

ЛИМФОИДНЫЕ ОПУХОЛИ

LYMPHOID TUMORS

Эксцизионные кольца V(D)J-рекомбинации В- и Т-клеток как прогностический маркер при В-клеточном хроническом лимфолейкозе

V(D)J Recombination Excision Circles of B- and T-cells as Prognostic Marker in B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia

И.В. Образцов^{1,2}, М.А. Гордукова³, Н.А. Северина⁴, Б.В. Бидерман⁴, С.Ю. Смирнова⁴, А.Б. Судариков⁴, Е.А. Никитин⁵, А.Г. Румянцев¹

IV Obraztsov^{1,2}, MA Gordukova³, NA Severina⁴, BV Biderman⁴, SYu Smirnova⁴, AB Sudarikov⁴, EA Nikitin⁵, AG Rumyantsev¹

¹ ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, ул. Саморы Машела, д. 1, Москва, Российская Федерация, 117198

¹ Dmitrii Rogachev Federal Scientific Clinical Centre of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology under the Ministry of Health of the Russian Federation, 1 Samory Mashela str., Moscow, Russian Federation, 117198

² ФГБУ «Государственный научный центр колопроктологии им. А.Н. Рыжих» Минздрава России, ул. Салыма Адилы, д. 2, Москва, Российская Федерация, 123423

² AN Ryzhikh State Scientific Center for Coloproctology under the Ministry of Health of the Russian Federation, 2 Salyama Adilya str., Moscow, Russian Federation, 123423

³ ГБУЗ «ДГКБ № 9 им. Г.Н. Сперанского ДЗМ», Шмитовский пр-д, д. 29, Москва, Российская Федерация, 123317

³ GN Speranskii Municipal Children's Hospital No. 9, 29 Shmitovskii pr-d, Moscow, Russian Federation, 123317

⁴ ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России, Новый Зыковский пр-д, д. 4, Москва, Российская Федерация, 125167

⁴ Hematology Research Center under the Ministry of Health of the Russian Federation, 4a Novyi Zykovskii pr-d, Moscow, Russian Federation, 125167

⁵ ГБУЗ «ГКБ им. С.П. Боткина ДЗМ», 2-й Боткинский пр-д, д. 5, Москва, Российская Федерация, 125284

⁵ SP Botkin Municipal Clinical Hospital, 5 2-i Botkinskii pr-d, Moscow, Russian Federation, 125284

РЕФЕРАТ

ABSTRACT

Актуальность и цели. Эксцизионные кольца Т-клеточного рецептора (TREC*) и κ-делеционного элемента (KREC**) представляют собой внехромосомные структуры ДНК, формирующиеся в процессе V(D)J-рекомбинации и характеризующие разнообразие антигенного репертуара Т- и В-клеток. Цель — определить прогностическое значение эксцизионных колец при хроническом лимфолейкозе (ХЛЛ).

Background & Aims. T-cell receptor excision circles (TREC) and κ-deleting recombination excision circles (KREC) are extrachromosomal DNA segments generated during V(D)J recombination process that characterize the diversity of the antigen repertoire of T- and B-cells. The aim of our study is to identify the prognostic value of the excision circles in the chronic lymphocytic leukemia (CLL) setting.

Методы. В работе исследовали содержание эксцизионных колец методом ПЦР в реальном времени у 109 больных ХЛЛ высокого риска и у 16 условно здоровых лиц соответствующего возраста.

Methods. The excision circles' levels were assessed by means of real time PCR in 109 patients with high-risk CLL and 16 matched healthy individuals.

Результаты. Содержание KREC у больных ХЛЛ значимо ($p < 0,001$) снижено по сравнению с контрольной группой. Уровень TREC понижен в группах с немутантными генами варибельного региона иммуноглобулинов ($p < 0,05$), с делецией 11q ($p < 0,1$). Кроме того, показано повышенное ($p < 0,05$) содержание KREC у носителей мутации NOTCH1 по сравнению с пациентами без таковой. Исследование результатов терапии демонстрирует связь между высоким уровнем TREC и достижением полной ремиссии. Прогностическая ценность показателя подтверждена при ROC-анализе: $AUC_{TREC} = 0,713$ ($p = 0,001$).

Results. KREC levels were significantly ($p < 0.001$) lower in CLL patients vs. the reference group. TREC levels were lower in groups with unmutated status of immunoglobulin heavy chain variable region genes ($p < 0.05$) and 11q deletions ($p < 0.1$). Moreover, the KREC levels were higher in NOTCH1 mutation carriers than in noncarriers ($p < 0.05$). The comparison of treatment outcomes demonstrated a correlation between a high TREC level and achievement of complete remission. The prognostic value of the biomarker was confirmed by ROC-analysis: $AUC_{TREC} = 0.713$ ($p = 0.001$).

* TREC — T-cell Receptor Excision Circle.

** KREC — Kappa-deleting Recombination Excision Circle.

Заключение. Взаимосвязь между содержанием эксцизионных колец и прогностическими клинико-лабораторными факторами ХЛЛ, а также достижением полной ремиссии дает возможность использования теста для прогнозирования эффекта терапии.

Ключевые слова: ХЛЛ, TREC, KREC, наивные Т-лимфоциты, наивные В-лимфоциты, биомаркеры, предикторы исхода.

Получено: 10 ноября 2016 г.

Принято в печать: 13 января 2017 г.

Для переписки: Игорь Владимирович Образцов, младший научный сотрудник, ул. Саморы Машела, д. 1, Москва, Российская Федерация, 117997; e-mail: igor_obraztsov@bk.ru

Для цитирования: Образцов И.В., Гордукова М.А., Северина Н.А. и др. Эксцизионные кольца V(D)J-рекомбинации В- и Т-клеток как прогностический маркер при В-клеточном хроническом лимфолейкозе. Клиническая онкогематология. 2017;10(2):131–40.

DOI: 10.21320/2500-2139-2017-10-2-131-140

Conclusion. Association between excision circles' levels and clinical/laboratory CLL prognostic factors, as well as complete remission achievement, makes possible the implementation of the test for early prediction of the treatment outcome.

Key words: CLL, TREC, KREC, naive T-cells, naive B-cells, biomarkers, outcome predictors.

Received: November 10, 2016

Accepted: January 13, 2017

For correspondence: Igor' Vladimirovich Obraztsov, junior researcher, 1 Samory Mashela str., Moscow, Russian Federation, 117997; e-mail: igor_obraztsov@bk.ru

For citation: Obraztsov IV, Gordukova MA, Severina NA, et al. V(D)J Recombination Excision Circles of B- and T-cells as Prognostic Marker in B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia. Clinical oncohematology. 2017;10(2):131–40 (In Russ).

DOI: 10.21320/2500-2139-2017-10-2-131-140

ВВЕДЕНИЕ

Хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ) — самый частый лейкоз у взрослых, характеризующийся клональной экспансией В-лимфоцитов с фенотипом CD5+ IgD/M+. В основе патогенеза лежат дефект апоптоза в циркулирующих клетках ХЛЛ, находящихся в фазах G₀/G₁, и активная пролиферация клеток ХЛЛ, происходящая в специализированных нишах микроокружения, так называемых центрах пролиферации. Развитие ХЛЛ принципиально зависит от взаимодействия с клетками микроокружения. Так, клетки ХЛЛ индуцируют дифференцировку моноцитов в специфические клетки-«кормилицы» (nurse-like cells), наблюдающиеся только в микроокружении ХЛЛ, и влияют на распределение и функцию Т-клеток. В свою очередь, микроокружение обеспечивает жизнеспособность лейкозных клеток, поскольку выключение этого взаимодействия приводит к их гибели. Сегодня это не только лабораторный феномен. Выключение сигнальных путей, определяющих взаимодействие клеток ХЛЛ с клетками окружения, является частью механизма действия ингибиторов пути В-клеточного рецептора (BCR), активно применяемых в клинической практике [1–3].

Влияние клеток ХЛЛ на микроокружение приводит к развитию иммунодефицита, который наблюдается у всех пациентов с ХЛЛ и имеет разную степень выраженности. Этот иммунодефицит, в частности, подтверждается по гипогаммаглобулинемии, которая обнаруживается у 85 % больных [4]. Частота и степень гипогаммаглобулинемии зависят от давности болезни. Влияние ХЛЛ на Т-клеточный компартмент (область) значительно сложнее. В крови число Т-клеток у больных ХЛЛ обычно повышено за счет увеличения клеток CD8+. Напротив, в лимфатических узлах и костном мозге повышено число клеток CD4+. Несмотря на увеличение количества Т-клеток, они характеризуются глубоким дефектом функции (слабый ответ на митогены, aberrantная экспрессия молекул адгезии и активации, осла-

бленное образование иммунных синапсов, aberrantный профиль секреции цитокинов со сдвигом в сторону Th2-ответа). Предполагается, что эти изменения помогают опухолевому клону избежать иммунного ответа [5, 6].

Одним из способов характеристики иммунодефицита может оказаться количественная оценка содержания эксцизионных колец Т-клеточного рецептора (TREC, T-cell Receptor Excision Circle) и κ-делеционного элемента (KREC, Kappa-deleting Recombination Excision Circle) В-клеток. TREC представляют собой внехромосомные кольцевые эксцизионные продукты реаранжировки генов Т-клеточного рецептора (TCR) в процессе соматической рекомбинации ДНК, которая происходит по мере созревания Т-лимфоцитов в тимусе. TREC формируются в DN4-тимocyтах (двойных негативных) на этапе перестройки гена α-цепи TCR при рекомбинации элементов δRec и ψJα с последующим удалением локуса TCRδ. TREC определяются в тимocyтах и зрелых наивных Т-лимфоцитах, только что покинувших тимус (RTE, recent thymic emigrants) [7, 8]. Схематическое изображение формирования TREC представлено на рис. 1.

Аналогичен механизм формирования KREC в пре-В-лимфоцитах на этапе V(D)J-рекомбинации генов легких цепей иммуноглобулинов (IGK и IGL). После реаранжировки генов тяжелых цепей иммуноглобулинов запускается VJ-перестройка IGK-локуса. Если она оказывается непродуктивной, происходит рекомбинация между делеционным элементом IGK (IGKDEL) и одной из вышележащих рекомбинационных сигнальных последовательностей (RSS, recombination signal sequences), которая отключает аллель IGK и приводит к формированию эксцизионного кольца — KREC [9]. Схематическое изображение формирования KREC представлено на рис. 2.

Общая схема формирования TREC и KREC показана на рис. 3. TREC и KREC не реплицируются в процессе периферической экспансии; их относительное содержание в клеточной популяции падает по мере деления клеток. Количественное определение TREC и KREC применяется для оценки репертуара TCR и BCR

при диагностике первичных иммунодефицитов (различные формы тяжелой комбинированной иммунной недостаточности [10], агаммаглобулинемии [11]), мониторинге иммунореконституции после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток [12], а также при мониторинге эффективности антиретровирусной терапии у больных с ВИЧ-инфекцией [13].

Цель настоящей работы — количественное определение TREC и KREC методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени для оценки антигенного репертуара Т- и В-клеток у больных В-ХЛЛ с различными цитогенетическими и молекулярно-генетическими аномалиями, а также для определения их прогностической значимости.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Обследовано 109 пациентов с В-ХЛЛ в возрасте 56–60 лет перед началом терапии по протоколу FCR (флударабин, циклофосфамид, ритуксимаб) и 16 условно здоровых лиц 59–77 лет без острых воспалительных, аутоиммунных, гематологических и онкологических заболеваний в качестве контрольной группы. Все пациенты, принявшие участие в исследовании, дали письменное согласие на участие.

Обследование пациентов с ХЛЛ включало цитогенетические и молекулярно-генетические исследования на предмет выявления хромосомных aberrаций (делеции 13q14, 11q23 и 17p, трисомии 12) и мутаций генов *IGHV*, *TP53*, *NOTCH1*, *SF3B1*. Клинически оценивали стадию заболевания по Binet и исходы лечения. Количественная оценка TREC и KREC выполнена методом ПЦР в реальном времени («БиТ-тест», Новосибирск, РФ [14]). Экстракцию ДНК из цельной крови проводили с помощью комплекта реагентов «АмплиПрайм РИБО-преп» (ООО «НекстБио»). Объем клинического материала для экстракции ДНК составлял 100 мкл, элюцию также проводили в 100 мкл РНК-буфера. Для количественной оценки молекул TREC и KREC использовали ПЦР в режиме реального времени с условиями, описанными в инструкции к набору реагентов. Программа амплификации включала стадию активации Taq-полимеразы в течение 15 мин при температуре 95° С, затем 45 циклов: 95° С — 10 с, 61° С — 30 с, 72° С — 15 с с детекцией флуоресцентного сигнала на стадии гибридизации праймеров. Амплификацию проводили на приборе CFX-96 (Bio-rad). Количество копий TREC (KREC) рассчитывали на 10⁵ ядродержащих клеток (лейкоцитов) с учетом внутреннего контроля IL17RA по формуле:

$$\text{Количество TREC (KREC)} = \left[\frac{\text{число копий TREC (KREC)}}{\text{на 1 мл}} / \frac{\text{число копий IL17RA}}{\text{(1 - доля клеток ХЛЛ)}} \right] \times 200\,000.$$

Статистическая обработка данных проводилась с помощью программного обеспечения SPSS 19 (IBM, США). Рассчитаны медианы, межквартильные интервалы, средние значения и доверительный интервал для средних: $\bar{x}_{cp} \pm Z_{1/2} \times \sigma / \sqrt{n}$ ($p = 0,05$). Значимость различий средних величин оценивали на основании *t*-критерия Стьюдента с поправкой Бонферрони; медиан — на основании *U*-критерия Манна—Уитни.

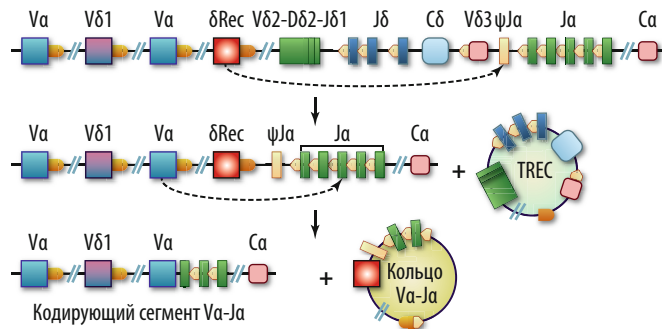


Рис. 1. Формирование TREC (цит. по [14]). Рекомбинация ДНК происходит при объединении V-, D-, J-сегментов и осуществляется комплексом рекомбиназ. Рекомбиназы «узнают» последовательности, фланкирующие каждый из сегментов V, D, J (так называемые рекомбинационные сигнальные последовательности — RSS). Рекомбиназы расщепляют ДНК между гептамером и окончанием кодирующей последовательности нужного гена; вычлняется сигнальный сегмент (SJ) V-D и формируется функциональный экзон V(D)J. RSS, находящиеся на концах сегмента V-D, соединяются друг с другом, что приводит к формированию внехромосомного циркулярного эксцизионного продукта (TREC)

Fig. 1. The formation of TREC (adapted from [14]). DNA recombination is performed by recombinases and involves the fusion of V, D, and J gene segments. Recombinases recognize the sequences at both sides of V, D, and J gene segments (so called recombination signal sequences — RSS). Recombinases split the DNA between the heptamer and terminal gene sequences with the formation of signal segment (SJ) V-D and functional V(D)J exon. RSS at the ends of the V-D segment fuse together, which results in the extrachromosomal T-cell receptor excision circle (TREC)

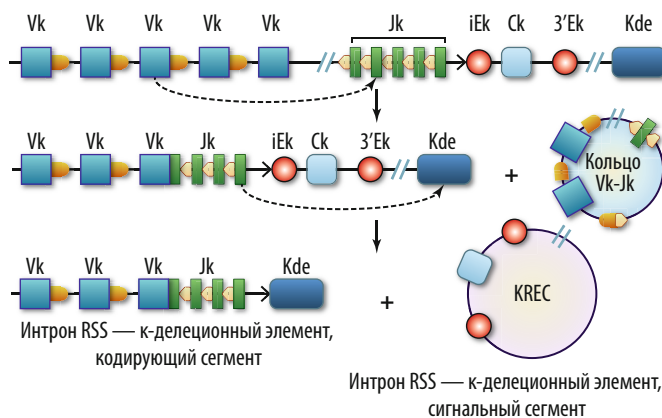


Рис. 2. Формирование KREC (цит. по [14]). Кодирующая ДНК для вариабельной части каждой из цепей иммуноглобулина собирается из сегментов, извлекаемых из отдельных V-, D- и J-кластеров. Формирование KREC происходит после реаранжировки гена тяжелой цепи при неэффективной реаранжировке генов IGK-локуса (в одном или обоих аллелях). Нефункциональный IGK-локус подвергается делеции в составе к-делеционного элемента, включающего C-, V- и J-фрагменты. к-делеционный элемент взаимодействует с рекомбинационными сигнальными последовательностями (RSS) благодаря работе рекомбиназ; формируется функциональный кодирующий фрагмент (CJ) и кольцевая сигнальная (SJ) некодирующая последовательность (KREC)

Fig. 2. The formation of KREC (adapted from [14]). The coding DNA for the variable regions of each immunoglobulin chain is formed from the V-, D-, and J-clusters. The KREC results from the ineffective rearrangement of IGK-locus in the heavy-chain gene (in one or both alleles). Non-functional IGK-locus is deleted as part of κ-deleting element, which includes C, V, and J gene fragments. Kappa-deleting element interacts with recombination signal sequences (RSS) by means of recombinase activity. This interaction results in functional coding fragment (CJ) and circular signal (SJ) non-coding sequence (KREC)

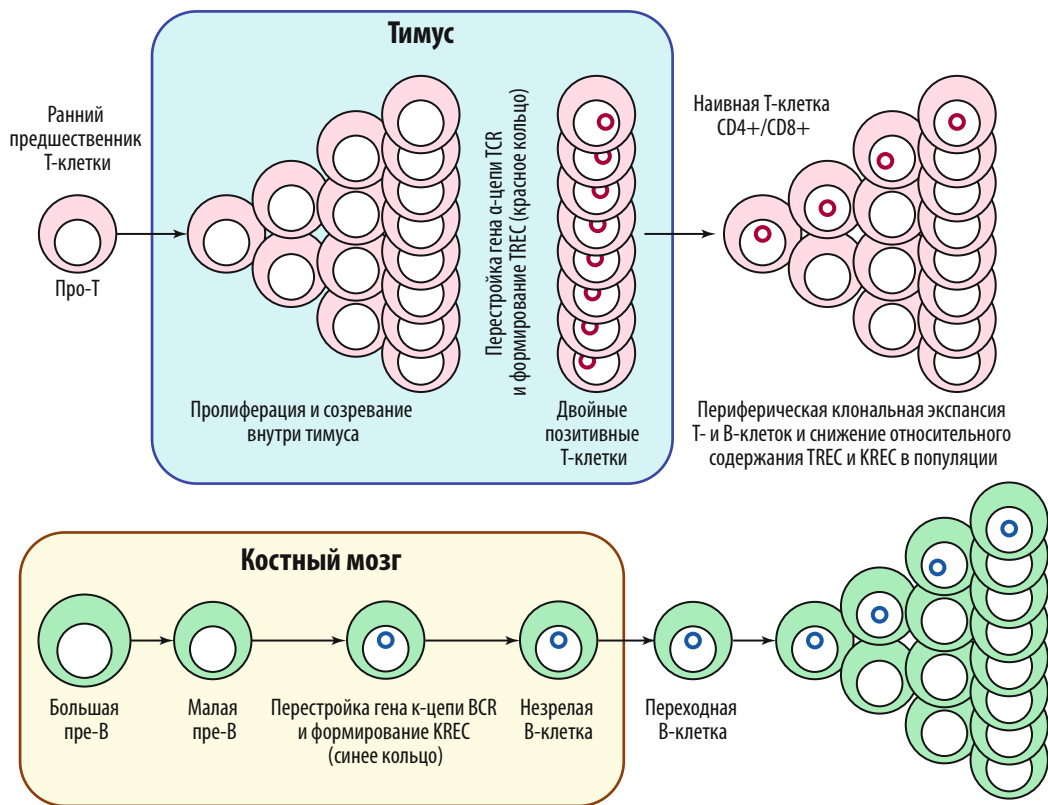


Рис. 3. Общая схема формирования TREC и KREC

Fig. 3. General pattern of TREC and KREC formation

РЕЗУЛЬТАТЫ

В группе пациентов с ХЛЛ среднее содержание TREC составило 1533 ± 499 копий (медиана 525 копий), KREC — 1684 ± 560 копий. Средний уровень TREC в контрольной группе значимо не отличался от такового у больных ХЛЛ и был равен 1503 копиям. Напротив, средний уровень KREC оказался статистически значимо ($p < 0,001$) выше и составил $19\ 009 \pm 9313$ копий (рис. 4, табл. 1).

Мутационный статус генов *IGHV* определен у 77 пациентов. У 28 (33,8 %) человек диагностирован вариант с мутациями *IGHV*-генов, у 51 (66,2 %) — вариант без мутаций *IGHV*-генов. У больных с мутациями среднее содержание TREC составило 1824 ± 792 копии, что статистически значимо ($p < 0,05$ для *t*-критерия и $p < 0,1$ для *U*-критерия) выше по сравнению с группой пациентов без мутаций (1427 ± 613 копий) (рис. 5).

Делеция 13q14 выявлена у 53 (48,6 %) из 109 обследованных больных; из них в сочетании с делецией 11q23 — у 8 (15,1 %), с трисомией 12 — у 1 (1,9 %), с делецией 17p — у 4 (7,5 %). Кроме того, *del(13q14)* сочеталась с мутациями *SF3B1* и *NOTCH1* в 7 (13,2 %) случаях каждая, с мутацией *TP53* — в 6 (11,3 %). Среднее содержание TREC и KREC у больных с *del(13q14)* составило 1440 ± 627 и 1457 ± 682 копии соответственно и статистически значимо не отличалось от такового у пациентов без аномалии (1225 ± 462 копии TREC и 2003 ± 505 копий KREC). Доля клеток ХЛЛ с делецией составила $80,5 \pm 5,4$ %. Следует отметить, что выявлена статистически значимая ($p < 0,05$) слабая обратная взаимосвязь ($\eta = -0,21$) между долей клеток с *del(13q14)* и количеством TREC. Это свидетельствует о сокращении антигенного репертуара TCR при увеличении количества клеток с *del(13q14)*. Корреляции между количеством KREC и содержанием *del(13q14)* не выявлено.

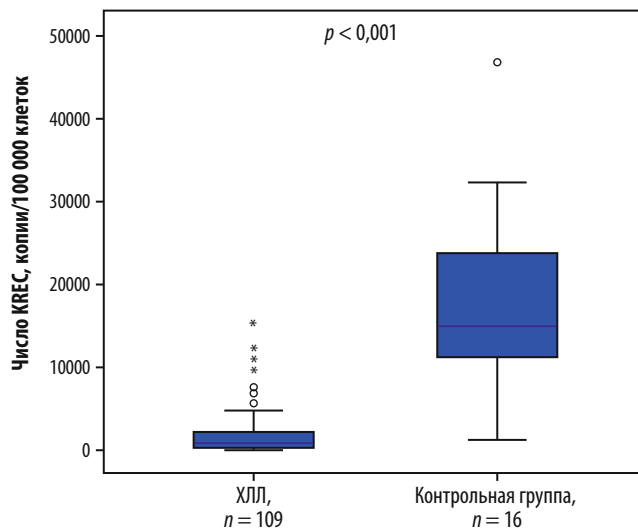


Рис. 4. Содержание KREC у больных ХЛЛ и в контрольной группе

Fig. 4. KREC levels in CLL patients and healthy controls

Таблица 1. Уровень TREC и KREC у больных ХЛЛ и в контрольной группе

	Больные ХЛЛ, n = 109		Контрольная группа, n = 16	
	TREC	KREC	TREC	KREC
1-й квартиль	15	0	46	8338
Медиана	525	390	630	15 019
3-й квартиль	2034	1871	871	28 001
Межквартильный интервал	2019	1871	826	19 664
Среднее	1565	1475	1503	19 009
Доверительный интервал ($p = 0,05$)	1021–2107	943–2008	0–3995	8052–29 966

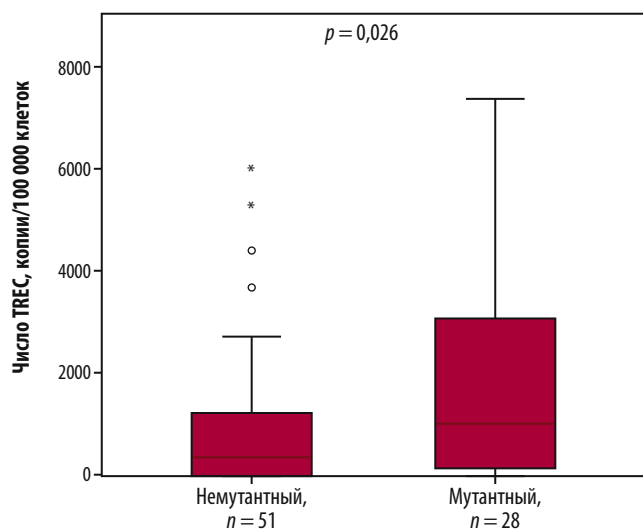


Рис. 5. Содержание TREC у больных ХЛЛ с мутациями и без них

Fig. 5. TREC levels in patients with mutated and unmutated CLL

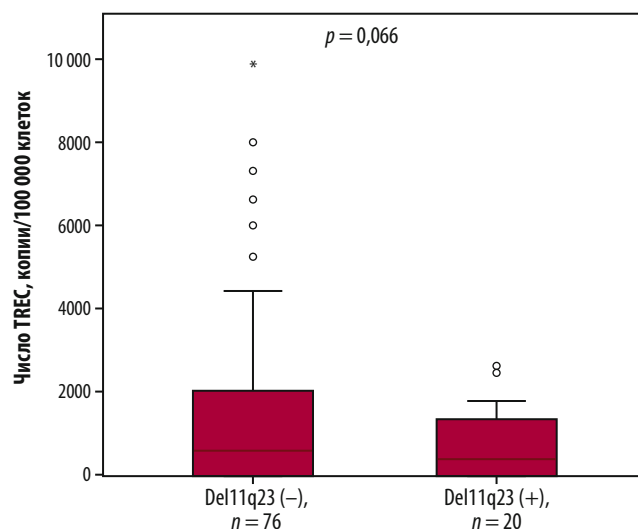


Рис. 6. Содержание TREC у пациентов с делецией 11q23 и без нее

Fig. 6. TREC levels in patients with and without 11q23 deletion

У 20 (18,3 %) пациентов обнаружена делеция 11q23. В одном наблюдении del(11q23) сочеталась с трисомией 12. Из тестируемых молекулярно-генетических нарушений в этой группе выявлено 2 (10 %) случая мутации *SF3B1* и 3 (15 %) — мутации *NOTCH1*. Мутации *TP53* не определялись. Средний уровень TREC в группе с del(11q23) составил 550 ± 380 копий, что статистически значимо ($p = 0,066$) ниже, чем в общей группе (рис. 6). Количество KREC в общих группах с del(11q23) и без нее значимо не различалось и составило 2705 ± 1765 и 1522 ± 615 копий соответственно. Доля клеток с del(11q23) составила $76,3 \pm 10,6$ %, корреляции между количеством TREC и KREC не выявлены. Таким образом, можно сделать вывод о том, что наличие del(11q23) связано с угнетением продукции наивных Т-клеток тимусом, однако увеличение количества aberrаций в клетках ХЛЛ не приводит к усилению данного эффекта.

Трисомия 12 выявлена в 13 случаях (11,9 % общей выборки), 5 (38,5 %) из которых сопровождалась мутацией *NOTCH1*. Уровень TREC в группе пациентов с трисомией 12 составляет в среднем 2038 ± 1292 копии, что превосходит значение показателя в группе без трисомии 12 (1216 ± 412 копий), однако это различие статистически незначимо. Количество KREC в указанных группах составляет 1377 ± 1238 и 1785 ± 670 копий соответственно. Содержание клеток с трисомией 12 в исследуемой группе составило $69,5 \pm 11,7$ %. Как и в случае с делецией 11q23, корреляции между содержанием клеток с трисомией 12 и количеством эксцизионных колец не обнаружены.

Делеция 17p выявлена у 9 (8,3 %) из 109 больных. Медиана содержания TREC и KREC в группе пациентов с del(17p) равна 613 и 0 копий соответственно. Содержание клеток с делецией составило $67,7 \pm 22,6$ %, причем выявлена отрицательная корреляция средней степени между числом клеток с делецией и уровнем TREC ($\eta = -0,38$; $p < 0,1$). Это говорит о подавлении продукции наивных Т-клеток в тимусе и сокращении антигенного репертуара TCR при увеличении количества клеток с del(17p) при ХЛЛ. Мутации *TP53* обнаружены у 8 (88,9 %) из 9 больных с del(17p). В 1 (11,1 %) наблюдении del(17p) сочеталась с мутацией *NOTCH1*.

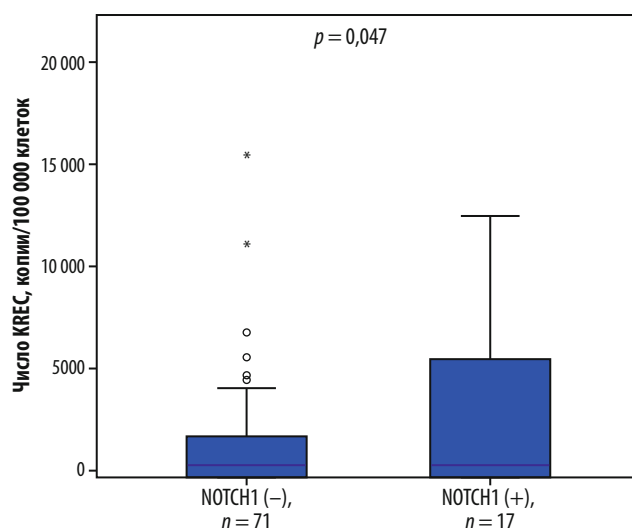


Рис. 7. Содержание KREC у пациентов с мутациями *NOTCH1* и без них

Fig. 7. KREC levels in patients with and without *NOTCH1* mutations

Мутации *SF3B1* выявлены у 14 (12,8 %) из 109 пациентов. В группе с мутациями медиана количества эксцизионных колец составляет 340 копий TREC и 348 копий KREC, что статистически значимо не отличается от показателя в общей группе без мутаций (439 копий TREC и 328 копий KREC). Это свидетельствует об отсутствии влияния мутации *SF3B1* в лейкозных клетках на продукцию наивных Т- и В-клеток тимусом и костным мозгом. В 1 (7,1 %) наблюдении мутация *SF3B1* сопровождалась мутацией *NOTCH1*. Мутации *TP53* в группе с *SF3B1* не зарегистрированы.

Из 109 обследованных больных мутации *NOTCH1* выявлены в 17 (15,6 %) случаях. Медиана уровней TREC и KREC в этой группе составила 92 и 116 копий соответственно. Среднее содержание KREC значимо ($p < 0,05$ для *t*-критерия) выше по сравнению с группой пациентов без мутаций *NOTCH1* (рис. 7). В 1 (5,9 %) наблюдении мутация *NOTCH1* сопровождалась мутацией *TP53*.

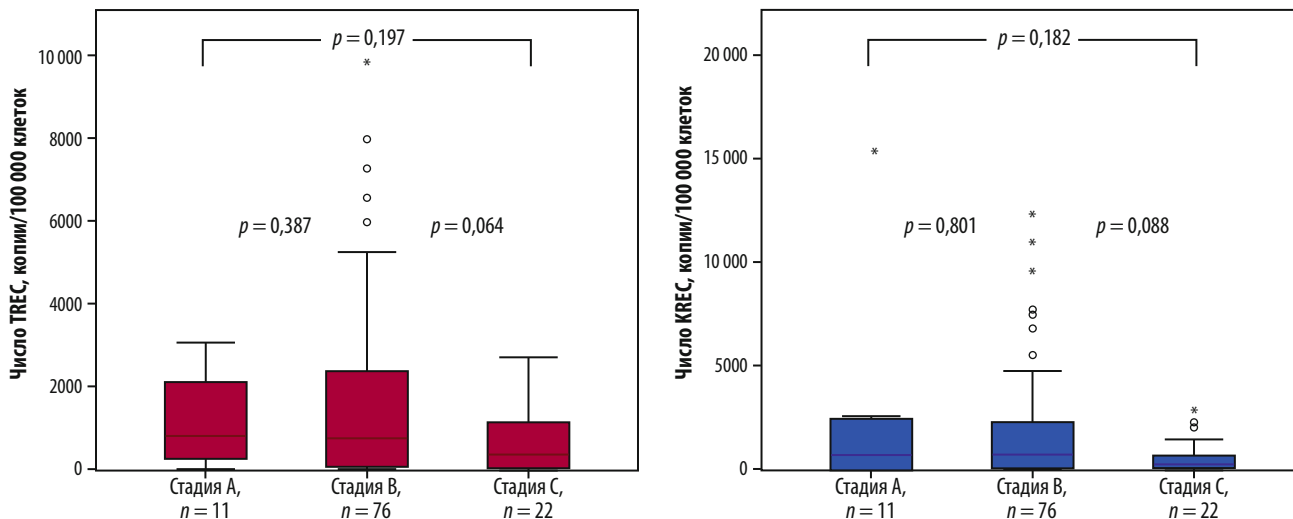


Рис. 8. Содержание TREC и KREC у больных с различными стадиями ХЛЛ по Binet

Fig. 8. TREC and KREC levels in patients with different Binet stages of CLL

Мутации *TP53* выявлены у 11 (10 %) больных. Средний уровень TREC и KREC в этой группе пациентов значимо не отличался от такового в общей группе без мутаций *TP53* и составил 1025 и 3244 копии соответственно. Сводные данные по цитогенетическим и молекулярным аномалиям представлены в табл. 2.

При клинической оценке активности ХЛЛ (рис. 8) стадия А установлена у 11 (10 %) больных, стадия В — у 76 (69,7 %) и С — у 22 (20,3 %). Медианы содержания эксцизионных колец составили 613 копий TREC и 52 копии KREC при стадии А, 580 копий TREC и 547 копий KREC при стадии В и 176 копий TREC и 3 копии KREC при стадии С, причем снижение содержания TREC и KREC, сопровождающее стадию С, оказалось статистически значимым ($p < 0,1$ для *t*-критерия и *U*-критерия).

Мы также оценили содержание эксцизионных колец при различных клинических исходах после проведения специфического лечения (рис. 9). Все пациенты получили в среднем 5 циклов по протоколу FCR. При этом отсутствие ответа наблюдалось в 16 случаях. Медиана содержания TREC и KREC в группе с отсутствием ответа оказалась равна 259 и 0 копий соответственно. Частичная ремиссия достигнута у 29 больных. Еще у 11 пациентов констатирована частичная ремиссия с минимальной остаточной болезнью (МОБ). Медиана содержания TREC в этих группах составила соответственно 219 и 335 копий; KREC — 380 и 433 копии. Полная ремиссия, наблюдавшаяся у 36 больных, сопровождалась наиболее высоким уровнем TREC (среднее значение 2089 ± 768 копий, медиана 1242 копии), что статистически значимо выше по сравнению с показателем в группах с отсутствием ответа ($p < 0,01$ для *t*-критерия и $p < 0,1$ для *U*-критерия) и с частичной ремиссией ($p < 0,05$ для *t*-критерия и $p < 0,01$ для *U*-критерия). Наличие МОБ на фоне полной ремиссии, зарегистрированное у 4 пациентов, также коррелировало со значимым ($p < 0,001$ для *t*-критерия и $p < 0,05$ для *U*-критерия) снижением числа TREC (медиана 53 копии). Медианы KREC в группах полной ремиссии с МОБ и без нее составили 619 и 824 копии соответственно. До начала специфической терапии от пневмонии умерло 2 пациента; у одного из них эксцизи-

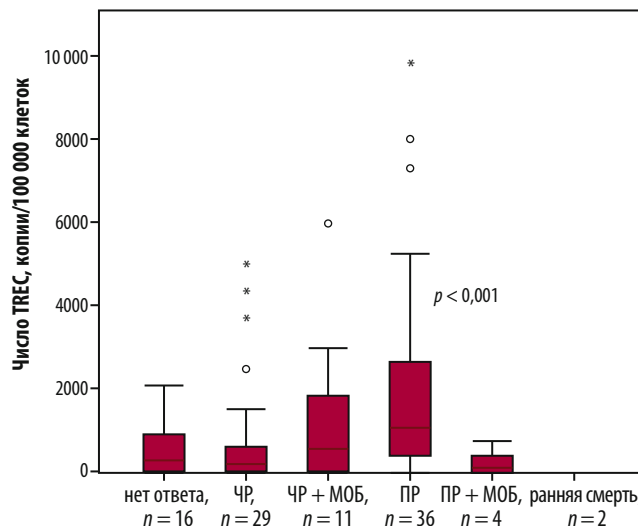


Рис. 9. Содержание TREC у больных ХЛЛ с различным исходом МОБ — минимальная остаточная болезнь; ПР — полная ремиссия; ЧР — частичная ремиссия.

Fig. 9. TREC levels in CLL patients with different clinical outcomes МОБ — minimal residual disease; ПР — complete remission; ЧР — partial remission.

онные кольца отсутствовали вовсе, у другого — уровень TREC составил 17 копий, KREC — 219 копий. Содержание эксцизионных колец в группах с различными клиническими характеристиками представлено в табл. 3.

ROC-анализ (рис. 10) подтвердил прогностическую значимость TREC в контексте возможности достижения полной ремиссии без МОБ: площадь под кривой для TREC составила 0,713 ($p = 0,001$), для KREC — 0,556 ($p = 0,376$).

ОБСУЖДЕНИЕ

В данной работе мы исследовали содержание TREC и KREC в группе первичных больных ХЛЛ, имеющих показания к началу терапии. Мы показываем, что по

Таблица 2. Уровни TREC и KREC в группах с различными цитогенетическими и молекулярными аномалиями

	TREC	KREC	TREC	KREC
	ХЛЛ с мутациями, n = 28		ХЛЛ без мутаций, n = 58	
1-й квартиль	134	0	0	0
Медиана	640	595	219	259
3-й квартиль	2577	1809	929	788
Межквартильный интервал	2443	1809	929	788
Среднее	1824	974	1427	1940
Доверительный интервал (p = 0,05)	1032–2616	585–1363	814–2040	1206–2674
	Del 13q14 (-), n = 51		Del 13q14 (+), n = 53	
1-й квартиль	0	0	0	0
Медиана	449	142	252	540
3-й квартиль	1520	1120	1164	1522
Межквартильный интервал	1520	1120	1164	1522
Среднее	1225	2003	1440	1457
Доверительный интервал (p = 0,05)	763–1687	1498–2508	813–2067	775–2139
	Del 11q23 (-), n = 85		Del 11q23 (+), n = 20	
1-й квартиль	8	0	0	0
Медиана	457	378	112	322
3-й квартиль	1577	1176	879	2128
Межквартильный интервал	1569	1176	879	2128
Среднее	1754	1522	550	2705
Доверительный интервал (p = 0,05)	1128–2380	907–2137	170–930	940–4470
	Tris 12 (-), n = 92		Tris 12 (+), n = 11	
1-й квартиль	0	0	132	0
Медиана	274	377	542	381
3-й квартиль	1227	1577	2113	833
Межквартильный интервал	1227	1577	1982	833
Среднее	1216	1785	2038	1377
Доверительный интервал (p = 0,05)	804–1628	1115–2455	746–3330	139–2615
	Del 17p (-), n = 100		Del 17p (+), n = 9	
1-й квартиль	16	0	0	0
Медиана	516	433	613	0
3-й квартиль	2012	2019	2413	784
Межквартильный интервал	1996	2019	2413	784
Среднее	1534	1585	1517	2966
Доверительный интервал (p = 0,05)	978–2090	1008–2162	289–2745	0–6548
	SF3B1 (-), n = 81		SF3B1 (+), n = 14	
1-й квартиль	13	0	8	2
Медиана	439	328	340	348
3-й квартиль	1598	1248	1257	2387
Межквартильный интервал	1585	1248	1250	2386
Среднее	1494	1794	1005	1047
Доверительный интервал (p = 0,05)	1004–1984	1053–2535	176–1834	305–1789
	NOTCH1 (-), n = 77		NOTCH1 (+), n = 17	
1-й квартиль	49	0	0	0
Медиана	457	380	92	116
3-й квартиль	1645	1577	618	828
Межквартильный интервал	1596	1577	618	828
Среднее	1643	1425	922	3128
Доверительный интервал (p = 0,05)	1041–2245	835–2015	131–1713	951–5305
	TP53 (-), n = 84		TP53 (+), n = 11	
1-й квартиль	16	0	0	0
Медиана	437	378	661	0
3-й квартиль	1308	1600	2279	1119
Межквартильный интервал	1291	1600	2279	1119
Среднее	1566	1545	1025	3244
Доверительный интервал (p = 0,05)	1008–2124	988–2102	327–1723	132–6356

Таблица 3. Уровни TREC и KREC в группах больных ХЛЛ с различными клиническими характеристиками

	TREC	KREC	TREC	KREC	TREC	KREC
	Стадия А, n = 11		Стадия В, n = 76		Стадия С, n = 22	
1-й квартиль	183	0	41	0	0	0
Медиана	613	52	580	547	176	3
3-й квартиль	2291	2443	2423	1928	1614	1023
Межквартильный интервал	2108	2443	2382	1928	1614	1023
Среднее	1163	2306	1580	1861	1713	605
Доверительный интервал ($p = 0,05$)	272–2054	0–6172	1047–2113	991–2168	0–3502	121–1089
	Нет ответа, n = 16		Частичная ремиссия, n = 29		Частичная ремиссия + МОБ, n = 11	
1-й квартиль	44	0	0	16	15	3
Медиана	259	0	219	380	335	433
3-й квартиль	1140	210	902	2420	2681	2247
Межквартильный интервал	1096	210	902	2404	2666	2244
Среднее	583	546	843	1346	1271	1134
Доверительный интервал ($p = 0,05$)	0–1226	0–1745	304–1382	531–2161	0–2558	139–2128
	Полная ремиссия, n = 36		Полная ремиссия + МОБ, n = 4		Ранняя смерть, n = 2	
1-й квартиль	424	0	0	0	0	0
Медиана	1242	619	53	824	9	109
3-й квартиль	2677	1545	596	2350	Нет данных	Нет данных
Межквартильный интервал	2253	1545	596	2350	Нет данных	Нет данных
Среднее	2089	1599	216	1058	9	109
Доверительный интервал ($p = 0,05$)	1271–2906	668–2529	0–798	0–3095	0–120	0–3095

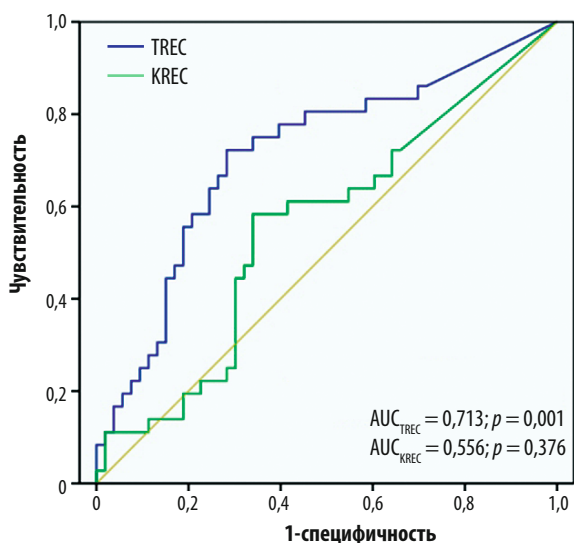


Рис. 10. ROC-кривые. В качестве положительного события выбрано достижение полной ремиссии без МОБ
AUC — площадь под кривой.

Fig. 10. ROC curves. Achievement of complete remission without MRD was chosen as a positive event
AUC — area under curve.

сравнению с контрольной группой лиц, не страдающих онкогематологическими и аутоиммунными заболеваниями, у больных ХЛЛ наблюдается существенное снижение числа эксцизионных колец, образующихся во время V(D)J-рекомбинации *IGHV*. Эти данные подтверждают наблюдение M. Motta и соавт. [15] о снижении интенсивности продукции наивных В-клеток у пациентов с ХЛЛ.

Резюмируя полученные данные, можно выделить две группы факторов, связанных с количеством эксцизионных колец TCR и BCR как индикаторов их

антигенного репертуара. Эти факторы характеризуют функциональную активность тимуса и костного мозга, с одной стороны, и воздействие лейкозных клеток — с другой. Со стороны клеток ХЛЛ к таким факторам, согласно нашим данным, относится мутационный статус *IGHV*, делеции 11q23, а также мутации *NOTCH1*. При этом немутантные гены *IGHV* и *del(11q23)*, ассоциированные с менее благоприятным клиническим прогнозом, связаны с угнетением процесса V(D)J-рекомбинации в созревающих наивных Т-клетках. Вариант ХЛЛ с мутациями *IGHV*-генов, напротив, характеризуется более высоким уровнем TREC, что свидетельствует о меньшей степени дисфункции Т-клеток и большем антигенном репертуаре TCR при прогностически более благоприятном варианте ХЛЛ. Полученные данные доказывают роль дисфункции Т-клеточного звена в патогенетическом эффекте обозначенных внутриклеточных событий при ХЛЛ. Эта дисфункция может быть обусловлена формированием патологических клонов Т-клеток [16].

Вторая группа факторов, воздействующих на функциональную активность тимуса, включает возраст и сопутствующие заболевания. Пожилой возраст сам по себе является неблагоприятным прогностическим фактором ХЛЛ. Пожилые пациенты обычно страдают большим количеством сопутствующих заболеваний, препятствующих проведению интенсивного лечения [17]. Доказано снижение числа TREC, сопровождающее уменьшение разнообразия репертуара Т-клеток, по мере увеличения возраста здоровых лиц, включенных в исследование [18]. В обследованной нами общей выборке больных ХЛЛ подтверждена обратная взаимосвязь между содержанием TREC и возрастом пациентов ($\eta = -0,35$; $p < 0,01$), которая оказалась еще сильнее в однородной группе пациентов со стадией В ($\eta = -0,41$; $p < 0,01$). В связи с этим правомерно утверждать, что со-

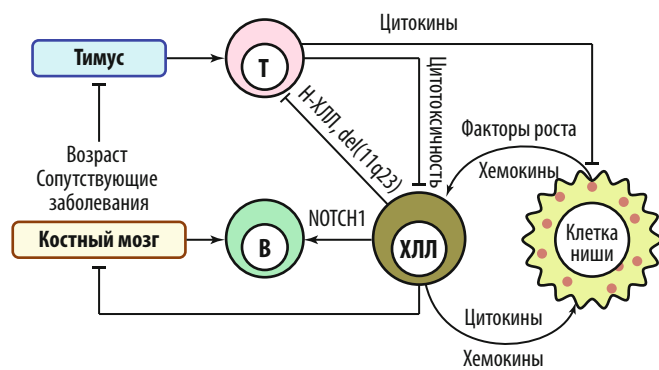


Рис. 11. Концептуальная схема взаимодействия ХЛЛ и центральных иммунных органов
Н-ХЛЛ — немутантный ХЛЛ.

Fig. 11. Conceptual scheme of interactions between CLL and central immune organs
Н-ХЛЛ — unmutated CLL.

крашение широты репертуара TCR с возрастом служит одним из неблагоприятных факторов у больных ХЛЛ.

Полученные результаты позволяют предложить концептуальную схему патологического взаимодействия лейкозного клона с Т- и В-клетками организма хозяина (рис. 11). Так, выживание и пролиферация клеток ХЛЛ реализуются клетками ниши, обменивающимися с опухолевой клеткой сигналами в форме цитокинов и хемокинов. Контроль над заболеванием и достижение стойкой ремиссии обеспечиваются благодаря уничтожению клеток ХЛЛ Т-цитотоксическими лимфоцитами и подавлению протективного влияния клеток ниши Т-хелперами. При этом эффективная работа Т-клеточного звена возможна только при наличии широкого антигенного репертуара TCR. Сужение антигенного репертуара происходит как из-за дефицита функции тимуса, обусловленного возрастом, так и вследствие формирования патологических функционально неполноценных Т-клеточных клонов за счет воздействия лейкозных клеток, несущих немутантные гены *IGHV* или делеции 11q23. В результате происходит ослабление противоопухолевого иммунного надзора и, как следствие, уход лейкозного клона от иммунного ответа, проявляющийся в виде полной или частичной рефрактерности к лечению либо персистенции МОБ. Подавление созревания полноценных наивных В-клеток в костном мозге вносит дополнительный вклад в развитие инфекционных осложнений у больных ХЛЛ, также способствующих сокращению антигенного репертуара TCR.

Таким образом, антигенный репертуар Т-клеток представляет интерес как прогностический фактор при ХЛЛ, поскольку является комплексным индикатором воздействия лейкозных клеток и факторов пациента. Это подтверждается нашими данными о повышенном содержании TREC у больных, достигших полной ремиссии после лечения по схеме FCR, а также результатами ROC-анализа.

Возможность прогностического использования KREC пока находится под вопросом. Не выявлено взаимосвязи ни с клиническими данными, ни с большинством лабораторных показателей. Отмеченное расширение репертуара BCR при наличии мутаций *NOTCH1* требует

дальнейшего исследования. Однако обнаружено значительное сужение репертуара В-клеток у больных ХЛЛ в общей группе, что может быть следствием как подавления продукции нормальных В-клеток, так и их клональной периферической пролиферации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты демонстрируют взаимосвязь между содержанием эксцизионных колец и прогностическими клинико-лабораторными факторами ХЛЛ. Неблагоприятные факторы прогноза, включающие мутантный статус *IGHV*-генов, наличие делеции 11q23, а также увеличение содержания клеток ХЛЛ с делециями 13q14 и 17p, связаны с уменьшением количества TREC. Кроме того, стадия С по Binet сопровождается статистически значимым сокращением содержания как TREC, так и KREC. Выявленная ассоциация между содержанием TREC и достижением полной ремиссии дает возможность использовать предлагаемый анализ для раннего прогнозирования эффекта терапии.

КОНФЛИКТЫ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование не имело спонсорской поддержки.

ВКЛАД АВТОРОВ

Концепция и дизайн: И.В. Образцов.

Сбор и обработка данных: И.В. Образцов, М.А. Гордукова, Н.А. Северина, Б.В. Бидерман, С.Ю. Смирнова.

Предоставление материалов исследования: И.В. Образцов, М.А. Гордукова, Н.А. Северина, Б.В. Бидерман, С.Ю. Смирнова, Е.А. Никитин.

Анализ и интерпретация данных: И.В. Образцов, Н.А. Северина, Б.В. Бидерман, С.Ю. Смирнова.

Подготовка рукописи: И.В. Образцов, А.Б. Судариков, Е.А. Никитин.

Окончательное одобрение рукописи: А.Б. Судариков, Е.А. Никитин.

Административная поддержка: А.Г. Румянцев.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают искреннюю признательность академику РАН, д-ру мед. наук, профессору А.Г. Румянцеву за неоценимую помощь в проведении исследования и подготовке статьи.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Rai KR, Jain P. Chronic lymphocytic leukemia (CLL)-Then and now. *Am J Hematol.* 2016;91(3):330–40. doi: 10.1002/ajh.24282.

2. Nicholas NS, Apollonio B, Ramsay AG. Tumor microenvironment (TME)-driven immune suppression in B cell malignancy. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1863(3):471–82. doi: 10.1016/j.bbamcr.2015.11.003.
3. Ohshima K. Molecular Pathology of Adult T-Cell Leukemia/Lymphoma. *Oncology*. 2015;89(Suppl 1):7–15. doi: 10.1159/000431058.
4. Best OG, Crassini K, Freeman JA, Mulligan SP; CLL Australian Research Consortium. The clinical significance of hypogammaglobulinaemia and serum immunoglobulin G subclass deficiency in patients with chronic lymphocytic leukaemia (CLL). *Scand J Infect Dis*. 2013;45(9):729. doi: 10.3109/00365548.2013.809477.
5. Riches JC, Gribben JG. Understanding the immunodeficiency in chronic lymphocytic leukemia: potential clinical implications. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2013;27(2):207–35. doi: 10.1016/j.hoc.2013.01.003.
6. Davis JE, Ritchie DS. The passive-aggressive relationship between CLL-B cells and T cell immunity. *Leuk Res*. 2014;38(10):1160–1. doi: 10.1016/j.leukres.2014.08.005.
7. Toubert A, Glauzy S, Douay C, et al. Thymus and immune reconstitution after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in humans: never say never again. *Tissue Antigens*. 2012;79(2):83–9. doi: 10.1111/j.1399-0039.2011.01820.x.
8. Pai S-Y. The Immune Response. In: Nathan and Oski's Hematology of Infancy and Childhood. Philadelphia: Elsevier; 2009. pp. 1221–53.
9. Mensen A, Ochs C, Stroux A, et al. Utilization of TREC and KREC quantification for the monitoring of early T- and B-cell neogenesis in adult patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *J Transl Med*. 2013;11(1):188. doi: 10.1186/1479-5876-11-188.
10. Ravkov E, Slev P, Heikal N. Thymic output: Assessment of CD4+ Recent Thymic Emigrants and T-Cell Receptor Excision Circles in Infants. *Cytometry B Clin Cytom*. 2015. doi: 10.1002/cyto.b.21341. [Epub ahead of print]
11. de Felipe B, Olbrich P, Lucenas JM, et al. Prospective neonatal screening for severe T- and B-lymphocyte deficiencies in Seville. *Pediatr Allergy Immunol*. 2016;27(1):70–7. doi: 10.1111/pai.12501.
12. Politikos I, Kim HT, Nikiforow S, et al. IL-7 and SCF Levels Inversely Correlate with T Cell Reconstitution and Clinical Outcomes after Cord Blood Transplantation in Adults. *PLoS One*. 2015;10(7):e0132564. doi: 10.1371/journal.pone.0132564.
13. Drylewicz J, Vrsekoop N, Mugwagwa T, et al. Reconciling Longitudinal Naive T-Cell and TREC Dynamics during HIV-1 Infection. *PLoS One*. 2016;11(3):e0152513. doi: 10.1371/journal.pone.0152513.
14. Гордукова М.А., Оскорбин И.П., Мишукова О.В. и др. Разработка набора реагентов для количественного определения молекул ДНК TREC и KREC в цельной крови и сухих пятнах крови методом мультиплексной ПЦР в режиме реального времени. *Медицинская иммунология*. 2015;17(5):467–78. doi: 10.15789/1563-0625-2015-5-467-478.
[Gordukova MA, Oskorbin IP, Mishukova OV, et al. Development of real-time multiplex PCR for the quantitative determination of TREC's and KREC's in whole blood and in dried blood spots. *Medical Immunology (Russia)*. 2015;17(5):467–78. doi: 10.15789/1563-0625-2015-5-467-478. (In Russ)]
15. Motta M, Chiarini M, Ghidini C, et al. Quantification of newly produced B and T lymphocytes in untreated chronic lymphocytic leukemia patients. *J Transl Med*. 2010;8(1):111. doi: 10.1186/1479-5876-8-111.
16. Holler C, Zaborsky N, Pinon-Hofbauer J, et al. Diversity of T-Cell Repertoire Predicts Disease Progression in Chronic Lymphocytic Leukaemia. *Clin Lymph Myel Leuk*. 2011;11(Suppl 2):S212. doi: 10.1016/j.clml.2011.09.111.
17. Никитин Е.А. Особенности пациентов с хроническим лимфолейкозом в России — данные Российского регистра больных онкогематологическими заболеваниями. Материалы XII Российской конференции с международным участием «Эффективные лимфомы». М., 2015. С. 20.
[Nikitin EA. Characteristics of patients with chronic lymphocytic leukemia in Russia: data from the Russian register for patients with oncohematological diseases. Proceedings of 12th Russian Conference with International Participation 'Malignant lymphomas'. Moscow; 2015. pp. 20. (In Russ)]
18. Zubakov D, Liu F, van Zelm MC, et al. Estimating human age from T-cell DNA rearrangements. *Curr Biol*. 2010;20(22):R970–1. doi: 10.1016/j.cub.2010.10.022.

