

© 2023 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ
им. Дмитрия Рогачева»
Минздрава России
Поступила 22.10.2022
Принята к печати 10.11.2022

DOI: 10.24287/1726-1708-2023-22-1-12-20

Использование цифровой капельной полимеразной цепной реакции для молекулярной диагностики и мониторинга ответа на терапию при гистиоцитозе из клеток Лангерганса с мутацией *BRAF V600E*

Д.С. Осипова¹, Е.В. Райкина¹, Э.И. Людовских¹, Д.А. Евсеев¹, И.И. Калинина¹,
Д.Д. Байдильдина¹, А.М. Попов¹, А.А. Семченкова¹, Е.А. Бурцев¹, Г.О. Бронин²,
А.А. Масчан¹, М.А. Масчан¹

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

²ГБУЗ «Морозовская детская городская клиническая больница Департамента здравоохранения г. Москвы», Москва

Контактная информация:

Осипова Дарья Сергеевна,
лаборант-исследователь лаборатории
молекулярной биологии ФГБУ «НМИЦ ДГОИ
им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России
Адрес: 117997, Москва,
ул. Саморы Машела, 1
E-mail: darya.osipova@fccho-moscow.ru

В данной статье показаны возможности высокочувствительного метода цифровой капельной полимеразной цепной реакции в диагностике и мониторинге аллельной нагрузки мутации *BRAF V600E* в свободно циркулирующей ДНК, а также в популяции миелоидных предшественников костного мозга в группе пациентов с гистиоцитозом из клеток Лангерганса. Применение данной методики поможет определить подходы к оценке минимальной остаточной болезни, а также улучшить понимание распространенности процесса и патогенеза гистиоцитоза из клеток Лангерганса. Исследование одобрено независимым этическим комитетом и утверждено решением ученого совета НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева.

Ключевые слова: полимеразная цепная реакция, гистиоцитоз из клеток Лангерганса, молекулярная диагностика, мутация *BRAF V600E*

Осипова Д.С. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. 2023; 22 (1): 12–20.
DOI: 10.24287/1726-1708-2023-22-1-12-20

© 2023 by «D. Rogachev NMCRPHOI»

Received 22.10.2022
Accepted 10.11.2022

The use of droplet digital polymerase chain reaction for the molecular diagnosis and monitoring of treatment response in patients with Langerhans cell histiocytosis with the *BRAF V600E* mutation

D.S. Osipova¹, E.V. Raykina¹, E.I. Lyudovskikh¹, D.A. Evseev¹, I.I. Kalinina¹, D.D. Baydildina¹, A.M. Popov¹,
A.A. Semchenkova¹, E.A. Burtsev¹, G.O. Bronin², A.A. Maschan¹, M.A. Maschan¹

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

²The Morozov Children's City Clinical Hospital of the Department of Health of Moscow, Moscow

Correspondence:

Daria S. Osipova,
a research technician at the Laboratory
of Molecular Biology of the Dmitry Rogachev
National Medical Research Center of Pediatric
Hematology, Oncology and Immunology,
Ministry of Healthcare
of the Russian Federation
Address: 1 Samory Mashela St.,
Moscow 117997, Russia
E-mail: darya.osipova@fccho-moscow.ru

This article discusses the potential of droplet digital polymerase chain reaction (PCR) for the diagnostic detection and monitoring of the allelic load of the *BRAF V600E* mutation in circulating cell-free DNA and myeloid progenitor cell population in the bone marrow of patients with Langerhans cell histiocytosis (LCH). Droplet digital PCR may serve as a useful tool for the monitoring of minimal residual disease and improve our understanding of the pathogenesis of Langerhans cells histiocytosis. The study was approved by the Independent Ethics Committee and the Scientific Council of the Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology.

Key words: polymerase chain reaction, Langerhans cell histiocytosis, molecular diagnosis, *BRAF V600E* mutation

Osipova D.S., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology. 2023; 22 (1): 12–20.
DOI: 10.24287/1726-1708-2023-22-1-12-20

Гистиоцитоз из клеток Лангерганса (ГКЛ) – заболевание, возникающее вследствие аномальной пролиферации и аккумуляции в органах и

тканях клеток, фенотипически похожих на клетки Лангерганса. Это приводит к локальному повреждению и нарушению функции пораженных органов.

Клинические проявления ГКЛ варьируют от легких доброкачественных моносистемных до распространенных, быстро прогрессирующих форм, включающих поражение органов риска, к которым относят печень, селезенку и костный мозг [1]. Основными механизмами развития заболевания являются клональная пролиферация патологических клеток Лангерганса и последующая дисрегуляция взаимодействия клеток иммунной системы в очагах поражения [2].

Во многих исследованиях было показано, что у 50–60% пациентов с ГКЛ обнаруживается точечная соматическая мутация *BRAF* V600E, приводящая к митотической активации и ингибированию апоптоза [3–5]. Ранее считалось, что распространенность поражения при гистиоцитозе зависит от уровня дифференцировки клеток, на котором происходит мутация и активация RAS/RAF–MEK–ERK-сигнального пути. Так, у группы пациентов с наличием поражения органов риска мутация была выявлена в стволовых CD34⁺-клетках, а также в циркулирующих CD11c⁺- и CD14⁺-клетках, в то время как у группы пациентов с моносистемным поражением мутация в клетках-предшественниках гистиоцитов обнаружена не была [6]. Однако, согласно данным Y. Xiao и соавт. (2020), патологический клон присутствует в костном мозге пациентов и с мультисистемными, и с моносистемными формами заболевания, а различия в клинических проявлениях объясняются различным соотношением клеточных популяций, несущих мутацию, в костном мозге [7].

Стандартным методом детекции мутации *BRAF* V600E в диагностических образцах является секвенирование по Сэнгеру. Ключевой проблемой диагностической детекции *BRAF* V600E является высокая примесь нормальных клеток иммунной системы в образце, что диктует необходимость использования высокочувствительных методов обнаружения мутации. В качестве альтернативы рассматривается метод цифровой капельной полимеразной цепной реакции (цкПЦР). Помимо диагностики важным нерешенным аспектом прикладной молекулярной биологии ГКЛ является разработка метода определения минимальной остаточной болезни (МОБ). В качестве перспективных методов рассматривают определение аллельной нагрузки мутации *BRAF* V600E (отношение количества мутантного аллеля к аллелю «дикого» типа) в свободно циркулирующей ДНК (сцДНК), а также в популяции миелоидных предшественников костного мозга у пациентов с ГКЛ. Чувствительная методика определения МОБ может помочь в определении длительности терапии таргетными препаратами и в верификации ответа на лечение у пациентов с

сомнительными результатами инструментального исследования.

В настоящей работе суммированы результаты применения методики цкПЦР для детекции мутации *BRAF* V600E на этапе диагностики в сцДНК и в селектированных ранних предшественниках в костном мозге. Продемонстрированы также возможности применения цкПЦР для мониторинга доли мутантного аллеля на этапах терапии в качестве потенциального биомаркера МОБ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Характеристика пациентов

За период с 2017 по 2022 г. в исследование вошли 117 пациентов, среди которых было 60 мальчиков и 57 девочек. Медиана возраста пациентов составила 3 года на момент инициального исследования. Из них у 20 пациентов была установлена моносистемная форма заболевания, у 45 – мультисистемная форма без поражения органов риска, у 52 – мультисистемная форма с поражением органов риска. Исследование одобрено независимым этическим комитетом и утверждено решением ученого совета НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева.

Для лечения пациентов использовали следующие протоколы: стандартный протокол LCH-IV [8] с или без последующей монотерапии вемурафенибом (*BRAF*-ингибитором) ($n = 89$) и исследовательский апробационный протокол NCT03585686 «Открытое исследование эффективности и безопасности применения вемурафениба в сочетании с комбинированной терапией цитарабином/2-хлордезоксиаденозином у пациентов с ГКЛ с наличием мутации V600E в гене *BRAF*» ($n = 28$), стратегия терапии которого предполагает интеграцию использования вемурафениба и низких доз цитозара и кладрибина (рисунк 1) [9].

Такая комбинация химиотерапии и *BRAF*-ингибитора (вемурафениба) направлена на элиминацию патологического клона, так как было показано, что монотерапия ингибиторами у большинства пациентов способна только сдерживать клон, а при отмене препарата происходит реактивация заболевания [10]. Протокол NCT03585686 предусматривает контрольные точки для возможной оценки МОБ: 3 точки пункции костного мозга для оценки аллельной нагрузки мутации в миелоидных предшественниках и 6 контрольных точек забора крови для оценки аллельной нагрузки мутации в сцДНК плазмы крови.

Методы

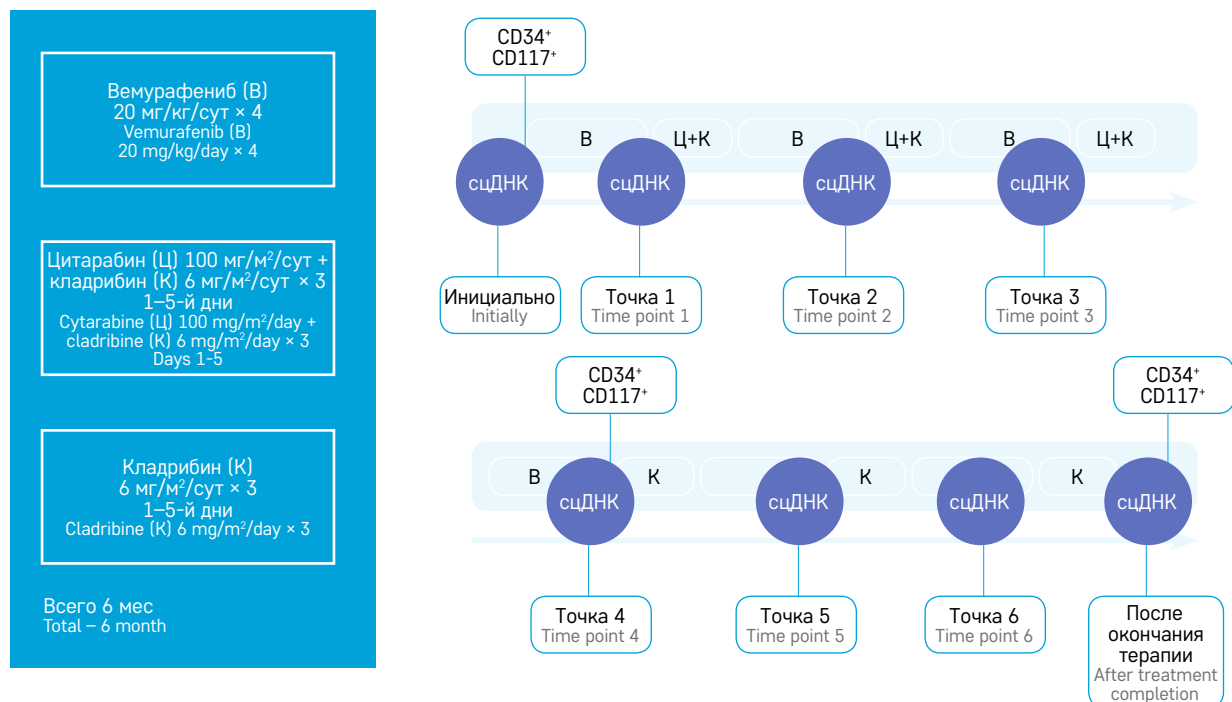
На этапе первичной диагностики стандартными методами были обследованы 117 пациентов. Из них у 58 в качестве диагностического материала был иссле-

Рисунок 1

Схема апробационного протокола NCT03585686 [9]

Figure 1

A scheme of the NCT03585686 clinical study protocol [9]. сцДНК – circulating cell-free DNA



дован биоптат очагов поражения (методом мутационно-специфической ПЦР в режиме реального времени с последующим секвенированием по Сэнгеру), у 37 – образцы костного мозга и селектированные CD34⁺-клетки (мутацию определяли методом прямого секвенирования по Сэнгеру). У 22 пациентов в качестве диагностического материала использовали и биоптат, и костный мозг с выделенной CD34⁺-популяцией.

BRAF-позитивными считали пациентов, у которых на этапе первичной диагностики мутацию выявляли в любом биоматериале.

Методом цкПЦР сцДНК плазмы крови на момент диагностики исследовали также у 117 пациентов, популяцию миелоидных предшественников – у 62.

Для выделения миелоидных предшественников проводили пункцию костного мозга. Клетки выделяли при помощи клеточного сортера BD FACSAria III (BD Biosciences, США), для окрашивания использовали следующую панель флуоресцентно-меченых моноклональных антител: CD34 PE-Cy7 (BD Biosciences), CD117 PC5.5 (Beckman Coulter, США), HLA-DR Pacific Blue (Beckman Coulter), CD45 Krome Orange (Beckman Coulter). Миелоидные предшественники выделяли на основании их иммунофенотипа (CD45^{dim}CD34⁺CD117⁺HLA-DR⁺⁺) (рисунок 2).

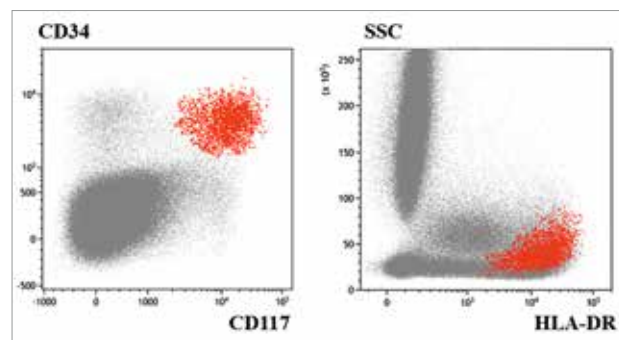
Выделение ДНК из клеточных популяций костного мозга осуществляли сорбентным методом с помощью коммерческого набора АмплиПрайм ДНК-сорб-В

Рисунок 2

Имунофенотип, выбранный для сортировки миелоидных предшественников. Миелоидные предшественники обозначены красным цветом; остальные ядросодержащие клетки – серым. SSC – параметр бокового светорассеяния

Figure 2

An immunophenotype chosen for myeloid progenitors cell sorting (shown in red). Other nucleated cells are shown in grey. SSC – side scatter parameter



(ИЛС, Россия). Выделение ДНК из образцов биоптата (парафиновых блоков) проводили с помощью набора RNA/DNA Purification Plus Kit (Norgen Biotek Corp, Канада). Выделение сцДНК проводили из 4 мл плазмы крови, набранной в пробирки Плазма Протект (Евроген, Россия), содержащие специальный консервант, который препятствует лизису клеток крови и обеспечивает сохранность внеклеточной ДНК в течение 10 дней. сцДНК выделяли с помощью набора QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit (QIAGEN, Нидер-

ланды) согласно инструкции производителя с использованием колонок QIAamp Mini (QIAGEN, Нидерланды) на вакуумном коллекторе QIAvac 24 Plus. Выделение ДНК из образцов костного мозга проводили с помощью станции выделения нуклеиновых кислот QIAasymphony и набора QIAasymphony DSP DNA Mini Kit (QIAGEN, Нидерланды).

Для оценки и мониторинга аллельной нагрузки мутации *BRAF* V600E использовали цкПЦР, так как данный метод обладает более высокой чувствительностью, которая зависит от количества ДНК, взятого в реакцию, и может достигать 0,002% [11]. Также с помощью цкПЦР можно определить абсолютное количество копий ДНК с мутацией и без, что позволяет точно рассчитать аллельную нагрузку мутации [12]. Мониторинг аллельной нагрузки мутации в сцДНК плазмы крови для возможной оценки МОБ был выполнен в контрольных точках у 21 пациента согласно протоколу NCT03585686. Также для этих пациентов был проведен мониторинг аллельной нагрузки мутации в популяции миелоидных предшественников. Для постановки цкПЦР использовали систему QX200 ddPCR System (Bio-Rad Technologies, Hercules, CA). Образцы анализировали в дубле. В каждой постановке в качестве положительного контроля использовали ДНК с подтвержденной секвенированием по Сэнгеру мутацией. В качестве отрицательного контроля использовали ДНК без мутации и воду. Для генерации капель использовали прибор QX200 AutoDG, для подсчета капель – QX200 Droplet Reader. Анализ данных проводили с использованием программы QuantaSoft.

Медиана количества сцДНК на реакцию цкПЦР составила 6,2 нг (94 копии/мкл (8,7–1013)). Порог

чувствительности метода определяли для каждого образца индивидуально согласно таблице, представленной производителем и отражающей зависимость чувствительности метода от количества ДНК в реакции [11]. Таким образом, медиана порога чувствительности метода для сцДНК составила 0,16% (0,05–1,70%).

В зависимости от клеточности образца и содержания в нем миелоидных предшественников количество выделенных клеток варьировалось от 7 тыс. до 223 тыс. (медиана 40 тыс.). Медиана количества выделенной ДНК, взятой в реакцию, составила 88,6 нг (1343 копии/мкл (376–5120)). Медиана порога чувствительности была рассчитана для каждого образца индивидуально и составила 0,011% (0,003–0,04%). Все значения, которые были ниже индивидуально рассчитанного порога чувствительности рассматривались как негативные.

Суммарные данные по количеству исследуемых образцов на этапе диагностики и мониторинга аллельной нагрузки мутации представлены в таблице 1.

Статистическую обработку данных проводили с использованием программы GraphPad Prism 8.4.2. Перед выполнением анализа выборки были исследованы на нормальность, симметричность и равенство дисперсий. По результатам проверки отдано предпочтение непараметрическим методам анализа. Для проверки гипотезы о наличии связи между системностью заболевания и наличием мутации использовали точный тест Фишера. При сравнении 3 выборок (уровня аллельной нагрузки мутации *BRAF* V600E в группах пациентов с моносистемным поражением, мультисистемными поражениями с и без вовлечения органов риска) использовали критерий Краскела–

Таблица 1

Количество исследуемых образцов с помощью стандартных методов и цкПЦР на этапе первичной диагностики и при последующем мониторинге аллельной нагрузки мутации *BRAF* V600E в различных видах биоматериала

Table 1

The number of samples processed using standard methods or droplet digital polymerase chain reaction (ddPCR) initially and during further *BRAF* V600E allelic load monitoring in different types of biomaterial

| Метод Method | Диагностический этап (всего 117 пациентов) At diagnosis (a total of 117 patients) | | | | | Мониторинг в контрольных точках согласно протоколу NCT03585686 (всего 21 пациент) Monitoring at time points determined by the NCT03585686 protocol (a total of 21 patients) | |
|---|--|---|------------------------------------|---|--|--|--|
| | Биоптат Biopsy sample | Биоптат + костный мозг, CD34 ⁺ Biopsy sample + bone marrow, CD34 ⁺ | сцДНК Circulating cell-free DNA | Костный мозг, CD34 ⁺ Bone marrow, CD34 ⁺ | CD34 ⁺ , CD117 ⁺ | сцДНК (8 контрольных точек) Circulating cell-free DNA (8 control time points) | CD34 ⁺ CD117 ⁺ (3 контрольные точки) CD34 ⁺ CD117 ⁺ (3 control time points) |
| Секвенирование по Сэнгеру Sanger sequencing | – | 22 образца 22 samples | – | 37 образцов 37 samples | – | – | – |
| Мутационно-специфическая ПЦР + секвенирование по Сэнгеру Mutation specific PCR + Sanger sequencing | 58 образцов 58 samples | | – | – | – | – | – |
| цкПЦР ddPCR | – | – | 117 образцов 117 samples | – | 62 образца 62 samples | 168 образцов 168 samples | 60 образцов 60 samples |

Уоллиса. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Инициальная диагностика мутации *BRAF V600E*

Среди пациентов, которым инициальное исследование на наличие мутации *BRAF V600E* проводили методом мутационно-специфической ПЦР с последующим секвенированием по Сэнгеру образцов биоптата, *BRAF*-положительными оказались 32 (55%) из 58. Среди пациентов, инициальное исследование которым проводили методом прямого секвенирования по Сэнгеру образцов костного мозга и популяции CD34⁺, *BRAF*-положительными оказались 10 (27%) из 37. Среди пациентов, инициальное исследование которым проводили и в биоптате, и в костном мозге, и в CD34⁺-популяции, мутацию выявили у 13 (59%) из 22. Таким образом, общее число *BRAF*-положительных пациентов по результатам инициального исследования стандартными методами выявления мутации составило 55 (47%) из 117. Доля пациентов с ГКЛ, имеющих мутацию *BRAF V600E*, соотносится с данными мировой литературы [3].

Помимо диагностики стандартными методами мутацию *BRAF V600E* на этапах первичной диагностики у данных пациентов определяли в сДНК плазмы крови методом цкПЦР. Результаты представлены на рисунке 3.

Доля мутантных образцов среди пациентов с моносистемным поражением составила 10% (2 из 20), в то время как у пациентов с мультисистемными поражениями доля мутантных образцов оказалась выше: 44% (20 из 45) и 79% (41 из 52) без и с поражением органов риска соответственно. Полученные результаты свидетельствуют о том, что детекция мутации *BRAF V600E* в сДНК ассоциирована с более тяжелым и распространенным течением заболевания ($p < 0,001$; точный тест Фишера), что соответствует данным литературы [13].

Кроме того, стоит отметить, что по данным инициального исследования на наличие *BRAF V600E* среди 117 пациентов мутация методом цкПЦР выявлена у 63 (54%). Данное значение оказалось выше, чем по результатам инициального исследования стандартными методами (47%) ввиду большей чувствительности метода цкПЦР.

Помимо выявления *BRAF V600E* был также проведен расчет аллельной нагрузки мутации в сДНК в разных группах пациентов, чтобы выяснить, будет ли различаться ее уровень в зависимости от распространенности заболевания. Данные представлены на рисунке 4.

Так, в группе пациентов с моносистемным поражением аллельная нагрузка в мутантных образцах

была низкой (медиана – 0,39; диапазон 0,11–0,68), в группе с мультисистемными поражениями без вовлечения органов риска она возрастала (медиана – 1,43; диапазон 0,13–23,88), а в группе пациентов с мультисистемными поражениями и вовлечением органов риска оказалась самой высокой (медиана – 4,91;

Рисунок 3

Количество положительных (*BRAF V600E*) и отрицательных (*BRAF wt*) инициальных образцов сДНК у пациентов с разной распространенностью заболевания

Figure 3

The number of positive (*BRAF V600E*) and negative (*BRAF wt*) cfDNA samples obtained from patients with different disease severity before the therapy initiation

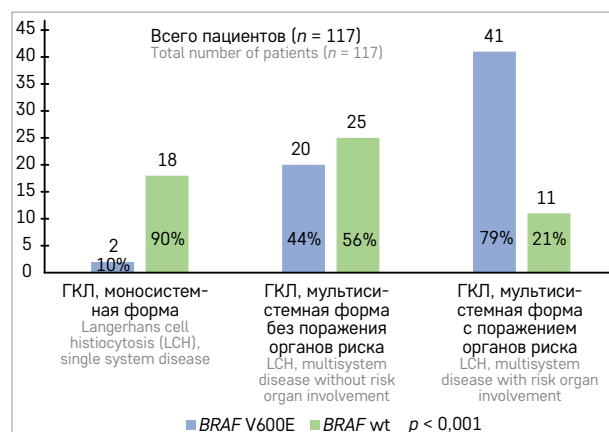
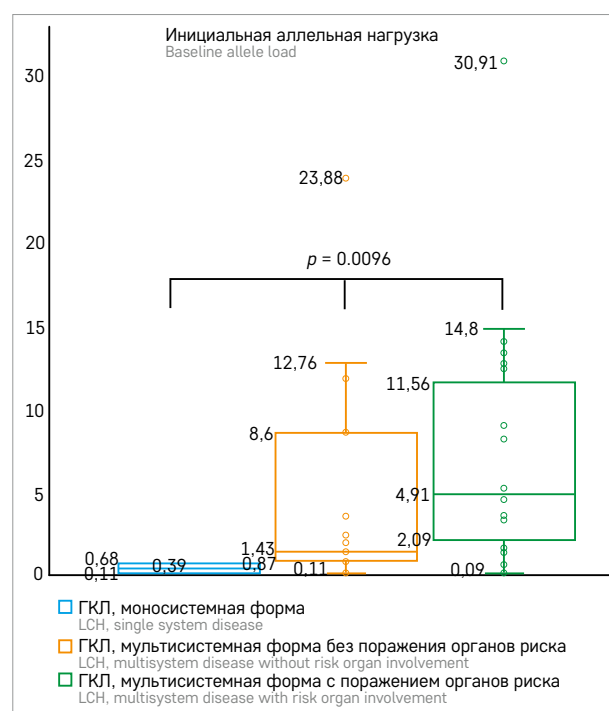


Рисунок 4

Уровень аллельной нагрузки мутации *BRAF V600E* в инициальных (взятых до начала терапии) образцах сДНК плазмы крови у пациентов с различной распространенностью заболевания

Figure 4

The level of cfDNA *BRAF V600E* allelic load measured in patients with different disease severity before the therapy initiation



диапазон 0,09–30,91 ($p = 0,0096$; критерий Краскела–Уоллиса).

Данные различия, вероятно, объясняются тем, что при большей распространенности заболевания общий объем клеточной массы патологических клеток Лангерганса, их пролиферация, диссеминация и клеточная гибель происходят более интенсивно, таким образом увеличивая долю апоптотической мутантной ДНК в плазме крови.

Также помимо анализа сДНК для лучшего понимания распространенности и патогенеза заболевания у 62 пациентов было проанализировано наличие мутации в популяции миелоидных предшественников костного мозга. Результаты исследования инициальных образцов представлены на *рисунке 5*.

Наибольшее количество образцов с детектируемой мутацией было выявлено в группе с мульти-системными поражениями с вовлечением органов риска – 60% (21 из 35), в группе с мультисистемными поражениями без вовлечения органов риска – 22% (5 из 23), в группе пациентов с моносистемными поражениями мутация в миелоидных предшественниках не была обнаружена (0 из 4).

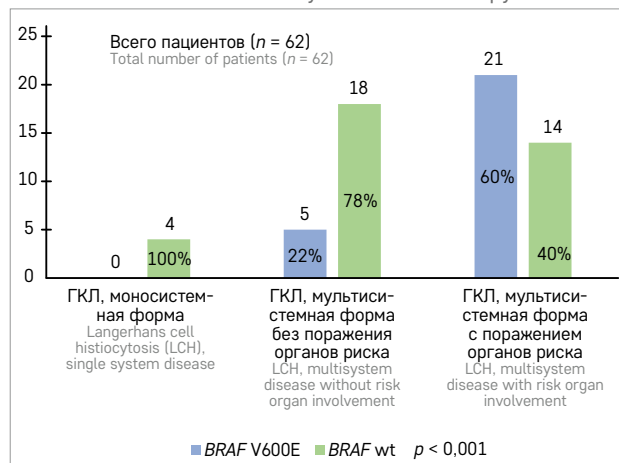
Таким образом, наличие мутации *BRAF V600E* в популяции CD34⁺CD117⁺-клеток костного мозга ассоциировано с более тяжелым и распространенным течением заболевания ($p = 0,002$; точный тест Фишера).

Необходимо отметить, что обнаружение мутации *BRAF V600E* в популяции миелоидных предшественников не всегда соответствовало клинически определяемому поражению костного мозга. Так, среди пациентов с мультисистемным поражением без вовлечения органов риска мутацию в миелоидных

Рисунок 5

Количество положительных (*BRAF V600E*) и отрицательных (*BRAF wt*) образцов популяции миелоидных предшественников у пациентов с разной распространенностью заболевания до начала терапии

Figure 5
The number of positive (*BRAF V600E*) and negative (*BRAF wt*) myeloid progenitors samples obtained from patients with different disease severity before the therapy initiation



предшественниках обнаружили у 5 из 23. Эти данные подтверждают современное представление о патогенезе ГКЛ – независимо от распространенности заболевания активирующая мутация обнаруживается на уровне миелоидных стволовых клеток [7].

Мониторинг аллельной нагрузки мутации *BRAF V600E* в сДНК и популяции миелоидных предшественников

Образцы плазмы крови для оценки аллельной нагрузки мутации в сДНК были взяты у пациентов ($n = 21$) на различных этапах терапии и после ее окончания согласно протоколу NCT03585686.

Данные по мониторингу аллельной нагрузки представлены в *таблице 2*.

Мониторинг аллельной нагрузки *BRAF V600E* на этапах терапии и после ее окончания показал, что у большинства пациентов детектируемое количество аллельной нагрузки прогрессивно снижается. У части пациентов аллельная нагрузка становится недетектируемой, в то же время у другой части – персистирует на низком уровне. На *рисунке 6* представлен мониторинг аллельной нагрузки *BRAF V600E* на примере 4 пациентов.

Полученные данные свидетельствуют о том, что снижение показателя аллельной нагрузки отражает эффективность проводимой терапии. Однако на сегодняшний день данный показатель не может рассматриваться однозначным критерием оценки МОБ, так как минимальный уровень аллельной нагрузки мутации после завершения терапии может поддерживаться за счет резидуальных пато-

Рисунок 6

Мониторинг аллельной нагрузки мутации *BRAF V600E* на примере 4 пациентов (0,05% – нижняя граница индивидуально рассчитанных порогов чувствительности)

Figure 6
cfDNA *BRAF V600E* allelic load monitoring illustrated by 4 cases (0.05% is the lowest individually calculated limit of detection)

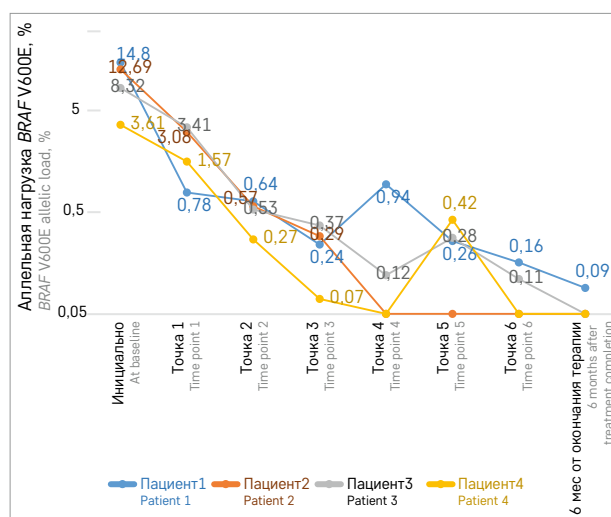


Таблица 2

Мониторинг аллельной нагрузки мутации *BRAF* V600E в сДНК у пациентов ($n = 21$) на различных этапах терапии и после ее окончания

Table 2

BRAF V600E allelic load monitoring in 21 patients during timepoints on protocol therapy and during the follow-up

| Пациент Patient | Инициально At baseline | Точка 1 Time point 1 | Точка 2 Time point 2 | Точка 3 Time point 3 | Точка 4 Time point 4 | Точка 5 Time point 5 | Точка 6 Time point 6 | После окончания терапии After treatment completion |
|--------------------|---------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|---|
| №1 | 14,80 | 0,78 | 0,64 | 0,24 | 0,94 | 0,26 | 0,16 | 0,09 |
| №2 | 12,69 | 3,08 | 0,57 | 0,29 | Н/д <LoD | Н/д <LoD | Н/д <LoD | Н/д <LoD |
| №3 | 8,32 | 3,41 | 0,53 | 0,37 | 0,12 | 0,28 | 0,11 | Н/д <LoD |
| №4 | 3,61 | 1,57 | 0,27 | Н/д <LoD | 0,07 | Н/д <LoD | Н/д <LoD | 0,42 |
| №5 | 14,08 | 5,42 | 2,68 | Н/д <LoD | Н/д <LoD | 0,40 | 1,99 | 0,50 |
| №6 | 1,41 | 0,14 | Н/д <LoD | Н/д <LoD | Н/д <LoD | 0,13 | Н/д <LoD | Н/д <LoD |
| №7 | 15,88 | 1,63 | 1,02 | 0,42 | Н/д <LoD | Н/д <LoD | Н/д <LoD | Н/д <LoD |
| №8 | 5,25 | 0,96 | Н/д <LoD | Н/д <LoD | 0,33 | 0,52 | 1,08 | 0,24 |
| №9 | 5,29 | 1,30 | 0,70 | 0,20 | 0,10 | 0,53 | 0,74 | 0,86 |
| №10 | 3,48 | 0,87 | 1,14 | 1,07 | 0,51 | Н/д <LoD | 1,55 | 0,61 |
| №11 | 3,66 | 9,56 | 0,32 | 0,67 | 0,20 | 0,17 | 0,34 | 0,54 |
| №12 | 12,40 | 5,78 | 1,12 | 1,35 | 1,18 | 1,49 | 6,29 | 2,33 |
| №13 | 30,91 | 3,17 | 0,71 | 0,13 | 0,34 | 0,29 | Н/д <LoD | Н/д <LoD |
| №14 | 12,7 | Н/д <LoD | Н/д <LoD | 0,35 | 0,39 | 0,41 | 1,05 | Н/д <LoD |
| №15 | 0,14 | Н/д <LoD | Н/д <LoD | Н/д <LoD | Н/д <LoD | Н/д <LoD | Н/д <LoD | Н/д <LoD |
| №16 | 8,60 | Н/д <LoD | 0,13 | 0,28 | 0,56 | 0,08 | Н/д <LoD | Н/д <LoD |
| №17 | 1,02 | Н/д <LoD | Н/д <LoD | Н/д <LoD | Н/д <LoD | Н/д <LoD | Н/д <LoD | Н/д <LoD |
| №18 | 1,10 | Н/д <LoD | Н/д <LoD | Н/д <LoD | Н/д <LoD | Н/д <LoD | Н/д <LoD | Н/д <LoD |
| №19 | 1,43 | Н/д <LoD | Н/д <LoD | Н/д <LoD | Н/д <LoD | Н/д <LoD | Н/д <LoD | Н/д <LoD |
| №20 | 1,00 | 0,26 | Н/д <LoD | Н/д <LoD | Н/д <LoD | Н/д <LoD | Н/д <LoD | Н/д <LoD |
| №21 | 0,63 | 1,51 | 0,59 | 0,30 | 0,13 | Н/д <LoD | 0,22 | Н/д <LoD |

Примечание. Н/д – аллельная нагрузка ниже уровня детекции.

Note. <LoD – below level of detection.

логических клеток в тканях, наличие которых необязательно приводит к системному рецидиву заболевания.

Согласно современным представлениям, персистенция миелоидных предшественников с мутацией *BRAF* V600E может быть источником рецидива заболевания. В этой связи в настоящей работе помимо мониторинга изменения аллельной нагрузки мутации в сДНК мониторинг проводили в популяции миелоидных предшественников, которые дают начало патологическому клону. Костномозговую пункцию проводили в 3 точках согласно протоколу.

Всего было проанализировано 60 образцов от 21 пациента. Данные по мониторингу аллельной нагрузки представлены в таблице 3 и на рисунке 7.

Доля детектируемых мутантных миелоидных предшественников резко снижалась в процессе терапии, что говорит о том, что данный показатель

отражает эффективность проводимой терапии. В то же время у некоторых пациентов даже после окончания терапии и полного восстановления гемопоэза наблюдались низкие значения аллельной нагрузки в миелоидных предшественниках. Также стоит отметить, что пациент №10 – единственный, развивший системный рецидив с вовлечением органов риска после окончания протокола, имел самую высокую аллельную нагрузку мутации в последней точке (1,03%), что указывает на потенциальное предсказательное значение данного показателя.

Таким образом, учитывая существенную однонаправленную динамику на фоне эффективной терапии, показатель аллельной нагрузки в миелоидных предшественниках может рассматриваться как потенциальный маркер МОБ. Необходимо расширенное исследование с установлением релевантных порогов отсечения для клинического применения.

Рисунок 7

Мониторинг аллельной нагрузки мутации *BRAF* V600E в популяции миелоидных предшественников в 3 точках согласно апробационному протоколу (0,003% – нижняя граница индивидуально рассчитанных порогов чувствительности)

Figure 7

Myeloid precursor *BRAF* V600E allelic load monitoring at 3 timepoints according to the clinical study protocol (0.003% is the lowest individually calculated limit of detection)

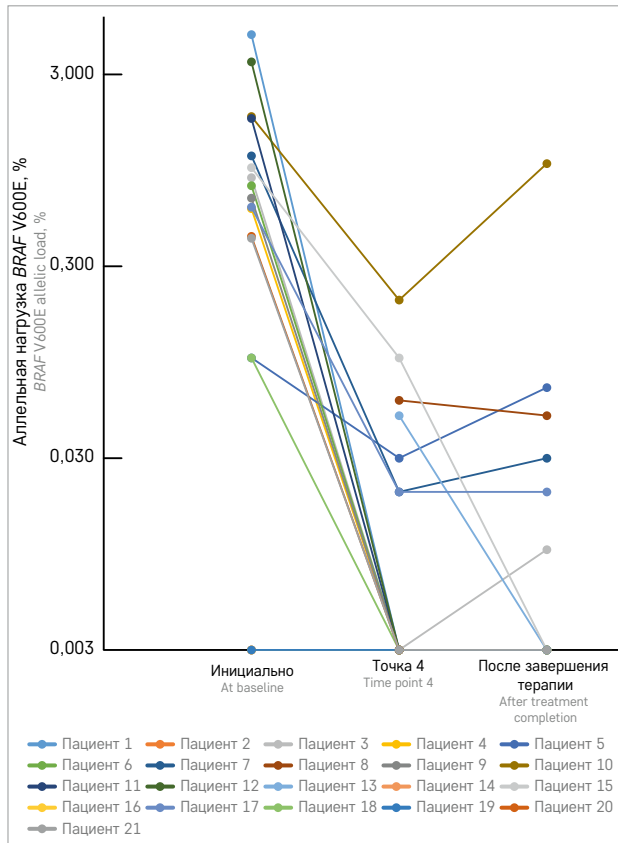


Таблица 3

Мониторинг аллельной нагрузки мутации *BRAF* V600E в популяции миелоидных предшественников в 3 точках

Table 3

Myeloid precursor *BRAF* V600E allelic load monitoring at 3 time points according to the clinical study protocol

| Пациент Patient | Инициально At baseline | Точка 4 Time point 4 | После окончания терапии After treatment completion |
|--------------------|---------------------------|-------------------------|---|
| №1 | 4,840 | Н/д <LoD | Н/д <LoD |
| №2 | Н/д <LoD | Н/д <LoD | Н/д <LoD |
| №3 | 0,870 | Н/д <LoD | 0,010 |
| №4 | 0,600 | Н/д <LoD | Н/д <LoD |
| №5 | 0,100 | 0,030 | 0,070 |
| №6 | 0,790 | Н/д <LoD | Н/д <LoD |
| №7 | 1,130 | 0,020 | 0,030 |
| №8 | | 0,060 | 0,050 |
| №9 | 0,680 | Н/д <LoD | Н/д <LoD |
| №10 | 1,810 | 0,200 | 1,030 |
| №11 | 1,770 | Н/д <LoD | Н/д <LoD |
| №12 | 3,490 | Н/д <LoD | Н/д <LoD |
| №13 | | 0,050 | Н/д <LoD |
| №14 | Н/д <LoD | Н/д <LoD | Н/д <LoD |
| №15 | 0,980 | 0,100 | Н/д <LoD |
| №16 | Н/д <LoD | Н/д <LoD | Н/д <LoD |
| №17 | 0,610 | 0,020 | 0,020 |
| №18 | 0,100 | Н/д <LoD | Н/д <LoD |
| №19 | Н/д <LoD | Н/д <LoD | Н/д <LoD |
| №20 | 0,430 | Н/д <LoD | |
| №21 | 0,42 | Н/д <LoD | Н/д <LoD |

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Мутация *BRAF* V600E играет ключевую роль в патогенезе ГЛЛ. В ходе данной работы были показаны возможности использования метода цкПЦР для выявления на этапе диагностики и мониторинга аллельной нагрузки мутации *BRAF* V600E в сцДНК, а также в популяции миелоидных предшественников костного мозга. Также было показано, что метод цк ПЦР является наиболее эффективным для оценки аллельной нагрузки *BRAF* V600E, так как обладает более высокой чувствительностью по сравнению с другими методами определения мутации.

Одна из диагностических перспектив связана с использованием в качестве биомаркера сцДНК, которая может быть обнаружена в плазме крови человека. Наличие мутации *BRAF* V600E в сцДНК ассоциировано с более тяжелым течением заболевания, а

изменения аллельной нагрузки мутации соотносятся с терапевтическим ответом. Преимуществом использования сцДНК в качестве биоматериала является то, что взятие крови является малоинвазивной процедурой, которую можно проводить в любой момент времени, обеспечив таким образом динамическое наблюдение за молекулярными изменениями в очагах поражения. Однако для установления более точных критериев оценки МОБ необходимы дальнейший набор материала и анализ изменений аллельной нагрузки мутации в сцДНК на фоне терапии и после ее окончания.

В то же время о возможном рецидиве заболевания может свидетельствовать сохранение патологического клона миелоидных предшественников. В связи с этим важно достоверно определять малые значения аллельной нагрузки мутации в данной популяции. Это предпочтительно делать с помощью высокочувствительного метода цкПЦР. Кроме того, мониторинг аллельной нагрузки мутации в попу-

ляции миелоидных предшественников может помочь в принятии решения об отмене или продолжении терапии.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование проведено при поддержке гранта Российского научного фонда, проект №22-15-00450.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ORCID

Osipova D.S. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9968-9332>
Raykina E.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7634-2053>
Lyudovskikh E.I. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0717-2019>
Evseev D.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8610-0624>
Kalinina I.I. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0813-5626>
Baidildina D.D. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7130-8596>
Popov A.M. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0889-6986>
Semchenkova A.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7082-1694>
Burtsev E.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3623-6547>
Bronin G.O. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0694-3996>
Maschan A.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0016-6698>
Maschan M.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1735-0093>

Литература

- Haupt R., Minkov M., Astigarraga I., Schäfer E., Nanduri V., Jubran R., et al. Langerhans cell histiocytosis (LCH): guidelines for diagnosis, clinical work-up, and treatment for patients till the age of 18 years. *Pediatr Blood Cancer* 2013; 60 (2): 175–84.
- Harmon C.M., Brown N. Langerhans Cell Histiocytosis A Clinicopathologic Review and Molecular Pathogenetic Update. *Arch Pathol Lab Med* 2015; 139: 1211–4.
- Badalian-Very G., Vergilio J.-A., Degar B.A., MacConaill L.E., Brandner B., Calicchio M.L., et al. Recurrent *BRAF* mutations in Langerhans cell histiocytosis. *Blood* 2010; 116 (11): 1919–23.
- Wei R., Wang Z., Li X., Shu Y., Fu B. Frequent *BRAFV600E* mutation has no effect on tumor invasiveness in patients with Langerhans cell histiocytosis. *Biomed Rep* 2013; 1(3): 365–8.
- Bigenwald C., Le Berichel J., Matthias Wilk C., Chakraborty R., Chen S.T., Tabachnikova A., et al. *BRAFV600E*-induced senescence drives Langerhans cell histiocytosis pathophysiology. *Nat Med* 2021; 27 (5): 851.
- Berres M.-L., Phaik Har Lim K., Peters T., Price J., Takizawa H., Salmon H., et al. *BRAF*-V600E expression in precursor versus differentiated dendritic cells defines clinically distinct LCH risk groups. *J Exp Med* 2014; 211 (4) 669–83.
- Xiao Y., van Halteren A.G.S., Lei X., Borst J., Steenwijk E., de Wit T., et al. Bone marrow-derived myeloid progenitors as driver mutation carriers in high- And low-risk Langerhans cell histiocytosis. *Blood* 2020; 136 (19): 2188–99.
- LCH-IV, International Collaborative Treatment Protocol for Children and Adolescents With Langerhans Cell Histiocytosis – Full Text View – ClinicalTrials.gov [Electronic resource]. URL: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02205762> (accessed 26.10.2022).
- Проспективное нерандомизированное клиническое испытание фазы II вемурафениба в комбинации с цитарабином и 2-хлордезоксиденозином у детей с гистiocитозом клеток Лангерганса с мутацией *BRAF V600E* [Электронный ресурс]. URL: <https://ichgcp.net/ru/clinical-trials-registry/NCT03585686> (дата обращения 26.10.2022).
- Evseev D., Kalinina I., Raykina E., Osipova D., Abashidze Z., Ignatova A., et al. Vemurafenib provides a rapid and robust clinical response in pediatric Langerhans cell histiocytosis with the *BRAF* V600E mutation but does not eliminate low-level minimal residual disease per ddPCR using cell-free circulating DNA. *Int J Hematol* 2021; 114 (6): 725–34.
- Bio-Rad. Rare Mutation Detection Best Practices Guidelines.
- Deprez L., Corbisier P., Kortekaas A.-M., Mazoua S., Beaz Hidalgo R., Trapmann S., et al. Validation of a digital PCR method for quantification of DNA copy number concentrations by using a certified reference material. *Biomol Detect Quantif* 2016; 9: 29–39.
- Héritier S., Hélias-Rodziewicz Z., Lapillonne H., Terrones N., Garrigou S., Normand C., et al. Circulating cell-free *BRAFV600E* as a biomarker in children with Langerhans cell histiocytosis. *Br J Haematol* 2017; 178 (3): 457–67.