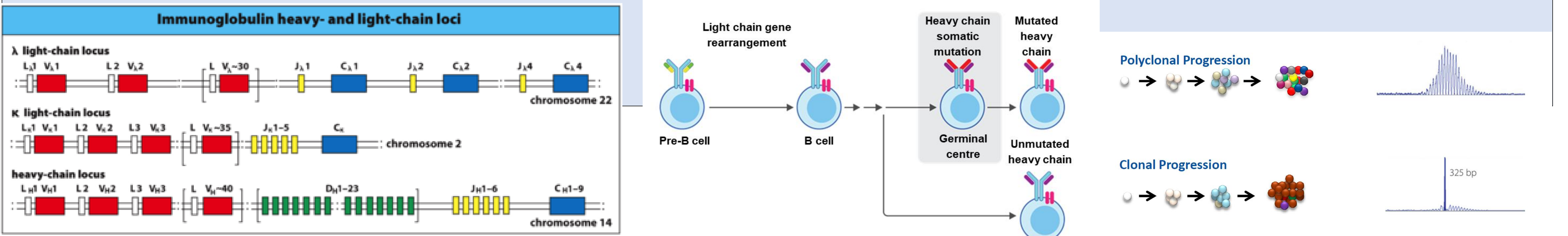


Lukačková R. (1), Majerová E. (1), Tomková E. (1), Tóthová K. (1), Tatayová L. (1), Šprincová A. (2), Kopcsayová D. (2)

1 - Oddelenie klinickej genetiky MEDIREX a.s., Bratislava, 2 - Oddelenie klinickej genetiky MEDIREX a.s., Košice

Úvod do problematiky:

Chronická lymfocytová leukémia (CLL) je charakterizovaná ako klonálna proliferácia a akumulácia zrelých CD5+ B-lymfocytov v periférnej krvi, kostnej dreni, lymfatických uzlinách a slezine. U CLL sú rekurentné chromozómové aberácie podstatné pre stratifikáciu pacientov do prognostických skupín. Na stanovenie prognózy sa využívajú aj rôzne molekulárne markery, ktoré umožňujú predikovať priebeh ochorenia. Nezávislým prognosticky významným markerom CLL je stanovenie mutačného statusu génu *IGHV*, ktorý kóduje variabilnú oblasť ťažkého reťazca imunoglobulínov. Podľa mutačného statusu *IGHV* sa pacienti delia do dvoch skupín. Pacienti, ktorých *IGHV* vykazuje v nukleotidovej sekvencii oproti zárodočnej línii rozdiel >2%, sú nositeľmi tzv. mutovaného génu *IGHV* (*M-IGHV*), ktorý sa spája s miernejším priebehom ochorenia a definuje potenciálne indolentnú formu CLL. Druhá skupina pacientov, kde bazový rozdiel oproti zárodočnej línii tvorí ≤ 2%, sú pacienti s nemutovaným stavom *IGHV* génu (*UM-IGHV*), ktorý koreluje s horšou prognózou a kratším prežívaním.



Metodika: *IGH* Somatic Hypermutation Assay

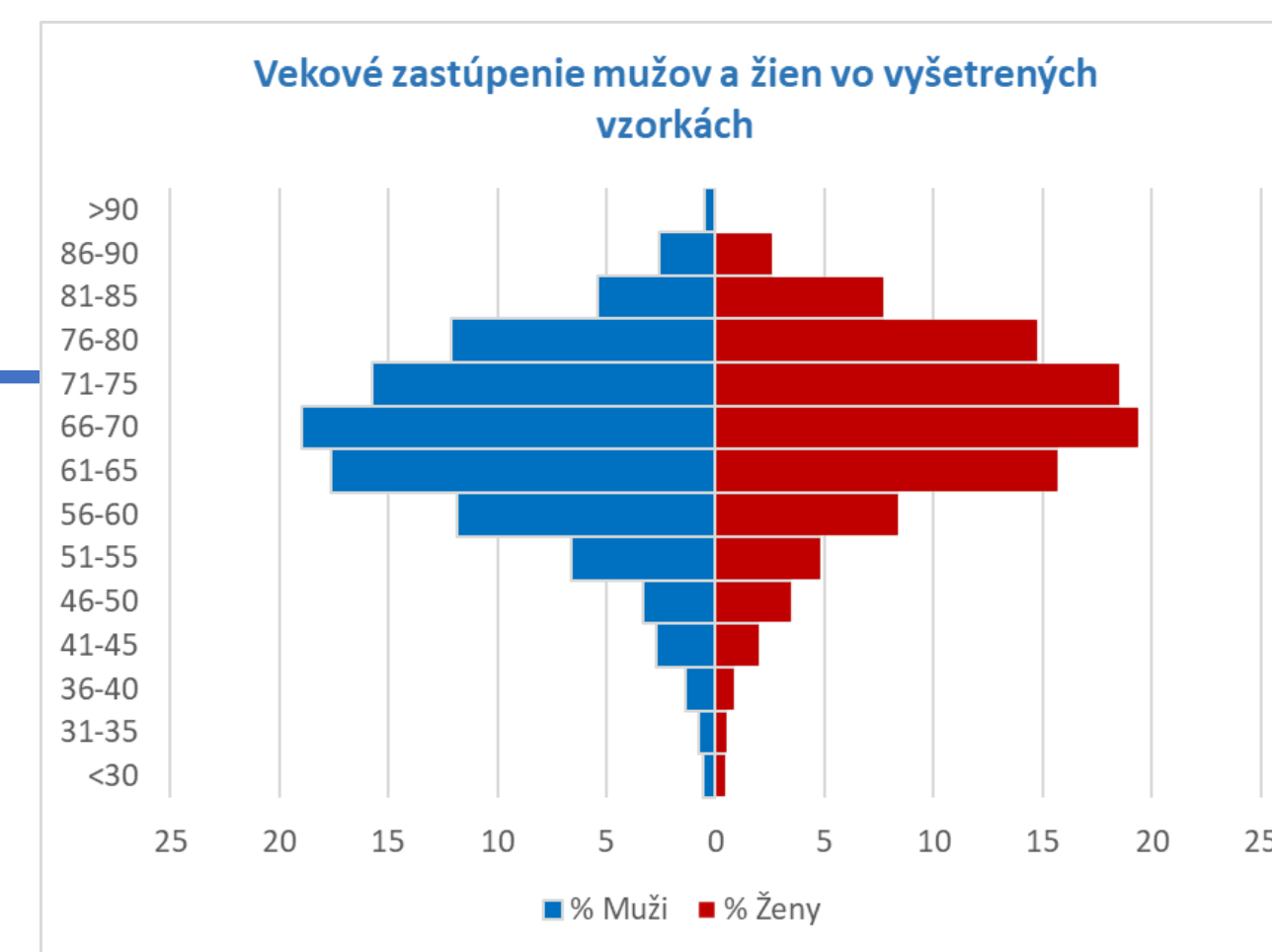
Princípom metódy je fragmentová analýza, pomocou ktorej sme identifikovali prestavby génu *IGH* (gén pre ťažký reťazec imunoglobulínu), a Sangerovo sekvenovanie, ktorým sme zisťovali mutačný status génu *IGHV*. Používali sme *IGH* Somatic Hypermutation Assay v2.0 – Gel Detection kit (Invivoscribe), *IGH* Somatic Hypermutation Assay v2.0 – ABI Fluorescence Detection kit (Invivoscribe) a BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (ThermoFisher Scientific). PCR produkty boli separované pomocou genetického analyzátoru ABI 3500 Series Genetic Analyzer (ThermoFisher Scientific). Fragmentovú analýzu sme vyhodnotili v softvéri GeneMapper Software 5 (ThermoFisher Scientific), na hodnotenie sekvenovania sme použili softvér Sequencing Analysis Software v6.0 (ThermoFisher Scientific). Po analýze sme sekvencie vzoriek porovnali so sekvenciami *IGHV* génu zárodočnej línie B-lymfocytov pomocou databázy IMGT/V-QUEST.

Výsledky: ŠTATISTIKA *IGHV* 01/2018 – 07/2024 (2657 analýz)

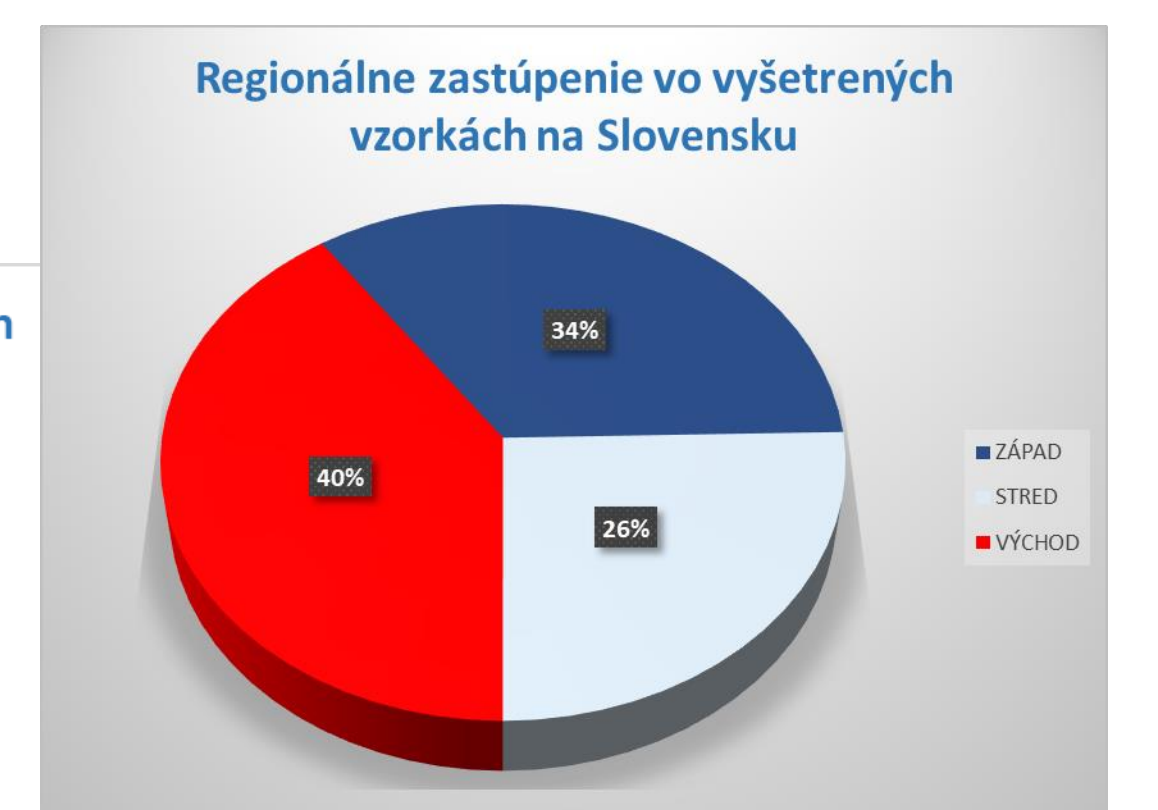
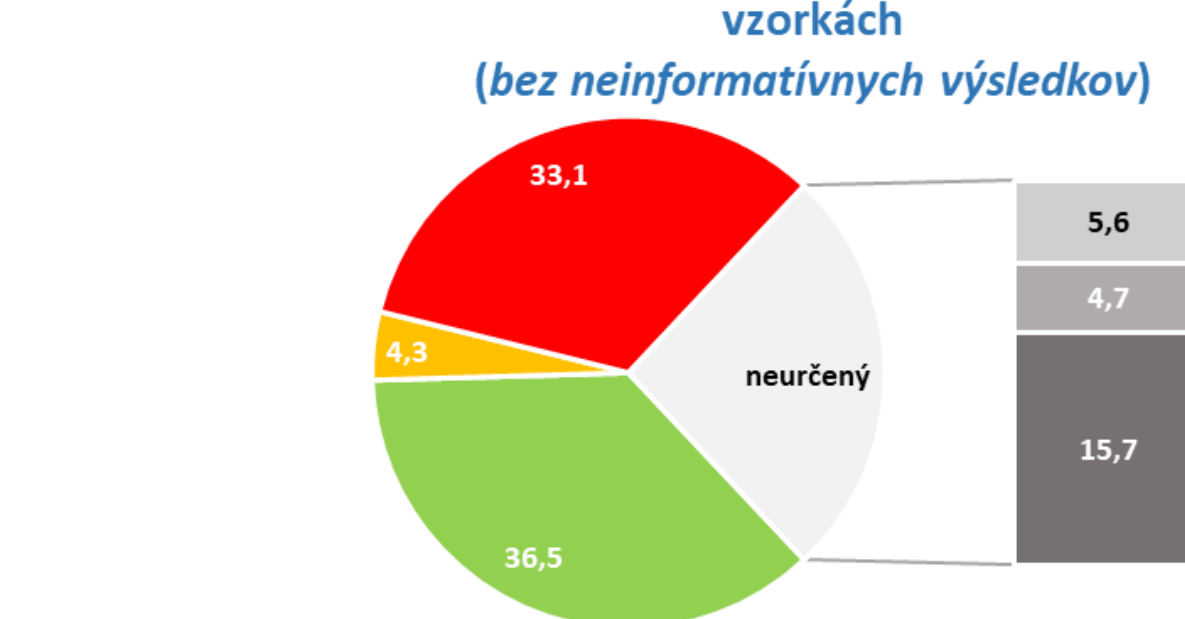
MUTAČNÝ STATUS *IGHV* - klonalita vzoriek

Mutačný status <i>IGHV</i>		Počet vzoriek	%	% Spolu
určený	mutovaný	951	36,5	73,9
	hranične mutovaný	112	4,3	
	nemutovaný	863	33,1	
neurčený	1 klon	145	5,6	26,1
	2 klony	123	4,7	
	3 klony	4	0,2	
	4 klony	1	0,0	
	polyklonalita	408	15,7	
Spolu		2607	100,0	

* neinformatívne výsledky (50 pacientov= 1,9%)



Mutačný status *IGHV* klonálnej populácie CD5+ B-lymfocytov vo vyšetrených vzorkách (bez neinformatívnych výsledkov)



Kazuistika pacienta:

- leukocytóza
- lymfocytóza v pomalej progresii, veľmi drobná LAP na krku a v ingv. v miernej progresii -splenomegália dla ct 169 mm 3/2023

Molekulová analýza

PB - TP53 mutačný status negat.
PB-*IGHV* 7-4-1, % = 88.54, produktívny, mutovaný

MA komentár

IGHV: Molekulovou analýzou sme detegovali klonovú populáciu B lymfocytov s produktívnym *IGHV*7-4-1 mutovaným rearrangementom, tj. menej ako 98% homológiou porovnaním sekvencie s germinálnou sekvenciou.

07.09.2023 Leukocyty ...177.7 (*10⁹/L) [4.0 - 10.0] ; Neutrofilý % ...2.7 (%) [40.0 - 64.0] ; Lymfocyty % ...96.1 (%) [19.0 - 48.0] ; Monocyty % ...0.9 (%) [3.4 - 9.0] ; Eozinofily % ...0.20 (%) [0.00 - 7.00] ; Bazofily % ...0.1 (%) [0.0 - 1.5] ; Neutrofilý abs. ...4.80 (*10⁹/L) [1.90 - 8.00] ; Lymfocyty abs. ...170.77 (*10⁹/L) [0.90 - 5.20] ; Monocyty abs. ...1.50 (*10⁹/L) [0.16 - 1.00] ; Eozinofily abs. ...0.40 (*10⁹/L) [0.00 - 0.80] ; Bazofily abs. ...0.10 (*10⁹/L) [0.00 - 0.20] ; Erytrocyty ...3.74 (*10¹²/L) [4.70 - 6.10] ; Hemoglobín ...11.7 (g/dL) [14.0 - 18.0] ; Hematokrit ...35.4 (%) [42.0 - 52.0] ; Stredný objem Ery ...94.7 (fL) [80.0 - 94.0] ; Farbivo erytrocyt ...31.3 (pg) [27.0 - 31.0] ; Stred.fareb.konc. ...33.0 (g/dL) [33.0 - 37.0] ; Distr.šírka Ery ...15.5 (%) [11.5 - 14.5] ; Distr.šírka Ery-SD ...49.90 (fL) [-] ; Nízka hustota HGB ...6.60 (%) [-] ; Fakt.mikroc.anémie ...11.10 [-] ; Trombocyty ...121 (*10⁹/L) [140 - 400] ; Trombokrit ...0.08 (%) [0.12 - 0.36] ; Stredný objem trombocytov ...6.9 (fL) [7.2 - 11.1] ; Distrib.šírka Tr ...17.4 [25.0 - 65.0] ; Makrocytóza ...Makrocytóza + [-] ; Malé trombocyty ...Malé trombocyty [-] ;

Odber: 07.09.2023 07:00, S - Beta-2-mikroglobulín ...3533.0 (ug/l) [800.0 - 3000.0] ; S - Glukóza ...6.0 (mmol/l) [4.1 - 5.9] ; S - Kreatinín ...75.0 (umol/l) [64.0 - 104.0] ; S - Kyselina močová ...405.0 (umol/l) [208.3 - 428.4] ; S - Celkové bielkoviny ...70.0 (g/l) [66.0 - 83.0] ; S - Albumín ...46.0 (g/l) [35.0 - 52.0] ; S - Bilirubín celkový ...14.7 (umol/l) [0.0 - 21.0] ; S - AST ...1.42 (ukat/l) [0.00 - 0.85] ; S - ALT ...0.38 (ukat/l) [0.00 - 0.85] ; S - GMT ...0.81 (ukat/l) [0.00 - 0.92] ; S - ALP ...1.87 (ukat/l) [0.71 - 1.92] ; S - LD ...4.47 (ukat/l) [0.00 - 4.13] ; S - IgG ...8.33 (g/l) [7.00 - 16.00] ; S - IgA ...1.26 (g/l) [0.70 - 4.00] ; S - IgM ...0.15 (g/l) [0.40 - 2.30] ; S - CRP ...0.86 (mg/l) [0.00 - 5.00] ; CC - eGFR-CKD-EPI-výpočet ...1.43 (ml/s/1,73m2) [-] ;

ZÁVER:

- ✓ *IGHV* mutačný status nezávislý prognostický faktor
- ✓ Zlatý štandard pre stanovenie prognózy (aj so stanovením TP53 mutačného statusu)
- ✓ Genetické vyšetrenia (komplex všetkých FISH a molekulových) je esenciálne pre stanovenie dg. a iniciáciu terapie, ale hlavne na predikciu prognózy, stanovenie tumorovej nálože (PK, KD) a monitorovanie dynamiky ochorenia
- ✓ Výsledkom diagnostiky a správnej interpretácie prognostických faktorov je včasná stratifikácia CLL pacientov pre voľbu vhodného terapeutického manažmentu podľa rizika.