

DOI: 10.17650/1818-8346-2023-18-3-70-77



# Клинические возможности проточной цитометрии при лимфоме Ходжкина

Ф.М. Аббасбейли<sup>1</sup>, А.А. Феденко<sup>1,2</sup>, П.А. Зейналова<sup>1,3</sup>, Р.Ф. Зибиров<sup>4</sup>, В.Н. Гриневиц<sup>2</sup>, Т.Ю. Мушкарина<sup>4</sup>, А.А. Мельникова<sup>4</sup>, М.А. Вернюк<sup>2</sup>, Л.Ю. Гривцова<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Клинический госпиталь «Лапино» группы компаний «Мать и дитя»; Россия, 143081 Московская обл., д. Лапино, 1-е Успенское шоссе, 111;

<sup>2</sup>Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена — филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава России; Россия, 125284 Москва, 2-й Боткинский пр-д, 3;

<sup>3</sup>ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет); Россия, 119991 Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2;

<sup>4</sup>Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба — филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава России; Россия, 249031 Обнинск, ул. Королева, 4

**Контакты:** Фируза Мазахировна Аббасбейли [f.abbasbeyli@mcclinics.ru](mailto:f.abbasbeyli@mcclinics.ru)

Лимфома Ходжкина (ЛХ) — уникальная лимфома В-клеточного происхождения, опухолевые клетки которой утратили экспрессию основных В-клеточных антигенов. По данным иммуногистохимического исследования стандартный иммунофенотип опухолевого субстрата характеризуется экспрессией таких маркеров, как CD15, CD30 и Рах-5, при этом опухолевые клетки имеют отрицательную экспрессию CD3, CD19 и в большинстве случаев также CD20 и CD45 (или экспрессируют этот антиген достаточно слабо). С помощью знаний, полученных за последние годы, удалось повысить эффективность диагностики, прогнозирования и лечения ЛХ. Проточная цитометрия как метод иммунофенотипирования при классической ЛХ практически не применялся из-за трудности разграничения единичных опухолевых клеток Березовского–Рид–Штернберга (БРШ) и опухолевого микроокружения (реактивного фона), которое очень богато клеточными элементами и представлено Т-клетками, В-клетками, эозинофилами, гистиоцитами и плазматическими клетками. Недавно в нескольких исследованиях были предприняты успешные попытки выявить клетки БРШ с использованием многопараметровой проточной цитометрии при аспирации тонкой иглой или биопсии ткани лимфатических узлов для подтверждения или дополнения результатов иммуногистохимического исследования при первичной диагностике. С учетом весьма характерного иммунофенотипа клеток БРШ проточная цитометрия в дальнейшем может стать дополнительным диагностическим методом классической ЛХ. В настоящем обзоре мы суммируем данные относительно возможности использования метода проточной цитометрии как дополнительной клинической первичной диагностической опции при классической ЛХ.

**Ключевые слова:** лимфома Ходжкина, клетка Березовского–Рид–Штернберга, проточная цитометрия

**Для цитирования:** Аббасбейли Ф.М., Феденко А.А., Зейналова П.А. и др. Клинические возможности проточной цитометрии при лимфоме Ходжкина. Онкогематология 2023;18(3):70–7. DOI: 10.17650/1818-8346-2023-18-3-70-77

## Clinical possibilities of flow cytometry in Hodgkin's lymphoma

F.M. Abbasbeyli<sup>1</sup>, A.A. Fedenko<sup>1,2</sup>, P.A. Zeynalova<sup>1,3</sup>, R.F. Zibirov<sup>4</sup>, V.N. Grinevich<sup>2</sup>, T.Yu. Mushkarina<sup>4</sup>, A.A. Melnikova<sup>4</sup>, M.A. Vernyuk<sup>2</sup>, L.Yu. Gritsova<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Clinical Hospital “Lapino” of the “Mother and Child” Group of companies; 111 1<sup>st</sup> Uspenskoe Shosse, Lapino, Moscow region 143081, Russia;

<sup>2</sup>P.A. Hertzen Moscow Oncology Research Institute — branch of the National Medical Research Radiological Center, Ministry of Health of Russia; 3 2<sup>nd</sup> Botkinskiy Proezd, Moscow 125284, Russia;

<sup>3</sup>I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of Russia (Sechenov University); Build. 2, 8 Trubetskaya St., Moscow 119991, Russia;

<sup>4</sup>A.F. Tsyb Medical Radiological Research Center — branch of the National Medical Research Radiological Center, Ministry of Health of Russia; 4 Koroleva St., Obninsk 249031, Russia

**Contacts:** Firuza Mazakhirovna Abbasbeyli [f.abbasbeyli@mcclinics.ru](mailto:f.abbasbeyli@mcclinics.ru)

Hodgkin's lymphoma (HL) is a unique lymphoma of B-cell origin, the tumor cells of which have lost the expression of main B-cell antigens. The standard immunophenotype of the tumor substrate, according to immunohistochemical

studies, is characterized by the expression of such markers as CD15, CD30 and Pax-5, while tumor cells have a negative expression of CD3, CD19 and in most cases also CD20 and CD45 (or express this antigen rather weakly). The knowledge gained in recent years has increased the effectiveness of diagnosis, prognosis and treatment of LH. Flow cytometry, as a method of immunophenotyping in classical LH, was practically not used due to the difficulty of distinguishing single Reed–Sternberg–Berezovsky tumor cells (RSB) and the tumor microenvironment (reactive background), which is very rich in cellular elements and is represented by T cells, B cells, eosinophils, histiocytes and plasma cells. However, in the recent past, several studies have successfully attempted to identify RSB cells using multiparameter flow cytometry during aspiration with a thin needle or biopsy of lymph node tissue to confirm or supplement immunohistochemical staining during primary diagnosis. Taking into account the very characteristic immunophenotype of RSB cells, the flow cytometry may become an additional diagnostic method of classical LH in the future. In this review, we summarize the data on the possibility of using the flow cytometry as an additional clinical diagnostic option in the primary diagnosis of classical LH.

**Keywords:** Hodgkin's lymphoma, Reed–Sternberg–Berezovsky tumor cell, flow cytometry

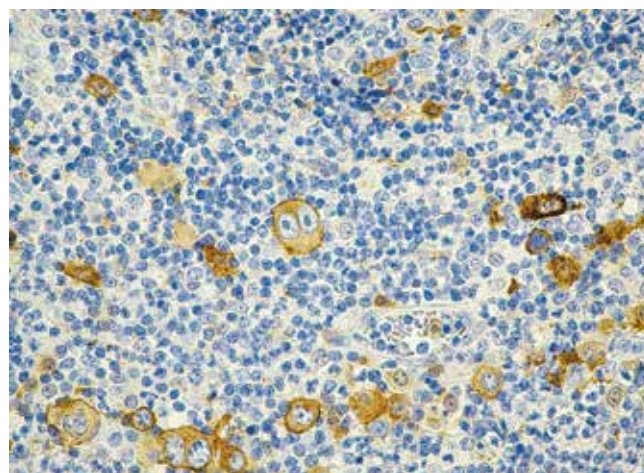
**For citation:** Abbasbeyli F.M., Fedenko A.A., Zeynalova P.A. et al. Clinical possibilities of flow cytometry in Hodgkin's lymphoma. *Onkogematologiya = Oncohematology* 2023;18(3):70–7. (In Russ.). DOI: 10.17650/1818-8346-2023-18-3-70-77

## Введение

Заболевание, которое мы сегодня знаем как лимфома Ходжкина (ЛХ), впервые было описано сэром Томасом Ходжкиным в 1832 г. и позже названа Сэмюэлем Уилксом «болезнью Ходжкина». В классификации Всемирной организации здравоохранения (2016–2022) предложены 4 гистологических варианта классической ЛХ (кЛХ): нодулярный склероз, смешанно-клеточный, богатый лимфоцитами и вариант с лимфоидным истощением. Злокачественные клетки этих вариантов демонстрируют достаточно типичные морфологию и иммунофенотип и характеризуются экспрессией таких маркеров, как CD15 (рис. 1), CD30 (рис. 2) и Pax-5, при этом опухолевые клетки CD3, CD19 отрицательны. Также в большинстве случаев отсутствует экспрессия CD20 (рис. 3) и CD45 (рис. 4) или экспрессия этих антигенов слабо выражена.

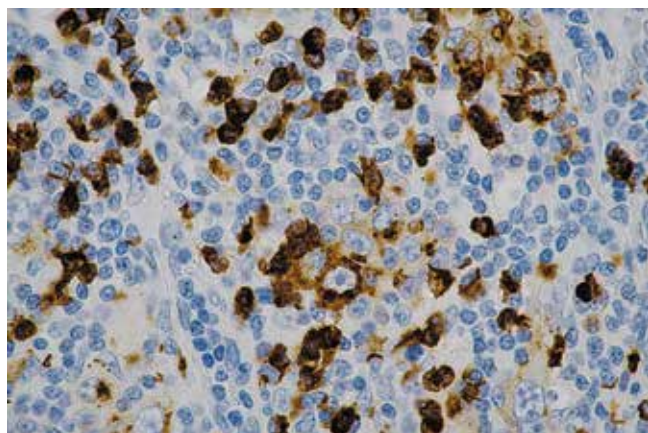
К ЛХ относят и еще одну В-клеточную опухоль — ЛХ с нодулярным лимфоидным преобладанием, которая является морфологически родственным подтипом, но клинически и патогенетически отличается от кЛХ и редко ассоциируется с инфекцией, вызванной виру-

сом Эпштейна–Барр. В настоящее время ведется дискуссия о выделении данной лимфомы в отдельную нозологическую единицу [1–5].



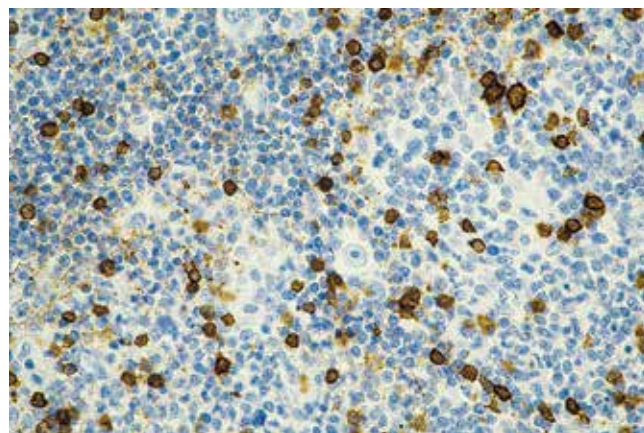
**Рис. 2.** CD30-положительные клетки Ходжкина (иммуногистохимическое окрашивание,  $\times 400$ )

**Fig. 2.** CD30 positive Hodgkin's cells (immunohistochemical staining,  $\times 400$ )



**Рис. 1.** CD15-положительные клетки Ходжкина (иммуногистохимическое окрашивание,  $\times 600$ )

**Fig. 1.** CD15 positive Hodgkin's cells (immunohistochemical staining,  $\times 600$ )



**Рис. 3.** CD20-отрицательные клетки Ходжкина (иммуногистохимическое окрашивание,  $\times 400$ )

**Fig. 3.** CD20 negative Hodgkin's cells (immunohistochemical staining,  $\times 400$ )



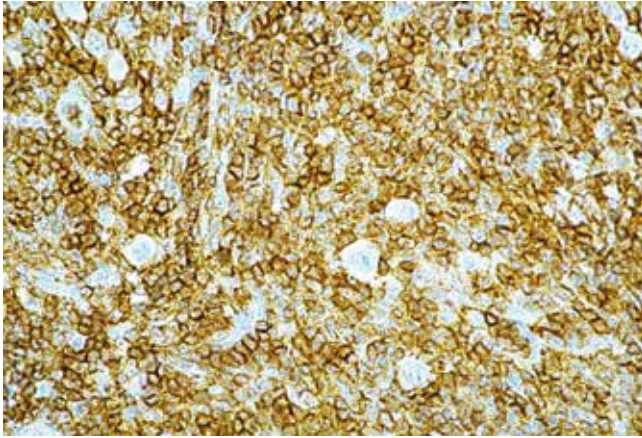


Рис. 4. CD45-отрицательные клетки Ходжкина (иммуногистохимическое окрашивание,  $\times 400$ )

Fig. 4. CD45 negative Hodgkin's cells (immunohistochemical staining,  $\times 400$ )

Лимфома Ходжкина с нодулярным лимфоидным преобладанием имеет характерную морфологию и не содержит клеток Ходжкина и Березовского—Рид—Штернберга (БРШ). Большие атипичные клетки ЛХ с нодулярным лимфоидным преобладанием определяются как лимфоидные (LP-клетки) или L- и Н-клетки. В отличие от клеток БРШ они экспрессируют В-клеточные маркеры, такие как CD20, CD79a, Pax-5, Oct-2, Bcl-1 и J-цепь иммуноглобулинов, в то время как маркеры клеток БРШ CD30 и CD15 отрицательны [6–8]. Злокачественные клетки ЛХ с нодулярным лимфоидным преобладанием редки, обычно меньше, чем клетки БРШ, и не имеют типичного большого макронуклеола. С точки зрения гистоархитектоники лимфома имеет нодулярный характер роста с макрофолликулами и расширенной сетью фолликулярных дендритных клеток, которые легко идентифицируются по маркерам CD21 и CD23 [9–11]. Среди лимфоидного микроокружения преобладают Т-хелперы ( $CD3^+$ ,  $CD4^+$  и  $CD57^+$ ). Другие маркеры, которые часто являются положительными на LP-клетках, — BCL-6 и EMA.

Диагностические проблемы при ЛХ с нодулярным лимфоидным преобладанием возникают в случае диффузного характера роста опухоли. В такой ситуации ЛХ с нодулярным лимфоидным преобладанием сложно отличить от В-клеточной крупноклеточной лимфомы, богатой Т-клетками и гистиоцитами, в силу клеточной плеоморфности обеих лимфом и схожести иммунофенотипа. Согласно классификации Всемирной организации здравоохранения, наличия по крайней мере одного узла достаточно для исключения В-клеточной крупноклеточной лимфомы. Также полезным дополнением будет иммуногистохимическое выявление сети фолликулярных дендритных клеток. В некоторых случаях различие между этими двумя образованиями должно быть определено клинически, поскольку в 5 % случаев ЛХ с нодулярным лимфоидным преобладанием возможна трансформация в диффузную В-клеточную крупноклеточную лимфому. Иммуноморфологически

это может проявляться наличием диффузного инфильтрата крупных В-клеток и потерей сетей фолликулярных дендритных клеток [12–15].

В случае нодулярного склероза кЛХ капсула лимфатического узла характерно утолщена коллагеном, полосы которого разделяют узел на отдельные части. Количество отложений коллагена варьирует и может быть настолько плотным, что весь узел кажется склеротичным. Опухолевое микроокружение формирует смешанный воспалительный инфильтрат из гистиоцитов, нейтрофилов и эозинофилов. Клетки БРШ могут иметь артефакт ретракции цитоплазмы, вызванный фиксацией формалином, и поэтому их называют лакунарными. В случаях, когда смешанный воспалительный клеточный инфильтрат чересчур выражен, может возникнуть диагностическая путаница со смешанно-клеточным вариантом кЛХ. В таком случае выявление коллагена с помощью поляризации является надежным и простым методом дифференциальной диагностики этих 2 вариантов [16–18].

В случае смешанно-клеточного варианта кЛХ микроокружение также представляет собой смешанно-клеточный воспалительный инфильтрат, включающий лимфоциты, плазматические клетки, гистиоциты, эозинофилы и нейтрофилы.

В случае варианта ЛХ, богатой лимфоцитами, рассеянные клетки БРШ (рис. 5) и клетки Ходжкина (рис. 6) легко различимы на узловом или редко встречающемся диффузном клеточном фоне, который состоит из мелких лимфоцитов. Ни нейтрофилов, ни эозинофилов, как правило, нет. Узелки образуются из мелких лимфоцитов и иногда имеют зародышевые центры, при этом клетки БРШ располагаются внутри узелков, но вне зародышевых центров. Они могут напоминать LP-клетки, и этот вариант можно спутать с вариантом нодулярного лимфоидного преобладания. Различие между этими 2 формами ЛХ может быть установлено иммуногистохимически [19–21]. Редко типичные узелки ЛХ, богатой лимфоцитами, могут быть окружены волокнистыми коллагеновыми полосами, а клетки БРШ беспорядочно рассеяны среди зон, богатых Т-клетками. Возможно, в таких случаях более уместно диагностировать поражение как нодулярный склероз, тем более что иммуногистохимически установлена взаимосвязь между этими 2 подтипами ЛХ. Описаны случаи сосуществования ЛХ, богатой лимфоцитами, и смешанно-клеточного варианта ЛХ, но они очень редки [22, 23].

Лимфома Ходжкина с дефицитом лимфоцитов (лимфоидным истощением) — подтип ЛХ, при котором клетки БРШ окружены небольшим количеством реактивных (незлокачественных) лимфоцитов. Гистоархитектоника пораженных узлов может быть различной, но диагностическим признаком считается обилие клеток БРШ среди значительно меньшего лимфоцитарного микроокружения. Часто ЛХ с дефицитом лимфоцитов напоминает смешанно-клеточный вариант кЛХ,

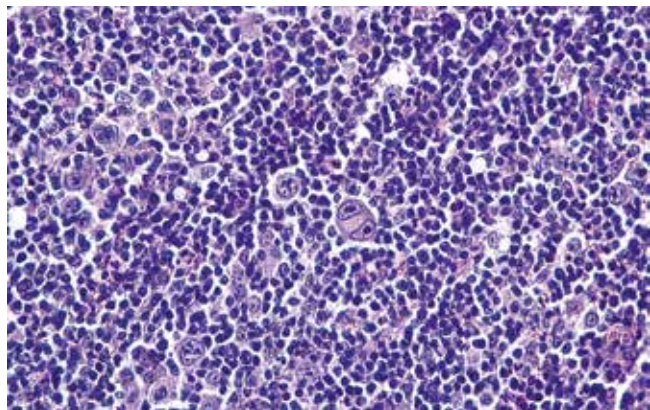


Рис. 5. Клетки Березовского—Рид—Штернберга (окраска гематоксилином и эозином,  $\times 400$ )

Fig. 5. Reed—Sternberg—Berezovsky cells (hematoxylin and eosin staining,  $\times 400$ )

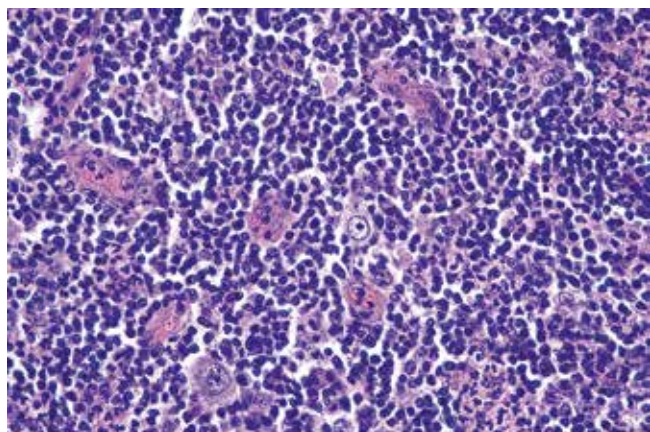


Рис. 6. Клетки Ходжкина (окраска гематоксилином и эозином,  $\times 400$ )

Fig. 6. Hodgkin's cell (hematoxylin and eosin staining,  $\times 400$ )

однако количество клеток БРШ существенно больше. Иногда эти злокачественные клетки при таком варианте ЛХ могут казаться плеоморфными, что может свидетельствовать о саркоматозном поражении. В такой ситуации бывает трудно дифференцировать ЛХ с дефицитом лимфоцитов от анапластических крупноклеточных лимфом. Иногда при ЛХ с дефицитом лимфоцитов возможно формирование диффузного фиброза с присутствием небольшого количества клеток БРШ, что требует дифференциальной диагностики с нодулярным склерозом [3, 4, 22, 23].

Несмотря на такое многообразие вариантов, обусловленных особенностями гистоархитектоники и микроокружения опухоли, во всех случаях кЛХ являются клетки БРШ с особым, легко отличимым иммунофенотипом, как описано ранее.

### Возможности проточной цитометрии в диагностике лимфомы Ходжкина

Наличие очень специфического иммунофенотипа клеток БРШ и их крупные размеры дают основание использовать для их выявления такой метод диагнос-

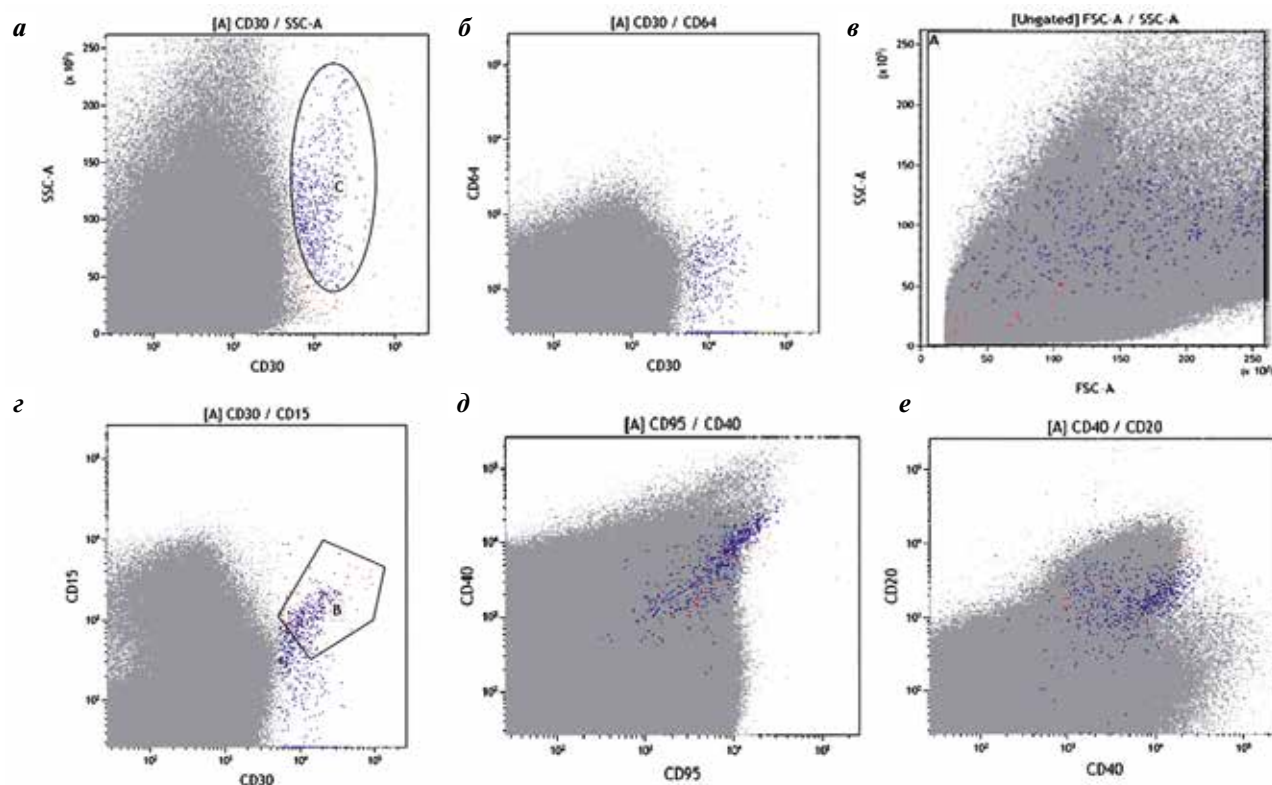
тики, как проточная цитометрия. Стандартно проточная цитометрия используется при определении варианта острых лейкозов или лимфом и оценке величины показателя минимальной остаточной болезни [24–29].

Ранее метод не использовался как диагностический инструмент при ЛХ в силу трудности выделения единичных клеток БРШ среди большого количества клеток микроокружения. Возможности метода все время совершенствуются, и с приходом в клиническую практику проточной цитометрии нового поколения с помощью нее стала возможной идентификация клеток БРШ. Так, недавно в ряде исследований были приняты попытки идентифицировать клетки БРШ с помощью проточной цитометрии в аспирационном или биопсийном материале лимфатического узла в целях подтверждения или дополнения иммуногистохимического окрашивания при диагностике ЛХ [30, 31].

Современные исследования в этой области сосредоточены на определении отличий иммунофенотипа клеток БРШ от воспалительного фона и на характеристике клеток опухолевого микроокружения, что может оказаться значимым для прогноза заболевания. На первом этапе отработки метода был использован прием с применением блокирующих антител к молекулам клеточной адгезии опухолевого микроокружения [30].

Однако по мере роста технических возможностей было продемонстрировано, что нет необходимости блокировать розеткообразование Т-клеток в случае применения проточной цитометрии высокого разрешения с одновременной оценкой на клетках образца 9 специфических параметров (оценка экспрессии на мембране антигенов CD5, CD15, CD20, CD30, CD40, CD45, CD64, CD71 и CD95). Такой подход позволил установить принципиально важные для выявления клеток БРШ антигены и несколько упростить протокол [31–34]. Принципиальными оказались комбинации антигенов CD30 и CD64, CD95 и CD40, экспрессия антигена Т-клеток CD3 в соотношении с параметром бокового светорассеяния SSC (неспецифическая характеристика в проточной цитометрии, отражающая степень гранулированности клетки, тип ее ядра), а также CD20 и CD40. Авторам исследования удалось установить, что клетки БРШ без использования антител для блокировки розеткообразования Т-клеток имеют следующие характеристики: повышенное боковое (SSC) и прямое (FSC — второй неспецифический параметр проточной цитометрии, отражающий размер клеток) рассеяние, т. е. являются более гранулированными, имеют больший размер по сравнению с нормальными лимфоцитами, гетерогенны по экспрессии общелейкоцитарного антигена CD45 (частично из-за связанных Т-клеток), в основном отрицательны в отношении антигена В-клеток CD20, также отрицательны в отношении моноцитарного антигена CD64, могут быть положительными для антигена Т-клеток CD3 (из-за связанных Т-клеток) и всегда положительны по экспрессии маркеров CD30, CD40 и CD95 [35].





**Рис. 7.** Выявление клеток Березовского–Рид–Штернберга (БРШ) в биоптате лимфатического узла методом проточной цитометрии. На всех диаграммах клетки БРШ выделены синим цветом. Клетки БРШ выделены на основании отчетливой экспрессии CD30, имеют высокие и средние показатели бокового светорассеяния (SSC) (а), не экспрессируют антиген CD64 (б), в большинстве это крупные клетки с высокими показателями прямого светорассеяния (FSC) (в), с экспрессией антигена CD15 (г). Клетки БРШ положительны в отношении антигенов CD40 и CD95 (д) и большинство из них слабоположительны в отношении В-клеточного антигена CD20 (е)

**Fig. 7.** Detection of Reed–Sternberg–Berezovsky (RSB) cells in a lymph node biopsy by flow cytometry. On all diagrams, the RSB cells are highlighted in blue. RSB cells were isolated by distinct CD30 expression, have high and medium side scatter (SSC) parameters (a), do not express CD64 antigen (b), most of them are large cells with high forward scatter (FSC) parameters (v), with CD15 expression (g). RSB cells are positive for CD40 and CD95 antigens (d) and most of them are weakly positive for CD20 B-cell antigen (e)

Мы изучили возможности данного протокола и попытались выявить клетки БРШ в ткани лимфатических узлов у 8 пациентов с диагнозом КЛХ методом многоцветной проточной цитометрии [36]. Мы применили 8-параметровый протокол, аналогичный представленному зарубежными коллегами [8, 32]. Во всех анализируемых случаях диагноз ЛХ подтвержден морфологически и иммуногистохимически. Пример выявления клеток БРШ представлен на рис. 7. В данном случае у пациента установлен диагноз ЛХ, вариант нодулярного склероза. Клетки БРШ выделены на основании экспрессии антигена CD30 и на всех точечных диаграммах отмечены синим цветом, характеристики светорассеяния (FSC, SSC) подтверждают, что большинство клеток данной популяции — это крупные клетки. Клетки миеломоноцитарного роста исключались нами из анализа на основании экспрессии миеломоноцитарных антигенов CD33 и CD64. Клетки БРШ экспрессируют антигены CD15, CD40 и CD95, также в данном случае опухолевая популяция слабоположительна в отношении антигена В-клеток CD20. Наш опыт подтверждает возможности выявления клеток БРШ с применением многопараметровой проточной цитометрии.

Применение проточной цитометрии высокого разрешения дает возможность легко исключить другие заболевания, которые морфологически имитируют КЛХ, например анапластическую крупноклеточную В-клеточную лимфому или В-клеточную крупноклеточную лимфому, богатую Т-клетками и гистиоцитами [31]. CD30-позитивная Т-клеточная лимфома/анапластическая крупноклеточная лимфома может быть исключена на основании того, что опухолевые клетки этой лимфомы имеют более низкие показатели SSC по сравнению с клетками БРШ, а также более яркую экспрессию CD45, CD5, CD95 и вариативную экспрессию CD30 и CD71, отсутствие экспрессии CD20 [33, 37, 38]. Диффузная В-клеточная крупноклеточная лимфома может быть исключена по отсутствию CD30, яркой экспрессии CD20 и более низких показателей SSC, наличию клональных цепей иммуноглобулинов. Опухолевый субстрат метастатической мелкоклеточной карциномы при схожести показателей SSC и FSC отличает от клеток БРШ отсутствие экспрессии антигенов CD30 и CD40. Кроме того, опухоль демонстрирует полное отсутствие CD45 при проточной цитометрии, что не типично для клеток БРШ, где экспрессия общелейкоцитарного антигена CD45 является слабой.

Вариант ЛХ с нодулярным лимфоидным преобладанием не может быть установлен с применением описанного метода, однако подтверждение данного диагноза с помощью проточной цитометрии все-таки возможно. Так, установлено, что LP-клетки положительны на CD20 и отрицательны на CD15 и CD30. Воспалительный фон при ЛХ с нодулярным лимфоидным преобладанием представлен CD4<sup>+</sup>-/CD57<sup>+</sup>-Т-клетками.

Как уже описано ранее, В-клеточная лимфома, богатая Т-клетками, может быть определена по яркой и мономорфной экспрессии CD20 в крупных опухолевых клетках. Опухолевые клетки этой лимфомы также экспрессируют другие В-клеточные маркеры, в том числе BCL-6, и не экспрессируют CD15 и CD30, что четко исключает диагноз ЛХ в этом случае. Опухолевое микроокружение данной лимфомы гетерогенно и представлено различными субпопуляциями Т-клеток [39].

Реактивная гиперплазия лимфатических узлов при таком методе может быть исключена на основании сохранения гистологической структуры, присутствия лимфоцитов с нормальным неизмененным иммунофенотипом и отсутствия крупных CD30<sup>+</sup>CD15<sup>+</sup>-клеток.

Недавно был предложен метод надежного выявления LP-опухолевых клеток с применением многопараметровой проточной цитометрии [7]. Подход к идентификации LP-клеток аналогичен таковому при иммунофенотипировании клеток Ходжкина при кЛХ. Авторами использована комбинация антигенов CD20, CD38, CD40, CD54, CD71, а также CD32 и CD71 для идентификации LP-клеток. Для исключения неопухолевых клеток применена комбинация антигенов CD5, CD10 и CD64. Для оценки образования розеток применяется сочетание антигенов CD5 и CD45. Параллельно оцениваются содержание ДНК (с использованием ДНК-связывающего красителя DAPI) и ядерная экспрессия антигена BCL-6. Подобно иммунофенотипу, описанному при иммуногистохимическом исследовании, методом проточной цитометрии было показано, что LP-клетки демонстрируют рестрикцию поверхностных легких цепей иммуноглобулинов. Экспрессия В-клеточных антигенов CD19 и CD20 в данном случае сопоставима с реактивными В-клетками, также наблюдалась яркая экспрессия CD40 и BCL-6. LP-клетки не экспрессируют CD5, CD10, CD15, CD30 или CD64.

Такой подход обеспечил выявление опухолевых клеток с высокими чувствительностью и специфичностью, и популяция LP-клеток была обнаружена во всех оцененных случаях ЛХ с нодулярным лимфоидным преобладанием (чувствительность 100 %). Данное исследование подтвердило, что LP-клетки взаимодействуют с Т-клетками с меньшей avidностью, чем клетки БРШ, а молекулы адгезии CD54 и CD50, вероятно, опосредуют это взаимодействие. Дополнительно установлено, что LP-клетки практически не экспрессируют лиганды программируемой клеточной гибели PD-L1 или PD-L2.

Также проточная цитометрия — удобный метод для характеристики опухолевого микроокружения, что может оказаться полезным в плане выявления дополнительных прогностических биомаркеров. Много внимания было уделено иммунофенотипическим особенностям реактивных Т-клеток при ЛХ в попытке выявить их диагностическую значимость. В некоторых исследованиях показано увеличение соотношения CD4:CD8, в других продемонстрирована повышенная экспрессия CD7, а в ряде — повышенная экспрессия Т-регуляторных клеток при ЛХ.

Данные относительно Т-регуляторного индекса (соотношение CD4:CD8) оказались противоречивы. Так, в некоторых исследованиях показано увеличение соотношения при ЛХ, в то время как в других не обнаружено значительных различий между ЛХ и реактивными лимфатическими узлами. Таким образом, на данный момент Т-регуляторный индекс не может использоваться в качестве диагностического критерия ЛХ.

При сопоставлении иммунофенотипа воспалительного фона при ЛХ и реактивной лимфоидной гиперплазии выявлены существенные различия: при ЛХ наблюдаются увеличение количества CD4<sup>+</sup>-Т-клеток, CD25<sup>+</sup>-Т-регуляторных клеток и уменьшение количества В-клеток по сравнению с реактивной лимфоидной гиперплазией.

Установлены и некоторые особенности реактивного микроокружения при различных подтипах ЛХ. Так, соотношение Т- и В-клеток является самым высоким в подтипах нодулярного склероза и ЛХ с дефицитом лимфоцитов и самым низким в случае смешанно-клеточного варианта ЛХ.

При сравнении иммунофенотипа Т-клеток в реактивных лимфатических узлах с ЛХ показано, что соотношение CD4:CD8 в случае ЛХ выше, чем при гиперплазии, при этом CD4<sup>+</sup>-Т-клетки ЛХ демонстрируют более яркую экспрессию CD7 (CD7<sup>++</sup>). Данный признак различался и в подтипах ЛХ: нодулярный склероз характеризуют более высокое соотношение CD4:CD8 и присутствие популяции CD4<sup>+</sup>CD7<sup>++</sup>. Смешанно-клеточный вариант ЛХ по данной характеристике оказался схожим с реактивной гиперплазией. Т-клетки микроокружения ЛХ с нодулярным лимфоидным преобладанием демонстрировали более слабую экспрессию CD7 по сравнению с кЛХ и реактивной гиперплазией [40, 41].

### Заключение

С помощью знаний, накопленных за последние годы, удалось улучшить диагностику, прогнозирование и лечение ЛХ. Основным диагностическим инструментом по-прежнему остаются морфологическое и иммуногистохимическое исследования биоптата опухоли. Позитронно-эмиссионная томография, совмещенная с компьютерной томографией, является важным инструментом при стадировании опухоли. Успешные попытки выявить клетки БРШ с использованием

многопараметровой проточной цитометрии при аспирации тонкой иглой или биопсии ткани лимфатических узлов для подтверждения или дополнения результатов иммуногистохимического исследования при

первичной диагностике позволяют рассматривать метод проточной цитометрии в качестве дополнительной диагностической опции, а также способа выявления новых маркеров прогноза ЛХ.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Hodgkin. On some morbid appearances of the absorbent glands and spleen. *Med Chir Trans* 1832;17:68–114. DOI: 10.1177/095952873201700106
- Wilks S. Cases of enlargement of the lymphatics glands and spleen (or, Hodgkin's disease) with remarks. *Guys Hosp Rep* 1856;11:56–67.
- Swerdlow S.H., Campo E., Pileri S.A. et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood* 2016;19;127(20):2375–90. DOI: 10.1182/blood-2016-01-643569
- Cree I.A. The WHO Classification of Haematolymphoid Tumours. *Leukemia* 2022;36(7):1701–2. DOI: 10.1038/s41375-022-01625-x
- Chang K.C., Khen N.T., Jones D., Su I.J. Epstein–Barr virus is associated with all histological subtypes of Hodgkin lymphoma in Vietnamese children with special emphasis on the entity of lymphocyte predominance subtype. *Hum Pathol* 2005;36(7):747–55. DOI: 10.1016/j.humpath.2005.05.003
- Gemici A., Aydogdu I., Terzi H. et al. Nodular lymphocyte predominant Hodgkin's lymphoma in daily practice: A multicenter experience. *Hematol Oncol* 2018;36(1):116–20. DOI: 10.1002/hon.2460
- Shankar A.G., Roques G., Kirkwood A.A. et al. Advanced stage nodular lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma in children and adolescents: clinical characteristics and treatment outcome – a report from the SFCE & CCLG groups. *Br J Haematol* 2017;177(1):106–15. DOI: 10.1111/bjh.14518
- Fromm J.R., Thomas A., Wood B.L. Characterization and purification of neoplastic cells of nodular lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma from lymph nodes by flow cytometry and flow cytometric cell sorting. *Am J Pathol* 2017;187(2):304–17. DOI: 10.1016/j.ajpath.2016.10.007
- Savage K.J., Mottok A., Fanale M. Nodular lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma. *Semin Hematol* 2016;53(3):190–202. DOI: 10.1053/j.seminhematol.2016.05.009
- Goel A., Fan W., Patel A.A. Nodular lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma: biology, diagnosis and treatment. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2014;14(4):261–70. DOI: 10.1016/j.clml.2014.01.006
- Sohani A.R., Jaffe E.S., Harris N.L. et al. Nodular lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma with atypical T cells: a morphologic variant mimicking peripheral T-cell lymphoma. *Am J Surg Pathol* 2011;35(11):1666–78. DOI: 10.1097/PAS.0b013e31822832de
- Dorfman D.M., Hwang E.S., Shahsafaei A., Glimcher L.H. T-bet, a T cell-associated transcription factor, is expressed in Hodgkin's lymphoma. *Hum Pathol* 2005;36(1):10–5. DOI: 10.1016/j.humpath.2004.10.006
- Taylor C.R. Hodgkin's disease is a non-Hodgkin lymphoma. *Hum Pathol* 2005;36(1):1–4. DOI: 10.1016/j.humpath.2004.12.006
- Visser L., Rutgers B., Diepstra A. et al. Characterization of the microenvironment of nodular lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma. *Int J Mol Sci* 2016;17(12):2127. DOI: 10.3390/ijms17122127
- Nathwani B.N., Vornanen M., Winkelmann R. et al. Intranodular clusters of activated cells with T follicular helper phenotype in nodular lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma: a pilot study of 32 cases from Finland. *Hum Pathol* 2013;44(9):1737–46. DOI: 10.1016/j.humpath.2013.02.010
- Sharma S., Dey P., Mitra S. et al. Nodular sclerosis classical Hodgkin lymphoma grade 2: a diagnostic challenge to the cytopathologists. *Cancer Cytopathol* 2017;125(2):104–13. DOI: 10.1002/cncy.21799
- Marcheselli R., Bari A., Tadmor T. et al. Neutrophil-lymphocyte ratio at diagnosis is an independent prognostic factor in patients with nodular sclerosis Hodgkin lymphoma: results of a large multicenter study involving 990 patients. *Hematol Oncol* 2017;35(4):561–6. DOI: 10.1002/hon.2359
- Ansell S.M. Hodgkin lymphoma: 2016 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol* 2016;91(4):434–42. DOI: 10.1002/ajh.24272
- Cheng C.L., O'Connor S. T cell-rich lymphoid infiltrates with large B cells: a review of key entities and diagnostic approach. *J Clin Pathol* 2017;70(3):187–201. DOI: 10.1136/jclinpath-2016-204065
- Scheidt V., Hansmann M.L., Schuhmacher B. et al. Atypical variants of nodular lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma show low microvessel density and vessels of distention type. *Hum Pathol* 2017;60:129–36. DOI: 10.1016/j.humpath.2016.10.008
- Carbone A., Gloghini A., Caruso A. The impact of EBV and HIV infection on the microenvironmental niche underlying Hodgkin lymphoma pathogenesis. *Int J Cancer* 2017;140(6):1233–45. DOI: 10.1002/ijc.30473
- Swerdlow S.H. Lymphoma classification and the tools of our trade: an introduction to the 2012 USCAP Long Course. *Mod Pathol* 2013;26(Suppl 1):S1–14. DOI: 10.1038/modpathol.2012.177
- Campo E., Swerdlow S.H., Harris N.L. The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood* 2011;117(19):5019–32. DOI: 10.1182/blood-2011-01-293050
- Гривцова Л.Ю., Мушкарина Т.Ю., Лунин В.В., Зейналова П.А. Проточная цитометрия при диагностике плазмноклеточных опухолей и оценке минимальной остаточной болезни. *Онкогематология* 2021;16(3):16–25. DOI: 10.17650/1818-8346-2021-16-3-16-25
- Grivtsova L.Yu., Mushkarina T.Yu., Lunin V.V., Zeynalova P.A. Flow cytometry in the diagnosis of plasma cell tumors and assessment of minimal residual disease. *Onkogematologiya = Oncohematology* 2021;16(3):16–25. (In Russ.). DOI: 10.17650/1818-8346-2021-16-3-16-25
- Чернышева О.А., Гривцова Л.Ю., Серебрякова И.Н. и др. Диагностика острых лимфобластных лейкозов из Т-линейных предшественников и подходы к мониторингу минимальной остаточной болезни. *Клиническая онкогематология* 2019;12(1):79–85. DOI: 10.21320/2500-2139-2019-12-1-79-85
- Chernysheva O.A., Grivtsova L.Yu., Serebryakova I.N. et al. Diagnosis of acute lymphoblastic leukemia originating from T-lineage precursors and approaches to minimal residual disease monitoring. *Klinicheskaya onkogematologiya = Clinical Oncohematology* 2019;12(1):79–85. (In Russ.). DOI: 10.21320/2500-2139-2019-12-1-79-85
- Безнос О.А., Гривцова Л.Ю., Тулицын Н.Н. Оптимизация проточно-цитометрических протоколов детекции минимальной остаточной болезни при острых лимфобластных лейкозах. *Медицинский алфавит* 2018;1(5):36–9.
- Beznos O.A., Grivtsova L.Yu., Tupitsyn N.N. Optimization of flow-cytometry protocols for detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *Meditsinskiy alfavit = Medical Alphabet* 2018;1(5):36–9. (In Russ.).
- Гривцова Л.Ю., Купрышина Н.А., Френкель М.А. и др. Диагностика и иммунофенотипические особенности бластных клеток при острых миелоидных лейкозах: экспрессия пан-миелоидных и линейно-нерестриктированных антигенов. *Медицинский алфавит* 2017;4(28):17–21.



- Gritsova L.Yu., Kupryshina N.N., Frenkel M.A. et al. Diagnosis and immunophenotypic features of blast cells in acute myeloid leukemia: pan-myeloid and linear-nonrestricted antigens. *Meditinskiy alfavit* = Medical Alphabet 2017;4(28):17–21. (In Russ.)
28. Гальцева И.В., Смирнова С.Ю., Паровичникова Е.Н. Методические аспекты детекции минимальной остаточной болезни у больных острыми лейкозами. *Гематология и трансфузиология* 2022;67(1):108–20. DOI: 10.35754/0234-5730-2022-67-1-108-120
  - Galtseva I.V., Smirnova S.Yu., Parovichnikova E.N. Methodological aspects of the detection of minimal residual disease in patients with acute leukemia. *Gematologiya i transfuziologiya* = Russian Journal of Hematology and Transfusiology 2022;67(1):108–20. (In Russ.). DOI: 10.35754/0234-5730-2022-67-1-108-120
  29. Гальцева И.В., Давыдова Ю.О., Паровичникова Е.Н. и др. Мониторинг минимальной остаточной болезни и В-клеточных субпопуляций у больных острым В-лимфобластным лейкозом, леченных по протоколу «ОЛЛ-2016». *Гематология трансфузиология* 2021;66(2):192–205. DOI: 10.35754/0234-5730-2021-66-2-192-205
  - Galtseva I.V., Davydova Yu.O., Parovichnikova E.N. et al. Minimal residual disease and b-cell subpopulation monitoring in acute B-lymphoblastic leukaemia patients treated on rll-2016 protocol. *Gematologiya i transfuziologiya* = Russian Journal of Hematology and Transfusiology 2021;66(2):192–205. (In Russ.). DOI: 10.35754/0234-5730-2021-66-2-192-205
  30. Fromm J.R., Kussick S.J., Wood B.L. Identification and purification of classical Hodgkin cells from lymph nodes by flow cytometry and flow cytometric cell sorting. *Am J Clin Pathol* 2006;126(5):764–80. DOI: 10.1309/7371-XK6F-6P74-74XX
  31. Fromm J.R., Thomas A., Wood B.L. Flow cytometry can diagnose classical Hodgkin lymphoma in lymph nodes with high sensitivity and specificity. *Am J Clin Pathol* 2009;131(3):322–32. DOI: 10.1309/AJCPW3UN9DYLDSPB
  32. Fromm J.R., Wood B.L. A six-color flow cytometry assay for immunophenotyping classical Hodgkin lymphoma in lymph nodes. *Am J Clin Pathol* 2014;141(3):388–96. DOI: 10.1309/AJCPQ1SVOXBHMMAM
  33. Wu D., Wood B.L., Dorer R., Fromm J.R. Utility of flow cytometry for immunophenotyping double-hit lymphomas. *Cytometry B Clin Cytom* 2013;84(6):398. DOI: 10.1002/cyto.b.21117
  34. Wu D., Wood B.L., Fromm J.R. Flow cytometry for non-Hodgkin and classical Hodgkin lymphoma. *Methods Mol Biol* 2013;971:27–47. DOI: 10.1007/978-1-62703-269-8\_2
  35. Engert A., Plütschow A., Eich H.T. et al. Reduced treatment intensity in patients with early-stage Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 2010;363(7):640–52. DOI: 10.1056/NEJMoa1000067
  36. Аббасбейли Ф.М., Феденко А.А., Зейналова П.А. и др. Выявление клеток Березовского–Рид–Штернберга в лимфатических узлах при классической лимфоме Ходжкина методом проточной цитометрии. *Альманах клинической медицины* 2023;51(2):134–42. DOI: 10.18786/2072-0505-2023-51-015
  - Abbasbeyli F.M., Fedenko A.A., Zeynalova P.A. et al. Identification of Reed–Berezovsky–Sternberg cells in lymphatic nodes in classic Hodgkin's lymphoma by flow cytometry: a clinical case series. *Al'manah klinicheskoy meditsiny* = Almanac of Clinical Medicine 2023;51(2):134–42. (In Russ.). DOI: 10.18786/2072-0505-2023-51-015
  37. Jiang M., Bennani N.N., Feldman A.L. Lymphoma classification update: B-cell non-Hodgkin lymphomas. *Expert Rev Hematol* 2017;10(5):405–15. DOI: 10.1080/17474086.2017.1318053
  38. Roshal M., Wood B.L., Fromm J.R. Flow cytometric detection of the classical Hodgkin lymphoma: clinical and research applications. *Adv Hematol* 2011;2011:387034. DOI: 10.1155/2011/387034
  39. Kelly K.M., Sposto R., Hutchinson R. et al. BEACOPP chemotherapy is a highly effective regimen in children and adolescents with high-risk Hodgkin lymphoma: a report from the Children's Oncology Group. *Blood* 2011;117(9):2596–603. DOI: 10.1182/blood-2010-05-285379
  40. Bosler D.S., Douglas-Nikitin V.K., Harris V.N., Smith M.D. Detection of T-regulatory cells has a potential role in the diagnosis of classical Hodgkin lymphoma. *Cytometry B Clin Cytom* 2008;74(4):227–35. DOI: 10.1002/cyto.b.20407
  41. Hudnall S.D., Betancourt E., Barnhart E., Patel J. Comparative flow immunophenotypic features of the inflammatory infiltrates of Hodgkin lymphoma and lymphoid hyperplasia. *Cytometry B Clin Cytom* 2008;74(1):1–8. DOI: 10.1002/cyto.b.20376

#### Вклад авторов

Ф.М. Аббасбейли: анализ клинических данных, написание текста статьи;  
 А.А. Феденко, П.А. Зейналова, Р.Ф. Зибиров, В.Н. Гриневич, М.А. Вернюк: общее руководство исследованием, редактирование статьи;  
 Т.Ю. Мушкарina: выполнение проточно-цитометрических исследований;  
 А.А. Мельникова: выполнение преаналитического этапа работы, анализ данных проточной цитометрии;  
 Л.Ю. Привцова: разработка дизайна исследования, анализ данных проточной цитометрии, общее руководство исследованием.

#### Authors' contributions

F.M. Abbasbeyli: analysis of clinical data, article writing;  
 A.A. Fedenko, P.A. Zeynalova, R.F. Zibirov, V.N. Grinevich, M.A. Vernyuk: general study management, article editing;  
 T.Yu. Mushkarina: flow cytometric studies;  
 A.A. Melnikova: preanalytical stage, analysis of flow cytometry data;  
 L.Yu. Gritsova: study design development, analysis of flow cytometry data, general study management.

#### ORCID авторов / ORCID of authors

Ф.М. Аббасбейли / F.M. Abbasbeyli: <https://orcid.org/0000-0002-2359-0547>  
 А.А. Феденко / A.A. Fedenko: <https://orcid.org/0000-0003-4927-5585>  
 П.А. Зейналова / P.A. Zeynalova: <https://orcid.org/0000-0003-1564-424X>  
 Р.Ф. Зибиров / R.F. Zibirov: <https://orcid.org/0000-0001-5252-0436>  
 Т.Ю. Мушкарina / T.Yu. Mushkarina: <https://orcid.org/0000-0002-1266-1792>  
 А.А. Мельникова / A.A. Melnikova: <https://orcid.org/0000-0001-7229-2813>  
 М.А. Вернюк / M.A. Vernyuk: <https://orcid.org/0000-0003-1497-2436>  
 Л.Ю. Привцова / L.Yu. Gritsova: <https://orcid.org/0000-0001-9103-9688>

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Финансирование.** Работа выполнена без спонсорской поддержки.

**Funding.** The work was performed without external funding.

**Статья поступила:** 09.06.2023. **Принята к публикации:** 13.07.2023.

**Article submitted:** 09.06.2023. **Accepted for publication:** 13.07.2023.