

# Особенности морфологии и иммунофенотипа опухолевых клеток лимфомы из клеток маргинальной зоны селезенки (исследование с помощью клеточного биочипа)

А.Н. Хвастунова<sup>1,2</sup>, Л.С. Аль-Ради<sup>3</sup>, О.С. Федянина<sup>1,2</sup>, У.Л. Джулакян<sup>3</sup>, Н.М. Капранов<sup>2,3</sup>,  
А.О. Закирова<sup>1,2</sup>, С.А. Луговская<sup>4</sup>, Е.В. Наумова<sup>4</sup>, Ф.И. Атауллаханов<sup>1,2</sup>, С.А. Кузнецова<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Лаборатория биофизики ФГБУ «Национальный научно-практический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России; Россия, 117997 Москва, ул. Саморы Машела, 1;

<sup>2</sup>Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН; Россия, 119991 Москва, ул. Косыгина, 4;

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

<sup>4</sup>ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России; Россия, 125993 Москва, ул. Баррикадная, 2/1, стр. 1

**Контакты:** Алина Николаевна Хвастунова [alina\\_shunina@mail.ru](mailto:alina_shunina@mail.ru)

В работе исследованы морфология и иммунофенотип циркулирующих опухолевых клеток, выделенных из периферической крови 22 пациентов с лимфомой из клеток маргинальной зоны селезенки, и показана их морфологическая и иммунофенотипическая гетерогенность. С помощью клеточного биочипа показано, что опухолевые клетки положительны по CD19 (100 %), CD20 (100 %), CD22 (100 %), поверхностному IgM (73 %), CD38 (23 %), CD5 (9 %), CD11c (36 %), CD103 (5 %), CD25 (32 %), CD23 (23 %), и полученные иммунофенотипы подтверждены результатами проточной цитометрии для каждого из пациентов. Высокая плотность связывания лимфоцитов на клеточном биочипе по сравнению с мазком позволяет выявить клетки с патологической морфологией даже при глубокой лейкопении.

**Ключевые слова:** клеточный биочип, лимфома из клеток маргинальной зоны селезенки, морфологический анализ, иммунофенотип, маркеры CD5, CD11c, CD23, CD25, CD103

DOI: 10.17650/1818-8346-2017-12-1-71-77

## Determination of morphology and immunophenotype of circulating lymphoma cells in patients with splenic marginal zone lymphoma using an anti-CD antibody microarray

A.N. Khvastunova<sup>1,2</sup>, L.S. Al-Radi<sup>3</sup>, O.S. Fedyanina<sup>1,2</sup>, U.L. Julhakyan<sup>3</sup>, N.M. Kapranov<sup>2,3</sup>,  
A.O. Zakirova<sup>1,2</sup>, S.A. Lugovskaya<sup>4</sup>, E.V. Naumova<sup>4</sup>, F.I. Ataulakhonov<sup>1,2</sup>, S.A. Kuznetsova<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Biophysics, National Scientific and Practical Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology named after Dmitry Rogachev, Ministry of Health of Russia; 1 Samory Mashela St., Moscow 117997, Russia;

<sup>2</sup>Theoretical Problems Center of Physical and Chemical Pharmacology RAS; 4 Kosygina St., Moscow 119991, Russia;

<sup>3</sup>Hematological Research Center; 4A, Noviy Zykovsky Proezd, Moscow, Russia, 125167

<sup>4</sup>Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Ministry of Health of Russia; 2/1 Bild. 1 Barrikadnaya St., Moscow 125993, Russia

We have studied the morphology and immunophenotype of circulating tumor cells isolated from peripheral blood of 22 patients with splenic marginal zone lymphoma and show that both of them are highly heterogeneous. Using a cell-binding microarray we have demonstrated that the circulating lymphoma cells are positive for CD19 (100 %), CD20 (100 %), CD22 (100 %), surface IgM (73 %), CD38 (23 %), CD5 (9 %), CD11c (36 %), CD103 (5 %), CD25 (32 %), CD23 (23 %) and these immunophenotypes are confirmed in all cases by flow cytometry. Higher surface density of lymphocyte binding onto anti-CD antibody microarray spots compared to blood smears permits to find circulating lymphoma cells even in leukopenic patients.

**Key words:** anti-CD antibody microarray, splenic marginal zone lymphoma, morphology, immunophenotype, CD5, CD11c, CD23, CD25, CD103

### Введение

Лимфома из В-клеток маргинальной зоны селезенки (ЛКМЗС) составляет около 1 % всех лимфоидных опухолей. Впервые это заболевание было описано R.A. Hickling в 1961 г. и G. Duhamel и соавт. в 1978 г. В 1982 г. А.И. Воробьев и М.Д. Бриллиант выделили ЛКМЗС как самостоятельную нозологическую фор-

му [1]. Заболевание чаще всего возникает у больных в возрасте старше 50 лет и характеризуется опухолевой пролиферацией В-лимфоцитов в зародышевых центрах белой пульпы селезенки. Ведущими симптомами являются выраженная спленомегалия и поражение костного мозга и крови без вовлечения перифериче-

ских лимфатических узлов. У 50 % больных ЛКМЗС в периферической крови наблюдаются умеренная анемия, тромбоцитопения и лейкоцитоз, редко превышающий  $25 \times 10^9/\text{л}$  [2].

Обычно опухолевые клетки представлены атипичными лимфоцитами среднего и большого размера, имеющими округлое ядро, часто с вмятинами, расщепленное, с глыбчатой или сглаженной структурой хроматина, возможно, с наличием ядрышек. Цитоплазма этих клеток широкая, голубого цвета с перинуклеарным просветлением, может иметь тонкие короткие выросты, часто локализованные на одном из полюсов клетки, или широкие выпячивания цитоплазмы на противоположных полюсах клетки [2–4]. В цитоплазме может наблюдаться вакуолизация. Если в крови более 20 % лимфоцитов имеют выросты цитоплазмы, то речь идет о ЛКМЗС с ворсинчатыми клетками [2]. Однако наличие лимфоцитов с выростами цитоплазмы свойственно также волосатоклеточному лейкозу (ВКЛ), его вариантной форме ВКЛ-В [5, 6] и мелкоклеточной лимфоме из клеток красной пульпы селезенки (ЛКПС) [7–10].

Для опухолевых клеток ЛКМЗС характерна экспрессия поверхностных иммуноглобулинов (Ig) классов IgM<sup>+</sup>, IgD<sup>+/–</sup>, экспрессия маркеров CD19<sup>+</sup>, CD20<sup>+</sup>, CD22<sup>+</sup>, CD24<sup>+</sup>, CD79a<sup>+</sup>, FMC7<sup>+</sup> [2, 11–13]. Как правило, опухолевые клетки не экспрессируют CD5, CD10, CD23, CD43 и CD103 [11]. Активационные

маркеры CD25 и CD38 либо не экспрессируются, либо определяются в небольшом числе клеток [12]. Может встречаться экспрессия маркера CD5 (у 12–50 % пациентов, по данным F. Berger и соавт. [11]). Известны случаи, когда опухолевые клетки экспрессировали маркер CD103 [14], CD23 (в 10–31 % случаев) [11], а в работе E. Matutes и соавт. [12] указано, что экспрессия CD11c может встречаться в 50 % случаев и более.

Таким образом, необходимо отличать ЛКМЗС от хронического В-клеточного лимфолейкоза (В-ХЛЛ), лимфомы из клеток мантийной зоны, ВКЛ и ВКЛ-В, ЛКПС и др. Морфологическое и иммунофенотипическое сходство ЛКМЗС с указанными лимфопролиферативными заболеваниями, протекающими с преимущественной спленомегалией, создает трудности в ее диагностике.

Ранее мы показали, что клеточный биочип дает заметное преимущество в диагностике гемобластозов, сопровождающихся лейкопенией [15, 16]. На биочипе достигается высокая, по сравнению с мазком, поверхностная концентрация клеток (рис. 1в), что дает возможность обнаружить даже редкие опухолевые клетки. Кроме того, биочип позволяет «сортировать» клетки по их поверхностным антигенам (рис. 1а, б), благодаря чему можно провести корреляцию морфологии опухолевых клеток с иммунофенотипом (рис. 1е) [15, 16]. Таким образом, биочип оказывается чрезвычайно

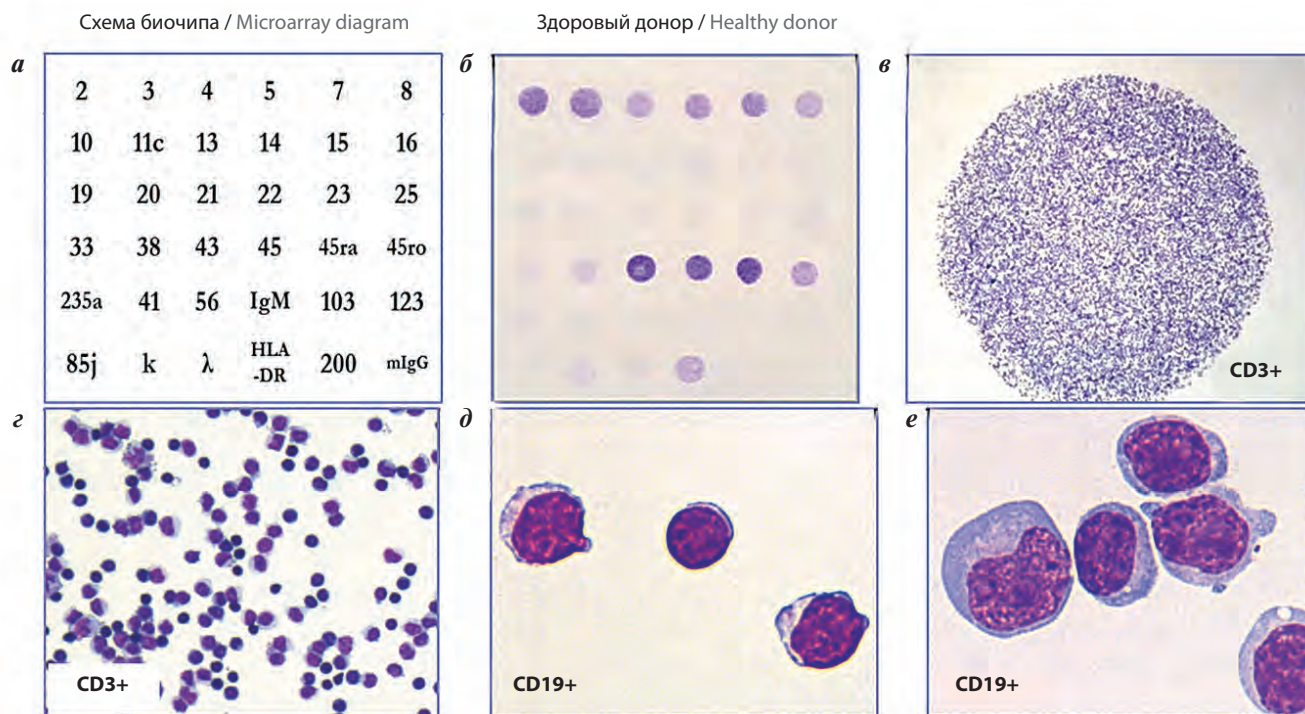


Рис. 1. Принцип работы биочипа: а – схема расположения пятен антител на биочипе; б – биочип со связавшимися мононуклеарами периферической крови здорового донора; в, г – морфология клеток, связавшихся с иммобилизованным антителом к CD3, при  $\times 40$  (в),  $\times 200$  (г); д, е – морфология клеток, связавшихся с антителами к CD19 (при  $\times 1000$ ), у здорового донора (д), у пациента с лимфомой из В-клеток маргинальной зоны селезенки (е). Окрасивание по Паппенгейму

Fig. 1. Microarray design: а – diagram of antibody spots on the microarray; б – microarray with bound peripheral blood mononuclear cells of a healthy donor; в, г – morphology of cells bound to immobilized CD3 antibodies at magnification  $\times 40$  (в),  $\times 200$  (г); д, е – morphology of cells bound to CD19 antibodies (at  $\times 1000$ ), in a healthy donor (д), in patient with splenic marginal zone lymphoma (е). Papanicolaou stain

удобным инструментом для исследования опухолевой популяции клеток, имеющей определенный иммунофенотип, а следовательно, и для проведения дифференциальной диагностики заболеваний со схожей морфологией опухолевых клеток.

Цель данной экспериментальной исследовательской работы — детальное изучение морфологических характеристик и иммунофенотипа опухолевых клеток при ЛКМЗС с помощью разработанного в нашей группе клеточного биочипа.

### Материалы и методы

Исследование проводилось на базе лаборатории биофизики на базе ФГБУ «Национальный научно-практический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Д. Рогачева» Минздрава России. Исследование с помощью биочипа выполняли А.Н. Хвастунова, С.А. Кузнецова, О.С. Федянина, Н.М. Капранов, А.О. Закирова, Ф.И. Атауллаханов и С.А. Кузнецова — руководители работы.

Кровь пациентов поступила из ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России при участии врачей Л.С. Аль-Ради и У.Л. Джулакяна.

Иммунофенотипы опухолевых лимфоцитов всех исследованных пациентов подтверждены результатами проточной цитометрии, которые предоставили С.А. Луговская и Е.В. Наумова (ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России).

**Пациенты.** В работе исследованы образцы периферической крови 22 пациентов с диагнозом ЛКМЗС. Медиана возраста больных составила 64 года (51–78 лет). Наблюдалось преобладание лиц женского пола с соотношением 1 : 2. Во всех случаях были выявлены спленомегалия, лимфоцитоз. Лейкопения встречалась в 2/3 случаев, медиана количества лейкоцитов в общем анализе крови составляла  $7,3 \times 10^9/\text{л}$  (с разбросом от  $2 \times 10^9/\text{л}$  до  $28 \times 10^9/\text{л}$ ).

### Анализ лимфоцитов с помощью клеточного биочипа.

Клеточный биочип — прозрачная пластиковая подложка размером  $22 \times 22$  мм из пластифицированного поливинилхлорида (Fisher Scientific, США), на которой иммобилизованы антитела к следующим CD-антигенам лейкоцитов: 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, CD45R0, CD64, CD85j, CD103, CD123, CD200, CD235a, HLA-DR, IgM,  $\kappa$  и  $\lambda$  легким цепям Ig, а также смесь мышиных IgG (eBioscience, США) (см. рис. 1а).

Биочип инкубировался 30 мин при  $4^\circ\text{C}$  с суспензией мононуклеарных клеток, полученной путем центрифугирования в градиенте плотности Histopaque-1077 из периферической крови:  $5 \times 10^6$  клеток/мл в фосфатном буфере (PBS) с 1 % бычьего сывороточного альбумина (BSA) и 20 % эмбриональной телячьей сыворотки. Лимфоциты, несущие опре-

деленный поверхностный антиген, связывались с иммобилизованными на биочипе антителами. Далее биочип отмывали от неспецифически связавшихся клеток, высушивали и окрашивали по Паппенгейму (см. рис. 1б).

**Морфологическое исследование клеток** проводили с помощью микроскопа Olympus BX45 с фотокамерой SP10.0238 Moticam 1300. При этом исследовали от 200 до 500 клеток, связавшихся с каждым из антител, иммобилизованных на биочипе.

**Определение иммунофенотипа клеток с патологической морфологией.** Поскольку маркер CD19 присутствует на поверхности всех В-лимфоцитов, то клетки, связавшиеся с антителом к CD19, представляли собой чистую популяцию В-клеток, значительно обогащенную опухолевыми лимфоцитами. Поэтому морфологическое исследование опухолевых клеток и определение размера опухолевой популяции проводили для лимфоцитов, связавшихся на биочипе с анти-CD19. Опухолевые клетки считали положительными по маркеру CDx, если плотность клеток с патологической морфологией, связавшихся с анти-CDx, превышала 75 % от плотности данных клеток на анти-CD19. Клональность определяли по связыванию опухолевых клеток с антителами к легким  $\kappa$ - и  $\lambda$ -цепям Ig.

### Результаты и обсуждение

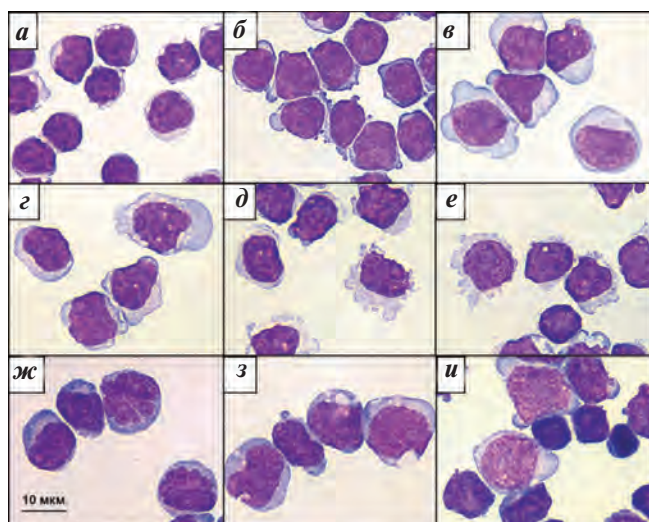
**Морфологические характеристики опухолевых клеток.** В периферической крови всех 22 пациентов с ЛКМЗС были обнаружены опухолевые клетки в количестве от 22 до 96 % (медиана 66 %) от всех лимфоцитов.

У 11 пациентов (50 %) морфология опухолевых клеток была представлена лимфоцитами малых и средних размеров диаметром 8–12 мкм, со зрелой глыбчатой или сглаженной структурой хроматина, округлой или овальной формой ядра (рис. 2а, б), а также пролимфоцитами, которые составляли от 6 до 25 % от всех В-клеток. У других 11 пациентов (50 %) опухолевые клетки имели морфологию широкоплазменных лимфоцитов диаметром 12–18 мкм, с округлой или овальной формой ядра, рыхлой или сглаженной структурой хроматина, светло-голубой цитоплазмой и перинуклеарным просветлением (рис. 2в, г).

У 5 пациентов (23 %) были также обнаружены клетки с фестончатым краем цитоплазмы (рис. 2д) или с короткими цитоплазматическими выростами или выпячиваниями, часто расположенными неравномерно по контуру клетки (рис. 2е). Данная морфология клеток больше характерна для ВКЛ, ВКЛ-В или ЛК-ПС. Однако ворсинчатые клетки были обнаружены в небольшом количестве (от 6 до 33 % всех CD19<sup>+</sup> В-лимфоцитов), и только у 2 из 5 пациентов они были найдены среди клеток, связавшихся с антителами к CD11c, CD25.

У 9 пациентов (41 %) примерно в трети опухолевых клеток (медиана 30 %) отмечена вакуолизация цитоплазмы (см. рис. 2з).





**Рис. 2.** Морфологические варианты опухолевых клеток, связавшихся в пятнах биочипа анти-CD19 при лимфоме из В-клеток маргинальной зоны селезенки. Окрасивание по Паппенгейму,  $\times 1000$ : а — малые зрелые лимфоциты (пациент К.); б — средние лимфоциты с гомогенной структурой хроматина (пациент В.); в — широкоплазменные лимфоциты с перинуклеарным просветлением и сглаженной структурой хроматина (пациент О.); г — лимфоциты с вакуолизированной цитоплазмой (пациент С.); д — лимфоцит с фестончатым краем цитоплазмы среди лимфоцитов (пациент А.); е — лимфоциты с закругленными отростками цитоплазмы (пациент М.); ж — широкоплазменные лимфоциты с перинуклеарным просветлением, сглаженной структурой хроматина, трещинами в ядре (пациент П.); з — широкоплазменные лимфоциты с одиночными ядрышками в ядре (пациент Р.); и — зрелые лимфоциты малых размеров, пролимфоциты и опухолевые лимфоциты с широкой цитоплазмой, волокнистым хроматином и крупными светлыми округлыми ядрышками (пациент Ш.)

Fig. 2. Morphological variants of tumor cells bound to anti-CD19 microarray spots in splenic marginal zone lymphoma. Papanicolaou stain,  $\times 1000$ : а — small mature lymphocytes (patient K.); б — intermediate-size lymphocytes with homogenous structure of chromatin (patient V.); в — mononuclear lymphocytes with clear perinuclear area and smoothed chromatin structure (patient O.); г — lymphocytes with vesicularized cytoplasm (patient S.); д — lymphocyte with scalloped cytoplasm margin among other lymphocytes (patient A.); е — lymphocytes with rounded cytoplasm projections (patient M.); ж — mononuclear lymphocytes with clear perinuclear area, smoothed chromatin structure, cracks in the nucleus (patient P.); з — mononuclear lymphocytes with solitary nucleoli in the nucleus (patient R.); и — small mature lymphocytes, prolymphocytes and tumor lymphocytes with wide cytoplasm, fibrous chromatin, and large light rounded nucleoli (patient Sh.)

У 7 пациентов (32 %) в среднем в 20 % CD19<sup>+</sup> клеток визуализировалось 1 округлое ядрышко (рис. 2з), и у 2 из этих пациентов среди циркулирующих опухолевых клеток присутствовали лимфоциты с базофильной цитоплазмой, волокнистым или в виде толстых нитей хроматином и крупными светлыми округлыми ядрышками (от 1 до 4 в ядре) (рис. 2и). У 2 пациентов наблюдались клетки с омоложенной, бластоподобной структурой хроматина. Среди клеток, содержащих четкие, видимые ядрышки, встречались двоядерные лимфоциты, клетки с дольчатой, бобовидной, гантелевидной формой ядра или с тонкими расщелинами в ядре (рис. 2жс).

В целом данные о морфологической разнородности опухолевых клеток при ЛКМЗС на биочипе

хорошо согласуются с литературой [3, 17, 18]. Использование клеточного биочипа значительно упрощает поиск опухолевых клеток за счет их концентрирования в пятнах антител, облегчая подсчет и морфологический анализ.

**Иммунофенотип опухолевых клеток.** В работе была использована достаточно широкая панель антител, включающая в себя антитела к В- и Т-клеточным маркерам и маркерам, используемым при дифференциальной диагностике ЛКМЗС: CD5, CD11c, CD23, CD25, CD103 и др. (см. рис. 1а). Иммунофенотип клеток с патологической морфологией определяли на биочипе по их присутствию в пятнах соответствующих антител.

Результаты исследования особенностей иммунофенотипа опухолевых лимфоцитов представлены в таблице. Во всех 22 случаях ЛКМЗС опухолевые клетки экспрессировали CD19 (100 %), CD20 (100 %), CD22 (100 %) и были отрицательны по CD2, CD10, CD123, у части пациентов было показано связывание опухолевых клеток с анти-IgM (73 %), анти-CD38 (23 %). При определении клоальности соотношение к и  $\lambda$  клонов составило 55 и 45 % соответственно. У некоторых пациентов было обнаружено связывание опухолевых клеток с антителами к CD5 (9 %), CD11c (36 %), CD103 (5 %), CD25 (32 %), CD23 (23 %). Иммунофенотипы опухолевых клеток всех пациентов с ЛКМЗС, полученные при исследовании на клеточном биочипе, включая aberrantную экспрессию маркеров, были подтверждены результатами проточной цитометрии.

Экспрессия маркера CD5 является типичной для В-ХЛЛ и лимфомы из клеток мантийной зоны. Тем не менее она может встречаться и при ЛКМЗС с частотой от 12 до 50 % случаев, по данным различных исследований [5, 11]. В некоторых наблюдениях наличие CD5 коррелировало с плохим прогнозом, таким как бластная трансформация [21], резистентность к терапии [22] и присутствие делеции в коротком плече хромосомы 17 [23]. В некоторых случаях сообщалось о коэкспрессии CD5, CD23 и CD43 в опухолевых клетках при ЛКМЗС, что имитирует классический иммунофенотип опухоли при В-ХЛЛ [11].

В нашей работе опухолевые клетки, положительные по CD5, были найдены у 2 пациентов. Приведем данные исследования одной из них.

**Большая Ш., 52 года, с ЛКМЗС с трансформацией в диффузную В-клеточную крупноклеточную лимфому с вовлечением висцеральных и периферических лимфоузлов, костного мозга с лейкокемизацией.** Общий анализ крови: гемоглобин — 148 г/л, эритроциты —  $5 \times 10^{12}$ /л, тромбоциты —  $344 \times 10^9$ /л, лейкоциты —  $20 \times 10^9$ /л, лимфоидные клетки — 50 %. В периферической крови популяция опухолевых В-клеток с иммунофенотипом CD5<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>, CD20<sup>+</sup>, CD22<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup>, CD38<sup>+</sup>, CD11c<sup>-</sup>, CD23<sup>-</sup>, CD103<sup>-</sup> составляла 88 %. Клеточный состав был

полиморфен. Наряду со зрелыми лимфоцитами малых размеров и пролимфоцитами присутствовало 20 % клеток с омоложенным хроматином бластоподобной структуры (см. рис. 2и).

L. Baseggio и соавт. показали, что пациенты с CD5<sup>+</sup>-опухолевыми клетками составляют подгруппу ЛКМЗС с более высоким лимфоцитозом и большим количеством клональных В-лимфоцитов в периферической крови [24]. Циркулирующий в периферической крови субстрат опухоли у данной подгруппы пациентов морфологически разнороден и представлен малыми лимфоцитами, центроцитоподобными и лимфоплазмацитоидными клетками, лимфоцитами с короткими выростами цитоплазмы на одном из полюсов клетки и крупными лимфоцитами с широкой бледно окрашенной цитоплазмой и омоложенным хроматином (схожие с показанными на рис. 2в, з) [24], что хорошо согласуется с нашими данными. Клетки с ядрышками, обнаруженные у пациентки Ш. (см. рис. 2и), в работе L. Baseggio и соавт. [24] не были обнаружены.

В нашем исследовании антигены CD10 и CD123 не были выявлены ни у одного из пациентов. В литературе описаны единичные случаи CD10<sup>+</sup> ЛКМЗС [11] и показано, что при ЛКМЗС опухолевые клетки могут быть положительными по CD123 менее чем в 25 % случаев, но всегда с низким уровнем экспрессии [5, 25].

Ранее было показано, что маркер CD11c всегда присутствует на опухолевых клетках при ВКЛ и ВКЛ-В [3, 5], в большинстве случаев (до 50 %) — при ЛКМЗС [12, 19] и изредка экспрессируется на поверхности опухолевых клеток при В-ХЛЛ и лимфоме из клеток мантийной зоны [26]. В нашей работе у 36 % пациентов с ЛКМЗС опухолевые клетки экспрессировали CD11c. Одновременное связывание опухолевых клеток с антителами к CD11c и CD103 не наблюдалось ни у одного из пациентов.

Маркер CD23, как правило, используется в дифференциальной диагностике В-ХЛЛ с лимфомой из клеток мантийной зоны, но при ЛКМЗС опухолевые клетки также могут экспрессировать данный антиген в 10–31 % случаев [11, 12], что коррелирует с отсутствием del7q31 [27]. В данном исследовании опухолевые клетки CD23<sup>+</sup> были найдены в 23 % случаев (у 5 пациентов из 22), что хорошо согласуется с данными F. Berger и соавт. и E. Matutes и соавт. [11, 12].

При ЛКМЗС с ворсинчатыми лимфоцитами экспрессия маркеров CD23 и CD11c является взаимоисключающей, что было показано D. Treton и соавт. [28]. В нашем исследовании также ни у одного из пациентов опухолевые клетки не связывались одновременно с антителами к CD23 и CD11c.

В публикациях показано, что антиген CD25 всегда обнаруживают на поверхности опухолевых клеток при ВКЛ и никогда при ВКЛ-В [3, 5] или ЛКПС [7, 10], а при ЛКМЗС маркер CD25 выявляется в 25 % случаев [12]. В данном исследовании экспрессия CD25

на опухолевых клетках при ЛКМЗС была обнаружена в 32 % (7/22) случаев, что хорошо согласуется с результатами E. Matutes и соавт. [12].

По данным литературы, CD38 экспрессируется на поверхности опухолевых клеток при ЛКМЗС в 22–30 % случаев [5, 12], и его наличие на опухолевых клетках характеризует подгруппу ЛКМЗС с более агрессивным течением [29]. Среди исследованных нами пациентов маркер CD38 на опухолевых клетках встречался с частотой 23 % (5/22).

CD103 является высокоспецифичным маркером типичной формы ВКЛ и в меньшей степени — ВКЛ-В [3, 5, 14, 26], но может встречаться и при других лимфопрлиферативных заболеваниях [14]. По данным литературы [12, 20], экспрессия CD103 на опухолевых клетках обнаружена у 15 и 40 % пациентов с ЛКМЗС соответственно. В нашем исследовании экспрессия CD103 на опухолевых клетках присутствовала у 1 из 22 пациентов.

### Заключение

Морфологические особенности циркулирующих опухолевых клеток при лимфоме из клеток маргинальной зоны селезенки до сих пор изучены мало, прежде всего в связи с невысокой частотой данного заболевания и низкой концентрацией опухолевых клеток в периферической крови. Хотя все источники указывают на морфологическую разнородность опухолевых клеток при ЛКМЗС, подробное описание

*Частота выявления иммунофенотипов опухолевых лимфоцитов при лимфоме из клеток маргинальной зоны селезенки по данным собственного исследования и литературных публикаций [5, 11, 12, 19, 20]*

*Frequency of identification of tumor lymphocyte immunophenotypes from splenic marginal zone lymphoma according to our data and literature [5, 11, 12, 19, 20]*

Маркер Marker	Собственные данные, % (n/N) Authors' data, % (n/N)	Данные публикаций, % Literature data, %
CD19	100 (22/22)	100
CD20	100 (22/22)	89–100
CD22	100 (22/22)	100
CD11c	36 (8/22)	50–67
CD103	5 (1/22)	15–40
CD123	0 (0/18)	0–25
CD5	9 (2/22)	12–50
CD10	0 (0/22)	0
CD23	23 (5/22)	10–38
CD38	23 (5/22)	22–30
CD25	32 (7/22)	22–25

возможных морфологических типов клеток при данном заболевании в литературе не встречается, что может затруднить диагностику ЛКМЗС [30]. Наиболее полное сравнительное описание морфологии и иммунофенотипа циркулирующих опухолевых клеток при ЛКМЗС, ВКЛ и ВКЛ-В содержится в работе Н. Shao и соавт. [5], однако в нее включены лишь 6 пациентов с ЛКМЗС. Использование клеточного биочипа, сортирующего клетки по поверхностным CD-антигенам, позволяет исследовать чистую популяцию В-лимфоцитов и получить более подробную картину морфологического разнообразия циркулирующих опухолевых клеток при ЛКМЗС. Выделенные в данной работе морфологические варианты циркулирующих опухолевых клеток при ЛКМЗС в целом

хорошо согласуются с данными других авторов [5, 24]. Полученные результаты по иммунофенотипу опухолевых клеток во всех случаях совпадают с результатами проточной цитометрии и хорошо соответствуют литературным данным (см. таблицу).

Инфильтрация костного мозга опухолевыми лимфоцитами и присутствие в периферической крови циркулирующих опухолевых клеток наблюдается практически у всех пациентов с ЛКМЗС на момент постановки диагноза [31]. Исследование лимфоцитов периферической крови с помощью биочипа позволяет обнаружить опухолевые клетки при ЛКМЗС, определить их иммунофенотип и выявить aberrantную экспрессию маркеров на их поверхности, что облегчает дифференциальную диагностику ЛКМЗС.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Воробьев А.И., Бриллиант М.Д. Лимфоцитома селезенки и классификация лимфоцитом. Терапевтический архив 1982;8:8–14. [Vorob'ev A.I., Brilliant M.D. Spleen lymphocytoma and Lymphocytomas classification. Terapevticheskiy arkhiv = Therapeutic Archive 1982;8:8–14. (In Russ.)].
2. Луговская С.А., Почтарь М.Е. Гематологический атлас. М. – Тверь: Триада, 2011. [Lugovskaya S.A., Pochtar' M.E. Hematologic Atlas. Moscow – Tver: Triada, 2011 (In Russ.)].
3. Bain B.J. Leukemia Diagnosis. 4th Ed. Singapore: Wiley-Blackwell, 2010.
4. Julhayan U., Magomedova A., Kravchenko S. et al. Splenic marginal zone lymphoma: characteristics and treatment. Naematologica 2011;96(S2):393–4.
5. Shao H., Calvo K.R., Grönberg M. et al. Distinguishing hairy cell leukemia variant from hairy cell leukemia: Development and validation of diagnostic criteria. Leuk Res 2013;37:401–9. DOI: 10.1016/j.leukres.2012.11.021. PMID: 23347903.
6. Robak T. Hairy-cell leukemia variant: recent view on diagnosis, biology and treatment. Cancer Treat Rev 2011;37(1): 3–10. DOI: 10.1016/j.ctrv.2010.05.003. PMID: 20558005.
7. Traverse-Glehen A., Baseggio L., Callet-Bauchu E. et al. Splenic red pulp lymphoma with numerous basophilic villous lymphocytes: a distinct clinicopathologic and molecular entity? Blood 2008;111:2253–60. DOI: 10.1182/blood-2007-07-098848. PMID: 18042795.
8. Ковригина А.М., Коржова С.М., Аль-Ради Л.С. и др. Патоморфологическая диагностика диффузной мелкоклеточной В-клеточной лимфомы красной пульпы селезенки. Клиническая онкогематология 2016;9(3):287–95. [Kovrigina A.M., Korzhova S.M., Al-Radi L.S. et al. Pathomorphological diagnosis of splenic diffuse red pulp small B-cell lymphoma. Klinicheskaya onkogematologiya = Clinical Oncohematology 2016;9(3):287–95. (In Russ.)]. DOI: 10.21320/2500-2139-2016-9-3-287-295.
9. Аль-Ради Л.С., Моисеева Т.Н., Джулакян У.Л. и др. Опыт изучения лимфомы красной пульпы селезенки. Терапевтический архив 2016;88(2):78–80. [Al-Radi L.S., Moiseeva T.N., Julhayan U.L. et al. Experience in investigating splenic red pulp lymphoma. Terapevticheskiy Arkhiv = Therapeutic Archive 2016;88(2):78–80. (In Russ.)]. DOI: 10.17116/terarkh201688453-60. PMID: 27070164.
10. Julhayan H.L., Al-Radi L.S., Moiseeva T.N. et al. A single-center experience in splenic diffuse red pulp lymphoma diagnosis. Clin. Lymphoma Myeloma Leuk 2016; 16 (S1): 166–9. DOI: 10.1016/j.clml.2016.03.011. PMID: 27131623.
11. Berger F., Felman P., Thieblemont C. et al. Non-MALT marginal zone B-cell lymphomas: a description of clinical presentation and outcome in 124 patients. Blood 2000;95(6):1950–6. PMID: 10706860.
12. Matutes E., Morilla R., Owusu-Ankomah K. et al. The immunophenotype of splenic lymphoma with villous lymphocytes and its relevance to the differential diagnosis with other B-cell disorders. Blood 1994; 83(6):1558–62. PMID: 8123845.
13. Джулакян У.Л., Гриншпун Л.Д. Селезеночная лимфома из клеток маргинальной зоны (лимфоцитомы селезенки) у пожилых пациентов: клиника, диагностика, лечение. В кн.: Гериатрическая гематология. Заболевания системы крови в старших возрастных группах. Т. 2. Под ред. Л.Д. Гриншпун, А.В. Пивника. М.: Медиум, 2012. С. 237–44. [Julhayan U.L., Grinshpun L.D. Splenic lymphoma from marginal zone cells (spleen lymphocytoma) in elderly patients: symptoms, diagnosis, treatment. In: Geriatric hematology. Blood diseases in elderly patients. Eds.: L.D. Grinshpun, A.V. Pivnik. Moscow: Medium, 2012. Vol. 2. Pp. 237–44. (In Russ.)].
14. 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. DOI: 10.1309/AJCLP13YDUHFKPJU. PMID: 19289595.
15. Khvastunova A.N., Kuznetsova S.A., Al-Radi L.S. et al. Anti-CD antibody microarray for human leukocyte morphology examination allows analyzing rare cell populations and suggesting preliminary diagnosis in leukemia. Sci Rep 2015;5:12573. DOI: 10.1038/srep12573. PMID: 26212756.
16. Хвастунова А.Н., Аль-Ради Л.С., Капранов Н.М. и др. Использование клеточного биочипа в диагностике волосатоклеточного лейкоза. Онкогематология 2015;1:37–45. [Khvastunova A.N., Al-Radi L.S., Kapranov N.M. et al. Cell-binding microarray application in diagnosis of hairy cell leukemia. Onkogematologiya = Oncohematology 2015;1:37–45. (In Russ.)]. DOI: 10.17650/1818-8346-2015-1-37-45.
17. Thieblemont C., Felman P., Callet-Bauchu E. et al. Splenic marginal-zone lymphoma: a distinct clinical and pathological entity. Lancet Oncol 2003;4:95–103.



- DOI: 10.1016/S1470-2045(03)00981-1.  
PMID: 12573351.
18. Oscier D., Owen R., Johnson S. Splenic marginal zone lymphoma. *Blood Rev* 2005;19:39–51.  
DOI: 10.1016/j.blre.2004.03.002.  
PMID: 15572216.
19. Kost C., Holden J., Mann K. Marginal zone B-cell lymphoma: A retrospective immunophenotypic analysis. *Cytometry B Clin Cytom* 2008;74B(5):282–6.  
DOI: 10.1002/cyto.b.20426.  
PMID: 18500740.
20. Ocio E., Hernandez J.M., Mateo G. et al. Immunophenotypic and cytogenetic comparison of Waldenstrom's macroglobulinemia with splenic marginal zone lymphoma. *Clin Lymphoma* 2005;5(4):241–5. PMID: 15794856.
21. Kuwayama M., Machii T., Yamaguchi M. et al. Blastic transformation of splenic lymphoma with villous lymphocytes after a well-controlled chronic phase of more than 10 years. *Int J Hematol* 2000;71(2):167–71.  
PMID: 10745627.
22. Giannouli S., Paterakis G., Ziakas P.D. et al. Splenic marginal zone lymphomas with peripheral CD5 expression. *Haematologica* 2004;89(1):113–4.  
PMID: 14754618.
23. Gimeno E., Salido M., Solé F. et al. CD5 negative and CD5 positive splenic marginal B-cell lymphomas have differential cytogenetic patterns. *Leuk Res* 2005;29(8):981–2.  
DOI: 10.1016/j.leukres.2005.02.001.  
PMID: 15978952.
24. Baseggio L., Traverse-Glehen A., Petinataud F. et al. CD5 expression identifies a subset of splenic marginal zone lymphomas with higher lymphocytosis: a clinico-pathological, cytogenetic and molecular study of 24 cases. *Haematologica* 2010;95(4):604–12.  
DOI: 10.3324/haematol.2009.011049.  
PMID: 20015887.
25. 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;136:625–30.  
DOI: 10.1309/AJCPKUM9J4IXCWEU.  
PMID: 21917686.
26. Ortolani C. Flow cytometry of hematological malignancies. John Wiley & Sons, 2011.
27. Boonstra R., Bosga-Bouwer A., van Imhoff G.W. et al. Splenic marginal zone lymphomas presenting with splenomegaly and typical immunophenotype are characterized by allelic loss in 7q31–32. *Mod Pathol* 2003;16(12):1210–17.  
DOI: 10.1097/01.MP.0000095895.19756.77.  
PMID: 14681321.
28. Treton D., Valensi F., Troussard X. et al. Cytokine response of B lymphocytes from splenic lymphoma with villous lymphocytes: correlation with TNF-RII (p75) and CD11c expression. *Hematol Cell Ther* 1996;38(4):345–52.  
PMID: 8891726.
29. Ruiz-Ballesteros E., Mollejo M., Rodriguez A. et al. Splenic marginal zone lymphoma. Proposal of new diagnostic and prognostic markers identified after tissue and cDNA microarray analysis. *Blood* 2005;106(5):1831–8.  
DOI: 10.1182/blood-2004-10-3898.  
PMID: 15914563.
30. Sorigue M., Juncà J., Gassiot S. et al. A case of splenic marginal zone lymphoma with mismatched morphology and phenotype, karyotype and clinical course. *Ann Hematol Oncol* 2015;2(1):id1016. Available at: <http://austinpublishinggroup.com/hematology/fulltext/hematology-v2-id1016.php>.
31. Piris M.A., Onaindía A., Mollejo M. Splenic marginal zone lymphoma. *Best Pract Res Clin Haematol* 2017;30(1–2):56–64.  
DOI: 10.1016/j.beha.2016.09.005.