

*Анна Владимировна Шибинская¹, Марина Абрамовна Френкель²,
Наталья Александровна Купрышина³, Людмила Юрьевна Гривцова⁴,
Николай Николаевич Тупицын⁵*

ИММУНОФЕНОТИПИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ВАРИАНТОВ В-ХРОНИЧЕСКОГО ЛИМФОЛЕЙКОЗА

¹ *Врач клинической лабораторной диагностики, клиничко-диагностическая лаборатория ФГУЗ ЦМСЧ
№58 ФМБА г. Северодвинска (164504, РФ, г. Северодвинск, ул. Кирилкина, г. 4)*

² *Профессор, г. м. н., ведущий научный сотрудник, лаборатория иммунологии гемопоэза
централизованного клиничко-лабораторного отдела НИИ клинической онкологии
РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН (115478, РФ, г. Москва, Каширское шоссе, г. 24)*

³ *К. м. н., старший научный сотрудник, лаборатория иммунологии гемопоэза централизованного
клиничко-лабораторного отдела НИИ клинической онкологии РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН
(115478, РФ, г. Москва, Каширское шоссе, г. 24)*

⁴ *К. м. н., старший научный сотрудник, лаборатория иммунологии гемопоэза централизованного
клиничко-лабораторного отдела НИИ клинической онкологии РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН
(115478, РФ, г. Москва, Каширское шоссе, г. 24)*

⁵ *Профессор, г. м. н., заведующий лабораторией иммунологии гемопоэза централизованного клиничко-
лабораторного отдела НИИ клинической онкологии РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН
(115478, РФ, г. Москва, Каширское шоссе, г. 24)*

Адрес для переписки: 115478, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24, лаборатория иммунологии
гемопоэза централизованного клиничко-лабораторного отдела НИИ клинической онкологии РОНЦ
им. Н. Н. Блохина РАМН, Френкель Марина Абрамовна; e-mail: marinaf@rinet.ru

Цель исследования — определение морфологических вариантов В-хронического лимфолейкоза и их иммунофенотипическая характеристика. Изучение лимфоидной популяции костного мозга с подсчетом лимфоцитогамм и иммунофенотипической характеристикой проведено у 155 больных В-хроническим лимфолейкозом. Выделены варианты заболевания: типичный (n = 83) и смешанно-клеточный (n = 72), который в свою очередь подразделен на подварианты: хронический лимфолейкоз/пролимфоцитарный лейкоз (n = 7) и атипичный хронический лимфолейкоз (n = 65). Для атипичного подварианта В-хронического лимфолейкоза характерна высокая интенсивность экспрессии прогностически неблагоприятного антигена CD38. Среди пациентов с хроническим лимфолейкозом/пролимфоцитарным лейкозом чаще выявлялись случаи с экспрессией антигена CD20 более чем на 50% клеток. Таким образом, выделение вариантов В-хронического лимфолейкоза может быть использовано для определения прогноза заболевания и выбора адекватной терапевтической тактики.

Ключевые слова: В-хронический лимфолейкоз, лимфоцитогамма, иммунофенотип, пролимфоцит, атипичный лимфоцит.

В-хронический лимфолейкоз (В-ХЛЛ) — В-клеточное лимфопролиферативное заболевание, субстратом которого является клон морфологически зрелых лимфоцитов с иммунофенотипом, соответствующим дифференцировке В-лимфоцита на уровне либо наивного В-лимфоцита, либо клетки памяти (ВОЗ, 2001) [1]. Характерной особенностью этого заболевания является гетерогенность клинического течения: у некоторых пациентов

болезнь не влияет существенно на продолжительность жизни, в то время как у других заболевание не поддается терапии и быстро прогрессирует [2].

Современные методы лечения В-ХЛЛ способны принципиально изменить течение болезни при условии адекватного применения. В этой ситуации терапия, сопровождающаяся высоким риском, назначается на основании неблагоприятного прогноза. Арсенал прогностических факторов, используемых в настоящее время у больных В-ХЛЛ, достаточно широк [3]. К ним относятся морфологические особенности лимфоидных лейкоэмических клеток, уровень гемоглобина и число тромбоцитов в пе-

риферической крови, показатель мутационного статуса, наличие специфических хромосомных аномалий, иммунологические маркеры.

Морфологическое исследование циркулирующих лимфоцитов всегда является первым шагом в диагностике хронического лимфолейкоза (ХЛЛ). Изучение клеточных типов и их содержания в периферической крови и костном мозге (КМ) — важная отправная точка в диагностике ХЛЛ, которая в совокупности с другими прогностическими факторами помогает определить прогноз заболевания.

Франко-американско-британская (ФАБ) классификация, базирующаяся на морфологической характеристике лимфоидных клеток, была предложена в 1989 г. В ней выделяли 2 варианта ХЛЛ [4]:

- 1) вариант с типичной морфологией: большую часть клеток составляли малые, типичные лимфоциты, количество пролимфоцитов и (или) крупных лимфоидных клеток было не более 10%;
- 2) смешанно-клеточный вариант. Последний подразделялся на 2 подварианта:
 - а) хронический лимфолейкоз/пролимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ/ПЛ) — имел смешанную, «диморфную» морфологическую картину с двумя подклассами клеток — большими пролимфоцитами (размером более 14 мкм, т. е. 2 эритроцитов) с нуклеолами, низким ядерно-цитоплазматическим отношением, и меньшими типичными клетками. Количество пролимфоцитов составляло 11—54%. Мелкие лимфоциты при ХЛЛ/ПЛ имели тенденцию к увеличению в объеме по сравнению с таковыми при ХЛЛ, а пролимфоциты были более плеоморфны, чем при пролимфоцитарном лейкозе (ПЛЛ);
 - б) атипичный — включал плеоморфные лимфоцитидные клетки различных размеров, пролимфоциты составляли менее 10%.

В дальнейшем эти критерии были адаптированы для практического использования Международной рабочей группой по ХЛЛ и классификацией ВОЗ [1].

Диагностика В-ХЛЛ наряду с морфологическими исследованиями включает в обязательном порядке определение иммунофенотипа опухолевых лимфоцитов [5]. Иммунологические маркеры позволяют отличить В-ХЛЛ от других лимфопролиферативных заболеваний и имеют определенное прогностическое значение для пациентов с В-ХЛЛ.

Целью настоящего исследования явились определение морфологических вариантов В-ХЛЛ на основании подсчета лимфоцитогранных клеток КМ больных В-ХЛЛ и анализ иммунофенотипических особенностей каждого варианта. Комплексная морфоиммунологическая характеристика вариантов В-ХЛЛ может дать полезную прогностическую информацию и использоваться для дальнейших клинических исследований.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование были включены 155 пациентов с В-ХЛЛ, наблюдавшихся в отделении гематологии РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН (зав. — д. м. н., проф. Д. Ш. Османов) с 2004 по 2007 г. У всех больных диагноз был установлен впервые.

Диагноз В-ХЛЛ определяли на основании классификации ВОЗ (2001) с учетом морфологических и иммунофенотипических критериев [1]. У всех пациентов количество лимфоидных клеток в периферической крови было более $5 \times 10^9 \text{ л}^{-1}$.

Среди больных было 89 мужчин и 66 женщин (их соотношение — 1,35). Средний возраст пациентов составлял 59 лет и не различался у больных разного пола.

Морфологическое и иммунофенотипическое исследование аспиратов КМ проводили в лаборатории иммунологии гемопоза (зав. — д. м. н., проф. Н. Н. Тупицын).

Аспират КМ (в объеме 0,3—0,7 мл) брали в пробирки «Vakutainer» с ЭДТА. Полученный материал использовали для подсчета миелокариоцитов, приготовления мазков КМ и исследования иммунофенотипа лимфоидных клеток.

Морфологическое исследование препаратов КМ включало подсчет миелограммы двумя врачами — по 250 клеток каждым, подсчет лимфоцитогранный тремя врачами — по 100 клеток каждым. На основании ФАБ-классификации выделяли следующие типы лимфоидных клеток:

- типичные лимфоциты — малые зрелые лимфоциты, мелкие, однообразно выглядящие, размером меньше 14 мкм, с отчетливым узким ободком цитоплазмы. Как ядро, так и очертания цитоплазмы правильные, хотя в некоторых случаях могут наблюдаться очертания ядер с выемкой, в форме почки. Структура хроматина плотная, глыбчатая. Цитоплазма скудная, базофилия выражена слабо. Ядерно-цитоплазматическое отношение высокое. Признаки клеток этого типа не отличались от характеристики нормальных лимфоцитов;
- пролимфоциты — клетки более крупного размера (более 14 мкм), как правило, округлой формы. Ядра правильные, округлые, структура хроматина несколько разреженная. В ядрах определяются четко идентифицируемые остатки нуклеола. Цитоплазма светлая, базофилия выражена слабо. Ядерно-цитоплазматическое отношение умеренное. Наличие нуклеола явилось специфическим признаком для определения этого типа клеток;
- атипичные лимфоциты представляли собой сборную группу. Это были лимфоидные элементы различных размеров, от малых до больших, плеоморфных клеток. Очертания ядер были различными, определялись клетки с округлыми и со складчатыми ядрами. В отдельных наблюдениях обнаруживались единичные лимфоциты (3—5%) с расщепленными ядрами или клетки с ядрами в форме розеток. Структура хроматина ядер была плотной, нуклеолы отсутствовали. Цитоплазма выявлялась либо в небольшом, либо в умеренном количестве, как правило, ее окраска была светлой. В единичных случаях определялись выраженная базофилия цитоплазмы и умеренная вакуолизация. Ядерно-цитоплазматическое отношение колебалось в разных наблюдениях от высокого до умеренного. Таким образом, атипичные лимфоциты отличались выраженной вариабельностью морфологических признаков.

Количество лимфоидных клеток разного типа в лимфоцитогранных КМ выражали в процентах. Количество

типичных лимфоцитов у анализируемых больных варьировало от 0 до 98%, пролимфоцитов — от 0 до 54%, атипичных лимфоцитов — от 1 до 69%.

Для выделения вариантов В-ХЛЛ все пациенты были разделены на группы. В группу типичного варианта вошли 83 больных, у которых число пролимфоцитов было менее 10% и атипичных лимфоцитов менее 10%, остальные клетки были представлены типичными лимфоцитами. Группу ХЛЛ/ПЛ составили 7 больных, у которых число пролимфоцитов превышало 10%, остальные лимфоидные элементы составили типичные и атипичные лимфоциты. В группе с атипичным В-ХЛЛ оказались 65 пациентов с числом атипичных лимфоцитов более 10%, пролимфоцитов менее 10%. Остальные клетки составили типичные лимфоциты.

У всех больных был установлен иммунологический фенотип лимфоидных клеток в проточном цитофлуориметре «FACScan» методом прямой иммунофлуоресценции. Дифференцировочные антигены определяли с использованием тройной флуориметрической метки для точной идентификации лимфоидных элементов и анализа коэкспрессии 2—3 антигенов на мембране одной клетки. Были использованы моноклональные антитела (МкАТ) к CD45, CD19, CD5, CD23, CD38, CD20, CD21, CD3, CD4, CD8, CD7.

Экспрессия CD5 и CD23 на В-лимфоцитах считается диагностическим критерием В-ХЛЛ. В нашем исследовании оба эти маркера, как правило, были мономорфно представлены на клетках CD19+. Вместе с тем при формулировке иммунологического заключения обычно указывается процент В-лимфоцитов, экспрессирующих каждый из этих антигенов. На рисунке отражены мономорфность популяции и процент позитивных клеток по сравнению с контролем.

При статистической обработке данных использовали пакет программ SPSS, версия 13. С применением теста Колмогорова—Смирнова была проверена гипотеза о принадлежности выборок к нормальным совокупностям. В случае значимого подтверждения этой гипотезы использовали критерий Стьюдента (при сравнении 2 выборок) или дисперсионный анализ (при сравнении большего числа выборок). В противном случае применяли непараметрические тесты Манна—Уитни (2 выборки) или Крускала—Уоллеса (больше 2 выборок).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Типичный вариант В-ХЛЛ

Этот вариант был определен у 83 (53,5%) пациентов, в лимфоцитогамме которых число атипичных лимфоцитов и пролимфоцитов не превышало 10%. Число типичных лимфоцитов при этом колебалось от 84 до 99%. Среди пациентов было 45 мужчин (54%) и 38 женщин (46%). Соотношение мужчины/женщины составило 1,2. Возраст больных варьировал от 36 до 80 лет (медиана 60 лет).

Содержание миелокариоцитов в аспиратах КМ колебалось от 10 до $850 \times 10^9 \text{ л}^{-1}$, ($148,1 \pm 13,3$) $\times 10^9 \text{ л}^{-1}$. У 73,5% больных аспират имел нормальный показатель клеточности. Гипоклеточный пунктат (менее $40 \times 10^9 \text{ л}^{-1}$) выявлен у 8 (9,6%) пациентов, гиперклеточный (более $190 \times 10^9 \text{ л}^{-1}$) — у 14 (16,9%). Число лимфоидных эле-

ментов (лимфоцитов и пролимфоцитов) в миелограмме составляло 18—98,8% ($60,3 \pm 2,6\%$). Абсолютное число лимфоидных элементов варьировало в пределах ($9,9—727,6$) $\times 10^9 \text{ л}^{-1}$, ($100 \pm 12,1$) $\times 10^9 \text{ л}^{-1}$.

При иммунофенотипировании (табл. 1) в популяции клеток CD19+ доля клеток CD5+ и CD23+ в среднем по группе была высокой. Содержание клеток CD5+ как в процентном, так и абсолютном выражении было несколько выше, чем элементов CD23+. У большинства пациентов доля клеток CD5+ и CD23+ (78 и 70 больных соответственно) превышала 50% в популяции.

Экспрессия антигена CD20 была слабой и выявлена (более 20% по сравнению с контролем) приблизительно в 50% случаев. В 25 наблюдениях число лимфоидных элементов CD20+ превысило 50%.

Экспрессия антигена CD21 была обнаружена у большинства обследованных больных, из них у 13 число клеток CD21+ превышало 50%.

Антиген CD38 на клетках CD19+ определялся у 20 пациентов из 81, у 4 из них число клеток CD38+ составляло более половины популяции.

Анализ взаимозависимости двух диагностических маркеров В-ХЛЛ — антигенов CD5+ и CD23+ в абсолютных показателях позволил установить высокую ассоциативную связь ($r = 0,94$; $p = 0,0001$). Зависимость между количеством антигенов CD5+ и CD23+ и другими маркерами лимфоидных клеток: CD20, CD21 и CD38 — отсутствовала.

Таким образом, у больных с типичным вариантом В-ХЛЛ число опухолевых клеток CD19+, CD5+ было несколько больше, чем CD19+, CD23+. Количество позитивных по этим маркерам клеток высоко коррелировало с их абсолютным содержанием в костном мозге. Уровень экспрессии антигенов CD20, CD21 и CD38 не зависел от процентного содержания лимфоидных элементов CD19+, CD5+ и CD19+, CD23+ в популяции.

Смешанно-клеточный вариант

Подвариант ХЛЛ/ПЛ. У 7 пациентов выявлен подвариант ХЛЛ/ПЛ, при котором в лимфоцитогамме доля пролимфоцитов составила 11—54%.

Среди больных было 5 мужчин и 2 женщины. Соотношение мужчины/женщины составляло 2,5. Возраст пациентов варьировал от 44 до 70 лет (медиана 64 года).

Содержание миелокариоцитов в аспиратах КМ колебалось от 44 до $300 \times 10^9 \text{ л}^{-1}$, ($154,6 \pm 41,8$) $\times 10^9 \text{ л}^{-1}$. У 4 больных в аспирате выявлено нормальное содержание клеток, гиперклеточный аспират был у 3 пациентов. Число лимфоидных элементов в миелограмме колебалось от 20,6 до 93,2% ($70,0 \pm 9,8\%$). Абсолютное количество лимфоидных элементов варьировало от 9,9 до $727,6 \times 10^9 \text{ л}^{-1}$.

При иммунофенотипировании содержание клеток CD5+ в клоне CD19+ в процентном и абсолютном выражении было выше, чем элементов CD23+.

Экспрессия антигена CD20 более 20% обнаружена в 5 случаях из 6, в 4 случаях содержание клеток CD20+ превысило 50%. Маркер CD21, исследованный в 2 случаях, в обоих оказался позитивным. Все 7 больных были негативны по антигену CD38.

Таким образом, при ХЛЛ/ПЛ экспрессия антигена CD5+ выявлялась на несколько большем числе клеток, чем

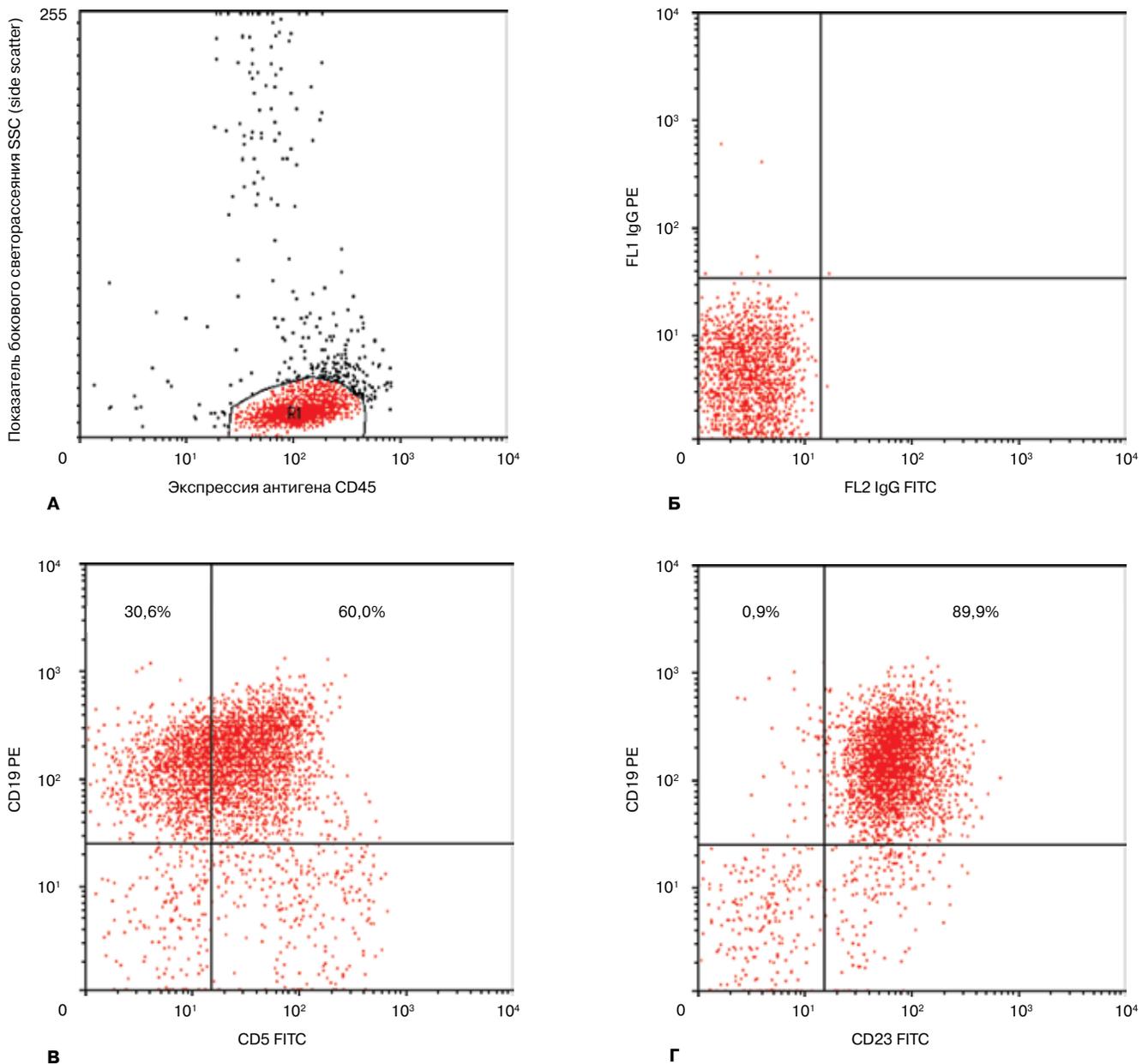


Рисунок. Результаты выделения гейта зрелых лимфоцитов и его иммунофенотипическая характеристика методом проточной цитометрии.

А. Гейт зрелых лимфоцитов R1. **Б.** Изотипический контроль в гейте зрелых лимфоцитов. **В.** Экспрессия антигенов CD19 и CD5 в гейте зрелых лимфоцитов. **Г.** Экспрессия антигенов CD19 и CD23 в гейте зрелых лимфоцитов.

CD23. Экспрессия антигена CD20 более чем на 50% клеток выявлена в 4 из 5 наблюдений. Как правило, обнаруживалась выраженная экспрессия CD20. Антиген CD38 отсутствовал во всех исследованиях (табл. 2).

Атипичный подвариант В-ХЛЛ. В группу с атипичным подвариантом В-ХЛЛ вошли 65 (41,9%) больных. В этих случаях количество атипичных лимфоцитов составляло более 10%, содержание пролимфоцитов не превышало 10%.

Среди больных было 39 мужчин (60%) и 26 женщин (40%). Соотношение мужчины/женщины составило 1,5.

Возраст пациентов варьировал от 36 до 85 лет (медиана 59 лет).

Содержание миеокариоцитов в аспиратах КМ колебалось от 15 до $338 \times 10^9 \text{ л}^{-1}$ ($126,9 \pm 11,7 \times 10^9 \text{ л}^{-1}$). У 75% больных в аспирате содержалось нормальное количество клеток. Гипоклеточный пунктат получен у 7 (10,8%) пациентов, гиперклеточный — у 9 (13,8%).

По нашим данным, доля лимфоидных элементов колебалась от 15,8 до 93,8% ($65,8 \pm 2,6\%$). Абсолютное содержание лимфоидных элементов варьировало от $6,9$ до $317,0 \times 10^9 \text{ л}^{-1}$ ($92,0 \pm 11,5 \times 10^9 \text{ л}^{-1}$).

Таблица 1

Иммунофенотипическая характеристика В-лимфоидных клеток при типичном В-ХЛЛ

| Маркер | Число больных | | Число позитивных случаев | | Позитивные случаи | |
|---|---------------|------|--------------------------|------|----------------------------|-------------|
| | абс. | % | абс. | % | границы колебаний признака | M ± m |
| CD19+CD5+, % | 83 | 100 | 83 | 100 | 27,0–99,8 | 87,5 ± 1,8 |
| CD19+CD5+, × 10 ⁹ л ⁻¹ | 83 | 100 | – | – | 7,3–724,0 | 86,1 ± 11,2 |
| CD19+CD23+, % | 83 | 100 | 83 | 100 | 31,0–99,4 | 75,7 ± 2,0 |
| CD19+CD23+, × 10 ⁹ л ⁻¹ | 83 | 100 | – | – | 3,5–581,4 | 75,0 ± 9,9 |
| CD20, % | 77 | 92,8 | 48 | 62,3 | 21,4–96,0 | 49,9 ± 2,9 |
| CD21, % | 34 | 41,0 | 28 | 82,4 | 21,0–99,0 | 55,3 ± 4,4 |
| CD38, % | 81 | 97,6 | 20 | 24,7 | 20,1–76,9 | 42,8 ± 3,8 |
| CD38, × 10 ⁹ л ⁻¹ | 81 | 97,6 | 20 | 24,7 | 16,2–101,2 | 38,0 ± 8,3 |

В результате иммунофенотипирования лимфоидных клеток установлено, что в среднем по группе количество клеток CD5+ было несколько больше, чем клеток CD23+, как в процентном, так и в абсолютном выражении (табл. 3).

Слабая экспрессия антигена CD20 выявлена у 39 больных, из них у 22 (36% от числа обследованных) доля позитивных элементов превышала 50%. У большинства пациентов обнаруживались клетки CD21+, как правило (21 из 26 больных), доля клеток CD21+ превышала 50%.

Таблица 2

Иммунофенотипическая характеристика В-лимфоидных клеток при ХЛЛ/ПЛ

| Иммунологический маркер | Число больных | | Число позитивных случаев | | Позитивные случаи | |
|---|---------------|------|--------------------------|------|-----------------------------|-------------|
| | абс. | % | абс. | % | границы колебаний признаков | M ± m |
| CD19+CD5+, % | 7 | 100 | 7 | 100 | 82,5–99,8 | 92,6 ± 2,3 |
| CD19+CD5+, × 10 ⁹ л ⁻¹ | 7 | 100 | – | – | 22,5–201,5 | 90,5 ± 25,8 |
| CD19+CD23+, % | 7 | 100 | 7 | 100 | 75,1–90,9 | 76,5 ± 7,2 |
| CD19+CD23+, × 10 ⁹ л ⁻¹ | 7 | 100 | – | – | 18,9–162,0 | 76,2 ± 23,2 |
| CD20, % | 6 | 85,7 | 5 | 83,3 | 24,4–74,8 | 54,2 ± 7,0 |
| CD21, % | 2 | 28,6 | 2 | 100 | 28,6–87,5 | 60,7 ± 29,5 |
| CD38, % | 7 | 100 | 0 | 0 | – | – |
| CD38, × 10 ⁹ л ⁻¹ | 7 | 100 | 0 | 0 | – | – |

Таблица 3

Иммунофенотипическая характеристика В-лимфоидных клеток при атипичном подварианте В-ХЛЛ

| Маркер | Число больных | | Число позитивных случаев | | Позитивные случаи | |
|---|---------------|------|--------------------------|------|----------------------------|------------|
| | абс. | % | абс. | % | границы колебаний признака | M ± m |
| CD19+CD5+, % | 65 | 100 | 65 | 100 | 37,3—99,9 | 92,3 ± 1,7 |
| CD19+CD5+, × 10 ⁹ л ⁻¹ | 65 | 100 | – | – | 6,3—311,9 | 81,0 ± 8,0 |
| CD19+CD23+, % | 65 | 100 | 65 | 100 | 26,2—99,8 | 79,3 ± 2,4 |
| CD19+CD23+, × 10 ⁹ л ⁻¹ | 65 | 100 | – | – | 3,5—581,4 | 68,3 ± 6,5 |
| CD20, % | 61 | 93,8 | 39 | 64,0 | 22,0—93,7 | 54,6 ± 3,1 |
| CD21, % | 30 | 46,2 | 26 | 87,5 | 24,7—99,1 | 64,4 ± 3,9 |
| CD38, % | 64 | 98,5 | 24 | 37,5 | 23,3—80,9 | 53,8 ± 3,2 |
| CD38, × 10 ⁹ л ⁻¹ | 64 | 98,5 | – | – | 4,4—168,6 | 41,5 ± 7,3 |

Экспрессия антигена CD38 на лимфоидных элементах наблюдалась более чем в 1/3 случаев, причем у 17 больных обнаружено более 50% позитивных клеток.

Как и при типичном варианте В-ХЛЛ, корреляция абсолютного числа клеток CD5+ и CD23+ оказалась высоко достоверной ($r = 0,93$; $p = 0,01$).

Частота и уровень экспрессии антигенов CD20, CD21 и CD38 не зависели от количества позитивных клеток CD5+ и CD23+ ($p > 0,05$).

Следовательно, при атипичном подварианте В-ХЛЛ в В-лимфоидной популяции КМ число клеток CD5+ несколько превышало количество CD23+. Была выявлена высоко достоверная взаимосвязь между абсолютным содержанием элементов CD5+ и CD23+. Отсутствовала корреляция между количеством маркеров CD5 и CD23 и числом элементов CD20+, CD21+ и CD38+.

Таким образом, при всех вариантах В-ХЛЛ в популяции В-лимфоцитов CD19+ доля клеток CD5+ была выше, чем доля клеток CD23+, частота экспрессии антигенов CD20, CD21 и CD38 была различной.

Сравнительная морфоиммунологическая характеристика вариантов В-ХЛЛ

Сравнительный анализ клинико-гематологических данных трех вариантов В-ХЛЛ позволил установить отсутствие между ними достоверных различий по возрасту, полу, частоте гипо- и гиперклеточных пунктатов, процентному и абсолютному содержанию лимфоидных клеток в аспирате.

При сопоставлении данных экспрессии отдельных антигенов при типичном В-ХЛЛ и атипичном подварианте выявлены некоторые достоверные различия (табл. 4).

У больных типичным В-ХЛЛ по сравнению с больными атипичным В-ХЛЛ была значительно ниже доля клеток CD19+, CD5+ и CD38+ в лимфоидной популяции. Кроме того, при типичном варианте число элементов CD38+ также было достоверно меньше, чем при атипичном подварианте (21 и 37,5% соответственно; $p = 0,041$). Среднее содержание клеток CD20+ и CD21+ по группе не различалось при обоих вариантах.

Случаи с экспрессией антигена CD20 более чем на 50% клеток при ХЛЛ/ПЛ выявлялись чаще (80%), чем при типичном (32%) и атипичном (36%) ХЛЛ. При ХЛЛ/ПЛ, в отличие от типичного и атипичного В-ХЛЛ, ни в одном из 7 случаев антиген CD38 на лимфоидных клетках не был выявлен.

Таким образом, результаты проведенного анализа позволяют сделать вывод, что наиболее высокая среди всех вариантов В-ХЛЛ экспрессия антигена CD38 как в среднем по группе, так и по числу CD38-позитивных случаев определяется при атипичном В-ХЛЛ.

Дополнительная иммунофенотипическая характеристика лимфоидных элементов при типичном варианте и атипичном подварианте В-ХЛЛ

При оценке результатов морфологической диагностики вариантов В-ХЛЛ мы столкнулись с определенными сложностями. Установление варианта В-ХЛЛ проводилось тремя независимыми экспертами. Оказалось, что около 10% случаев являются затруднительными при определении варианта заболевания и требуют специального обсуждения. Эти расхождения послужили основанием для дополнительного анализа в целях определения точности использованных морфологических критериев. Для решения этой задачи больные с типичным В-ХЛЛ и

Таблица 4

Сравнение показателей иммунофенотипических маркеров у больных типичным вариантом и атипичным подвариантом В-ХЛЛ

| Иммунологический маркер, % | Доля позитивных клеток, % ($M \pm m$) | | p |
|----------------------------|---|----------------------|--------|
| | типичный вариант | атипичный подвариант | |
| CD19+CD5+ | 87,5 ± 1,8 | 92,3 ± 1,7 | 0,029 |
| CD19+CD23+ | 75,7 ± 2,0 | 68,3 ± 6,5 | > 0,05 |
| CD38 | 42,8 ± 3,8 | 53,8 ± 3,2 | 0,027 |

атипичным подвариантом были разделены на 2 группы: основную (с бесспорным преобладанием характерных клеток в лейкоцитарной популяции) и промежуточную (с менее четкими признаками). При типичном варианте В-ХЛЛ основную группу составили пациенты с числом лимфоцитов более 90% (56 человек), промежуточную — 84—90% (27 человек). При атипичном подварианте к основной группе были отнесены 34 (52%) пациента, у которых содержание лимфоцитов в лимфоцитогамме варьировало от 24 до 74%. Промежуточную группу с содержанием лимфоцитов 75—88% составил 31 (48%) больной.

Сравнительный анализ иммунофенотипа лимфоидных клеток пациентов основной и промежуточной групп позволил выявить отсутствие выраженных различий по уровню маркеров CD5, CD23, CD38, CD20 и CD21 как при типичном, так и при атипичном подварианте В-ХЛЛ.

Отдельно было проведено сравнение иммунофенотипических показателей двух промежуточных групп (при типичном варианте и атипичном подварианте) как наиболее близких по составу лимфоцитогамм и потому затруднительных при определении варианта В-ХЛЛ. Было установлено, что в промежуточной группе типичного В-ХЛЛ определялось достоверно меньшее содержание лимфоидных элементов CD19+, CD5+ ($80,7 \pm 4,5$ и $94,2 \pm 2,6\%$ соответственно), чем при атипичном подварианте. Аналогичная зависимость выявлена и для доли клеток с экспрессией антигена CD20 ($28,0 \pm 4,7$ и $41,7 \pm 4,7\%$ соответственно; $p < 0,05$). Таким образом, иммунофенотипические особенности каждой из промежуточных групп соответствовали характеристике того варианта В-ХЛЛ, к которому она была отнесена.

Полученные результаты свидетельствуют о правомочности использования выбранных нами морфологических критериев для определения варианта В-ХЛЛ. Следовательно, морфологический подход является объективным независимым диагностическим методом.

ОБСУЖДЕНИЕ

Проведено изучение морфологических и иммунофенотипических особенностей лейкоцитарных лимфоидных клеток у 155 больных В-ХЛЛ. На основании подсчета лимфоцитогамм КМ в соответствии с ФАБ-классификацией выделены 2 варианта заболевания: типичный (83 человека) и смешанно-клеточный, внутри второго выделены два подварианта — ХЛЛ/ПЛ (7 чело-

век) и атипичный (65 человек). При сравнении клеточного состава КМ, состава миелограмм не выявили достоверных различий между этими вариантами.

Изучение морфологических особенностей лимфоидных элементов при В-ХЛЛ привлекает интерес исследователей, поскольку течение заболевания отличается значительным разнообразием клинических проявлений. Постоянно делаются попытки выявить взаимосвязь между морфологическими особенностями лейкоцитарного процесса и их прогностическим значением. Большинство исследователей, ссылавшихся на классификацию ФАБ и уточнявших ее в своих работах, выделяют 2 варианта В-ХЛЛ: типичный и атипичный. Так, в работе E. Matutes и соавт. [6] к атипичному ХЛЛ были отнесены случаи, при которых в лимфоидной популяции выявлялись лимфоциты с выраженной базофилией цитоплазмы и клетки с расщепленным ядром. Содержание подобных анаплазированных лимфоидных форм в лимфоцитогамме составляло более 15%. В исследовании R. Vigoni и соавт. [7] к атипичному В-ХЛЛ отнесены случаи с содержанием в лимфоцитогамме больших лимфоцитов и (или) пролимфоцитов более 10%. F. Maugo и соавт. [8] также подразделяют В-ХЛЛ на типичный вариант, к которому относят случаи с содержанием больших лимфоцитов или клеток с расщепленным ядром $\leq 11\%$, и атипичный, при котором содержание таких клеток превышает 11%.

Таким образом, разными исследовательскими группами используются критерии, которые незначительно различаются и позволяют сравнивать результаты. Как в оригинальной статье ФАБ-группы, так и в последующих публикациях авторами отмечалась связь атипичной морфологии с более агрессивным клиническим течением, рефрактерностью к терапии и сокращением выживаемости [6; 7].

Наши данные свидетельствуют о том, что высокая доля CD5+ и CD23+ в популяции клеток CD19+ обнаруживается при всех вариантах В-ХЛЛ. Однако при типичном варианте содержание CD19+, CD5+ оказалось достоверно ниже, чем при атипичном подварианте, в то время как число CD19+, CD23+ не различалось. В ряде исследований установлено прогностически неблагоприятное значение экспрессии антигена CD5. Данные H. Gary-Gouy и соавт. [9] свидетельствуют о блокировке антигеном CD5 функции В-клеточного рецептора, что делает опухолевые клетки невосприимчивыми к стиму-

ляции и позволяет им избежать апоптотической гибели. В работе I. Higs и соавт. [10] обнаружена корреляция между экспрессией антигена CD5 более чем на 85% клеток, временем удвоения уровня лимфоцитов менее 12 мес и необходимостью терапии в течение 6 мес. Однако вопрос о корреляции между морфологическим вариантом лимфоидных клеток и показателями иммунофенотипа остается пока нерешенным, так как в отдельных исследованиях (G. D'Arena и соавт. [11]) не было обнаружено разницы между типичным вариантом и атипичным подвариантом по числу клеток CD5+ и CD23+.

В современных цитометрических протоколах считается возможным пренебречь изотипическими контролями. В-клетки CD5+ характеризуются по их принадлежности к В-ХЛЛ на основе экспрессии CD20, CD22, CD43, CD81 и CD79b. Именно это позволит в дальнейшем диагностировать минимальную резидуальную болезнь в ходе лечения В-ХЛЛ [12]. Полностью признавая современные критерии и опираясь на них в повседневной работе, мы тем не менее сочли возможным в данной публикации привести процентное содержание клеток CD23+ и CD5+. Другим отличием типичного В-ХЛЛ, по нашим данным, явилось достоверно меньшее число случаев с выраженной экспрессией ($\geq 50\%$) антигена CD21. Исследование J. P. Aubry и соавт. [13] посвящено взаимодействию антигена CD23 и его естественного лиганда CD21, которое усиливает адгезию, пролиферацию и активацию В-клеток. Коэкспрессия этих маркеров на лимфоидных клетках В-ХЛЛ может способствовать росту и устойчивости лейкомиического клона и является прогностически неблагоприятным фактором, более характерным для атипичного подварианта.

Еще одним маркером, позволяющим охарактеризовать различия клеток при разных вариантах В-ХЛЛ, является антиген CD38. При типичном варианте по сравнению с атипичным подвариантом достоверно реже наблюдаются варианты CD38+, а экспрессия антигена CD38 выявляется на меньшем количестве лимфоидных клеток. Неблагоприятной роли этого фактора в прогнозировании В-ХЛЛ посвящено большое количество работ. Так, P. Chevallier и соавт. [14] отмечают, что экспрессия CD38 в значительной степени связана с развернутыми стадиями В и С по J. Binet [3], низкой выживаемостью и коротким периодом без лечения. Меньшая выживаемость пациентов с экспрессией этого маркера отмечена в исследованиях G. D'Arena [15], J. Durig и соавт. [16]. По данным Т. Е. Бялик, экспрессия CD38 является наиболее значимым прогностическим фактором, негативно влияющим на общую и безрецидивную выживаемость [17].

По данным литературы, оценка зависимости экспрессии этого маркера от морфологического варианта В-ХЛЛ неоднозначна. В работах J. L. Frater и соавт. [18] и P. Chevallier и соавт. [14] отмечается связь экспрессии антигена CD38 с атипичной морфологией лимфоцитов. Напротив, чешские исследователи не обнаружили зависимости между морфологическими вариантами и экспрессией CD38 [19].

Характеристика ХЛЛ/ПЛ в нашем исследовании базируется на небольшом числе наблюдений — 7 пациентов, поэтому не было проведено статистического сравнения иммунофенотипических данных с остальными

вариантами. Однако следует отметить, что при ХЛЛ/ПЛ чаще, чем у остальных больных, отмечалась выраженная экспрессия антигена CD20 и во всех случаях отсутствовал антиген CD38. В исследовании E. Matutes и соавт. [20] отмечается, что иммунофенотип лимфоидных клеток ХЛЛ/ПЛ может отличаться от случая к случаю и быть ближе либо к ХЛЛ, либо к пролимфоцитарному лимфолейкозу. Для последнего характерны экспрессия CD19, отсутствие экспрессии антигенов CD5 и CD23, выраженная экспрессия CD20. В работе S. Molica и соавт. [21] отмечается, что выраженная экспрессия маркера CD20 на лимфоидных клетках коррелирует с атипичной морфологией и неблагоприятным прогнозом. В исследовании G. D'Arena и соавт. [22] с использованием количественной проточной цитометрии показано, что плотность молекул CD20, CD79b и FMC7 на клетках выше при атипичном подварианте В-ХЛЛ. Следует предположить, что повышение экспрессии антигена CD20 при ХЛЛ/ПЛ является его специфическим иммунофенотипическим признаком, в то время как данные по антигену CD38 требуют дополнительных наблюдений.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, установлено, что варианты В-ХЛЛ, выделенные на основании морфологических критериев, различаются по своим иммунофенотипическим особенностям. Для атипичного подварианта В-ХЛЛ характерна более высокая интенсивность экспрессии прогностически неблагоприятного антигена CD38, при ХЛЛ/ПЛ чаще выявлялись случаи с экспрессией антигена CD20 более чем на 50% лимфоцитов. Полученные данные позволяют сделать вывод, что выделение морфоиммунологических вариантов В-ХЛЛ имеет существенное значение для определения прогноза заболевания и выбора адекватной тактики лечения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Chronic lymphocytic leukemia / Muller-Hemerlink H. K., Montserrat E., Catovsky D., Harris N. L. // World Health Organization Classification of Tumors IARC Pathology and Genetics of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. — Lion: IARC Press, 2001. — P. 127—130.
2. Волкова М. А. Хронический лимфолейкоз // Клиническая онкогематология / Волкова М. А. (ред.). — М.: Медицина, 2007. — С. 771—807.
3. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis / Binet J. L., Auquier A., Dighiero G., Chastang C., Piquet H., Gousquen J., Vaugier G., Potron G., Colona P., Oberling F., Thomas M., Tchernia G., Jacquillat C., Boivin P., Lesty C., Duault M. T., Monconduit M., Belabbes S., Gremy F. // Cancer. — 1981. — Vol. 48. — P. 198—206.
4. Proposals for the classification of chronic (mature) B and T lymphoid leukemias. French-American-British (FAB) Cooperative Group / Bennet J. M., Catovsky D., Daniel M. T., Flandrin G., Galton D. A., Gralnick H. R., Sultan C. // J. Clin. Patol. — 1989. — Vol. 42. — P. 567—584.
5. Луговская С. А., Почтарь М. Е., Тупицын Н. Н. Иммунофенотипирование в диагностике гемобластозов. — М.: Кафедра КЛД, 2005. — С. 165.
6. Trisomy 12 defines a group of CLL with atypical morphology: correlation between cytogenetic, clinical and laboratory features in 544 patients / Matutes E., Oscier D., Garcia-Marco J., Ellis J., Coppstone A., Gillingham R., Hamblin T., Lens D., Swansbury G. J., Catovsky D. // Br. J. Haematol. — 1996. — Vol. 92. — P. 382—388.
7. Chromosome aberration in atypical chronic lymphocytic leukemia: a cytogenetic and interphase cytogenetic study / Bigoni R., Cuneo A., Roberti M. G., Bardi A., Rigolin G. M., Piva N., Scapoli G., Spanedda R., Negrini M., Bullrich F., Veronese M. L., Croce C. M., Castoldi G. // Leukemia. — 1997. — Vol. 11. — P. 1933—1940.

8. Clinical characteristics and outcome of young chronic lymphocytic leukemia patients: a single institution study of 204 cases / Mauro F. R., Foa R., Gianarelli D., Cordon I., Crescenzi S., Pescarmono E., Sala R., Cerretti R., Mandelli F. // *Blood*. — 1999. — Vol. 94, N 2. — P. 448—454.
9. Human CD5 promotes B-cell survival through stimulation of autocrine IL-10 production / Gary-Gouy H., Harriague J., Bismuth G., Platzer C., Schmitt C., Dalloul A. H. // *Blood*. — 2002. — Vol. 100, N 13. — P. 4537—4543.
10. Malignant B cell CD5 membrane phenotype and B cell colony growth in vivo and in vivo in patients with B-chronic lymphocytic leukemia: analysis with clinical parameters / Higs I., Kay N. E., Ranhein E., Seroogy C., Parson R. E. // *Leukemia and Lymphoma*. — 1993. — Vol. 12, N 1—2. — P. 59—67.
11. Morphological typical and atypical B-cell chronic lymphocytic leukemias display a different pattern of surface antigenic density / D'Arena G., Dell'Olio M., Musto P., Cascavilla N., Perla G., Savino L., Greco M. M. // *Leukemia and Lymphoma*. — 2001. — Vol. 42. — P. 649—654.
12. Купрышина Н. А., Гривцова Л. Ю., Тупицын Н. Н. Определение минимальной резидуальной болезни при В-клеточном хроническом лимфолейкозе по стандартизованному европейско-американскому протоколу 2007 г. // *Иммунология гемопоза*. — 2008. — № 2. — С. 60—76.
13. The Epstein-Barr virus-binding site on CD21 is involved in CD23 binding and interleukin-4-induced IgE and IgG4 production by human B cells / Aubry J. P., Pochon S., Graber P., Jansen K. U., Bonnefoy J. Y. // *Nature*. — 1992. — Vol. 358. — P. 505—507.
14. CD38 expression and secondary 17p deletion are important prognostic factors in chronic lymphocytic leukemia / Chevalier P., Pen-ther D., Avet-Loiseau H., Robillard N., Ifrah N., Mahe B., Hamidou M., Maisonneuve H., Moreau P., Jardel H., Harousseau J. L., Bataille R., Ga-rand R. // *Br. J. Haematol.* — 2002. — Vol. 116. — P. 142—150.
15. CD38 expression correlates with adverse biological features and predicts poor clinical outcome in B-cell chronic lymphocytic leukemia / D'Arena G., Musto P., Cascavilla N., Dell'Olio M., Di Renzo N., Perla G., Savino L., Carotenuto M. // *Leukemia and Lymphoma*. — 2001. — Vol. 42, N 1—2. — P. 109—114.
16. CD38 expression is an important prognostic marker in chronic lymphocytic leukemia / Durig J., Naschan M., Schmucker U., Renzing-Kohler K., Holter T., Huttmann A., Duhren U. // *Leukemia*. — 2002. — Vol. 16, N 1. — P. 30—35.
17. Бялик Т. Е. Биологические маркеры как прогностические факторы при хроническом лимфолейкозе: Дис... канд. мед. наук. — М., 2004. — 185 с.
18. Typical and Atypical Chronic Lymphocytic Leukemia Differ Clinically and Immunophenotypically / Frater J. L., McCarron K. F., Ham-mel G. P., Shapiro J. L., Miller M. L., Tubbs R. R., Pettay J., Hsi E. D. // *Am. J. Clin. Pathol.* — 2001. — Vol. 116, N 5. — P. 655—664.
19. Prognostic relevance of the FAB morphological criteria in chronic lymphocytic leukemia: correlations with IgVh gene mutational status and other prognostic markers / Schwarz J., Mikulenkova D., Cermakova K., Polanska P., Michalova K., Marinov I., Campr V., Ransdorfova S., Mar-kova J., Pavlistova L., Brezinova J., Volkova Z., Benesova K., Cermak J., Vitec A., Cetkovsky P. // *Blood*. — 2006. — Vol. 53, N 3. — P. 219—225.
20. The immunological profile of B-cell disorders and proposal of a scoring system for the diagnosis of CLL / Matutes E., Owusu-Au-ko-mah K., Morilla R., Garcia-Marco J., Houlinan A., Que T. H., Cato-vsky D. // *Leukemia*. — 1994. — Vol. 8. — P. 1640—1645.
21. Clinico-prognostic relevance of quantitative immunophenotyp-ing in B-cell chronic lymphocytic leukemia with emphasis on the ex-pression of CD20 antigen and surface immunoglobulins / Molica S., Le-vato D., Dattilo A., Mannella A. // *Eur. J. Haematol.* — 1999. — Vol. 62, N 2. — P. 117—122.
22. Quantitative flow cytometry for the differential diagnosis of leu-kemic B-cell chronic lymphoproliferative disorders / D'Arena G., Mus-to P., Cascavilla N., Dell'Olio M., Di Renzo N., Carotenuto M. // *Am. J. Hematol.* — 2000. — Vol. 64. — P. 275—281.

Поступила 01.03.2009

*Anna Vladimirovna Shibinskaya¹, Marina Abramovna Frenkel²,
Natalia Alexandrovna Kupryshina³, Lyudmila Yurievna Grivtsova⁴,
Nikolay Nikolayevich Tupitsyn⁵*

IMMUNOPHENOTYPING OF B-CLL MORPHOLOGIC TYPES

¹ *Clinical Laboratory Diagnosis Physician, Clinical Diagnosis Laboratory, Hospital No. 58
(4, ul. Kirilkina, Severodvinsk, Arkhangelsk Region, 164504, Russian Federation)*

² *MD, PhD, Professor, Leading Researcher, Hemopoiesis Immunology Laboratory, Centralized Clinical
Laboratory Department, Clinical Oncology Research Institute, N. N. Blokhin RCRC RAMS
(24, Kashirskoye sh., Moscow, 115478, Russian Federation)*

³ *MD, PhD, Senior Researcher, Hemopoiesis Immunology Laboratory, Centralized Clinical Laboratory
Department, Clinical Oncology Research Institute, N. N. Blokhin RCRC RAMS
(24, Kashirskoye sh., Moscow, 115478, Russian Federation)*

⁴ *MD, PhD, Senior Researcher, Hemopoiesis Immunology Laboratory, Centralized Clinical Laboratory
Department, Clinical Oncology Research Institute, N. N. Blokhin RCRC RAMS
(24, Kashirskoye sh., Moscow, 115478, Russian Federation)*

⁵ *MD, PhD, Professor, Head, Hemopoiesis Immunology Laboratory, Centralized Clinical Laboratory
Department, Clinical Oncology Research Institute, N. N. Blokhin RCRC RAMS
(24, Kashirskoye sh., Moscow, 115478, Russian Federation)*

Address for correspondence: Frenkel Marina Abramovna, Hemopoiesis Immunology Laboratory, Centralized
Clinical Laboratory Department, Clinical Oncology Research Institute, N. N. Blokhin RCRC RAMS, 24,
Kashirskoye sh., Moscow, 115478, Russian Federation; e-mail: marinaf@rinet.ru

The purpose of this study was to identify and to characterize immunologically morphologic types of B-cell chronic lymphocytic leukemia. Study of bone marrow lymphoid population involving lymphocyte count and immunophenotyping was made in 155 patients with B-chronic lymphocytic leukemia. Typical (n = 83) and mixed cell (n = 72) types were identified, the latter was subdivided into chronic lymphocytic leukemia / prolymphocytic leukemia (n = 7) and atypical (n = 65) subtypes. The atypical B-chronic lymphocytic leukemia was characterized by high intensity of prognostically poor antigen CD38. Portion of cases with CD20 expression on more than 50% of cells was greater in the chronic lymphocytic leukemia / prolymphocytic leukemia group. Therefore, identification of B-cell chronic lymphocytic leukemia subtypes may be useful for disease prognosis and choice of adequate treatment policy.

Key words: B-cell chronic lymphocytic leukemia, lymphocyte count, immunophenotype, prolymphocyte, atypical lymphocyte.