



<https://doi.org/10.34883/PI.2023.9.1.002>

Лебедева С.А.✉, Борковская А.Н., Дадаханова Э.Р., Вьюшков В.С., Солдаткина О.И., Тимофеева Н.М., Калинина И.И., Масчан А.А., Новичкова Г.А., Ольшанская Ю.В., Зеркаленкова Е.А.

Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева, Москва, Россия

Мониторинг минимальной остаточной болезни при остром миелоидном лейкозе с перестройками гена KMT2A: сравнение методов мультиплексной и моноплексной ОТ-ПЦР в режиме реального времени

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: концепция и дизайн исследования – Лебедева С.А., Ольшанская Ю.В., Калинина И.И., Масчан А.А., Новичкова Г.А., Зеркаленкова Е.А.; поиск и обработка данных – Лебедева С.А., Борковская А.Н., Дадаханова Э.Р., Солдаткина О.И., Тимофеева Н.М., Калинина И.И., Зеркаленкова Е.А.; статистический анализ и интерпретация данных – Лебедева С.А., Зеркаленкова Е.А.; редактирование, подготовка рукописи – Лебедева С.А., Зеркаленкова Е.А.

Подана: 13.12.2022

Принята: 17.01.2023

Контакты: svetlana.lebedeva@fccho-moscow.ru

Резюме

Острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) занимает 15–20% в структуре детских острых лейкозов. Несмотря на успехи, достигнутые за последние годы, терапия ОМЛ остается трудной задачей. Важную роль в определении оптимальной тактики терапии играет определение уровня минимальной остаточной болезни (МОБ). Для ОМЛ с перестройками гена KMT2A одним из наиболее чувствительных методов детекции МОБ является количественная ПЦР. Перестройки гена KMT2A представляют собой крайне гетерогенную группу, в связи с чем для их первичной детекции применяют различные молекулярно-биологические методы, включая длинную инвертированную ПЦР, мультиплексную ПЦР и таргетное высокопроизводительное секвенирование, что позволяет не только подтвердить наличие перестройки гена KMT2A, но и уточнить характер этой перестройки. В дальнейшем для мониторинга МОБ может применяться как мультиплексная, так и моноплексная количественная ПЦР. Целью работы являлось сравнение методов мультиплексной и моноплексной ОТ-ПЦР в режиме реального времени в контексте мониторинга МОБ у пациентов с KMT2A-позитивными ОМЛ. В исследование было включено 20 пациентов с KMT2A-позитивным ОМЛ, проходивших диагностику в лаборатории цитогенетики и молекулярной генетики НМИЦ ДГОИ имени Дмитрия Рогачева. Определение экспрессии химерного транскрипта выполнено суммарно в 37 точках, из них 14 – исследование на инициальном материале, 23 – исследование на материале в контрольных точках, предусмотренных протоколом лечения. В 33 случаях химерный транскрипт детектировался обоими методами, в 4 случаях – только при использовании моноплексной ОТ-ПЦР в режиме реального времени. При использовании моноплексной ОТ-ПЦР отношение копийности химерного транскрипта к копийности контрольного гена было достоверно выше, нежели при использовании мультиплексной ОТ-ПЦР ($n=33$, $p<0,001$). Проведенное

сравнение демонстрирует, что моноплексная ОТ-ПЦР в режиме реального времени является не только более специфичным, но и более чувствительным методом детекции МОБ.

Ключевые слова: ген KMT2A, мониторинг МОБ, острый миелоидный лейкоз, ОТ-ПЦР в режиме реального времени

Lebedeva S., Borkovskaya A., Dadahanova E., Vyushkov V., Soldatkina O., Timofeeva N., Kalinina I., Maschan A., Novichkova G., Olshanskaya Yu., Zerkalenkova E.
Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Moscow, Russia

MRD Monitoring in AML with KMT2A Gene Rearrangements: Comparison of Multiplex and Monoplex Real-Time RT-PCR Methods

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: the concept and design of the study – Lebedeva S., Olshanskaya Yu., Kalinina I., Maschan A., Novichkova G., Zerkalenkova E.; data search and processing – Lebedeva S., Borkovskaya A., Dadahanova E., Soldatkina O., Timofeeva N., Kalinina I., Zerkalenkova E.; statistical analysis and interpretation of data – Lebedeva S., Zerkalenkova E.; editing, preparation of the manuscript – Lebedeva S., Zerkalenkova E.

Submitted: 13.12.2022

Accepted: 17.01.2023

Contacts: svetlana.lebedeva@fccho-moscow.ru

Abstract

Acute myeloid leukemia (AML) occupies 15–20% in the structure of childhood acute leukemia. Despite the advances made in recent years, the treatment of AML remains a challenge. The level of minimal residual disease (MRD) plays an important role in determining of the optimal therapy tactics. For AML with KMT2A gene rearrangements, quantitative PCR is one of the most sensitive methods for MRD detection. KMT2A rearrangements are extremely heterogeneous, and therefore, for their primary detection, various molecular methods are used, including long-distance inverse PCR, multiplex PCR, and targeted high-throughput sequencing, which enables not only to confirm KMT2A rearrangement presence, but also to clarify its structure. Subsequently, both multiplex and monoplex quantitative PCR can be used for MRD monitoring. The purpose of the work was to compare methods of multiplex and monoplex real-time RT-PCR in the context of MRD monitoring in patients with KMT2A-positive AML. The study included 20 patients with KMT2A-positive AML who underwent diagnostics in the laboratory of cytogenetics and molecular genetics in Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology. The chimeric transcript expression analysis was performed at 37 points, including 14 initial and 23 MRD samples as determined by the treatment protocol. In 33 cases, the chimeric transcript was detected by both methods, and in 4 cases, only by real-time monoplex RT-PCR. When using monoplex RT-PCR, the copy ratio of the chimeric transcript to the copy number of the control gene was significantly higher than when using multiplex RT-PCR ($n=33$, $p<0.001$). This comparison demonstrates



that real-time monoplex RT-PCR is not only more specific, but also more sensitive for PCR-based MRD detection.

Keywords: KMT2A gene, MRD monitoring, acute myeloid leukemia, real-time RT-PCR

■ ВВЕДЕНИЕ

Острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) – это злокачественное заболевание кроветворной системы, характеризующееся опухолевой трансформацией клеток-предшественников миелоидной линии гемопоэза. Несмотря на успехи, достигнутые за последние годы, терапия ОМЛ остается трудной задачей. Важную роль в определении оптимальной тактики терапии на сегодняшний день играет выявление ряда цитогенетических и молекулярно-генетических маркеров, позволяющих отнести пациента в ту или иную прогностическую группу. Например, известно, что мутации в гене NPM1 являются благоприятным прогностическим фактором в отношении общей и безобъёмной выживаемости [3], тогда как перестройки гена NUP98 ассоциированы с крайне неблагоприятным прогнозом [4]. Отдельного внимания заслуживают случаи ОМЛ с перестройками гена KMT2A (lysine methyltransferase 2A, ранее MLL – mixed lineage leukemia). Перестройки гена KMT2A представляют собой крайне гетерогенную молекулярно-генетическую группу и в целом характеризуются неблагоприятным прогнозом, за исключением транслокации t(9;11)(p21.3;q23.3)/KMT2A::MLLT3, которая относится к группе промежуточного риска [5].

Помимо инициальной цитогенетической и молекулярно-генетической характеристики, важным параметром, определяющим прогноз заболевания, является уровень минимальной остаточной болезни (МОБ) [6]. Уровень МОБ используется в качестве прогностического показателя как отечественными (ОМЛ-MRD-2018), так и зарубежными (AIEOP, NOPHO) группами по лечению ОМЛ у детей. Определение уровня МОБ позволяет своевременно провести рестратификацию пациентов по группам риска после проведения индукционного курса полихимиотерапии (ПХТ) и выбрать оптимальную тактику дальнейшей терапии. В настоящее время существует два основных подхода к высокочувствительному мониторингу МОБ – иммунофенотипический и молекулярный. Многоцветная проточная цитометрия является наиболее активно применяемым методом детекции МОБ в силу своей универсальности и применимости у большинства пациентов [7, 8]. Однако для некоторых генетических подгрупп ОМЛ наиболее чувствительным методом детекции МОБ являются различные варианты количественной ПЦР в режиме реального времени [9]. Например, разработаны и валидированы большими международными группами системы детекции МОБ на основе ПЦР для таких распространенных подтипов ОМЛ, как ОМЛ с t(8;21)(q22;q22.1)/RUNX1::RUNX1T1 и inv(16)(p13.1q22)/CBFB::MYH11 [10–12], а также с мутациями NPM1 [13]. Для острого промиелоцитарного лейкоза ПЦР на химерный транскрипт PML::RARA является «золотым стандартом» мониторинга МОБ [14]. Перестройки гена KMT2A также представляют собой привлекательную мишень для мониторинга МОБ на основе ПЦР, особенно в случаях зрелого моноцитарного фенотипа ОМЛ [15]. Однако стандартной системы для детекции перестроек гена KMT2A методом ПЦР на сегодняшний день не существует, поскольку они относительно редко

встречаются у пациентов взрослого возраста и характеризуются выраженной молекулярно-генетической гетерогенностью. Среди пациентов детского возраста перестройки гена KMT2A встречаются значительно чаще, что позволило нам провести сравнение различных методов детекции перестроек гена KMT2A у данной когорты пациентов [16–18].

Метод количественной либо качественной мультиплексной ПЦР является сравнительно быстрым и удобным для детекции перестроек гена KMT2A в дебюте заболевания, когда содержание опухолевых клеток в биологическом материале достаточно высоко [19]. Однако при эффективности проводимой ПХТ в дальнейшем содержание опухолевых клеток в костном мозге пациента резко снижается, что требует применения высокочувствительных методов для дальнейшей детекции МОБ. Одним из способов повышения чувствительности количественной ПЦР в режиме реального времени является использование одной пары праймеров, специфической именно для данного варианта перестройки гена KMT2A.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Сравнить результаты двух методов детекции МОБ при KMT2A-позитивных ОМЛ у детей – мультиплексной и моноплексной количественной ПЦР в режиме реального времени с обратной транскрипцией.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Пациенты. В исследование было включено 20 пациентов с KMT2A-позитивным ОМЛ, проходивших диагностику в лаборатории цитогенетики и молекулярной генетики НМИЦ ДГОИ имени Дмитрия Рогачева в период с 2019 по 2021 г. Определение экспрессии химерного транскрипта выполнено суммарно в 37 точках, из них 14 – исследование на инициальном материале (в дебюте заболевания), 23 – исследование на материале в контрольных точках, предусмотренных протоколом лечения.

Определение и характеристика перестройки в гене KMT2A. Всем пациентам было выполнено стандартное кариотипирование методом G-banding с описанием согласно международной системе цитогенетической номенклатуры хромосом [20], перестройки гена KMT2A подтверждали методом флуоресцентной гибридизации in situ (FISH) с пробой на разрыв хромосомного региона 11q23 Kreatech KMT2A breakapart (Leica, Нидерланды) либо транслокационными пробами Kreatech KMT2A::AFF1, KMT2A::AFDN, KMT2A::MLLT3, KMT2A::MLLT1 (Leica, Нидерланды). Природу гена-партнера определяли методами FISH или мультиплексной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) с прямыми праймерами и пробами к гену KMT2A [21] и праймерам на 8 основных генов-партнеров (AFF1, MLLT3, MLLT1, MLLT10, MLLT4, ELL, EPS15, MLLT6) [22–26]. Природу KMT2A-химерного транскрипта определяли методом секвенирования по Сэнгеру. Точную локализацию точки разрыва гена KMT2A и гена-партнера в химерных транскриптах определяли с помощью программы парного выравнивания Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

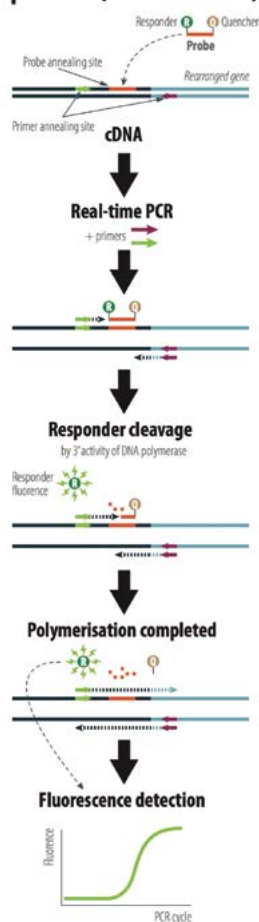
Определение уровня экспрессии химерного транскрипта. Оценку уровня экспрессии химерного транскрипта выполняли как на инициальном материале, так и на материале в контрольных точках с положительным МОБ-статусом. Во всех точках пациентам была выполнена оценка уровня экспрессии химерного транскрипта двумя



методами – мультиплексной и моноплексной количественной ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) в режиме реального времени. Для проведения ОТ-ПЦР из клеток костного мозга выделяли РНК набором InnuPrep DNA/RNA Mini Kit (Analytik Jena AG, Jena, Germany). Общий принцип количественной ОТ-ПЦР в режиме реального времени представлен на рисунке [19].

Для мультиплексной ОТ-ПЦР в режиме реального времени использовали комбинации прямых и обратных праймеров, специфических для конкретного гена-партнера (MLLT3-mix, MLLT10-mix и т. д.). Для моноплексной ОТ-ПЦР в режиме реального времени использовали одну пару праймеров, специфическую для данного типа перестройки (с учетом природы гена-партнера и локализации точки разрыва в обоих генах), подобранную по результатам предшествующего секвенирования химерного

qPCR («rt-PCR»)



ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) в режиме реального времени для детекции экспрессии химерных транскриптов [19]

Real-time PCR with reverse transcription for fusion transcripts detection [19]

транскрипта по Сэнгеру. Дизайн праймеров, использованных для моноплексной ОТ-ПЦР в режиме реального времени, приведен в таблице. Количественно уровень экспрессии химерного транскрипта выражали в соотношении (Ratio) количества копий химерного транскрипта и количества копий контрольного гена. В качестве контрольного гена использовали ABL [27]. Для инициального материала исследование проводили в двух повторах, для материала в контрольных точках исследование проводили в трех повторах. Результат ОТ-ПЦР считали положительным при наличии сигнала во всех повторах либо в двух из трех повторов. Для контроля качества аналитического этапа параллельно проводили оценку уровня экспрессии таргетного химерного транскрипта в контрольных позитивном и негативном образцах.

Статистический анализ. Статистическую обработку и анализ полученных данных осуществляли с помощью пакета программ IBM SPSS Statistics, версия 23. Для сравнения определения уровня экспрессии химерного транскрипта двумя различными методами применяли непараметрический критерий знаковых рангов Уилкоксона для связанных выборок. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ

Нами была проведена оценка уровня экспрессии KMT2A-химерных транскриптов в анализируемых точках ($n=37$) с использованием методов мультиплексной и моноплексной ОТ-ПЦР в режиме реального времени (см. таблицу). В 33 случаях химерный транскрипт выявлялся обоими методами, в 4 случаях – только при использовании моноплексной ОТ-ПЦР в режиме реального времени. В 9 случаях из 33 химерный транскрипт детектировался мультиплексной ОТ-ПЦР, однако копияность оказывалась слишком низкой для количественного выражения (Ratio=0). В 33 случаях отношение копияности химерного транскрипта к копияности контрольного гена было выше при использовании метода моноплексной ОТ-ПЦР в режиме реального времени. В целом при использовании моноплексной ОТ-ПЦР отношение копияности химерного транскрипта к копияности контрольного гена было достоверно выше, нежели при использовании мультиплексной ОТ-ПЦР (непараметрический критерий знаковых рангов Уилкоксона, $p < 0,001$).

■ ОБСУЖДЕНИЕ

Уровень МОБ – это важный признак, позволяющий спрогнозировать течение ОЛ и оптимизировать проводимую терапию [6]. На сегодняшний день наиболее активно применяемым методом детекции МОБ при ОМЛ является многоцветная проточная цитометрия. Тем не менее для ряда молекулярных подтипов ОМЛ в силу гетерогенности и разнообразия иммунофенотипов миелоидных опухолевых клеток, а также нередкого изменения профиля экспрессии антигенов в процессе терапии более высокочувствительным и специфичным методом детекции МОБ является применение количественной ПЦР в режиме реального времени [28, 29]. Одной из таких групп являются KMT2A-позитивные ОМЛ. Перестройки гена KMT2A являются удобной мишенью для мониторинга МОБ, поскольку являются ведущим событием в онкогенной трансформации и не теряются в клональной эволюции опухоли [30].



Результаты определения экспрессии химерного транскрипта методами мультиплексной и моноплексной ОТ-ПЦР
Fusion transcripts detection by multiplex and monoplex PCR

Перестройка	№	Точка	Мультипл. ОТ-ПЦР	Монопл. ОТ-ПЦР	Отношение моноплекс/ мультиплекс	Последовательность праймеров
KMT2A::MLLT3	1	МОБ	+	+	0,9	5'-CGCCTCAGCCACCTACTACAG-3' 5'-TGGCAGGACTGGGTTGTTTC-3'
KMT2A::MLLT3	2	МОБ	+	+	-	5'-CGCCTCAGCCACCTACTACAG-3' 5'-TGGCAGGACTGGGTTGTTTC-3'
KMT2A::MLLT3	3	МОБ	+	+	-	5'-CGCCTCAGCCACCTACTACAG-3' 5'-TGGCAGGACTGGGTTGTTTC-3'
KMT2A::MLLT3	4	МОБ иниц.	+	+	9,3 36,0	5'-CGCCTCAGCCACCTACTACAG-3' 5'-TGGCAGGACTGGGTTGTTTC-3'
KMT2A::MLLT3	5	МОБ иниц.	+	+	- 0,1	5'-CGCCTCAGCCACCTACTACAG-3' 5'-TGGCAGGACTGGGTTGTTTC-3'
KMT2A::MLLT10	6	МОБ	+	+	1,9	5'-CGCCTCAGCCACCTACTACAG-3' 5'-AACAGCTATGACCATGTGCTGATGACTGTTGGGAGTGAGAGT-3'
KMT2A::MLLT3	7	МОБ иниц.	+	+	8,8 - 6,8	5'-CGCCTCAGCCACCTACTACAG-3' 5'-TGGCAGGACTGGGTTGTTTC-3'
KMT2A::MLLT10	8	МОБ	+	+	13,6	5'-CGCCTCAGCCACCTACTACAG-3' 5'-GTGAGAGGAGAATCACTTAACTTTG-3'
KMT2A::MLLT10	9	МОБ	-	+	-	5'-CGCCTCAGCCACCTACTACAG-3' 5'-CACTGAACCTCCAGAAGATGACT-3'
KMT2A::MLLT10	10	иниц.	+	+	0,5	5'-CGCCTCAGCCACCTACTACAG-3' 5'-AACAGCTATGACCATGACCAATGCAGGTGATGTTCTGGCT-3'
KMT2A::AFDN	11	МОБ иниц.	+	+	2,2 2,0	5'-CGCCTCAGCCACCTACTACAG-3' 5'-TCTCCGCTGACATGCACCTTCATAG-3'

Окончание таблицы

Перестройка	№	Точка	Мультипл. ОТ-ПЦР	Монопл. ОТ-ПЦР	Отношение моноплекс/ мультиплекс	Последовательность праймеров
KMT2A::MLLT3	12	МОБ	+	+	–	5'-CGCCTCAGCCACCTACTACAG-3' 5'-TGGCAGGACTGGGTTGTTC-3'
		МОБ	+	+	54,7	
		иниц.	+	+	160,6	
KMT2A::MLLT10	13	МОБ	+	+	12,7	5'-CGCCTCAGCCACCTACTACAG-3' 5'-CACTGAAC TTCCAGAA GATGACT-3'
		МОБ	+	+	–	
		иниц.	+	+	95,8	
KMT2A::MLLT10	14	МОБ	–	+	–	5'-CGCCTCAGCCACCTACTACAG-3' Reverse 5'-CACTGAAC TTCCAGAA GATGACT-3'
		МОБ	+	+	3,2	
		иниц.	+	+	1,8	
KMT2A::AFDN	15	иниц.	+	+	9,9	5'-CGCCTCAGCCACCTACTACAG-3' 5'-TCTCCGCTGACATGCACTTCATAG-3'
		МОБ	–	+	–	
		МОБ	–	+	–	
KMT2A::AFDN	16	иниц.	+	+	2,9	5'-CGCCTCAGCCACCTACTACAG-3' 5'-TCTCCGCTGACATGCACTTCATAG-3'
		МОБ	+	+	0,3	
		иниц.	+	+	1,6	
KMT2A::AFDN	17	МОБ	+	+	2,1	5'-CGCCTCAGCCACCTACTACAG-3' 5'-TCTCCGCTGACATGCACTTCATAG-3'
		МОБ	+	+	46,8	
		иниц.	+	+	–	
KMT2A::MLLT3	18	МОБ	+	+	18,6	5'-CGCCTCAGCCACCTACTACAG-3' 5'-TGGCAGGACTGGGTTGTTC-3'
		МОБ	+	+	–	
		иниц.	+	+	–	
KMT2A::MLLT3	19	иниц.	+	+	–	5'-CGCCTCAGCCACCTACTACAG-3' 5'-TGGCAGGACTGGGTTGTTC-3'
		МОБ	+	+	–	
		иниц.	+	+	–	
KMT2A::MLLT3	20	иниц.	+	+	–	5'-CGCCTCAGCCACCTACTACAG-3' 5'-TGGCAGGACTGGGTTGTTC-3'



Ген KMT2A расположен на длинном плече хромосомы 11 в регионе 11q23.3 и кодирует белок лизинметилтрансферазу 2A, принадлежащий к белковому семейству лизинметилтрансфераз 2 (KMT2). Кодированный им белок входит в состав крупного хроматин-модулирующего белкового комплекса, осуществляющего эпигенетический контроль экспрессии генов [31]. Перестройки KMT2A крайне гетерогенны: для данного гена описано более 120 хромосомных aberrаций и охарактеризовано более 90 различных генов-партнеров. При этом, по данным европейских и американских регистров, существует 6 наиболее частых генов-партнеров (AFF1 (35,8%), MLLT3 (19,1%), MLLT1, MLLT10, ELL, AFDN), на чью долю суммарно приходится более 80% известных перестроек гена KMT2A [2]. Кроме того, для гена KMT2A также характерна вариабельность локализации точки разрыва. Чаще всего разрыв происходит в небольшом регионе протяженностью около 10 тысяч пар нуклеотидов (с 8-го по 14-й экзон), так называемом главном кластере точек разрыва (major breakpoint cluster region) [2, 32]. Существует также минорный кластер точек разрыва, захватывающий интервал с интрона 19 по экзон 24 гена KMT2A [33], и описан ряд случаев с разрывом KMT2A вне обоих кластеров.

Учитывая все вышеперечисленное, для детекции перестроек данного гена зачастую применяют мультиплексную ПЦР. При применении мультиплексной ПЦР состав набора праймеров может быть различным. Если природа гена-партнера известна (например, по результатам стандартного кариотипирования или FISH), возможно использование небольшого набора из нескольких прямых и обратных праймеров, специфичных для конкретного гена-партнера, но не локализации точки разрыва. Если природа гена-партнера не известна, используются расширенные мультиплексные системы, в состав которых входят несколько прямых праймеров и большое количество обратных праймеров, комплементарных наиболее частым генам-партнерам. Метод мультиплексной ПЦР является сравнительно быстрым и крайне удобным в дебюте заболевания, когда содержание опухолевых клеток в биологическом материале достаточно высоко. С его помощью можно не только подтвердить наличие перестройки гена KMT2A, но и уточнить природу гена-партнера и локализацию точки разрыва при последующем секвенировании ПЦР-продукта по Сэнгеру. Однако при эффективности проводимой ПХТ в дальнейшем содержание опухолевых клеток в костном мозге пациента резко снижается, в результате чего мультиплексная ПЦР может оказаться недостаточно чувствительным методом для детекции МОБ и приводить к ложноотрицательным результатам.

Увеличить чувствительность метода ПЦР теоретически возможно при уменьшении количества используемых праймеров, то есть при использовании моноплексной системы вместо мультиплексной. В нашей работе при использовании моноплексной ОТ-ПЦР среднее отношение копийности химерного транскрипта к копийности контрольного гена было достоверно выше, нежели при использовании мультиплексной ОТ-ПЦР, что свидетельствует о более высокой чувствительности данного метода. Кроме того, использование пациент-специфической пары праймеров (с учетом природы гена-партнера и локализации точки разрыва в гене KMT2A) при проведении моноплексной ПЦР повышает специфичность метода и снижает вероятность ложноположительного результата при перекрестной контаминации биологического материала.

Также важно упомянуть, что для гена KMT2A характерно большое количество различных редких вариантов перестроек, например, KMT2A::NEBL, KMT2A::AB11, KMT2A::USP10, KMT2A::BTK и др. [26, 34, 35]. При наличии одной из таких редких перестроек применение ОТ-ПЦР с использованием пациент-специфической пары праймеров является крайне чувствительным, специфичным и легко воспроизводимым методом детекции МОБ.

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Уровень МОБ – это один из основных параметров, позволяющих оценить ответ на проводимую терапию и спрогнозировать течение ОМЛ. Оценка уровня МОБ является важным этапом, включенным в современные протоколы лечения ОМЛ. Для группы KMT2A-позитивных ОМЛ одним из высокочувствительных методов детекции МОБ является количественная ПЦР в режиме реального времени. Нами проведена сравнительная оценка двух вариантов детекции МОБ с помощью количественной ОТ-ПЦР – с использованием нескольких прямых и обратных праймеров (мультиплексная ОТ-ПЦР в режиме реального времени) и с использованием пациент-специфической пары праймеров (моноплексная ОТ-ПЦР в режиме реального времени). При использовании моноплексной ОТ-ПЦР среднее отношение копийности химерного транскрипта к копийности контрольного гена достоверно выше, нежели при использовании мультиплексной ОТ-ПЦР, что свидетельствует о более высокой чувствительности данного метода.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Rubnitz J.E., Inaba H., Dahl G. Minimal residual disease-directed therapy for childhood acute myeloid leukaemia: results of the AML02 multicentre trial. *Lancet Oncol.* 2010;11(6):543–52. doi: 10.1016/S1470-2045(10)70090-5
2. Meyer C., Burmeister T., Groger D. The MLL recombinome of acute leukemias in 2017. *Leukemia.* 2018;32(2):273–284. doi: 10.1038/leu.2017.213
3. Cheng Z., Dai Y., Pang Y. Clinical and Biological Implications of Mutational Spectrum in Acute Myeloid Leukemia of FAB Subtypes M0 and M1. *Cell Physiol Biochem.* 2018;47(5):1853–1861. doi: 10.1159/000491065
4. Conneely S.E., Stevens A.M. Acute Myeloid Leukemia in Children: Emerging Paradigms in Genetics and New Approaches to Therapy. *Curr Oncol Rep.* 2021;23(2):16. doi: 10.1007/s11912-020-01009-3
5. Winters A.C., Bernt K.M. MLL-Rearranged Leukemias-An Update on Science and Clinical Approaches. *Front Pediatr.* 2017;5(4). doi: 10.3389/fped.2017.00004
6. Karol S.E., Coustan-Smith E., Cao X. Prognostic factors in children with acute myeloid leukaemia and excellent response to remission induction therapy. *Br J Haematol.* 2015;168(1):94–101. doi: 10.1111/bjh.13107
7. San Miguel J.F., Martinez A., Macedo A. Immunophenotyping investigation of minimal residual disease is a useful approach for predicting relapse in acute myeloid leukemia patients. *Blood.* 1997;90(6):2465–70.
8. Terwijn M., van Putten W.L., Kelder A. High prognostic impact of flow cytometric minimal residual disease detection in acute myeloid leukemia: data from the HOVON/SAKK AML 42A study. *J Clin Oncol.* 2013;31(31):3889–97. doi: 10.1200/JCO.2012.45.9628
9. Inaba H., Coustan-Smith E., Cao X. Comparative analysis of different approaches to measure treatment response in acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol.* 2012;30(29):3625–32. doi: 10.1200/JCO.2011.41.5323
10. Benetton M., Merli P., Walter C. Molecular Measurable Residual Disease Assessment before Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Pediatric Acute Myeloid Leukemia Patients: A Retrospective Study by the I-BFM Study Group. *Biomedicines.* 2022;10(7). doi: 10.3390/biomedicines10071530
11. Jourdan E., Boissel N., Chevret S. Prospective evaluation of gene mutations and minimal residual disease in patients with core binding factor acute myeloid leukemia. *Blood.* 2013;121(12):2213–23. doi: 10.1182/blood-2012-10-462879
12. Krauter J., Gorlick K., Ottmann O. Prognostic value of minimal residual disease quantification by real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction in patients with core binding factor leukemias. *J Clin Oncol.* 2003;21(23):4413–22. doi: 10.1200/JCO.2003.03.166
13. Schnittger S., Kern W., Tschulik C. Minimal residual disease levels assessed by NPM1 mutation-specific RQ-PCR provide important prognostic information in AML. *Blood.* 2009;114(11):2220–31. doi: 10.1182/blood-2009-03-213389
14. Chendamarai E., Balasubramanian P., George B. Role of minimal residual disease monitoring in acute promyelocytic leukemia treated with arsenic trioxide in frontline therapy. *Blood.* 2012;119(15):3413–9. doi: 10.1182/blood-2011-11-393264
15. Konoplev S., Wang X., Tang G. Comprehensive immunophenotypic study of acute myeloid leukemia with KMT2A (MLL) rearrangement in adults: A single-institution experience. *Cytometry B Clin Cytom.* 2022;102(2):123–133. doi: 10.1002/cyto.b.22051
16. Buccisano F., Maurillo L., Del Principe M.I. Minimal residual disease as a biomarker for outcome prediction and therapy optimization in acute myeloid leukemia. *Expert Rev Hematol.* 2018;11(4):307–313. doi: 10.1080/17474086.2018.1447378



17. Leroy H., de Botton S., Grardel-Duflos N. Prognostic value of real-time quantitative PCR (RQ-PCR) in AML with t(8;21). *Leukemia*. 2005;19(3):367–72. doi: 10.1038/sj.leu.2403627
18. Yin J.A., O'Brien M.A., Hills R.K. Minimal residual disease monitoring by quantitative RT-PCR in core binding factor AML allows risk stratification and predicts relapse: results of the United Kingdom MRC AML-15 trial. *Blood*. 2012;120(14):2826–35. doi: 10.1182/blood-2012-06-435669
19. Lomov N., Zerkalenskova E., Lebedeva S. Cytogenetic and molecular genetic methods for chromosomal translocations detection with reference to the KMT2A/MLL gene. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2021;58(3):180–206. doi: 10.1080/10408363.2020.1844135
20. *ISCN 2020 An International System for Human Cytogenomic Nomenclature*. 2020.
21. Jansen M.W., van der Velden V.H., van Dongen J.J. Efficient and easy detection of MLL-AF4, MLL-AF9 and MLL-ENL fusion gene transcripts by multiplex real-time quantitative RT-PCR in TaqMan and LightCycler. *Leukemia*. 2005;19(11):2016–8. doi: 10.1038/sj.leu.2403939
22. Burmeister T., Meyer C., Groger D. Evidence-based RT-PCR methods for the detection of the 8 most common MLL aberrations in acute leukemias. *Leuk Res*. 2015;39(2):242–7. doi: 10.1016/j.leukres.2014.11.017
23. Mitani K., Kanda Y., Ogawa S. Cloning of several species of MLL/MEN chimeric cDNAs in myeloid leukemia with t(11;19)(q23;p13.1) translocation. *Blood*. 1995;85(8):2017–24.
24. Prasad R., Gu Y., Alder H. Cloning of the ALL-1 fusion partner, the AF-6 gene, involved in acute myeloid leukemias with the t(6;11) chromosome translocation. *Cancer Res*. 1993;53(23):5624–8.
25. Suzukawa K., Shimizu S., Nemoto N. Identification of a chromosomal breakpoint and detection of a novel form of an MLL-AF17 fusion transcript in acute monocytic leukemia with t(11;17)(q23;q21). *Int J Hematol*. 2005;82(1):38–41. doi: 10.1532/IJH97.05025
26. Zerkalenskova E., Lebedeva S., Kazakova A. Acute myeloid leukemia with t(10;11)(p11-12;q23.3): Results of Russian Pediatric AML registration study. *Int J Lab Hematol*. 2019;41(2):287–292. doi: 10.1111/ijlh.12969
27. Beillard E., Pallisgaard N., van der Velden V.H. Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using 'real-time' quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR) – a Europe against cancer program. *Leukemia*. 2003;17(12):2474–86. doi: 10.1038/sj.leu.2403136
28. Creutzig U., van den Heuvel-Eibrink M.M., Gibson B. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in children and adolescents: recommendations from an international expert panel. *Blood*. 2012;120(16):3187–205. doi: 10.1182/blood-2012-03-362608
29. Jorgensen J.L., Chen S.S. Monitoring of minimal residual disease in acute myeloid leukemia: methods and best applications. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2011;11(1):49–53. doi: 10.1016/j.clml.2011.03.023
30. Marschalek R. Systematic Classification of Mixed-Lineage Leukemia Fusion Partners Predicts Additional Cancer Pathways. *Ann Lab Med*. 2016;36(2):85–100. doi: 10.3343/alm.2016.36.2.85
31. Rao R.C., Dou Y. Hijacked in cancer: the KMT2 (MLL) family of methyltransferases. *Nat Rev Cancer*. 2015;15(6):334–46. doi: 10.1038/nrc3929
32. Reichel M., Gillert E., Angermuller S. Biased distribution of chromosomal breakpoints involving the MLL gene in infants versus children and adults with t(4;11) ALL. *Oncogene*. 2001;20(23):2900–7. doi: 10.1038/sj.onc.1204401
33. Meyer C., Lopes B.A., Caye-Eude A. Human MLL/KMT2A gene exhibits a second breakpoint cluster region for recurrent MLL-USP2 fusions. *Leukemia*. 2019;33(9):2306–2340. doi: 10.1038/s41375-019-0451-7
34. Zerkalenskova E., Lebedeva S., Borkovskaia A. BTK, NUTM2A, and PRPF19 Are Novel KMT2A Partner Genes in Childhood Acute Leukemia. *Biomedicines*. 2021;9(8). doi: 10.3390/biomedicines9080924
35. Zerkalenskova E., Lebedeva S., Kazakova A. A case of pediatric acute myeloid leukemia with t(11;16)(q23;q24) leading to a novel KMT2A-USP10 fusion gene. *Genes Chromosomes Cancer*. 2018;57(10):522–524. doi: 10.1002/gcc.22646