

© 2023 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России
Поступила 18.11.2022
Принята к печати 13.01.2023

DOI: 10.24287/1726-1708-2023-22-1-32-38

Определение минимальной диссеминированной болезни в костном мозге методом секвенирования нового поколения у детей с лимфомой Беркитта

Е.В. Волчков^{1,3}, Ю.Г. Аbugова¹, И.З. Мамедов², Д.С. Абрамов¹, М.А. Сенченко¹, Л.Х. Андержанова¹, А.Ю. Комков², В.В. Фоминых¹, Ю.В. Ольшанская¹, Н.В. Мякова¹, Г.А. Новичкова¹

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, Москва

²ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиком М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» РАН, Москва

³Научно-исследовательский институт молекулярной и клеточной медицины ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», Москва

Контактная информация:

Волчков Егор Васильевич,
врач-гематолог отдела исследования лимфом ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России
Адрес: 117997, Москва, ул. Саморы Машела, 1
E-mail: volchcov.egor@yandex.ru

Эффективность терапии детей с лимфомой Беркитта достигла 85–90% с применением современных риск-адаптированных схем лечения, в основе которых лежит разделение пациентов на группы риска по стадии и степени распространенности опухолевого процесса. Для оценки поражения костного мозга традиционно используют подсчет миелограммы из нескольких точек с поиском опухолевых клеток. Однако для более точного выявления прогностически значимой минимальной диссеминированной болезни (МДБ) нужны высокочувствительные молекулярно-генетические методы. В настоящей работе мы использовали секвенирование нового поколения в целях выявления специфических для опухолевых клонов перестроек генов иммуноглобулинов, что может быть использовано в качестве маркера для оценки МДБ у детей с В-клеточными неходжкинскими лимфомами. Исследование одобрено независимым этическим комитетом и утверждено решением ученого совета НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева. Мы показали, что данный метод позволяет детектировать поражение костного мозга на уровне до 10^{-6} у пациентов с лимфомой Беркитта, у которых анализ миелограммы стандартным морфологическим методом не показал наличие опухолевых клеток. Выявление молекулярной МДБ позволяет уточнить стадирование и улучшить стратификацию на группы риска у детей с В-клеточными неходжкинскими лимфомами.

Ключевые слова: неходжкинские лимфомы, секвенирование нового поколения, V(D)J-рекомбинация, лимфома Беркитта

Волчков Е.В. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. 2023; 22 (1): 32–8.
DOI: 10.24287/1726-1708-2023-22-1-32-38

© 2023 by «D. Rogachev NMRCPHOI»

Received 18.11.2022
Accepted 13.01.2023

The evaluation of minimal disseminated disease in the bone marrow of children with Burkitt lymphoma using next generation sequencing

E.V. Volchkov^{1,3}, Yu.G. Abugova¹, I.Z. Mamedov², D.S. Abramov¹, M.A. Senchenko¹, L.Kh. Anderzhanova¹, A.Yu. Komkov², V.V. Fominykh¹, Yu.V. Olshanskaya¹, N.V. Myakova¹, G.A. Novichkova¹

¹The Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology of Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow

²The Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Moscow

³The Research Institute of Molecular and Cellular Medicine, Peoples' Friendship University of Russia, Moscow

The effectiveness of treatment for children with B-cell non-Hodgkin lymphomas (B-NHL) has reached 85–90% after the introduction of modern risk-adapted treatment regimens that involve risk group stratification based on tumor stage. Bone marrow involvement is traditionally evaluated using quantitative morphological analysis of tumor cells which has, however, a lower sensitivity compared to molecular genetic methods. In our study, we used next generation sequencing (NGS) to identify tumor-specific V(D)J-rearrangements of immunoglobulin genes which can be used as a marker for the evaluation of minimal disseminated disease (MDD) in children with B-NHL. The study was approved by the Independent Ethics Committee and the Scientific Council of the Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology. Here we demonstrated that NGS allows detection of bone marrow involvement at a sensitivity of 10^{-6} in patients with Burkitt lymphoma, in whom standard morphological analysis failed to reveal the presence of tumor cells. The detection of molecular MDD can improve tumor staging and risk stratification in children with B-cell non-Hodgkin lymphomas.

Key words: non-Hodgkin lymphomas, next generation sequencing, V(D)J-recombination, Burkitt lymphoma

Volchkov E.V., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology. 2023; 22 (1): 32–8.
DOI: 10.24287/1726-1708-2023-22-1-32-38

Correspondence:
Egor V. Volchcov,
a hematologist at the Lymphoma Research Department at the Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology of Ministry of Healthcare of the Russian Federation
Address: 1 Samory Mashela St., Moscow 117997, Russia
E-mail: volchcov.egor@yandex.ru

Согласно критериям 5-й версии классификации Всемирной организации здравоохранения, лимфома Беркитта (ЛБ) определяется как агрессивное новообразование, состоящее из клеток среднего размера с фенотипом герминальных В-клеток и реаранжировкой гена *c-MYC* [1]. Данный вариант лимфомы является самым частым среди всех подтипов В-клеточных неходжкинских лимфом (В-НХЛ) у детей. Примерно в 20% случаев ЛБ отмечается морфологическое поражение костного мозга [2]. При применении современных риск-адаптированных протоколов терапии удается добиться общей и бессобытийной выживаемости в 90% случаев. При этом рецидивы и прогрессия заболевания являются основными причинами неудач терапии, так как выведение рефрактерных пациентов во вторую ремиссию практически невозможно [2]. Основой для современных протоколов лечения являются стратификация пациентов на группы риска и применение интенсивной химио-иммунотерапии блоками с последующей оценкой ответа опухоли и необходимости интенсифицировать терапию. Основой для разделения на группы риска являются оценка степени распространенности опухолевого процесса (система стадирования по St. Jude) и уровень лактатдегидрогеназы [3, 4]. При этом именно среди пациентов 3-й и 4-й групп риска наблюдается большинство неудач терапии [5]. В случае поражения костного мозга всегда выставляется IV стадия заболевания.

Для выявления поражения костного мозга традиционно проводят морфологическую оценку аспирата из 3–4 точек с подсчетом клеток с бластной морфологией. Такой метод имеет ряд ограничений, главным из которых является низкая разрешающая способность, не позволяющая обнаруживать опухолевые клетки на уровне менее нескольких процентов от нормальных значений. Однако для уточнения минимальной диссеминированной болезни (МДБ), которая имеет прогностическое значение при продвинутых стадиях заболевания, необходимо обнаружение опухолевой популяции на более низком уровне. При этом использование проточной цитометрии, применяемой для этих целей в случае острых лейкозов, может быть затруднено ввиду отсутствия специфических маркеров, которые позволили бы достоверно разделить опухолевую и нормальную популяции клеток.

Значительный прогресс в развитии технологий, основанных на полимеразной цепной реакции (ПЦР), и в первую очередь секвенирования нового поколения (NGS), существенно расширили наши возможности по поиску специфических маркеров, которые могут быть использованы для выявления опухолевой клеточной популяции с большей чувствительностью и специфичностью, чем позволяют стандартные

методы исследования. В настоящей работе мы дадим краткую характеристику основным подходам, которые могут быть использованы для этих целей, а также приведем собственные результаты по детекции МДБ путем выявления специфических реаранжировок генов иммуноглобулинов (IGs) методом NGS. Исследование одобрено независимым этическим комитетом и утверждено решением ученого совета НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева.

Полимеразная цепная реакция длинных фрагментов

ЛБ отличает перестройка гена *c-MYC* с одной из цепей IG. Чаще всего происходит транслокация с тяжелой цепью IG (IGH) с образованием химерного гена *c-MYC::IGH* (8;14)(q24;q32), но возможна также и перестройка с одним из локусов легких цепей каппы (IGK) или лямбды (IGL) – t(2;8)(p11;q21) и t(8;22)(q24;q11.2) соответственно [6]. Данные реаранжировки можно использовать в качестве опухолевых маркеров.

Для детекции специфических перестроек чаще всего используют ПЦР в режиме реального времени, где по приросту флуоресценции при каждом новом цикле ПЦР можно судить о количестве исходных молекул путем нормализации и соотношения с референсными значениями. Данная технология не может быть применена для детекции *c-MYC*-перестроек, так как точка разрыва в обоих перестраиваемых генах может существенно меняться от образца к образцу, а главное они разнесены в пространстве генома и в результате не образуется единая матричная РНК (мРНК) с обоих генов, что заставляет синтезировать цепь ДНК длиной до нескольких тысяч нуклеотидов. Для этих целей, по данным ряда авторов, предлагается использовать ПЦР длинных фрагментов, которая позволяет синтезировать фрагменты достаточной длины [7, 8]. Суть метода заключается в использовании в параллельных реакциях ПЦР разных пар праймеров на экзоны *c-MYC* и локусы IGH. Дальше проводится визуальная оценка наличия ПЦР-продукта с помощью электрофореза.

Однако у данного метода есть ряд ограничений, главными из которых являются отсутствие информации по его использованию при t(2;8)(p11;q21) и t(8;22)(q24;q11.2), невозможность количественной оценки, трудоемкость при подборе оптимальной комбинации праймеров и сильный разброс чувствительности от образца к образцу [8, 9].

Секвенирование нового поколения

Основным преимуществом технологии NGS перед стандартной ПЦР является возможность массированного параллельного секвенирования многих молекул ДНК в одной проточной ячейке секвенатора

[10]. В настоящее время NGS позволяет детектировать специфические для опухоли перестройки IGs и выявлять различные мутации, полиморфизмы (SNVs), изменения числа копий (CNVs) и инделсы (делеции или вставки различной протяженности) [11].

В процессе нормального созревания В-лимфоцитов поэтапно происходит реаранжировка генов IGh и легких (V(D)J) цепей IGs, соматическая гипермутация (СГМ) и переключение классов IGs, что и обуславливает все антигенное разнообразие В-клеток у человека [12]. ЛБ, как и все остальные злокачественные опухоли, является клональным заболеванием, в результате чего все опухолевые клетки с некоторыми оговорками несут уникальную последовательность CDR3, которая образуется в результате всех этапов «созревания» IGh и легких цепей IGs и которая в норме отвечает за связь с антигеном [12]. В настоящее время имеется лишь одна одобренная для клинического использования система для детекции перестроек IGs на основе NGS – clonoSEQ (США) [13]. Главным достоинством этого метода является высокая чувствительность (до 0,005%), однако низкая доступность данного набора в России, определенные трудности в первичной идентификации V(D)J-перестройки в опухоли, возможность одновременного анализа только одной мишени и сложности в анализе полученных данных ограничивают распространение данной методики. В нашей работе мы продемонстрировали результаты собственного подхода для детекции клональных перестроек при ЛБ, который дает аналогичную с clonoSEQ эффективность, а также лишен недостатков данной технологии.

Помимо анализа клональных перестроек IGs можно исследовать и другие опухоль-специфические маркеры. Как известно, практически все новообразования имеют в той или иной степени генетическую нестабильность, в результате которой в процессе клональной эволюции происходит накопление генетических событий, их определение позволяет отделить опухолевую популяцию от условно нормальных клеток в исследуемом образце. Наиболее полные генетические данные удается получить в результате полногеномного или полноэкзомного секвенирования, при которых изучается последовательность всего генома или белок-кодирующие последовательности генов. Помимо всех достоинств данных методов низкая чувствительность (зависит от глубины секвенирования) и высокая стоимость ограничивают их применение в клинической практике. Использование таргетного NGS с изучением только заранее заданных регионов существенно уменьшает затраты на секвенирование, а также повышает чувствительность данной технологии до 0,01–0,001%. Данный подход с успехом применяется для различных онко-

гематологических заболеваний, особенно когда в силу биологии опухоли невозможно провести анализ клональных перестроек IGs [14, 15]. Также существуют различные модификации данной технологии как на уровне пробоподготовки, так и на уровне биоинформационного анализа, целью которых является снижение количества ошибок секвенирования и повышение чувствительности. К подобным технологиям относят дуплексное секвенирование, где детекция варианта происходит сразу по двум цепям ДНК, детекцию сочетанных вариантов («фазированные варианты» – PhasED-секвенирование) и др. [16, 17]. Учитывая возможность секвенирования генов IGs в контексте изучения В-НХЛ, данные технологии нашли применение в методах малоинвазивной биопсии при данных заболеваниях. Более подробно эти технологии описаны в обзоре E. Lauer и соавт. [18].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В пилотное исследование по определению МДБ были включены 10 детей с установленным диагнозом ЛБ в возрасте от 1 до 14 лет (медиана возраста 5,5 года) без поражения костного мозга по данным стандартной морфологии и проходивших лечение в НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева с 2018 по 2021 г. Все пациенты были включены в протокол В-НХЛ2010маб и были стратифицированы согласно его критериям. Характеристика пациентов представлена в *таблице 1*.

ДНК для генетического анализа выделялась из парафиновых FFPE-блоков с помощью набора GeneRead DNA FFPE Kit (Qiagen, Германия). Определение МДБ методом NGS выполнялось в 2 этапа. На первом этапе определялся клональный репертуар перестроек IGs в опухолевом образце, полученном после биопсии и установления диагноза. Библиотеки для определения клонального репертуара готовились путем 2 раундов ПЦР. В первом раунде проводилось 5 параллельных мультиплексных ПЦР для каждого образца с использованием набора праймеров к V-, D-, J-локусам цепи IGh (3 мультиплексных ПЦР с праймерами к сегментам FR1, FR2 и FR3 цепи IGh) и по одной мультиплексной ПЦР с праймерами к V- и J-сегментам легких цепей Igh и Igl. В каждой реакции использовалось по 40 нг геномной ДНК. В ходе второго раунда ПЦР происходило присоединение индексов i7 и i5, содержащих адаптерные последовательности. Продукты ПЦР очищались на магнитных частицах. Секвенирование библиотек проводилось на секвенаторе MiSeq (Illumina, США). Полученные после секвенирования и демультиплексирования файлы анализировались с помощью веб-платформы Galaxy (<https://usegalaxy.org>) и программы IgBLAST

Таблица 1
Характеристика пациентов с ЛБ, включенных в исследование

Table 1
The characteristics of the study patients with Burkitt lymphoma (BL)

Пациент Patient	Пол Gender	Возраст, годы Age, years	Регионы поражения Involvement	Стадия Stage	Группа риска Risk Group
№1	Женский Female	14	Лимфатические узлы шеи, пазух носа, основания черепа, глазницы, миндалины, плевры, яичников, брюшной стенки Lymph nodes of the neck, nasal sinuses, the base of the skull, orbits, tonsils, the pleura, ovaries, the abdominal wall	III	3
№2	Мужской Male	2	Почки Kidneys	IINR	2
№3	Мужской Male	3	Брюшная полость Abdominal cavity	IINR	2
№4	Женский Female	3	Яичники, матка, брюшина Ovaries, uterus, peritoneum	III	3
№5	Мужской Male	8	Носоглотка Nasopharynx	IINR	2
№6	Женский Female	4	Лимфатические узлы шеи, миндалины Cervical lymph nodes, tonsils	IINR	2
№7	Мужской Male	7	Брюшная полость, печень, поджелудочная железа, надпочечник, щитовидная железа Abdominal cavity, liver, pancreas, an adrenal gland, the thyroid gland	III	3
№8	Мужской Male	14	Полость носа, верхнечелюстная пазуха, глазница, решетчатая кость, легкие, кости скелета Nasal cavity, a maxillary sinus, an orbit, the ethmoid bone, lungs, bones	IV	3
№9	Мужской Male	10	Брюшная полость Abdominal cavity	IINR	2
№10	Мужской Male	1	Брюшная полость, почки, брюшина Abdominal cavity, kidneys, peritoneum	III	3

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast>). В качестве опухолевых рассматривались клоны, которых в процентном соотношении было больше 5% всех детектированных. В ходе второго этапа проводилось непосредственное определение МДБ. Подготовка библиотеки осуществлялась путем 2 раундов ПЦР. В первом раунде выполнялась постановка 32 параллельных реакций ПЦР по методу серийных разведений вносимой ДНК с праймерами к локусам генов IGs, обнаруженных на данном этапе у опухолевых клонов. Так, 16 реакций ПЦР выполнялось с внесением около 300 нг геномной ДНК на реакцию, 8 реакций – с 30 нг и еще 8 – с 3 нг, что примерно соответствует ДНК, выделенной от 50 000, 5000 и 500 клеток на реакцию соответственно. В ходе второго раунда выполнялось уникальное индексирование каждой отдельной реакции ПЦР, после чего также проводилась отмывка получившейся библиотеки на магнитных частицах. Таким образом, на каждый образец было подготовлено по 32 отдельных библиотеки. Секвенирование библиотек также проводилось на секвенаторе MiSeq (Illumina, США). Суммарная глубина прочтения составила 1 млрд ридов на образец. После секвенирования проводилось демультимплексирование по уникальным парам индексов. Таким образом, риды от каждой из 32 отдельных ПЦР были отделены друг от друга. В дальнейшем с помощью самостоятельно разработанного пайплайна проводился поиск опухолевой последовательности CDR3 среди каждой из 32 библиотек в образце. В случае детекции опухолевой последовательности в какой-либо из библиотек проводился

математический подсчет содержания опухолевой популяции в образце на основе количества загружаемой ДНК на реакцию и общего количества реакций, в которых были обнаружены опухолевые клоны. Учитывая, что количество загружаемой ДНК для каждого образца составляло порядка 850 000 клеток, то диапазон чувствительности данной системы составляет от 0,0001% (10^{-6}) до 0,2% (10^{-3}).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На первом этапе исследования был проведен анализ клонального репертуара в опухолевых образцах, результаты представлены в *таблице 2*.

После определения клонального репертуара в опухолевых образцах последовательность CDR3, уникальная для опухолевых клонов, использовалась для поиска опухолевой популяции в образцах костного мозга. Среди 10 обследованных пациентов у 4 удалось выявить опухолевую популяцию на уровне от 0,0001 до 0,007%. Результаты определения МДБ представлены в *таблице 3* (нумерация клонов соответствует *таблице 2*).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

В ходе настоящей работы мы применили кастомную NGS-систему детекции клональных перестроек генов IGs у детей с ЛБ, которая до этого была успешно применена нами при остром лимфобластном лейкозе [19]. Определенные таким образом уникальные нуклеотидные последовательности

Таблица 2
Определение клонального репертуара в опухолевых образцах

Table 2
Clonal repertoire analysis in the tumor samples

Пациент Patient	Цепь IG IG chain	V-локус* V locus*	J-локус J locus	Нуклеотидная последовательность CDR3 CDR3 nucleotide sequence
№1	IGH	V4	J3	AGACAGAGCGCTGCCTGGCGGGCTGAACACC
	IGH	V4	J4	AGAGTCAAAGACGTGAGTCTCCGGACGATAACCTGC
	IGK	V3	J4	AGTGAGGAGGTGAGCTACCATACTGCTG
	IGK	V5	J1	CGTCCCCTAAGAGGGAAATTATCATGTTGTAG
№2	IGH	V3	J6	GACGTCCATACCGTAGTCCGAAAAATATCGTAATCTGATAGGGCCATGTATTTCGC
	IGH	V2	J5	GGGGTCAAGAACAGGTTTCATCTCCCGCGGGTGACCTGTACCAGCCACTGCCACTTCCGCTAC
	IGL	V1	J4	CACCCAGCACTCAGGCTGCTATCCACGTTCC
	IGK	V1	J3	AGTGAGGGCACTGTTATACTTTTG
№3	IGH	V4	J6	GACGTCCATACCGTAGTAGTAGAGTCCGGGGGCAATTACCACCCTGCAATAGAGAACGGGAATCTCGC
	IGH	V3	J4-5	GTATTCAAACGTATACACAGTTGTAGCCAGGCTGTCCGACGTGTCGT
	IGH	V3	J4-5	GTATTCAAACGTAGGCACAGTTGTAGCCAGGCTGTCCGACGTGTCGT
	IGL	V3	J2-3	TATCATATGATCACTGCTACTATCCACACCTG
№4	IGH	V3	J4	GCAAGAGATTTCAAGATGGGTAGTGGGAGCCATTACTACTTTGACTAC
	IGK	V1	J2	AGTACTCGAGGGGGTACTGTAACCTCTGTTG
	IGL	V1	J7	CACAACAGCACTCAGGTTGCTATCCCATGTTCC
№5	IGH	V2	J6	GGACGGATATATCCGGAGCAGATGGGACGAACCTACGGTATGGACGTC
№6	IGH	D3	J1-2	CTTACCTGAGGAGACGGTGCCC
№7	IGH	V1	J6	CTGAGATCTGAAGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGGAGTAGTCAACCTCTTAGCAGAACTGGGGACC
	IGH	V1	J6	ACACCACTACGGTATGGACGCTGGGGCCAA
	IGH	V1	J6	CTGAGATTTGAAGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGGAGTAGTCAACCTCTTAGCAGAACTGGGGACC
№8	IGH	V3	J6	ACACCACTACGGTATGGACGCTGGGGCCAA
	IGH	V3	J6	CTGAGATCTGAAGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGGAGTAGTCAACCTCTTAGCAGAACTGGGGACC
	IGH	V3	J6	ACACCACTACGGTATGGACGCTGGGGCCAA
	IGL	V3	J1	GTCCAGGCAGAACGAGGCTGACTATTTCTGTCAATCAGCAGACAGCAGTGGTAGTTATGCTTCCGGAAC
№9	IGH	D2	J4	TGGGACCGAGCTGAC
	IGH	V4	J4	CCAGTAGTCAATGTTAGAGCAGTACCACCACAATATGCTCAGTGCACAGACGAACCCCAAAAATCTCC
№10	IGH	V3	J6	TGTCCTACAGGAGA
	IGH	V3	J6	CCAGTACTCAAAGGAGACACCGTAGGCTCTCTTCCACA

Примечание. * – в случаях с неполными перестройками (DJ-рекомбинация IGH) V-сегмент отсутствует, таким образом указывается D-сегмент.
Notes. * – since the V-segment is absent in cases of incomplete rearrangements (IGH DJ recombination), the D-segment was specified.

Таблица 3
Результаты определения МДБ

Table 3
The results of the minimal disseminated disease (MDD) analysis

Пациент Patient	Стадия Stage	Группа риска Risk Group	Клон, № Clone, №	Уровень МДБ, % MDD, %
№1	III	3	1	0,001
			2	0,0007
			3	0
			4	0
№2	IINR	2	1	0
			2	0
			3	0
			4	0
№3	IINR	2	1	0
			2	0
			3	0
			4	0
№4	III	3	1	0
			2	0
			3	0
№5	IINR	2	1	0
№6	IINR	2	1	0
№7	III	3	1	0
			2	0
			3	0
№8	IV	3	1	0
			2	0
			3	0,007
			4	0
№9	IINR	2	1	0,0001
			2	0
№10	III	3	1	0,0011

участка CDR3 могут быть использованы в качестве опухолевых маркеров для детекции МДБ. Данная система позволяет обнаруживать как полные, так и неполные перестройки, что является критичным при изучении клонального репертуара по реаранжировкам генов IGs. Так, среди исследуемой когорты неполные перестройки были обнаружены у 2 пациентов, у одного из которых по данному клону была детектирована МДБ в костном мозге. Полученные результаты убедительно показывают, что отсутствие опухолевых клеток у больных ЛБ в костном мозге по данным морфологического исследования не означает отсутствие поражения костного мозга. Это объясняется значительно большей чувствительностью метода NGS и возможностью выявлять опухолевую популяцию на уровне 1 клетки на почти 1 млн нормальных, что недоступно никакому другому из существующих на сегодняшний день методов исследования. Возможность с большей точностью выявить минимальное опухолевое поражение костного мозга позволяет вносить этот показатель в определение стадии заболевания и группы риска, что может быть использовано в будущих протоколах для более ранней интенсификации терапии у пациентов с МДБ. В нашем исследовании не была выявлена какая-либо

связь между наличием МДБ и исходом терапии, но надо отметить, что группа малочисленна и все эти пациенты получили интенсивное лечение по высокой группе риска.

Другим востребованным применением данной технологии является определение так называемой минимальной остаточной болезни, когда оценивается ответ на проводимое лечение. Данный метод может быть особенно полезным в случаях с инициальным поражением костного мозга, так как кроме NGS не существует оптимального метода детекции остаточной опухолевой популяции в костном мозге у пациентов с ЛБ с необходимым для этого уровнем чувствительности. Персистенция МДБ после терапии индукции является неблагоприятным прогностическим фактором.

Как и у всех методов при применении NGS для определения МДБ могут быть свои ограничения. Так, при данной технологии необходима первичная детекция клональных перестроек в образце, который должен содержать достаточное количество опухолевых клеток для надежного разграничения опухолевой популяции и реактивного иммунного окружения. При этом, учитывая преимущественное использование FFPE-блоков для этих целей, возникает сложность в получении надлежащего качества геномной ДНК, способной вступить в ПЦР. Высокая чувствительность в определении МДБ напрямую зависит от количества загружаемого материала (более 5 мкг на 1 образец), что также может быть затруднено в случае гипоклеточного костного мозга. Другой возможной проблемой, уже биологического характера, может быть СГМ, которая в норме происходит на уровне В-лимфоцитов герминального центра. СГМ может привести к изменению нуклеотидной последовательности CDR3 уже после

первичной детекции в процессе клональной эволюции опухоли, что делает ранее обнаруженные маркеры бесполезными для мониторинга МДБ и минимальной остаточной болезни. Такой эффект был описан для фолликулярной и диффузной В-крупноклеточной лимфом примерно в 20% случаев [20, 21]. В отношении ЛБ нет данных о возникновении СГМ в CDR3, что может быть объяснено тем, что ЛБ происходит из ранних В-клеток герминального центра лимфатического фолликула до возникновения гипермутации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Резюмируя все выше сказанное, можно сделать вывод, что определение клональных перестроек генов IGs методом NGS представляется оптимальным методом для определения МДБ и может быть использовано в качестве диагностического инструмента для определения стадии заболевания, а также для выявления остаточной опухолевой популяции в исследуемом образце.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование проведено при финансовой поддержке фонда «Наука – детям».

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

ORCID

Volchkov E.V. ORCID <https://orcid.org/0000-0002-2574-1636>

Olshanskaya Yu.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2352-7716>

Myakova N.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4779-1896>

Novichkova G.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2322-5734>

Литература

1. Alaggio R., Amador C., Anagnostopoulos I., Attygalle A.D., de Oliveira Araujo I.B., Berti E. et al. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Lymphoid Neoplasms. *Leukemia* 2022; 36 (7): 1720–48. DOI: 10.1038/s41375-022-01620-2
2. Mbulaiteye M., Biggar J., Bhatia K., Linet M.S., Devesa S.S. Sporadic childhood Burkitt lymphoma incidence in the United States during 1992–2005. *Pediatr Blood Cancer* 2009; 53: 366–70. DOI: 10.1002/pbc.22047
3. Reiter A., Schrappe M., Tiemann M., Ludwig W.D., Yakisan E., Zimmermann M. et al. Improved treatment results in childhood B-cell neoplasms with tailored intensification of therapy: a report of the Berlin–Frankfurt–Münster Group Trial NHL-BFM 90. *Blood* 1999; 94: 3294–306.
4. Murphy S.B. Classification, staging and end results of treatment of childhood non-Hodgkin's lymphomas: dissimilarities from lymphomas in adults. *Semin Oncol* 1980; 7: 332–9.
5. Maschan A., Myakova N., Aleinikova O., Abugova Y., Ponomareva N., Belogurova M. et al. Rituximab and

- reduced-intensity chemotherapy in children and adolescents with mature B-cell lymphoma: interim results for 231 patients enrolled in the second Russian-Belorussian multicentre study B-NHL-2010M. *Br J Haematol* 2019; 186 (3): 477–83. DOI: 10.1111/bjh.15944
6. Burmeister T., Schwartz S., Horst A., Rieder H., Gökbuget N., Hoelzer D. et al. Molecular heterogeneity of sporadic adult Burkitt-type leukemia/lymphoma as revealed by PCR and cytogenetics: correlation with morphology, immunology and clinical features. *Leukemia* 2005; 19: 1391–8. DOI: 10.1038/sj.leu.2403847
 7. Mussolin L., Basso K., Pillon M., D'Amore E.S., Lombardi A., Luzzatto L., et al. Prospective analysis of minimal bone marrow infiltration in pediatric Burkitt's lymphomas by long-distance polymerase chain reaction for t(8;14)(q24;q32). *Leukemia* 2003; 17 (3): 585–9. DOI: 10.1038/sj.leu.2402828
 8. Лавриненко В.А., Волочник Е.В., Фёдорова А.С., Алейникова О.В. Первичная диагностика и оценка минимальной диссеминированной и минимальной остаточной болезни путем определения перестройки с-МYC-IgH с помощью полимеразной цепной реакции длинных фрагментов при лимфоме/лейкозе Беркитта. *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии* 2016; 15 (4): 66–73. DOI: 10.20953/1726-1708-2016-4-66-73
 9. Mussolin L., Pillon M., Emanuele G., Conter V., Piglione M., Lo Nigro L., et al. Minimal Disseminated Disease in High-Risk Burkitt's Lymphoma Identifies Patients With Different Prognosis. *J Clin Oncol* 2011; 29 (13): 1779–84. DOI: 10.1200/JCO.2010.32.8161
 10. Scherer F., Kurtz M., Diehn M., Alizadeh A.A. High-throughput sequencing for noninvasive disease detection in hematologic malignancies. *Blood* 2017; 130: 440–52.
 11. Sánchez R., Ayala R., Martínez-López J. Minimal Residual Disease Monitoring with Next-Generation Sequencing Methodologies in Hematological Malignancies. *Int J Mol Sci* 2019; 20 (11): 2832.
 12. Sepulveda J., Seija N., Oppezio P., et al. The Antigen Receptor as a Driver of B-Cell Lymphoma Development and Evolution. In: Guenova M., Balatzenko G., eds. *Hematology – Latest Research and Clinical Advances*. London: IntechOpen; 2017.
 13. Ching T., Duncan E., Newman-Erkles T., McWhorter M.M.E., Tracy J.M., Steen M.S. et al. Analytical evaluation of the clonoSEQ Assay for establishing measurable (minimal) residual disease in acute lymphoblastic leukemia, chronic lymphocytic leukemia, and multiple myeloma. *BMC Cancer* 2020; 20 (1): 612. DOI: 10.1186/s12885-020-07077-9
 14. Onecha E., Linares M, Rapado I., Ruiz-Heredia Y., Martinez-Sanchez P., Cedena T., et al. A novel deep targeted sequencing method for minimal residual disease monitoring in acute myeloid leukemia. *Haematologica* 2019; 104 (2): 288–96. DOI: 10.3324/haematol.2018.194712
 15. Rossi D., Diop F., Spaccarotella E., Monti S., Zanni M., Rasi S., et al. Diffuse large B-cell lymphoma genotyping on the liquid biopsy. *Blood* 2017; 129 (14): 1947–57. DOI: 10.1182/blood-2016-05-719641
 16. Kennedy R., Schmitt W., Fox J., Nanjangud G., Chaganti R.S., Küppers R., et al. Detecting ultralow-frequency mutations by duplex sequencing. *Nat Protoc* 2014; 412 (6844): 341–6. DOI: 10.1038/35085588
 17. Pasqualucci L., Neumeister P., Goossens T., Nanjangud G., Chaganti R.S., Küppers R. et al. Hypermutation of multiple proto-oncogenes in B-cell diffuse large-cell lymphomas. *Nature* 2001; 412 (6844): 341–6. DOI: 10.1038/35085588
 18. Lauer M., Mutter J., Scherer F. Circulating tumor DNA in B-cell lymphoma: technical advances, clinical applications, and perspectives for translational research. *Leukemia* 2022; 36: 2151–64.
 19. Комков А.Ю., Мирошниченко А.М., Ольшеванская Ю.В., Мякова Ю.В., Дьяконова Ю.Ю., Минервина А.А. и др. Детекция перестроек иммуноглобулиновых генов при острых лимфобластных лейкозах с использованием высокопроизводительного секвенирования нового поколения. *Гематология и трансфузиология* 2016; 61 (4): 200–4. DOI: 10.18821/0234-5730-2016-61-4-200-204
 20. Sarkozy C., Huet S., Carlton E., Fabiani B., Delmer A., Jardin F. et al. The prognostic value of clonal heterogeneity and quantitative assessment of plasma circulating clonal IG-VDJ sequences at diagnosis in patients with follicular lymphoma. *Oncotarget* 2017; 8 (5): 8765–74. DOI: 10.18632/oncotarget.14448
 21. Kurtz M., Green R., Bratman V., Scherer F., Long Liu C., Kunder C.A., et al. Noninvasive monitoring of diffuse large B-cell lymphoma by immunoglobulin high-throughput sequencing. *Blood* 2015; 125 (24): 3679–87. DOI: 10.1182/blood-2015-03-635169