

## ПРОГНОСТИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ СОСТАВА МИЕЛОГРАММЫ У БОЛЬНЫХ ДИФФУЗНОЙ В-КРУПНОКЛЕТОЧНОЙ ЛИМФОМОЙ

Чэн Цзяо<sup>1,2</sup>, П.А. Зейналова<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24;

<sup>2</sup>ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет);

Россия, 119991, Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2

Контакты: Чэн Цзяо vera.joe@mail.ru

**Введение.** Увеличение процентного содержания бластных клеток в миелограмме больных диффузной В-крупноклеточной лимфомой (ДВКЛ) является прогностически неблагоприятным фактором. В работе оценена частота данного явления у 60 больных ДВКЛ и предпринята попытка анализа возможности выявления минимального поражения костного мозга различными проточно-цитометрическими методами.

**Материалы и методы.** Исследование проведено у 60 больных ДВКЛ. Диагноз во всех случаях установлен на основании критериев классификации ВОЗ. Исследование костного мозга проводилось на основании мазков пунктатов (миелограмма). Иммунофенотипические исследования включали широкую панель моноклональных антител к В-линейным антигенам CD19, CD20, CD21, CD22, CD24, CD45, а также каппа- и лямбда-цепям иммуноглобулинов.

**Результаты.** Увеличение процентного содержания бластных клеток в костном мозге больных ДВКЛ установлено в 73,3 % случаев. Эта группа пациентов имела более низкие показатели выживаемости. Использованы следующие методы идентификации моноклональных В-лимфоцитов костного мозга: анализ мембранных каппа- и лямбда-цепей иммуноглобулинов в пределах CD19+ клеток, в пределах зрелых CD45++ CD20+ лимфоцитов, в пределах CD5-негативных зрелых CD20+CD45++ лимфоцитов. Анализ уровней экспрессии различных дифференцировочных антигенов зрелых В-клеток – CD20, CD21, CD22, CD24. Установлено, что в пределах зрелых В-лимфоцитов костного мозга присутствует пропорция CD21-негативных клеток.

**Заключение.** Наиболее информативными методами установления минимального поражения костного мозга при ДВКЛ являются оценка клональности по каппа- и лямбда-цепям мембранных иммуноглобулинов зрелых В-лимфоцитов (CD45++ CD20+CD5–), а также установление aberrантности зрелых В-лимфоцитов по экспрессии CD21.

**Ключевые слова:** диффузная В-крупноклеточная лимфома, поражение костного мозга, бластные клетки

DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-4-58-63

## PROGNOSTICALLY SIGNIFICANT BONE MARROW CELLULAR CONTENT CHANGES IN DIFFUSE LARGE B-CELL LYMPHOMA

Cheng Jiao<sup>1,2</sup>, P.A. Zeynalova<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center; 24 Kashyrskoe shosse, Moscow 115478, Russia;

<sup>2</sup>Sechenov University; 2 build., 8 Trubetskaya St., 119991 Moscow, Russia

**Introduction.** Increasing of blast cell percentage in bone marrow of diffuse large B-cell lymphoma patients is a sign of unfavourable prognosis. We estimated the frequency of this phenomenon and made attempts to identify minimal bone marrow involvement in DLBCL by flow cytometry.

**Materials and methods.** Study has been done in 60 DLBCL patients. Diagnosis in all cases was done according to WHO (2008) criteria. Bone marrow study was done on smears (myelogram). Immunophenotypic study was done with a large panel of B-lineage monoclonal antibodies as well as kappa and lambda light chains to membrane immunoglobulins.

**Results.** Increase in blast cell content in bone marrow was noted in 73.3 % of DLBCL patients. That group of patients had lower survival. We used the following methods for identification of monoclonal B-lymphocytes: monoclonality according to membrane light immunoglobuline chains within mature B-lymphocytes and aberrancy of immunophenotype. Levels of different B-cell antigen expression – CD20, CD21, CD22, CD24. It was identified B-lymphocytes with aberrant expression of CD21.

**Conclusion.** The most informative methods of identification of minimal bone marrow involvement in DLBCL are estimation of clonality according to light chain expression of mature B-lymphocytes (CD45++CD20+CD5–), as well as assessment of aberrancy of CD21 expression of mature B-lymphocytes.

**Key words:** diffuse large B-cell lymphoma, bone marrow involvement, blast cells

## Введение

Прогностические факторы при диффузной В-крупноклеточной лимфоме (ДВКЛ) могут быть разделены на относящиеся к пациенту (возраст, статус по шкале Карновского) и факторы, относящиеся собственно к опухоли (стадия, опухолевая нагрузка, пролиферирующая фракция, наличие экстранодального поражения). Сывороточные уровни лактатдегидрогеназы, уровни  $\beta 2$ -микроглобулина, пролиферирующая фракция являются индикаторами агрессивности заболевания. Важную роль в прогнозе ДВКЛ играет терапевтическая тактика, применяемая у больных. Международный прогностический индекс (IPI) и скорректированный для возраста прогностический индекс (aaIPI) разработаны как модели предсказания исходов на основе клинических факторов при оценке прогноза более чем у 4000 больных [1].

Поражение костного мозга является неблагоприятным фактором прогноза ДВКЛ. Общепринятая точка зрения состоит в том, что конкордантное вовлечение костного мозга при ДВКЛ существенно ухудшает прогноз (5-летняя общая выживаемость в этих случаях составляет 10 %), что не зависит от групп риска в соответствии с IPI [2].

В наших предшествующих работах было показано, что изменения состава миелограммы у больных ДВКЛ в ряде случаев имеют прогностическое значение [3, 4]. В числе причин этого прогностически неблагоприятного явления может быть минимальное поражение костного мозга при ДВКЛ, не улавливаемое морфологическими методами.

В настоящей работе мы проанализировали частоту повышения процентного содержания бластных

клеток в костном мозге больных ДВКЛ, а также проанализировали различные подходы к установлению минимального поражения костного мозга, основанные на оценке клональности зрелых В-лимфоцитов и аберрантности их иммунофенотипа в сравнении с обычными В-клетками.

## Материалы и методы

Исследование проведено у 60 больных ДВКЛ. Диагноз во всех случаях установлен на основании критериев классификации ВОЗ (2008) [5].

У всех больных проведен подсчет миелограмм двумя специалистами-гематоцитологами.

Иммунологические исследования проведены методом проточной цитометрии на приборе FACS CAN-TO II (Becton Dickinson, США). Использовали панель антител к антигенам В-лимфоцитов — CD19, CD20, CD21, CD24, а также к общелейкоцитарному антигену CD45, каппа- и лямбда-цепям иммуноглобулинов.

## Результаты

Прогностически значимыми оказались следующие показатели миелограммы: повышение процента бластных клеток (значимость близка к достоверной), снижение процента нейтрофильных гранулоцитов, повышение процента оксифильных нормобластов.

Снижение процентного содержания нейтрофильных гранулоцитов имело достоверную связь с поздними стадиями ДВКЛ. Прогностическая роль увеличения оксифильных нормобластов рассмотрена нами в отдельных публикациях.

В настоящей статье мы остановимся на увеличении процента бластных клеток в костном мозге больных ДВКЛ, возможных причинах этого явления и проточно-цитометрических подходах к диагностике минимального поражения костного мозга при ДВКЛ.

Увеличение процентного содержания бластных клеток в миелограмме отмечено у 73,3 % больных ДВКЛ. Больные с содержанием бластных клеток 1 % и выше имели худшие показатели выживаемости ( $p = 0,172$ ) (рис. 1), что подтверждает наши более ранние наблюдения.

Одной из причин повышения уровня бластов может быть наличие в костном мозге пациентов единичных опухолевых клеток ДВКЛ, которые на морфологическом уровне трудно отличимы от бластных клеток.

Вопрос диагностики минимального поражения костного мозга при ДВКЛ проточно-цитометрическим методом актуален, так как хорошо известно, что вовлечение в процесс костного мозга существенно ухудшает прогноз заболевания.

Для детального изучения В-клеточного звена костного мозга методом проточной цитометрии нами использованы 3 пробы (табл. 1).

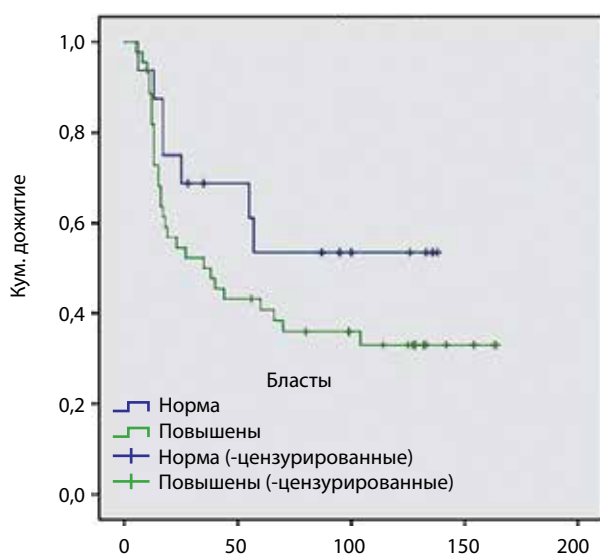


Рис. 1. Кривые общей выживаемости в группах больных ДВКЛ с нормальным и повышенным ( $\geq 1$  %) содержанием бластных клеток в миелограмме

**Таблица 1.** Панель моноклональных антител для изучения субпопуляций В-клеток костного мозга у больных диффузной В-крупноклеточной лимфомой

№ пробы	V450	V500	FITC	PE	PE-Cy5	PE-Cy7	APC	APC-H7
1	CD21	CD45	CD9	CD30	CD19	-	CD22	CD38
2	—	—	CD45	CD20	CD19	CD10	CD5	CD24
3	—	—	kappa	lambda	CD19	—	—	—

Необходимо было оценить возможность определения клональности В-лимфоцитов костного мозга у больных ДВКЛ. Следует отметить, что в стандартной постановке иммунологических реакций (см. табл. 1) мы использовали конъюгат антител к каппа-цепям иммуноглобулинов человека, меченный флуоресцеин-изотиоцианатом (FITC), а к лямбда-цепям — фикоэритрином (PE). Простое использование этих конъюгатов в сочетании с антителами к В-клеткам (CD19), как правило, малоинформативно. Это обусловлено тем, что наряду со зрелыми В-лимфоцитами в костном мозге присутствует выраженная пропорция В-линейных предшественников, негативных в отношении мембранных иммуноглобулинов. В этих случаях оценка клональности в пределах популяции CD19+ лимфоцитов представляется сложной ввиду разбавления В-клеток В-линейными предшественниками.

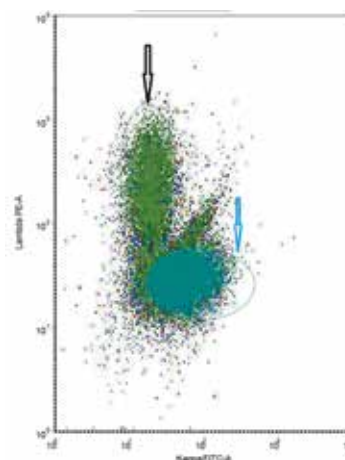
По этой причине целесообразно включение в панель определения клональности В-лимфоцитов маркеров, отражающих зрелость лимфоидных клеток. Мы использовали антитела к CD45 (позволяют исключить из анализа клетки-предшественники на основании более слабой экспрессии на них антигена) и CD20 (мембранный CD20 экспрессирован на всех зрелых В-клетках и лишь на небольшой пропорции предшественников). Сочетание этих 2 маркеров на мембране клетки характерно для зрелых В-лимфоцитов. Используемые антитела и флуорохромы представлены в табл. 2.

**Таблица 2.** Панель моноклональных антител, использованная для оценки моноклональности зрелых В-клеток костного мозга больных ДВКЛ

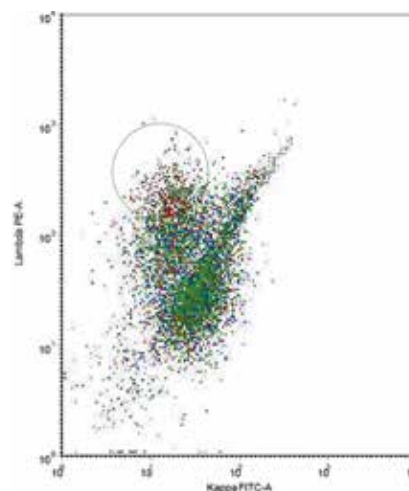
№ пробы	V450	V500	FITC	PE
1	CD20	CD45	Каппа	Лямбда

Данное сочетание антигенов (CD45, CD20, каппа-цепи, лямбда-цепи) использовано при исследовании В-лимфоцитов костного мозга 6 больных ДВКЛ.

Приводим примеры различных вариантов экспрессии каппа- и лямбда-цепей на В-лимфоцитах костного мозга больных ДВКЛ.



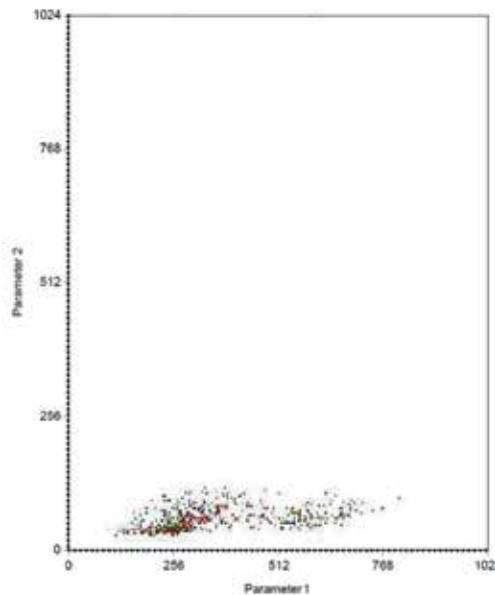
**Рис. 2.** Экспрессия каппа- и лямбда-полипептидных цепей иммуноглобулинов на зрелых В-лимфоцитах (CD45++CD20++) костного мозга больного ДВКЛ. Лямбда-цепи присутствуют на 22,4 % В-лимфоцитов (овал показан черной стрелкой), каппа-цепи — на 55,3 % клеток (показано голубой стрелкой). Реакция поликлональна



**Рис. 3.** Тенденция к моноклональности легких цепей иммуноглобулинов по лямбда-типу. Часть клеток имеют выраженную экспрессию (++) лямбда-цепей (обведены овалом). Видно, что в пределах этих клеток присутствует отчетливая пропорция крупных клеток, как показано на рис. 4

Пример поликлональной реакции представлен на рис. 2.

Следующий пример (рис. 3) иллюстрирует В-лимфоциты с наличием явной тенденции к моноклональности по лямбда-цепям мембранных



**Рис. 4.** Характеристики светорассеяния В-клеток костного мозга больной ДВКЛ. Видно, что в пределах клеток, гиперэкспрессирующих лямбда-цепи (обведены овалом на рис. 3) присутствует пропорция крупных клеток с большими значениями параметра 1 (соответствует FSC — прямому рассеянию света лазерного луча)

иммуноглобулинов. На рисунке овалом обведены клетки, гиперэкспрессирующие мембранные лямбда-цепи иммуноглобулинов. На рис. 4 показано, что в пределах клеток, гиперэкспрессирующих лямбда-цепи, присутствует пропорция крупных клеток.

Другой подход для оценки клональности В-клеток был применен с целью выявления минимального количества В-лимфоцитов с периферическим иммунофенотипом (CD45+ CD20+ CD5-), моноклональность по каппа- или лямбда-легким полипептидным цепям иммуноглобулинов. В этом случае для оценки клональности мы применили антитела, меченные APC-H7 и APC (табл. 3).

**Таблица 3.** Панель моноклональных антител для оценки моноклональности зрелых CD5-негативных В-лимфоцитов костного мозга

№ пробы	V500	FITC	PE	APC	APC-H7
1	CD45	CD5	CD20	Каппа	Лямбда

Подобный подход был реализован у 7 больных ДВКЛ и оказался весьма успешным. Последовательность гейтирования была такова: CD45++ лимфоидные клетки (низкое SSC), CD20+ В-лимфоциты, CD5+ В-лимфоциты. Далее берем гейт CD5-негативных лимфоцитов, в котором присутствуют зрелые В-клетки — CD20+CD45++ CD5-. В этом гейте оцениваем клональность В-клеток по каппа- или лямбда-полипептидным цепям иммуноглобулинов. Из 7 случаев лишь в 1 не удалось оценить клональ-

ность (неспецифическое связывание антител к каппа- и лямбда-цепям иммуноглобулинов); в 1 случае содержание В-клеток в костном мозге (CD20+) было очень малым — 0,57 %. В 3 случаях установлена клональность, в 2 случаях анализируемые В-клетки были поликлональны.

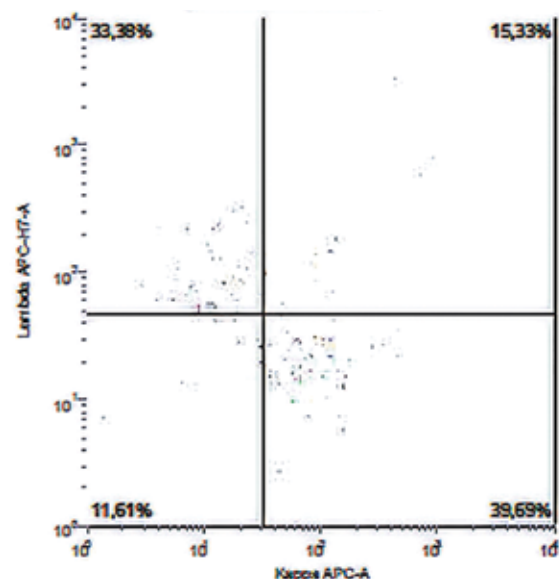
На рис. 5 приведен пример поликлональности В-клеток костного мозга у больных ДВКЛ.

Представленные данные убедительно свидетельствуют о возможности оценки клональности В-клеток костного мозга у больных ДВКЛ.

Общая панель для исследования В-лимфоцитов (см. табл. 1) позволяет подробно оценить маркеры В-клеток в целом (CD19), их более зрелые формы (CD20); антигены, присутствующие практически на всех периферических В-клетках (CD21, CD22, CD24), клональность по экспрессии каппа- и лямбда-цепей, дополнительные и активационные маркеры (CD10, CD5, CD38, CD9), а также уровень зрелости клеток на основании экспрессии общелейкоцитарного антигена CD45.

**Маркер CD19.** Среднее содержание зрелых В-лимфоцитов в костном мозге больных ДВКЛ среди CD45+ лимфоцитов составило  $8,4 \pm 1,4$  % (диапазон от 0,8 до 22,8). Уровень CD22+ лимфоцитов в целом по группе больных ДВКЛ —  $9,1 \pm 1,6$  % (0,17–23,0 %), уровни CD20 —  $8,3 \pm 1,4$  % (0,04–22,0 %), содержание CD24+ в целом по группе —  $7,2 \pm 1,6$  % (0,06–22,1 %).

При оценке экспрессии антигена CD24 гейтирования по CD45 было недостаточно (перекрест с Т-клетками), поэтому использовали в CD45+-гейте оси CD19 и CD24. Практически все CD19+ клетки были CD24-позитивны. Количество CD21+ лимфоцитов в целом по группе —  $6,6 \pm 1,7$  % (0,08–22,9 %).



**Рис. 5.** Пример поликлональной популяции CD45++CD20+CD5- В-лимфоцитов костного мозга у больного ДВКЛ



На большинстве зрелых В-клеток костного мозга (CD45+) присутствовали практически все пан-В-клеточные антигены. Клональность популяции В-лимфоцитов костного мозга по каппа- и лямбда-цепям, как правило, не наблюдалась.

При сравнении средних значений процентного содержания различных популяций лимфоцитов достоверные различия получены для популяций клеток CD19 и CD21, средние значения 8,37 и 6,55 %. Кроме того, достоверно различались популяции CD19 и CD24: 8,4 и 7,1 % (табл. 4).

**Таблица 4.** Парное сравнение средних значений процентного содержания В-клеток костного мозга, выявляемого на основании экспрессии различных дифференцировочных антигенов, у больных ДВКЛ в пределах зрелых CD45++ лимфоцитов

Сравниваемые пары	t	Степень свободы	p
CD19CD45–CD20CD45	1,835	17	,084
CD19CD45–CD22CD45	–,341	16	,738
CD19CD45–CD21CD45	2,350	13	,035
CD19CD45–CD24CD45	2,415	14	,030
CD20CD45–CD22CD45	–1,295	15	,215
CD20CD45–CD21CD45	1,968	13	,071
CD20CD45–CD24CD45	1,721	14	,107
CD22CD45–CD21CD45	1,991	13	,068
CD22CD45–CD24CD45	1,611	13	,131
CD21CD45–CD24CD45	–,608	13	,554

Для более глубокого понимания данного вопроса мы обратились к данным зарубежной и отечественной литературы относительно особенностей иммунофенотипа клеток ДВКЛ. Одной из таких

особенностей является отсутствие экспрессии антигена CD21 на клетках ДВКЛ. По данным отечественных онкогематологов, антиген экспрессируется лишь в 10 % случаев ДВКЛ [4].

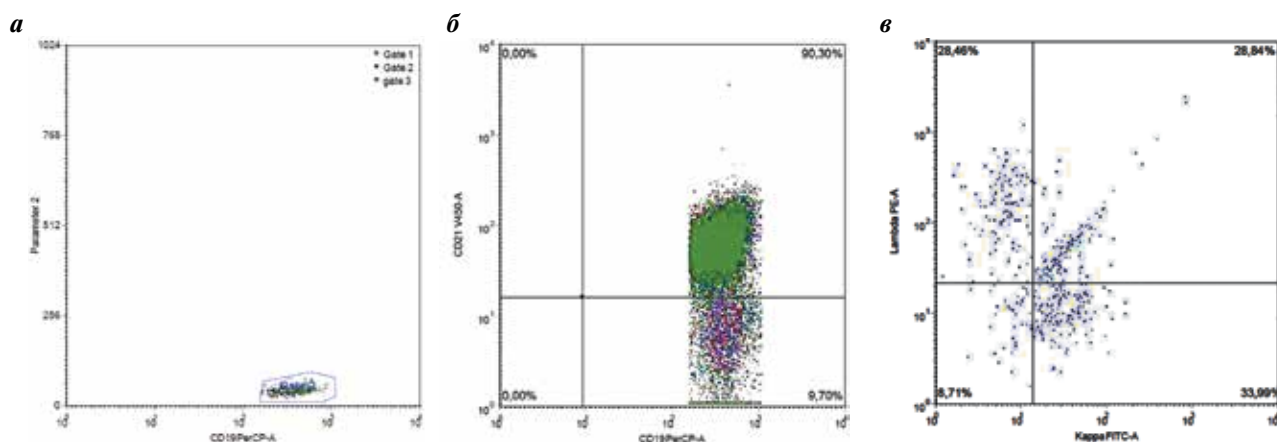
Действительно, в ряде случаев ДВКЛ популяция зрелых В-лимфоцитов костного мозга была гетерогенна по экспрессии данного антигена, что можно подтвердить конкретным примером (рис. 6а). Анализ экспрессии CD21 указывал на наличие четкой отрицательной фракции (рис. 6б). Содержание CD21-негативных В-клеток составило 9,7 % от В-лимфоцитов. При оценке размера CD21-негативных В-лимфоцитов отчетливо определяется фракция более крупных клеток (в приведенном примере – 9,53 %, т. е. 0,01 % от общего числа миелокариоцитов).

Таким образом, в пределах клеток костного мозга цитометрически можно выделять фракцию крупных клеток с фенотипом ДВКЛ даже при их очень низком содержании (в представленном случае 0,01 %).

Последующие исследования клональности и сопоставление с первичным иммунофенотипом необходимы для подтверждения взаимосвязи этих клеток с первичной ДВКЛ. Интересно отметить, что в целом популяция зрелых В-клеток (CD19+) у этого больного была поликлональной (рис. 6в). Популяцию более крупных клеток (CD21–) оценить с позиций клональности не удалось, так как не было подходящих флуорохромов.

Таким образом, оценка минимального поражения костного мозга при ДВКЛ должна базироваться на выявлении клональности В-лимфоцитов костного мозга по каппа- и лямбда-цепям иммуноглобулинов, степени зрелости клеток и особенностях их иммунофенотипа.

Использование маркеров зрелых В-клеток (CD20+CD45++) позволяет выявить поликлональность



**Рис. 6.** Гейт зрелых В-лимфоцитов (CD45++CD19+) в костном мозге больного ДВКЛ (а); в пределах зрелых В-клеток присутствует фракция CD21-негативных лимфоцитов – 9,7 % (б); общая популяция В-клеток (CD19+) костного мозга больного поликлональна по каппа- и лямбда-цепям иммуноглобулинов (в)

В-клеток и тенденцию к моноклональности. Исключение из состава этих клеток CD5- позволяет с большей точностью оценить клональность зрелых В-клеток. Из 7 оцененных случаев в 2 возможно было установить моноклональность В-лимфоцитов.

Подробный анализ иммунофенотипа В-лимфоцитов костного мозга больных ДВКЛ по экспрессии мембранных CD19, CD20, CD21, CD22, CD24 позволил установить особую группу пациентов с наличием CD21-негативных В-клеток. Это типично для первичной ДВКЛ. Для подобного анализа необходима многоцветная проточная цитометрия – CD45++CD19+CD21–. Эти зрелые В-клетки наиболее напоминают по иммунофенотипу ДВКЛ, в пределах них присутствует фракция крупных клеток.

Дальнейший анализ минимального поражения костного мозга при ДВКЛ целесообразно вести имен-

но в этом направлении — поиска CD21-негативных В-лимфоцитов крупного размера, моноклональных.

### Заключение

У большинства больных ДВКЛ повышено содержание бластных клеток в костном мозге. Эта группа больных характеризуется менее благоприятным прогнозом в сравнении с больными, у которых содержание бластных клеток нормальное. В связи с этим предпринята попытка установления минимального поражения костного мозга при ДВКЛ. Наиболее информативными оказались 2 подхода: исследование клональности В-клеток по каппа- и лямбда-цепям мембранных иммуноглобулинов в пределах популяции CD45++CD20+CD5– зрелых В-лимфоцитов, оценка аберрантности зрелых В-клеток (отсутствие экспрессии CD21).

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Shipp M.A., Harrington D.P., Anderson J.R. et al. A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. The international non-Hodgkin's lymphoma prognostic factors project. *N Engl J Med* 1993;329 (14):987–94. DOI: 10.1056/NEJM199309303291402. PMID: 8141877.
2. Campbell J., Seymour J.F., Matthews J. et al. The prognostic impact of bone marrow involvement in patients with diffuse large cell lymphoma varies according to the degree of infiltration and presence of discordant marrow involvement. *Eur J Haematol* 2006;76:473–80. DOI: 10.1111/j.1600-0609.2006.00644.x. PMID: 16529599.
3. Тупицын Н.Н., Зейналова П.А., Френкель М.А., Османов Е.А. Роль костного мозга в прогнозе диффузной В-крупноклеточной лимфомы. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии 2015;1:72–7. [Tupitsyn N.N., Zeynalova P.A., Frenkel M.A., Osmanov E.A. The role of the bone marrow in the prognosis of diffuse B-large cell lymphoma. *Voprosy biologicheskoy, medicinskoj i farmaceuticheskoy himii* = Questions of biological, medical and pharmaceutical chemistry 2015;1:72–7. (In Russ.)].
4. Зейналова П.А. Диагностическая и прогностическая роль активационных антигенов опухолевых клеток при диффузной В-крупноклеточной лимфоме. Автореф. дис. ... докт. мед. наук. М., 2015. 47 с. [Zeynalova P.A. Diagnostic and prognostic role of activation antigens of tumor cells in diffuse large B-cell lymphoma. *Author's abstract dis. ... of doctor of medical sciences*. М., 2015. 47 p. (In Russ.)].
5. Stein H., Warnke R.A., Chan W.C. et al. Diffuse large B-cell lymphoma not otherwise specified. In: WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues (Swerdlow S.H., Campo E., Harris N.L. et al. –Eds). WHO Press, 2008. 233–7.

### ORCID авторов /ORCID of authors

Цзяо Чэн/Cheng Jiao: <https://orcid.org/0000-0002-9916-1992>

П.А. Зейналова/P.A. Zeynalova: <https://orcid.org/0000-0003-1564-424X>

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

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