

<https://doi.org/10.25557/2073-7998.2022.11.23-26>

Цитогенетическая диагностика хронических лимфопролиферативных заболеваний с применением локуспецифичных флуоресцентных зондов

Возилова А.В., Бойко Д.В.

ФГБУН «Уральский научно-практический центр радиационной медицины» ФМБА России
454141, г. Челябинск, Россия, ул. Воровского 68-А

Цитогенетическое исследование клеток костного мозга или периферической крови у лиц с лимфопролиферативными заболеваниями является обязательным и необходимым. Результаты помогают врачу с ранней диагностикой заболевания и выбором тактики лечения. Современные молекулярно-цитогенетические подходы, основанные на применении локуспецифичных флуоресцентных зондов (метод FISH), дают возможность быстро получить точную информацию о наличии или отсутствии наиболее распространенных мутаций при определенных нозологиях. Целью настоящей работы является анализ собственных данных цитогенетического обследования с применением «коктейля» из 5 локуспецифичных флуоресцентных зондов лиц с лимфопролиферативными заболеваниями, большая часть которых имела диагноз хронический лимфолейкоз. Цитогенетическое исследование было проведено 16 пациентам в период с 2014 г. по 2022 г. в лаборатории радиационной генетики ФГБУН УНПЦ РМ. Использовали коктейль локуспецифичных зондов: ATM (11q22)/TP53 (17p13), DLEU (13q14)/LAMP (13q34) и cen 12 (12p11.1;12q11.1). 75% обследованных лиц были носителями мутаций. Наиболее часто встречались мутации del17p13 (50%), del13q14 (50%). Считаем, что при наличии у пациента мутации в 13q14 необходимо провести дополнительно исследование на del 13q14.2 (RB1).

Ключевые слова: лимфопролиферативные заболевания, хронический лимфолейкоз, локуспецифичные зонды, FISH.

Для цитирования: Возилова А.В., Бойко Д.В. Цитогенетическая диагностика хронических лимфопролиферативных заболеваний с применением локуспецифичных флуоресцентных зондов. *Медицинская генетика* 2022; 21(11): 23-26.

Автор для корреспонденции: Возилова А.В.; e-mail: vozilova@urcrm.ru

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке ФМБА России.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила: 20.10.2022

The cytogenetic diagnostics of chronic lymphoproliferative diseases using locus-specific fluorescent probes

Vozilova A.V., Boiko D.V.

Ural Research Center for Radiation Medicine FMBA
68-A, Vorovskogo str., Chelyabinsk, 454141, Russian Federation

The cytogenetic assay of bone marrow or peripheral blood cells in persons with lymphoproliferative diseases is mandatory and necessary. The results help a doctor with the diagnosis of the disease and the choice of treatment tactics as early as possible after the patient's visit to the hematologist. Modern molecular cytogenetic approaches based on the use of locus-specific fluorescent probes (FISH method) make it possible to quickly and accurately obtain information about the presence or absence of the most common mutations. The aim of this work is to analyze our cytogenetic data given with a "cocktail" of 5 locus-specific fluorescent probes in individuals with lymphoproliferative diseases, most of whom were diagnosed with CLL. A cytogenetic study was conducted in 16 patients in the period 2014 - 2022 in the Laboratory of Radiation Genetics of the URCRM. A cocktail of locus-specific probes was used: ATM (11q22)/TP53 (17p13) and DLEU (13q14)/LAMP (13q34) and cen 12 (12p11.1;12q11.1). Seventy five percent of the examined individuals were carriers of mutations. The most common mutations were del17p13 (50%), del13q14 (50%). We believe that if a patient has a mutation in 13q14, it is necessary to conduct an additional study on del13q14.2 (RB1).

Keywords: lymphoproliferative diseases, chronic lymphocytic leukemia, locus-specific probes, FISH.

For citation: Vozilova A.V., Boiko D.V. The cytogenetic diagnostics of chronic lymphoproliferative diseases using locus-specific fluorescent probes. *Medical genetics [Medicinskaya genetika]*. 2022; 21(11): 23-26. (In Russ.)

Corresponding author: Vozilova A.V.; e-mail: vozilova@urcrm.ru

Funding. The work was carried out with the financial support of the FMBA of Russia.

Conflict of interest. The authors declare no conflicts of interest.

Accepted: 20.10.2022

Введение

В последнее время для цитогенетического исследования клеток костного мозга (КМ) или клеток периферической крови (ПК) онкогематологических больных активно применяются разные варианты метода флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH). В практике лаборатории радиационной генетики ФГБУН УНПЦ РМ при исследованиях клеток лиц с лимфопролиферативными заболеваниями с 2014 г. используются «коктейли» локуспецифичных флуоресцентных зондов на 5 локусов: ATM (11q22)/TP53 (17p13), DLEU (13q14)/LAMP (13q34) и cen 12 (12p11.1;12q11.1) (производство MetaSystems, Германия) [1]. По данным исследований, результаты которых опубликованы в последние годы, хромосомные аномалии именно в данных регионах чаще обнаруживаются у лиц с диагнозом хронический лимфолейкоз (ХЛЛ) [2]. Поскольку В-лимфоциты имеют низкую пролиферативную активность, анализ интерфазных клеток с применением FISH-технологий бывает зачастую единственно возможным и информативным. Так, по данным лаборатории кариологии ФГБУ «НМИЦ гематологии» только у 18% больных с ХЛЛ определяется аберрантный кариотип при стимуляции В-клеток стандартными митогенами, но у половины больных с нормальным кариотипом при использовании FISH-метода с локуспецифичными зондами в интерфазных ядрах выявляются хромосомные aberrации [3].

Цель настоящей работы – анализ результатов цитогенетического исследования клеток периферической крови или костного мозга с применением «коктейля» из 5 локуспецифичных флуоресцентных зондов у лиц с лимфопролиферативными заболеваниями, большая часть которых имела диагноз ХЛЛ.

Методы

Цитогенетическое исследование было проведено 16 пациентам (7 женщин, 9 мужчин) в период с 2014 по 2022 гг. Возраст обследованных лиц – от 26 до 70 лет. 13 человек имели диагноз ХЛЛ. Несколько человек были из-под наблюдения, по ним информация была получена из медицинской информационной системы «БАРС». Клетки КМ или ПК культивировали согласно методике, представленной в работе [1]. При отсутствии митозов работали с интерфазными клетками. Для оценки генетических аномалий использовали «коктейли» локуспецифичных зондов: 4 локуса ATM (11q22)/TP53 (17p13) и DLEU (13q14)/

LAMP (13q34) и один локус cen 12 (12p11.1;12q11.1) для выявления трисомии. Для получения флуоресцентных сигналов использовали протокол производителя зондов (MetaSystems, Германия). Анализ выполняли на флуоресцентном микроскопе Axio Imager Z2 с флуоресцентными фильтрами FITC, SpO, DAPI, AQUA. Оценивали 300–400 клеток на пациента. Делецией считали присутствие одного сигнала, нормой – наличие двух сигналов. Трисомией по хромосоме 12 считалось наличие трех сигналов в клетке. Вполне допустимо, что один сигнал вместо двух мог означать потерю хромосомы (анеуплоидию), но ошибок позволили избежать анализ большого количества клеток и сравнительные цифры всех сигналов в каждом 100 клетках (существенных различий не было отмечено).

В таблице приведена краткая характеристика обследованных лиц, информация о 5-летней выживаемости, цитогенетические результаты. В результатах исследования отмечали сигналы делеций >8%. За норму принималось отсутствие исследуемой патологии в 95% и более клеток.

Результаты

Из таблицы видно, что не выявили исследуемой патологии у 4 человек (25% обследованных). Все пациенты из этой группы на данный момент живы. Половина пациентов имела делецию в локусе 17p13 (TP53), и у 50% также отметили делецию в 13q14 (DLEU), причем у 5 человек (31%) отмечалось сочетание обеих делеций. 19% обследованных лиц имели делецию в изучаемом локусе гена *LAMP*. Делецию в локусе гена *ATM* отметили у 2 человек, что составляет 12,5% обследованных. Трисомию по 12 хромосоме выявили у 2 человек (12,5%). Пять человек из группы (31%) имели по одной исследуемой мутации. Важно отметить, что у 4 человек (25%) выявили сочетание трех мутаций.

Обсуждение

По данным литературы для каждой из изучаемых нами aberrаций определено прогностическое значение [3]. Благоприятным прогностическим фактором является наличие делеции 13q14 как единственного нарушения кариотипа. В нашем случае такую единственную мутацию отметили у 3 обследованных человек, все они живы. Промежуточный прогноз дается при наличии трисомии по хромосоме 12. Обоих пациентов, носителей этой мутации, не удалось спасти. Самым неблагоприятным прогностическим фактором

является делеция 17p13 с потерей гена-супрессора опухолевого роста *TP53*. В нашем случае у пациентов с делецией 17p13 5-летняя выживаемость составила 50%. Прогноз неблагоприятный при обнаружении делеции

11q23 (*ATM*). В нашем исследовании из двух носителей этой мутации 5-летний порог выживаемости преодолел только 1 пациент. Неблагоприятным фактором считается наличие нескольких мутаций у одного пациента.

Результаты цитогенетического исследования интерфазных клеток КМ или ПК пациентов с лимфопролиферативными заболеваниями с использованием локуспецифичных флуоресцентных зондов *ATM* (11q22)/*TP53* (17p13), *DLEU* (13q14)/*LAMP* (13q34) и *cen 12* (12p11.1;12q11.1)

Results of cytogenetic analysis of bone marrow or peripheral blood interphase cells of patients with lymphoproliferative diseases using locus-specific fluorescent probes *ATM* (11q22)/*TP53* (17p13), *DLEU* (13q14)/*LAMP* (13q34) and *cen 12* (12p11.1;12q11.1)

№	Пол пациента	Год рождения	Год исследования, диагноз, стадия по Binet	5-летняя выживаемость	% клеток с делецией, хромосома, регион (ген)
1.	ж	1952	2016 ХЛЛ, В ст.	Жива, полная ремиссия	Норма 95%
2.	м	1967	2015 ХЛЛ, В ст.	Жив, частичная ремиссия	11% del 17p13 (<i>TP53</i>), 23% del 13q14 (<i>DLEU</i>)
3.	м	1951	2015, ХЛЛ, С ст.	Умер, 2016 г. от осложнений ХЛЛ	11% del 17p13 (<i>TP53</i>), 59% с трисомией <i>cen 12p11.1</i>
4.	ж	1966	2015, ХЛЛ В ст.	Жива, частичная ремиссия	12% del 17p13 (<i>TP53</i>), 14% 13q14 (<i>DLEU</i>) 8% 13q34 (<i>LAMP</i>)
5.	ж	1966	2015, ХЛЛ В ст.	Жива, частичная ремиссия	13% del 17p13 (<i>TP53</i>), 9% del 11q22 (<i>ATM</i>), 9% 13q14 (<i>DLEU</i>)
6.	м	1960	2014, ХЛЛ А ст.	Жив, лечение не показано	16% del 17p13 (<i>TP53</i>)
7.	м	1946	2014, ХЛЛ С ст.	Умер, ОНМК (инсульт)	32% с трисомией <i>cen 12p11.1</i>
8.	м	1950	2018, ХЛЛ, В ст.	Жив, частичная ремиссия	Норма 95%
9.	м	1950	2021, ХЛЛ В ст.	Умер от осложнений ХЛЛ	82% del 17p13 (<i>TP53</i>), 44% 13q14 (<i>DLEU</i>)
10.	м	1976	2022 ХЛЛ, В ст.	Жив, лечение	13% del 13q14 (<i>DLEU</i>)
11.	м	1966	2016, ХЛЛ	Жив, по БАРС	11% del 13q14 (<i>DLEU</i>)
12.	м	1941	2015, ХЛЛ	Умер, по БАРС	16% del 17p13 (<i>TP53</i>), 19% 13q14 (<i>DLEU</i>) 13% 13q34 (<i>LAMP</i>)
13.	ж	1960	2015, ХЛЛ	Жива, по БАРС	Норма 95%
14.	ж	1967	2016, Неходжкинская лимфома	Жива, частичная ремиссия	14% del 13q14 (<i>DLEU</i>)
15.	ж	1947	2017 г., лимфома мантийной зоны селезенки 4 ст.	Умерла, от осложнений ЛМЗ	46% del 17p13 (<i>TP53</i>), 73% 13q34 (<i>LAMP</i>), 76% 11q22 (<i>ATM</i>)
16.	ж	1992	2018, анапластическая В-крупноклеточная лимфома 3 ст.	Жива, ремиссия	Норма 95%

Из 4 таких носителей 5-летняя выживаемость отмечена у половины обследованных. Нам представляется важным обратить внимание на тот факт, что распространенность мутации в регионе 13q14 при исследованной нозологии сравнима с мутацией 17p13. В регионе 13q14.2 располагается ген онкосупрессор *RBI*. По данным литературы [4], крупная делеция II типа может затрагивать этот ген, что снижает эффективность лечения и выживаемость. На основе анализа литературы считаем, что при наличии у пациента *del* 13q14 нужно дополнительно проводить исследование с применением зонда на локус 13q14.2 (*RBI*), что будет иметь важное прогностическое и практическое значение.

Важно отметить, что при расширении выборки (с 2019 г.) мы получили похожие соотношения с теми, что были представлены ранее в работе [1]. К сожалению, у нас нет возможности цитогенетического охвата всех пациентов с ХЛЛ и другой патологией города и области, поэтому накопление данных идет медленно.

Литература

1. Возилова А.В. Диагностика хронических лейкозов с применением методов молекулярной цитогенетики. Особенности методологии. Медицинская генетика. 2018(2):24-28.
2. Baliakas P., Jeromin S., Iskas M. et al. Cytogenetic complexity in chronic lymphocytic leukemia: definitions, associations, and clinical impact. *Blood*. 2019; 133(11):1205–1216.
3. Кислицина М.А. Характеристика кариотипа иммуностимулированных В-лимфоцитов больных хроническим лимфолейкозом. Дисс. канд. биол. наук. М. 2021.
4. Khalid K., Padda J., Syam M. et al. 13q14 Deletion and Its Effect on Prognosis of Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cureus*. 2021; 13(8):e16839. DOI 10.7759/cureus.16839.2021.

References

1. Vozilova A.V. Diagnostika khronicheskikh leykozov s primeneniym metodov molekulyarnoy tsitogenetiki. Osobennosti metodologii [Diagnosis of Chronic Lymphocytic Leukemias by Means of Methods of Molecular Cytogenetics. Characteristics of the Methodology]. *Meditsinskaya genetika [Medical Genetics]*. 2018;17(2):24-28. (In Russ.) <https://doi.org/10.25557/2073-7998.2018.02.24-28>
2. Baliakas P., Jeromin S., Iskas M. et al. Cytogenetic complexity in chronic lymphocytic leukemia: definitions, associations, and clinical impact. *Blood*. 2019; 133(11):1205–1216.
3. Kislitsina M.A. Kharakteristika kariotipa immunostimulirovannykh V-limfotsitov bol'nykh khronicheskim limfoleykozom. Diss. kand. biol. Nauk [Characteristics of the karyotype of immunostimulated B-lymphocytes in patients with chronic lymphocytic leukemia. Diss. cand. biol. Sciences]. М. 2021. (In Russ.)
4. Khalid K., Padda J., Syam M. et al. 13q14 Deletion and Its Effect on Prognosis of Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cureus*. 2021; 13(8):e16839. DOI 10.7759/cureus.16839.2021.