

Молекулярная диагностика ангиоиммунобластной Т-клеточной лимфомы

Н.Г. Чернова, Ю.В. Сидорова, С.Ю. Смирнова, Н.В. Рыжикова, Е.Е. Никулина, А.М. Ковригина, М.Н. Синицына, А.Б. Судариков

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава России, Москва, Россия

Резюме

Цель: определить показания и последовательность проведения молекулярных исследований при ангиоиммунобластной Т-клеточной лимфоме (АИТЛ) в различном биологическом материале.

Материалы и методы. Молекулярные исследования проведены у 84 первичных больных АИТЛ. Медиана возраста составила 61 (29–81) год, соотношение мужчины/женщины – 48/36. Оценку Т-клеточной и В-клеточной клональности проводили по реаранжировкам генов цепей Т-клеточного рецептора и тяжелых цепей иммуноглобулинов. Для количественного определения клеток с мутацией G17V гена *RHOA* применяли полимеразную цепную реакцию (ПЦР) в реальном времени с аллель-специфичными LNA модифицированными праймерами.

Результаты. В биоптатах лимфатических узлов реаранжировки генов цепей Т-клеточных рецепторов определены у 76 (90,5%) из 84 больных и отсутствовали в 8 (9,5%) случаях. Выявление одинаковых клональных продуктов амплификации генов *TCRG* и *TCRB* в биоптате лимфатического узла и в образцах периферической крови и/или костного мозга свидетельствовало о лейкоемизации опухолевого процесса и наблюдалось у 64,7% больных. Определение в образцах периферической крови и/или костного мозга клональных продуктов, отсутствующих в лимфатическом узле, обусловлено реактивной цитотоксической популяцией лимфоцитов и наблюдалось в 58,8% случаев АИТЛ. Одновременное выявление Т- и В-клеточной клональности в биоптате лимфатического узла отмечалось у 20 (24,7%) из 81 больного. Клетки с мутацией G17V гена *RHOA* выявлены в биоптатах лимфоузлов у 45 (54,9%) из 82 пациентов. Применение метода аллель-специфичной ПЦР с LNA модифицированными праймерами позволило выявить лейкоемизацию опухолевого процесса у 100% и поражение костного мозга – у 93,9% пациентов с выявленной мутацией в лимфоузлах.

Заключение. В результате выполненной работы определены показания и последовательность проведения молекулярных исследований при АИТЛ в различном биологическом материале. Количественная аллель-специфичная ПЦР с LNA модифицированными праймерами для определения мутации G17V гена *RHOA* обладает высокой чувствительностью, позволяет верифицировать лейкоемизацию опухолевого процесса и проводить мониторинг минимальной резидуальной болезни во время терапии.

Ключевые слова: реаранжировка генов Т-клеточного рецептора и тяжелых цепей иммуноглобулинов, мутация G17V гена *RHOA*, ангиоиммунобластная Т-клеточная лимфома.

Для цитирования: Чернова Н.Г., Сидорова Ю.В., Смирнова С.Ю. и др. Молекулярная диагностика ангиоиммунобластной Т-клеточной лимфомы. Терапевтический архив. 2019; 91 (7): 63–69. DOI: 10.26442/00403660.2019.07.000330

Molecular diagnosis angioimmunoblastic T-cell lymphoma

N.G. Chernova, Y.V. Sidorova, S.Y. Smirnova, N.V. Ryzhikova, E.E. Nikulina, A.M. Kovrigina, M.N. Sinitsyna, A.B. Sudarikov

National Research Center for Hematology, Moscow, Russia

Aim: to determine molecular diagnostics routine for different tissue samples in angioimmunoblastic T-cell lymphoma.

Materials and methods. Molecular studies were performed for 84 primary AITL patients. The median age was 61 year (29–81); the male to female ratio was 48/36. T-cell and B-cell clonality was assessed by GeneScan analysis of rearranged T-cell receptor (*TCRG*, *TCRB*) and immunoglobulin heavy chain genes. For the quantitative determination of cells with *RHOA* G17V mutation real-time polymerase chain reaction (PCR) with allele-specific LNA modified primers was used.

Results. In lymph nodes rearrangements of T-cell receptor genes were determined in 76 (90.5%) of 84 patients and were absent in 8 (9.5%) cases. Identification of the same clonal products of the *TCRG* and *TCRB* genes in the lymph node and in peripheral blood and/or bone marrow indicated the prevalence of the tumor process and was observed in 64.7% of patients. Clonal products in peripheral blood and/or bone marrow different from those in the lymph node indicated reactive cytotoxic lymphocyte population and were noted in 58.8% of AITL cases. Simultaneous detection of T- and B-cell clonality in the lymph node was observed in 20 (24.7%) of 81 patients. Cells with *RHOA* G17V mutation were detected in lymph node in 45 (54.9%) of 82 patients. The use of allele-specific PCR with LNA modified primers revealed presence of the tumor cells in peripheral blood in 100% and in bone marrow in 93.9% of patients with G17V *RHOA* mutation in the lymph nodes.

Conclusion. The validity of different molecular assays performed on certain tissue samples for the diagnosis of angioimmunoblastic T-cell lymphoma has been evaluated. Quantitative allele-specific PCR assay for *RHOA* G17V mutation based on LNA modified primers possesses sufficient sensitivity for tumor process prevalence evaluation and minimal residual disease monitoring.

Keywords: T-cell receptor and immunoglobulin heavy chains genes rearrangements, *RHOA* G17V mutation, angioimmunoblastic T-cell lymphoma.

For citation: Chernova N.G., Sidorova Y.V., Smirnova S.Y., et al. Molecular diagnosis angioimmunoblastic T-cell lymphoma. Therapeutic Archive. 2019; 91 (7): 63–69. DOI: 10.26442/00403660.2019.07.000330

АИТЛ – ангиоиммунобластная Т-клеточная лимфома
ДВККЛ – диффузная В-клеточная крупноклеточная лимфома
ПЦР – полимеразная цепная реакция
IGH – тяжелые цепи иммуноглобулинов

LNA – locked nucleotide acid
TCRB – бета-цепь Т-клеточного рецептора
TCRG – гамма-цепь Т-клеточного рецептора

Ангиоиммуобластная Т-клеточная лимфома (АИТЛ) – вид нодальной периферической Т-клеточной лимфомы, характеризующийся генерализованной лимфаденопатией, выраженными симптомами интоксикации и протекающий с диспротеинемией [1]. Первоначальное название заболевания «ангиоиммуобластная лимфаденопатия с диспротеинемией» было обусловлено развитием у большинства больных АИТЛ различных иммунных нарушений (гипергаммаглобулинемия, гемолитическая анемия) [2]. До появления молекулярных методов диагностики, доказавших Т-клеточную природу заболевания, АИТЛ трактовалась как неопухолевый лимфопролиферативный процесс с гипериммунной реакцией В-клеток [3, 4].

В настоящее время диагностика АИТЛ основывается на гистологическом и иммуногистохимическом исследованиях биоптата лимфатического узла. Характерной морфологической чертой АИТЛ является сравнительно небольшое количество опухолевых клеток на фоне выраженного реактивного микроокружения, представленного зоиофилами, плазматическими клетками, гистиоцитами, мелкими лимфоидными клетками, иммунобластами [1, 5, 6]. Обилие крупных В-клеток, инфицированных в большинстве случаев вирусом Эпштейна–Барр, может напоминать субстрат диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомы (ДВККЛ) [7]. Приблизительно в 1/3 случаев АИТЛ одно- и многоядерные иммунобласты напоминают клетки Ходжкина и клетки Рид–Березовского–Штернберга, что придает морфологической картине сходство со смешанно-клеточным вариантом лимфомы Ходжкина. На ранних этапах развития АИТЛ, так же как и при реактивных процессах, может наблюдаться только расширение паракортикальной зоны лимфатического узла, в связи с чем требуется проведение дополнительных методов диагностики для разграничения этих двух процессов [6, 8, 9].

Иммуногистохимическое исследование является обязательным для диагностики АИТЛ и направлено на разграничение сходных по морфологической картине, но различных по этиологии и подходам к лечению заболеваний. Использование расширенной панели антител, включающей исследование пан-Т-клеточных антигенов (CD2, CD3, CD4, CD5) и маркеров фолликулярных Т-хелперов (CD10, BCL6, CXCL13, PD1, ICOS, CXCR5) в большинстве случаев позволяет верифицировать правильный диагноз [1, 5, 10]. Од-

нако в ряде случаев АИТЛ, при небольшом количестве опухолевых клеток, выраженной пролиферации иммунобластов и aberrанности иммунофенотипа фолликулярных Т-хелперов, морфологические методы исследования не позволяют однозначно решить диагностическую дилемму.

Одним из дополнительных методов диагностики является полимеразная цепная реакция (ПЦР) – исследование Т- и В-клеточной клональности по реаранжировкам генов гамма и бета цепей Т-клеточного рецептора (*TCRG* и *TCRB*) и тяжелых цепей иммуноглобулинов (*IGH*). По данным литературы, Т-клеточная клональность методом ПЦР обнаруживается в 76–96% случаев АИТЛ, клональная или олигоклональная популяция В-клеток – в 17–45% [11–14]. В то же время общеизвестно, что Т-клеточная клональность по реаранжировкам генов *TCRG* в образцах периферической крови может выявляться при аутоиммунных, инфекционных процессах и других реактивных процессах, поэтому значение выявленной в различных биологических образцах Т-клеточной клональности при АИТЛ до конца не изучено [15–17]. Другой молекулярный маркер – выявленная несколько лет назад точечная соматическая мутация G17V гена *RHOA*, специфичная для ангиоиммуобластной Т-клеточной лимфомы и периферической Т-клеточной лимфомы, неспецифицированной, частота ее определения составляет 33–71% и 13–46% соответственно [18–21]. Наряду с этим остается неизвестным прикладное значение мутации G17V гена *RHOA* в диагностике АИТЛ, на данный момент не сформулированы показания к ее определению.

В нашей статье мы представили собственные данные исследования Т- и В-клеточной клональности методом ПЦР и точечной соматической мутации G17V гена *RHOA* количественной аллель-специфичной ПЦР в биоптатах лимфатических узлов, в образцах костного мозга и периферической крови у 84 первичных больных АИТЛ.

Материалы и методы

Пациенты. Проведен анализ основных клинико-лабораторных показателей у 84 первичных больных АИТЛ, наблюдавшихся в ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава России с 2002 по 2018 г. Соотношение мужчины/женщины – 48/36. Медиана возраста составила 61 (29–81) год. Клинико-лабораторная характеристика пациентов представлена в **таблице**.

Методы диагностики. Всем больным, вошедшим в исследование, проведено комплексное клинико-лабораторное обследование. Диагноз АИТЛ устанавливали согласно критериям классификации Всемирной организации здравоохранения 2017 г. Для патоморфологической верификации АИТЛ проводили морфологическое и иммуногистохимическое исследования биоптата лимфатического узла с расширенной панелью антител [CD2, CD3ε, CD4, CD5, CD7, CD8, CD10, CD20, CD21/CD23, CD30, PD1, CXCL13, BCL 6, PAX-5, Ki67, CISH (EBV)]. Распространенность опухолевого процесса определяли согласно классификации Ann Arbor (1971), при выявлении поражения костного мозга и/или экстра nodальных очагов устанавливали IV стадию заболевания.

Контактная информация:

Чернова Наталья Геннадьевна – к.м.н., врач-гематолог отделения интенсивной высокодозной химиотерапии лимфом с круглосуточным и дневным стационаром ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, тел.: 8(495)612-48-10, 8(916)660-27-63; e-mail: ngchernova@mail.ru; ORCID: 0000-0002-0827-4052

Сведения об авторах:

Сидорова Юлия Владимировна – к.м.н., с.н.с. лаб. молекулярной гематологии ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России; ORCID: 0000-0003-1936-0084

Смирнова Светлана Юрьевна – н.с. лаб. молекулярной гематологии ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России; ORCID: 0000-0001-6220-8868

Рыжикова Наталья Валерьевна – н.с. лаб. молекулярной гематологии ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России; ORCID: 0000-0003-2424-9524

Никулина Елена Евгеньевна – н.с. лаб. молекулярной гематологии ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России; ORCID: 0000-0003-3914-8611

Ковригина Алла Михайловна – д.б.н., проф., зав. патологоанатомическим отделением ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России; ORCID: 0000-0002-1082-8659

Синицына Марина Николаевна – н.с. патологоанатомического отделения ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России; ORCID: 0000-0002-0750-8005

Судариков Андрей Борисович – д.б.н., зав. лаб. молекулярной гематологии ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России; ORCID: 0000-0001-9463-9187

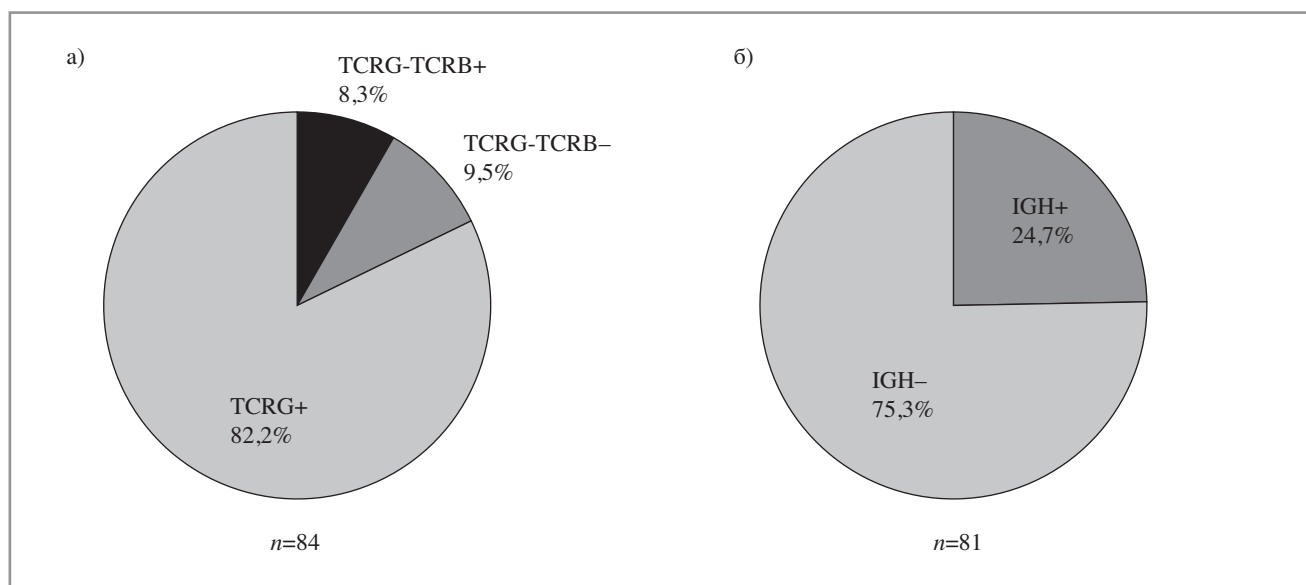


Рис. 1. Результаты ПЦР-исследования реаранжировок генов цепей Т-клеточного рецептора и тяжелых цепей иммуноглобулинов в биоптатах лимфатических узлов у больных АИТЛ.

а – результаты исследования Т-клеточной клональности, б – результаты исследования В-клеточной клональности.

Клинико-лабораторная характеристика больных

Клинико-лабораторные параметры	Число больных	%
Всего	84	100
Медиана возраста, лет	61 (29–81)	
Соотношение мужчин/женщин	48/36	
Стадия III–IV (Ann Arbor)	83	98,8
В-симптомы	82	97,6
Поражение костного мозга (по данным морфологического исследования)	36 из 75	48,0

Оценку Т-клеточной клональности проводили по реаранжировкам генов *TCRG* ($V\gamma-J\gamma$) и *TCRB* ($V\beta-J\beta$, $D\beta-J\beta$). Оценку В-клеточной клональности проводили по реаранжировкам генов *IGH* (FR1, FR2, FR3). Для этого использовали метод ПЦР с мультиплексными системами праймеров BIOMED-2 [22]. Для фрагментного анализа ПЦР-продуктов использовали автоматический анализатор нуклеиновых кислот ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA).

Для количественного определения клеток с мутацией G17V гена *RHOA* применяли ПЦР в реальном времени с аллель-специфичными праймерами, которые на 3' конце имели LNA (locked nucleotide acid) модифицированный нуклеотид. Благодаря данной модификации была увеличена чувствительность метода, которая составила 0,02% клеток с мутацией от общего количества клеток в образце [23].

Выделение $CD4^+$ и $CD8^+$ популяций лимфоцитов проводили с помощью набора для клеточной селекции производства MicroBeads (Miltenyi Biotec, Германия) согласно стандартному протоколу производителя. Селекция $CD4^+$ и $CD8^+$ лимфоцитов периферической крови проведена у 5 пациентов с последующим исследованием каждой из популяций [24].

Результаты

Определение Т-клеточной клональности методом ПЦР. Исследование реаранжировок генов *TCRG* в биоптате лимфатического узла проведено у 84 первичных больных АИТЛ, в 69 (82,2%) случаях выявлена моноклональная картина, из них в 6 (7,1%) биоптатах обнаружены сомнительные моноклональные пики. В 15 (17,9%) случаях отсутствия перестроек генов *TCRG* исследованы реаранжировки генов *TCRB*, моноклональная картина выявлена в 7 (8,3%) случаях, в остальных 8 (9,5%) образцах наблюдалась поликлональная картина. Таким образом, у 76 (90,5%) из 84 больных в биоптатах лимфатических узлов подтверждена Т-клеточная природа заболевания, тогда как в 8 (9,5%) случаях не выявлено перестроек генов *TCRG* и *TCRB* (рис. 1, а).

Исследование Т-клеточной клональности по реаранжировкам генов *TCRG* и/или *TCRB* в образцах периферической крови и костного мозга, взятых одновременно до начала

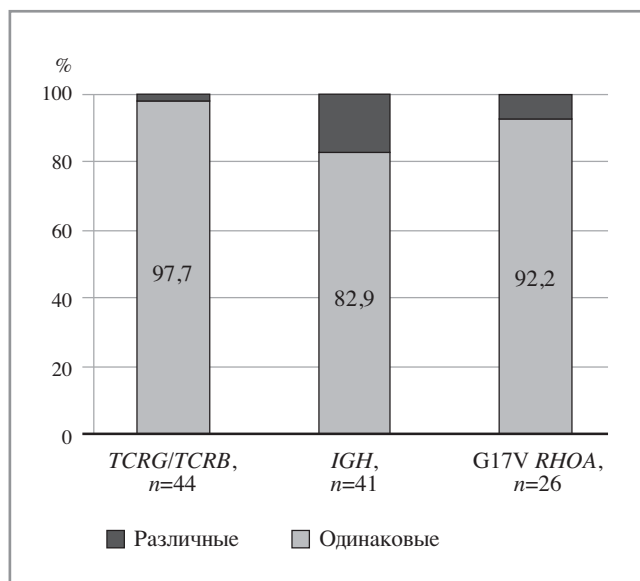


Рис. 2. Оценка идентичности результатов исследования образцов периферической крови и костного мозга (ПЦР-исследование Т- и В-клеточной клональности и мутации G17V гена *RHOA*).

терапии, проведено у 44 первичных больных АИТЛ. Оказалось, что в 43 (97,7%) из 44 случаев результаты исследования Т-клеточной клональности в образцах периферической крови и костного мозга были идентичны (рис. 2). Лишь в одном случае в образце периферической крови выявлялся сомнительный моноклональный пик при его отсутствии в образце костного мозга.

Учитывая высокую корреляцию полученных результатов в образцах периферической крови и костного мозга, проведено исследование частоты выявления Т-клеточной клональности в образцах периферической крови и/или костного мозга у 57 первичных больных АИТЛ при наличии реаранжировок *TCRG* и/или *TCRB* в лимфатическом узле. Моноклональная картина по реаранжировкам генов *TCRG* в образцах периферической крови и/или костного мозга выявлена у 32 (56,1%) из 57 больных, по *TCRG* и/или *TCRB* – у 34 (59,6%), поликлональная картина наблюдалась в 23 (40,4%) случаях.

Сравнение клональных продуктов, выявленных в биоптатах лимфатического узла и в образцах периферической крови и/или костного мозга, проведено у 34 первичных больных АИТЛ. Оказалось, что полное совпадение клональных продуктов по реаранжировкам генов *TCRG* и/или *TCRB* в биоптатах лимфатических узлов и в образцах периферической крови и/или костного мозга отмечено у 14 (41,2%) из 34 больных, появление дополнительных в образцах периферической крови и/или костного мозга – у 8 (23,5%), несовпадение – у 12 (35,3%) пациентов (рис. 3).

Принимая во внимание иммунофенотипические особенности АИТЛ ($CD4^+$) и цитотоксических лимфоцитов ($CD8^+$), для разграничения опухолевых и реактивных клонов у 5 больных проведена селекция лимфоцитов периферической крови. В дальнейшем проведено исследование реаранжировок генов *TCRG* и *TCRB* в $CD4^+$ и $CD8^+$ популяциях. В результате показано, что реаранжировки, наблюдавшиеся в лимфатическом узле, выявлялись в $CD4^+$ популяции клеток, в то время как в $CD8^+$ популяции наблюдались реаранжировки, отсутствующие в лимфатическом узле [24] (рис. 4, см. на цветной вклейке).

Определение В-клеточной клональности методом ПЦР. Исследование В-клеточной клональности по реаранжировкам генов *IGH* в биоптатах лимфатических узлов и образцах периферической крови и костного мозга прове-

дено у 81 первичного больного АИТЛ. В-клеточная клональность по реаранжировкам генов *IGH* в биоптатах лимфатических узлов выявлена у 20 (24,7%) из 81 больного, из них в 11 (13,6%) случаях выявлялись сомнительные пики (рис. 1, б). Несмотря на то что в 9 (11,1%) случаях наблюдались отчетливые моноклональные пики, сочетание ангиоиммуобластной Т-клеточной лимфомы с ДВККЛ при морфологическом исследовании биоптата лимфатического узла выявлено только в одном случае.

Исследование В-клеточной клональности по реаранжировкам генов *IGH* в образцах периферической крови и костного мозга, взятых одновременно до начала терапии, проведено у 41 первичного больного АИТЛ. Реаранжировки генов *IGH* в образцах периферической крови выявлены у 8 (19,5%) из 41 больного, в 3 (7,3%) случаях наблюдалась отчетливая моноклональная картина, в остальных 5 (12,2%) – выявлялись сомнительные моноклональные пики. Реаранжировки генов *IGH* в образцах костного мозга определялись у 10 (24,4%) из 41 больного, в 5 (12,2%) случаях обнаружена отчетливая моноклональная картина, в остальных 5 (12,2%) случаях наблюдались сомнительные моноклональные пики. У 3 больных отчетливые моноклональные пики были идентичны в биоптате лимфатического узла и в образцах периферической крови и костного мозга, у одного из них отмечено сочетание АИТЛ с ДВККЛ при первичной диагностике, у 1 больной манифестация ДВККЛ наблюдалась в процессе лечения АИТЛ, 1 больной умер от прогрессирования АИТЛ на ранних этапах лечения, у него не отмечено развития ДВККЛ. В 2 остальных случаях выявления моноклональной картины по реаранжировкам генов *IGH* в образцах костного мозга у больных в дебюте АИТЛ наблюдалась секреция моноклонального иммуноглобулина (Gk 4,5 г/л и Gk 7,5 г/л), которая была расценена как моноклональная гаммапатия неуточненного значения. На протяжении периода цитостатической терапии и последующего наблюдения больных, достигших клинко-гематологической ремиссии, в течение 42 и 44 мес уровень секреции моноклонального иммуноглобулина значительно не изменился. В образцах костного мозга продолжали выявляться те же клональные продукты по реаранжировкам генов цепей *IGH*. Сомнительные клональные пики по реаранжировкам генов цепей *IGH* в образцах периферической крови и/или образцах костного мозга

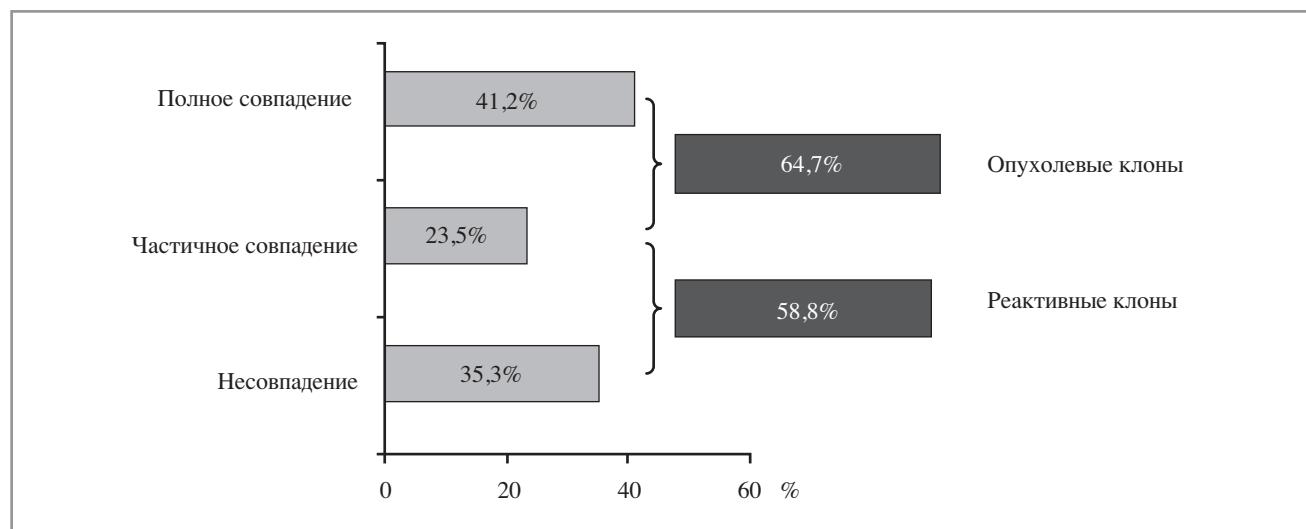


Рис. 3. Сопоставление клональных продуктов по реаранжировкам генов цепей Т-клеточного рецептора в биоптатах лимфатического узла и в образцах периферической крови и/или костного мозга.

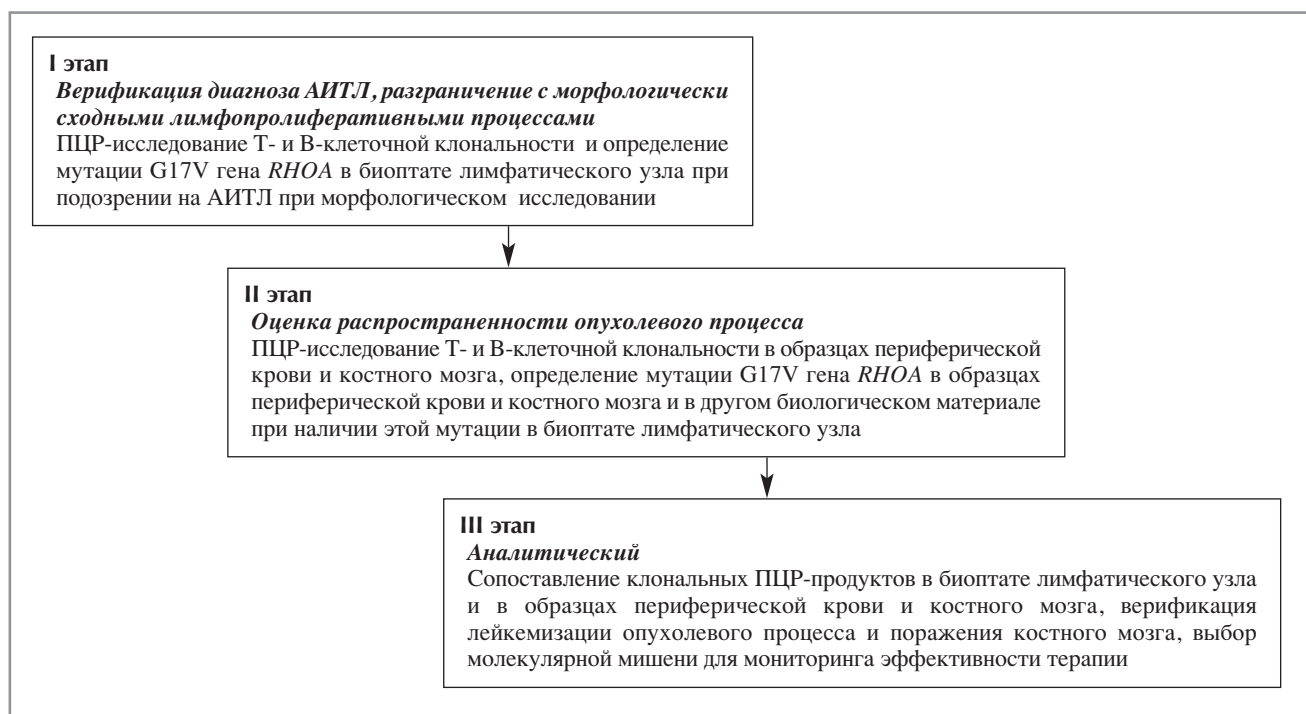


Рис. 5. Алгоритм проведения молекулярных методов исследования при АИТЛ.

выявлены у 8 больных, но ни в одном случае не отмечено совпадения с клональными продуктами в биоптате лимфатического узла. При сопоставлении результатов исследования В-клеточной клональности по реаранжировкам генов цепей *IGH* в образцах периферической крови и костного мозга результаты оказались идентичными в 34 (82,9%) случаях (см. рис. 2).

Определение G17V мутации гена *RHOA* методом аллель-специфичной ПЦР с LNA (locked nucleotide acid) праймерами. Исследование мутации G17V гена *RHOA* в биоптатах лимфатических узлов и в образцах периферической крови и/или костного мозга проведено у 82 первичных больных АИТЛ. Клетки с мутацией G17V гена *RHOA* выявлены в 45 (54,9%) из 82 биоптатов лимфатических узлов, среднее относительное содержание клеток с мутацией составило 8,2 (0,7–47,0)%. Исследование мутации G17V гена *RHOA* проведено в образцах периферической крови и костного мозга у больных с наличием этой мутации в лимфатическом узле. Частота выявления мутации G17V гена *RHOA* составила в периферической крови 31/31 (100%), в костном мозге – у 31/33 (93%). Среднее относительное содержание клеток с мутацией G17V гена *RHOA* в образцах периферической крови составило 2,57 (0,02–1,5)%, в образцах костного мозга – 1,19 (0,02–8,25)%. Результаты исследования первичных образцов периферической крови и костного мозга, взятых одновременно до начала терапии, были сопоставлены в 26 G17V *RHOA*-положительных случаях. У 24 (92,2%) из 26 больных результаты исследования были идентичны, в остальных 2 случаях клетки с мутацией G17V гена *RHOA* выявлялись только в образцах периферической крови (0,2 и 0,05%) при их отсутствии в образцах костного мозга (см. рис. 2).

Сопоставление результатов определения Т- и В-клеточной клональности и G17V мутации гена *RHOA*. Сопоставление результатов определения Т- и В-клеточной клональности и мутации G17V гена *RHOA* проведено у 81 первичного больного АИТЛ. Одновременное выявление Т- и В-клеточной клональности в биоптате лимфатического узла наблюдалось у 20 (24,7%) из 81 больного, из них в по-

ловине случаев ($n=10$) определялась мутация G17V гена *RHOA*. У 8 (9,9%) из 81 больного не выявлено ни Т-, ни В-клеточной клональности, ни мутации G17V гена *RHOA* в биоптате лимфатического узла. Во всех случаях выявления мутации G17V гена *RHOA* выявлялись реаранжировки генов цепей Т-клеточного рецептора. При отсутствии этой мутации реаранжировки генов *TCRG* и/или *TCRB* определены у 29 (78,4%) из 37 больных. В нашей группе больных не было ни одного случая выявления В-клеточной клональности по реаранжировкам генов цепей *IGH* при отсутствии Т-клональности по реаранжировкам генов *TCRG* и/или *TCRB* в биоптате лимфатического узла.

Сопоставление результатов определения Т-клеточной клональности по реаранжировкам генов *TCRG* и *TCRB* и мутации G17V гена *RHOA* в одних и тех же образцах периферической крови и костного мозга, взятых одновременно до начала терапии, проведено в 31 G17V *RHOA*-положительном случае. В результате показано, что при отсутствии наблюдавшихся в лимфатическом узле клональных продуктов по реаранжировкам генов Т-клеточного рецептора в образцах периферической крови и костного мозга, относительное содержание клеток с мутацией G17V *RHOA* не превышало 0,8 и 0,45% от всех ядродержащих клеток соответственно.

Обсуждение

В настоящее время диагностика ангиоиммунобластной Т-клеточной лимфомы остается для морфологов одной из самых сложных задач. Для верификации диагноза АИТЛ и разграничения ее с морфологически сходными лимфомами и реактивными процессами требуется проведение иммуногистохимического исследования с расширенной панелью антител и молекулярных исследований. Выполнение в сложных случаях диагностики только В- или только Т-клеточной клональности может затруднить верификацию диагноза. Результаты молекулярных исследований должны рассматриваться в совокупности с клинической и морфологической картиной у каждого конкретного больного.

В данной статье мы представили собственный опыт интерпретации результатов исследования Т- и В-клеточной клональности, мутации G17V гена *RHOA* на большом клиническом материале. Клетки с мутацией G17V гена *RHOA* выявлены в 45 (54,9%) из 82 биоптатов лимфатических узлов, среднее относительное содержание клеток с мутацией составило 8,2% (0,7–47,0). В результате проведенной работы определены показания и последовательность исследования Т- и В-клеточной клональности, мутации G17V гена *RHOA* в различном биологическом материале.

Первоначальным и основным субстратом как для морфологических, так и для молекулярных методов диагностики лимфом является лимфатический узел. Для подтверждения Т-клеточной природы АИТЛ и разграничения с другими морфологически сходными заболеваниями первым этапом проводится определение Т- и В-клеточной клональности по реаранжировкам генов *TCRG* и *IGH* в биоптате лимфатического узла (рис. 5). По нашим данным, в 82,1% случаев определяются клональные продукты по перестройкам генов *TCRG*, при отсутствии которых необходимо исследовать реаранжировки генов *TCRB*, что позволяет доказать Т-клеточную природу заболевания еще у 8,3% больных. Однако у 9,5% больных реаранжировки генов цепей Т-клеточного рецептора не обнаруживаются, что, вероятно, связано с небольшим процентным содержанием опухолевых клеток в образце или другими неясными на данный момент причинами. Наличие моноклональной или олигоклональной В-клеточной клональности не исключает диагноз АИТЛ, в то же время диагноз Т-клеточной лимфомы представляется сомнительным при выявлении реаранжировок генов тяжелых цепей иммуноглобулинов при отсутствии перестроек генов Т-клеточного рецептора [25–27]. Моноклональная и олигоклональная В-клеточная клональность в биоптате лимфатического узла может быть выявлена у каждого четвертого больного АИТЛ (24,7%), однако сочетание АИТЛ с В-клеточной лимфопролиферацией встречается крайне редко и верифицируется только на основании морфологического исследования. В литературе описаны единичные случаи одновременного и последовательного развития АИТЛ и В-клеточных лимфопролиферативных заболеваний [28–30]. В нашей группе только в 1 случае при морфологическом исследовании было выявлено сочетание АИТЛ с ДВБКЛ, что, возможно, явилось следствием накопления онкогенных мутаций в В-клетках микроокружения у больного с латентным течением Т-клеточной лимфомы.

Следующий этап молекулярных методов исследования направлен на оценку распространенности опухолевого процесса. Выявление одинаковых клональных продуктов по реаранжировкам генов *TCRG* и *TCRB* в биоптате лимфатического узла и образцах периферической крови и/или костного мозга свидетельствует о лейкоемизации заболевания и наблюдается у 64,7% больных. Однако следует помнить, что при АИТЛ в 58,8% случаев в периферической крови и костном мозге определяются клональные продукты, отсутствующие в лимфатическом узле, обусловленные реактивной цитотоксической популяцией лим-

фоцитов. Выявление В-клеточных моноклональных продуктов в образце костного мозга, отсутствующих в биоптате лимфатического узла, может быть ассоциировано с другим лимфопролиферативным процессом, например, моноклональной гаммапатией неутонченного значения. Обнаружение сомнительных В-клеточных пиков только в образцах периферической крови и/или костного мозга может быть связано с появлением реактивной популяции В-клеток. ПЦР-диагностика клональности не позволяет отличить иммунный клональный продукт от опухолевого, а лишь обнаруживает лимфоциты с одинаковой перестройкой генов, если их количество превышает 1–10% от общего количества лимфоцитов [22].

Применение в нашей работе количественной аллель-специфичной ПЦР с модифицированными LNA праймерами для определения мутации G17V гена *RHOA* увеличило чувствительность метода до 0,02% [23, 31]. Количество клеток с мутацией G17V гена *RHOA* в биоптатах лимфатических узлов было больше, чем в образцах периферической крови и костного мозга, поэтому исследование мутации G17V гена *RHOA* в образцах периферической крови и костного мозга целесообразно проводить только после выявления ее в биоптате лимфатического узла. Очень важно, что применение этой методики позволило выявить лейкоемизацию опухолевого процесса во всех (100%) G17V *RHOA*-положительных случаях, а поражение костного мозга – у подавляющего большинства (93,9%) больных. Количественная аллель-специфичная ПЦР с LNA модифицированными праймерами для определения мутации G17V гена *RHOA* обладает высокой чувствительностью, позволяет верифицировать лейкоемизацию опухолевого процесса и проводить мониторинг минимальной резидуальной болезни во время терапии.

Заключение

Таким образом, проведение ПЦР-исследования для определения В- и Т-клеточной клональности по реаранжировкам генов цепей Т-клеточного рецептора и тяжелых цепей иммуноглобулинов позволяет разграничить ангиоиммуннобластную Т-клеточную лимфому с другими морфологически сходными лимфопролиферативными процессами. В образцах периферической крови и костного мозга более чем в половине случаев наблюдаются дополнительные клональные продукты по реаранжировкам генов цепей Т-клеточного рецептора, не связанные с лейкоемизацией заболевания и поражением костного мозга. Количественное определение в биоптатах лимфатических узлов и в образцах периферической крови и костного мозга клеток с мутацией G17V гена *RHOA* методом аллель-специфичной ПЦР с модифицированными LNA праймерами позволяет выявить лейкоемизацию опухолевого процесса и поражение костного мозга у подавляющего большинства больных, а также мониторировать опухолевый клон во время лечения.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Arber DA, Hasserjian RP, LeBeau MM, Orazi A, Siebert R. WHO classification of tumors of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon: IARC, 2017:407-10.
2. Frizzera G, Moran EM, Rappaport H. Angioimmunoblastic lymphadenopathy with dysproteinemia. *Lancet*. 1974;1:1070-3.
3. Lukes RJ, Tindle BH. Immunoblastic lymphadenopathy. A hyperimmune entity resembling Hodgkin's disease. *N Engl J Med*. 1975;292(1):1-8.
4. Frizzera G, Moran EM, Rappaport H. Angio-immunoblastic lymphadenopathy: diagnosis and clinical course. *Am J Med*. 1975;59:803-18.
5. Willenbrock K, Renné C, Gaulard P, Hansmann ML. In angioimmunoblastic T-cell lymphoma, neoplastic T cells may be a minor cell population. A molecular single-cell and immunohistochemical study. *Virchows Arch*. 2005;446(1):15-20. doi: 10.1007/s00428-004-1114-1
6. de Leval L, Gisselbrecht C, Gaulard P. Advances in the understanding and management of angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Br J*

- Haematol.* 2010;148(5):673-89. doi: 10.1111/j.1365-2141.2009.08003.x
7. Weiss LM, Jaffe ES, Liu XF, Chen YY, Shibata D, Medeiros LJ. Detection and localization of Epstein-Barr viral genomes in angioimmunoblastic lymphadenopathy and angioimmunoblastic lymphadenopathy-like lymphoma. *Blood*. 1992;79:1789-95.
 8. Dogan A, Attygalle AD, Kyriakou C. Angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Br J Haematol.* 2003;121:681-91.
 9. Стефанов Д.Н., Ковригина А.М., Поддубная А.М. Новая концепция происхождения ангиоиммунобластной Т-клеточной лимфомы: от молекулярной биологии к терапии. *Бюллетень СО РАМН*. 2011;31(2):14-9 [Stefanov DN, Kovrigina AM, Poddubnaya AM. A new concept of angioimmunoblastic T-cell lymphoma origin: from molecular biology to therapy. *Bulleten SO RAMN*. 2011;31(2):14-9 (In Russ.)].
 10. Dupuis J, Boye K, Martin N, Copie-Bergman C, Plonquet A, Fabiani B, Baglin AC, Haioun C, Delfau-Larue MH, Gaulard P. Expression of CXCL13 by neoplastic cells in angioimmunoblastic T-cell lymphoma (AITL). A new diagnostic marker providing evidence that AITL derives from follicular helper T-cells. *Am J Surg Pathol.* 2006;30:490-4.
 11. Lachenal F, Berger F, Ghesquière H, Biron P, Hot A, Callet-Bauchu E, Chassagne C, Coiffier B, Durieu I, Rousset H, Salles G. Angioimmunoblastic T-cell lymphoma: clinical and laboratory features at diagnosis in 77 patients. *Medicine (Baltimore)*. 2007;86(5):282-92. doi: 10.1097/MD.0b013e3181573059
 12. Чернова Н.Г., Виноградова Ю.Е., Сидорова Ю.В., Капланская И.Б., Гилязитдинова Е.А., Горенкова Л.Г., Марын Д.С., Кременецкая А.М., Воробьев А.И., Кравченко С.К. Длительные режимы цитостатической терапии ангиоиммунобластной Т-клеточной лимфомы. *Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика*. 2014;7(1):57-62 [Chernova NG, Vinogradova YuE, Sidorova YuV, Kaplanskaya IB, Gilyazitdinova EA, Gorenkova LG, Mar'in DS, Kremenetskaya AM, Vorob'ev AI, Kravchenko SK. Prolonged chemotherapy for angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Russian Journal of klinicheskaya onkogematologiya. Fundamental'nye issledovaniya i klinicheskaya praktika*. 2014;7(1):57-62 (In Russ.)].
 13. Tan BT, Warnke RA, Arber DA. The frequency of B- and T-cell gene rearrangements and Epstein-Barr virus in T-cell lymphomas: a comparison between angioimmunoblastic T-cell lymphoma and peripheral T-cell lymphoma, unspecified with and without associated B-cell proliferations. *J Mol Diagn.* 2006;8(4):466-75. doi: 10.2353/jmoldx.2006.060016
 14. Сидорова Ю.В., Никулина Е.Е., Чернова Н.Г., Горенкова Л.Г., Гилязитдинова Е.А., Кравченко С.К., Ковригина А.М., Судариков А.Б. Определение клональности методом ПЦР при ангиоиммунобластной Т-клеточной лимфоме. *Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика*. 2014;7(2):192-6 [Sidorova YuV, Nikulina EE, Chernova NG, Gorenkova LG, Gilyazitdinova EA, Kravchenko SK, Kovrigina AM, Sudarikov AB. PCR-based clonality detection in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Russian Journal of klinicheskaya onkogematologiya. Fundamental'nye issledovaniya i klinicheskaya praktika*. 2014;7(2):192-6 (In Russ.)].
 15. Чернова Н.Г., Сидорова Ю.В., Захарько Е.И., Наумова Е.В., Рыжикова Н.В., Гальцева И.В., Двирык В.Н., Смирнова С.Ю., Судариков А.Б., Кохно А.В., Моисеева Т.Н., Луговская С.А., Звонков Е.Е., Савченко В.Г. Протоочная цитометрия и ПЦР-исследование Т-клеточной клональности в разграничении опухолевой и реактивной пролиферации больших гранулярных лимфоцитов. *Гематология и трансфузиология*. 2018;2:124-33 [Chernova NG, Sidorova YuV, Zakharko EI, Naumova EV, Ryzhikova NV, Galtseva IV, Dvirnyk VN, Smirnova SYu, Sudarikov AB, Kokhno AV, Moiseeva TN, Lugovskaya SA, Zvonkov EE, Savchenko VG. Flow cytometry and PCR-based T-cell clonality testing for discriminating between reactive and neoplastic proliferation of large granular lymphocytes. *Russian Journal of Hematology and Transfusiology (Gematologiya i transfusiologya)*. 2018; 2:124-33 (In Russ.)]. doi: 10.25837/HAT.2018.48..2.003
 16. Сидорова Ю.В., Никитин Е.А., Меликян А.Л., Пивник А.В., Судариков А.Б. Определение Т-клеточной клональности при инфекционном мононуклеозе методом ПЦР-SSCP-TCRγ. *Гематология и трансфузиология*. 2004;49(6):1-7 [Sidorova YuV, Nikitin EA, Melikyan AL, Pivnik AV, Sudarikov AB. Use of PCR-SSCP-TCRγ method to determine T-cell clonality in infectious mononucleosis. *Russian Journal of Hematology and Transfusiology (Gematologiya i transfusiologya)*. 2004;49(6):1-7 (In Russ.)].
 17. Smirnova SJ, Sidorova JV, Tsvetaeva NV, Nikulina OF, Biderman BV, Nikulina EE, Kulikov SM, Sudarikov AB. Expansion of CD8+ cells in autoimmune hemolytic anemia. *Autoimmunity*. 2016;49(3):147-54. doi: 10.3109/08916934.2016.1138219
 18. Sakata-Yanagimoto M, Enami T, Yoshida K, Shiraishi Y, Ishii R, Miyake Y, Muto H, Tsuyama N, Sato-Otsubo A, Okuno Y, Sakata S, Kamada Y, Nakamoto-Matsubara R, Tran NB, Izutsu K, Sato Y, Ohta Y, Furuta J, Shimizu S, Komeno T, Sato Y, Ito T, Noguchi M, Noguchi E, Sanada M, Chiba K, Tanaka H, Suzukawa K, Nanmoku T, Hasegawa Y, Nureki O, Miyano S, Nakamura N, Takeuchi K, Ogawa S, Chiba S. Somatic RHOA mutation in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Nat Genet.* 2014;46(2):171-5. doi: 10.1038/ng.2872
 19. Nakamoto-Matsubara R, Sakata-Yanagimoto M, Enami T, Yoshida K, Yanagimoto S, Shiozawa Y, Nanmoku T, Satomi K, Muto H, Obara N, Kato T, Kurita N, Yokoyama Y, Izutsu K, Ota Y, Sanada M, Shimizu S, Komeno T, Sato Y, Ito T, Kitabayashi I, Takeuchi K, Nakamura N, Ogawa S, Chiba S. Detection of the G17V RHOA mutation in angioimmunoblastic T-cell lymphoma and related lymphomas using quantitative allele-specific PCR. *PLoS One*. 2014;9(10):e109714. doi: 10.1371/journal.pone.010 9714
 20. Kataoka K, Ogawa S. Variegated RHOA mutations in human cancers. *Exp Hematol.* 2016;44(12):1123-9. doi: 10.1016/j.exphem.2016.09.002
 21. Manso R, González-Rincón J, Rodríguez-Justo M, Roncador G, Gomez S, Sánchez-Beato M, Piris MA, Rodríguez-Pinilla SM. Overlap at the molecular and immunohistochemical levels between angioimmunoblastic T-cell lymphoma and a subgroup of peripheral T-cell lymphomas without specific morphological features. *Oncotarget*. 2018;9(22):16124-33. doi: 10.18632/oncotarget.24592
 22. Dongen FL, Langerak AW, Brüggemann M, Evans PA, Hummel M, Lavender JJ, Delabesse E, Davi F, Schuurink E, Garcia-Sanz R, Krieken JH, Droese J, Gonzalez D, Bastard C, White HE, Spaargaren M, Gonzalez M, Parreira A, Smith JL, Morgan GJ, Kneba M, Macintyre EA. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia*. 2003;17(12):2257-317. doi: 10.1038/sj.leu.2403202
 23. Sidorova YuV, Chernova NG, Sinitsyna MN, Aleksenko MY, Glinshchikova OA, Smirnova SYu, Ryzhikova NV, Nikulina EE, Zakharko EI, Rybkina EB, Dvirnyk VN, Kovrigina AM, Zvonkov EE, Sudarikov AB. Monitoring of RHOA G17V mutation during the course of therapy in patients with angioimmunoblastic T-cell lymphoma by quantitative allele-specific PCR with LNA-modified primers. *Hemisphere. Abstract book. 23rd Congress of the European Hematology Association*. 2018;2(S):89-90.
 24. Smirnova S, Sidorova Y, Chernova N, Zvonkov E, Sinitsyna M, Sychevskaya K, Glinshchikova O, Ryzhikova N, Kovrigina A, Sudarikov A. CD8+ T-cell clones persistent in bone marrow and peripheral blood during course of CD4+ angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Haematologica*. 2017;102(suppl 1):578, E1403.
 25. Zaki MA, Wada N, Kohara M, Ikeda J, Hori Y, Fujita S, Ogawa H, Sugiyama H, Hino M, Kanakura Y, Morii E, Aozasa K. Presence of B-cell clones in T-cell lymphoma. *Eur J Haematol.* 2011;86(5):412-9. doi: 10.1111/j.1600-0609.2011.01597.x
 26. Higgins JP, van de Rijn M, Jones CD, Zehnder JL, Warnke RA. Peripheral T-cell lymphoma complicated by a proliferation of large B-cells. *Am J Clin Pathol.* 2000;114:236-47.
 27. Lome-Maldonado C, Canioni D, Hermine O, Delabesse E, Damotte D, Raffoux E, Gaulard P, Macintyre E, Brousse N. Angioimmunoblastic T-cell lymphoma (AILD-TL) rich in large B-cells and associated with Epstein-Barr virus infection. A different subtype of AILD-TL? *Leukemia*. 2002;16:2134-41. doi: 10.1038/sj.leu.2402642
 28. Xu Y, McKenna RW, Hoang MP, Collins RH, Kroft SH. Composite angioimmunoblastic T-cell lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma: a case report and review of the literature. *Am J Clin Pathol.* 2002;118:848-54. doi: 10.1309/VD2D-98ME-MB3F-WH34
 29. Huang J, Zhang PH, Gao YH, Qiu LG. Sequential development of diffuse large B-cell lymphoma in a patient with angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Diagn Cytopathol.* 2012;40:346-51. doi: 10.1002/dc.21641
 30. Chernova NG, Sidorova JV, Margolin OV, Maryin DS, Al-Radi LS, Moiseeva TN, Kovrigina AM, Kremenetskaya AM, Vorobiev AI, Kravchenko SK. Hodgkin lymphoma in patient with angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *J Haematologica*. 2013;98(suppl 2):27, P081.
 31. Latorra D, Campbell K, Wolter A, Hurley JM. Enhanced allele-specific PCR genotyping using 3' locked nucleic acid (LNA) primers. *Hum Mutat.* 2003;22(1):79-85. doi: 10.1002/humu.10228

Поступила 31.03.2019