

Л.М. Склярєнко¹
 А.С. Поліщук¹
 Т.С. Іванівська¹
 В.Н. Зінченко²
 О.О. Підгорна²
 О.О. Фільченков¹
 Д.Ф. Глузман¹
 Т.В. Каднікова³
 О.М. Вакульчук³

¹Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України

²Київська міська клінічна лікарня № 9

³Національний інститут раку, Київ, Україна

Ключові слова: антиген, імунофенотип, цитохімія, волосковоклітинний лейкоз, лімфома маргінальної зони селезінки, лімфома червоної пульпи селезінки.

ІМУНОЦИТОХІМІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА ВОРСИНЧАСТИХ ЛІМФОЦИТІВ ПРИ В-КЛІТИННИХ ЛІМФОПРОЛІФЕРАТИВНИХ ЗАХВОРЮВАННЯХ

Мета: дослідження цитологічних та імуноцитохімічних ознак лімфоцитів із ворсинчастими відростками при певних формах В-клітинних лімфопроліферативних захворювань. **Об'єкт і методи:** використано цитоморфологічні, цитохімічні, імуноцитохімічні методи дослідження. Діагноз «волосковоклітинний лейкоз» (ВКЛ) у хворих зі спленомегалією, дисемінацією ворсинчастих клітин у кістковому мозку та наявністю їх у периферичній крові встановлювали відповідно до нової переглянутої класифікації ВООЗ (2016) лімфоїдних новоутворень. **Результати:** неопластичні клітини при ВКЛ відзначалися наявністю високої активності тартратрезистентної кислотої фосфатази (ТРКФ) і мали імунофенотип відносно зрілих В-клітин. На поверхневих мембранах виявляли експресію асоційованих із В-лімфоцитами антигенів CD19, CD20, CD22. Позитивною була реакція при виявленні CD25, CD103, CD200. В окремих випадках визначали циклін D1. Реакція з моноклональними антитілами (МкАт) до CD5, CD10, CD23 була негативною. При лімфомі маргінальної зони селезінки клітини з ворсинчастими відростками за імунофенотипом також відповідали зрілим В-лімфоцитам. Експресія антигенів CD19, CD20, CD22 відзначена в усіх випадках; CD11c — у 50% хворих; CD25 або CD5 — у 10% пацієнтів. У патологічних клітинах 80% хворих не виявляли активності ТРКФ; у 20% пацієнтів вона була слабкою і зберігалась у 10–15% клітин. У клітинах кісткового мозку та периферичної крові при дифузній лімфомі червоної пульпи селезінки активності ТРКФ не виявляли. Відзначена експресія антигенів CD19, CD20, CD22, CD11c та CD103. Пухлинні клітини мали негативну реакцію при виявленні антигена CD25 та цикліну D1. Імунофенотипові особливості клітин при варіантному ВКЛ були децю іншими, ніж при класичному (CD19⁺, CD20⁺, CD22⁺, CD103⁺, CD11c⁺, CD5⁻, CD10⁻, CD23⁻). Реакція з МкАт до цикліну D1 та CD25 — негативна. **Висновки:** охарактеризовані цитохімічні та імунофенотипові маркери ворсинчастих лімфоцитів, які мають диференційно-діагностичне значення при різних формах лімфоїдних пухлин В-клітинного походження, важливі для вибору методів терапії та прогнозу.

У новій класифікації ВООЗ (перегляд 2016 р.) пухлин лімфоїдної тканини наведені критерії виділення окремих форм В-клітинних новоутворень на основі цитоморфологічних, імунофенотипових та молекулярно-генетичних досліджень [1, 2]. У категорію лімфопроліферативних захворювань, що виникають зі зрілих В-лімфоцитів, на рівні з хронічним лімфолейкозом (В-ХЛЛ), В-клітинним пролімфоцитарним лейкозом (В-ПЛЛ) та деякими неходжкінськими лімфомами (НХЛ), входять захворювання, які характеризуються спленомегалією, наявністю в кістковому мозку та периферичній крові неопластичних лімфоїдних клітин із ворсинчастими відростками цитоплазми. До цієї групи відносяться волосковоклітинний лейкоз (ВКЛ), лімфома маргінальної зони селезінки (ЛМЗС), ди-

фузна лімфома червоної пульпи селезінки з малих лімфоцитів (ЛЧПС) та варіантний волосковоклітинний лейкоз (В-ВКЛ) [3–6].

Мета дослідження — на основі порівняння морфологічних та імуноцитохімічних ознак встановити ймовірну природу неопластичних субстратних клітин при зазначених захворюваннях.

ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

У роботі наведені результати 10-річних досліджень співробітників Референтної лабораторії відділу онкогематології Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України. Вивчали лімфоїдні клітини периферичної крові та кісткового мозку хворих на ВКЛ, ЛМЗС, ЛЧПС та В-ВКЛ, отримані до початку лікування.

За допомогою імерсійної системи (x 1000) здійснювали цитоморфологічне дослідження мазків крові та кісткового мозку, забарвлених за Паппенгеймом. Проводили цитохімічне визначення внутрішньоклітинної локалізації та активності тартратрезистентної кислоти фосфатази (ТРКФ) (КФ 3.1.3.2) за методом Goldberg, Barak [7]. При імуноцитохімічному дослідженні антигенів поверхневих мембран клітин за допомогою панелі моноклональних антитіл (МкАт) (Dako Cytomation, Данія) застосовували лужно-фосфатазний стрептавідин-біотиновий метод (LSAB-AP) і метод проточної цитометрії з використанням цитометру Beckman Coulter EPICS XL (США).

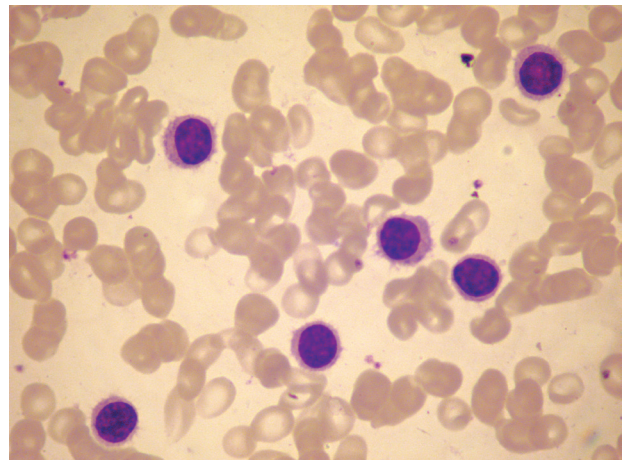
РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Волосковоклітинний лейкоз (ВКЛ) виявлено у 137 осіб віком від 26 до 70 років. Майже в усіх випадках була наявна спленомегалія. Ознаки гіперплазії лімфатичних вузлів у черевній порожнині та середостінні за допомогою комп'ютерної томографії виявлено у небагатьох пацієнтів. Інколи вогнища ураження спостерігалися в печінці та кістках скелета, вкрай рідко виявляли наявність ексудату в грудній або черевній порожнині. При виконанні загального аналізу крові у більшості хворих виявлена анемія (вміст гемоглобіну <math><100\text{ г/л}</math>), тромбоцитопенія (кількість тромбоцитів <math><100 \cdot 10^9/\text{л}</math>), у більшості хворих була виражена лейкопенія ($0,7\text{--}1,5 \cdot 10^9/\text{л}$). В окремих пацієнтів вміст лейкоцитів у периферичній крові був достатньо високим ($20\text{--}30 \cdot 10^9/\text{л}$). У лейкограмі в більшості випадків спостерігали відносне переважання Т-лімфоцитів, а також зазвичай відзначали виражену моноцитопенію. Субстратні клітини з ворсинчастими відростками становили від 5 до 10%, іноді більше, особливо у разі з помірним збільшенням загальної кількості лейкоцитів.

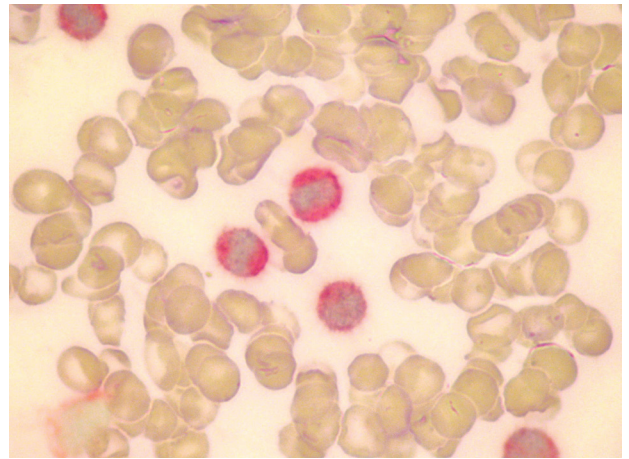
Клітинний склад мієлограм у хворих на ВКЛ також був неоднаковим. В окремих випадках спостерігалася картина вираженої гіпоплазії з поодинокими субстратними клітинами, в інших — переважали лімфоїдні клітини з характерними цитоморфологічними ознаками. У більшості випадків це були лімфоїдні клітини середнього розміру, дещо більші, ніж при В-ХЛЛ, з помірно широкою світло-блакитною цитоплазмою з поліморфними ворсинчастими відростками. Ядра клітин округлі, овальної чи бобовидної форми, в окремих випадках розміщені ексцентрично. Структура ядерного хроматину була помірно щільною, ядерця нечітко контурувались або взагалі не виявлялися.

Головний діагностичний критерій у хворих на ВКЛ при ензимцитохімічному дослідженні — визначення наявності високої активності кислоти фосфатази у вигляді інтенсивного забарвлення цитоплазми клітин із ворсинчастими відростками (рис. 1). Інтенсивність забарвлення цитоплазми клітин не змінювалася при додаванні в інкубацій-

не середовище інгібітора — 0,05М виннокислого калію-натрію (тартрату). Наявність ТРКФ (ізоферменту 5), як відомо, є досить надійною ознакою, яка дозволяє проводити диференційну діагностику ВКЛ з іншими лімфопроліферативними захворюваннями.



a



б

Рис. 1. Клітини кісткового мозку при ВКЛ: *a* — забарвлення за Паппенгеймом; *б* — реакція на ТРКФ. x 1000

Неопластичні клітини, які виявляли у хворих на ВКЛ в кістковому мозку та периферичній крові, мали імунофенотип відносно зрілих В-клітин. На їх поверхневих мембранах визначали експресію асоційованих із В-лімфоцитами антигенів CD19, CD20, CD22, CD79a, яка була особливо вираженою при виявленні останніх двох маркерів. Помірна чи виражена реакція спостерігалася при виявленні на поверхневих мембранах клітин IgM. Зазвичай негативні результати отримували при визначенні антигенів CD5, CD10, CD23 і CD43. Позитивною була реакція при виявленні антигену CD25 (α -ланцюга рецептора інтерлейкіну-2), який є маркером активованих В- і Т-клітин. Позитивну експресію, більш виражену, ніж при інших лімфопроліферативних захворюваннях, відзначали при реакції з МкАт до антигену CD11c. На поверхневих мембранах клітин при ВКЛ, на відміну від В-ХЛЛ та нечисленних випадків фолікулярних лімфом

і лімфом із клітин мантійної зони, виявляли експресію антигену CD103. Вираженою була експресія антигену CD200. В ½ випадків виявлена слабка експресія цикліну D1.

Лімфому маргінальної зони селезінки (ЛМЗС), яка також називалася лімфомою селезінки з циркулюючими у крові ворсинчастими лімфоцитами, раніше діагностували як один із цитологічних варіантів В-ХЛЛ. Діагноз ЛМЗС встановлено нами у 266 пацієнтів, серед яких переважали особи віком старше 60 років. Для більшості хворих характерна наявність спленомегалії, що поєднувалась з анемією та аутоімунною тромбоцитопенією. В патологічний процес у певній категорії хворих були залучені лімфатичні вузли біля воріт селезінки, печінка та кістковий мозок. Практично не спостерігалось ураження периферичних лімфатичних вузлів. Кількість лейкоцитів у периферичній крові зазвичай була в межах норми чи дещо підвищеною. Тільки у 20% пацієнтів вона була $> 25 \cdot 10^9/\text{л}$. При дослідженні мазків периферичної крові визначалася варіююча кількість лімфоцитів із ворсинчастими відростками.

Лімфоцити периферичної крові були невеликого чи середнього розміру, інколи дещо більшими, ніж при В-ХЛЛ (рис. 2). Ядра клітин — округлої форми. Структура хроматину ядер дрібногранулярна. Розмір цитоплазми варіював, частіше вона була світло-блакитною і значно вужчою, ніж при ВКЛ. Відповідно, ядерно-цитоплазматичне співвідношення було вищим, ніж при ВКЛ. У частині лімфоцитів спостерігалися короткі й нечисленні виступи в цитоплазмі.

При цитохімічному дослідженні клітин ЛМЗС активність кислої фосфатази визначали у вигляді слабого чи помірного дифузно-гранулярного забарвлення цитоплазми. У переважній кількості пацієнтів реакція в більшості клітин крові та кісткового мозку повністю інгібувалась іонами тартрату, проте у 20% випадків вона зберігалась у вигляді значно слабшого забарвлення у 10–15% клітин. Дані імунофенотипування свідчили про належність клітин при ЛМЗС до категорії відносно зрілих клітинних елементів В-клітинного походження. На поверхневих мембранах неопластичних клітин встановлена наявність антигенів CD19, CD20, виражена експресія антигену CD22. У половині випадків визначали експресію CD11c, у 10% хворих спостерігали слабку експресію CD25 або CD5. Експресію антигену CD103 і цикліну D1 не визначали.

Лімфома червоної пульпи селезінки із малих лімфоцитів (ЛЧПС) у структурі НХЛ становить $< 1\%$. Нарівні з селезінкою в патологічний процес при ЛЧПС залучені синуси кісткового мозку. Нами досліджено три випадки ЛЧПС (у чоловіків віком 58, 64 і 72 роки). До клініко-гематологічних ознак у цих пацієнтів слід віднести наявність вираженої спленомегалії, лейкопенії та тромбоцитопенії. При мі-

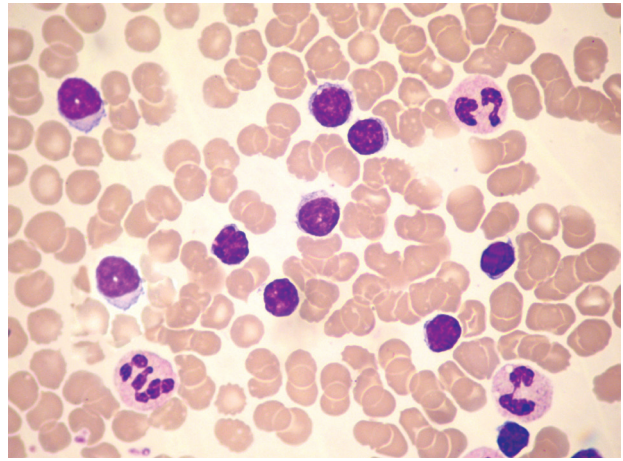
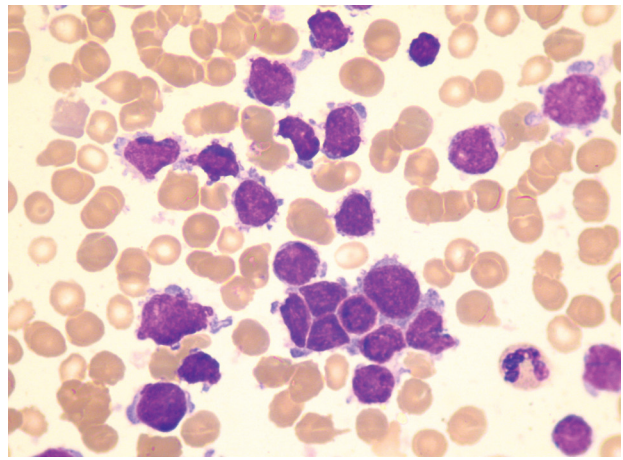
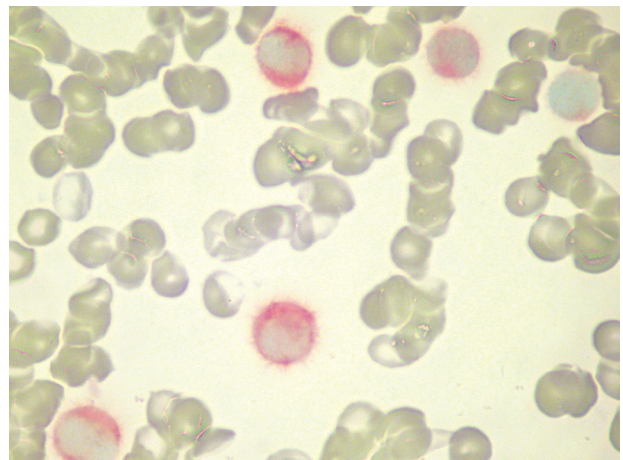


Рис. 2. В-лімфоцити в периферичній крові при лімфомі маргінальної зони селезінки у фазі лейкомізації. $\times 1000$



a



b

Рис. 3. Клітини кісткового мозку при лімфомі червоної пульпи селезінки у фазі лейкомізації: *a* — забарвлення за Паппенгеймом; *b* — слабка активність ТРКФ в субстратних клітинах. $\times 1000$

кроскопічному дослідженні в мазках периферичної крові та кісткового мозку визначали круглі клітини невеликого та середнього розміру з рихлою структурою ядерного хроматину, вузькою цитоплазмою з ознаками певної базофілії. Відростки в цитоплазмі були дещо ширші та довші, ніж у хворих на ВКЛ та ЛМЗС (рис. 3).

Цитохімічні та імунофенотипові ознаки ворсинчастих лімфоцитів при В-клітинних лімфопроліферативних захворюваннях

Діагноз	ТРКФ	CD19	CD20	CD22	CD11c	CD25	CD103	Ци-клін D1	CD5
ВКЛ	+	+	+	+	+	+	+	+	-
ЛМЗС	-/+	+	+	+	-/+	-/+	-/+	-	-/+
ЛЧПС	-/+	+	+	+	+/-	-	-/+	-	-/+
ВКЛ-В	-/+	+	+	+	+	-	+	-	-

При цитохімічному дослідженні в неопластичних клітинах активність кислої фосфатази коливалася від слабкої до помірної та виявлялася в цитоплазмі клітин у вигляді гранул. У двох випадках реакція повністю інгібувалася іонами тартрату, а у клітинах одного хворого зберігалася у вигляді слабого забарвлення. Клітини крові та кісткового мозку двох хворих на ЛЧПС мали характерний імунофенотиповий профіль: CD19⁺CD20⁺CD22⁺ (яскрава реакція) CD25⁻CD103⁻CD11c⁻CD5⁻циклін D1⁻. Позитивну слабку реакцію при визначенні антигенів CD103 і CD11c відзначали в одного хворого.

Варіантний волосковоклітинний лейкоз (В-ВКЛ).

Відповідно до переглянутої класифікації ВООЗ (2016), на рівні з ЛЧПС як попередню нозологічну форму включили В-ВКЛ у категорію «В-клітинна лімфома/лейкоз селезінки неklasифікована». В-ВКЛ відрізняється від ВКЛ за наявністю специфічних гістологічних, імунофенотипових ознак та за рівнем чутливості хворого до хіміотерапії. В обстежених нами 5 хворих (віком старше 60 років) спостерігали ознаки спленомегалії при відсутності лімфаденопатії. У всіх хворих відзначали ознаки анемії та тромбцитопенії. Кількість лейкоцитів у периферичній крові коливалася у межах від 30 до 50·10⁹/л. Вміст моноцитів у крові, на відміну від класичного ВКЛ, був підвищеним. У мазках периферичної крові та кісткового мозку виявляли значну кількість лімфоїдних клітин із ворсинчастою цитоплазмою. В неопластичних клітинах відзначали вище, ніж при ВКЛ, ядерно-цитоплазматичне співвідношення. Цитоплазма клітин була вузькою і відзначалася слабкою базофілією. Вирости цитоплазми більш нагадували ті, що виявлялись у клітинах хворих на ЛЧПС. Ядра клітин — із конденсованою структурою хроматину та чітко вираженими ядерцями, подібними до тих, що спостерігалися у клітинах при В-ПЛЛ. Реакція на кислу фосфатазу була дрібно-гранулярною від слабкої до помірної. При додаванні в інкубаційне середовище інгібітора іонів тартрату у двох випадках у частині клітин реакція зберігалася, проте була дуже слабкою. В інших хворих вона повністю інгібувалася. На поверхневих мембранах клітин периферичної крові та кісткового мозку виявляли експресію В-клітинних антигенів CD19 і CD20, а також слабку експресію антигенів CD22, CD103 та CD11c. Реакція при визначенні антигену CD25 і цикліну D1 була негативною.

Результати проведених нами лабораторних гематологічних досліджень та дані імунофенотипу клітин надзвичайно важливі для проведення диференційної діагностики ряду В-клітинних лімфопроліферативних захворювань (таблиця).

Отримані дані можуть бути використані також для ретроспективного підтвердження обґрунтованого виділення ВКЛ, ЛМЗС, ЛЧПС, В-ВКЛ як окремих нозологічних форм у новій класифікації лімфоїдних новоутворень ВООЗ (2016).

На сьогодні в ролі нормального клітинного аналога розвитку лімфопроліферативних захворювань, які розглянуто в зазначеному повідомленні, виділяється активована В-клітина на пізніх стадіях антигензалежного диференціювання [1]. Можна припустити, що поява нових даних внаслідок проведення цитогенетичних та молекулярно-генетичних досліджень, схожих на нещодавно виявлені мутації генів *MAP2K1* і *BRAF* при ВКЛ [8], дасть можливість детальніше уточнити та охарактеризувати окремі клітинні елементи, із трансформацією яких пов'язане виникнення неопластичних процесів та поява в кістковому мозку і периферичній крові патологічних клітин із ворсинчастими відростками.

ВИСНОВКИ

1. Встановлені цитохімічні та імунофенотипові маркери ворсинчастих лімфоцитів при різних формах В-клітинних лімфопроліферативних захворювань.

2. Результати цитоморфологічного та імунофенотипового досліджень субстратних клітин периферичної крові та кісткового мозку можуть бути безпосередньо використані при встановленні діагнозу ЛМЗС, ЛЧПС, В-ВКЛ без вивчення гістологічних препаратів видаленої селезінки після оперативного втручання.

3. Особливе значення має диференціація ЛМЗС і ЛЧПС, від якої залежить вибір методу терапії та прогноз у окремих хворих.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Swerdlow SH, Campo E, Pileri, *et al.* The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood* 2016; **127** (20): 2376–90.
2. Bain BJ. *Leukemia diagnosis*, 5th ed. London: John Wiley & Sons, Inc, 2017. 498 p.
3. Vyhovska YI, Loginsky VY, Mazurok AA, *et al.* Splenic lymphoma from villous lymphocytes. *Oncology* 1999; **1** (3): 177–82. (in Ukrainian).
4. Behdad A, Bailey NG. Diagnosis of splenic B-cell lymphomas in the bone marrow: a review of histopathologic, immunophenotypic, and genetic findings. *Arch Pathol Lab Med* 2014; **138** (10): 1295–301.
5. Ponzoni M, Kenellis G, Poulion E, *et al.* Bone marrow histopathology in the diagnostic evaluation of splenic marginal-zone and splenic diffuse red pulp small B-cell lymphoma: a reliable substitute for spleen histopathology. *Am J Surg Pathol* 2012; **36** (11): 1609–18.
6. Dong HY, Weisberger J, Liu Z, Tugulea S. Immunophenotypic analysis of CD103⁺ B-lymphoproliferative disorders: hairy cell leukemia and its mimics. *Am J Clin Pathol* 2009; **131** (4): 586–95.
7. Gluzman DF. *Diagnostic cytochemistry of hematoblastoses*. Kyiv: Nauk Dymka, 1978. 210 p. (in Russian).
8. Tiacci E, Trifonov V, Schiavoni G, *et al.* BRAF mutation in hairy-cell leukemia. *N Engl J Med* 2011; **364** (24): 2305–15.

IMMUNOPHENOTYPICAL CHARACTERISTICS OF VILLOUS LYMPHOCYTES IN B-CELL LYMPHOPROLIFERATIVE DISEASES

L.M. Sklyarenko¹, A.S. Polishchuk¹, T.S. Ivanivska¹, V.N. Zinchenko², O.O. Pidgorna², A.A. Philchenkov¹, D.F. Gluzman¹, T.V. Kadnikova³, O.M. Vakulchuk³

¹R.E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology, NAS of Ukraine

²City Clinical Hospital № 9

³National Cancer Institute, Kyiv, Ukraine

Summary. Objective: the cytological and immunocytochemical features of lymphocytes with villous morphology in some B-cell lymphoproliferative disorders were studied. **Object and methods:** cytomorphological, cytochemical, immunocytochemical methods of investigation were used. The diagnosis of hairy cell leukemia (HCL) in patients with splenomegaly, dissemination of villous cells in the bone marrow (BM) and their presence in peripheral blood was established in accordance with the newly revised WHO classification (2016) of lymphoid tumors. **Results:** neoplastic cells with hairy cell leukemia were determined by the presence of high tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) activity and had an immunophenotype of relatively mature B cells. Cell surface expression of CD19, CD20, and CD22 antigens associated with B lymphocytes detected. Positive was the reaction when detecting CD25, CD103, and CD200. In some cases, cyclin D1 was determined. Reaction from moAb to CD5, CD10, and CD23 was negative. In the splenic marginal zone lymphoma with villous processes by immunopheno-

type also corresponded to mature B lymphocytes. Expression of CD19, CD20, and CD22 antigens was observed in all cases; CD11c — in 50% of patients; CD25 or CD5 — in 10% of patients. In pathologic cells of 80% of patients did not show TRAP activity; in 20% of patients it was weak and was stored in 10–15% of cells. TRAP activity was not detected in BM and peripheral blood cells with diffuse red pulp lymphoma. The expression of CD19, CD20, and CD22 antigens was noted. Tumor cells had a negative reaction when CD25 antigens and cyclin D1 were detected. The immunophenotypic features of cells with variant hairy cell leukemia were somewhat different from those of classical HCL (CD19⁺ CD20⁺ CD22⁺ CD103⁺ CD11c⁺ CD5⁻ CD10⁻ CD23⁻). The reaction with moAb to cyclin D1 and CD25 was negative. **Conclusions:** characterized cytochemical and immunophenotypic markers of villous lymphocytes, which have differential diagnostic value in various forms of lymphoid tumors of B cell origin, are important for the choice of treatment methods and prognosis.

Key Words: antigens, immunophenotype, cytochemistry, hairy cell leukemia, splenic marginal zone lymphoma, splenic red pulp lymphoma.

Адреса для листування:

Скляренко Л.М.

03022, Київ, вул. Васильківська, 45

Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України

E-mail: vals@onconet.kiev.ua

Одержано: 23.05.2019