

## Характеристика перестроек 11q23 (MLL) у детей первого года жизни с острым лимфобластным лейкозом

Г.А. Цаур<sup>1,2</sup>, А.М. Попов<sup>1,2</sup>, О.В. Алейникова<sup>3</sup>, Э.Г. Бойченко<sup>4</sup>, Т.Ю. Вержбицкая<sup>1,2</sup>, Е.В. Волочник<sup>3</sup>, А.С. Иванова<sup>1,2</sup>, О.В. Каленник<sup>5</sup>, С.Ю. Ковалев<sup>6</sup>, К.Л. Кондратчик<sup>7</sup>, А.М. Кустанович<sup>3</sup>, Е.С. Лапотентова<sup>3</sup>, Д.В. Литвинов<sup>8</sup>, И.С. Мартынкевич<sup>9</sup>, Н.В. Мякова<sup>8</sup>, Т.В. Наседкина<sup>5</sup>, В.А. Овсепян<sup>10</sup>, Ю.В. Ольшанская<sup>8</sup>, О.М. Плеханова<sup>1</sup>, А.В. Попа<sup>11</sup>, Т.О. Ригер<sup>1,2</sup>, Л.И. Савельев<sup>1,2,11</sup>, О.В. Стренева<sup>1,2</sup>, М.В. Стригалева<sup>1</sup>, И.В. Шмунк<sup>12</sup>, Е.В. Шориков<sup>1,2</sup>, Л.Г. Фечина<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>ГУЗ Областная детская клиническая больница № 1, Екатеринбург;

<sup>2</sup>ГУЗ СО Институт медицинских клеточных технологий, Екатеринбург;

<sup>3</sup>ГУ Республиканский научно-практический центр детской онкологии и гематологии, Минск;

<sup>4</sup>ГУЗ Детская городская больница № 1, Санкт-Петербург;

<sup>5</sup>Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва;

<sup>6</sup>ФГАОУ ВПО Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина, Екатеринбург;

<sup>7</sup>Морозовская детская городская клиническая больница, Москва;

<sup>8</sup>ФГБУ Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева Минздравоохранения России, Москва;

<sup>9</sup>ФГУ Российский НИИ гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства, Санкт-Петербург;

<sup>10</sup>ФГУ Кировский НИИ гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства;

<sup>11</sup>ГОУ ВПО Уральская государственная медицинская академия, Екатеринбург;

<sup>12</sup>ОГУП Челябинская областная станция переливания крови

**Контакты:** Григорий Анатольевич Цаур [tsaur@mail.ru](mailto:tsaur@mail.ru)

Целью данной работы являлась характеристика перестроек 11q23 (MLL) у детей первого года жизни с острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ), включая частоту их выявления, взаимосвязь с различными иммунологическими вариантами ОЛЛ, а также определение структуры химерных транскриптов у пациентов исследуемой группы. Для этого нами обследовано 117 пациентов с ОЛЛ без синдрома Дауна в возрасте от 1 до 365 дней. Перестройки 11q23 (MLL) были выявлены у 74 (63,2%) пациентов. В этой группе преобладала транслокация t(4;11)(q21;q23)/MLL-AF4 — 63,5% случаев, реже встречались t(11;19)(q23;p13)/MLL-MLLT1 — 18,9% случаев, t(10;11)(p12;q23)/MLL-MLLT10 и t(1;11)(p32;q23)/MLL-EPS15 — по 6,8% случаев; t(9;11)(p22;q23)/MLL-MLLT3 — в 2,7%. У пациентов младше 6 мес перестройки 11q23 (MLL) были выявлены достоверно чаще, чем у пациентов в возрасте 6–12 мес — 84,0% и 47,8% случаев соответственно (p < 0,001). VI-вариант ОЛЛ статистически значимо чаще, а VII-ОЛЛ значительно реже встречались у пациентов с наличием аномалий 11q23 (MLL) по сравнению с теми, у кого эти транслокации не были выявлены (p < 0,001 в обоих случаях). У 26 пациентов с различными перестройками гена MLL было проведено определение структуры химерного транскрипта. В зависимости от локализации точки слияния в гене MLL и генах-партнерах выявлено 7 вариантов химерного транскрипта MLL-AF4, 3 варианта MLL-MLLT1, 2 варианта MLL-EPS15. В 14 (53,8%) случаях точка слияния располагалась в 11-м экзоне гена MLL.

**Ключевые слова:** острый лимфобластный лейкоз, дети первого года жизни, транслокации района 11q23, перестройки гена MLL

### Detection of 11q23 (MLL) rearrangements in infant acute lymphoblastic leukemia

G.A. Tsauro<sup>1,2</sup>, A.M. Popov<sup>1,2</sup>, O.V. Aleynikova<sup>3</sup>, E.G. Boychenko<sup>4</sup>, T.Yu. Verzhbitskaya<sup>1,2</sup>, E.V. Volochnik<sup>3</sup>, A.S. Ivanova<sup>1,2</sup>, O.V. Kalennik<sup>5</sup>, S.Yu. Kovalev<sup>6</sup>, K.L. Kondratchik<sup>7</sup>, A.M. Kustanovich<sup>3</sup>, E.S. Lapotentova<sup>3</sup>, D.V. Litvinov<sup>8</sup>, I.S. Martynkevich<sup>9</sup>, N.V. Myakova<sup>8</sup>, T.V. Nasedkina<sup>5</sup>, V.A. Ovsepyan<sup>10</sup>, Yu.V. Olshanskaya<sup>8</sup>, O.M. Plehanova<sup>1</sup>, A.V. Popa<sup>11</sup>, T.O. Riger<sup>1,2</sup>, L.I. Savelyev<sup>1,2,11</sup>, O.V. Strenева<sup>1,2</sup>, M.V. Strigaleva<sup>1</sup>, I.V. Shmunk<sup>12</sup>, E.V. Shorikov<sup>1,2</sup>, L.G. Fechina<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Regional Children's Hospital № 1, Yekaterinburg;

<sup>2</sup>Research Institute of Medical Cell Technologies, Yekaterinburg;

<sup>3</sup>Belarusian Research Center for Pediatric Oncology and Hematology, Minsk;

<sup>4</sup>Children's Municipal Hospital № 1, St.-Petersburg;

<sup>5</sup>Engelgardt Institute of Molecular Biology Russian Academy of Science, Moscow;

<sup>6</sup>B. Eltsyn Ural Federal University, Yekaterinburg;

<sup>7</sup>Morozov Pediatric Municipal Clinical Hospital, Moscow;

<sup>8</sup>Federal Research Institute of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Moscow;

<sup>9</sup>Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology, St.-Petersburg;

<sup>10</sup>Kirov Research Institute of Hematology and Transfusiology;

<sup>11</sup>Ural State Medical Academy, Yekaterinburg;

<sup>12</sup>Chelyabinsk Regional Blood Transfusion Station

117 cases of infant acute lymphoblastic leukemia without Down syndrome (aged from 1 to 365 days) were included in the current study. Rearrangements of 11q23 (MLL) were revealed in 74 (63.2%) patients. Among this group the most common rearrangement was t(4;11)

(q21;q23)/*MLL-AF4* detected in 63.5 % cases, less frequently was found *t(11;19)(q23;p13)/MLL-MLLT1* (in 18.9 % cases), *t(10;11)(p12;q23)/MLL-MLLT10* and *t(1;11)(p32;q23)/MLL-EPS15* (each one in 6.8 %), *t(9;11)(p22;q23)/MLL-MLLT3* in 2.7 %. Children under 6 months of age had significantly higher incidence of 11q23 (*MLL*) rearrangements in comparison with infants older than 6 months (84.0 % vs. 47.8 %,  $p < 0.001$ ). Patients with translocations 11q23 (*MLL*) more frequently had *B1-ALL* and less frequently *B11-ALL* than children without these rearrangements ( $p < 0.001$  for both). Fusion gene transcript was sequenced in 26 *MLL*-rearranged cases. Depending on breakpoint position within *MLL* and partner genes we detected 7 different types of *MLL-AF4* fusion gene transcript, 3 types of *MLL-MLLT1*, 2 types of *MLL-EPS15*. The most common fusion site within *MLL* gene was exon 11, detected in 14 (53.8 %) patients.

**Key words:** acute lymphoblastic leukemia, infants, translocation 11q23, *MLL* rearrangements

### Введение

Ген *MLL* (myeloid/lymphoid or mixed lineage leukemia), располагающийся на длинном плече 11-й хромосомы в регионе 11q23, состоит из 37 экзонов [1] и кодирует гистоновую метилтрансферазу. Перестройки с вовлечением района 11q23 и участием гена *MLL* встречаются примерно в 10 % всех случаев острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ) и в 3% случаев острого миелоидного лейкоза (ОМЛ) [2, 3]. Наиболее частыми генами-партнерами *MLL* являются *AF4*, *MLLT1* (*ENL*), *MLLT3* (*AF9*), *MLLT4* (*AF6*), *MLLT10* (*AF10*). Суммарно они встречаются более чем в 80% всех случаев *MLL*-позитивных острых лейкозов у детей и взрослых [4].

Среди всех возрастных категорий наиболее часто перестройки гена *MLL* выявляются у детей первого года жизни с ОЛЛ [5, 6], где частота их выявления может достигать 79% [7, 8]. Несмотря на относительную редкость ОЛЛ у детей данной возрастной группы, он представляет большой интерес для исследователей как из-за неблагоприятного прогноза [9–13], так и из-за особенностей биологии опухоли и наличия широкого спектра перестроек гена *MLL* [6, 14], которые могут возникать *in utero* [10, 15].

По механизму образования все перестройки 11q23 (*MLL*) можно разделить на инверсии, делеции, внутренние тандемные повторы, вставки, транслокации с вовлечением 3 и более хромосом, а также комбинации различных вариантов, например транслокация с одновременной делецией части гена *MLL* [4]. Наиболее часто встречаются реципрокные транслокации, на долю которых приходится более 80 % всех случаев перестроек 11q23 (*MLL*) как при ОЛЛ, так и при ОМЛ [16]. На сегодняшний день на молекулярном уровне охарактеризовано 64 транслокации [4]. Столь большое число перестроек затрудняет проведение молекулярно-генетической диагностики и верификацию гена-партнера [12].

Необходимо отметить, что особую ценность приобретает выявление перестроек гена *MLL* в свете того, что они представляют собой удобную мишень для мониторинга минимальной остаточной болезни (МОБ) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Ранее, в рамках протокола *MLL-Baby* [17], нам удалось показать прогностическую значимость выяв-

ления МОБ данным способом [18], а также раннего достижения молекулярной ремиссии у пациентов с наличием различных перестроек гена *MLL* [19].

Целью данной работы являлась характеристика перестроек гена *MLL* (11q23) у детей первого года жизни с ОЛЛ.

### Материалы и методы

Проанализированы данные 117 пациентов с ОЛЛ без синдрома Дауна в возрасте от 1 до 365 дней (медиана — 211 дней). Их подробная характеристика представлена в табл. 1. Диагноз ОЛЛ у становивался на основании стандартных цитоморфологических показателей [20], дополненных данными иммунофенотипирования согласно критериям группы EGIL (European Group for the Immunological Characterization of Leukemias) [21]. Все пациенты получали терапию по одному из следующих химиотерапевтических протоколов: *MLL-Baby*, *ALL-MB-2002*, *ALL-MB-2008*, *ALL-BFM 90*, *ALL-MB 91*, *CO ALL* в детских онкогематологических клиниках Российской Федерации

Таблица 1. Инициальные данные 117 детей первого года жизни с ОЛЛ

	n	%
<b>Возраст</b>		
Младше 6 мес	50	42,7
Старше 6 мес	67	57,3
<b>Пол</b>		
Мужской	43	36,8
Женский	74	62,2
<b>Имунофенотип</b>		
Нет данных	3	—
В1-ОЛЛ	59	51,8*
ВП-ОЛЛ	35	30,7*
ВПШ-ОЛЛ	17	14,9*
Т-ОЛЛ	3	2,6*

\* Процент рассчитан от 114 пациентов, которым было проведено иммунофенотипирование.

**Таблица 2.** Число пациентов, обследованных разными методами и их комбинациями

Метод	Число пациентов
Цитогенетика как единственный метод	14
ОТ-ПЦР как единственный метод	38
FISH как единственный метод	1
Цитогенетика + ОТ-ПЦР	35
Цитогенетика + FISH	24
ОТ-ПЦР + FISH	29
Цитогенетика + ОТ-ПЦР + FISH	23

и Республики Беларусь. Информированное согласие на проведение диагностических и лечебных процедур было получено во всех случаях.

Для цитогенетического анализа использовали клетки костного мозга и периферической крови, которые брали до начала терапии и культивировали 1 ч («прямые препараты») и/или 24–48 ч. Препараты окрашивали G-методом с предварительной обработкой трипсином. В большинстве случаев анализировали не менее 20 метафазных пластинок. Каритипирование проводили в соответствии с международной номенклатурой хромосом человека [22]. В 30 случаях дополнительно проводили исследование методом флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) с локус-специфичным зондом LSI MLL Dual Color, Break Apart Rearrangement Probe (Abbott, США) согласно инструкции производителя.

Всем пациентам проводилось определение следующих химерных транскриптов: *MLL-AF4*, *MLL-MLLT1*, *MLL-MLLT3*, *MLL-MLLT4*, *MLL-MLLT10*, *MLL-ELL*. У 11 пациентов с отсутствием вышеуказанных химерных транскриптов дополнительно определяли экспрессию *MLL-SEPT9*, *MLL-MLLT11*, *MLL-EPS15*. Выявление химерных транскриптов проводили методом гнездовой обратнo-транскриптазной полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) или ОТ-ПЦР с последующей гибридизацией на биочипе (набор реагентов «ЛК-Био чип», Биочип-ИМБ, Россия) по ранее описанным протоколам [19, 23–25]. В дальнейшем оба метода представлены как метод ОТ-ПЦР.

Число пациентов, обследованных разными методами и их комбинациями, приведено в табл. 2. Стандартное цитогенетическое исследование проведено 73 пациентам, ОТ-ПЦР — 102, FISH — 30. Все 3 метода одновременно применены у 23 пациентов. Использование того или иного метода выявления перестроек 11q23 (*MLL*) было обусловлено диагностическими возможностями каждой из лабораторий, проводивших обследование пациентов.

Для выявления типа химерных транскриптов проводили секвенирование полученных ПЦР-продуктов в прямом и обратном направлении на генетическом анализаторе «ABI Prism 3130» (Applied Biosystems, США) с использованием «BigDye e Terminator 3.1» (Applied Biosystems, США) согласно инструкции производителя.

При сравнении групп пациентов по качественным признакам применяли критерий  $\chi^2$  с поправкой Йетса. Различия считали достоверными при  $p < 0,05$ . Анализ результатов проводили с помощью программ для статистической обработки данных Statistica 6.0.

### Результаты

В исследованной группе перестройки гена *MLL* (11q23) выявлены у 74 из 117 (64,2 %) пациентов. Частота выявления перестроек 11q23 (*MLL*) при использовании различных методов диагностики представлена в табл. 3. Сравнение частоты выявления перестроек 11q23 (*MLL*), проведенных разными методами, показало, что при использовании FISH перестройки гена *MLL* выявлялись несколько чаще (73,3%), но полученные результаты статистически не отличались от результатов цитогенетического (60,3%) и молекулярно-генетического (61,8%) методов исследования ( $p = 0,303$  и  $p = 0,326$  соответственно).

Результаты цитогенетических и молекулярно-генетических исследований представлены в табл. 4.

**Таблица 3.** Сравнение цитогенетического и молекулярно-генетических методов для выявления перестроек 11q23 (*MLL*)

Метод	Обследовано (n = 117)	Выявлено (n = 74)
Цитогенетическое исследование	73	44 (60,3 %)
ОТ-ПЦР	102	63 (61,8 %)
FISH	30	22 (73,3 %)

**Таблица 4.** Выявленные перестройки 11q23 (*MLL*)

	n	%
Всего обследовано	117	
Всего выявлено перестроек гена <i>MLL</i>	74	63,2
t(4;11)(q21;q23) / <i>MLL-AF4</i>	47	40,2
t(11;19)(q23;p13) / <i>MLL-MLLT1</i>	14	12,0
t(9;11)(p22;q23) / <i>MLL-MLLT3</i>	2	1,7
t(10;11)(p12;q23) / <i>MLL-MLLT10</i>	5	4,3
t(1;11)(p32;q23) / <i>MLL-EPS15</i>	5	4,3
Неизвестный ген-партнер	1	0,9

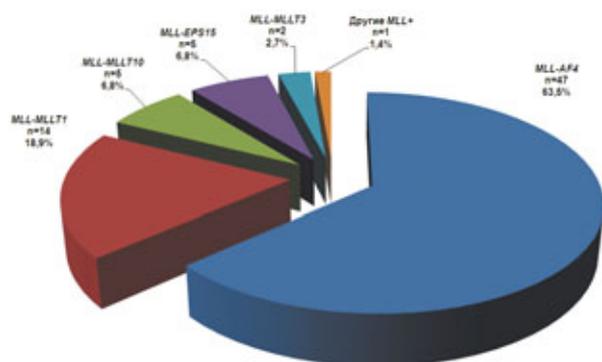


Рис. 1. Относительная частота выявления перестроек 11q23 (MLL) у пациентов с ОЛЛ

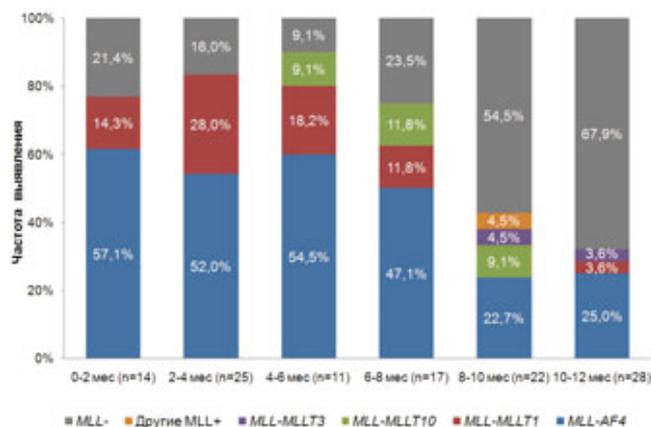


Рис. 2. Встречаемость перестроек 11q23 (MLL) в различных возрастных группах

Самой частой была транслокация  $t(4;11)(q21;q23)/MLL-AF4$ , на 2-м месте —  $t(11;19)(q23;p13)/MLL-MLLT1$ , другие перестройки гена *MLL* наблюдались значительно реже. В 1 (0,9%) случае методом FISH на интерфазных ядрах была выявлена перестройка гена *MLL*, однако идентифицировать ген-партнер не уда-

лось. Относительная частота выявления перестроек 11q23 (*MLL*) представлена на рис. 1. На долю  $t(4;11)(q21;q23)/MLL-AF4$  и  $t(11;19)(q23;p13)/MLL-MLLT1$  приходилось 63,5% и 18,9% от числа выявленных перестроек *MLL/11q23* соответственно.

Для исследования взаимосвязи между перестройками 11q23 (*MLL*) и возрастом пациентов все случаи ОЛЛ у детей первого года жизни были разделены на 6 возрастных групп (рис. 2). Частота выявления  $t(4;11)(q21;q23)/MLL-AF4$  постепенно снижалась с увеличением возраста пациентов (от 57,1% в возрастной группе 0–2 мес до 25,0% у детей в возрасте 10–12 мес), однако обнаруженные различия не достигли статистической значимости ( $p = 0,088$ ). Транслокация  $t(11;19)(q23;p13)/MLL-MLLT1$  наиболее часто фиксировалась у детей в возрасте 2–4 мес — в 7 (28,0%) из 25 случаев. Четверо из 5 пациентов с  $t(10;11)(p12;q23)/MLL-MLLT10$  были старше 6 мес. Случаи с наличием  $t(1;11)(p32;q23)/MLL-EPS15$  практически равномерно представлены во всех возрастных группах. Транслокация  $t(9;11)(p22;q23)/MLL-MLLT3$  не выявлялась у пациентов младше 8 мес.

При разделении пациентов на 2 группы — старше и младше 6 мес — выявлено, что у детей в возрасте младше 6 мес перестройки 11q23 (*MLL*) были обнаружены достоверно чаще (84,0% случаев) по сравнению с пациентами в возрасте 6–12 мес (47,8% случаев) ( $p < 0,001$ ). Статистически значимые различия сохранялись для  $t(4;11)(q21;q23)/MLL-AF4$  (54,0% и 29,8% соответственно) ( $p = 0,014$ ) и  $t(11;19)(q23;p13)/MLL-MLLT1$  (22,0% и 4,5% соответственно) ( $p = 0,009$ ).

Результаты иммунофенотипирования опухолевых клеток представлены в табл. 5. У 39 (83,0%) из 47 пациентов с наличием  $t(4;11)(q21;q23)/MLL-AF4$  был обнаружен VI-ОЛЛ. Значительно реже у пациентов с данной хромосомной аберрацией выявлялись VII- и VIII-варианты (10,6% и 6,4% соответственно). Все пациенты с наличием  $t(1;11)(p32;q23)/MLL-EPS15$ ,

Таблица 5. Число пациентов с различными иммунологическими вариантами ОЛЛ и наличием перестроек 11q23 (MLL)

	VI-ОЛЛ	VII-ОЛЛ	VIII-ОЛЛ	T-ОЛЛ	Нет данных	Всего
$t(4;11)(q21;q23)/MLL-AF4$	39	5	3	0	0	47
$t(11;19)(q23;p13)/MLL-MLLT1$	5	3	5	0	1	14
$t(9;11)(p22;q23)/MLL-MLLT3$	0	2	0	0	0	2
$t(10;11)(p12;q23)/MLL-MLLT10$	2	0	3	0	0	5
$t(1;11)(p32;q23)/MLL-EPS15$	5	0	0	0	0	5
Неизвестный ген-партнер <i>MLL</i>	1	0	0	0	0	1
Нет перестроек 11q23 ( <i>MLL</i> )	7	25	6	3	2	43
<b>Всего</b>	<b>59</b>	<b>35</b>	<b>17</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>117</b>

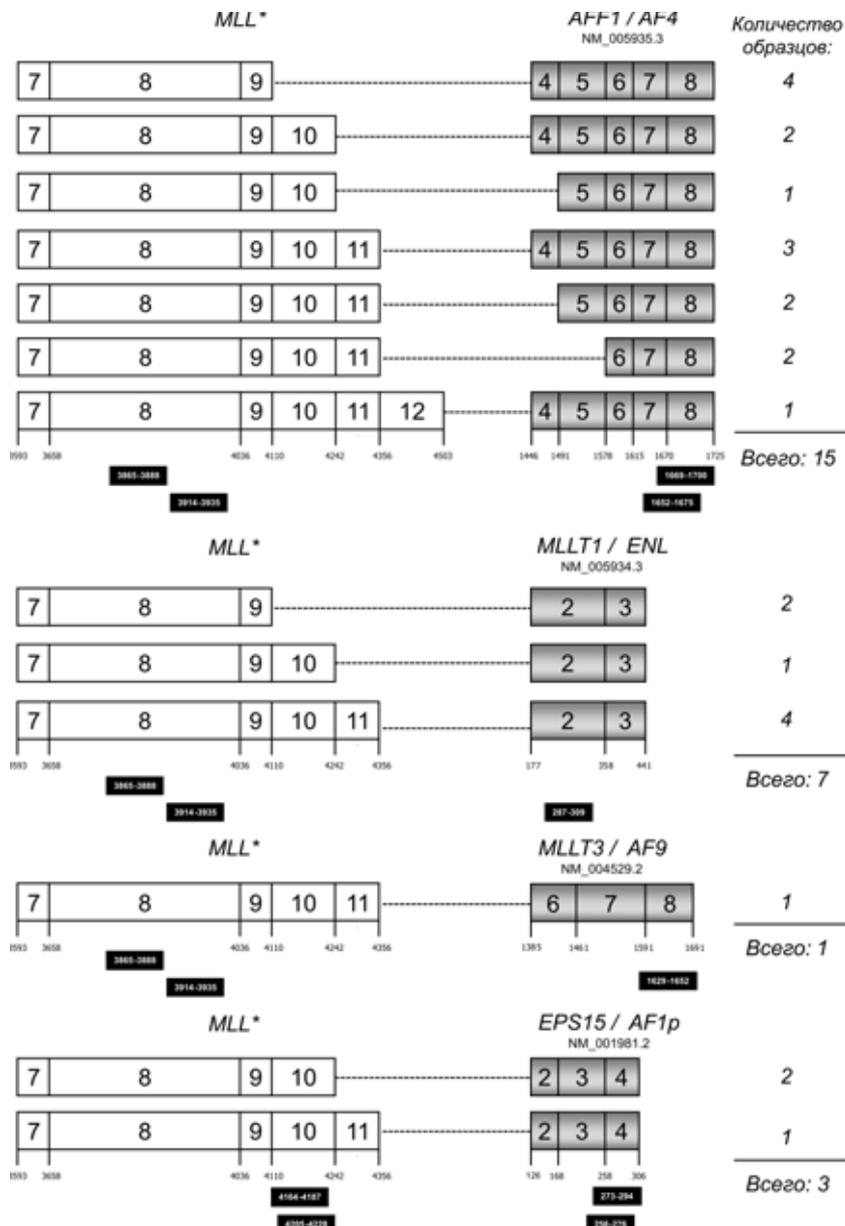


Рис. 3. Локализация точек слияния в гене *MLL* и генах-партнерах у 26 пациентов. Белые прямоугольники — экзоны гена *MLL*, серые — экзоны генов-партнеров. Для всех генов-партнеров приведены номера референсных последовательностей (NM) нормальных транскриптов.

\* Нумерация экзонов гена *MLL* дана по работе Nilson et al., 1996 [1]. Праймеры для проведения гнездовой *CT-ПЦР* схематически представлены в виде черных прямоугольников. Цифры внутри черных прямоугольников соответствуют местам начала и конца праймера по отношению к нормальной *mРНК* соответствующего транскрипта. Цифры под схематическим изображением экзонов соответствуют месту началу экзона

*t(10;11)(p12;q23)/MLL-MLLT10*, а также с неопределенным геном-партнером *MLL* имели VI-ОЛЛ или VIII-ОЛЛ, в то время как оба пациента с *t(9;11)(p22;q23)/MLL-MLLT3* — VII-ОЛЛ. При наличии *t(11;19)(q23;p13)/MLL-MLLT1* по 5 (38,5 %) из 13 пациентов имели VI-ОЛЛ и VIII-ОЛЛ, а 3 (23,1 %) — VII-ОЛЛ. У пациентов с отсутствием перестроек *MLL/11q23* в большинстве случаев (60,1 %) зафиксирован VII-ОЛЛ.

Таким образом, у пациентов с наличием перестроек 11q23 (*MLL*) VI-ОЛЛ встречался достоверно чаще, чем другие иммунологические варианты ( $p < 0,001$ ). В то же время VII-ОЛЛ у этих пациентов

выявлялся значительно реже, чем VI и VIII ( $p < 0,001$ ). Связи наличия VIII-ОЛЛ с выявлением перестроек 11q23 (*MLL*) выявлено не было ( $p = 0,989$ ). У пациентов с T-ОЛЛ ( $n = 3$ ) перестроек гена *MLL* (11q23) нами не найдено.

Исследование методом секвенирования для выявления структуры химерного транскрипта было выполнено у 26 больных. Из этого числа 15 пациентов имели *MLL-AF4*, 7 — *MLL-MLLT1*, 3 — *MLL-EPS15*, 1 — *MLL-MLLT3*. Среди всех транскриптных вариантов *MLL-AF4* наиболее часто был обнаружен вариант со слиянием 9-го экзона гена *MLL* и 4-го экзона гена *AF4* (e9e4) — в 4 случаях из 15. Реже выявлялись

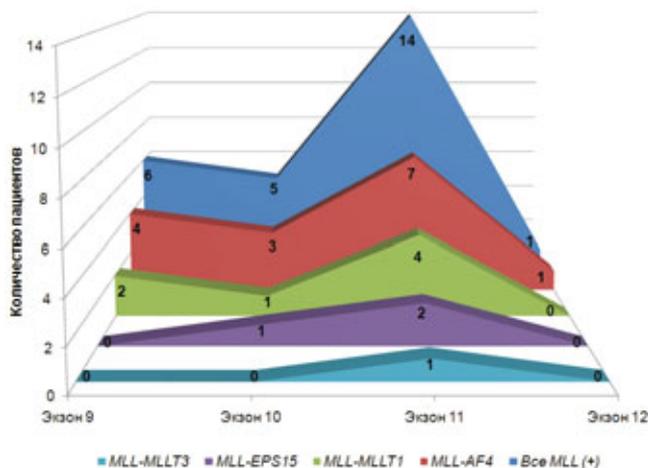


Рис. 4. Распределение точек слияния в гене *MLL*. Представлены результаты определения точек слияния в регионе с 9-го по 12-й экзон гена *MLL* у 26 пациентов с ОЛЛ, включая 15 случаев *MLL-AF4*, 7 случаев *MLL-MLLT1*, 3 случая *MLL-EPS15*, 1 случай *MLL-MLLT3*

химерные транскрипты e11e4 — 3 случая, e10e4, e11e5, e11e6 — по 2 случая каждого соответственно (рис. 3). Среди транскриптных вариантов *MLL-MLLT1* преобладал e11e2 — 4 случая из 7. У всех 7 пациентов точка слияния в гене *MLL* находилась во 2-м экзоне. Среди 3 пациентов с наличием химерного транскрипта с *MLL-EPS15* у 2 был выявлен вариант e11e2, у 1 — e10e2. Единственный пациент с *MLL-MLLT3*, у которого была определена структура химерного транскрипта, имел точку слияния в 11-м и 6-м экзонах соответственно. Суммарно наиболее частой точкой слияния в гене *MLL* являлся 11-й экзон, на долю которого приходится более половины всех исследованных нами случаев — 14 из 25 (рис. 4).

### Обсуждение

В настоящей работе проведено исследование частоты встречаемости различных перестроек 11q23 (*MLL*) у детей первого года жизни с диагнозом ОЛЛ. Эти перестройки нами были выявлены у 74 (63,2 %) из 117 пациентов. Оказалось, что частота обнаружения вышеуказанных перестроек ниже, чем в международном исследовании Interfant-99, где перестройки *MLL* были зарегистрированы в 79,3 % случаев (расчет сделан от числа информативных исследований) [7], а также в 2 последовательных исследованиях MLL96 и MLL98, где частота выявления перестроек гена *MLL* составила 78,4% [8]. В то же время наши результаты соответствуют данным, полученным в разное время в Бразилии — 58,1% [26], Германии — 65,9%, [27], Великобритании — 66,0% [28], США — 68,7% [13]. Однозначно объяснить причину полученных различий не представляется возможным. При этом следует отметить, что большинство пациентов, включенных в исследование Interfant-99, наряду с цитогенетическим и молекулярно-генетическим исследованиями были обследованы методом FISH [7], а всем пациентам, получавшим терапию по протоколам

MLL96 и MLL98, проводилось исследование методом гибридизации по Саузерну [8]. Оба метода позволяют выявить любые перестройки *MLL*, в том числе криптические. В то же время проведенное в рамках данной работы сравнение частоты выявления перестроек 11q23 (*MLL*) не выявило статистически значимых различий использования 3 диагностических методов. Однако это может быть связано с недостаточной мощностью исследования, в частности, небольшим количеством пациентов, которым проводилась FISH.

Сравнение относительной частоты выявления различных перестроек 11q23 (*MLL*) показало, что наиболее часто в исследованной нами группе встречались t(4;11)(q21;q23)/*MLL-AF4* и t(11;19)(q23;p13)/*MLL-MLLT1*, что полностью совпадает с ранее опубликованными данными [4, 7, 8, 13, 26–28]. Данные литературы по частоте встречаемости транслокации t(9;11)(p22;q23)/*MLL-MLLT3* противоречивы: ряд исследователей ставят ее на 3-е место по частоте обнаружения у детей первого года жизни с ОЛЛ (11,2–15,6 %) [7, 8, 13], в то же время в работе С.-Н. Pui et al. при анализе данных 11 кооперативных групп по лечению ОЛЛ у детей младше 12 месяцев данная транслокация была выявлена только в 3,7 % случаев от общего числа перестроек 11q23 (*MLL*) [12]. В нашем исследовании t(9;11)(p22;q23)/*MLL-MLLT3* встретилась только у 2 (2,7 %) пациентов.

Несколько чаще, чем это описывалось ранее (6,7 % по сравнению с 2,3–3,0 %) [4, 12] нам встретилась реципрокная транслокация t(1;11)(p32;q23), ведущая к образованию химерного гена *MLL-EPS15*. Ген *EPS15* (epidermal growth factor receptor pathway substrate 15), также известный как *AF1P*, *AF-1P*, *MLLT5*, впервые описан Bernard et al. в 1994 г. [29]. Данный ген, расположенный на коротком плече 1-й хромосомы в регионе 1p32, кодирует один из рецепторов эпидермального фактора роста. В отличие от белков AF4, MLL T1, MLLT3 и MLLT10, которые располагаются в ядре клетки, EPS15 локализуется в цитоплазме, что обуславливает несколько иной механизм взаимодействия с белком MLL [30]. При этом происходит образование двух спиральных олигомеров EPS15, которые только в таком виде способны приводить к лейкемической трансформации белка MLL. Следует отметить, что t(1;11)(p32;q23)/*MLL-EPS15* примерно с одинаковой частотой (2–3 %) описывается у детей как при ОЛЛ, так и при ОМЛ [4, 31].

По нашим данным, частота выявления перестроек 11q23 (*MLL*) достоверно отличалась у детей младше и старше 6 мес ( $p < 0,001$ ); при этом пик приходится на возрастную группу 4–6 мес, где эта величина достигла 91,9 %. Сходные результаты получены и другими исследовательскими группами [32, 33]. Описанное в отдельных работах преобладание частоты выявления перестроек гена *MLL* у детей в первые 3 месяца жизни по сравнению с более старшими детьми первого года жизни [26] не нашло подтверждения в нашей работе.

Проведенный нами анализ иммунофенотипа опухолевых клеток показал преобладание у детей первого года жизни VI-варианта ОЛЛ, который был выявлен у 51,8% пациентов, что хорошо согласуется с ранее опубликованными данными, в которых VI-ОЛЛ выявлялся с частотой 47,3–64,6% [26, 27, 34]. Мы вместе с другими авторами отмечаем доминирование этого иммунологического варианта у пациентов с наличием перестроек 11q23 (*MLL*) и, наоборот, более частое выявление VII-ОЛЛ среди больных, у которых эти перестройки не были обнаружены [26, 27, 32, 34].

Большая вариабельность точек разрыва в гене *MLL* и генах-партнерах значительно усложняет выявление отдельных перестроек и использование их в качестве мишеней для мониторинга МОБ. В связи с этим чрезвычайно важно определять структуру химерных транскриптов для последующего качественного и количественного анализа МОБ методом ПЦР в реальном времени. Известно, что, в отличие от взрослых пациентов с ОЛЛ, у детей первого года жизни наиболее частой зоной разрыва в гене *MLL* является интрон 11, на долю которого приходится до половины всех случаев перестроек гена *MLL* [4, 35]. На уровне матричной РНК (мРНК) это приводит к образованию химерных транскриптов с точкой слияния в экзоне 11. В нашей работе это встретилось у 14 (53,8%) из 26 обследованных пациентов. Кроме того, для *MLL-AF4*, *MLL-MLLT1*, *MLL-EPS15* нами выявлено более 1 варианта химерных транскриптов. Наибольшей гетерогенностью обладал *MLL-AF4*, для которого выявлено 7 транскриптных вариантов; для *MLL-MLLT1* было найдено 3 варианта, для *MLL-EPS15* — 2. При этом, если в *MLLT1* и *EPS15* точка слияния в гене-партнере была постоянной (экзон 2 во всех случаях), то в *AF4* было выявлено 3 точки слияния — экзон 4 (11 случаев), экзон 5 (3 случая) и экзон 6 (2 случая).

Исследование инициальных характеристик у пациентов первого года жизни с ОЛЛ важно по ряду причин. Показано, что такие параметры, как возраст, инициальный лейкоцитоз, наличие и тип перестроек 11q23 (*MLL*), иммунофенотип и ответ на терапию оказывают важное влияние на исход данного заболевания [7, 12, 36–39].

Известно, что бессобытийная выживаемость детей младше 12 месяцев, больных ОЛЛ, значительно уступает таковой детей старше 12 месяцев [12, 40, 41]. Имеются существенные различия и среди пациентов первого года жизни. Показано увеличение длительности бессобытийной выживаемости в соответствии с увели-

чением возраста пациентов [5, 7], а минимальная продолжительность бессобытийной выживаемости зафиксирована у пациентов с лейкозом, манифестировавшим в течение первого месяца жизни [42].

Практически все исследовательские группы сходятся в том, что наличие любых перестроек 11q23 (*MLL*) значительно ухудшает прогноз заболевания [7–9, 12, 13]. В то же время существует мнение о неравнозначной прогностической роли различных аномалий 11q23 (*MLL*) при ОЛЛ у детей первого года жизни. Традиционно считается, что наиболее неблагоприятной является транслокация t(4;11)/*MLL-AF4*, в то время как прогноз для пациентов с t(11;19)/*MLL-MLLT1* и t(9;11)/*MLL-MLLT3* — несколько лучше [12, 36, 43]. С другой стороны, в рамках проспективного исследования Interfant-99 пациенты с любой из вышеперечисленных транслокаций имели сходные показатели бессобытийной выживаемости [5]. Все это подчеркивает необходимость дальнейшего накопления данных о связи конкретных перестроек с исходами ОЛЛ у детей первого года жизни.

#### Выводы

1. Перестройки района 11q23 с вовлечением гена *MLL* выявлены нами у 63,2% пациентов с ОЛЛ. Среди пациентов исследованной группы преобладали t(4;11)(q21;q23)/*MLL-AF4* — 63,5% случаев и t(11;19)(q23;p13)/*MLL-MLLT1* — 18,9% случаев.

2. Наиболее часто перестройки 11q23 (*MLL*) обнаружены в возрастной группе 4–6 месяцев, где частота выявления достигла 91,9%, а наиболее редко — у пациентов в возрасте 10–12 месяцев (32,1%).

3. У пациентов в возрасте младше 6 месяцев перестройки 11q23 (*MLL*) были выявлены в 84,0% случаев, а в возрасте 6–12 месяцев — в 47,8% случаев.

4. VI-вариант ОЛЛ достоверно чаще, а VII-ОЛЛ значительно реже встречались у пациентов с наличием перестроек 11q23 (*MLL*).

5. При исследовании структуры химерных транскриптов выявлено, что наиболее часто точка слияния располагается в 11-м экзоне гена *MLL*.

*Авторы выражают глубокую признательность Е.В. Флейшман и О.И. Соковой за ценные советы и критические замечания, полученные в процессе работы над статьей, а также благодарят врачей-гематологов и детских онкологов, предоставивших данные о пациентах первого года жизни с острыми лейкозами.*

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Nilson I., Loechner K., Siegler G. et al. Exon/intron structure of ALL1 (*MLL*) gene involved in translocations to chromosomal region 11q23 and acute leukemias. *Br J Haematol* 1996;94(4):966–72.  
2. Armstrong S., Look A. Molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 2005;23:6306–15.

3. Schoch C., Schnittger S., Klaus M. et al. AML with 11q23/*MLL* abnormalities as defined by the WHO classification: incidence, partner chromosomes, FAB subtype, age distribution, and prognostic impact in an unselected series of 1897 cytogenetically analyzed AML cases. *Blood* 2003;102:2395–402.

4. Meyer C., Kowarz E., Hofmann J. et al. New insights to the *MLL* recombinome of acute leukemias. *Leukemia* 2009;23:1490–9.  
5. Reaman G., Zeltzer P., Bleyer W. et al. Acute lymphoblastic leukemia in infants less than one year of age: a cumulative experience of the Children's Cancer Study Group. *J Clin Oncol* 1985;3:1513–21.

6. Biondi A., Cimino G., Pieters R., Pui C.-H. Biological and therapeutic aspects of infant leukemia. *Blood* 2000;96:24–33.
7. Pieters R., Schrappe M., De Lorenzo P. et al. A treatment protocol for infants younger than 1 year with acute lymphoblastic leukaemia (Interfant-99): an observational study and a multicentre randomised trial. *Lancet* 2007;370(9583):240–50.
8. Tomizawa D., Koh K., Sato T. et al. Outcome of risk-based therapy for infant acute lymphoblastic leukemia with or without an MLL gene rearrangement, with emphasis on late effects: a final report of two consecutive studies, MLL96 and MLL98, of the Japan Infant Leukemia Study Group. *Leukemia* 2007;11:2258–63.
9. Chen C.-S., Sorensen P., Domer P. et al. Molecular rearrangements on chromosome 11q23 predominate in infant acute lymphoblastic leukemia and are associated with specific biologic variables and poor outcome. *Blood* 1993;81:2386–93.
10. Greaves M. Infant leukemia: biology, aetiology and treatment. *Leukemia* 1996;10:372–7.
11. Isoyama K., Eguchi M., Hibi S. et al. Risk-directed treatment of infant acute lymphoblastic leukaemia based on early assessment of MLL gene status: results of the Japan Infant Leukaemia Study (MLL96). *Br J Haematol* 2002;118:999–1010.
12. Pui C.-H., Chessells J., Camitta B. et al. Clinical heterogeneity in childhood acute lymphoblastic leukemia with 11q23 rearrangements. *Leukemia* 2003;17:700–6.
13. Hilden J., Dinndorf P., Meerbaum S. et al. Analysis of prognostic factors of acute lymphoblastic leukemia in infants: report on CCG 1953 from the Children's Oncology Group. *Blood* 2006;108:441–51.
14. Cimino G., Rapanotti M., Sprovieri T., Elia L. ALL1 gene alterations in acute leukemia: biological and clinical aspects. *Haematologica* 1998;83:350–7.
15. Gale K., Ford A., Repp R. et al. Backtracking leukemia to birth: identification of clonotypic gene fusion sequences in neonatal blood spots. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:13950–4.
16. Slany R. The molecular biology of mixed lineage leukemia. *Haematologica* 2009;94:984–93.
17. Fechina L., Shorikov E., Tsauro G. et al. Contribution of all-trans retinoic acid to improved early relapse-free outcome in infant acute lymphoblastic leukemia comparing to the chemotherapy alone. *Blood* 2007;110(11):832A. Abstr. 2828.
18. Tsauro G., Popov A., Nasedkina T. et al. Minimal residual disease monitoring by quantification of fusion gene transcript in infant with MLL-rearranged acute lymphoblastic leukemia by MLL-Baby protocol. *Blood* 2010;116(21):1126. Abstr. 2731.
19. Цаур Г.А., Наседкина Т.В., Попов А.М. и др. Время достижения молекулярной ремиссии как фактор прогноза у детей первого года жизни с острым лимфобластным лейкозом. *Онкогематология* 2010;2:46–54.
20. Bennett J., Catovsky D., Daniel M. et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol* 1976;33:451–8.
21. Bene M., Castoldi G., Knapp W. et al. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia* 1995;9(10):1783–6.
22. ISCN (2005): An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (2005). Editors: Shaffer L.G., Tommerup N. Karger, Basel, Switzerland, 2005.
23. Borkhardt A., Repp R., Haupt E. et al. Molecular analysis of MLL/AF4 recombination in infant acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 1994;8:549–53.
24. Pallisgaard N., Hokland P., Riishoj D. et al. Multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction for simultaneous screening of 29 translocations and chromosomal aberrations in acute leukemia. *Blood* 1998;92:574–88.
25. Dongen van J., Macintyre E., Gabert J. et al. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. *Leukemia* 1999;13:1901–18.
26. Emerenciano M., Arias D., Coser V. et al. Molecular cytogenetic findings of acute leukemia included in the Brazilian collaborative study group of infant acute leukemia. *Pediatr Blood Cancer* 2006;47:549–54.
27. Borkhardt A., Wuchter C., Viehmann S. et al. Infant acute lymphoblastic leukemia — combined cytogenetic, immunophenotypic and molecular analysis of 77 cases. *Leukemia* 2002;16:1685–90.
28. Chessells J., Harrison C., Kempinski H. et al. Clinical features, cytogenetics and outcome in acute lymphoblastic and myeloid leukaemia of infancy: report from the MRC Childhood Leukaemia working party. *Leukemia* 2002;16:776–84.
29. Bernard O., Mauchauffe M., Mecucci C. et al. A novel gene, AF-lp, fused to HRX in t(1;11)(p32;q23) is not related to AF-4, AF-9 nor ENL. *Oncogene* 1994;9:1039–45.
30. DiMartino J., Cleary M. MLL rearrangements in haematological malignancies: lessons from clinical and biological studies. *Br J Haematol* 1999;106:614–26.
31. Harrison C., Cuneo A., Clark R. et al. Ten novel 11q23 chromosomal partner sites. *Leukemia* 1998;12:811–22.
32. Jansen M., Corral L., van der Velden V. et al. Immunobiological diversity in infant acute lymphoblastic leukemia is related to the occurrence and type of MLL gene rearrangement. *Leukemia* 2007;21:633–41.
33. Lightfoot T. Aetiology of Childhood Leukemia. *Bioelectromagnetics* 2005; Suppl 7:5–11.
34. Mathew S., Behm F., Dalton J., Raimondi S. Comparison of cytogenetics, Southern blotting and fluorescence *in situ* hybridization as methods for detecting MLL gene rearrangements in children with acute leukemia and with 11q23 abnormalities. *Leukemia* 1999;13:1713–20.
35. Burmeister T., Meyer C., Schwartz S. et al. The MLL recombinome of adult CD10-negative B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: results from the GMALL study group. *Blood* 2009; 113:4011–5.
36. Pui C.-H., Gaynon P., Boyett J. et al. Outcome of treatment in childhood acute lymphoblastic leukaemia with rearrangements of the 11q23 chromosomal region. *Lancet* 2002;359:1909–15.
37. Silverman L., McLean T., Gelber R. et al. Intensified therapy for infants with acute lymphoblastic leukemia results from the Dana-Farber Cancer Institute Consortium. *Cancer* 1997;80:2285–95.
38. Dordelmann M., Reiter A., Borkhardt A. et al. Prednisone response is the strongest predictor of treatment outcome in infant acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1999;94:1209–17.
39. Velden van der V., Corall L., Valsecchi M. et al. Prognostic significance of minimal residual disease in infants with acute lymphoblastic leukemia treated within the Interfant-99 protocol. *Leukemia* 2009;23:1073–9.
40. Pui C.-H., Frankel L., Carroll A. et al. Clinical characteristics and treatment outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia with the t(4;11)(q21;q23): A collaborative study of 40 cases. *Blood* 1991;77:440–7.
41. Mann G., Cazzaniga G., van der Velden V. et al. Acute lymphoblastic leukemia with t(4;11) in children one year and older: the 'big sister' of the infant disease? *Leukemia* 2007;21:642–6.
42. Linden van der M., Valsecchi M., De Lorenzo P. et al. Outcome of congenital acute lymphoblastic leukemia treated on the Interfant-99 protocol. *Blood* 2009; 114:3764–8.
43. Pui C.-H., Ribeiro R., Campana D. et al. Prognostic factors in the acute lymphoid and myeloid leukemias of infants. *Leukemia* 1996;10:952–6.