

# Гени за имуноглобулин и Т-ћелијски рецептор као молекуларни маркери код деце с акутном лимфобластном леукемијом

Јелена Лазић<sup>1</sup>, Лидија Докмановић<sup>1</sup>, Нада Крстовски<sup>1</sup>, Јелица Предојевић<sup>2</sup>, Наташа Тошић<sup>3</sup>, Соња Павловић<sup>3</sup>, Драгана Јанић<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Служба за хематологију и онкологију, Универзитетска дечја клиника, Београд, Србија;

<sup>2</sup>Дечја клиника, Клиничко-болнички центар, Бања Лука, Босна и Херцеговина;

<sup>3</sup>Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство, Београд, Србија

## КРАТАК САДРЖАЈ

**Увод** Акутна лимфобластна леукемија (АЛЛ) је малигна клонална болест и једна од најчешћих неоплазми дечјег узраста. Применом савремених протокола постижу се висок степен ремисије и дугогодишња стопа преживљавања. Увођењем метода молекуларне генетике омогућени су субмикроскопска класификација и праћење минималне резидуалне болести (МРБ), одговорне за настанак рецидива.

**Циљ рада** Циљ рада је било испитивање учесталости реаранжмана генских локуса за тешке ланце имуноглобулина (*IgH*) и Т-ћелијски рецептор (*TCR*) и њихова корелација с клиничким параметрима.

**Методе рада** Испитано је 41 дете оболело од АЛЛ којима је на дијагнози рађена молекуларна детекција реаранжмана генских локуса за *IgH* и *TCR* методом ланчаног умножавања ДНК (*PCR*). Посматрање развоја МРБ је рађено у индукционој фази лечења, када се очекује морфолошки одговор на терапију.

**Резултати** Реаранжман генског локуса за *IgH* забележен је код 82,9%, а за *TCR* код 56,1% испитаника. После 33 дана индукционе терапије реаранжмани за *IgH* генски локус су забележени код 39%, а за *TCR* код 36,5% деце.

**Закључак** Откривање генетских аберација на молекуларном нивоу и њихова корелација са стандардним прогностичким параметрима указала је на значај нове стратификације ризичних група, које захтевају промену интензитета хемиотерапије. Праћење МРБ се показало прецизним предиктивним фактором у настанку рецидива болести.

**Кључне речи:** акутна лимфобластна леукемија; минимална резидуална болест; реаранжмани генских локуса за *IgH* и *TCR*

## УВОД

Акутна лимфобластна леукемија (АЛЛ) је једно од најчешћих малигнитета дечјег узраста. Настаје клонском пролиферацијом лимфобласта, незрелих прекурсорских ћелија лимфоидне лозе који су претходно подлегли малигној трансформацији [1]. Захваљујући савременим протоколима, интратекалној примени лекова и зрачењу централног нервног система (ЦНС), данас се код око 80% деце с АЛЛ постиже дуготрајна клиничка ремисија, која је дефинисана присуством мање од 5% бласта у костној сржи. Међутим, с обзиром на то да се код 10-15% деце развије рецидив болести, сматра се да конвенционална морфолошка ремисија може бити удружена с резидуалним бластима, који су најчешћи узрок поновне активације болести [2].

Откривање и праћење резидуалних малигних ћелија се назива минимална резидуална болест (МРБ) и представља најнижи мерљиви ниво болести [2]. Као независни прогностички фактор, МРБ омогућава стратификацију нових група ризика и пружа основу за потпуно индивидуални терапијски приступ [3]. Одабир болесника према генетском профилу болести омогућава поделу на групу која захтева интензификацију терапије и на групу где се примењују стандардни протоколи лечења са смањеним дозама, чиме се не угрожава исход лечења, а избегава се излагање многим токсичним дејствима цитостатика [4].

Током последње две деценије забележени су покушаји да се различитим методама открије и прати МРБ. Метода избора за МРБ треба да задовољи неколико важних критеријума: сензитивност од најмање  $10^{-3}$ , способност разликовања малигних од нормалних ћелија, постојање стабилних леукемија – специфичних маркера, лаку стандардизацију, брзо добијање резултата и могућност квантификације [5]. Једна од метода је ланчана реакција умножавања ДНК (енгл. *polymerase chain reaction* – *PCR*). *PCR* есеј је способан да открије једну леукемијски измењену ћелију међу милион нормалних ћелија [6]. За праћење МРБ користе се методе квалитативна *RT-PCR* (енгл. *reverse transcriptase PCR*) и квантитативна *RQ-PCR* (енгл. *real-time quantitative PCR*), засноване на откривању фузионих транскрипата и антиген-рецептор гена.

МРБ у АЛЛ подразумева откривање и праћење структурних фузионих аберација и реаранжмана генских локуса имуноглобулина (*IgH*) и Т-ћелијског рецептора (*TCR*). На својој површини Б-лимфоцити експримирају имуноглобулин, а Т-лимфоцити *TCR*, који препознају антигене. Сваки клон Б или Т лимфоцита носи рецептор јединствене специфичности одређене комбинацијом *V* (енгл. *variable* – променљив), *D* (енгл. *diversity* – разноврстан) и *J* (енгл. *joining* – спајајући) генских сегмената, деловима локуса, како за имуноглобулин, тако и за *TCR* за антиген. Велики репертоар различитих специфичних места за антиген постиже

се током сазревања лимфоцита комбинацијом по једног гена из *V*, *D* и *J* региона. Варијабилност се додатно увећава делецијом и инсерцијом нуклеотида на месту спајања, чиме настаје секвенца јединствена за сваки Б и Т лимфоцитни клон [7].

Током сазревања Б и Т лимфоцита одиграва се процес соматских рекомбинација, при чему се секвенце одређеног типа комбинују и стварају ген са којег се преписује информација за синтезу одговарајућег ланца [8]. На овај начин генерише се огроман диверзитет антигенских рецептора, који се огледа у постојању више од билион ( $10^{12}$ ) различитих клонова Б и Т лимфоцита, сваки с рецептором различите специфичности [9].

Клон-специфични *IgH* и *TCR* реаранжмани су маркери специфични за тумор и болесника, који се могу препознати на дијагнози више од 95% пацијената с лимфолиферативним болестима. Различити клонални имуноглобулински и *TCR* реаранжмани морају бити тачно дефинисани, да би се разликовали од сличних поликлоналних, који се истовремено с њима амплификују. Реаранжмани имају посебан значај као мете специфичне за болесника за откривање и праћење резидуалне болести деце без хромозомских аберација. Код здравих особа лимфоцитни репертоар је стабилан и поликлоналан. Рекомбинације се у лимфоидним прогениторима одигравају по одређеном хијерархијском редоследу, због чега се у више од 95% Б-прекурсорских АЛЛ може открити *IgH* реаранжман.

Потпуно реаранжирани *IgH* локуси нису одлика искључиво Б-леукемија, као што се ни *TCR* реаранжмани не откривају искључиво код Т-малигнитета. Знатан проценат Б и Т леукемија се одликује истовременом експресијом оба реаранжирана локуса [10].

Анализом *IgH* репертоара на дијагнози се у 30-40% Б-прекурсорских АЛЛ може открити више од једне клоналне популације леукемијских ћелија. Олигоклоналност се такође може открити с фреквенцијом од око 10% за имуноглобулин и приближно 20% за *TCR* генске локусе. Када су у питању Т-АЛЛ, олигоклоналност *TCR* локуса се јавља код мање од 5%, док је *IgH* узорак олигоклоналан код 27% болесника [11].

Клонална еволуција је модификација постојећих реаранжмана којом леукемијски клон даје више популација субклонова. Поређење схеме имуноглобулина и *TCR* реаранжмана на дијагнози и у рецидиву болести указују на промену, зависно од типа леукемије, степена сазревања и врсте самог реаранжмана. Због могуће појаве лажно негативних резултата, стабилност ових реаранжмана се мора узети у обзир када се они користе као маркери за посматрање напредовања болести. Како бар један реаранжиран *IgH*, *TCR* $\gamma$ , односно *TCR* $\delta$  алел остаје стабилан у 75-90% Б-АЛЛ, односно 90% Т-АЛЛ, препоручује се посматрање бар два маркера, колико је и доступно код већине болесника с АЛЛ [12].

Резултати многих студија су показали да се схема имуноглобулинских и *TCR* реаранжмана мења с напретком болести. С обзиром на то да је конфигурација генских локуса специфичан маркер леукемијске ћелије, помоћу којег се она може посматрати, промена те конфигурације у времену може да укаже и на промену

саме малигне ћелије и њених биолошких одлика. Одвијање рекомбинација на доступним имуноглобулинским и *TCR* локусима указује на то да је рекомбинаторни систем активан, а механизми затварања хроматина не функционишу као код нормалних ћелија. Стога је могуће претпоставити да и неки други делови генома могу бити отворени за приступ рекомбинацији, услед чега може доћи до нагомилавања мутација. Неке од њих могу бити узрок промене фенотипа леукемијског клона, што наводи на закључак да је клонална еволуција, праћена кроз реаранжмане имуноглобулина и *TCR*, модел напретка болести [13].

## ЦИЉ РАДА

Циљ рада је био да се утврде фреквенција и клоналност реаранжмана у генима за *IgH* и *TCR* у тренутку постављања дијагнозе и њихова корелација с клиничким и стандардним прогностичким параметрима болести код деце оболеле од АЛЛ. Посматрани су и развој МРБ 33. дана индукционог лечења и корелација генетичких маркера с појавом рецидива и смртним исходом.

## МЕТОДЕ РАДА

Истраживање је обухватило 41 дете оболело од АЛЛ (22 дечака и 19 девојчица), узраста од 1,9 до 16,5 година (медијана шест година), код којих је дијагноза обољења постављена између 1. децембра 2002. и 1. јула 2005. године, а надгледана су до 1. августа 2007. године. На Универзитетској дечјој клиници (УДК) у Београду су дијагностикована и лечена 32 болесника, док је код деветоро деце дијагноза постављена на УДК, али су она лечена на Дечјој клиници Клиничко-болничког центра у Бања Луци. Испитаници су у просеку надгледани две године и три месеца (распон 0,7-53,7 месеци).

Дијагноза је постављена на основу стандардних цитоморфолошких, цитохемијских и имунофенотипских критеријума.

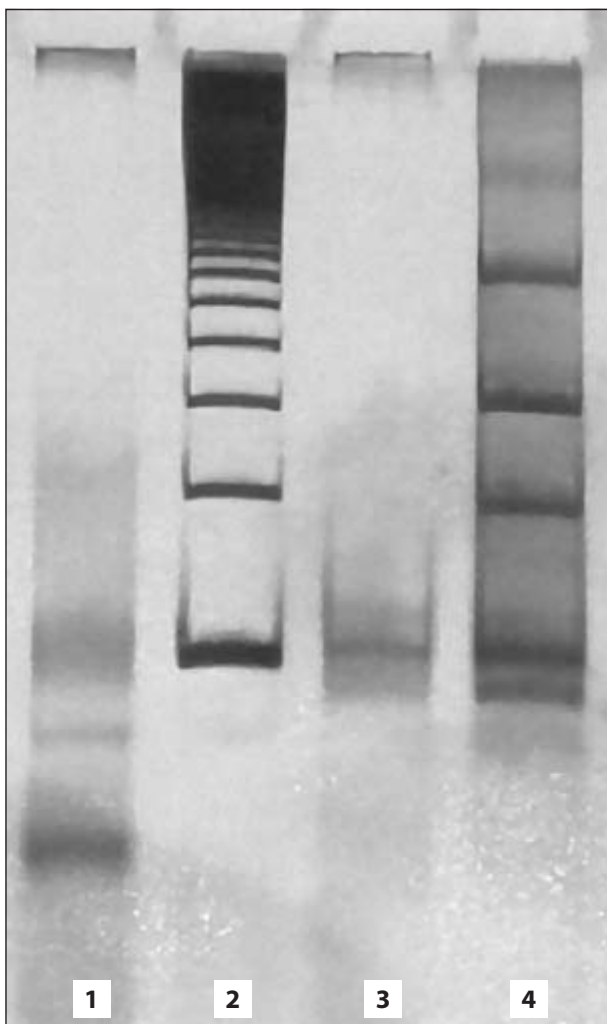
Лечење је изведено према актуелном протоколу *ALL IC-BFM 2002*, који се састоји од уобичајених фаза лечења: индукције, консолидације, реиндукције (детерминисана рандомизацијом) и фазе одржавања. Протокол налаже стратификацију ризика у односу на узраст, иницијални број леукоцита, позитиван цитогенетски налаз *t(9;22)* и *t(4;11)*, присуство фузионих гена *BCR/ABL* и *MLL/AF4*, одговор на пронизон осмог дана, односно проценат бласта у костној сржи 15. и 33. дана лечења.

Материјал за *PCR* анализу реаранжмана генских локуса (*IgH* и *TCR*) узет је стандардном аспирацијом костне сржи у тренутку постављања дијагнозе и 33. дана лечења, када протокол предвиђа улазак болесника у морфолошку ремисију.

Молекуларногенетичке анализе су урађене у Институту за молекуларну генетику и генетичко инжењерство у Београду. ДНК је изолована из ћелија кост-

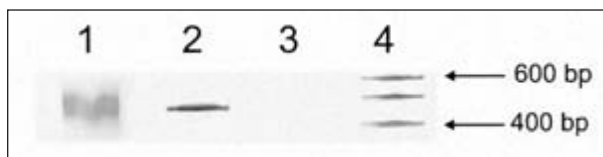
не сржи стандардном фенол-хлороформ-изоамила-кохолном методом.

Откривање *IgH* генских реаранжмана вршено је методом *PCR*. Прајмери су комплементарни секвенцама које ограничавају три хиперваријабилна региона (*CDR*) егзона, који кодира варијабилни домен тешког ланца, и деле висок степен хомологије између различитих *V*, односно *J* сегмената. На овај начин омогућено је умножавање комплетног *IgH* репертоара. Нормалан поликлоналан узорак здравих индивидуа открива се као „смир” на дужини између 100 и 200 *bp* и представља велики број трака различите дужине које потичу од различитих лимфоцита. Појава једне доминантне траке или више њих указује на постојање клоналних популација ћелија с идентичним реаранжманом, тј. *VDJ<sub>H</sub>* комбинацијом генских сегмената (Слика 1). Коришћена су два пара прајмера, јер се *PCR* амплификација ради у два корака (енгл. *nested PCR*): *FR1* (5'-(*G/C*)*AGGT(A/G)CAGCTG(G/C/T)(AT)G(GC)AGTC(G/A/T/C)G-3'*) и *J1H* (5'-*ACCTGAGGAGACGGTGACCAGGGT-3'*) – први пар прајмера; *FR1* (5'-(*G/C*)*AGGT(A/G)CAGCTG(G/C/T)(AT)*



**Слика 1.** Анализа *IgH-PCR* производа на осмопроцентном полиакриламидном гелу

**Figure 1.** *IgH-PCR* analyzed products on 8% polyacrilamid gel  
1 – здрав испитаник; 2 – ДНК маркер (лествица од по 100 *bp*);  
3 – пацијент са моноклоналним *IgH*; 4 – пацијент са биклоналним *IgH*  
1 – healthy individual; 2 – DNA marker (100 *bp* scale);  
3 – patient with monoclonal *IgH* rearrangement;  
4 – patient with biclonal *IgH* rearrangement



**Слика 2.** Анализа *TCRγ-PCR* производа на осмопостотном полиакриламидном гелу

**Figure 2.** *TCRγ-PCR* analyzed products on 8% polyacrilamid gel  
1 – здрав испитаник; 2 – пацијент са моноклоналним *TCRγ*;  
3 – контрола *PCR* реакције; 4 – ДНК маркер (лествица од по 100 *bp*)  
1 – healthy individual; 2 – patient with monoclonal *TCRγ* rearrangement;  
3 – *PCR* reaction control; 4 – DNA marker (100 *bp* scale)

*G(GC)AGTC(G/A/T/C)G-3'*) и *FR3A* (5'-*ACACGGC(C/T)(C/G)TGTATTACTGT-3'*) – други пар прајмера [11].

Услови амплификације су: денатурација на 94°C (10 минута), после које следи 35 циклуса денатурације такође на 94°C (15 секунди), анилинга на 55°C (20 секунди) и елонгације на 72°C (30 секунди). Реакција се завршава финалном елонгацијом на 72°C (пет минута). Откривање производа *PCR* вршено је електрофорезом ДНК на полиакриламидном гелу.

Откривање *TCRγ* генских реаранжмана вршено је методом *PCR*, прајмерима који омогућавају умножавање највећег дела *TCRγ* репертоара. Нормалан поликлоналан узорак здравих индивидуа открива се као „смир” на дужини између 400 и 500 *bp*. Појава једне доминантне траке или више њих указује на постојање клоналних популација ћелија с идентичним реаранжманом, тј. *VDJ<sub>γ</sub>* комбинацијом генских сегмената (Слика 2). Испитаници са доминантном траком означени су као позитивни, и то: с једном као моноклонални, са две биклонални, са три триклонални, а са више од три као олигоклонални. Коришћена су два пара прајмера: *TCRγ1* (5'-*CTGTGACAACAAGTGTTCAC-3'*) и *TCRγ2* (5'-*GTGCTTCTAGCTTTCCTGTCTC-3'*) – први пар прајмера; *TCRγ3* (5'-*GAGTACGTCGCCTACAGAGAGG-3'*) и *TCRγ4* (5'-*CCACTGCCAAAGAGTTTCTT-3'*) – други пар прајмера [14].

Услови амплификације били су: денатурација на 94°C (10 минута), после које следи 35 циклуса денатурације на такође 94°C (45 секунди), анилинга на 65°C (30 секунди) и елонгације на 72°C (60 секунди). Реакција се завршава финалном елонгацијом на 72°C (пет минута). Откривање производа *PCR* вршено је електрофорезом ДНК на полиакриламидном гелу.

## РЕЗУЛТАТИ

Код 70 деце је рађено иницијално откривање молекуларних реаранжмана за *IgH* и *TCR* методом *PCR*, а развој МРБ је посматран ради бележења одговора на примењено лечење и корелације с клиничким прогностичким факторима. Код испитаних болесника број леукоцита (*Le*) у крвној слици на дијагнози је био у просеку 15400/*mm*<sup>3</sup> (опсег 1300-406400/*mm*<sup>3</sup>). ЦНС статус 1 (изостанак бласта у ликвору и клиничких знакова болести ЦНС) установљен је код 37 деце (90,3%), ЦНС статус 2 (нетрауматска лумбална пункција са мање од пет ћелија по микролитру у цереброспиналној течности) утврђен је код два детета (4,9%), док је ЦНС ста-

тус 3 (клинички знаци инфилтрације ЦНС и мање од пет ћелија по микролитру у ликвору са преобладањем бласта на цитоспину) такође установљен код два детета (4,9%). FAB класификација је показала да је подтип L1 био заступљен код 16 деце (39%), док су морфолошке одлике подтипа L2 забележене код 25 деце (61%). Имунофенотип који одговара Б-ћелијској линији је утврђен код 29 деце (70,7%), док је код 12 деце (29,3%) забележена експресија антигена специфичних за Т-ћелијску линију. Према предвиђеној стратификацији ризика, у стандардни ризик (СР) је сврстано 12 деце (29,3%), у интермедијарни ризик (ИР) 22 (53,7%), а у висок ризик (ВР) седам испитаника (17%).

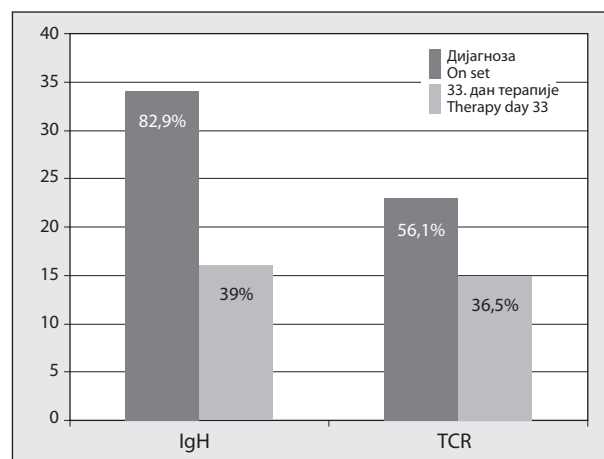
У групи од 41 испитаника реаранжман за IgH генски локус је забележен код 34 детета (82,9%): моноклоналност код 17 деце (41,5%), биклоналност код 14 (34,1%), триклоналност код једног детета (2,4%) и олигоклоналност код три испитаника (7,3%). У истој групи испитаника реаранжман за TCR $\gamma$  генски локус је забележен код 23 детета (56,1%): моноклоналност код 20 испитаника (48,8%), биклоналност код три (7,3%) и триклоналност код једног детета. Клиничке одлике деце са IgH и TCR $\gamma$  реаранжманима су приказане у табели 1.

**Табела 1.** Клиничке одлике испитаника с откривеним генским реаранжманима

**Table 1.** Clinical characteristics of patients with detected gene rearrangements

Параметар Parameter		Генски реаранжмани Gene rearrangements	
		IgH	TCR
Укупан број испитаника Total number of patients		34	23
Пол Sex	Мушки Male	18	9
	Женски Female	16	14
Узраст (године) Age (years)	<6	19	9
	≥6	15	14
Број леукоцита Number of leukocytes	<20000	23**	12
	≥20000	11	11
Хепатомегалија Hepatomegaly	Да / Yes	21	12
	Не / No	13	11
Спленомегалија Splenomegaly	Да / Yes	15	14
	Не / No	19	9
Статус ЦНС CNS status	1	31	21
	2	1	1
	3	2	1
Имунофенотип Immunophenotype	B	26*	15
	T	8	8
Морфологија бласта Morphology of blasts	L1	13	7
	L2	21	16
Апсолутни број бласта 8. дана Absolute blast count on day 8	<1000	30	20
	≥ 1000	4	3
Костна срж 15. дана Bone marrow on day 15	M1	25	17
	M2	8	5
	M3	1	1
Костна срж 33. дана Bone marrow on day 33	M1	32	22
	M2	-	-
	M3	1	1

\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$



**Графикон 1.** Брзина елиминације малигног клона код деце са IgH и TCR $\gamma$  реаранжманима

**Graph 1.** Speed of elimination of malignant clone in children with IgH and TCR $\gamma$  rearrangements

Рearанжмани оба генска локуса истовремено утврђена су код 19 испитаника (43,9%). У групи болесника са IgH реаранжманом 11 деце (26,8%) је стратификовано у стандардни ризик, 18 (43,9%) у интермедијарни, а петоро (12,2%) у високи ризик. Међу испитаницима са TCR $\gamma$  реаранжманом у групи интермедијарног ризика било је 14 деце (65,2%), док су у групи стандардног и високог ризика била по четири испитаника (17,4%). Позитивност на BCR/ABL откривена је код четири испитаника (11,8%) с реаранжманима IgH генског локуса и пет испитаника (21,7%) са TCR $\gamma$  реаранжманима.

Након Ia фазе индукционог лечења, код 15 деце (39%) с IgH реаранжманом откривена је МРБ: моноклоналност је забележена код шест испитаника (14,6%), а биклоналност и олигоклоналност код по три (7,3%). У групи болесника са TCR $\gamma$  реаранжманом, код 15 деце (65,2%) је 33. дана лечења уочен резидуални малигни клон. Моноклоналност је забележена код 11 испитаника (47,8%), а биклоналност, триклоналност и олигоклоналност код по једног детета (4,3%) (Графикон 1).

Клиничка ремисија је постигнута код 97,6% испитаника, а једна девојчица је умрла услед сепсе пре процене ремисије 33. дана лечења. Рани медуларни рецидив је дијагностикован код четворо деце (9,4%). Смрт је наступила код такође четири испитаника (9,4%): код једног дечака након рецидива болести, а код три детета услед сепсе. Трансплантација матичне ћелије хематопоезе је урађена код једног детета, код којег је откривен BCR/ABL фузиони транскрипт, који је сада у потпуној ремисији.

## ДИСКУСИЈА

У лечењу АЛЛ се постиже висок степен клиничке и морфолошке ремисије код више од 95% деце, а дугогодишње преживљавање без знака активације болести код око 80% [15]. Међутим, и поред примене савремених протокола, код око 15% болесника се јавља рецидив болести, за шта се сматра одговорном МРБ, која се не може открити конвенционалним микроскопским

методама [16]. Интензификација терапије према групи ризика је већ принцип лечења у многим протоколима националних и међународних кооперативних група [17]. Многе студије указују на то да се усмеравањем лечења према вишеструким прогностичким факторима постиже позитиван исход и знатно смањује токсичност терапије [18]. Откривање фузионих гена, као независних молекуларних маркера, помогла је разумевању настанка леукемија [19] и директном усмеравању лечења. Међутим, с обзиром на то да се структурне хромозомске аберације јављају код трећине деце с АЛЛ [20], откривање и праћење реаранжираних гена за *IgH* и *TCR* стварају услове за прецизну стратификацију ризика код свих болесника.

Анализом *IgH* репертоара на дијагнози се у 30-40% Б-прекурсорских АЛЛ може открити више од једне клоналне популације леукемијских ћелија. Када су у питању Т-АЛЛ, олигоклоналност *TCR* локуса се јавља код мање од 5%, а *IgH* локуса код 27% болесника [21]. С друге стране, *TCR* реаранжмани се могу открити код 30-80% Б-прекурсорских АЛЛ. Ова фреквенција је у вези са степеном сазревања малигне Б-ћелије, јер што је мања зрелост малигно алтерисане ћелије, мањи је и проценат откривања, док се *IgH* реаранжмани јављају у 10-20% Т-АЛЛ.

У нашем истраживању, реаранжман за *IgH* генски локус је забележен код 82,9% испитаника, и то: моноклонална популација леукемијски измењених ћелија код 41,5%, биклонална код 34,1%, триклонална код 2,4%, а олигоклонална код 7,3%. Реаранжман *TCR $\gamma$*  генског локуса је забележен код 56,1% деце, од чега моноклоналност код 48,8%, биклоналност код 7,3%, а триклоналност код 2,4% болесника.

Као што се за структурне хромозомске аберације поставља питање различитости у односу на етничку основу, тако се расподела и клоналност *IgH* и *TCR* реаранжмана испитују у односу на географско порекло или социоекономске услове живота. Скридели (*Scrideli*) и Тоне (*Tone*) [22] су сумирањем резултата бројних мултицентричних студија закључили да су инциденција и особине анализираних реаранжмана различити у односу на етничку припадност и социоекономски статус.

Међу испитаницима са *IgH* и *TCR* реаранжманима генског локуса код 7,3% деце је откривен *BCR/ABL* фузиони транскрипт. Овај податак је од суштинске важности, јер мења клиничку слику ових болесника, као и очекивани одговор на лечење у корист установљене транслокације. У обе групе деце – са *IgH* и *TCR* реаранжманом – више је било дечака, који су у просеку били узраста од 5,6 до 6,8 година, с тим што је у групи испитаника са *TCR* реаранжманом било више деце старије од шест година.

Код испитаника са *TCR* реаранжманом била је очекивано већа медијана броја леукоцита, јер је иницијално повишена вредност леукоцита повезана са Т-имунофенотипом.

У обе групе испитаника био је доминантан морфолошки подтип Л2, као и Б-имунофенотип бласта (76,5% према 65,2%), што доказује да потпуно реаран-

жирани *IgH* локуси нису одлика искључиво Б-леукемија, односно *TCR* реаранжмани Т-леукемија. Ван дер Велден (*Van der Velden*) и сарадници [23, 24] су потврдили да се знатан проценат Б и Т леукемија одликује истовременом експресијом оба реаранжираних локуса.

У обе групе наших испитаника забележен је лош одговор на пронозон осмог дана лечења (11,8% према 13%), али су, изузев једног детета, то били болесници са транслокацијом *BCR/ABL*. Такође, код једног детета је изостала клиничка и морфолошка ремисија 33. дана лечења, што се објашњава његовом *Ph* позитивношћу и истовременим откривањем реаранжмана за *IgH* и *TCR $\gamma$*  генски локус.

Поређење схеме *IgH* и *TCR* реаранжмана на дијагнози током праћења МРБ и у рецидиву болести указују на промене, и то зависно од типа леукемије, степена сазревања и врсте самог реаранжмана. Кампана (*Campana*) [25] је закључио да је овакав резултат последица промене *IgH* и *TCR* реаранжмана с напредовањем болести, што је уочено и у нашем истраживању. Конфигурација генских локуса је специфичан маркер леукемијске ћелије, те свака промена у времену указује и на промену саме малигне ћелије и њених биолошких особина [26].

Клонална еволуција је важна одлика агресивних Б-прекурсорских леукемија, јер је посматрањем развоја МРБ током рецидива болести уочено да је значајно више деце код које је на почетку болести установљена олигоклоналност. Ван Донген (*Van Dongen*) и сарадници [27] у свом раду објављеном још 1998. године наводе да су деца која задржавају олигоклоналну популацију ћелија током лечења знатно краће у ремисији болести и да је код њих ризик од настанка смрти десет пута већи, што се, без обзира на мањи узорак испитаника, може односити и на болеснике нашег истраживања. Бјонди (*Biondi*) и сарадници [28] су закључили да праћење МРБ у раним фазама лечења указује на почетни одговор на терапију, хемиосензитивност и клоналност преосталих бласта, што је, у случају позитивног налаза, предиктивни фактор за настајак рецидива; то је потврђено и у нашој студији. Међу нашим испитаницима код којих је откривена олигоклоналност *IgH* реаранжираних локуса, код 7,3% њих је дошло до рецидива болести, а 11,8% је преминуло, док је међу децом са *TCR $\gamma$*  реаранжманом генског локуса рецидив дијагностикован код 13%, а смртни исход код 17,4% болесника.

Производи добијени применом *PCR* методе стварају доминантан сигнал у клоналној пролиферацији у односу на постојећи, који потиче од нормалне поликлоналне популације лимфоцита [29]. Осетљивост откривања зависи од апсолутног броја заступљених леукемијских ћелија и апсолутног броја Б и Т лимфоцита у костној сржи, што представља разлог за квантификацију *PCR* производа, јер податак о клоналности није довољно снажан предиктивни фактор [30]. Моноклонални *IgH* и *TCR* генски реаранжмани могу се открити са сензитивношћу од  $0,5-1,5 \times 10^{-1}$  из периферне крви, односно  $6 \times 10^{-4}$  из аспирата косне сржи, што дијагностиковање и праћење болести чини лакшим [31].

Rezultati mnogih studija pokazuju da se kod oko 50% dece moze otkriti amplifikovan PCR proizvod re-aranjiranih *IgH* i *TCR* genskih lokusa na kraju indukcije. Ta deca su sigurni kandidati za nastanak recidiva bolesti, a rizik je proporcionalan izmerenom nivou MRB [32]. Stratifikacija rizika prema ovako ustanovljenim genetskim markerima omogucava odredzivanje intenziteta terapije, sto ih chini nezavisnim prognostickim faktorima. Individualno usmeravanje terapije omogucava smanjenje toksicnosti citostat-ских агенса код деце с раном и брзом циторедукцијом.

Настанак леукемија је динамичан процес који усло-вљава ток болести сталним променама у популаци-ји малигних ћелија, доводећи до генерисања клонал-не фенотипске променљивости, чиме директно утиче на исход болести [33]. Захваљујући увођењу молеку-ларне генетике у клиничку дијагностику, открива се и прати променљивост малигних ћелија, која је одговор-на за високопролиферативне, агресивне и резистент-не субклонове [34, 35].

## ЗАКЉУЧАК

Реаранжман *IgH* генског локуса се открива код чети-ри петине болесника, а *TCR $\gamma$*  гена код више од поло-

вине. У обе групе болесника доминантна је монокло-нална популација леукемијски измењених ћелија (код скоро 50% деце), док је олигоклонална популација нај-мање заступљена. Очекивано већа медијана броја ле-укоцита се бележи код деце са *TCR $\gamma$*  реаранжманом због корелације са Т-имунофенотипом. Истовремен-на експресија оба реаранжираних генских локуса је би-ла чешћа код деце са Б-имунофенотипом. У обе гру-пе испитаника неповољан исход болести је био пре-доминантан код деце код које је истовремено откри-вен и Филадельфија-хромозом. Изразито висок проце-нат уласка у клиничку ремисију је забележен код свих испитаника, док је проценат рецидива и смртног ис-хода услед рецидива најмањи код деце без генетских мутација. Овакав резултат несумњиво указује на зна-чај почетног откривања и посматрања молекуларних маркера током лечења.

## НАПОМЕНА

Овај чланак је резултат рада на пројекту број 143051 Министарства за науку и технолошки развој Репу-блике Србије.

## ЛИТЕРАТУРА

- Greaves M. Childhood leukaemia. *BMJ*. 2002; 342(7332):283-7.
- Cazzaniga G, Biondi A. Molecular monitoring of minimal residual disease. In: Pui CH. *Treatment of Acute Leukemias*. New Jersey: Humana Press; 2003. p.537-547.
- Cave H, van der Werff ten Bosch J, Suci S, Guidal C, Waterkeyn C, Otten J, et al., for the European Organization for Research and Treatment of Cancer-Childhood Leukemia Cooperative Group. Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*. 1998; 339(9):591-8.
- Stock W, Estrov Z. Studies of minimal residual disease in acute lymphocytic leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2000; 14(6):1289-305.
- Netto GJ, Saad RD, Dysert PA. Diagnostic molecular pathology: current techniques and clinical applications. *BUMC proceedings* 2003; 16:379-83.
- Gribben JG. Minimal residual leukemia. In: Nathan DG, Orkin SH, Ginsburg D, Look AT. *Nathan and Oski's Hematology of Infancy and Childhood*. Vol 2. Philadelphia: W.B. Saunders; 2003. p.1259-1273.
- Virella G. Immunoglobulin structure. In: Virella G. *Medical Immunology*. 6th ed. New York: Informa Healthcare; 2007. p.55-64.
- Burmester GR, Pezzutto A. *Color Atlas of Immunology*. Stuttgart: Thieme; 2003.
- Kuby J. Antibodies – structure and function. In: Goldsby RA, et al. *Immunology*. 5th ed. New York: WH Freeman; 2002. p.76-88.
- Szczepanski T, Beishuizen A, Pongers-Willems MJ, Hählen K, van Wering ER, Wijkhuijs AJ, et al. Cross-lineage T cell receptor gene rearrangements occur in more than ninety percent of childhood precursor-B acute lymphoblastic leukemias: alternative PCR targets for detection of minimal residual disease. *Leukemia*. 1999; 13:196-205.
- Green E, McConville CM, Powell JE, Mann JR, Darbyshire PJ, Taylor AM, et al. Clonal diversity of Ig and T-cell receptor gene rearrangements identifies a subset of childhood B-precursor acute lymphoblastic leukemia with increased risk of relapse. *Blood*. 1998; 92(3):952-8.
- Szczepanski T, Willems MJ, Brinkhof B, van Wering ER, van der Burg M, van Dongen JJ. Comparative analysis of Ig and TCR gene rearrangements at diagnosis and at relapse of childhood precursor-B-ALL provides improved strategies for selection of stable PCR targets for monitoring of minimal residual disease. *Blood*. 2002; 99(7):2315-23.
- Germano G, del Giudice L, Palatron S, Giarin E, Cazzaniga G, Biondi A, et al. Clonality profile in relapsed precursor-B-ALL children by GeneScan and sequencing analyses. Consequences on minimal residual disease monitoring. *Leukemia*. 2003; 17:1573-82.
- Čolović M, Pavlović S, Kragujac N, Čolović N, Janković G, Sefer D, et al. Acquired amegakaryocytic thrombocytopenia associated with proliferation of  $\gamma/\delta$  TCR+ t-lymphocytes and a bcr-abl (p210) fusion transcript. *Eur J Haematol*. 2004; 73:372-5.
- Pui CH, Sandlund JT, Pei D, Campana D, Rivera GK, Ribeiro RC, et al. Improved outcome for children with acute lymphoblastic leukemia: Results of total therapy study XIII B at St Jude Children's Research Hospital. *Blood*. 2004; 104(9):2690-6.
- Lightfoot TJ, Roman E. Causes of childhood leukemia and lymphoma. *Tox App Pharm*. 2004; 199:104-17.
- Schultz KR, Pullen DJ, Sather HN, Shuster JJ, Devidas M, Borowitz MJ, et al. Risk and response based classification of childhood B-precursor acute lymphoblastic leukemia: A combined analysis of prognostic markers from the Pediatric Oncology Group (POG) and Children's Cancer Group (CCG). *Blood*. 2007; 109(3):926-35.
- Arico M, Conter V, Valsecchi MG, Rizzari C, Boccalatte MF, Barisoni E, et al. Treatment reduction of highly selected standard-risk childhood acute lymphoblastic leukemia. The AIEOP ALL-9501 study. *Haematologica*. 2005; 90(9):1186-91.
- Mitelman F, Johansson B, Mertens F. The impact of translocations and gene fusions on cancer causation. *Nat Rev Cancer*. 2007; 7(4):233-5.
- Cazzaniga G, Rossi V, Biondi A. Monitoring minimal residual disease using chromosomal translocations in childhood ALL. *Best Prac Res Clin Haematol*. 2002; 15(1):21-35.
- Meleshko AN, Belevtsev MV, Savitskaja TV, Potapnev MP. The incidence of T-cell receptor gene rearrangements in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia is related to immunophenotype and fusion oncogene expression. *Leuk Res*. 2006; 30:795-800.
- Scrideli CA, Tone LG. Ig and TCR gene rearrangements in childhood ALL: Is there ethnic and socio-economic diversity of rearrangements patterns? *Leuk Res*. 2006; 30(9):1065-6.

23. Van der Velden VHJ, de Bie M, van Wering ER, van Dongen JJ. Immunoglobulin light chain gene rearrangements in precursor-B-acute lymphoblastic leukemia: Characteristics and applicability for the detection of minimal residual disease. *Haematologica*. 2006; 91:679-82.
24. Van der Velden VHJ, Szczepanski T, Wijkhuijs JM, Hart PG, Hoogeveen PG, Hop WC, et al. Age-related patterns of immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangements in precursor-B-ALL: implications for detection of minimal residual disease. *Leukemia*. 2003; 17:1834-44.
25. Campana D. Minimal residual disease studies in acute leukemia. *Am J Clin Pathol*. 2004; 122(Suppl):S47-57.
26. Willemse MJ, Seriu T, Hettlinger K, D'Aniello E, Hop WC, Panzer-Grumayer ER, et al. Detection of minimal residual disease identifies differences in treatment response between T-ALL and precursor B-ALL. *Blood*. 2002; 99(12):4386-93.
27. van Dongen JJ, Seriu T, Panzer-Grumayer ER, Biondi A, Pongers-Willemse MJ, Corral L, et al. Prognostic value of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia in childhood. *Lancet*. 1998; 352:1731-8.
28. Biondi A, Valsecchi MG, Seriu T, D'Aniello E, Willemse MJ, Fasching K, et al. Molecular detection of minimal residual disease is a strong predictive factor of relapse in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia with medium risk features. A case control study of the International BFM study group. *Leukemia*. 2000; 14:1939-43.
29. Szczepanski T. Why and how to quantify minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia? *Leukemia*. 2007; 21:622-6.
30. Neale GAM, Campana D, Pui CH. Minimal residual disease detection in acute lymphoblastic leukemia: Real improvement with the real-time quantitative PCT method? *J Pediatr Hematol Oncol*. 2003; 25(2):100-2.
31. Van der Velden VHJ, Panzer-Grumayer ER, Cazzaniga G, Flohr T, Sutton R, Schrauder A, et al. Optimization of PCR-based minimal residual disease diagnostics for childhood acute lymphoblastic leukemia in a multi-center setting. *Leukemia*. 2007; 21:706-13.
32. Zhou J, Goldwasser MA, Li A, Dahlberg SE, Neuberger D, Wang H, et al. Quantitative analysis of minimal residual disease predicts relapse in children with B-lineage acute lymphoblastic leukemia in DFCLALL Consortium Protocol 95-01. *Blood*. 2007; 110:1607-11.
33. Stanulla M, Cario G, Meissner B, Schrauder A, Moricke A, Riehm H, et al. Integrating molecular information into treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia – A perspective from the BFM Study Group. *Blood Cells Mol Disease*. 2007; 39:160-3.
34. Apostolidou E, Swords R, Alvarado Y, Giles J. Treatment of acute lymphoblastic leukaemia: a new era. *Drugs*. 2007; 67(15):2153-71.
35. Lazić J. Korelacija prisustva minimalne rezidualne bolesti i prognostičkih parametara u toku lečenja dece sa akutnom limfoblastnom leukemijom [magistarska teza]. Beograd: Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu; 2007.

## Immunoglobulin Genes and T-Cell Receptors as Molecular Markers in Children with Acute Lymphoblastic Leukaemia

Jelena Lazić<sup>1</sup>, Lidija Dokmanović<sup>1</sup>, Nada Krstovski<sup>1</sup>, Jelica Predojević<sup>2</sup>, Nataša Tošić<sup>3</sup>, Sonja Pavlović<sup>3</sup>, Dragana Janić<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Haematology and Oncology, University Children's Hospital, Belgrade, Serbia;

<sup>2</sup>Childrens Hospital, Clinical Centre, Banja Luka, Bosnia and Herzegovina;

<sup>3</sup>Institute for Molecular Genetics and Genetic Engineering, Belgrade, Serbia

### SUMMARY

**Introduction** Acute lymphoblastic leukaemia (ALL) is a malignant clonal disease, one of the most common malignancies in childhood. Contemporary protocols ensure high remission rate and long term free survival. The ability of molecular genetic methods help to establish submicroscopic classification and minimal residual disease (MRD) follow up, in major percent responsible for relapse.

**Objective** The aim of the study was to detect the frequency of IgH and TCR gene rearrangements and their correlation with clinical parameters.

**Methods** Forty-one children with ALL were enrolled in the study group, with initial diagnosis of IgH and TCR gene rearrangements by polymerase chain reaction (PCR). MRD follow-up

was performed in induction phase when morphological remission was expected, and after intensive chemotherapy.

**Results** In the study group IgH rearrangement was detected in 82.9% of children at the diagnosis, while TCR rearrangement was seen in 56.1%. On induction day 33, clonal IgH rearrangements persisted in 39% and TCR rearrangements in 36.5% of children.

**Conclusion** Molecular analysis of genetic alterations and their correlation with standard prognostic parameters show the importance of risk stratification revision which leads to new therapy intensification approach. MRD stands out as a precise predictive factor for the relapse of disease.

**Keywords:** acute lymphoblast leukaemia; minimal residual disease; IgH and TCR gene rearrangements