

Использование клеточного биочипа в диагностике волосатоклеточного лейкоза

А.Н. Хвастунова^{1,2}, Л.С. Аль-Ради³, Н.М. Капранов^{2,3}, О.С. Федянина²,
Л.А. Горгидзе³, С.А. Луговская⁴, Е.В. Наумова⁴, У.Л. Джулакян³,
А.В. Филатов⁵, Ф.И. Атауллаханов¹⁻³, С.А. Кузнецова¹⁻³

¹ФГБУ ФНКЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева Минздрава России; Россия, 117198, Москва, ул. Саморы Машела, 1;

²Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН, Москва;
Россия, 119991, Москва, Ленинский просп., 38А, корп. 1;

³ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России; Россия, 125167, Москва, Новый Зыковский проезд, 4а;

⁴ГБОУ ДПО «Российская медицинская академия последипломного образования» Минздрава России;
Россия, 125993, Москва, ул. Баррикадная, 2/1;

⁵ФГБУ «Государственный научный центр «Институт иммунологии» ФМБА России;
Россия, 115478, Москва, Каширское шоссе, 24, корп. 2

Контакты: Алина Николаевна Хвастунова alina_shunina@mail.ru

В работе описано применение клеточного биочипа для параллельного исследования морфологии, активности тартрат-резистентной кислой фосфатазы и экспрессии различных поверхностных маркеров на лимфоцитах периферической крови 90 пациентов, поступивших для дообследования с подозрением на волосатоклеточный лейкоз (ВКЛ). Сформулированы критерии, позволяющие достоверно отличить типичный ВКЛ от вариантной формы ВКЛ (ВКЛ-В) и лимфомы из клеток маргинальной зоны селезенки (ЛКМЗС). Указанные критерии позволили предположить у 55 из обследованных пациентов типичную форму ВКЛ, у 7 больных — ВКЛ-В и ЛКМЗС — у 10 пациентов. Данные диагнозы, поставленные с помощью исследования на биочипе, были подтверждены стандартными методами диагностики во всех случаях. Таким образом, биочип может быть использован в дифференциальной диагностике ВКЛ. Высокая чувствительность метода позволяет обнаружить в крови опухолевые лимфоциты даже при глубокой лейкопении и малой доле ворсинчатых клеток.

Ключевые слова: клеточный биочип, волосатоклеточный лейкоз, вариантная форма волосатоклеточного лейкоза, лимфома из клеток маргинальной зоны селезенки, маркеры CD11c, CD25, CD103, CD123

DOI: 10.17650/1818-8346-2015-1-37-45

Cell-binding microarray application in diagnosis of hairy cell leukemia

A.N. Khvastunova^{1,2}, L.S. Al-Radi³, N.M. Kapranov^{2,3}, O.S. Fedyanina², L.A. Gorgidze³, S.A. Lugovskaya⁴,
E.V. Naumova⁴, U.L. Dzhulakyan³, A.V. Filatov⁵, F.I. Ataullakhanov¹⁻³, S.A. Kuznetsova¹⁻³

¹Federal Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology named after Dmitriy Rogachev,
Ministry of Health of Russia; 1 Samory Mashela St., Moscow, 117198, Russia;

²Theoretical Problems Center of Physical and Chemical Pharmacology, Russian Academy of Sciences;
38A, Bldg. 1 Leninskiy Pr., Moscow, 119991, Russia;

³Hematological Research Center, Ministry of Health of Russia; 4a Novo-Zykovskiy Pr-d, Moscow, 125167, Russia;

⁴Russian Medical Academy of Postgraduate Education, Ministry of Health of Russia;
2/1 Barrikadnaya St., Moscow, 125993, Russia;

⁵State Research Center "Institute of Immunology", Federal Medical and Biological Agency, Moscow;
24, Bldg. 2 Kashirskoe Shosse, Moscow, 115478, Russia

We describe an application of a cell-binding microarray — to parallel study of morphology, tartrate-resistant acid phosphatase activity and detection of surface markers on peripheral blood lymphocytes of 90 patients with suspected hairy cell leukemia (HCL). We have formulated the microarray-based diagnostic criteria for hairy cell leukemia, hairy cell leukemia variant (HCLv) and splenic marginal zone lymphoma (SMZL). According to these criteria we have suggested the presence of HCL for 55 patients, HCLv — for 7 patients and SMZL — for 10 patients from the studied cohort. These diagnoses were confirmed by standard diagnostic methods in all cases. These results show that the cell-binding microarray can be used in differential diagnosis of HCL, while the high sensitivity of the microarray permits to detect the leukemic cells in spite of leukopenia and low hairy cell content.

Key words: anti-CD antibody microarray, hairy cell leukemia, hairy cell leukemia variant, splenic marginal zone lymphoma, CD11c, CD25, CD103, CD123

Введение

Волосатоклеточный лейкоз (ВКЛ) — хроническое лимфопролиферативное заболевание, протекающее с вовлечением костного мозга и селезенки. ВКЛ составляет около 2 % всех лейкозов [1]. Характерными клиническими проявлениями ВКЛ являются цитопения, лимфоцитоз и спленомегалия, а наиболее значимым диагностическим признаком — присутствие в крови и костном мозге субстрата опухоли, клональных В-лимфоцитов с характерной морфологией и иммунофенотипом «ворсинчатых клеток» (ВК). Проточная цитометрия определяет ВК как клон В-лимфоцитов с характерным для ВКЛ иммунофенотипом: CD19⁺, CD20⁺, sIgG⁺, CD22⁺, CD11c⁺, CD103⁺, CD25⁺, CD123⁺. Ни один из перечисленных маркеров, однако, не является специфичным для ВКЛ, поскольку часть из них может встречаться на опухолевых клетках и при других хронических В-зрелоклеточных заболеваниях, в том числе вариантной форме ВКЛ (ВКЛ-В) [2], лимфоме из клеток маргинальной зоны селезенки (ЛКМЗС) [3]. В литературе описаны как случаи ВКЛ с CD103⁺ или CD25⁺ опухолевыми клетками [4], так и случаи CD11c⁺ и CD103⁺ других хронических лимфопролиферативных заболеваний [5]. Наличие лимфоцитов с выростами цитоплазмы, морфологически схожих с ворсинчатыми лимфоцитами, также свойственно не только ВКЛ, но и ВКЛ-В, и ЛКМЗС. Еще одним методом, используемым при дифференциальной диагностике ВКЛ, является определение активности в опухолевых клетках тартрат-резистентной кислой фосфатазы (TRAP) цитохимически или с помощью TRAP-специфичных моноклональных антител.

Дифференциальная диагностика типичной формы ВКЛ с ЛКМЗС и ВКЛ-В имеет большое значение, поскольку последние, в отличие от ВКЛ, резистентны к терапии интерфероном и аналогами пуринов (кладрибин и пентостатин). Для подтверждения диагноза «волосатоклеточный лейкоз» оптимально обнаружение в крови или костном мозге пациента всех характеристик ВК (характерной морфологии, активности TRAP и иммунофенотипа) одновременно, поскольку иммунофенотип и морфологические особенности клеток данных опухолей существенно перекрываются. Однако существующие на сегодняшний день диагностические методы не позволяют проводить данные исследования на одних и тех же клетках. Дифференциальный диагноз «волосатоклеточный лейкоз» в случае aberrантного иммунофенотипа или нестандартной морфологии может представлять существенную трудность. Данную проблему позволяет решить использование клеточного биочипа.

Биочип (рис. 1) представляет собой прозрачную пластиковую подложку, на которой иммобилизованы антитела к CD-антигенам лимфоцитов (рис. 1б). Биочип инкубируется с суспензией лимфоцитов. Лимфоциты, несущие определенный поверхностный антиген, связываются с иммобилизованными на биочипе

антителами к нему. После этого к связавшимся с биочипом клеткам применяются стандартные методы морфологической или цитохимической окраски, разработанные для мазков. На клеточном биочипе достигается высокая, по сравнению с мазком, поверхностная концентрация клеток, что дает возможность обнаруживать даже редко встречающиеся ВК (рис. 1ж). Кроме того, биочип позволяет «сортировать» клетки по их поверхностным антигенам, что обеспечивает проведение корреляции морфологии ВК с иммунофенотипом (рис. 1д).

Ранее было показано, что плотность связывания моноклеаров периферической крови с антителами к антигену CDx, нормированная на плотность связывания клеток на антителах положительного контроля, совпадает с долей клеток, положительных по CDx, в исследуемой клеточной суспензии, а морфология нормальных и патологических лимфоцитов периферической крови на биочипе совпадает с морфологией тех же клеток в стандартных мазках (А.Н. Хвастунова, С.А. Кузнецова, неопубликованные данные).

На основании литературных данных нами были сформулированы диагностические критерии для дифференциальной диагностики ВКЛ с помощью биочипа.

Целью данной работы была валидация критериев дифференциальной диагностики ВКЛ с помощью клеточного биочипа, а также исследование особенностей иммунофенотипа, морфологии и активности TRAP в популяции опухолевых лимфоцитов пациентов с подозрением на ВКЛ.

Пациенты и методы

Изготовление биочипов. На покровные стекла 22 × 22 мм и толщиной 0,2 мм из пластифицированного поливинилхлорида (Fisher Scientific, USA) наносили растворы моноклональных мышиных антител к CD2, CD3, CD5, CD7, CD10, CD16, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD38, CD45, CD56 (ООО «Сорбент», Москва), CD4, CD8, CD11c, CD13, CD14, CD15, CD25, CD33, CD41a, CD43, CD45ra, CD45ro, CD64, CD85j, CD103, CD123, CD200, CD235a, HLA-DR, IgM, κ и λ легким цепям Ig, а также смесь мышиных IgG (eBioscience, USA) в карбонат/бикарбонатном буфере, pH 9,4–9,6, в концентрации 0,25–0,50 мг/мл по 1 мкл/пятно, помещали во влажную камеру и выдерживали 14 ч при +4 °C, затем высушивали и инкубировали час с 6 % BSA (бычий сывороточный альбумин) в PBS (фосфатный буфер) при комнатной температуре, ополаскивали дистиллированной водой, высушивали и хранили при +4 °C.

Анализ лимфоцитов при помощи клеточного биочипа. Моноклеары периферической крови получали путем центрифугирования в градиенте плотности Histopaque-1077. Суспензию моноклеаров (5 × 10⁶ клеток/мл в PBS с 1 % BSA и 20 % эмбриональной телячьей сыворотки) наносили на биочип, инкубировали 30 мин при 4 °C, отмывали от неспецифически связавшихся клеток, высушивали и окрашивали по Паппенгейму.

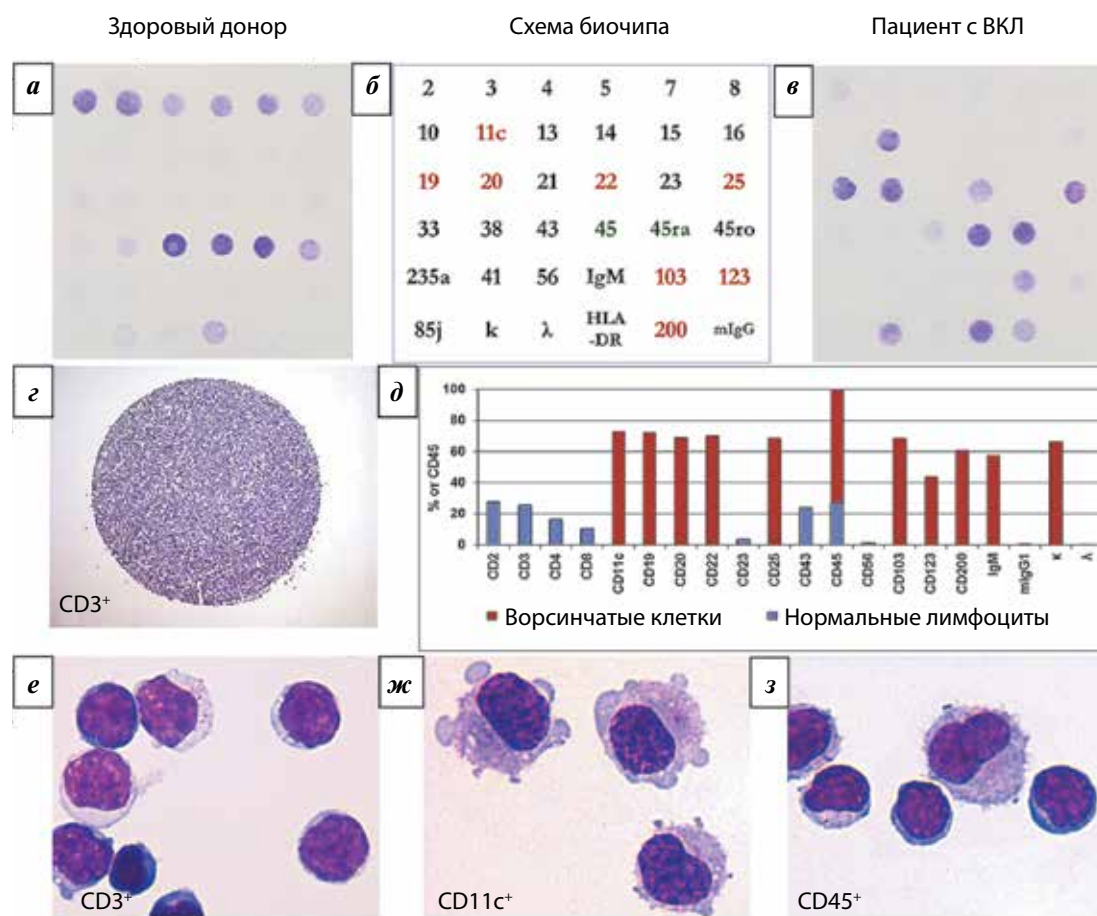


Рис. 1. Принцип работы биочипа: а — биочип со связавшимися мононуклеарами периферической крови здорового донора, окраска по Паппенгейму; б — схема расположения пятен антител на биочипе; в — биочип со связавшимися мононуклеарами периферической крови пациента с ВКЛ, окраска по Паппенгейму; г — фотография клеток, связавшихся с иммобилизованным антителом к CD3, окраска по Паппенгейму, увеличение $\times 40$; д — нормированная плотность связывания лимфоцитов периферической крови пациента с ВКЛ на биочипе, красные прямоугольники — ВК, синие прямоугольники — остальные клетки; е–з — морфологическая картина клеток, связавшихся с антителами к CD3 (е), CD11c (ж), CD45 (з), окраска по Паппенгейму, увеличение $\times 1000$

При определении иммунофенотипа лимфоцитов на биочипе процентное содержание клеток, экспрессирующих антиген CDx, определяли как плотность связывания клеток с анти-CDx на биочипе, нормированную на плотность связывания с анти-CD45. Плотность связывания клеток определялась подсчетом в программах ImageJ и CellProfiler.

Активность тартрат-резистентной кислой фосфатазы в лимфоцитах на биочипе определялась методом Гольдберга–Барки [6] с добавлением тартрата натрия в концентрации 7,5 мг/мл.

Пациенты и общая клиническая характеристика. В работе исследованы образцы периферической крови 90 пациентов с подозрением на ВКЛ. Основными клиническими признаками заболевания ВКЛ были панцитопения с лимфоцитозом и спленомегалия. Редко наблюдалось увеличение лимфатических узлов, и почти всегда это увеличение касалось не периферических, а внутри- и забрюшинных групп лимфоузлов в воротах печени и селезенки. Медиана возраста больных составила 54 (17–82) года. Среди пациентов 19 (21 %) были молодого возраста — от 17 до 45 лет. Наблюда-

лось преобладание лиц мужского пола с соотношением М:Ж 1,3:1. Лейкопения выявлена в 60 случаях, медиана уровня лейкоцитов составила $3,1 \times 10^9$ кл/л (с разбросом 0,7– 115×10^9 кл/л).

Диагностика. Диагноз «волосатоклеточный лейкоз» устанавливался в соответствии с утвержденным протоколом диагностики [7] на основании морфологического анализа периферической крови и пунктата костного мозга, гистологического исследования трепанобиоптата, определения TRAP в мазках крови или костного мозга цитохимическим методом, выявления мутации гена *BRAF V600E* методом полимеразной цепной реакции и результатов иммунофенотипирования лимфоцитов периферической крови или костного мозга.

Диагностические критерии волосатоклеточного лейкоза на клеточном биочипе. После инкубации мононуклеаров периферической крови каждого из пациентов с биочипом, отмывки и окраски исследовалась морфология клеток, связавшихся с каждым из иммобилизованных антител, и производился подсчет лимфоцитов с ворсинчатым или фестончатым краем цитоплазмы.

Для определения иммунофенотипа клеток с патологической морфологией сначала проводился подсчет данных клеток, связавшихся с анти-CD45 (положительный контроль), для определения размера опухоли. Опухолевые клетки считались положительными по маркеру CDx, если плотность клеток с патологической морфологией, связавшихся с анти-CDx, превышала 75 % от плотности данных клеток на положительном контроле. Клональность определялась по связыванию опухолевых клеток с антителами к kappa и lambda легким цепям иммуноглобулинов.

Диагностические критерии для ВКЛ, ВКЛ-В и ЛКМЗС на основе анализа лимфоцитов на биочипе были сформулированы на основании литературных данных о морфологии, цитохимии и иммунофенотипе лимфоцитов периферической крови при данных заболеваниях [5, 8–11] и были следующими. Диагноз «волосатоклеточный лейкоз» предполагался, если в крови обнаруживали моноклональную популяцию ВК на антителах к CD11c, CD103, CD25, CD123, CD19, CD20, CD22 и реакция на TRAP в ВК была положительной. ВКЛ-В предполагали в случае связывания опухолевых клеток с антителами к CD11c, CD103, CD19, CD20, CD22, отсутствия связывания с антителами к CD25, CD123 и отрицательной реакции на TRAP в опухолевых клетках. В случае, если популяция опухолевых клеток была морфологически разнородна, в части клеток наблюдалась вакуолизация в цитоплазме, отдельные клетки имели короткие цитоплазматические выросты [12] и опухолевые клетки были положительны по пан-В-клеточным маркерам CD19, CD20, CD22 и IgM, но не CD11c, CD103 и CD123, то предполагалось наличие у пациента ЛКМЗС.

Результаты исследования и их обсуждение

В работе были исследованы плотность связывания с биочипом, морфология и активность TRAP лимфоцитов периферической крови 90 пациентов с подозрением на ВКЛ. У 55 (61 %) больных на основании сформулированных выше диагностических критериев было предположено наличие ВКЛ. У 7 (8 %) пациентов опухолевые клетки отличались слабой экспрессией CD25 на опухолевых клетках и отсутствием активности TRAP, что соответствует предложенным критериям для ВКЛ-В. Десяти (11 %) больным был поставлен предварительный диагноз «лимфома из клеток маргинальной зоны селезенки». У оставшихся 18 пациентов результаты исследования клеток на биочипе не удовлетворяли предложенным нами диагностическим критериям ВКЛ, ВКЛ-В и ЛКМЗС, при этом у 12 (14 %) больных онкогематологических заболеваний выявлено не было.

При сравнении полученных результатов с окончательными диагнозами, поставленными на основании совокупности клинико-лабораторных диагностических методов, оказалось, что для всех 72 пациентов, которым на основании биочипа были поставлены

предварительные диагнозы «волосатоклеточный лейкоз» (55 больных), «вариантная форма волосатоклеточного лейкоза» (7 пациентов) или «лимфома из клеток маргинальной зоны селезенки» (10 больных), данные диагнозы подтверждены стандартной диагностикой. Для 12 пациентов, у которых при исследовании лимфоцитов периферической крови биочип не выявил отклонений от нормы, изменений при исследовании периферической крови стандартными методами также обнаружено не было. У оставшихся 6 больных были выявлены другие онкогематологические заболевания (хронический лимфолейкоз, острый миелобластный лейкоз, Т-клеточная лимфома). Это свидетельствует о том, что выбранные нами диагностические критерии работают и могут быть использованы при дифференциальной диагностике ВКЛ с помощью клеточного биочипа.

Общий иммунофенотип лимфоцитов. Для всех 90 пациентов, вошедших в исследование, с помощью биочипа определялась нормированная плотность связывания лимфоцитов на всех антителах панели биочипа. Используемая панель антител представлена на рис. 1б и включает как антитела к В- и Т-клеточным маркерам, так и к маркерам, используемым при дифференциальной диагностике ВКЛ: CD11c, CD25, CD103, CD123 [8, 9].

Среди пациентов с типичной формой ВКЛ у 25 больных из 55 вследствие небольшого количества опухолевых клеток (от 1 до 25 % всех лимфоцитов), плотности связывания лимфоцитов с антителами к маркерам Т- и В-лимфоцитов (CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD19, CD20, CD22) не отличались от плотностей связывания, полученных для лимфоцитов 55 здоровых доноров (рис. 2а, красные и синие столбики соответственно), а значимые отличия в плотности связывания по сравнению с нормой наблюдались только для антител к CD11c, CD25, CD103, CD123.

На рис. 2б приведены гистограммы иммунофенотипов лимфоцитов 10 пациентов с ЛКМЗС (синие столбики), 7 пациентов с ВКЛ-В (красные столбики) и 30 больных с типичной формой ВКЛ, для которых количество В-лимфоцитов превышало 25 % (зеленые столбики). Для всех 3 групп пациентов характерно значимое увеличение плотности связывания клеток с антителами к В-клеточным маркерам CD19, CD20 и CD22 по сравнению с нормой (рис. 2а, синие столбики). Для типичной и вариантной форм ВКЛ значимые различия по сравнению с нормой наблюдались в плотности связывания лимфоцитов с антителами к CD11c и CD103. Лимфоциты, связавшиеся с антителами к CD25 и CD123, были найдены в количестве, превышающем норму, только у больных с типичной формой ВКЛ.

Морфологические характеристики опухолевых клеток. В периферической крови всех пациентов с типичной формой ВКЛ была обнаружена популяция ВК, составлявшая от 1 до 97 % всех лимфоцитов (медиа-

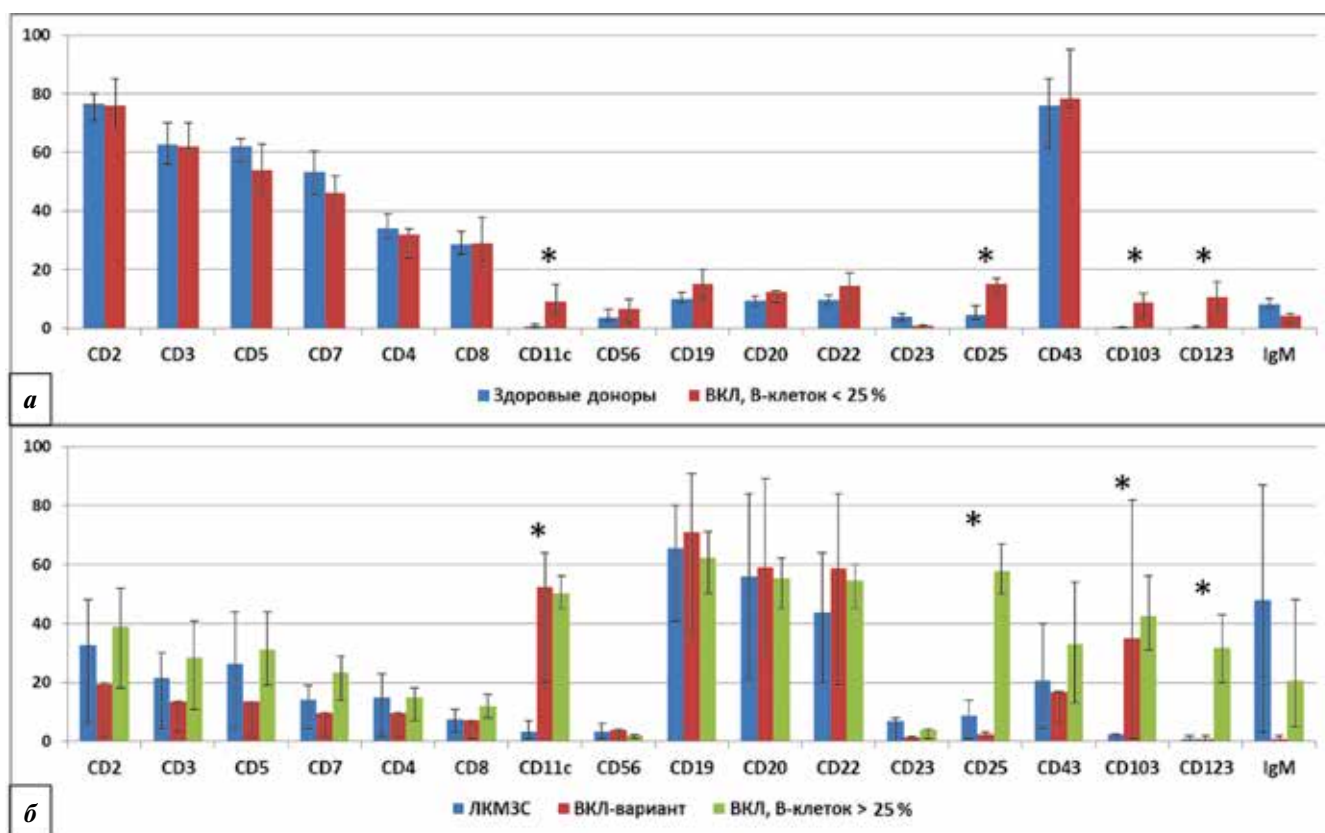


Рис. 2. Медианы относительной плотности связывания лимфоцитов периферической крови с различными антителами на биочипе: а — 55 здоровых доноров (синие столбики) и 25 пациентов с ВКЛ, для которых количество В-лимфоцитов не превышало 25 % (красные столбики); б — 10 пациентов с ЛКМЗС (синие столбики), 7 пациентов с ВКЛ-В (красные столбики) и 30 пациентов с типичным ВКЛ, для которых количество В-лимфоцитов превышало 25 % (зеленые столбики). Столбики обозначают значение медианы, усы — 10–90 % доверительный интервал. Звездочки показывают антигены, на антителах к которым наблюдалось значимое ($p < 0,01$) отличие в плотностях связывания клеток

на — 19 %). ВК представляли собой лимфоциты диаметром от 10 до 16 мкм со средним или большим количеством цитоплазмы бледно-голубого или серо-голубого цвета с неровным, ворсинчатым, изрезанным или фестончатым краем. Ядро клеток круглое, овальное, реже бобовидной или гантелевидной формы, иногда встречались двухядерные ВК; ядерный хроматин разрыхленный, деконденсированный (рис. 3а–в). У 12 из 55 пациентов с типичной формой ВКЛ (22 %) наблюдались крупные ворсинчатые лимфоциты с хроматином в виде толстых нитей и наличием видимых ядрышек (рис. 3г). Данные пациенты были либо на поздней стадии заболевания, либо ранее они получали курс терапии, не характерной для ВКЛ. У 6 больных данной группы ворсинчатые лимфоциты были положительны по CD10.

При ВКЛ-В у всех 7 пациентов опухолевые клетки в ПК были представлены клетками с короткими цитоплазматическими выростами, выпячиваниями цитоплазмы, расположенными неравномерно по контуру клетки (рис. 3д). Цитоплазма некоторых клеток была вакуолизирована. У всех пациентов в среднем в 20 % клеток визуализировалось одно округлое ядрышко. У 2 из 7 больных были обнаружены крупные ВК, как при типичной форме ВКЛ.

При ЛКМЗС опухолевые клетки в ПК были средних размеров с ядрами правильной округлой или овальной формы с рыхлой или глыбчатой структурой хроматина и широкой голубой цитоплазмой, часто с перинуклеарным просветлением, в редких случаях вакуолизированной. В среднем в 10 % клеток визуализировалось одно округлое ядрышко. У 2 из 10 пациентов у части опухолевых клеток цитоплазма образовывала короткие цитоплазматические выросты, локализованные, как правило, на одном из полюсов клетки (рис. 3е).

Цитохимическое определение тартрат-резистентной кислой фосфатазы в лимфоцитах. Для 84 пациентов проводилось цитохимическое определение TRAP в лимфоцитах периферической крови: в мазках у 26 % пациентов и у 74 % больных — с использованием клеточного биочипа. Сильная активность TRAP выявлялась в виде гранул ярко-красного цвета в цитоплазме лимфоцитов, слабая активность — в виде гомогенного розового окрашивания цитоплазмы. Цитохимическая активность TRAP была сильно положительной во всех 49 исследованных случаях типичного ВКЛ, лишь в единичных ВК наблюдалась слабая активность фермента (рис. 4б, в, е, ж). Цитохимическая реакция на биочипе не отличалась от цитохимической реакции в мазке (рис. 4д, е). Во всех 7 случаях ВКЛ-В (рис. 4з, з),

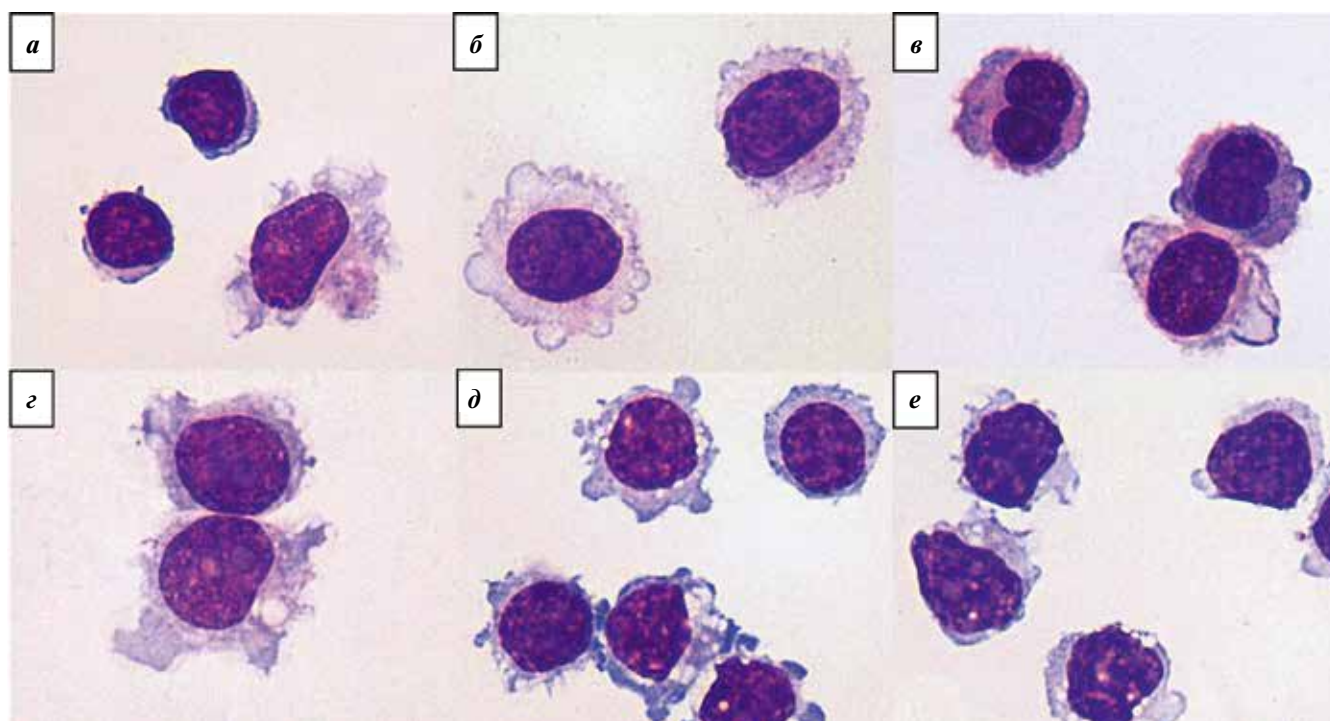


Рис. 3. Морфологическая картина лимфоцитов, связавшихся в пятнах биочипа: а – при типичной форме ВКЛ, связавшихся с антителом к CD45, и б–в – с анти-CD11с. На рисунке а можно видеть 2 нормальных лимфоцита (слева) и 1 ВК (справа); д – при ВКЛ-В, связавшихся с антителом к CD19; е – при ЛКМЗС – в пятне анти-CD19

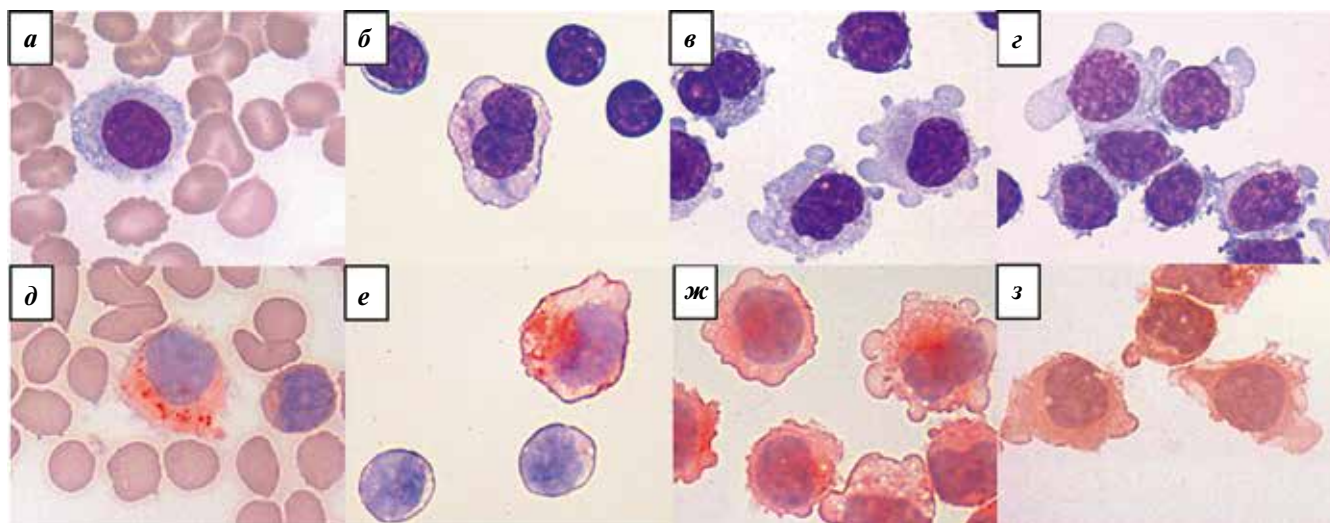


Рис. 4. Морфологическая и цитохимическая (реакция на TRAP) картины ворсинчатых лимфоцитов различных пациентов с ВКЛ: а, д – в мазке крови пациента Б. с типичным ВКЛ; б, е – в пятнах биочипа анти-CD45 пациента Е. с типичным ВКЛ можно видеть 2 нормальных лимфоцита, отрицательных по TRAP (внизу) и 1 положительную по TRAP ВК (вверху); в, ж – в пятнах биочипа анти-CD19 пациента Е. при типичном ВКЛ; г, з – в пятнах биочипа анти-CD19 пациента М. с ВКЛ-В

10 случаях ЛКМЗС и для 18 пациентов без онкогематологических нарушений или с другими диагнозами активности TRAP в опухолевых клетках выявлено не было.

Иммунофенотип опухолевых клеток. Особенности морфологии и иммунофенотипа опухолевых лимфоцитов периферической крови пациентов с ВКЛ, ВКЛ-В и ЛКМЗС представлены в таблице. Для типичной формы ВКЛ характерно связывание ВК с антителами

к В-клеточным антигенам CD19, CD20, CD22 и типичными для ВКЛ антителами к CD11с, CD25, CD103, CD123. В ряде случаев было обнаружено также связывание ВК с антителами к CD2 (10 %), CD5 (4 %), CD10 (24 %), CD23 (13 %), CD38 (4 %) и IgM (22 %), но одновременного связывания ВК с антителами к CD5 и CD23 обнаружено не было.

Опухолевые клетки периферической крови всех 7 пациентов с ВКЛ-В связывались с антителами к CD19,

Сравнение данных медиан количества лейкоцитов, процента опухолевых клеток, морфологического исследования, исследования иммунофенотипов лимфоцитов, частоты выявления мутации гена *BRAF V600E* и результатов реакции на *TRAP* опухолевых лимфоцитов пациентов с ВКЛ, ВКЛ-В и ЛКМЗС

№	Данные результатов различных исследований	Пациенты		
		типичная форма ВКЛ	ВКЛ-В	ЛКМЗС
1	Медиана количества WBC (диапазон), $\times 10^9$ кл/л	2 (0,7–26)	41 (3,4–115)	6 (2,2–110)
2	Медиана процента опухолевых клеток, % (диапазон)	19 (1–97)	87 (23–96)	70 (25–96)
3	Связывание опухолевых клеток с антителами к:			
	Kappa	45 %	57 %	60 %
	Lambda	55 %	43 %	40 %
	CD19	100 % (55/55)	100 % (7/7)	100 % (10/10)
	CD20	100 % (55/55)	100 % (7/7)	100 % (10/10)
	CD22	100 % (55/55)	100 % (7/7)	100 % (10/10)
	IgM	22 % (12/55)	0 % (0/7)	80 % (8/10)
	CD11c	100 % (55/55)	100 % (7/7)	20 % (2/10)
	CD103	98 % (54/55)	71 % (5/7)	10 % (1/10)
	CD123	96 % (22/23)	0 % (0/3)	0 % (0/10)
	CD2	9 % (5/55)	0 % (0/7)	0 % (0/10)
	CD5	4 % (2/55)	0 % (0/7)	0 % (0/10)
	CD10	24 % (13/55)	29 % (2/7)	0 % (0/10)
	CD23	13 % (7/55)	0 % (0/7)	10 % (1/10)
	CD38	4 % (2/55)	0 % (0/7)	30 % (3/10)
	CD25	100 % (55/55)	0 % (0/7)	10 % (1/10)
4	Положительная реакция на <i>TRAP</i>	100 % (49/49)	0 % (0/7)	0 % (0/10)
5	Мутация гена <i>BRAF V600E</i>	100 % (55/55)	0 % (0/7)	0 % (0/10)
6	Морфология клеток:			
	с ворсинчатым или фестончатым краем цитоплазмы	100 % (55/55)	27 % (2/7)	0 % (0/10)
	с короткими цитоплазматическими выростами, выпячиваниями	18 % (10/55)	100 % (7/7)	20 % (2/10)
	Процент ВК от общего количества клеток, связавшихся с антителом к:			
	CD11c	90 %	< 30 %	0 %
	CD103	90 %	< 30 %	0 %
	CD19	80 %	< 30 %	< 10 %

CD20, CD22 и CD11c. Основным отличием в иммунофенотипе опухолевых клеток при ВКЛ-В от типичной формы ВКЛ являлось отсутствие связывания патологических клеток при ВКЛ-В с анти-CD25 и анти-CD123. У 5 (71 %) пациентов опухолевые клетки были обнаружены на анти-CD103, у 2 (29 %) – на анти-CD10.

Во всех 10 случаях ЛКМЗС опухолевые клетки экспрессировали CD19, CD20, CD22. У части пациентов обнаружено связывание патологических лимфоцитов с антителами с CD11c (20 %), CD103 (10 %), CD25

(10 %), однако одновременного связывания с антителами к любым двум из указанных маркеров не наблюдалось. Иммунофенотипы опухолевых клеток всех пациентов с ВКЛ, ВКЛ-В, ЛКМЗС, полученные при исследовании на клеточном биочипе, включая aberrantную экспрессию CD5, CD10 и CD23, были подтверждены результатами проточной цитометрии. Исключение составлял маркер CD123, наличие которого было исследовано с помощью проточного цитометра лишь для небольшого числа пациентов.

Поскольку в норме CD11c и CD103 присутствуют на очень малых субпопуляциях лимфоцитов периферической крови [13], связывание нормальных лимфоцитов с антителами к данным маркерам практически отсутствует. Поэтому лимфоциты, связывающиеся с анти-CD11c и анти-CD103, представляют собой практически чистую популяцию опухолевых клеток, что упрощает их подсчет и морфологический анализ. Процент связавшихся клеток с антителами к CD11c и CD103 совпадал с долей ВК, обнаруженных при морфологическом исследовании лимфоцитов в пятнах анти-CD45, и с размером опухоли, определенным методом проточной цитометрии. У пациентов с ВКЛ доля ВК среди клеток, связавшихся с анти-CD11c и анти-CD103, составляла 70–100 % (см. таблицу). В то же время, для пациентов с ВКЛ-В доля лимфоцитов с цитоплазматическими выростами составляла менее 30 % общего количества клеток, связавшихся с антителами к данным маркерам, т. е. большинство опухолевых клеток при ВКЛ-В не являются ворсинчатыми. Отметим, что морфологическая разнородность опухолевых клеток при ЛКМЗС хорошо известна [14, 15], но для ВКЛ-В она показана впервые. Неоднородность морфологического состава CD11c⁺- и CD103⁺-лимфоцитов при ВКЛ-В может также быть использована при дифференциальной диагностике с типичной формой ВКЛ.

Маркер CD11c был обнаружен на опухолевых клетках всех пациентов с типичной и вариантной формами ВКЛ и у 20 % пациентов с ЛКМЗС в соответствии с литературными данными [9, 13, 16]. CD103 высокоспецифичный для типичной формы ВКЛ и, в меньшей степени, ВКЛ-В [5, 9, 13, 16] был обнаружен на поверхности опухолевых клеток 54 из 55 исследованных пациентов с ВКЛ и 5 из 7 пациентов с ВКЛ-В. CD25, по нашим данным (см. таблицу), является главным поверхностным маркером, отличающим ВКЛ от ВКЛ-В, что согласуется с данными литературы [9, 16].

CD123 в последнее время активно используется при диагностике лейкозов [17]. Показано, что во всех случаях стандартной формы ВКЛ опухолевые клетки положительны по CD123 с высокой экспрессией данного маркера [9–11], при ВКЛ-В CD123 присутствует на опухолевых клетках лишь в 40 % случаев, при

ЛКМЗС — менее чем в 25 % случаев и всегда с низким уровнем экспрессии [9, 10]. В нашей работе CD123⁺-опухолевые клетки были обнаружены в 96 % случаев типичного ВКЛ и не были обнаружены ни у одного из пациентов с ВКЛ-В или ЛКМЗС.

Для всех обследованных больных определялось также наличие в опухолевых клетках мутации *BRAF V600E*. Многочисленные исследования показывают, что из всех гемобластозов данная мутация характерна только для стандартной формы ВКЛ [18, 19]. В нашем исследовании все 55 пациентов с типичной формой ВКЛ были положительны по *BRAF V600E*, и в соответствии с литературными данными ни у одного из пациентов с ВКЛ-В и ЛКМЗС данная мутация не была обнаружена.

Заключение

Использование клеточного биочипа позволяет одновременно исследовать морфологические особенности опухолевых лимфоцитов, выявить активность TRAP и определить маркеры, присутствующие на поверхности клеток определенной морфологии или содержащие активную TRAP. Такой подход облегчает и ускоряет дифференциальную диагностику ВКЛ, ВКЛ-В и ЛКМЗС, в том числе и на ранних этапах развития заболевания, поскольку все диагностически значимые показатели определяются параллельно, в одном и том же образце, а высокая чувствительность описанного метода позволяет обнаружить опухолевые лимфоциты даже при глубокой лейкопении и малой доле ВК в крови.

Благодарности

Авторы признательны сотрудникам лаборатории молекулярной гематологии ФГБУ «Гематологический научный центр» и ее руководителю д.б.н. А. Б. Сударикову за предоставленные данные по наличию мутации *BRAF V600E* в опухолевых клетках исследованных пациентов. Мы также благодарны сотрудникам ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» за предоставленную возможность выполнения данных исследований, финансовую поддержку и проявленный интерес к работе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Swerdlow S. H., Campo E., Harris N. L. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. France: IARC Press, 2008.
2. Robak T. Hairy-cell leukemia variant: recent view on diagnosis, biology and treatment. *Cancer Treat Rev* 2011;37(1):3–10.
3. Iannitto E., Ambrosetti A., Ammatuna E. et al. Splenic marginal zone lymphoma with or without villous lymphocytes. Hematologic findings and outcomes in a series of 57 patients. *Cancer* 2004;101(9):2050–7.
4. Chen Y. H., Tallman M. S., Goolsby C. et al. Immunophenotypic variations in hairy cell leukemia. *Am J Clin Pathol* 2006;125(2):251–9.
5. Dong H. Y., Weisberger J., Liu Z. et al. Immunophenotypic analysis of CD103⁺ B-lymphoproliferative disorders: hairy cell leukemia and its mimics. *Am J Clin Pathol* 2009;131(4):586–95.
6. Goldberg A. F., Barka T. Acid phosphatase activity in human blood cells. *Nature* 1962;195:297.
7. Аль-Ради Л. С., Кравченко С. К. Протокол диагностики и лечения волосатоклеточного лейкоза в кн. «Программное лечение заболеваний системы крови» под ред. академика РАМН

- В.Г. Савченко, т. 2. М.: Практика, 2012. С. 497–514. [Al-Radi L.S., Kravchenko S.K. Diagnostic and treatment protocols of hairy cell leukemia. In: Treatment of Hematological Diseases. Ed.: prof. Savchenko V.G., Vol. 2. M.: Practice, 2012. Pp. 497–514. (In Russ.)].
8. Matutes E. Immunophenotyping and differential diagnosis of hairy cell leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am* 2006;20(5):1051–63.
9. Shao H., Calvo K.R., Grönborg M. et al. Distinguishing hairy cell leukemia variant from hairy cell leukemia: Development and validation of diagnostic criteria. *Leukemia Research* 2013;37(4):401–9.
10. Venkataraman G., Aguhar C., Kreitman R.J. et al. Characteristic CD103 and CD123 expression pattern defines hairy cell leukemia: usefulness of CD123 and CD103 in the diagnosis of mature B-cell lymphoproliferative disorders. *Am J Clin Pathol* 2011;136(4):625–30.
11. Del Giudice I., Matutes E., Morilla R. et al. The diagnostic value of CD123 in B-cell disorders with hairy or villous lymphocytes. *Haematologica* 2004;89(3):303–8.
12. Луговская С.А., Почтарь М.Е. Гематологический атлас. Тверь: Триада, 2011. 368 с. [Lugovskaya S.A., Pochtar M.E. Atlas of Hematology. Tver: Triada, 2011. 368 pp. (In Russ.)].
13. Ortolani C. Flow cytometry of hematological malignancies. John Wiley & Sons, 2011.
14. Thieblemont C., Felman P., Callet-Bauchu E. et al. Splenic marginal-zone lymphoma: a distinct clinical and pathological entity. *Lancet Oncol* 2003;4(2):95–103.
15. Oscier D., Owen R., Johnson S. Splenic marginal zone lymphoma. *Blood Rev* 2005;19(1):39–51.
16. Bain B.J. Leukemia Diagnosis, 4th edition. Wiley-Blackwell, 2010. 402 p.
17. Liu K., Zhu M., Huang Y. et al. CD123 and its potential clinical application in leukemias. *Life Sci* 2015; 122C:59–64.
18. Blombery P.A., Wong S.Q., Hewitt C.A. et al. Detection of BRAF mutations in patients with hairy cell leukemia and related lymphoproliferative disorders. *Haematologica* 2012;97(5):780–3.
19. Wang X.J., Kim A., Li S. Immunohistochemical analysis using a *BRAF V600E* mutation specific antibody is highly sensitive and specific for the diagnosis of hairy cell leukemia. *Int J Clin Exp Pathol* 2014;7(7):4323–8.