

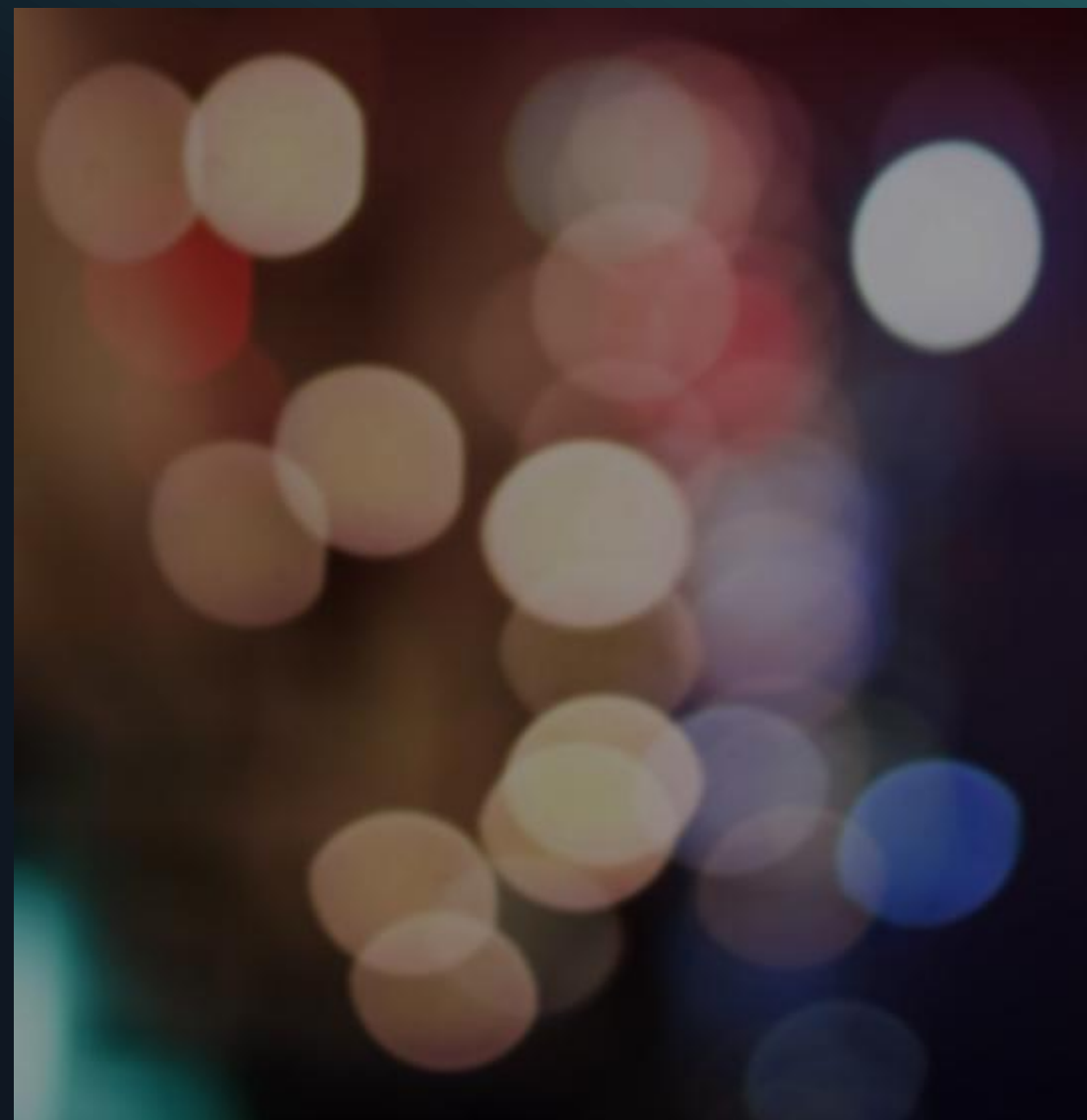


FISH DIJAGNOSTIKA U KRONIČNOJ LIMFOCITNOJ LEUKEMIJI (KLL)

Doc.dr.sc. Jasmina Rajc, dr. med
Zavod za patologiju i sudsku medicinu
KBC Osijek

Kronična limfocita leukemija-KLL

- Leukemija odrasle dobi- limfom malih limfocita ako se nađe u limfnim čvorovima
- Monoklonalna proliferacija malih do srednje velikih limfocita koji su imunohistokemijski pozitivni na CD 20, pax 5, CD23
- Za dijagnozu je potrebno najmanje 5×10^9 /L monoklonalnih limfocita u perifernoj krvi u razdoblju od najmanje tri mjeseca



Biološka i klinička obilježja KLL-a

Klinička slika uključuje limfocitozu, limfadenopatiju, splenomegaliju, citopenije i imunodeficijenciju. Međutim, tijekom bolesti izrazito varira.

Biološki čimbenici koji određuju tijek bolesti:

- IGHV mutacijski status
- TP53 status
- citogenetske aberacije (FISH)
- ekspresiju ZAP-70 i CD38
- epigenetske promjene

Osnove FISH metode

- ❑ FISH metoda razvila se 1980-tih godina
- ❑ Najčešće se koristi u dijagnostici limfoma, leukemija, HER2 amplifikacija, potvrda nalaza klasične karitotipizacije

Vrste proba



- ❑ Lokus specifične probe
- ❑ Centromerne probe
- ❑ Break apart probe
- ❑ Fuzijske probe

Kontrola kvalitete i interpretacija



- ❑ Adekvatna kontrola pozadine
- ❑ Određivanje cut off vrijednosti
- ❑ Validirani protokoli
- ❑ Najmanje 200 stanica za analizu
- ❑ Iskustvo citogenetičara

Prednosti



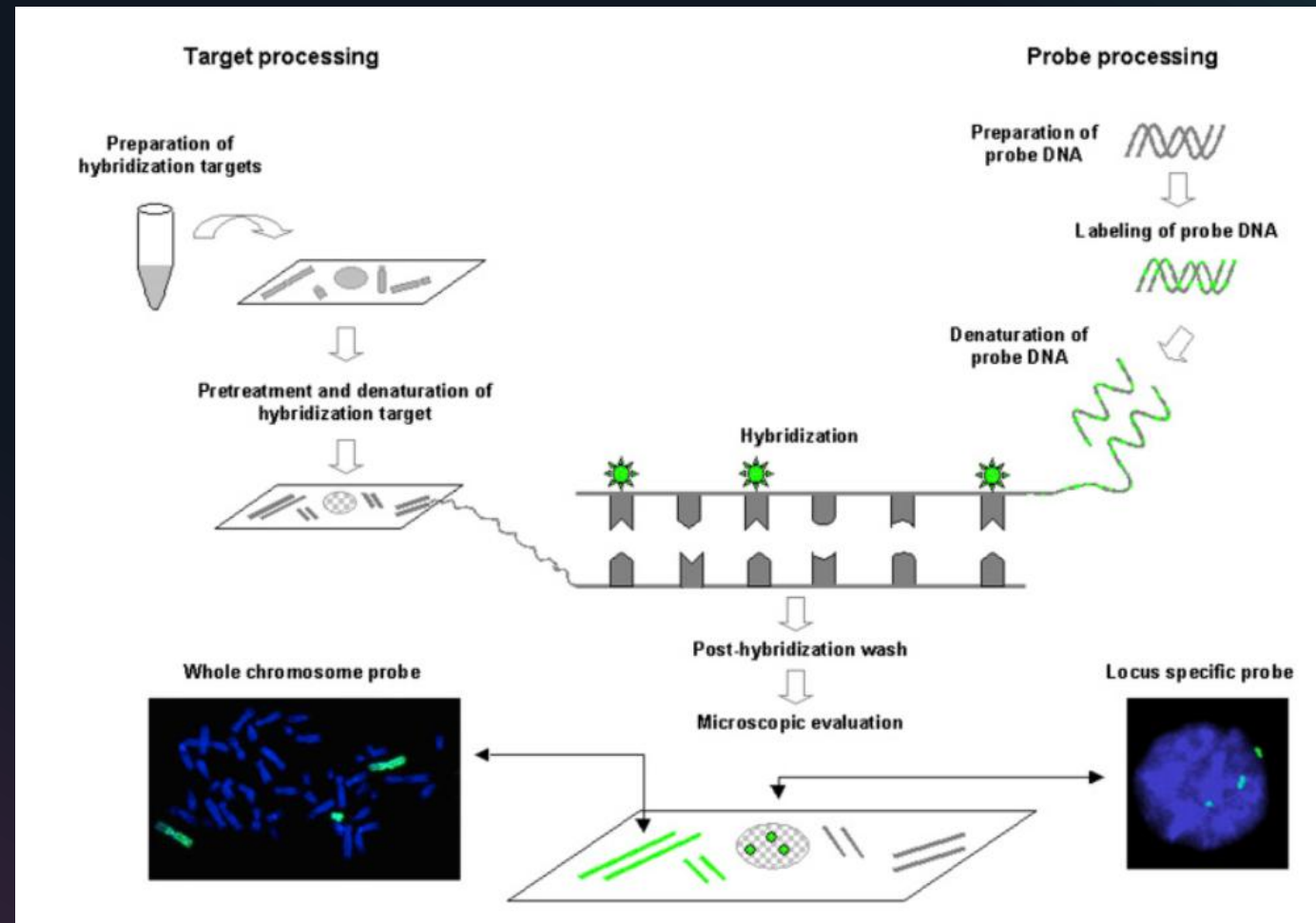
- ❑ Visoka osjetljivost i specifičnost
- ❑ Ne zahtjeva kultivaciju stanica
- ❑ Brza i pouzdana detekcija
- ❑ Različite vrste uzoraka
- ❑ Standardizirana interpretacija rezultata

Ograničenja



- ❑ Zahtjeva prethodno definirane probe
- ❑ Ograničen broj boja signala
- ❑ Ne otkriva nove ili neočekivane aberacije
- ❑ Cijena
- ❑ Tehnički zahtjevna izvedba

Način izvođenja analize



Oprema za FISH

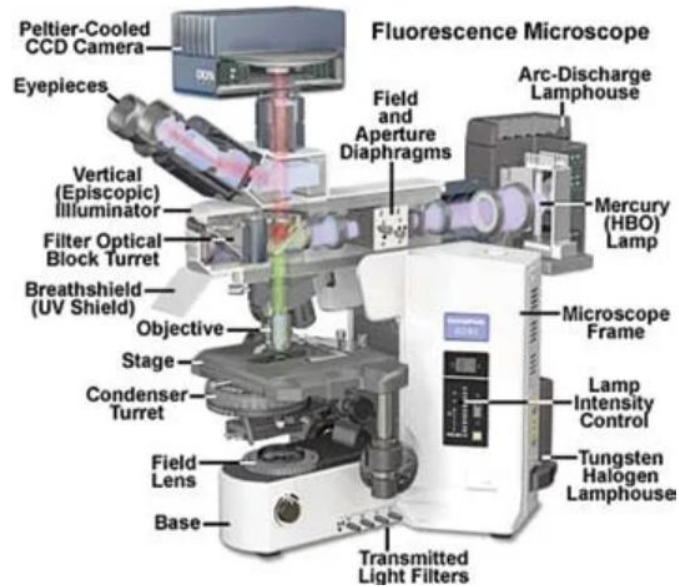
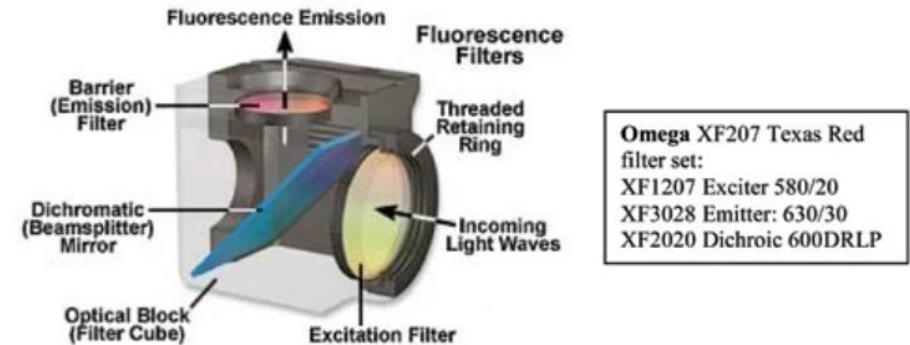


Figure 1.

The primary components in the episcopic (reflected illumination) pathway consist of the light source (a Mercury arc lamp in this example), a series of lenses that work to focus the light, and compensate for optical deviations as the beam moves in the direction of the filters.

Figure 2 shows an exploded image of the filter cube. The excitation filter is shown in yellow, and the emission filter is detailed in red to exhibit the standard band-pass Texas Red filter set.



Najčešće kromosomske aberacije u KLL-u

Aberacija	Učestalost	Kliničko značenje
del(13q14)	50–60%	Najpovoljnija prognoza
trisomija 12	15–20%	Intermedijarna prognoza, atipičan fenotip
del(11q22–23) (ATM)	10–20%	Lošija prognoza, masivna limfadenopatija
del(17p13) (TP53)	5–10%	Najlošija prognoza, refraktornost na kemoterapiju

❑ Kompleksni kariotip-kada se dokažu tri ili više kromosomskih abnormalnosti

Prognostička vrijednost FISH metode

FISH nalazi integrirani su u međunarodne prognostičke sustave, uključujući:

- Döhnerov citogenetski model
- CLL IPI (International Prognostic Index)
- iwCLL smjernice

Uloga FISH metode u dijagnostici KLL-a

- Prema suvremenim smjernicama, dijagnostika KLL a uključuje:
 - kompletnu krvnu sliku
 - razmaz periferne krvi
 - imunofenotipizaciju (CD5+, CD19+, CD23+)
 - molekularne testove (IGHV, TP53)
 - FISH analizu za ključne aberacije
- FISH metoda se ne koristi za postavljanje dijagnoze već za prognostičku stratifikaciju i terapijsko planiranje

Hijerarhija rizika prema Döhneru

- Najbolja prognoza: del(13q) kao jedina aberacija
- Intermedijarna prognoza: normalan kariotip, trisomija 12
- Loša prognoza: del(11q)
- Najlošija prognoza: del(17p)

- Ova stratifikacija izravno utječe na terapijske odluke.



FISH u terapiji KLL-a

Kod asimptomatskih bolesnika (Binet A–B, Rai 0–II) ne primjenjuje se terapija bez obzira na nalaz FISH-a

- Bolesnici s indikacijom za terapiju
 - Bez del(17p)/TP53 mutacije
mlađi, dobrog općeg stanja: FCR ili BR
stariji ili komorbidni: klorambucil + anti CD20 (obinutuzumab/rituksimab)
 - S del(17p) ili TP53 mutacijom
ibrutinib (BTK inhibitor)
acalabrutinib
idelalisib + rituksimab
venetoklaks (BCL 2 inhibitor)
- Kemoterapija se ne preporučuje zbog izrazite refraktornosti.



FISH u praćenju bolesti

Klonska evolucija može uključivati pojavu novih aberacija, osobito del(17p).

- FISH se rutinski ne ponavlja kod stabilnih bolesnika, ali se preporučuje:
 - prije svake nove linije terapije
 - kod kliničke progresije
 - kod sumnje na klonsku evoluciju

Kombinacia FISH-a sa drugim metodama

Iako je FISH iznimno korisna metoda, ona ima svoja ograničenja. Ne može otkriti mutacije gena, što zahtijeva dopunu metodama poput NGS-a

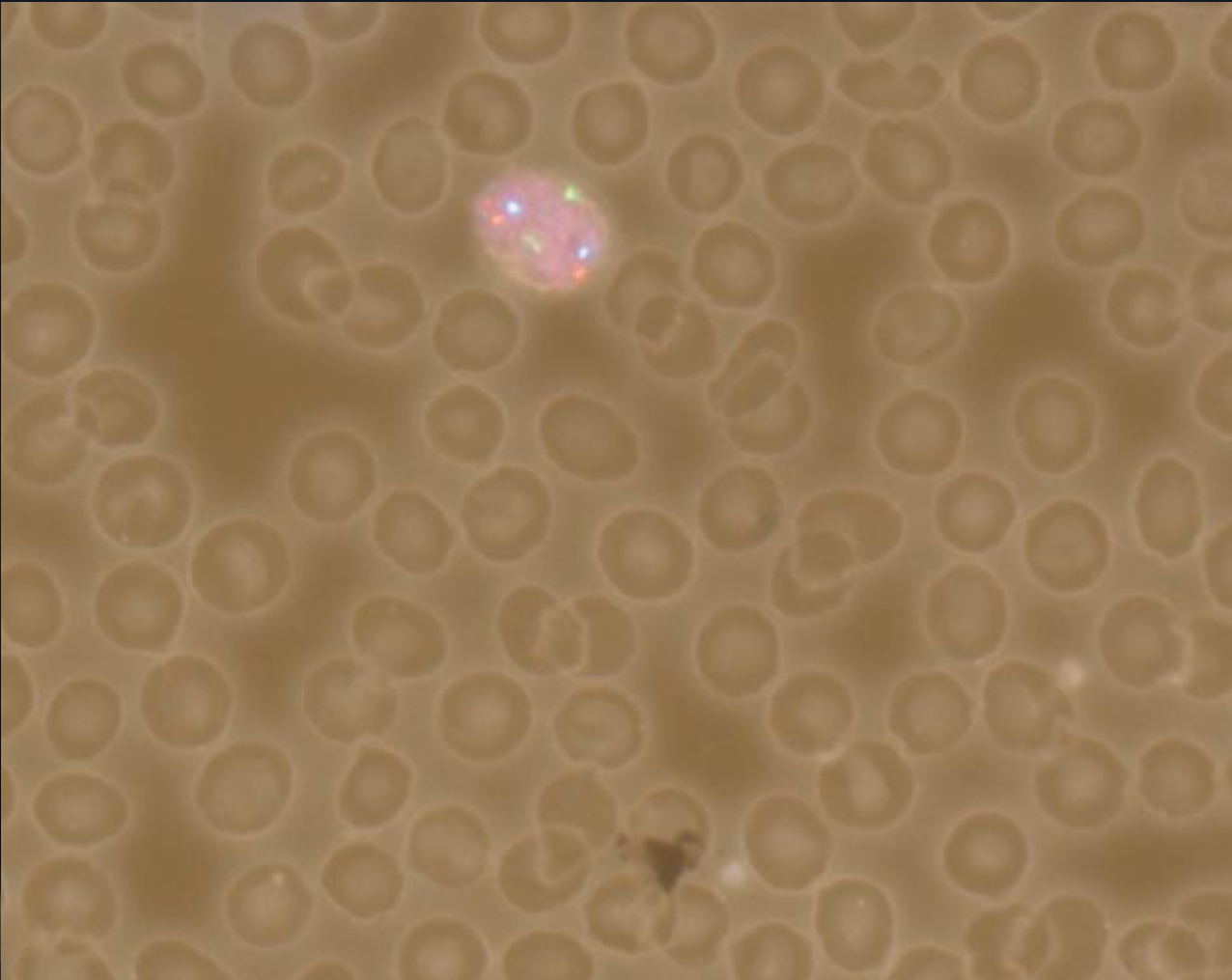
- FISH analiza najčešće se kombinira sa:
 - IGHV mutacijskim statusom
 - TP53 sekvenciranjem (NGS)
 - analizom NOTCH1, SF3B1 i BIRC3 mutacija



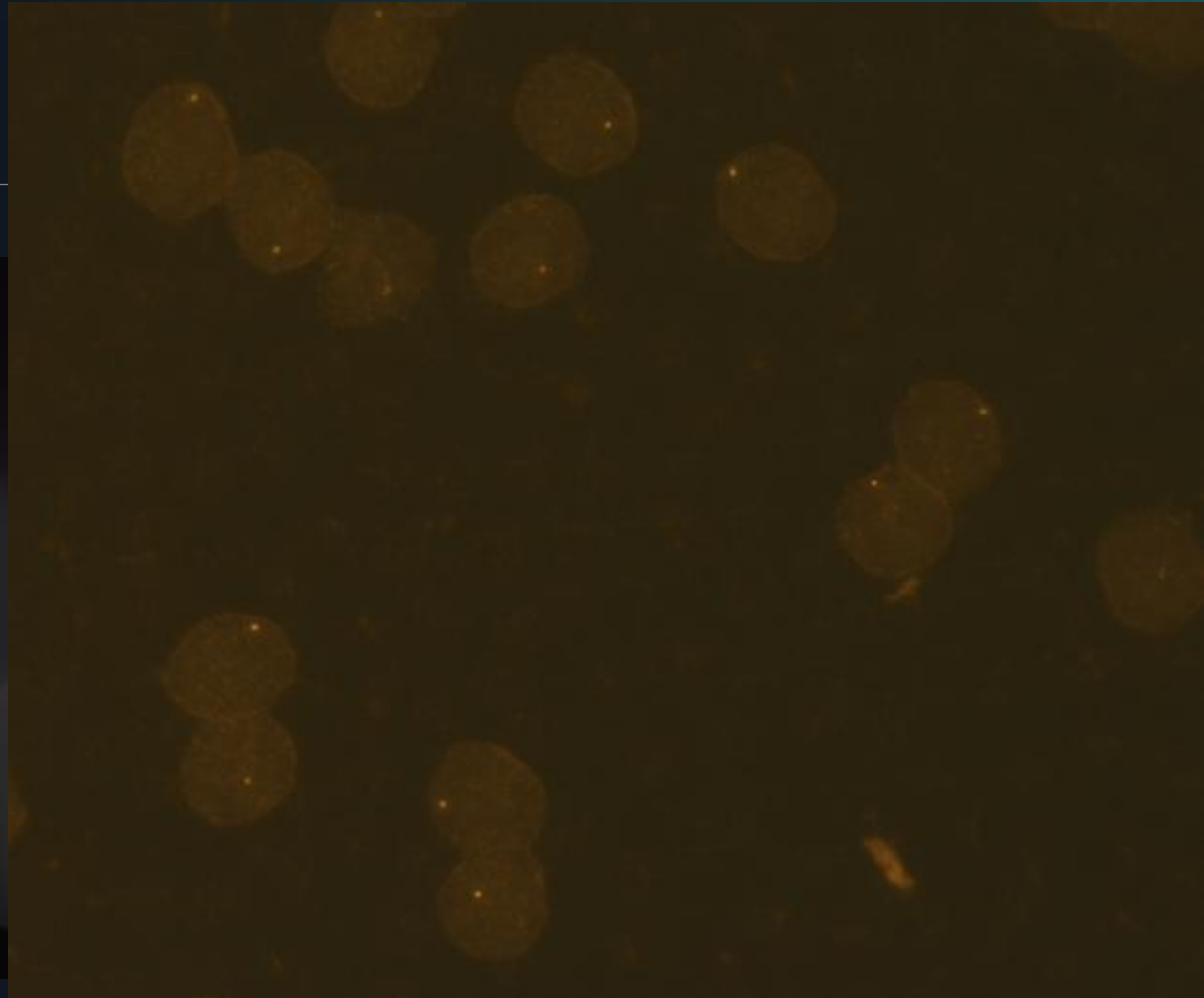
ZAKLJUČAK

FISH metoda ostaje nezamjenjiva metoda u dijagnostici i praćenju KLL-a

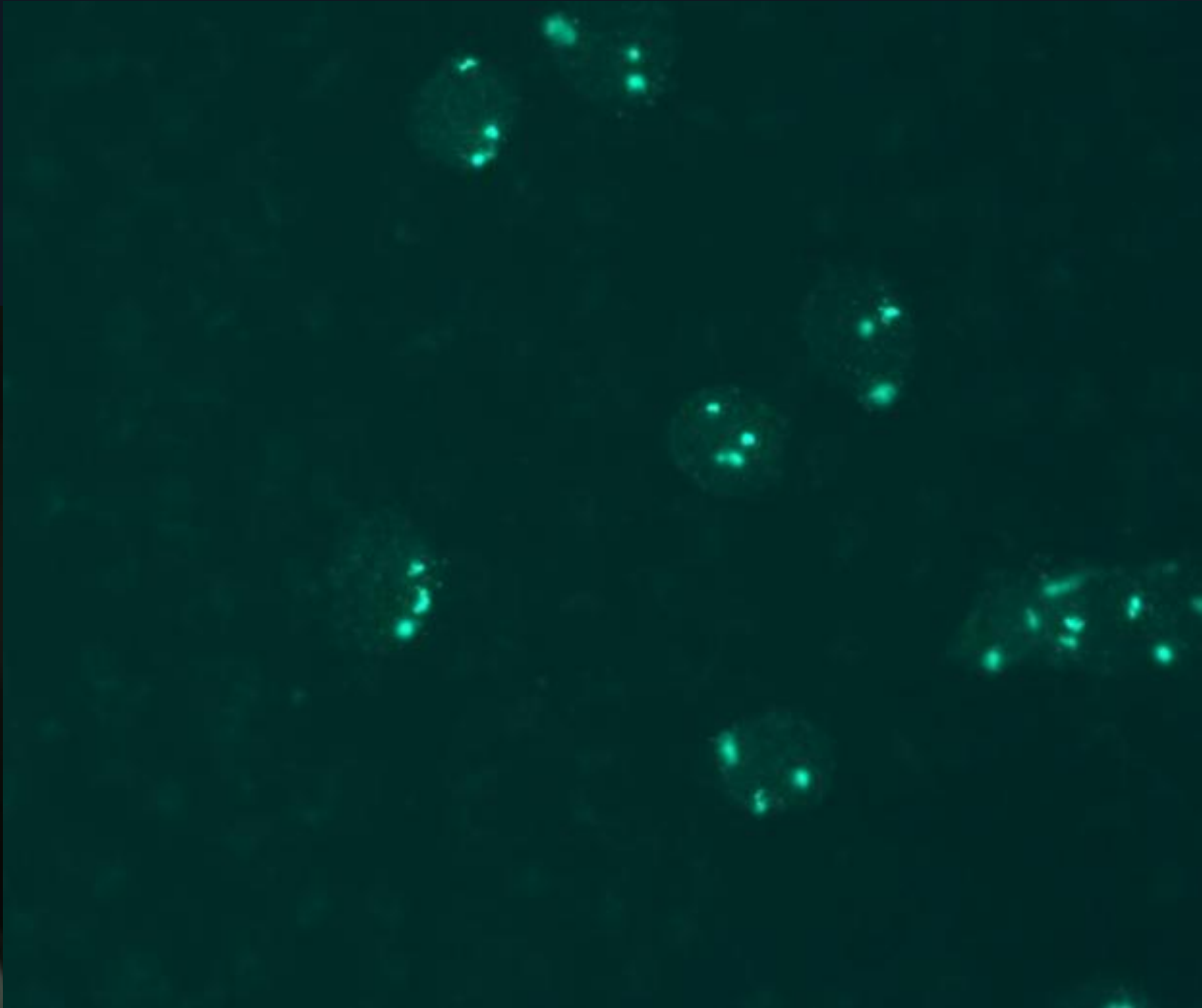
- FISH dijagnostika predstavlja temeljni alat u procjeni bolesnika s kroničnom limfocitnom leukemijom. Omogućuje detekciju najvažnijih citogenetskih aberacija koje određuju prognozu, predviđaju odgovor na terapiju i usmjeravaju kliničke odluke. Usporedba različitih aberacija jasno pokazuje da KLL nije jedinstvena bolest, već skupina biološki različitih entiteta.
- Najvažniji doprinos FISH metode je identifikacija visokorizičnih bolesnika, osobito onih s del(17p) i TP53 disfunkcijom, kod kojih standardna kemoterapija nije učinkovita. U takvim slučajevima FISH izravno određuje terapijski pristup, usmjeravajući liječnike prema ciljanim lijekovima koji značajno poboljšavaju ishode.



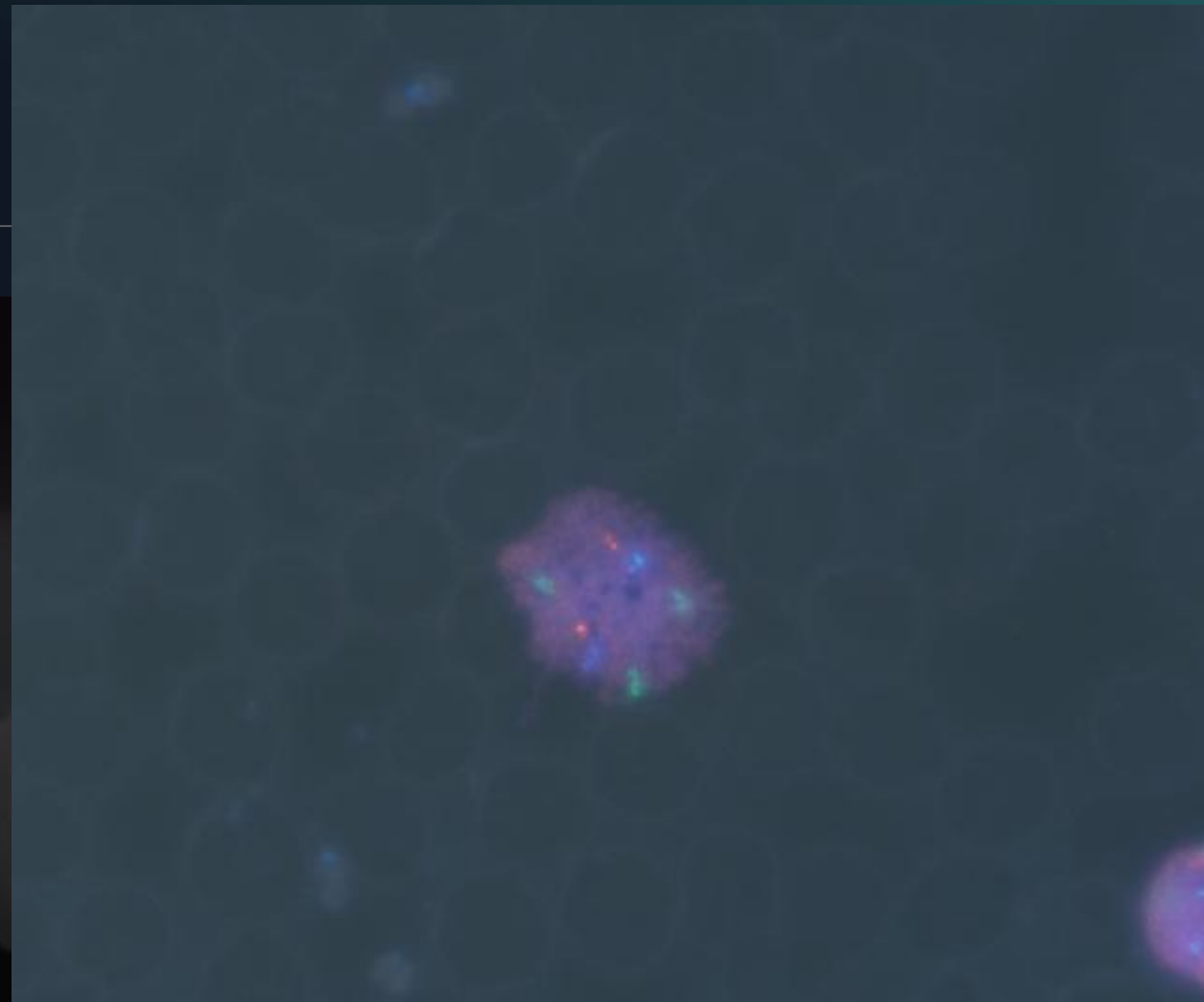
Normalan kariotip- višestruki filter (RED/GREEN/AQUA)- vidljiva su dva crvena, dva zelena i dva plava signala (2R, 2G, 2A)- plavi signal (Aqua) služi kao kontrola reakcija (13q34)



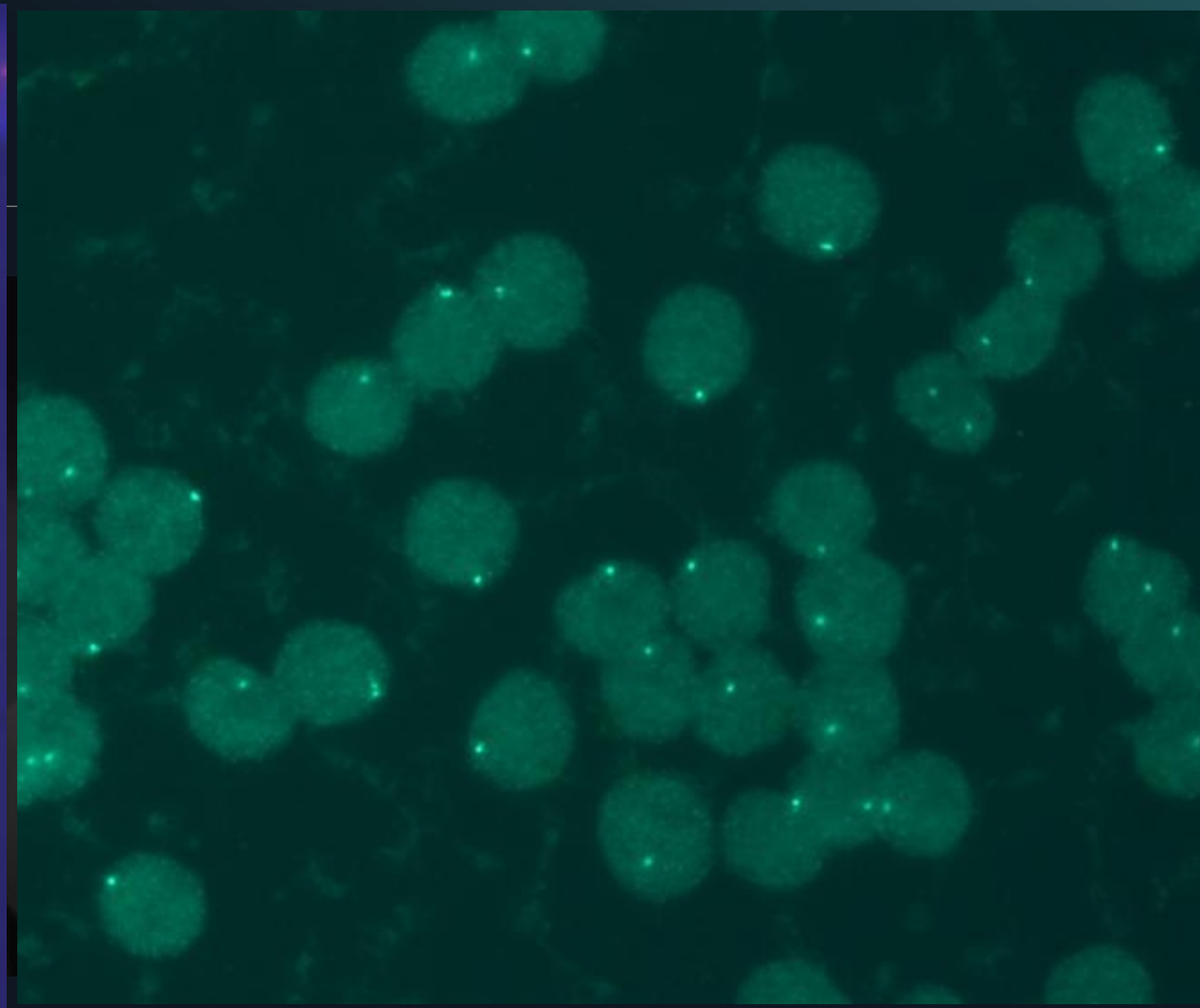
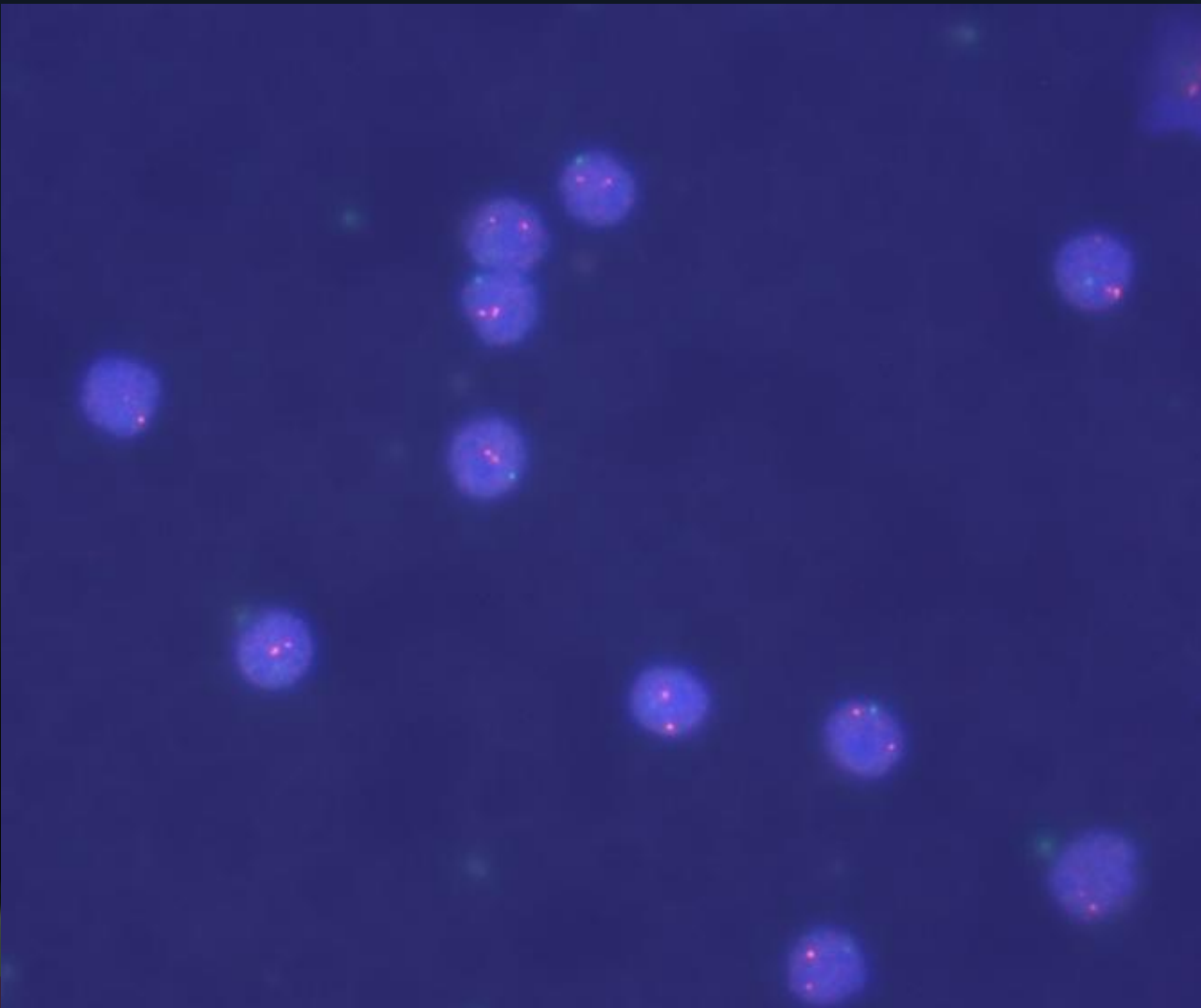
del(13q14), crveni filter; nalazi se samo jedan crveni signal (1R)



Trisomija 12, zeleni filter; vide se tri zelena signala (3G)



Trisomija 12, višestruki filter (RED/GREEN/AQUA), nalaze se dva crvena, tri zelena i dva plava signala (2R, 3G, 2A)



del(11q22-23) (ATM), višestruki filter (DAPI/RED/GREEN)-
dva crvena i jedan zeleni signal (2R, 1G)



del(11q22-23), (ATM), zeleni filter; jedan zeleni signal (1G)

HVALA!

