

Результаты количественной *RHOA* Gly17Val аллель-специфичной полимеразной цепной реакции и определения Т-клеточной клональности при ангиоиммунобластной Т-клеточной лимфоме

Ю.В. Сидорова, Н.Г. Чернова, И.А. Якутик, С.Ю. Смирнова, Н.В. Рыжикова, Е.Е. Никулина, М.Ю. Алексенко, М.Н. Синицына, А.М. Ковригина, Т.Н. Моисеева, Е.Е. Звонков, А.Б. Судариков

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава России; Россия, 125167 Москва, Новый Зыковский проезд, 4

Контакты: Юлия Владимировна Сидорова iouliavl@rambler.ru

Введение. Ангиоиммунобластная лимфома — периферическая Т-клеточная лимфома (АИТЛ), характеризующаяся обильной полиморфной инфильтрацией лимфатических узлов (ЛУ) при небольшом количестве опухолевых CD4⁺ Т-клеток. Сложность представляет дифференциальная диагностика с реактивными процессами и другими лимфомами, например лимфомой Ходжкина. Для подтверждения диагноза применяют молекулярные методы определения клональности. Клональные реаранжировки генов Т-клеточных рецепторов (T-cell receptors, TCR) в ЛУ могут не совпадать с реаранжировками, выявляемыми в костном мозге (КМ) и других тканях, что затрудняет их интерпретацию. Недавно обнаруженная точечная соматическая мутация *ras*-гомологичной малой гуанозин-трифосфатазы А типа (*RHOA*) Gly17Val выявляется у 53–71 % пациентов с АИТЛ и позволяет определить количество имеющихся опухолевых клеток.

Цель исследования — оценить количество опухолевых клеток с мутацией *RHOA* Gly17Val в различных тканях у пациентов с АИТЛ и сопоставить его с результатами определения Т-клеточной клональности.

Материалы и методы. Т-клеточную клональность оценивали по реаранжировкам TCRG и TCRB генов по протоколу BIOMED-2 методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующим проведением фрагментного анализа на секвенаторе ABI Prism 3130. Мутация *RHOA* Gly17Val анализировалась с помощью количественной TaqMan аллель-специфичной ПЦР. Исследованы образцы ЛУ, кожи, КМ и крови у 40 пациентов с диагнозом АИТЛ.

Результаты. Т-клеточная клональность выявлена в ЛУ у 37 из 40 пациентов (92 %) и в КМ у 26 (96 %) из 28 пациентов, однако клональные TCR-реаранжировки не совпадали по длине в ЛУ и КМ у 12 (46 %) из 26 пациентов. Мутация *RHOA* Gly17Val выявлена в ЛУ у 24 (60 %) из 40 пациентов. Количество опухолевых клеток в ЛУ в среднем составило 26,7 % от всех клеток, тогда как в КМ клетки с мутацией *RHOA* либо не выявлялись (у 7 из 17 пациентов), либо выявлялись в малом количестве: у 10 из 17 пациентов — в среднем 2 % от общего количества клеток. Образцы кожи, КМ и крови с пиками Т-клеточной клональности, отличающимися от таковых, найденных в ЛУ, были также отрицательны на наличие клеток с мутацией *RHOA*. У 4 пациентов было показано, что клональные продукты в КМ и крови, не совпадающие с ЛУ, относятся к CD8⁺-лимфоцитам.

Выводы. Результаты исследования показывают, что количественное определение клеток с мутацией *RHOA* Gly17Val необходимо учитывать при стадировании заболевания и интерпретации результатов определения Т-клеточной клональности. Т-клеточные клоны, не совпадающие с клонами, выявляемыми в ЛУ, должны рассматриваться как реактивные.

Ключевые слова: ангиоиммунобластная Т-клеточная лимфома, клональность, точечная мутация, аллель-специфичная полимеразная цепная реакция, *RHOA* Gly17Val

DOI: 10.17650/1818-8346-2017-12-4-41-49

Quantitative *RHOA* Gly17Val allele-specific polymerase chain reaction and T-cell clonality analysis in angioimmunoblastic T-cell lymphoma.

Yu. V. Sidorova, N. G. Chernova, I. A. Yakutik, S. Yu. Smirnova, N. V. Ryzhikova, E. E. Nikulina, M. Yu. Aleksenko, M. N. Sinitsyna, A. M. Kovrigina, T. N. Moiseeva, E. E. Zvonkov, A. B. Sudarikov

National Research Center for Hematology, Ministry of Health of Russia; 4 Novyy Zykovskiy Proezd, Moscow 125167, Russia

Introduction. Angioimmunoblastic T-cell lymphoma (AITL) is a T-cell lymphoma, characterized by abundant polymorphocellular infiltrate of lymph nodes with the small number of tumor CD4⁺ T-cells. AITL could often be misdiagnosed as reactive processes and other lymphomas, including Hodgkin's lymphoma. Molecular methods of determining clonality are used to confirm the diagnosis. TCR gene rearrangements detected in the lymph nodes may not coincide with those detected in the bone marrow (BM), blood or skin, that makes their interpretation difficult. Recently discovered point somatic *RHOA* (Ras homolog gene family, member A) Gly17Val mutation is present in 53–71 % of angioimmunoblastic T-cell lymphomas.

The aim of the study was to evaluate the number of *RHOA* Gly17Val mutated cells in different tissues of AITL patients and to correlate it with corresponding T-cell clonality results.

Materials and methods. TCRG and TCRB gene rearrangements were PCR-amplified according to BIOMED-2 standardized protocol and analyzed by capillary electrophoresis on ABI Prism 3130. Gly17Val mutation was analyzed by quantitative allele-specific (qAS) TaqMan Real-Time PCR assay. Lymph nodes (LN) and skin biopsies, blood and BM samples were studied for 40 patients with AITL.

Results. The clonal TCR gene rearrangements were found in 37 (92 %) of 40 patients in LN and in 26 (96 %) of 28 patients in BM, but they were not matched in length in LN and BM in 12 (46 %) of 26 patients. RHOA (Gly17Val) mutation in LN was revealed in 60 % (24 of 40) patients. Number of cells with RHOA mutation was highest in the LN (in average 26.7 % of the total cells), while in the BM RHOA mutation were undetectable (in 7 patients), or detected in 10 patients in a low quantity (in average 2 % of the total cells). Skin, blood and BM samples with the T-cell clonality peaks that differ from those found in the LN were also negative for the presence of cells having RHOA Gly17Val mutation. Also, in four patients we showed that clonal products in BM and blood that do not coincide with LN refer to CD8⁺ lymphocytes.

Conclusions. The results of the study demonstrate that the quantitative determination of cells with the mutation of RHOA Gly17Val must be taken into account in staging the disease and interpreting the results of T-cell clonality assay. Clonal cells with rearrangements not matching those identified for the LN should be considered reactive.

Key words: angioimmunoblastic T-cell lymphoma, clonality, point mutation, allele-specific polymerase chain reaction, RHOA Gly17Val

Введение

Ангиоиммунобластная лимфома — периферическая Т-клеточная лимфома (АИТЛ), которая характеризуется генерализованной лимфаденопатией с обильной полиморфноклеточной инфильтрацией лимфатических узлов (ЛУ), пролиферацией сосудов и фолликулярных дендритных клеток [1]. По данным международной группы изучения Т- и НК-клеточных лимфом, выявляемость АИТЛ составляет 18,5 % среди всех периферических Т-клеточных лимфом [2]. Кроме ЛУ, при АИТЛ часто наблюдается поражение селезенки, печени, кожи и костного мозга (КМ). Заболевание практически всегда ассоциировано с вирусом Эпштейна—Барр (ВЭБ), что позволяет предположить его роль в этиологии АИТЛ [3, 4]. Дифференциальная диагностика чаще всего проводится с другими Т-клеточными лимфомами, смешанно-клеточным вариантом лимфомы Ходжкина, диффузной В-крупноклеточной лимфомой, аутоиммунными или реактивными процессами [5]. При морфологическом исследовании обнаруживаются небольшое количество опухолевых клеток и преобладание реактивных клеточных элементов: В-лимфоциты, иммунобласты, часть из которых может напоминать одно- и двуядерные клетки Ходжкина и Березовского—Штернберга, сеть фолликулярных дендритических клеток, клетки эндотелия, плазматические клетки, гистиоциты, эозинофилы и др. [5, 6]. Опухолевые CD4⁺ Т-клетки в большинстве случаев немногочисленны и экспрессируют пан-Т-клеточные антигены (CD3, CD2, CD5), маркеры нормальных фолликулярных Т-хелперов (CD10, CXCL13, PD-1). Для подтверждения диагноза, оценки распространенности процесса проводят морфологическое, иммуногистохимическое, молекулярно-генетическое исследование биоптатов очагов поражения, образцов крови и КМ [1, 5–7]. В сложных диагностических случаях помогает исследование Т-клеточной клональности методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) по ретранжировкам генов Т-клеточных рецепторов (TCR), которые обнаруживаются в большинстве (76–96 %) случаев [7–10]. Однако при первичном обследовании ткани ЛУ при АИТЛ в 20–45 % случаев выявляется

также В-клеточная клональность, которая предположительно носит реактивный, ВЭБ-ассоциированный характер [11–13]. Недавно обнаруженная точечная соматическая мутация RHOA Gly17Val определяется у 53–71 % пациентов с АИТЛ, является хорошей диагностической мишенью и позволяет количественно оценить наличие опухолевых клеток [14–17]. Показано, что данная мутация при АИТЛ обнаруживается только в опухолевых, но не в других кроветворных клетках, в отличие от точечных мутаций в генах TET2 и DNMT3A. Данная мутация приводит к аминокислотной замене в гуанозинтрифосфатсвязывающем районе белка RHOA и его инактивации. Поскольку данный белок участвует в передаче сигнала от Т-клеточного рецептора, нарушается иммунологическое взаимодействие Т-лимфоцитов с другими клетками иммунной системы, что, возможно, является триггерным механизмом развития АИТЛ [18]. В данной работе мы сравнили результаты исследования Т-клеточной клональности и количественной RHOA Gly17Val аллель-специфичной ПЦР у пациентов с АИТЛ.

Цель исследования — сопоставление количества опухолевых клеток с мутацией RHOA Gly17Val с результатами определения Т-клеточной клональности в ЛУ, крови, КМ и коже пациентов с АИТЛ.

Материалы и методы

Пациенты. В исследование включены 40 пациентов с диагнозом АИТЛ, установленным на основании критериев диагностики ВОЗ (2008 г.) [1]. Пациенты наблюдались в ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава России с 2002 по 2017 г. Мужчин было больше, чем женщин — 25 против 15, медиана возраста составила 65 лет (36–87 лет). Для патоморфологической верификации АИТЛ проводили гистологическое и иммуногистохимическое исследования опухолевого субстрата с расширенной панелью антител (CD2, CD3ε, CD4, CD5, CD7, CD8, CD10, CD20, CD30, PD1, CXCL13, BCL6, PAX-5, Ki67). Молекулярные исследования выполняли на материале ЛУ (n = 47), кожи (n = 12), КМ (n = 53), крови (n = 29), селезенки (n = 2). Лейкоциты

и ДНК из крови и КМ выделяли так же, как ранее описано нами в публикации [19]. Для выделения ДНК из ткани, залитой в парафиновый блок, или свежемороженой ткани также использовали описанную ранее методику [20]. В качестве контрольной использовали ДНК от 10 здоровых доноров и 30 пациентов с В-клеточными лимфомами.

Определение Т-клеточной клональности методом ПЦР. Оценку Т-клеточной клональности проводили по реаранжировкам *TCRG* ($V\gamma-J\gamma$) и *TCRB* ($V\beta-J\beta$, $D\beta-J\beta$) генов. Для этого использовали метод ПЦР с мультиплексными праймерами по протоколу BIOMED-2 [21]. Для фрагментного анализа ПЦР-продуктов использовали автоматический анализатор нуклеиновых кислот ABI Prism 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США). Капиллярный электрофорез высокого разрешения проводили на полимере POP-4 (Applied Biosystems, США). Флуоресценцию амплификатов и их профиль (распределение по длинам) оценивали с помощью компьютерной программы GeneMapper v. 4.0 (Applied Biosystems, США). Если моноклональный пик более чем в 3 раза превышал поликлональный фон, результат считали моноклональным, если в 2–3 раза, то сомнительным. Чувствительность определения

Т-клеточной клональности варьирует от 1 до 10 % моноклональных клеток от общего количества Т-лимфоцитов и зависит от репертуара поликлональных и клональных лимфоцитов [21].

Количественное определение *RHOA* Gly17Val методом аллель-специфичной ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ). Мутацию *RHOA* Gly17Val определяли с помощью количественной TaqMan аллель-специфичной ПЦР. Для этого использовали следующие праймеры и пробы: прямой (дикого типа wt) TGGTGATGGAGCCTGTAG, прямой (мутантного типа mt) TGGTGATGGAGCCTGTAT, пробу FAM-CAAGGACCAGTTCCCAGAGG-BHQ1, обратный GCTTTCCATCCACCTCGATA. ДНК (200–400 нг) вносили в 25 мкл реакционной смеси (ЗАО «Синтол», Россия), содержащей: 10 пмоль wt или mt прямого праймера, 10 пмоль обратного и 7,5 пмоль пробы к гену *RHOA* (ЗАО «Синтол», Россия). Анализ ПЦР проводился в 3 повторах (3wt и 3mt), ПЦР-РВ и анализ данных – на приборе Step One Real-Time PCR (Applied Biosystems, США). Условия ПЦР – 95 °C 5 мин, затем 50 циклов – 95 °C 30 с, 56 °C 15 с, 54 °C 15 с, 72 °C 30 с. Количество опухолевых клеток рассчитывали относительно амплификации с праймером дикого типа (wt) в соответствии с формулами:

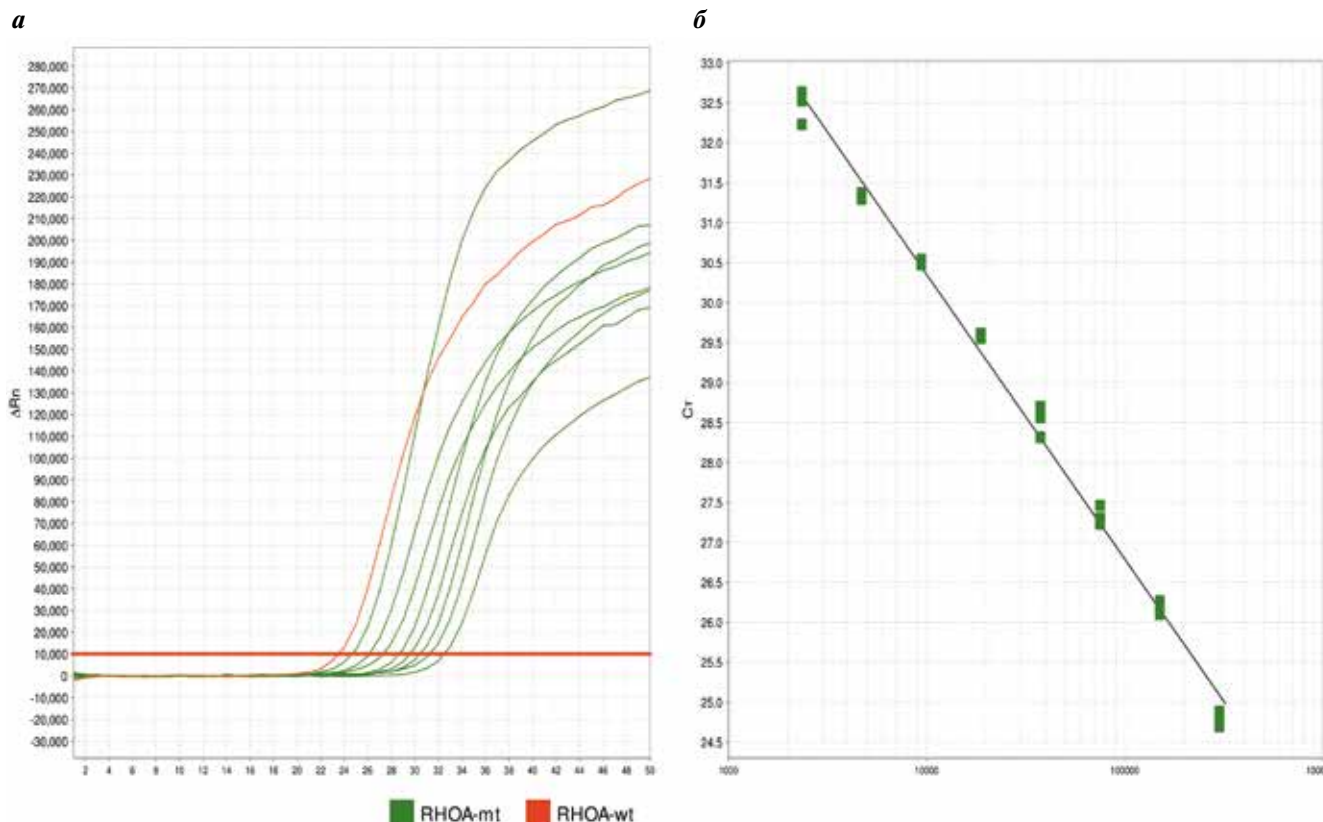


Рис. 1. Результаты количественной аллель-специфичной полимеразной цепной реакции в реальном времени определения мутации *RHOA* Gly17Val: а) профили амплификации серийных разведений опухолевой ДНК в нормальной: 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625; 0,03125; 0,0156; 0,0078 (красный цвет – амплификационная кривая с праймерами дикого типа), б) стандартная кривая на основе серийных разведений. ΔRn – уровень относительной флуоресценции, C_t – пороговый цикл

Fig. 1. Real-time quantitative allele-specific polymerase chain reaction data for *RHOA* Gly17Val detection: а) the amplification profiles of serial dilutions of tumor DNA in normal: 1; 0.5; 0.25; 0.125; 0.0625; 0.03125; 0.0156; 0.0078. Red color – amplification curve with wild type primers, б) Standard curve based on serial dilutions. ΔRn – relative fluorescence level, C_t – threshold cycle

$$\Delta Ct = Ct (mt) - Ct (wt),$$

$$N = 50 / (2^{\Delta Ct}),$$

где N — искомое количество клеток, выраженное в процентах от исходного уровня; $Ct (mt)$ и $Ct (wt)$ — номер цикла подъема кривой флуоресценции с праймером мутантного и дикого типов соответственно.

На основании анализа серии разведений опухолевого образца в неопухолевой ткани, построения стандартной кривой, а также анализа отрицательных «контролей», т. е. образцов без мутации ($n = 40$), определена чувствительность метода (рис. 1), которая составила 1 % клеток с мутацией от общего количества клеток в образце.

Селекция $CD4^+$ - и $CD8^+$ -лимфоцитов. У 4 пациентов выполнена селекция $CD8^+$ - и $CD4^+$ -популяции лимфоцитов периферической крови с последующим определением Т-клеточной клональности в каждой из популяций. Клетки селектировали с помощью набора $CD4^+$, $CD8^+$ MicroBeads (Miltenyi Biotec) согласно стандартному протоколу производителя.

Статистический анализ. Для сравнения результатов, полученных 2 методами, использовали критерий ранговой корреляции Спирмена (rs). Вычисления про-

водили с помощью программы StatPlus 6.0 (AnalystSoft Inc, Walnut, США).

Результаты

Клональные реаранжировки TCR обнаружены в ЛУ у 37 (92 %) из 40 пациентов. При этом клональность носила сомнительный характер в 14 % случаев (у 5 из 37 пациентов). В первичных образцах КМ Т-клеточная клональность выявлена у 26 из 28 исследованных, однако только в 23 % случаев (у 6 из 26 пациентов) реаранжировки TCR совпадали по длине с выявляемыми в ЛУ и других органах. Так, например, на рис. 2 представлены результаты количественного определения мутации $RHOA$ Gly17Val и Т-клеточной клональности по реаранжировкам генов $TCRG$ пациентки С., 1965 г. р. Т-клеточная моноклональность определяется во всех образцах с одинаковой длиной клональных продуктов (208 и 217 bp), а также во всех тканях выявляется значительное количество клеток с мутацией $RHOA$ Gly17Val. У 8 (30 %) из 26 пациентов реаранжировки совпадали только частично, т. е. в КМ имелись дополнительные пики. У 12 (46 %) из 26 пациентов клональные реаранжировки TCR в КМ полностью не совпадали по длине с таковыми, выявляемыми в ЛУ. Таким образом, для пациентов с АИТЛ

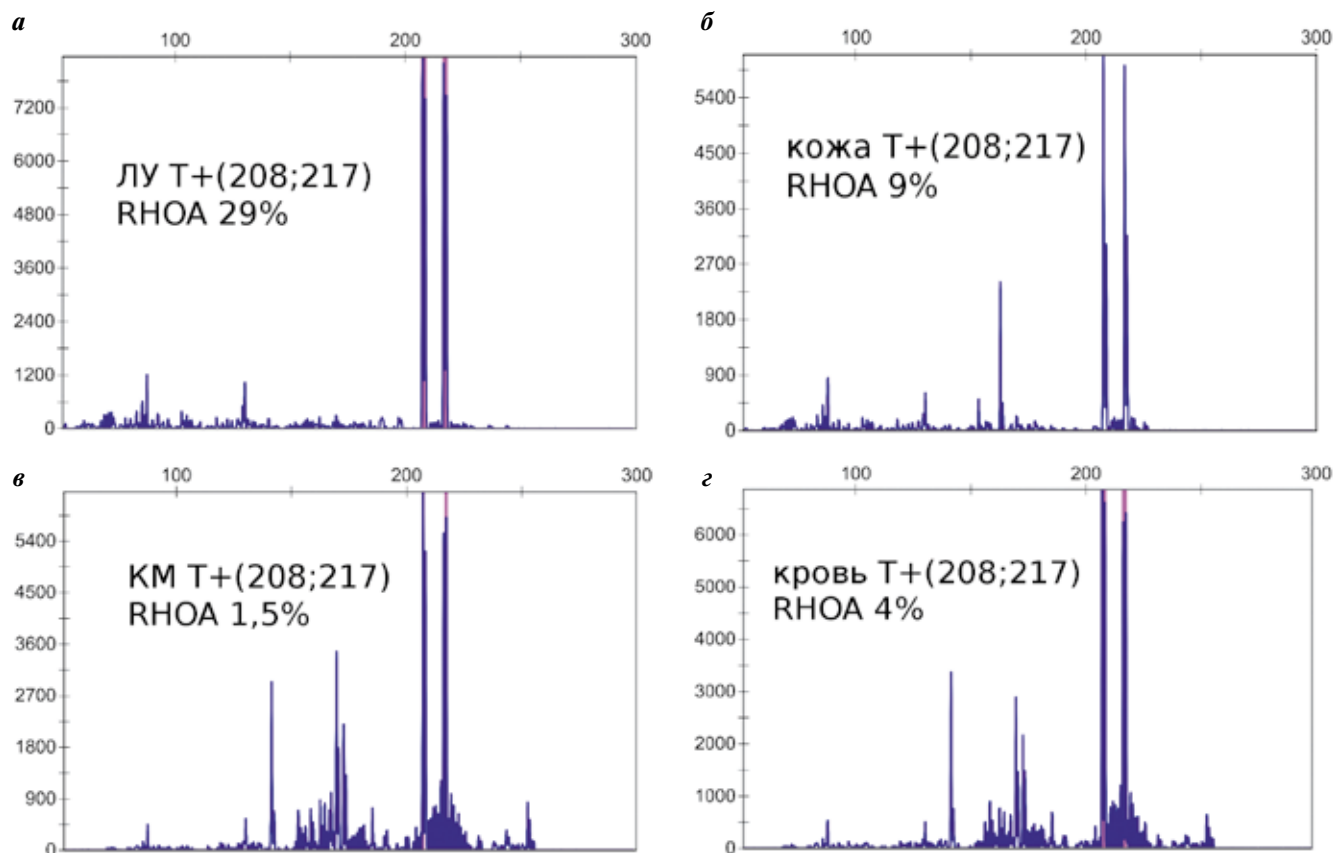


Рис. 2. Пациентка С., 1965 г. р. Результаты количественного определения мутации $RHOA$ Gly17Val и определения Т-клеточной клональности по реаранжировкам генов $TCRG$: а — в лимфатических узлах (ЛУ), б — коже, в — костном мозге (КМ), г — крови. (Пояснение дано в тексте.)
Fig. 2. Patient С., born in 1965. The results of $RHOA$ Gly17Val mutation quantitative detection and T-cell clonality by $TCRG$ genes rearrangement: а — in lymph nodes (LN), б — in skin, в — in bone marrow (BM), г — in blood. (The description is given in the text)

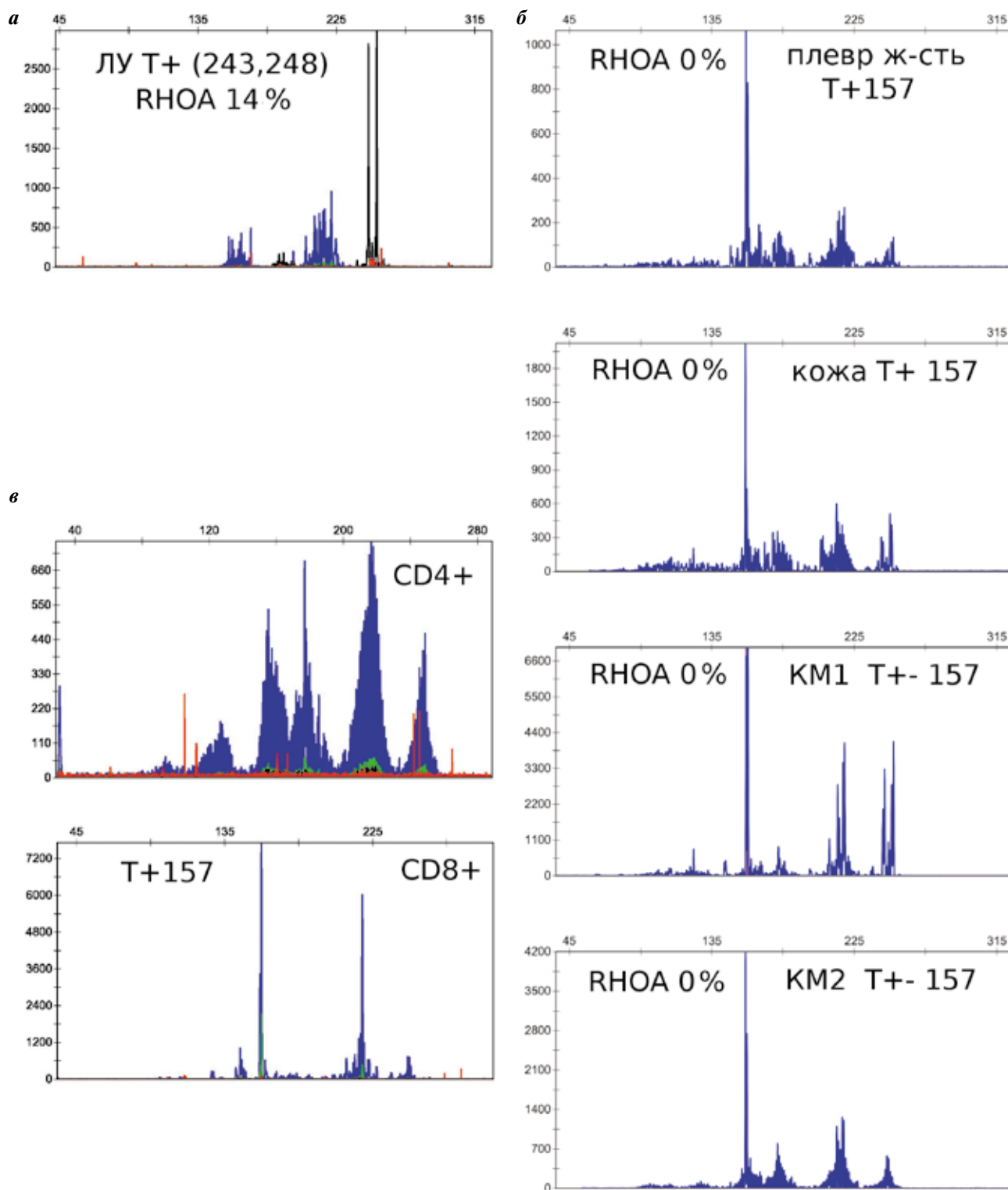


Рис. 3. Пациент А., 1951 г. р. Результаты количественного определения мутации RHOA Gly17Val и определения Т-клеточной клональности по генам TCRG: а – в лимфатических узлах (ЛУ); б – других тканях: плевральной жидкости, коже, костном мозге (КМ) (КМ1 – первичный образец, КМ2 – образец через 6 мес от начала лечения) – описание в тексте; в – результат селекции клеток периферической крови: CD4⁺-клетки демонстрируют поликлональную картину, тогда как моноклональный пик 157 bp обнаружен только в CD8⁺-лимфоцитах. По оси х отложена длина продуктов амплификации в парах оснований (base pares – bp), по оси у – интенсивность флуоресценции. Плевр ж-сть. – плевральная жидкость; Т + 157 (Т ± 157) – Т-клеточная моноклональность (сомнительная моноклональность) с длиной клонального продукта 157 bp

Fig. 3. Patient A., born in 1951. The results of RHOA Gly17Val mutation quantitative detection and T-cell clonality by TCRG genes rearrangement: a – in lymph nodes (LN); б – other tissues: pleural fluid, skin, bone marrow (BM) (BM1 – primary sample, BM2 – sample after 6 months of starting treatment) – the description is given in the text; в – Result of peripheral blood cells selection: CD4⁺ cells demonstrate a polyclonal pattern, while a monoclonal 157 bp peak is found in CD8⁺ lymphocytes. X-axis – length of PCR product, y-axis – fluorescence intensity. Плевр ж-сть. – pleural fluid; Т + 157 (Т ± 157) – T-cell monoclonality (doubtful monoclonality) with the length of the clonal product of 157 bp

характерной оказалась клональная вариабельность — несовпадение Т-клеточной клональности, выявляемой в ЛУ, с клональностью, выявляемой в КМ, коже, крови и т. д. Так, например, на рис. 3 представлены результаты количественного определения мутации *RHOA* Gly17Val и определения Т-клеточной клональности по генам *TCRG* пациента А., 1951 г. р. В ЛУ выявляются клональные продукты длиной 243 и 248 bp, которые не совпадают с клональным продуктом 157 bp в других тканях, при этом клетки с мутацией *RHOA* Gly17Val выявляются только в ЛУ.

У 24 (60 %) пациентов из 40 была выявлена мутация *RHOA* Gly17Val в ЛУ. Мы исследовали 51 образец различных тканей у пациентов с *RHOA*-положительным результатом в ЛУ. Процент *RHOA*-мутированных клеток сильно варьировал между образцами (рис. 4а). Количество клеток с мутацией *RHOA* было высоким в ЛУ (в среднем 26,7 % от общего количества клеток) (рис. 4б), тогда как в КМ клетки с мутацией *RHOA* либо не выявлялись ($n = 7$), либо выявлялись в малом количестве (в среднем 2 % от общего количества клеток, $n = 10$ (рис. 4в)). Интересно, что при выполнении нескольких биопсий у 1 пациента количество *RHOA*

Gly17Val положительных клеток и результаты определения Т-клеточной клональности могли значительно различаться, при этом во всех биоптатах выявлялась гистологическая и иммуногистохимическая картина, характерная для АИТЛ (рис. 5).

Сопоставление данных гистологии, Т-клеточной клональности, количества *RHOA*-мутированных клеток показало, что поражение КМ обнаруживается у большинства (76 %) пациентов (у 13 из 17) хотя бы одним из методов (см. таблицу).

Одновременно первоначальные образцы крови и КМ исследованы у 7 пациентов с мутацией *RHOA*, при этом количество клеток с мутацией *RHOA* было незначительно выше в крови, чем в КМ, у 5 из 7 пациентов. Первоначальные образцы кожи получены у 6 пациентов с мутацией *RHOA*: у 5 из них выявлены Т-клеточная клональность, совпадающая по длине продукта с ЛУ, и значительный процент клеток с мутацией *RHOA* (в среднем 25 %), у 4 из 5 пациентов при гистологическом исследовании подтверждено специфическое поражение кожи. У 1 пациента в биоптате кожи обнаружен клон Т-лимфоцитов, отличный от ЛУ, при этом мутация *RHOA* не выявлена, и при

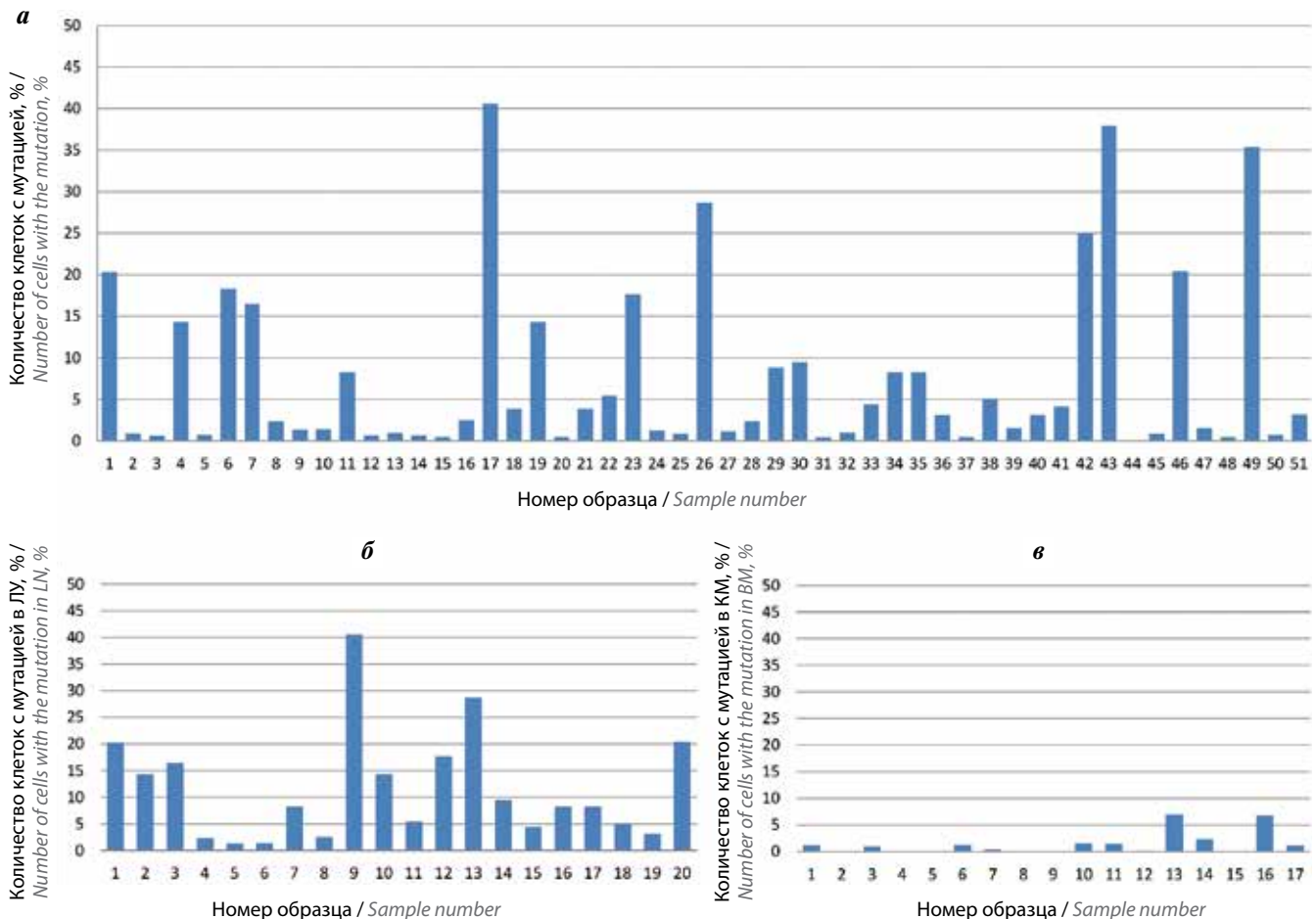


Рис. 4. Количественный результат определения мутации *RHOA* в первоначальных образцах у пациентов с ангиоиммунобластной Т-клеточной лимфомой: а — во всех образцах, $n = 51$; б — в лимфатических узлах (ЛУ), $n = 20$; в — в костном мозге (КМ), $n = 17$

Fig. 4. The quantitative result of *RHOA* mutations detection in initial samples of angioimmunoblastic T-cell lymphoma patients: а) in all samples, $n = 51$; б — in lymph nodes (LN), $n = 20$; в — in bone marrow (BM), $n = 17$

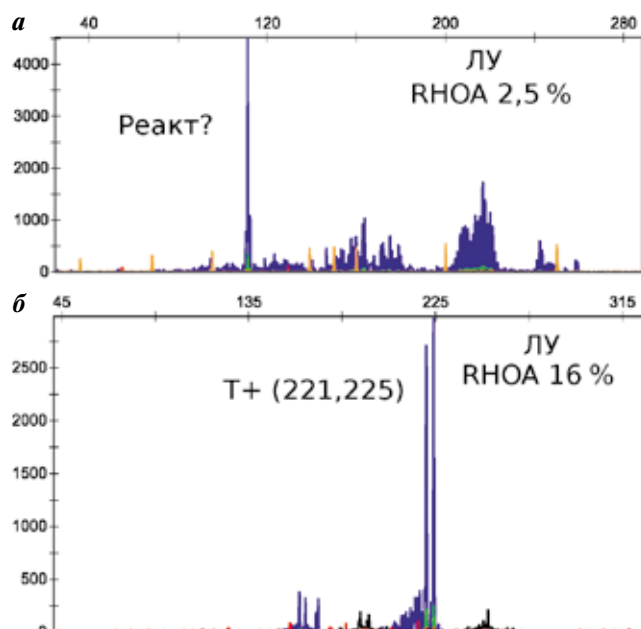


Рис. 5. Пациент В., 1939 г. р. Результаты биопсии шейного (а) и пахового (б) лимфатических узлов (ЛУ) с интервалом в 1 мес без проведения терапии: а – реактивная Т-клеточная клональность, выявленная в шейном ЛУ, при низком (2,5 %) количестве клеток с мутацией RHOA Gly17Val; б – наличие в паховом ЛУ 16 % клеток с мутацией RHOA Gly17Val и клональной реаранжировки TCRG. Реакт – реактивный клон

Fig. 5. Patient B. born in 1939. Results of 2 LN biopsies with monthly intervals: neck LN (a) and inguinal LN (б), with no therapy. In the neck LN, reactive T-cell clonality and a low percentage (2.5 %) of cells with a RHOA Gly17Val mutation was detected, in contrast to inguinal LN, which contains 16 % of cells with a RHOA Gly17Val mutation and a clonal TCRG rearrangement. Peakm – reactive clone

гистологическом исследовании опухолевого поражения кожи не обнаружено.

В целом мы зафиксировали хорошую корреляцию ($r = 0,8198$, $p < 0,00001$) в исследованных образцах ($n = 51$) между выраженностью Т-клеточной клональности (совпадающей с пиками в ЛУ) и количеством RHOA-мутированных клеток. Образцы кожи, КМ и крови с пиками Т-клеточной клональности, отличающимися от таковых, найденных в ЛУ, были также отрицательны на наличие клеток с мутацией RHOA. Таким образом, в данных образцах Т-клеточная клональность носила реактивный характер, возможно, связанный с аутоиммунными, противовирусными или противоопухолевыми реакциями организма. У 4 пациентов в ремиссии заболевания с персистирующей Т-клеточной клональностью были выделены CD4⁺- и CD8⁺-популяции Т-лимфоцитов методом магнитной селекции. У всех пациентов клональные продукты, полученные из КМ и крови, не совпадающие по длине пиков с таковыми, полученными из ЛУ, выявлялись в популяции CD8⁺-клеток, но не в популяции CD4⁺ (см. рис. 3в), что окончательно подтверждает их реактивный характер. У одной пациентки в популяции CD4⁺-клеток был обнаружен клональный продукт, соответствующий таковому, выявленному в ЛУ

Результаты определения Т-клеточной клональности, количественного определения мутации RHOA Gly17Val и гистологического исследования костного мозга (КМ) у пациентов с выявленной мутацией

The results of T-cell clonality assays, the quantitative detection of RHOA Gly17Val mutation and histological examination of the bone marrow (BM) in patients with the revealed mutation

Пациенты, n = 17 Patients, n = 17	Т-клеточная клональность T-cell clonality	Количество клеток с мутацией RHOA, % Number of cells with an RHOA mutation, %	Морфологическое поражение КМ по данным гистологии Morphological lesion of BM according to histology
1	—	1,2	0
2	—	0,0	1
3	+	1,0	1
4	—	0,0	1
5	—	0,0	0
6	+	1,3	1
7	+	0,8	1
8	—	0,0	0
9	—	0,0	0
10	+	1,6	1
11	+	1,5	0
12	—	0,8	1
13	+	5,3	1
14	—	0,0	0
15	+	0,0	0
16	+	6,8	1
17	+	1,1	1

Примечание. Знаки «—» и «+» обозначают соответственно отсутствие и наличие выявленных клональных пиков, совпадающих с ЛУ. Цифрами 0 и 1 дано невыявленное и выявленное поражение КМ соответственно.

Note. “—” no clonal peaks coinciding with LN, “+” clonal peaks, coinciding with LN, 0 – no BM involvement, 1 – with BM involvement.

в дебюте заболевания, что, вероятно, указывает на его опухолевую природу. У 14 из 20 пациентов реактивная Т-клеточная клональность в крови и КМ исследована в динамике, и обнаружено, что у 7 (50 %) из 14 пациентов клональные продукты персистировали на протяжении длительного времени и не исчезали при достижении ремиссии заболевания. Период наблюдения в среднем составил 12 мес (от 1 до 44 мес.).

По нашим данным, не было выявлено связи между персистенцией реактивных Т-клеточных клонов и активностью ВЭБ. Мы сравнили наличие или отсутствие реактивных клонов в крови и КМ с результатом

количественного определения ДНК ВЭБ в крови, КМ, биоптате ЛУ методом ПЦР. Были исследованы 20 пациентов (8 без реактивных Т-клеточных клонов и 12 с реактивными Т-клеточными клонами), при этом точно у половины пациентов и в той, и в другой группе инфекция ВЭБ была подтверждена методом ПЦР.

Количество клеток в КМ с мутацией *RHOA* Gly17Val исследовано в динамике у 5 пациентов, которые изначально имели *RHOA*-положительный результат по КМ. На фоне лечения все образцы КМ стали *RHOA*-негативными в период от 3 до 12 мес. По чувствительности детекции, которая составила 1 % опухолевых клеток от общей популяции, метод аллель-специфичной ПЦР с данными праймерами оказался сопоставим со стандартным методом определения Т-клональности (10 % клональных клеток от Т-лимфоцитов). В связи с низкой чувствительностью данную методику аллель-специфичной ПЦР нельзя использовать для оценки минимальной остаточной болезни.

Обсуждение

АИТЛ — это одна из самых сложных и запутанных в диагностическом плане лимфом. Из-за необычных клинических аутоиммунных проявлений, спонтанных ремиссий, гистологической картины и обильного реактивного компонента эту лимфому в течение долгого времени считали неопухолевым заболеванием. АИТЛ упоминалась под различными терминами: иммунобластная лимфаденопатия [22] и ангиоиммунобластная лимфаденопатия с диспротеинемией [23]. С появлением иммунофенотипирования и молекулярных методов стало очевидно, что ангиоиммунобластная лимфаденопатия — опухолевый, клональный процесс, что привело к появлению термина «ангиоиммунобластная Т-клеточная лимфома» (ВОЗ, 2001 г.). Тем не менее остаются многочисленные вопросы, связанные с АИТЛ: диагностические сложности, правильная интерпретация данных Т- и В-клеточной клональности (наличие нескольких Т-клеточных клонов у большинства пациентов, одновременное присутствие Т- и В-клональности), стадирование, характер поражения кожи у некоторых пациентов (реактивное или специфическое), выделение пациентов в различные прогностические группы, адекватный выбор терапии и длительности ее проведения [24, 25].

В нашей работе использован новый диагностический маркер АИТЛ — точечная мутация *RHOA* Gly17Val,

которая выявляется у 60 % пациентов и позволяет точно оценить количество опухолевых клеток в том или ином органе. Так, было показано, что процентное содержание опухолевых клеток в КМ при АИТЛ низкое (в среднем менее 2 % от общего количества клеток), но по совокупности данных молекулярного и гистологического исследований КМ поражен у большинства пациентов. Кроме того, было установлено, что при АИТЛ поражение кожи может носить как специфический, так и неспецифический характер. Благодаря этому маркеру стало возможным соотнести данные молекулярного определения клональности и количественной аллель-специфичной ПЦР. Убедительно показано, что несовпадение (полное у 46 % пациентов и частичное у 30 %) клональных пиков в ЛУ и других тканях можно отнести на счет присутствия в крови или КМ иммунных, реактивных Т-клеточных клонов, которые могут давать преимущественную амплификацию при малом количестве опухолевых Т-лимфоцитов. У данной когорты пациентов можно использовать для молекулярной диагностики только ЛУ, так как только в них имеется достаточное для диагностики количество опухолевых клеток. Интересно, что мы не нашли связи между активностью ВЭБ-инфекции и наличием данных реактивных Т-клеточных клонов. Для уточнения генеза реактивной Т-клеточной клональности при АИТЛ необходимо проведение дальнейших исследований. Поскольку АИТЛ богата аутоиммунными феноменами (васкулиты, полиартриты, аутоиммунные тиреоидиты и т. д.) [5], то данные Т-клеточные клоны, возможно, несут иммунный, аутоиммунный или ассоциированный с опухолью характер.

Заключение

Методом аллель-специфичной ПЦР точечная мутация *RHOA* Gly17Val выявляется у 60 % пациентов с АИТЛ, но только в пораженных ЛУ определяется достаточное для диагностики количество опухолевых Т-лимфоцитов. Количественное определение клеток с мутацией *RHOA* Gly17Val необходимо учитывать при стадировании заболевания и интерпретации результатов определения Т-клеточной клональности. Клональные продукты в КМ и крови, не совпадающие с ЛУ, выявляются у большинства пациентов с АИТЛ, относятся к CD8⁺-лимфоцитам, могут персистировать в течение длительного времени и несут реактивный характер.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests. Authors declare no conflict of interest.

Л И Т Е Р А Т У Р А / R E F E R E N C E S

1. Swerdlow S.H., Campo E., Harris N.L. et al. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon: IARC Press, 2008.
2. Vose J., Armitage J., Weisenburger D.; International T-Cell Lymphoma Project. International peripheral T-cell and natural killer / T-cell lymphoma study: pathology findings and clinical outcomes. *J Clin Oncol* 2008;26(25):4124–30. DOI: 10.1200/JCO.2008.16.4558. PMID: 18626005.
3. Weiss L.M., Jaffe E.S., Liu X.F. et al. Detection and localization of Epstein-Barr viral genomes in angioimmunoblastic lymphadenopathy and angioimmunoblastic lymphadenopathy-like lymphoma. *Blood* 1992;79(7):1789–95. PMID: 1373088.
4. Zettl A., Lee S.S., Rudiger T. et al. Epstein-Barr virus-associated B-cell lymphoproliferative disorders in angioimmunoblastic T-cell lymphoma and peripheral T-cell lymphoma, unspecified. *Am J Clin Pathol* 2002;117(3):368–79. DOI: 10.1309/6UTX-GVC0-12ND-JJEU. PMID: 11888076.
5. Dogan A., Attygalle A.D., Kyriakou C. Angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Br J Haematol* 2003;121(5):681–91. DOI: 10.1046/j.1365-2141.2003.04335.x. PMID: 12780782.
6. 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 D.N., Kovrigina A.M., Poddubnaya A.M. A new concept of of angioimmunoblastic T-cell lymphoma origin: from molecular biology to therapy. Bulletin SO RAMN = Bulletin of the SB RAMS 2011;31(2):14–9. (In Russ.)].
7. Brüggemann M., White H., Gaulard P. et al. Powerful strategy for polymerase chain reaction-based clonality assessment in T-cell malignancies Report of the BIOMED-2 Concerted Action BHM4 CT98–3936. *Leukemia* 2007;21(2):215–21. DOI: 10.1038/sj.leu.2404481. PMID: 17170730.
8. Lachenal F., Berger F., Ghesquière H. et al. 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. PMID: 17873758.
9. Никитин Е.А., Сидорова Ю.В., Рыжикова Н.В. и др. Определение Т-клеточной клональности по гамма-цепи Т-клеточного рецептора: окончательные данные. Терапевтический архив 2006;78(7):52–7. [Nikitin E.A., Sidorova Yu.V., Ryzhikova N.V. et al. Determination of T-cell clonality by T-cell receptor gamma chain: final data. Terapevticheskii arkhiv = Therapeutic archive 2006;78(7):52–7. (In Russ.)].
10. Сидорова Ю.В., Никулина Е.Е., Чернова Н.Г. и др. Определение клональности методом ПЦР при ангиоиммунобластной Т-клеточной лимфоме. Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика 2014;7(2):192–6. [Sidorova Yu.V., Nikulina E.E., Chernova N.G. et al. PCR-based clonality detection in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. Klinicheskaya onkogematologiya. Fundamentalnye issledovaniya i klinicheskaya praktika = Clinical Oncohematology. Basic Research and Clinical Practice 2014;7(2):192–6. (In Russ.)].
11. Zaki M.A., Wada N., Kohara M. et al. 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. PMID: 21362051.
12. Attygalle A., Al-Jehani R., Diss T.C. et al. Neoplastic T cells in angioimmunoblastic T-cell lymphoma express CD10. *Blood* 2002;99(2):627–33. DOI: 10.1182/blood.V99.2.627. PMID: 11781247.
13. Tan B.T., Warnke R.A., Arber D.A. 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. PMID: 16931587.
14. Sakata-Yanagimoto M., Enami T., Yoshida K. et al. Somatic RHOA mutation in angioimmunoblastic T cell lymphoma. *Nat Genet* 2014;46(2):171–5. DOI: 10.1038/ng.2872. PMID: 24413737.
15. Palomero T., Couronné L., Khiabani H. et al. Recurrent mutations in epigenetic regulators, RHOA and FYN kinase in peripheral T cell lymphomas. *Nat Genet* 2014;46(2):166–70. DOI: 10.1038/ng.2873. PMID: 24413734.
16. 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. PMID: 27693615.
17. Nakamoto-Matsubara R., Sakata-Yanagimoto M., Enami T. et al. 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.0109714. PMID: 25310466.
18. Saoudi A., Kassem S., Dejean A. et al. Rho-GTPases as key regulators of T-lymphocyte biology. *Small GTPases* 2014;5:e28208. DOI: 10.4161/sgtp.28208. PMID: 24825161.
19. Сидорова Ю.В., Сорокина Т.В., Бидерман Б.В. и др. Определение минимальной остаточной болезни у больных В-клеточным хроническим лимфолейкозом методом пациент-специфичной ПЦР. Клиническая лабораторная диагностика 2011;12:22–4. [Sidorova Yu.V., Sorokina T.V., Biderman B.V. et al. Minimal residual disease detection in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia by patient-specific PCR. Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = (Clinical laboratory diagnostics 2011;12:22–4. (In Russ.)].
20. Sidorova J.V., Biderman B.V., Nikulina E.E. et al. A simple and efficient method for DNA extraction from skin and paraffin-embedded tissues applicable to T-cell clonality assays. *Exp Dermatol* 2012;21(1):57–60. DOI: 10.1111/j.1600-0625.2011.01375.x. PMID: 21995276.
21. Dongen J.J., Langerak A.W., Brüggemann M. et al. 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. PMID: 14671650.
22. Lukes R.J., Tindle B.H. Immunoblastic lymphadenopathy. A hyperimmune entity resembling Hodgkin's disease. *N Engl J Med* 1975;292(1):1–8. DOI: 10.1056/NEJM197501022920101. PMID: 1078547.
23. Frizzera G., Moran E.M., Rappaport H. Angio-immunoblastic lymphadenopathy with dysproteinaemia. *Lancet* 1974;1(7866):1070–3. DOI: 10.1016/S0140-6736(74)90553-4. PMID: 4135245.
24. Сидорова Ю.В., Чернова Н.Г., Рыжикова Н.В. и др. Клональные реаранжировки и опухолевые клоны при периферической Т-клеточной лимфоме. Acta Naturae (русскоязычная версия) 2015;7(3):130–40. [Sidorova Yu.V., Chernova N.G., Ryzhikova N.V. et al. Clonal rearrangements and Malignant Clones in Peripheral T-cell Lymphoma. Acta Naturae (Russian version) 2015;7(3):130–40. (In Russ.)]. PMID: 26483968.
25. Чернова Н.Г., Виноградова Ю.Е., Сидорова Ю.В. и др. Длительные режимы цитостатической терапии ангиоиммунобластной Т-клеточной лимфомы. Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика 2014;7(1):57–62. [Chernova N.G., Vinogradova Yu.E., Sidorova Yu.V. et al. Prolonged chemotherapy for angioimmunoblastic T-cell lymphoma. Klinicheskaya onkogematologiya. Fundamentalnye issledovaniya i klinicheskaya praktika = Clinical Oncohematology. Basic Research and Clinical Practice 2014;7(1):57–62. (In Russ.)].

Статья поступила: 23.10.2017. Принята в печать: 14.12.2017.

Article received: 23.10.2017. Accepted for publication: 14.12.2017.