



<https://doi.org/10.34883/PI.2023.12.2.007>

УДК 616.155.392-036.11-036.87-097.3-071:577.27.088.7



Луцкович Д.В.¹✉, Столярова Е.А.², Мелешко А.Н.¹

¹ Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии, Минск, Беларусь

² Лечебно-диагностический центр Международного института биологических систем имени Сергея Березина, Санкт-Петербург, Россия

Разнообразие и значимость идентификации реаранжировок генов иммуноглобулина и Т-клеточного рецептора для мониторинга минимальной остаточной болезни при Т-линейном остром лимфобластном лейкозе

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: концепция и дизайн исследования – Луцкович Д.В.; клиническое заключение – Столярова Е.А.; контроль выполнения исследования – Мелешко А.Н.

Подана: 10.02.2023

Принята: 02.05.2023

Контакты: lutskovichdm@gmail.com

Резюме

Введение. Острый лимфобластный лейкоз – онкологическое заболевание, наиболее часто встречающееся в детском возрасте, развивается стремительно и имеет высокую летальность. К настоящему времени лечение данного заболевания имеет достаточно высокую эффективность и вызывает дальнейшую продолжительную ремиссию. Однако всегда остается вероятность развития рецидива, что является основной и достаточно частой проблемой. Рецидивы возникают у 30–35% пациентов и являются одной из наиболее частых причин смертности. Выживаемость пациентов, у которых возник рецидив, составляет около 3–19% (в группе высокого риска). В случае клинического рецидива после проведенной терапии согласно протоколу лечения, варианты дальнейшего лечения ограничены и часто неэффективны. В то же время терапия на стадии раннего рецидива (до гематологического проявления), когда клон лейкоза еще невелик, более эффективна, чем лечение рецидива перенесенного заболевания. Поэтому особенно важно вести мониторинг минимальной остаточной болезни для предсказания раннего рецидива.

Цель. Определить разнообразие и частоту встречаемости возникающих при Т-линейном остром лимфобластном лейкозе реаранжировок генов иммуноглобулинов и Т-клеточного рецептора и использовать выявление этих «мишеней» в качестве тестов диагностики и мониторингирования минимальной остаточной болезни.

Материалы и методы. В исследование включены 32 пациента в возрасте от 1 до 18 лет (медиана возраста 9,5) с диагнозом «Т-линейный острый лимфобластный лейкоз» (Т-ОЛЛ), получавшие лечение по протоколу ALL MB-2015. Из них мониторинг минимальной остаточной болезни был произведен для 27 пациентов.

Результаты. Согласно полученным результатам одна клональная реаранжировка была обнаружена у 70,3% (19/27) пациентов, две и более – у 29,6% (8/27). Наибольшая частота встречаемости реаранжировок приходится на генные сегменты V δ 1-J δ 1 гена TCRD (34,88% от всех выявленных реаранжировок), генные сегменты гена TCRB – V β -J β (23,26% от всех выявленных реаранжировок) и гена TCRG – реаранжировка V γ 1-J γ 1.1/2.1 (16,28% от всех выявленных реаранжировок). Показатели минимальной остаточной болезни (МОБ) исследовались методом ПЦР в режиме реального времени по реаранжировкам генов Ig/TCR на 15-й, 36-й дни терапии, а также перед началом поддерживающей терапии (197-й день терапии). В зависимости от значений МОБ, определяемых на 15-й и 36-й день терапии, пациенты были распределены на 5 групп исследования: с уровнем МОБ <0,01%; с уровнем МОБ $\geq$ 0,01% – <0,1%; с уровнем МОБ $\geq$ 0,1% – <1%; с уровнем МОБ $\geq$ 1% – <10%; с уровнем МОБ $\geq$ 10%.

Заключение. Метод мониторинга МОБ по реаранжировкам генов Ig/TCR обладает высокой чувствительностью и имеет прогностическое значение для коррекции принимаемой терапии для пациентов с Т-ОЛЛ, особенно для группы высокого риска, при лечении рецидива или после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК). В настоящей статье приведены результаты по разнообразию и частотам выявления при Т-ОЛЛ мишеней для мониторинга МОБ, а также их практическое использование в диагностике. Реаранжировки генов Ig/TCR происходят практически во всех случаях Т-ОЛЛ, а в 84,3% пригодны для количественной оценки МОБ методом ПЦР в реальном времени с чувствительностью до 10^{-5} , что позволяет измерять низкие уровни МОБ и использовать в протоколах лечения клинически значимые пороговые уровни МОБ на разных этапах терапии.

Ключевые слова: реаранжировки, минимальная остаточная болезнь, Т-линейный острый лимфобластный лейкоз, аллель-специфические олигонуклеотиды, иммуноглобулин, Т-клеточный рецептор



Dzmitry V. Lutskovich¹✉, Alena A. Staliarova², Alexander N. Meleshko¹

¹ Belarusian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology, Minsk, Belarus

² Diagnostic and Treatment Center of International Institution for Biological Systems named after Sergey Berezin, Saint Petersburg, Russia

Diversity and Significance of Identification of Immunoglobulin and T-cell Receptor Gene Rearrangements for Monitoring Minimal Residual Disease in T-lineage Acute Lymphoblastic Leukemia

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: study concept and design – Dzmitry V. Lutskovich; clinical conclusion – Alena A. Staliarova; study monitoring – Alexander N. Meleshko.

Submitted: 10.02.2023

Accepted: 02.05.2023

Contacts: lutskovichdm@gmail.com

Abstract

Introduction. Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is an oncological disease most common in childhood, progressing rapidly and having a high mortality rate. To date, the treatment of this condition has been quite effective followed by subsequent long-term remission. However, the likelihood of relapse always remains, being a major and fairly common challenge. Relapses occur in 30–35% of patients and are one of the most common causes of death. The survival rate of patients who have relapsed is about 3–19% (in the high-risk group). In cases of clinical relapse after therapy as per established treatment protocol, further treatment options are limited and often ineffective. Meanwhile, therapy at the early relapse stage (prior hematological manifestations), when the leukemia clone is still minor, is more effective than management of relapsed disease. Therefore, it is particularly important to monitor minimal residual disease to predict early relapse.

Purpose. To determine both diversity and frequency of rearrangements of immunoglobulin and T-cell receptor genes occurring in T-lineage acute lymphoblastic leukemia and to use the identification of these "targets" as diagnostic tests and monitoring of minimal residual disease.

Materials and methods. The study included 32 patients aged 1 to 18 years (median age 9.5) diagnosed with T-lineage acute lymphoblastic leukemia treated according to the ALL MB-2015 protocol. Of these, minimal residual disease was monitored in 27 patients.

Results. According to the results, one clonal rearrangement was found in 70.3% (19/27) of patients, two or more were found in 29.6% (8/27). The highest frequency of occurrence of rearrangements was revealed in the V δ 1-J δ 1 gene segments of the TCRD gene (34.88% of all identified rearrangements), in the gene segments of the TCRB gene – V β -J β (23.26% of all identified rearrangements), and in the V γ 1 – J γ 1.1 rearrangement of the TCRG gene /2.1 (16.28% of all identified rearrangements). MRD parameters were studied by real-time PCR for Ig/TCR gene rearrangements on the 15th and 36th days of therapy, as well as before the start of maintenance therapy (day 197 of therapy). Depending on the MRD value determined on the 15th and 36th day of therapy, patients were divided into 5 study

groups: with MRD level $<0.01\%$; with MRD level $\geq 0.01\% - <0.1\%$; with MRD level $\geq 0.1\% - <1\%$; with MRD level $\geq 1\% - <10\%$; and with MRD level $\geq 10\%$.

Conclusion. The method of monitoring minimal residual disease by Ig/TCR gene rearrangements is highly sensitive and has a prognostic value for adjusting the therapy for patients with T-lineage acute lymphoblastic leukemia, especially in high-risk group, in relapses treatment or after hematopoietic stem cell transplantation (HSCT). This article presents results on the diversity and detection rates of targets for MRD monitoring in T-ALL, as well as their practical use in diagnostics. Ig/TCR gene rearrangements occur in almost all cases of T-ALL, and in 84.3% they are suitable for MRD quantification by real-time PCR with sensitivity up to 10^{-5} , allowing measuring low levels of MRD and using in treatment protocols clinically significant MRD threshold levels at different stages of therapy.

Keywords: rearrangements, minimal residual disease, T-lineage acute lymphoblastic leukemia, allele-specific oligonucleotides, immunoglobulin, T-cell receptor

■ ВВЕДЕНИЕ

Т-линейный острый лимфобластный лейкоз (Т-ОЛЛ) является гетерогенным заболеванием, при котором широкий спектр генетических повреждений [1] и факторов микроокружения [2] взаимодействуют, способствуя многоступенчатому лейкемогенному процессу, нарушая нормальный рост клеток, их выживание, пролиферацию и дифференцировку во время развития тимоцитов. От общего числа всех ОЛЛ на долю Т-ОЛЛ приходится 10–15% случаев у детей. Современная схема лечения Т-ОЛЛ основана на химиотерапии, стероидах и трансплантации ГСК. За последние 20 лет использование агрессивной циторедукции улучшило показатели выживаемости, которые в настоящее время рассматриваются как аналогичные показателям для В-линейного ОЛЛ [3]. Однако рецидивы остаются терапевтической проблемой. В отличие от В-ОЛЛ перспективы лечения рецидивов Т-ОЛЛ у детей неутешительны из-за более биологически гетерогенных характеристик рецидивирующих клонов: 5-летняя общая выживаемость и бессобытийная выживаемость в случаях рецидива составляют около 25% [3]. Наиболее важным предиктором исходов у пациентов с Т-ОЛЛ по-прежнему остается уровень минимальной остаточной болезни (МОБ) [4], что позволяет делать прогностическое значение для оценки эффективности лечения, предсказания рецидива, принятия решения о проведении трансплантации ГСК [5].

На сегодняшний день существует два основных, но принципиально различных метода выявления МОБ: проточная цитометрия, где в качестве мишеней используются химерные онкогены, которые и обладают достаточной специфичностью, но являются не более чем в 30% случаев детского ОЛЛ [7–9], и количественная ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ), где в качестве мишеней выступают клональные реаранжировки генов иммуноглобулина (Ig) и/или Т-клеточного рецептора (TCR) [7–9]. Данный метод является наиболее чувствительным, но остается актуальным выбор мишени и интерпретация результатов.

Мониторинг МОБ по реаранжировкам генов Ig/TCR для детей с Т-линейным острым лимфобластным лейкозом имеет прогностическую значимость в области оценки эффективности лечения и предсказания рецидива.



■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Определить разнообразие и частоту выявляемых реаранжировок генов иммуноглобулина и Т-клеточного рецептора у пациентов с Т-линейным острым лимфобластным лейкозом для диагностики минимальной остаточной болезни и определить их практическое использование.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В период с 2017 по 2022 г. обследованы 32 пациента в возрасте от 1 года до 18 лет (медиана возраста 9,5) с диагнозом «Т-линейный острый лимфобластный лейкоз», получавших лечение по протоколу ALL MB-2015 [6]. У всех пациентов получено письменное информированное согласие на участие в исследовании на базе Республиканского научно-практического центра детской онкологии, гематологии и иммунологии Республики Беларусь.

В качестве исследуемого материала использовали геномную ДНК, которая выделялась из мононуклеаров пунктата костного мозга (КМ) с содержанием опухолевых клеток не менее 80%.

Методом ПЦР проводили последовательную амплификацию переменных регионов тяжелой/легких цепей Ig и TCR. Реакционная смесь состояла из 1,5 ммоль/л MgCl₂, 0,2 ммоль/л дНТП и содержащего 12,5 пмоль каждого из праймеров, 0,5 U Taq-полимеразы и 100 нг ДНК в объеме раствора 30 мкл.

Для идентификации моноклональных и поликлональных продуктов реакции ПЦР, полученных из клональных лейкоэмических клеток и поликлональных реактивных лимфоцитов, проводили гетеродуплексный анализ в 8–10% полиакриламидном геле на аппарате для вертикального электрофореза, по протоколу – денатурации (95 °C, 5 мин.) с постепенной ренатурацией до 4 °C для образования дуплекса.

Секвенирования моноклональных продуктов ПЦР производили с использованием двух праймеров для прочтения последовательности в обоих направлениях. Идентификацию перестроенных генов проводили путем сравнения полученных последовательностей с последовательностями зародышевой линии, доступными в базах данных IMGT® и BLAST.

Аллель-специфические олигонуклеотиды подбирали к соединительному региону перестроенных генов Ig/TCR, на стыке V- (D) J-генных сегментов, располагая праймер в области нематричных (N) нуклеотидов [12, 13].

Для постановки количественной ПЦР-PB использовали 2-кратную реакционную смесь, не содержащую референсных красителей, воду и раствор смеси праймеров. Каждую реакцию проводили в объеме 20 мкл, включая 10 п/моль каждого праймера, 5 п/моль TaqMan пробы и 500 нг геномной ДНК [7, 8].

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенных исследований было выявлено 43 клональные реаранжировки генов Ig/TCR для 31 пациента (для 1 пациента из 32 реаранжировки обнаружены не были), включающие 15 реаранжировок гена TCRG (7 – V γ I – J γ 1.1/2.1, 2 – V γ I – J γ 1.3/2.3, 4 – V γ III – J γ 1.3/2.3, 2 – V γ II – J γ 1.3/2.3), 15 реаранжировок гена TCRD (15 – V δ 1-J δ 1), 13 реаранжировок гена TCRB (10 – V β : J β и 3 – D β -J β), реаранжировки гена IgH обнаружены не были.

В результате одна клональная реаранжировка была обнаружена у 70,3% (19/27) пациентов с Т-ОЛЛ, две и более – у 29,6% (8/27) пациентов. Наибольшая частота встречаемости реаранжировок приходится на генные сегменты V δ 1-J δ 1 (34,88% от всех выявленных реаранжировок), V β : J β (23,26% от всех выявленных реаранжировок), V γ I – J γ 1.1/2.1 (16,28% от всех выявленных реаранжировок). Данные про процентному соотношению обнаруженных реаранжировок генов Ig/TCR представлены на рис. 1.

Кроме того, была изучена частота вариабельных генов, генов разнообразия и соединения в реаранжировках, идентифицированных в отдельных локусах Ig/TCR, для определения характера использования V(D)J-генных реаранжировок.

Реаранжировки в локусе TCRG чаще всего затрагивали членов семейства V γ I – J γ 1.1/2.1 (46,67%, 7/15), V γ III – J γ 1.3/2.3 (26,67%, 4/15), V γ I – J γ 1.3/2.3 и V γ II – J γ 1.3/2.3 (по 13,33% 2/15 и 2/15). Реаранжировки в локусе TCRD в 100% случаев (15/15) составили V δ 1-J δ 1. В локусе TCRB перестройки V β : J β (76,92%, 10/13) были преимущественно идентифицированы по сравнению с D β : J β (23,7%, 3/13). Графическое распределение представлено на рис. 2.

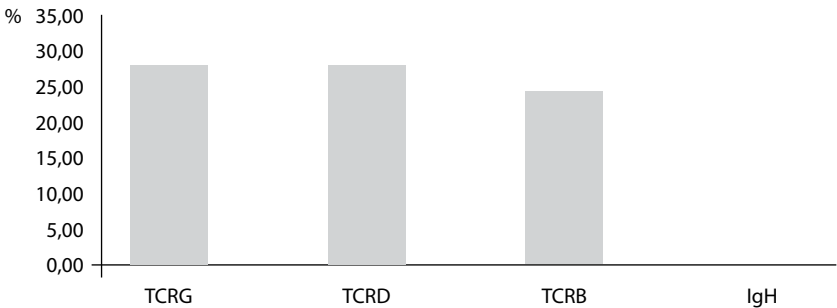


Рис. 1. Процентная частота встречаемости генов Ig/TCR при Т-ОЛЛ
Fig. 1. Frequency of occurrence of Ig/TCR genes in T-ALL as percentage

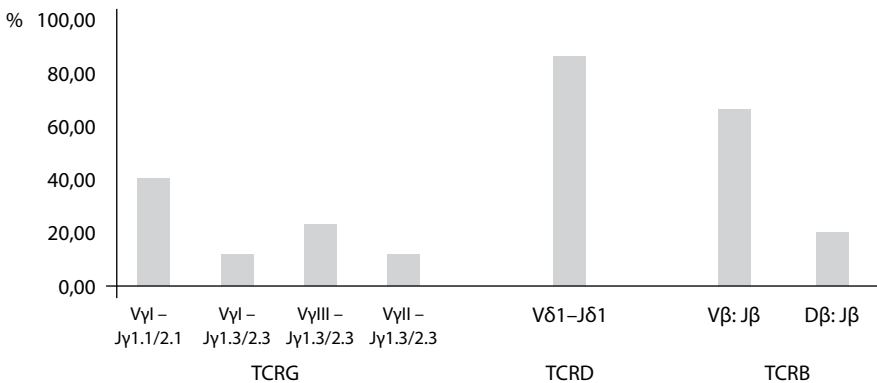


Рис. 2. Процентная частота встречаемости реаранжировок в локусах TCRG, TCRD, TCRB
Fig. 2. Frequency of occurrence of rearrangements in loci TCRG, TCRD, and TCRB as percentage



Методология выявления и мониторинга МОБ базировалась на экспериментальной модели, воспроизводимой при каждом анализе. Каждое измерение сопровождалось построением двух калибровочных кривых: для контрольного гена калибровку использовали для нормализации количества ДНК между образцами и для мишени МОБ использовали расчет уровня МОБ в follow up образцах. Таким образом, для количественной оценки МОБ нами был использован метод «стандартной кривой», который позволяет на основании экспериментальной модели пересчитать уровень амплификации измеряемого образца в значение стандартного количества, которое выражает количество мишени в логарифмическом виде относительно эталонного образца (диагностической ДНК), принятого за 1 [10].

Клиническое заключение

В исследование включено 32 пациента с впервые установленным диагнозом Т-ОЛЛ, получавших лечение согласно протоколу ОЛЛ МБ – 2015. У 1 (0,32%) пациента реаранжировки генов Ig/TCR обнаружены не были, у 4 (12,5%) – мишень для диагностики МОБ не имела достаточной специфичности и/или чувствительности. У 5 (18,5%) пациентов среди анализируемых развился рецидив заболевания, 1 (3,7%) пациент умер в состоянии ремиссии после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток.

Показатели МОБ исследовались методом ПЦР в режиме реального времени по реаранжировкам генов иммуноглобулинов и Т-клеточного рецептора на 15-й, 36-й дни терапии, а также перед началом поддерживающей терапии (197-й день терапии).

В зависимости от уровня проявлений МОБ, определяемых на 15-й и 36-й дни терапии, пациенты были распределены на 5 групп исследования: с уровнем МОБ $<0,01\%$; с уровнем МОБ $\geq 0,01\% - <0,1\%$; с уровнем МОБ $\geq 0,1\% - <1\%$; с уровнем МОБ $\geq 1\% - <10\%$; с уровнем МОБ $\geq 10\%$.

Среди анализируемых пациентов показатели МОБ на 15-е сут. терапии определялись у 23 пациентов с Т-ОЛЛ: у 4 (17,4%) пациентов показатели МОБ составили менее $0,01\%$; у 2 (8,7%) – показатели МОБ определялись в диапазоне $\geq 0,01\% - <0,1\%$; у 4 (17,4%) – в пределах значений МОБ $\geq 0,1\% - <1\%$; уровень МОБ $\geq 1\% - <10\%$ определялся у 4 (17,4%) человек, МОБ $\geq 10\%$ – у 9 (39,1%) пациентов с Т-ОЛЛ.

Среди анализируемых пациентов показатели МОБ на 36-е сут. терапии определялись у 25 пациентов с Т-ОЛЛ: у 7 (28%) пациентов показатели МОБ составили менее $0,01\%$; у 5 (5,6%) – находились в диапазоне $\geq 0,01\% - <0,1\%$; у 6 (24%) – в пределах значений МОБ $\geq 0,1\% - <1\%$; уровень МОБ $\geq 1\% - <10\%$ определялся у 5 (5,6%) пациентов, МОБ $\geq 10\%$ – у 2 (8%) пациентов с Т-ОЛЛ.

Перед началом поддерживающей терапии показатели МОБ определялись у 18 пациентов с Т-ОЛЛ, у всех пациентов анализируемый показатель МОБ составил $\leq 0,01\%$.

Динамика показателей МОБ на 15-е и 36-е сут. определялась у 21 пациента с Т-ОЛЛ. На протяжении проводимой терапии, в период с 15-го по 36-й дни терапии, у всех наблюдаемых пациентов отмечалось снижение показателей МОБ.

Среди анализируемых у 1 (4,8%) пациента показатели МОБ снизились в пределах 4 логарифмов, у 3 (14,3%) пациентов показатели МОБ снизились на 2 логарифма, у 5 (23,8%) – снижение показателей МОБ определялось в пределах 1 логарифма, у большинства пациентов (12 пациентов) показатели МОБ не снизились в пределах 1-го логарифма. Среди пациентов, характеризующихся отсутствием снижения МОБ

в пределах 1-го логарифма 4 исследуемых имели отрицательное значение МОБ уже на 15-й день терапии.

Среди лиц с известным уровнем МОБ на 15-й и 36-й дни терапии рецидив заболевания констатирован у 3 пациентов с Т-ОЛЛ, среди них один пациент имел отрицательное значение МОБ уже на 15-е сут. терапии, второй пациент с рецидивом заболевания характеризовался отсутствием снижения показателя МОБ в пределах 1-го логарифма, у третьего пациента с рецидивом Т-ОЛЛ отмечалось снижение показателей МОБ в период с 15-го по 36-й день на 2 логарифма.

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Значения уровня выраженности проявлений МОБ, определяемые на 15-е, 36-е сут. терапии и перед поддерживающей терапией, указывают на необходимость дальнейшего изучения прогностического значения показателей МОБ, определяемых методом ПЦР по реаранжировкам генов иммуноглобулинов и Т-клеточного рецептора, на риск развития рецидива заболевания и после трансплантации ГСК у пациентов с Т-ОЛЛ. Приведены результаты оценки разнообразия и частоты выявляемых реаранжировок при Т-ОЛЛ, выступающих в качестве мишеней для мониторинга МОБ.

Реаранжировки генов Ig/TCR происходят практически во всех случаях Т-ОЛЛ, а в 84,3% пригодны для количественной оценки МОБ методом ПЦР-РВ с чувствительностью до 10^{-5} , что позволяет измерять низкие уровни МОБ и использовать в протоколах лечения клинически значимые пороговые уровни МОБ на разных этапах терапии.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Passaro D., Quang C.T., Ghysdael J. Microenvironmental cues for T-cell acute lymphoblastic leukemia development. *Immunol. Rev.* 2016;271:156–172. doi: 10.1111/immr.12402.
2. Belver L., Ferrando A. The genetics and mechanisms of T cell acute lymphoblastic leukaemia. *Nat. Rev. Cancer.* 2016;16:494–507. doi: 10.1038/nrc.2016.63.
3. Raetz E.A., Teachey D.T. T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Hematology.* 2016; 2016:580–588. doi: 10.1182/asheducation-2016.1.580.
4. Cooper S.L., Brown P.A. Treatment of Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. *Pediatr. Clin. N. Am.* 2015;62:61–73. doi: 10.1016/j.pcl.2014.09.006.
5. Kröger N., Miyamura K., Bishop M.R. Minimal Residual Disease Following Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transpl.* 2011;17(1 Suppl):S94–100.
6. Nagafuji K., Miyamoto T., Eto T. et al. Monitoring of minimal residual disease (MRD) is useful to predict prognosis of adult patients with Ph-negative ALL: results of a prospective study (ALL MRD2002 Study). 2013;6:14.
7. Republican Scientific and Practical Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology; Lutskovich D.V., Gil A.V., Stolyarova E.A., Lipai N.V., Meleshko A.N. Method for determining residual tumor cells in patients with acute lymphoblastic leukemia: instructions for use No. 122-1120: approved by the Ministry of Health of the Republic of Belarus on December 24, 2020. Minsk, 2020; 18 p. (in Russian)
8. Lutskovich D.V., Stolyarova E.A., Polyakova E.A., Meleshko A.N. Significance of identification of immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangements for diagnosis and monitoring of minimal residual disease in B-linear acute lymphoblastic leukemia. *Lab. Diagnostics. Eastern Europe.* 2022;11(3):289–299. (in Russian)