 п.н.)

выми реаранжировками в рецидиве присутствовали лишь в минимальных количествах при дебюте заболевания [28]. Размер таких резистентных субклонов варьировал от 10^{-2} до 10^{-5} клеток, и чем меньше было количество клеток, тем больше времени проходило до рецидива [29].

В последние годы показано, что острые лимфобластные лейкозы имеют сложный и генетически неоднородный состав опухолевых клеток в пределах одного заболевания [30, 31]. В большинстве случаев ОЛЛ клональная эволюция обусловлена реактива-

цией одного из минорных субклонов, резистентного к проводимой терапии [14, 29, 32]. Клональное разнообразие является механизмом опухолевой прогрессии. Часть клональных клеток, вероятно, имеет отличные от остальных клеток свойства (генетические мутации, скорость деления, иммунологическую зрелость), что придает им устойчивость к воздействию химиотерапии. Причины поздней реактивации первоначального опухолевого клона до сих пор неизвестны. Возможно, происходит ослабление иммунологического надзора и механизмов противоопухоле-

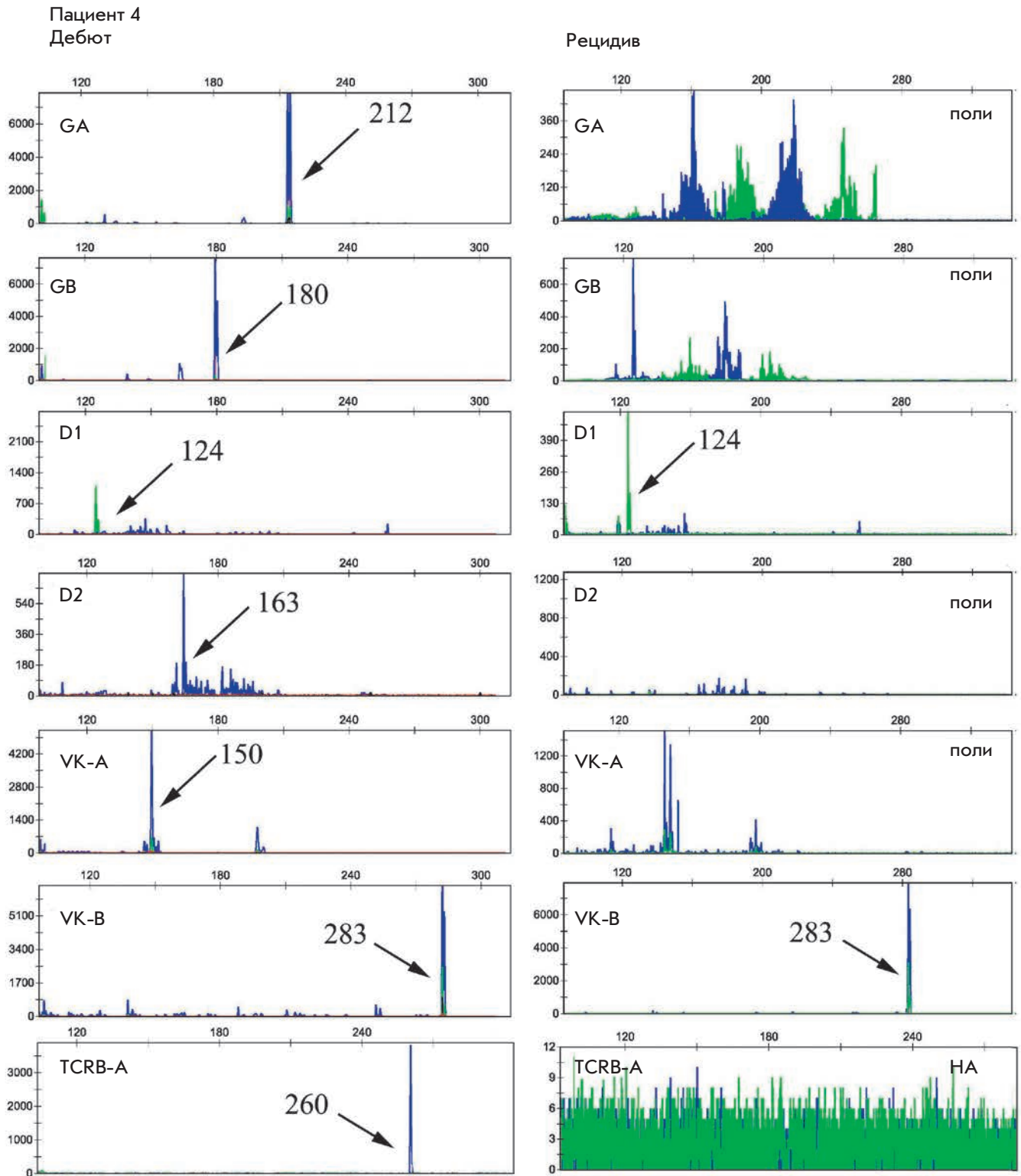


Рис. 2. Данные фрагментного анализа продуктов амплификации генов *TCRG*, *TCRD*, *IGK*, *TCRB* пациента № 4 в дебюте и рецидиве заболевания. В дебюте выявлено семь клональных продуктов (указаны стрелками). В рецидиве у данного пациента сохранились только два клональных продукта из семи исходных – реаранжировка генов *TCRD* (в реакции D1 – 124 п.н.) и легкой κ -цепи *IG* (в реакции VK-B – 283 п.н.)

вого иммунитета или появление новых генетических мутаций в опухолевых клетках с их последующей реактивацией. Применение количественных методов оценки МОБ является независимым фактором прогноза и критерием разделения пациентов на группы риска развития рецидива. В течение заболевания спектр клональных реаранжировок может изменяться. Такой процесс может происходить в течение раннего индукционного курса терапии, что дает ложноотрицательные результаты определения МОБ и препятствует стратификации больных на группы риска. Успешный контроль минимальной остаточной болезни можно обеспечить только при подборе пациент-специфичных праймеров для каждой клональной мишени, выявленной в дебюте заболевания.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

У пяти из шести (83%) пациентов отмечено несоответствие клональных реаранжировок в дебюте и рецидиве заболевания, что говорит о клональной нестабильности на фоне проводимой полихимиотерапии. Опухолевые клетки при ОЛЛ изначально имеют сложный генетически неоднородный состав,

и в то время как одни клоны исчезают под воздействием полихимиотерапии, другие, не распознанные из-за недостаточной чувствительности метода, приобретают способность к пролиферации. Клональная эволюция служит одним из механизмов опухолевой прогрессии и является серьезной помехой для количественной оценки МОБ методом ПЦР. Нами показано, что отсутствие амплификации с пациент-специфичными праймерами, подобранными к мишеням, секвенированным в дебюте заболевания, не может полностью гарантировать отсутствие остаточного заболевания, так как мы показываем, что в ряде случаев при остром лейкозе опухолевые клоны нестабильны. Таким образом, в сомнительных случаях при подозрении на рецидив и отсутствии амплификации с пациент-специфичными праймерами необходимо повторное исследование клональности. Изучение механизмов клональной эволюции, способности полихимиотерапии влиять на процессы клональной эволюции, возможно, будет способствовать разработке новых прогностических факторов и терапевтических подходов. ●

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Felix C. Acute lymphoblastic leukemia in infants. Washington: Education Program Book of hematology, American society of hematology, 2015. P. 285–302.
2. Паровичникова Е.Н., Троицкая В.В., Соколов А.Н., Ахмерзаева З.Х., Кузьмина Л.А., Менделеева Л.П., Клясова Г.А., Кравченко С.К., Грибанова Е.О., Бондаренко С.Н. и др. // Онкогематология. 2014. № 3. С. 6–15.
3. Campana D., Pui C. // Blood. 1995. V. 85. № 6. P. 1416–1434.
4. Copelan E., McGuire E. // Blood. 1995. V. 85. № 5. P. 1151–1168.
5. Flohr T., Schrauder A., Cazzaniga G., Panzer-Grümayer R., van der Velden V., Fischer S., Stanulla M., Basso G., Niggli F.K., Schäfer B.W. // Leukemia. 2008. V. 22. № 4. P. 771–782.
6. Brüggemann M., Raff T., Flohr T., Gökbuget N., Nakao M., Droese J., Lüschen S., Pott C., Ritgen M., Scheuring U., et al. // Blood. 2006. V. 107. № 3. P. 1116–1123.
7. van Dongen J.J., van der Velden V.H., Brüggemann M., Orfao A. // Blood. 2015. V. 125. № 26. P. 3996–4009.
8. van der Velden V.H., Hochhaus A., Cazzaniga G., Szczepanski T., Gabert J., van Dongen J.J. // Leukemia. 2003. V. 17. P. 1013–1034.
9. van Dongen J.J., Langerak A.W., Brüggemann M., Evans P.A.S., Hummel M., Lavender F.L., Delabesse E., Davi F., Schuurin E., García-Sanz R. // Leukemia. 2003. V. 17. № 12. P. 2257–2317.
10. Pongerse-Willems M.J., Seriu T., Stolz F., d'Aniello E., Gameiro P., Pisa P., Gonzalez M., Bartram C.R., Panzer-Grümayer E.R., Biondi A. // Leukemia. 1999. V. 13. P. 110–118.
11. Szczepanski T., van der Velden V.H., Raff T., Jacobs D.C., van Wering E.R., Brüggemann M., Kneba M., van Dongen J.J. // Leukemia. 2003. V. 17. № 11. P. 2149–2156.
12. Szczepanski T., van der Velden V.H., Waanders E., Kuiper R.P., van Vlierberghe P., Gruhn B., Eckert C., Panzer-Grümayer R., Basso G., Cavé H., et al. // ClinOncol. 2011. V. 29. № 12. P. 1643–1649.
13. Beishuizen A., Verhoeven M.A., van Wering E.R., Hahlen K., Hooijkaas H., van Dongen J.J. // Blood. 1994. V. 83. № 8. P. 2238–2247.
14. Li A., Zhou J., Zuckerman D., Rue M., Dalton V., Lyons C., Silverman L.B., Sallan S.E., Gribben J.G. // Blood. 2003. V. 102. № 13. P. 4520–4526.
15. Szczepanski T., Willems M.J., Brinkhof B., van Wering E.R., van der Burg M., van Dongen J.J. // Blood. 2002. V. 99. № 7. P. 2315–2323.
16. van der Velden V.H., Szczepanski T., Wijkhuijs J.M., Wijkhuijs J.M., Hart P.G., Hoogeveen P.G., Hop W.C.J., van Wering E.R., van Dongen J.J.M. // Leukemia. 2003. V. 17. № 9. P. 1834–1844.
17. Beishuizen A., Hahlen K., Hagemeyer A., Verhoeven M.A., Hooijkaas H., Adriaansen H.J., Wolvers-Tettero I.L., van Wering E.R., van Dongen J.J. // Leukemia. 1991. V. 5. № 8. P. 657–667.
18. Beishuizen A., de Bruijn M.A., Pongers-Willems M.J., Verhoeven M.-A.J., van Wering E.R., Hählen K., Breit T.M., de Bruin-Versteeg S., Hooijkaas H., van Dongen J.J.M. // Leukemia. 1997. V. 11. № 12. P. 2200–2207.
19. Brüggemann M., van der Velden V.H., Raff T., Droese J., Ritgen M., Pott C., Wijkhuijs A.J., Gökbuget N., Hoelzer D., van Wering E.R. // Leukemia. 2004. V. 18. № 4. P. 709–719.
20. Breit T.M., Wolvers-Tettero I.L., Beishuizen A., Verhoeven M.A., van Wering E.R., van Dongen J.J. // Blood. 1993. V. 82. № 10. P. 3063–3074.
21. Szczepanski T., Langerak A.W., Willems M.J., Wolvers-Tettero I.L., van Wering E.R., van Dongen J.J. // Leukemia. 2000. V. 14. № 7. P. 1208–1214.
22. van der Velden V.H., Wijkhuijs J.M., Jacobs D.C., van Wering E.R., van Dongen J.J. // Leukemia. 2002. V. 16. № 7. P. 1372–1380.
23. Willems M.J., Seriu T., Hettinger K., d'Aniello E., Hop W.C., Panzer-Grümayer E.R., Biondi A., Schrappe M., Kamps W.A., Masera G., et al. // Blood. 2002. V. 99. № 12. P. 4386–4393.
24. Germano G., del Giudice L., Palatron S., Giarin E., Cazzaniga

- G., Biondi A., Basso G. // *Leukemia*. 2003. V. 17. № 8. P. 1573–1582.
25. Сидорова Ю.В., Сорокина Т.В., Бидерман Б.В., Никулина Е.Е., Кисиличина Д.Г., Наумова Е.В., Почтарь М.Е., Луговская С.А., Иванова В.Л., Ковалева Л.Г. и др. // *Клиническая лабораторная диагностика*. 2011. № 12. С. 22–35.
26. Dongen J.J., Langerak A.W., Bruggemann M., Evans P.A., Hummel M., Lavender F.L., Delabesse E., Davi F., Schuur- ing E., Garcia-Sanz R., et al. // *Leukemia*. 2003. V. 17. № 12. P. 2257–2317.
27. Lo Nigro L., Cazzaniga G., Di Cataldo A., Pannunzio A., D’Aniello E., Masera G., Schiliró G., Biondi A. // *Leukemia*. 1999. V. 13. P. 190–195.
28. Eckert C., Flohr T., Koehler R., Hagedorn N., Moericke A., Stanulla M., Kirschner-Schwabe R., Cario G., Stackelberg A., Bartram C.R., et al. // *Leukemia*. 2011. V. 25. № 8. P. 1305–1313.
29. Choi S., Henderson M.J., Kwan E., Beesley A.H., Sutton R., Bahar A.Y., Giles J., Venn N.C., Pozza L.D., Baker D.L., et al. // *Blood*. 2007. V. 110. № 2. P. 632–639.
30. Mullighan C.G., Zhang J., Kasper L.H., Lerach S., Payne-Turner D., Phillips L.A., Heatley S.L., Holmfeldt L., Collins-Underwood J.R., Ma J., et al. // *Nature*. 2011. V. 471. № 7337. P. 235–239.
31. Gawad C., Pepin F., Carlton V.E., Klinger M., Logan A.C., Miklos D.B., Faham M., Dahl G., Lacayo N. // *Blood*. 2012. V. 120. № 22. P. 4407–4417.
32. de Haas V., Verhagen O.J., von dem Borne A.E., Kroes W., van den Berg H., van der Schoot C.E. // *Leukemia*. 2001. V. 15. № 1. P. 134–140.