

ИММУНОЛОГИЯ ГЕМОПОЭЗА

УДК 616.-006

Периодическое научное издание. Выходит дважды в год

Основан в 2006 году

1/2007, Том 4

Учредитель: ГУ РОНЦ имени Н.Н.Блохина РАМН
(лаборатория иммунологии гемопоэза)

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР Н.Н.ТУПИЦЫН

Ответственный секретарь Моженкова А.В.

Редакционная коллегия:

З.Г. Кадагидзе (зам. главного редактора)
Е.Г. Турнянская (Москва)
Е.В. Артамонова (Москва)
Ж. Брошье (Франция)
Дж. Вижденес (Франция)
Л.Ю. Гривцова (Москва)
Дж. Джаносси (Великобритания)
И.С. Долгополов (Москва)
Т.Н. Заботина (Москва)
А.М. Ковригина (Москва)
А.М. Копылов (Москва)
Л.В. Мазурок (Курган)
А.А. Михайлова (Москва)
Д.Ш. Османов (Москва)
А.И. Павловская (Москва)
С.В. Петров (Казань)
Б.В. Пинегин (Москва)
А.В. Попа (Москва)
Н.А. Пробатова (Москва)
Р.М. Рамазанова (Казakhstan)
И.Н. Серебрякова (Москва)
Г.С. Тумян (Москва)
С.А. Тюляндин (Москва)
А.В. Филатов (Москва)
М.А. Френкель (Москва)
С.А. Шинкарев (Липецк)
Е.Н. Шолохова (Москва)
А.А. Ярилин (Москва)

Адрес редакции: 115478, Москва, Каширское шоссе, 24
Тел./факс 324-90-69
E-mail: imhaemo_hi@ronc.ru, www.ronc.ru/imhaemo_hi

Журнал зарегистрирован в Федеральной службе по надзору за соблюдением законодательства в сфере массовых коммуникаций и охране культурного наследия.
Свидетельство ПИ № ФС 77-23551 от 06.03.2006
Свидетельство Эл № ФС 77-24174 от 19.04.2006
Подписной индекс № 36915
Отпечатано в типографии ООО «Диджитал»
Тираж 1000 экз.

При перепечатке материалов ссылка на «Иммунологию гемопоэза» обязательна

HEMATOPOIESIS IMMUNOLOGY

UDK 616.-006

Semi-annual scientific oncoimmunological periodicals

Founded in 2006

1/2007, Vol. 4

Founder: State N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center affiliated to the Russian Academy of Medical Sciences, Russian Federation (Haematopoiesis Immunology Laboratory)

EDITOR-IN-CHIEF N.N.TUPITSYN

Executive secretary Mozhenkova A.V.

Editorial Board:

Z.G. Kadagidze (Deputy Editor-in-Chief)
E.G. Turnianskaia (Moscow)
E.V. Artamonova (Moscow)
J. Brochie (France)
G. Wijdenes (France)
L.U. Grivtzova (Moscow)
G. Janossy (UK)
I.S. Dolgoplov (Moscow)
T.N. Zabolina (Moscow)
A. M. Kovrigina (Moscow)
A.M. Kopilov (Moscow)
L.V. Mazurok (Kurgan)
A.A. Mikhailova (Moscow)
D.Ch. Osmanov (Moscow)
A.I. Pavlovskaja (Moscow)
S. V. Petrov (Kazan)
B.V. Pinegin (Moscow)
A.V. Popa (Moscow)
N.A. Probatova (Moscow)
R.M. Ramazanova (Kazakhstan)
I.N. Serebriakova (Moscow)
G.S. Tumian (Moscow)
S.A. Tuliandin (Moscow)
A.V. Filatov (Moscow)
M.A. Frenkel (Moscow)
S.A. Shinkarev (Lipetzsk)
E.N. Sholokhova (Moscow)
A.A. Iarilin (Moscow)

Address of Editorial Office: 24, Kashirskoye sh., Moscow, Russian Federation, 115478. Tel/fax 324-90-69
E-mail: imhaemo_hi@ronc.ru, www.ronc.ru/imhaemo_hi

The journal is registered at the Federal Agency of Press and Mass-media of Russian Federation.
License № ФС 77-23551 от 06.03.2006
License № ФС 77-24174 от 19.04.2006
Zip-code № 36915
Published in limited company "Digital"
Print run 1000 copies

No reproduction is permitted without reference to Journal Haematopoiesis immunology

СОДЕРЖАНИЕ

Н.Н. Тупицын
От редактора 4

Н.В. Кокосадзе, Н.А. Пробатова, Е.Н. Шолохова, Н.Н. Тупицын
MALT-лимфома желудка: морфоиммунологические основы диагноза на материале гастробиопсий 6

Г.С. Тумян, Н.Н. Тупицын, Е.Н. Шолохова, А.М. Ковригина, Н.А. Пробатова
Клиническая и иммуноморфологическая характеристика лимфомы Ходжкина 34

В.Р. Городецкий, Е.Ю. Варламова, Н.А. Пробатова, Т.Т. Кондратьева, Л.Ю. Гривцова, Е.Н. Шолохова, Е.В. Гордеев, А.Л. Иванов, Н.Н. Тупицын
Лимфомы с секрецией моноклонального иммуноглобулина 56

Н.Н. Тупицын, Л.Ю. Гривцова, М.М. Анохина, О.К. Непряхина, J. Brochier, R. Jones and J. Wijdenes
Бесцитокинная активация gr130 на мобилизованных стволовых клетках крови (CD34+) ведет к их пролиферации и дифференцировке 76

С.Е. Султангазиева
Осложнения лечения ОМЛ по программам «7+3» и «7+3+VP-16» 90

Организация 4-й Российской с международным участием конференции «Иммунология гемопоэза» и публикация данного тома периодического издания «Иммунология гемопоэза» поддержаны Российским фондом Фундаментальных исследований, грант № 07-04-06044.

CONTENTS

<i>N. N. Tupitsyn</i> Message from the Editor	5
<i>N. V. Kokosadze, N.A. Probatova, E. N. Sholokhova, N.N. Tupitsyn</i> MALT-lymphoma of the stomach: morphoimmunological principles of diagnosis by gastrobiopsy	7
<i>G. S. Tumyan, N. N. Tupitsyn, E. N. Sholokhova, A. M. Kovrigina, N. A. Probatova</i> Hodgkin's lymphoma: clinical and immunological characterization	35
<i>V.R. Gorodetsky, E.Yu. Varlamova, N.A. Probatova, T.T. Kondratyeva, L.Yu. Gritsova, E.N. Sholokhova, E.V. Gordeyev, A.L. Ivanov, N.N. Tupitsyn</i> Monoclonal immunoglobulin-secreting lymphomas	57
<i>N. N. Tupitsyn, L.Yu. Gritsova, M.M. Anokhina, O.K. Nepryakhina, J. Brochier, R. Jones and J. Wijdens</i> Cytokineless gp130 activation on mobilized haematopoietic stem cells (CD34+) leads to their proliferation and differentiation	77
<i>N.N. Tupitsyn, V.N. Yaryghin, A.S. Bryukhovetskiy, L.YU. Gritsova, G.L. Mentkevich, I.S. Dolgopolov, A.YU. Zaitsev, M.I. Davydov</i> Immunophenotypic peculiarities of mobilized stem (CD34+) cells in blood from patients with severe spinal cord injury	83

От редактора

Первый номер журнала «Иммунология гемопоэза» «Hematopoiesis Immunology» за 2007 год, несомненно, привлечет внимание наших читателей, в особенности онкогематологов. В данном номере нам впервые удалось в полном объеме выдержать требования и формат журнала — три статьи (Н.В. Кокосадзе и соавторов; Г.С. Тумян и соавторов; В.Р. Городецкого и соавторов) представляют результаты завершенных кандидатских или докторских диссертационных работ. Статьи публикуются на 2 языках (русском и английском) с достаточным количеством цветных иллюстраций.

В предыдущем номере журнала была опубликована статья Н.Н. Тупицына и соавторов по субпопуляциям мобилизованных стволовых клеток у больных с травмами спинного мозга. Английская версия статьи была принята Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents, однако, до настоящего времени не появилась в печати¹. Учитывая тот факт, что материал представляет интерес для наших зарубежных читателей, мы публикуем английскую версию статьи в настоящем номере.

Мы будем и далее очень благодарны всем читателям журнала «Иммунология гемопоэза» «Hematopoiesis Immunology» за высказанные пожелания по его совершенствованию.

Как всегда, журнал выходит к 6 июня — дате проведения 4-й Российской с международным участием конференции «Иммунология гемопоэза», программу этой конференции, посвященной микрометастазам рака, читатели найдут в данном номере, а подробные материалы — в одном из ближайших номеров.

*Главный редактор журнала
профессор Н.Н. Тупицын*

¹ Когда верстался номер, я получил письмо от одного из редакторов JBRHA Francesco Lanza, в котором он сообщает, что статья опубликована, а задержка связана со сменой издателя журнала.

Editor's Preface

The first in 2007 issue of the Hæmatopoïesis Immunology will undoubtedly draw attention of our readers, in particular hematology oncologists. This issue for the first time complies in full with the journal requirements and format: three presentations (N.V. Kokosadze et al., G.S. Tumyan et al., V.R. Gorodetsky et al.) summarize results of completed theses for Ph. D and M. D. degrees. These presentations are in two languages (Russian and English) and have a sufficient number of color illustrations.

The previous issue contained an article by N. N. Tupitsyn et al. on mobilized stem cell subpopulations in patients with spinal cord traumas. Its English version was accepted by the Journal of Biological Regulators and Homeostasis Agents though was not yet published¹. We think this material to be of interest for our foreign readers and are publishing the English version in this issue.

We shall appreciate greatly proposals to improve the Haemopoïesis Immunology from our readers.

The journal will be issued by the 6th of June, the date of the 4th Russian Conference on Haemopoïesis Immunology with international participation. This conference is devoted to cancer micrometastases; its program is published in this issue and more detailed information will be presented in one of near issues of the journal.

*Professor N.N. Tupitsyn
Editor-in-Chief*

¹ When this issue was in press I received a letter from Francesco Lanza, a JBRHA editor, who informed me that the paper had already been published and the delay was due to change of the Journal publishers.

УДК:616.33-006441-091:616-078.73:616.33-076

Н.В. Кокосадзе, Н.А. Пробатова, Е.Н. Шолохова, Н.Н. Тупицын

MALT-ЛИМФОМА ЖЕЛУДКА: МОРФОИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ДИАГНОЗА НА МАТЕРИАЛЕ ГАСТРОБИОПСИЙ

ГУ РОНЦ им.Н.Н.Блохина РАМН, Москва

РЕЗЮМЕ

На гастробиопсийном материале 115 больных с лимфоидноклеточными инфильтратами в слизистой оболочке желудка разработан комплекс морфологических диагностических критериев MALT-лимфомы желудка для гастробиопсий на основе совокупности гистологических и иммуногистохимических особенностей опухолевых клеток, характера их роста. Установлены наиболее информативные комбинации морфологических особенностей в дифференциальной диагностике с другими сходными по морфологической картине новообразованиями и реактивными лимфоидными инфильтратами. Так, наиболее важным морфологическим критерием в оценке опухолевой ткани служат размеры опухолевых клеток, причем с увеличением размеров клеток меняется их цитоморфологический облик — форма ядер, состояние хроматина, а также нарастает степень цитологической атипии.

Определены возможности использования иммуногистохимического метода на замороженных и парафиновых срезах в целях диагностики и дифференциальной диагностики исследуемых лимфом. При этом иммунологический диагноз MALT-лимфомы должен основываться на выявлении нарушенной иммуноархитектоники слизистой желудка и иммунофенотипических особенностях лимфомных клеток, позволяющих провести дифференциальный диагноз с реактивными лимфоидными инфильтратами, CD5-позитивными лимфомами, фолликулярной лимфомой и лимфомой Беркитта.

Ключевые слова:

MALT-лимфома, лимфома желудка, гастробиопсия, морфология, иммуногистохимия.

Список сокращений:

- АГ — антиген
- ВОЗ — Всемирная организация здравоохранения
- ЛКМ — лимфома из клеток зоны мантии
- ЛБ — лимфома Беркитта
- НХЛ — Неходжкинская лимфома
- ОЛА — общий лейкоцитарный антиген
- ФЛ — фолликулярная лимфома

UDC: 616.33-006441-091:616-078.73:616.33-076

N.V. Kokosadze, N.A. Probatova, E.N. Sholokhova, N.N. Tupitsyn

MALT-LYMPHOMA OF THE STOMACH: MORPHOIMMUNOLOGICAL PRINCIPLES OF DIAGNOSIS BY GASTROBIOPSY

Russian State N. N. Blokhin Memorial Cancer Research Center
Affiliated to the Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

ABSTRACT

A set of morphological criteria for the diagnosis of MALT-lymphoma of the stomach has been identified basing on combined tumor cell histological and immunohistochemical characteristics and type of tumor growth as determined by analysis of gastrobiopsies from 115 patients with lymphoid cell infiltration of gastric mucosa. Most informative morphological combinations were selected to differentiate MALT-lymphoma from neoplasias with a similar morphological pattern or reactive lymphoid infiltration. Tumor cell size was considered the most important morphological criterion in tumor tissue analysis: the larger the tumor cells, the greater the changes in their cytomorphological appearance involving nuclear shape, chromatin status and increased cytological atypia.

Potential value of frozen and paraffin section immunohistochemistry was assessed in the common and differential diagnoses of MALT-lymphoma. The immunological diagnosis must be made basing on changes in immunoarchitecture if other immunological criteria are absent.

Key words:

MALT-lymphoma, lymphoma of the stomach, gastrobiopsy, morphology, immunohistochemistry.

List of Abbreviations

AG — antigen
 BL — Burkitt's lymphoma
 CD — cluster of differentiation
 CLA — common leukocyte antigen
 FDC — Follicular dendritic cells
 FL — follicular lymphoma
H.p. — *Helicobacter pylori*
 Ig — immunoglobulin
 LELs — lymphoepithelial lesions
 MALT — mucosa-associated lymphoid tissue

ФДК — фолликулярные дендритные клетки
 CD — Cluster of Designation или Cluster of Differentiation
H.p. — *Helicobacter pylori*
 Ig — иммуноглобулин
 LELs — лимфоэпителиальные поражения
 MALT — mucosa associated lymphoid tissue — лимфоидная ткань, ассоциированная со слизистыми оболочками.

ВВЕДЕНИЕ

В связи с наметившейся тенденцией роста заболеваемости неходжкинскими лимфомами (НХЛ), составляющими около 5 % всех злокачественных новообразований [11; 12], проблемы морфологической диагностики первичных экстранодальных лимфом, а особенно первичных гастроинтестинальных лимфом, охватывающих от 24 % до 37 % всех экстранодальных поражений, привлекают большое внимание. В свою очередь, наиболее распространенной локализацией среди первичных гастроинтестинальных лимфом является желудок; эта локализация встречается более чем в половине случаев [2; 6; 15].

Морфологические особенности лимфомы желудка более тесно связаны со структурой и функцией MALT, чем с таковыми периферических лимфатических узлов [4; 8; 16]. MALT-лимфома желудка представлена зрелоклеточными элементами, ей свойственны лимфоидные фолликулы и лимфоэпителиальные поражения, при этом гистологический диагноз MALT-лимфомы желудка ставится на основании совокупности морфологических признаков, так как ни один из них не является патогномичным для этой лимфомы, что обуславливает трудности диагностики [7]. Помимо зрелоклеточного облика неопластических элементов отмечается их полиморфизм, разнообразное их количественное сочетание.

Объективной трудностью диагностики является чрезвычайно малый объем материала гастробиопсий. Все признаки MALT-лимфомы, хорошо очерченные и описанные в операционном материале, могут быть слабо выражены или вообще отсутствовать в гастробиоптате [3; 19]. Таким образом, разработка совокупности надежных морфологических диагностических критериев по материалу гастробиопсий является чрезвычайно важной.

При диагностике MALT-лимфомы большое значение имеет иммуногистохимическое исследование, особенно в спорных случаях [5; 9; 14; 18]. Детальная морфологическая характеристика MALT-лимфомы и дифференциальная диагностика с реактивными лимфоидными инфильтратами (хронические гастриты), периферическими мелкоклеточными В-клеточными лимфомами (включая лимфому из малых лимфоцитов, лимфому из клеток зоны мантии, фолликулярную лимфому 1–2 цитологической степени) чрезвычайно актуальна в связи с различным клиническим течением, прогнозом и лечебной тактикой.

Таким образом, целью проводимого исследования явилась разработка морфо-иммунологических критериев диагностики MALT-лимфомы желудка и дифференциаль-

MCL — mantle cell lymphoma
NHL — non-Hodgkin's lymphoma
WHO — World Health Organization

INTRODUCTION

Morphoimmunological diagnosis of primary extranodal lymphoma, in particular of gastrointestinal lymphoma accounting for 24 % to 37 % of all extranodal lesions, is of a great importance with an increasing occurrence of non-Hodgkin's lymphomas (NHL) which are about 5 % of all malignant neoplasms [11; 12]. Stomach is the most common site of primary gastrointestinal lymphomas (more than half of the cases) [2; 6; 25].

Morphological features of gastric lymphomas are more closely related to structure and functioning of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) than to those of peripheral lymph nodes [4;8;16]. MALT-lymphoma of the stomach is characterized by mature cellular elements, the presence of lymphoid follicles and lymphoepithelial lesions (LELs); histological diagnosis of MALT-lymphoma of the stomach is rather difficult and is made basing on a combination of morphological features because none of them is exclusively pathognomic for this lymphoma type [7]. The neoplastic elements have a mature-cell appearance and are characterized by polymorphism and a variety of quantitative combinations.

Very small size of gastrobiopsy samples is an objective difficulty of the diagnosis. All signs of MALT-lymphoma that are clearly seen in surgical specimens may be poorly visible or absent in gastrobiopsies [3; 19]. Development of reliable morphological diagnostic criteria for gastrobiopsy is therefore a very important problem.

Immunohistochemical analysis is of much importance in the diagnosis of MALT-lymphoma, especially in controversial cases [5; 9; 14; 18]. MALT-lymphoma should be characterized morphologically in detail and differentiated from reactive lymphoid infiltrations (chronic gastritis) and peripheral small B-cell lymphomas (including small B-cell lymphoma, mantle cell lymphoma, cytological grade I–II follicular lymphoma) because these conditions are different in their clinical course and prognosis, and require different treatments.

The purpose of this study was to develop morphoimmunological criteria for the diagnosis of MALT-lymphoma of the stomach and its differentiation from conditions with similar histological features (reactive infiltrations, peripheral small B-cell gastric lymphomas).

MATERIALS AND METHODS

The study was performed on gastrobiopsies from 115 patients with lymphoid-cell infiltration of gastric mucosa including 71 patients with MALT-lymphoma of the stomach, 23 patients with reactive (non-tumor) lymphoid infiltrations, 21 patients with non-MALT-type peripheral small B-cell gastric lymphomas (cytological grade I or I–II FL, MCL), Burkitt's lymphoma (BL). There were 48 males and 67 females (1:1.39) in the study group. Patients' age ranged from 14 to 85 years (mean 53 years). The patients were managed at the

ной диагностики со сходными по гистологической картине процессами (реактивные инфильтраты, периферические мелкоклеточные В-клеточные лимфомы желудка).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Изучался гастробиопсийный материал от 115 больных с лимфоидноклеточным инфильтратом в слизистой оболочке желудка, из них 71 больной с MALT-лимфомой желудка, 23 больных с реактивными (неопухолевыми) лимфоидными инфильтратами, 21 больной с периферическими мелкоклеточными В-клеточными лимфомами желудка не MALT-типа (фолликулярной лимфомой I, I–II цитологической степени, лимфомой из клеток зоны мантии), лимфомой Беркитта. В исследование вошло 48 мужчин и 67 женщин (соотношение 1:1,39 соответственно). Возраст больных колебался в пределах от 14 до 85 лет (средний возраст больных — 53 года). Больные обследовались в ГУ РОНЦ им. Н.Н.Блохина РАМН в период с 1995 по 2003 гг.

Из нашего исследования были исключены случаи диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы без мелкоклеточного MALT-компонента и случаи фолликулярной лимфомы III цитологической степени [13; 17].

Материал обрабатывали с использованием гистологических и иммуногистохимических методов.

Гистологическое исследование

Гистологическое исследование проводили в соответствии со стандартной схемой: материал гастробиопсий фиксировали в 10 % нейтральном забуференном растворе формалина (рН=7,0). Гистологические срезы толщиной 3–4 микрона окрашивали гематоксилином и эозином, метиловым зеленым и пиронином по Браше, акридином-оранжевым.

На светооптическом уровне определяли наличие изъязвления, грануляционной ткани разной степени зрелости и фиброза, активность хронического гастрита (по выраженности инфильтрации слизистой оболочки нейтрофилами), плотность инфильтрата, клеточный состав по преобладающим цитологическим признакам (мелкоклеточный, из клеток средних размеров, смешанноклеточный), конфигурацию клеточных ядер, характер роста (очаговый, диффузный, диффузно-очаговый). На срезах, окрашенных метиловым зеленым и пиронином по Браше, определяли наличие плазмцитоподобной дифференцировки в клетках инфильтрата и присутствие плазматических клеток в поверхностных отделах собственной пластинки слизистой оболочки желудка (единичные рассеянные или в виде пласта). Цитоплазма этих клеток окрашивалась пиронином в розовый цвет различной степени выраженности.

Активность воспаления оценивали с помощью полуколичественного метода, используемого по рекомендации «Классификация и градация гастритов. Модифицированная Сиднейская система» 1996 г., для оценки степени выраженности активного хронического гастрита (слабая, умеренная, выраженная) [1].

На срезах, окрашенных акридиновым оранжевым, определяли наличие *Helicobacter pylori* в слизи на поверхности и в просвете желез покровно-ямочного эпителия, а также в клетках эпителия; степень обсемененности микроорганизмом

State N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center affiliated to the Russian Academy of Medical Sciences, Russian Federation during 1995 to 2003.

Cases with diffuse large B-cell lymphoma free from MALT component and cytological grade III FL were excluded from the study [13; 17].

Study samples were prepared by histological and immunohistochemical methodologies.

Histological study

Histological study was performed by a standard procedure, as follows. Gastrobiopsy samples were fixed in 10 % neutral buffered formalin solution (pH 7.0). 3–4 micron thick histological sections were stained with hematoxylin and eosin, methyl green and pyronin (Brachet staining), acridine orange.

Light optics was used to detect the presence of ulcers, granulation tissue of various degrees of maturity and fibrosis, activity of chronic gastritis (by severity of neutrophil infiltration of mucosa), infiltration density and cellular composition (small cells, medium cells, mixed cells), cell nucleus configuration, lesion type of growth (focal, diffuse, diffuse-focal). Sections exposed to methyl green and Brachet pyronin staining were used to discover the presence of plasmocytoid differentiation in infiltration cells and the presence of plasma cells in surface layers of the gastric proper mucous plate (as single, diffused cells or as a sheet of cells). The cell cytoplasm had pink coloration of different intensity after pyronin staining.

Inflammation activity was assessed by semi-quantitative assay as recommended by Gastritis Classification and Gradation. Modified Sidney System (1996) as concerns degree of active chronic gastritis (mild, moderate, severe) [1].

Sections stained with acridine orange were studied for the presence of *Helicobacter pylori* (*H. p.*) in epithelial gland surface and lumen mucosa and epithelial cells; degree of *H. p.* infection was assessed in a semi-quantitative manner (mild, moderate, severe) also in accordance with the Sidney System [1].

Immunohistochemical study

Immunohistochemical study was performed on frozen and paraffin sections in 88 cases (53 MALT-lymphomas, 22 reactive lymphoid infiltrations, 13 peripheral small B-cell lymphomas). Endoscopy specimens were divided into two portions to be exposed in parallel to freezing and to formalin fixation for paraffin embedding to follow. The frozen sections were studied by indirect immunofluorescence, while the paraffin sections were analyzed by peroxidase immunoassay (DAKO En Vision tm+ System).

The procedure of indirect immunofluorescence reactivity study was as follows. Frozen sections (4–6 microns) were placed onto fat-free slides and fixed in acetone for 10 min at 4°C. Further stages took place at room temperature in a moist chamber: the sections were incubated in medium 199 (pH 7.2–7.4) for 10 min; exposed to antibodies for 30 min; washed in medium 199 for 10 min. Then FITC-labeled F(ab)2-fragments of antiserum against white mouse immunoglobulins were applied for 30 min, then the sections were washed for 10 min in medium 199. After that the sections were preserved in 50 % glycerin saline solution and covered with cover glasses. The slides were studied using an

оценивали полуколичественно (слабая, умеренная, выраженная) по критериям, также отраженным в Сиднейской Системе [1].

Иммуногистохимическое исследование

Иммуногистохимическое исследование проводили в 88 случаях (53 случая MALT-лимфом, 22 случая реактивных лимфоидных инфильтратов, 13 случаев периферических мелкоклеточных В-клеточных лимфом) на криостатных и парафиновых срезах. Материал эндоскопического исследования разделяли на две части и параллельно запускали в обработку — замораживали для получения криосрезов и фиксировали в растворе формалина для дальнейшей обработки и получения парафиновых блоков. Криосрезы окрашивались непрямой реакцией иммунофлуоресценции; парафиновые срезы — непрямой иммунопероксидазным методом (DAKO En Vision^{tm+} System).

При постановке непрямой реакции иммунофлуоресценции замороженные срезы (толщиной 4–6 микрон) помещали на обезжиренные предметные стекла и фиксировали в ацетоне в течение 10 минут при температуре 4°C. Дальнейшие этапы реакции проводились при комнатной температуре во влажной камере: срезы инкубировали в среде 199 (при pH=7,2–7,4) в течение 10 минут; наносили моноклональные антитела на 30 минут; отмывали 10 минут в среде 199. Затем наносили ФИТЦ-меченные F(ab)2-фрагменты антисыворотки против глобулинов белой мыши на 30 минут; отмывали в среде 199 в течение 10 минут. После чего срезы консервировали 50 % глицерином на физрастворе, закрывали покровными стеклами. Готовые препараты просматривали на люминесцентном микроскопе «AxioPlan-2» (Zeiss, Германия). Для подтверждения гемопозитической природы опухоли и установления вариантов неходжкинских лимфом использовали следующие маркеры: антитела к линейным антигенам В-лимфоцитов CD19, CD20, CD37; антитела к Т-антигенам CD3, CD4, CD5, CD7, CD8. Для визуализации плазматических клеток использовали антитело CD38; для определения фолликулярных дендритических клеток — антитела CD21 и CD23; в качестве дополнительных маркеров — антитела HLA-DR, CD10.

В случаях отсутствия свежего биопсийного материала применялось иммуногистохимическое окрашивание парафиновых срезов иммуноферментным методом. Парафиновые срезы (толщиной 4–5 микрон) монтировали на стеклах, обработанных поли-L-лизином, затем подвергали депарафинизации в ксилоле (2 раза по 10 минут) и регидратации в спирте 96° (3 раза по 4 минуты). После промывания в дистиллированной воде (2 раза по 5 минут) проводили блокирование активности эндогенной пероксидазы охлажденной 0,3 % перекисью водорода в течение 10 минут с последующим ополаскиванием и промыванием в дистиллированной воде 2 раза по 5 минут. Восстановление антигенной структуры ткани проводили с использованием Target Retrieval Solution (DAKO) (pH=6,0) в СВЧ-печи (мощность 130 Вт) в течение 25 минут с последующим остыванием при комнатной температуре в течение 20 минут. Затем промывали 2 раза в дистиллированной воде по 5 минут. На срезы наносили первичные антитела и инкубировали 30 минут при комнатной температуре во влажной камере. После ополаскивания и промывания в Tris-HCL буфере (pH=7,6) 2 раза по

AxioPlan-2 (Zeiss) luminescent microscope. The following markers were used to confirm tumor hemopoietic origin and to establish NHL type: antibodies to B-lymphocyte antigens CD19, CD20, CD37; antibodies to T-antigens CD3, CD4, CD5, CD7, CD8. Antibody CD38 was used to visualize plasma cells; antibodies CD21 and CD23 were applied to identify follicular dendritic cells; and antibodies HLA-DR, CD10 were used as additional markers.

Immunohistochemical staining of paraffin sections by immunoenzyme method was used, if fresh biopsy samples were not available. Paraffin sections (4–5 microns) were placed onto slides previously treated with poly-L-lysine, freed from paraffin with xylene (two times 10 min each) and rehydrated in 96° alcohol (3 times 4 min each). After washing the slides in distilled water (2 times 5 min each) endogenous peroxidase activity was blocked with cooled 0.3 % hydrogen peroxide for 10 min, the slides were rinsed and washed in distilled water 2 times for 5 min each. Tissue antigen structure was restored by 25-min exposure to Target Retrieval Solution (DAKO) (pH 6.0) in a microwave (130 W), then the slides were left to cool at room temperature for 20 min and washed 2 times in distilled water 2 times 5 min each. The sections were then treated with primary antibodies and incubated at room temperature in a moist chamber for 30 min. After rinsing and washing in Tris-HCl buffer (pH 7.6) 2 times 5 min each they were incubated in the buffer in a similar manner. After a 5-min treatment with DAB (1 drop of chromatin per ml buffer) the sections were washed in 2 portions of distilled water 5 min each. After additional hematoxylin staining (30 s) the sections were washed in distilled water (2 times 3 min each) and tap water (2 times 3 min each) to be washed again in distilled water 2 times 3 min each. After dehydration in alcohols at increasing concentrations (4 portions 5 min each) and washing in xylene 2 times 5 min each the sections were embedded in Canada Balsam and covered with cover glasses. Antibodies used in this study are shown in tabl. 1. Interpretation of results was made in a qualitative manner, i.e. as a negative (-) or positive (+) reaction.

RESULTS

Morphoimmunological characterization of MALT-lymphoma

The study was performed in 71 patients aged 14 to 83 years, mean age 54.32 years. Most patients were aged 60 to 72 years. Mean age was 51.78 years for men and 55.54 years for women. Women were predominating (female to male ratio 2.08:1).

MALT-lymphoma is always accompanied by active chronic inflammation which in half of cases is associated with *H. p.* infection (pic. 1); mucosal defects are found in two thirds of cases.

MALT-lymphoma has a very polymorphous morphological picture due to heterogeneous composition of the tumor component and a great inter-patient variability of combinations (pic. 2). We assessed the following histological signs:

1. Cell composition with respect to nucleus shape;
2. The presence of monocytoid B-lymphocytes;
3. The presence of plasma cells;
4. The presence of tumor cell plasmocytoid differentiation;

5 минут инкубировали с En Vision (DAKO) 30 минут, ополаскивали и промывали в буфере аналогичным образом. Затем наносили DAB (на 1 мл буфера — 1 капля хромогена) на 5 минут, после чего промывали в 2 сменах дистиллированной воды по 5 минут. После докраски гематоксилином (в течение 30 секунд) с последующей промывкой в дистиллированной воде (2 раза по 3 минуты) и промывке в водопроводной воде (2 раза по 3 минуты), срезы промывали в дистиллированной воде 2 раза по 3 минуты. После обезвоживания в спиртах возрастающей концентрации (4 спирта по 5 минут) и промывания в ксилоле 2 раза по 5 минут, срезы заключали в канадский бальзам и накрывали покровным стеклом. Антитела, используемые для данного этапа работы, приведены в табл. 1. Интерпретация результатов проводилась с использованием качественной оценки реакции: отрицательная (-), положительная (+).

Таблица 1

Используемые антитела

Название антитела	Клон	Разведение	Фирма-производитель антитела
CD20	L26	RTU	DAKO
CD3		RTU	DAKO
IgM	R1/69	1:50	DAKO
IgD	IgD26	1:50	DAKO
IgG		RTU	DAKO
Kappa light chains	R10-21-F3	RTU	DAKO
Lambda light chain	N10/2	RTU	DAKO

Сокращения: RTU – готовые к употреблению

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Морфоиммунологическая характеристика MALT-лимфомы

В исследование вошли 71 больной в возрасте от 14 до 83 лет, средний возраст больных составил 54,32. Большинство больных имели возраст в диапазоне 60-70 лет. Средний возраст соответствовал для мужчин — 51,78 лет, для женщин — 55,54 лет. В группе больных преобладали женщины, в соотношении 2,08:1.

Постоянным спутником MALT-лимфомы является активное хроническое воспаление, более чем в половине случаев ассоциированное с Hр-инфекцией (рис. 1); имеется дефект слизистой оболочки почти в 2/3 случаев.

Морфологическая картина MALT-лимфомы чрезвычайно полиморфна, так как состав опухолевого инфильтрата гетерогенный, и разные составляющие могут меняться в сочетаниях от случая к случаю (рис. 2). Нами оценивались следующие гистологические признаки:

1. Клеточный состав по форме ядер лимфоидных клеток.
2. Наличие моноцитоподобных В-лимфоцитов.

5. LELs;
6. The presence of follicles (reactive, colonized);
7. The presence of blasts.

Table 1

List of antibodies used

Name	Clone	Dilution	Manufacturer
CD20	L26	RTU*	DAKO
CD3		RTU*	DAKO
IgM	R1/69	1:50	DAKO
IgD	IgD26	1:50	DAKO
IgG		RTU*	DAKO
Kappa light chains	R10-21-F3	RTU*	DAKO
Lambda light chains	N10/2	RTU*	DAKO

* RTU, ready to use.

Neoplastic cells had different cytological characteristics in some cases. Cell composition was assessed by nucleus shape and size, chromatin status, amount of cytoplasm, the presence of plasmocytoid differentiation.

The following types of neoplastic cell morphology were identified in lymphoid cell infiltrations:

1. Cells with mainly round nuclei (morphologically closest to small lymphocytes: with clear-cut nucleus outline, highly dispersed chromatin, non-visualized nucleoli, cytoplasm looking like a narrow, poorly outlined rim) — 5 cases (7.04 %).
2. Cells with centrocytoid morphology (small cells with cleaved or wedge-like nuclei, moderately dispersed or granulated chromatin, invisible nucleoli and a moderately wide cytoplasm rim) — 7 cases (9.86 %).
3. Cells with mixed morphology (round and centrocytoid nuclei) — 53 cases (74.65 %).
4. Cells with irregular nuclei (when centrocytoid cleavage was undetectable; cells with such nuclei were larger than the two previous types and differed to the most extent from non-tumor analogs, i.e. were most atypical) — 6 cases (8.45 %).

Tumor cell size ranged from small, similar to small lymphocytes in 26 cases (36.62 %) to medium, similar to prolymphocyte and two-fold greater than small lymphocytes in 5 cases (7.04 %). More than half of the cases (40, 56.34 %) were of a mixed infiltration type comprising both small and medium-size cells.

We conventionally divided the MALT-lymphomas into 3 histological groups with respect to tumor cell size. The cells were changing in cytomorphological appearance (nucleus shape and chromatin status) as their size was increasing. The larger were the cells the greater were their degree of atypia and similarity to blasts.

As seen in tabl. 2, 17 of 26 cases (65.4 %) with infiltration mainly consisting of small cells presented with round or wedge-shaped nuclei, the wedge shape being due to splitting (centrocytoid morphology). There were no cases with irregular nuclei in neoplastic cells.

3. Наличие плазматических клеток.
4. Наличие плазматоидной дифференцировки опухолевых клеток.
5. Лимфоэпителиальные поражения.
6. Наличие фолликулов (реактивных, колонизированных).
7. Наличие бластных клеток.

Цитологические характеристики неопластических клеток различались в ряде случаев. Мы проводили оценку клеточного состава по размеру, форме ядер, состоянию хроматина, количеству цитоплазмы, наличию плазматоидной дифференцировки.

В лимфоидноклеточных инфильтратах наблюдались следующие разновидности клеточной морфологии неопластических элементов:

1. Клетки преимущественно с округлыми ядрами (наиболее близкие по морфологии малому лимфоциту: с четкими контурами ядер, мелкодисперсным хроматином, ядрышки не визуализируются, цитоплазма клеток имела вид узкого, плохо контурируемого ободка) — 5 случаев (7,04 %).

2. Клетки с центроцитоидной морфологией (малые клетки с расщепленным ядром, с клиновидной формой ядер, умеренно диспергированным или гранулярным хроматином, незаметным ядрышком, умеренно-широким ободком цитоплазмы) — 7 случаев (9,86 %).

3. Клетки со смешанной морфологией: клетки с округлыми и центроцитоидными ядрами — 53 случая (74,65 %).

4. Клетки с неправильной формой ядер (когда было не возможно различить центроцитоидное расщепление; клетки с подобными ядрами были крупнее двух предыдущих категорий клеток, и в наибольшей степени отличались от неопухолевых аналогов — то есть были наиболее атипичными) — 6 случаев (8,45 %).

Размер клеток опухоли колебался от мелкого, равного малому лимфоциту в 26 случаях (36,62 %) до среднего, равного по размерам пролимфоциту и в 2 раза больше, чем малый лимфоцит — в 5 случаях (7,04 %). В более чем половине случаев (40 случаев — 56,34 %) наблюдался смешанный по размеру клеток инфильтрат, включающий малые и средние по размеру клетки.

Мы условно разделили MALT-лимфомы на 3 гистологические группы в зависимости от величины опухолевых клеток. По мере увеличения их размеров менялся цитоморфологический облик — форма ядер, состояние хроматина. С увеличением клеток нарастала степень цитологической атипичности, росло сходство с бластными клеточными формами.

Как видно из табл. 2, при малом размере преобладающих в инфильтрате опухолевых клеток в 17 из 26 случаев (65,4 %) ядра были округлой и клиновидной формы, при этом ядра принимали клиновидную форму из-за расщепления (центроцитоидная морфология). В этой группе не было ни одного случая с неправильной формой ядер у неопластических клеток.

В наиболее многочисленной группе (40 случаев) из смешанных (малых/средних) по размеру клеток большую часть — 87,5 % — составляли случаи со смешанной морфологией ядер: с округлыми и с клиновидными (рис. 3).

Table 2

MALT-lymphoma: cell element morphology of lymphoid infiltration with respect to three groups

Cell nucleus shape	Small cells (26 cases)	Mixed (small and medium) cells (40 cases)	Medium cells (5 cases)
round	4 (15.4%)	1 (2.5%)	0
round/centrocyte-like	17 (65.4%)	35 (87.5%)	1
centrocyte-like	5 (19.2%)	1 (2.5%)	1
irregular	0	3 (7.5%)	3

In the largest group (40 cases) with mixed-size (small/medium) cells 87.5 % of cases demonstrated mixed nuclear morphology, i.e. round or wedge-shaped nuclei (pic. 3).

In the group with predominating medium cells (5 cases) more than half of the cases (60 %) had lymphocytes with irregular nuclei (pic. 4).

Cell elements having a different morphology were present in the tumor infiltrations in parallel with the predominant type.

For instance, in 25 cases (35.21 %) a part of neoplastic elements looked like monocytoid B-lymphocytes with a bean-shaped or irregular nuclei, wide and poorly stained cytoplasm (pic. 5). The monocytoid B-lymphocytes were found less frequently in the group with small cells (15.38 %), more frequently in the second group with mixed cells (40 %) and most frequently in the third group with medium cells (80 %) (tabl. 3).

Most cases (85.9 %) presented with plasma cells. In most cases plasma cells were located immediately under covering epithelium as a massive sheet (46.47 %), or less frequently were dispersed in small portions in surface layers of gastric proper mucous plate among leukocytes (39.43 %). The plasma cells had eccentric nuclei, more frequently of a round or slightly irregular shape, wide cytoplasm in the form of a rim or a tongue of flame of intense pink color after Brachet staining. The number of cases with a great amount of plasma cells in the form of sheets under covering epithelium was decreasing with increase in cell size: cf., 18 (69.23 %) cases in the first group, 17 (42.5 %) cases in the second group and 1 (20 %) case in the third group (see tabl. 3).

Beside plasmocytes the tumor infiltrations contained cells with plasmocytoid differentiation acquiring similarity with plasma cells, that was better observed after Brachet staining (pic. 6, 7) [10]. The plasmocytoid differentiation was found in 15 cases (21.13 %).

Thus, cases with markedly atypical morphology of tumor infiltration more often had monocytoid B-cells with the number of plasma cell progressively decreasing. Neoplastic elements with plasmocytoid differentiation were 20 to 30 % in all the 3 groups.

LELs as aggregations of 3 or more marginal zone cells destroying glandular epithelium were found in 36 (50.7 %) cases. Gland destruction looked like distortion of the outline and disappearance of the border-line due to degradation of basement membranes (pic. 8).

Таблица 2

Морфология клеточных элементов лимфоидноклеточного инфильтрата MALT-лимфомы в 3-х выделенных группах

Клеточный состав по форме ядер	Из мелких клеток (26 случаев)	Смешанный (из мелких и средних клеток) (40 случаев)	Из средних клеток (5 случаев)
– округлые	4 (15,4%)	1 (2,5%)	0
– окр./центрицитоподобные	17 (65,4%)	35 (87,5%)	1
– центрицитоподобные	5 (19,2%)	1 (2,5%)	1
– неправильные	0	3 (7,5%)	3

В группе из преимущественно средних по размеру клеток (5 случаев) больше половины случаев (60 %) демонстрировали неправильную форму ядер лимфоцитов (рис. 4).

Помимо преобладающих в каждой из выделенных групп клеток в опухолевом инфильтрате можно было видеть и клеточные элементы с иной морфологией.

Так в 25 случаях (35,21 %) часть неопластических элементов имели облик моноцитоподобных В-лимфоцитов: ядро бобовидной или неправильной формы, цитоплазма широкая, бледно окрашиваемая (рис. 5). При этом в первой группе из мелких по размеру клеток моноцитоподобные В-клетки встречались реже (15,38 %), во второй группе из смешанных по размеру клеток они встречались в 40 % случаев, а в третьей группе из клеток среднего размера они имелись в 80 % наблюдений (табл. 3).

В большинстве наблюдений (85,9 %) имелись плазматические клетки. Чаще они располагались тотчас под покровным эпителием в виде массивного пласта (46,47 %), реже в небольшом количестве были рассеяны в поверхностных отделах собственной пластинки слизистой оболочки среди клеток лейкоцитарного ряда (39,43 %). Ядра в них располагались эксцентрически, чаще были округлой или слегка неправильной формы, цитоплазма выглядела широкой, либо в виде ободка, либо в виде язычка пламени интенсивно розового цвета при окраске по Браше. В исследованных группах по мере увеличения размера клеток количество случаев с большим содержанием плазматических клеток в виде пластов под покровным эпителием снижалось и составило 18 случаев (69,23 %) для первой, 17 (42,5 %) для второй, и 1 случай (20 %) для третьей группы (см. табл. 3).

Наряду с данными плазматическими среди опухолевого инфильтрата также встречались клетки с плазматоидной дифференцировкой — которые начинали приобретать некоторое сходство с плазматическими клетками, особенно очевидное при окраске по Браше (рис. 6, 7) [10]. Плазматоидная дифференцировка наблюдалась в 15 случаях (21,13 %).

Таким образом, в случаях с выраженной атипичной морфологией опухолевого инфильтрата чаще встречались моноцитоподобные В-клетки, а количество плазматических клеток прогрессивно уменьшалось. Плазматоидная дифференцировка неопластических элементов колебалась между 20-30 % во всех 3 группах.

In some cases gland borders could be guessed by residual basement membrane only or by solitary groups of epithelial cells with signs of eosinophilic degeneration. 6 cases (17.14 %) presented with 'blast' LELs formed by large blasts.

Table 3
MALT-lymphoma: morphological characteristics of lymphoid cell infiltration with respect to three groups

Morphological sign	Small cells (26 cases)	Mixed (small and medium) cells (40 cases)	Medium cells (5 cases)
Monocytoid B-lymphocytes	n: 22 (84.6%) y: 4 (15.4%)	n: 24 (60%) y: 16 (40%)	n: 1 y: 4
Plasma cells	n: 1 (3.9%) s: 7 (26.9%) m: 18 (69.2%)	n: 7 (17.5%) s: 16 (40%) m: 17 (42.5%)	n: 0 s: 4 m: 1
Plasmocytoid differentiation	32%	18.2%	20%
Lymphoepithelial lesions	n: 12 (46.2%) y: 14 (53.8%)	n: 23 (57.5%) y: 17 (42.5%)	n: 1 y: 4
Reactive follicles/colonization	n: 18 (69.2%) y: 8 (30.8%) c: 3 (37.5%)	n: 29 (72.5%) y: 11 (27.5%) c: 7 (63.6%)	n: 4 y: 1 c: 1
Blasts	n: 15 (57.7%) y: 11 (42.3%) s: 81.85%	n: 4 (10%) y: 36 (90%) s: 38.9% l: 36.1%	n: 0 y: 5

n, no; y, yes; s, single; m, multiple; c, colonized follicles; l, layers of more than 20 blasts.

As demonstrated by gastrobiopsy, follicles or follicle-like structures were absent in 50 of 71 (70.42 %) cases, reactive follicles with light-color proliferation centers consisting of centrocytes and centroblasts, a small number of mitotic figures and individual macrophages with cellular detritus in their cytoplasm were present in 10 (14.09 %) cases. Proliferation centers could be surrounded by a partially preserved, thin mantle zone. Tumor cells propagated in a diffuse manner in proper mucous plate and grew around the reactive follicles.

Lymphoid follicle colonization was found practically in half the cases with follicles (15.49 %). Pre-existing germinal centers were populated by small neoplastic cells and in some cases surrounded by a narrow mantle zone. There were small islands of residual germinal centers in some colonized follicles. Therefore, lymphoid follicle occurrence was decreasing with cells growing, while the frequency of colonized follicles was rising with increase in atypicity of the infiltration cells (see tabl. 3).

The neoplastic infiltration usually contained large cell forms morphologically similar to centroblasts or immunoblasts, i.e. blasts with either round-oval/slightly irregular nuclei

Таблица 3
Морфологические признаки лимфоидноклеточного инфильтрата MALT-лимфомы в 3-х выделенных группах

Морфологический признак	Из мелких клеток (26 случаев)	Смешанный (из мелких и средних клеток) (40 случаев)	Из средних клеток (5 случаев)
1. Наличие моноцитонидных В-лимфоцитов	н-22 (84,6%) е-4 (15,4%)	н-24 (60%) е-16 (40%)	н-1 е-4
2. Наличие плазматических клеток	н-1 (3,9%) ед-7 (26,9%) мн-18 (69,2%)	н-7 (17,5%) ед-16 (40%) мн-17 (42,5%)	н-0 ед-4 мн-1
3. Плазмоцитонидная дифференцировка	32%	18,2%	20%
4. Лимфоэпителиальные поражения	н-12 (46,2%) е-14 (53,8%)	н-23 (57,5%) е-17 (42,5%)	н-1 е-4
5. Реактивные фолликулы-колонизированные	н-18 (69,2%) е-8 (30,8%) к-3 (37,5%)	н-29 (72,5%) е-11 (27,5%) к-7 (63,6)	н-4 е-1 к-1
6. Бластные клетки	н-15 (57,7%) е-11 (42,3%) ед-81,8%	н-4 (10%) е-36 (90%) ед-38,9% пл-36,1%	н-0 е-5
Сокращения: н — нет; е — есть; ед — единичные; мн — множество; к — колонизированные фолликулы; пл — пласты бластных клеток более 20 клеток.			

Лимфоэпителиальные поражения (LELs) — агрегаты из 3-х и более клеток маргинальной зоны, разрушающие эпителий желез — были обнаружены в 36 случаях (50,7 %). Разрушение желез выражалось в искажении очертания последних, стирании границ желез из-за размытости базальных мембран (рис. 8). Иногда очертания желез угадывались лишь по резидуальной базальной мембране или по единичным группам эпителиальных клеток с явлениями эозинофильной дегенерации. В 6 случаях (17,14 %) имелись «бластные» LELs, образованные крупными бластными клетками.

Из 71 случая в материале гастробиопсий фолликулы и фолликулоподобные структуры отсутствовали в 50 случаях (70,42 %); в 10 случаях (14,09 %) имелись реактивные фолликулы со светлыми центрами размножения из centroцитов и centroбластов, наблюдались немногочисленные фигуры митоза, встречались единичные макрофаги с клеточным детритом в цитоплазме. Центры размножения могли быть окружены частично сохранившейся, истонченной зоной мантии. Клетки опухоли при этом диффузно распространялись в собственной пластинке слизистой оболочки и росли вокруг реактивных фолликулов.

Практически в половине случаев, имевших фолликулы (15,49 %), наблюдалось явление колонизации лимфоидных фолликулов. Предсуществовавшие зародыше-

and 1 to 3 nucleoli, or with round bottle-shape nuclei and 1 compact, centrally located nucleolus. Blast count was performed according to WHO (2001) criteria [12]. Individual diffuse large cell forms were found in 36.62 %, blast clusters of less than 20 cells each were present in 8.45 %, diffused individual blasts together with blast clusters of less than 20 cells were found in 9.86 % of cases (pic. 9). Layers or areas of more than 20 blasts were found in 18.31 % of cases. These 13 cases were attributed to the group of mixed small and large (blast) cells mainly characterized by diffuse infiltration of round and centrocyte-like cells with blast fields (see tabl. 3).

Immunophenotyping was carried out in 49 MALT-lymphoma cases.

MALT-lymphoma neoplastic elements were free from characteristic pathognomic immunological signs.

In reaction with common leukocyte antigen (CLA) tumor cells demonstrated monomorphous reactivity with diffuse cell growth, less frequently (5 cases, 11.9 %) CLA-positive cells made large clusters between glands.

The infiltration cells expressed pan-B-cell markers (CD19, CD20) as diffused, dense positive staining in most cases or, less frequently, as follicle-like areas on positive cell groups.

Tumor cells were CD5-negative in all cases.

T-cell component was present in most cases as single diffused cells, with CD-8 cytotoxic lymphocytes slightly predominating over CD4-helpers.

Tumor cell reaction with CD23 was negative in more than 90 % of cases.

The presence of FDCs in tumor infiltration was studied using antibodies to CD21 and CD23. FDCs were found in 19 cases. They formed a network among CD23-negative cells of tumor infiltration, though more frequently (17 cases, 89.47 %) looked as loose clusters in CD21-positive infiltration (5 cases) or in CD21-negative infiltration (12 cases).

Both tumor cells and plasmocytes were studied for reactivity with CD38. The tumor cell reactivity was negative; CD38-positive plasma cells were located in surface mucosa as foci or layers.

All cases were CD10-negative; 1 case with mosaic positive reaction on tumor cells should be considered questionable.

Expression of CD20, CD3, IgD, IgG, IgM, and Ig λ and κ light chains was studied in 35 paraffin sections. Marked, clear-cut CD20 expression on tumor infiltration cells was found in all cases. CD3 was expressed on single diffuse cells among B-cells. Ig of all three classes were expressed on plasma cells. Tumor cells demonstrated no Ig expression. Ig λ and κ light chains were expressed on plasma cells and very weakly on lymphoid neoplastic cells, though restriction of one of the chains was not found. Therefore, all paraffin sections demonstrated plasma cell polyclonality, i.e. expression of different classes of Ig without restriction of one of the chains.

Differentiation criteria in the diagnosis of MALT-lymphoma of the stomach and morphologically similar lesions

Reactive lymphoid infiltrations of the stomach

The study was performed in gastrobiopsies from 23 cases aged 18 to 85 years, mean age was 53.47 years. Males to females ratio was 1.3:1.

вые центры были заселены неопластическими мелкими клетками, в единичных случаях были окружены узкой зоной мантии. Небольшие островки резидуальных зародышевых центров иногда обнаруживались в колонизированных фолликулах. Таким образом, частота встречаемости лимфоидных фолликулов снижалась по мере укрупнения клеток, в то же время чем атипичнее были клетки инфильтрата, тем больше было случаев с колонизированными фолликулами (см. табл. 3).

В неопластическом инфильтрате обычно имелись крупные клеточные формы, сходные по морфологии с центробластами или иммунобластами — бластные клетки с ядрами либо округло-овальной, либо слегка неправильной формы, и ядрышками в количестве 1–3. Или с пузырьковидными ядрами округлой формы и 1 компактным, центрально расположенным ядрышком. Подсчет количества бластных клеток проводился с учетом критериев ВОЗ (2001) [12]. В 36,62 % случаев встречались единичные рассеянные крупные клеточные формы. В 8,45 % случаев имелись группы бластных клеток в количестве менее 20. 9,86 % случаев демонстрировали рассеянные единичные бласты в сочетании с группами менее 20 клеток (рис. 9). В 18,31 % случаев имелись пласты или поля из бластных клеток в количестве более 20. Эти 13 случаев относились к группе из смеси мелких и крупных (бластных) клеток, они характеризовались в основном диффузным инфильтратом из округлых и центроцитоподобных клеток с полями бластов (см. табл. 3).

Метод иммунофенотипирования применяли в 49 случаях МALT-лимфом желудка.

Неопластические элементы МALT-лимфомы не имели характерных патогномоничных иммунологических признаков.

При реакции с общим лейкоцитарным антигеном (ОЛА) опухолевые клетки демонстрировали положительную мономорфную реакцию с диффузным ростом инфильтрата, реже (в 5 случаях — 11,9 %) экспрессирующие этот антиген клетки образовывали крупные скопления среди желез.

Инфильтраты экспрессируют общие В-клеточные маркеры (CD19, CD20) — в большинстве случаев диффузный, плотный позитивный инфильтрат, редко в виде некоторой зональности на группах позитивных клеток по типу фолликулов.

Опухолевые клетки были CD5-негативными во всех случаях.

T-клеточный компонент встречался в большинстве случаев в виде единичных рассеянных клеток, при этом CD8-цитотоксические лимфоциты слегка преобладали над CD4-лимфоцитами-хелперами.

Реакция опухолевых клеток с CD23 более чем в 90 % случаев была отрицательной.

Наличие ФДК в опухолевом инфильтрате исследовали с помощью антител к CD21 и CD23. ФДК были выявлены в 19 случаях. Они формировали сеть среди негативных клеток опухолевого инфильтрата, но чаще, в 17 случаях (89,47 %) — образовывали рыхлые скопления, при этом в 5 случаях среди CD21-позитивного опухолевого инфильтрата, и в 12 случаях среди CD21-негативного инфильтрата.

Оценивалась реакция с CD38 как на опухолевых клетках, так и на плазмочитах. Реакция с опухолевыми клетками была негативной; CD38-позитивные плазматические клетки располагались в поверхностных отделах слизистой оболочки в виде очаговых скоплений и пластов.

More than half (56.52 %) of the gastrobiopsies demonstrated mucosal defects of different severity: from surface erosion to ulcer. All 23 cases had signs of active chronic inflammation, mainly of moderate or severe degree (39.13 and 56.52 % respectively). Twenty two (95.65 %) cases presented with *H. p.* infection in mucosa or in gland lumens on epithelial surface, the degree of contamination correlating with inflammation activity.

Infiltration growth was mainly focal (47.83 %) or focal-diffuse (39.13 %). Diffuse infiltration was seen in 13.04 % of cases.

Lymphoid cells were mainly small (86.96 %). There were no infiltrations consisting of medium cells.

The reactive lymphoid-cell infiltrations had the following morphological signs: predominance of cells with centrocytoid morphology of the nucleus, no or mild cytological atypia.

None of the infiltrations had monocytoid B-lymphocytes.

Large amounts of plasma cells were present in all 23 cases as layers under surface epithelium. There was no plasmocytoid differentiation of lymphoid cells in any of the cases.

Follicles were found in 34,78 % of samples as round or slightly irregular, light-color centers of proliferation with a typical centrocyte or centroblast composition and single macrophages with wide cytoplasm and phagocyted bodies. Germinal centers were surrounded by a narrow, denser and darker (after hematoxylin and eosin staining) mantle zone of small lymphoid cells with round nuclei. There were no cases with follicle colonization.

LELs were found in about 1/5 of cases. The LELs consisted of more than 3 small lymphoid cells, with the gland outline distorted. Infiltration of gland epithelium by segmented leukocytes or so called crypt abscesses were mainly observed.

Two (8.7 %) cases presented with single large (blast) cells. These cells looked like centroblasts or immunoblasts and were diffused in small-cell infiltration.

Immunophenotyping by gastrobiopsy samples was performed in 21 cases with reactive lymphoid infiltration.

Infiltration cells expressed CD45 in all 21 cases, the positive reaction being seen on all infiltration cells that looked mainly as small or loose clusters.

There were cases with mixed cell infiltration in which T-lymphocytes were predominating over or (rarer) were equal in number to B-lymphocytes, CD8-positive T-lymphocytes were prevailing.

Infiltration cells demonstrated negative reactivity with CD21, CD23, CD5 and CD10.

Reactions with CD21 and CD23 identified the presence of positive, well marked, arranged network of FDC reactive follicles.

CD38 expression was found on plasma cells.

Peripheral small B-cell lymphoma of the stomach: mantle cell lymphoma, follicular lymphoma; Burkitt's lymphoma

The study was performed in 21 cases aged 14 to 83 years, mean age was 48 years. Males to females ratio was 1.3:1. Cases selected for differentiation from MALT-lymphoma had peripheral small B-cell lymphomas demonstrating lower occurrence as

Все случаи были CD10-негативными; 1 случай с мозаичной позитивной реакцией на опухолевых клетках следует считать сомнительным.

В 35 случаях на парафиновых срезах исследовали экспрессию CD20, CD3, иммуноглобулинов (Ig) классов D, G и M, а также легких цепей иммуноглобулинов λ и κ . Во всех исследованных случаях была отмечена выраженная, отчетливая экспрессия CD20 на клетках опухолевого инфильтрата. CD3 экспрессировался на единичных рассеянных клетках среди В-клеток. Ig различных классов экспрессировались на поверхностных плазматических клетках. Экспрессии Ig опухолевыми клетками выявлено не было. Легкие цепи иммуноглобулинов λ и κ экспрессировались как на плазматических клетках, так и весьма слабо на лимфоидных неопластических клетках. Плазмциты были поликлональны, оценка рестрикции одной из легких цепей иммуноглобулинов на лимфомных клетках в большинстве случаев была затруднена. Таким образом, на парафиновых срезах в большинстве исследованных случаев продемонстрирована поликлональность плазмцитов и сложность оценки клональности лимфомных клеток на основании рестрикции легких цепей иммуноглобулинов.

Дифференциально-диагностические критерии MALT-лимфомы желудка и процессов, близких по морфологической картине

Реактивные лимфоидные инфильтраты желудка

В исследование вошли 23 больных в возрасте от 18 до 85 лет, средний возраст больных составил 53,47. В группе больных преобладали мужчины, в соотношении 1,3:1.

Все исследованные случаи были представлены гастробиоптатами, в более чем половине случаев которых (56,52 %) наблюдался дефект слизистой оболочки, выраженный в разной степени: от поверхностной эрозии до изъязвления. Все 23 случая имели признаки активного хронического воспаления, преимущественно умеренно и резко выраженного (39,13 % и 56,52 % соответственно). В 22 случаях (95,65 %) на поверхности эпителия в слизи и в просвете желез обнаруживался *Helicobacter pylori*, при этом степень обсемененности слизистой оболочки коррелировала с активностью воспаления.

Характер роста инфильтрата был чаще очаговым (47,83 %) или очагово-диффузным (39,13 %). Диффузный характер инфильтрата наблюдали в 13,04 %.

Лимфоидные клетки изученных инфильтратов имели преимущественно малые размеры (86,96 %). Инфильтратов, состоящих из средних размеров клеток, среди изученных случаев не было.

Морфологические признаки реактивных лимфоидноклеточных инфильтратов были следующими: преобладали клетки с центроцитоидной морфологией ядер, без признаков цитологической атипии, либо со слабо выраженной цитологической атипией.

Моноцитоидные В-лимфоциты не обнаруживались ни в одном из исследованных инфильтратов.

Плазматические клетки во всех 23 случаях обнаруживались в большом количестве в виде пластов под поверхностным покровно-ямочным эпителием. Ни в одном случае не была выявлена плазмцитоидная дифференцировка лимфоидных клеток инфильтратов.

compared to MALT-lymphoma, such as 10 cases with FL of cytological grade I, I–II, II (pic. 10, 11) and 6 cases with MCL (pic. 12). Besides, 5 cases with BL were included because the lesion could have medium-size neoplastic cells (pic. 13). Cases with B-CLL were not included because there were no cases with B-CLL of the stomach managed during 1995 to 2003.

All gastrobiopsies were small pieces of gastric mucosa from different segments of the stomach. Two thirds of the samples had mucosal defects ranging in severity from surface erosion to ulcer. Inflammation was mild or moderate in all cases. *H. p.* infection was seen in 8 (38.1 %) cases.

The lymphoma infiltrations were characterized by moderate or high density (38.1 and 61.9 % respectively). Infiltration growth in cases with MCL and FL was focal-diffuse (1/3) or diffuse (2/3). All 5 BL cases demonstrated diffuse growth.

Morphological characteristics of FL, MCL and BL are compared in tabl. 4.

Table 4
Peripheral small B-cell lymphomas, Burkitt's lymphoma: morphological characteristics of lymphoid cell infiltration in gastric mucosa

Morphological sign	Follicular lymphoma (10 cases)	Mantle cell lymphoma (6 cases)	Burkitt's lymphoma (5 cases)
Tumor cell size	Mixed	Small and medium	Medium
Monocytoid B-lymphocytes	Present in 1 case	Present in 1 case	Absent
Plasma cells	Present in 7 cases	Present in 2 cases	Absent
Plasmocytoid differentiation	Present in 1 case	Absent	Absent
Lymphoepithelial lesions	Present in 4 cases	Present in 1 case	Present in 2 cases
Reactive follicles/colonization	Present in 2 cases with colonization signs	Absent	Absent
Blasts	Present in 9 cases	Present in 4 cases	Present in 5 cases
s, single			

Immunohistochemical study was performed in 7 FL and 4 MCL cases. All the MCL and FL were B-cell lymphomas and contained single or small groups of diffuse T-cells. The diagnosis of FL was made by expression of CD23, CD38 and CD10 in various combinations. All the 3 cases of FL of the stomach were CD10-negative and expressed in parallel either CD38 or CD23. CD5 reactivity was found diagnostically meaningful for MCL: all cases were CD5-positive.

Morphological characteristics of lymphoid-cell infiltrations in gastric mucosa for lymphomas and reactive infiltrations are compared in tabl. 5.

CONCLUSIONS

1. Analysis of 71 gastrobiopsies from MALT-lymphoma patients discovered tumor cell size to be the most important morphological criterion. Three groups were identified bas-

Фолликулы обнаружены в 34,78 % в виде округлых или слегка неправильных очертаний светлых центров размножения, имеющих типичный состав из centrocytes и centroblasts с единичными макрофагами с широкой цитоплазмой с фагоцитированными тельцами. Зародышевые центры были окружены неширокой, более плотной и темной при окраске гематоксилином и эозином зоной мантии из небольших лимфоидных клеток с округлыми ядрами. Ни один случай не имел признаков колонизации фолликулов.

Лимфоэпителиальные поражения имелись приблизительно в 1/5 случаев. LELs состояли из более чем 3 небольших лимфоидных клеток, очертания желез были искажены. В основном наблюдалась инфильтрация эпителия желез сегментоядерными лейкоцитами — формирование так называемых крипт-абсцессов.

Единичные крупные (бластные) клетки имелись в 2 случаях (8,7 %). Данные клетки имели облик centroblasts или иммунобластов, были рассеяны среди мелкоклеточного инфильтрата.

С помощью метода иммунофенотипирования изучили 21 случай реактивных лимфоидных инфильтратов в материале гастробиопсий.

Клетки инфильтрата экспрессировали CD45, при этом положительная реакция выявлялась на всех клетках инфильтрата, имеющих, в основном, вид небольших групп или рыхлых размытых скоплений.

Наблюдался смешанноклеточный инфильтрат, где Т-лимфоциты преобладали над В-лимфоцитами, или реже находились в равном соотношении, при этом преобладали CD8-позитивные Т-лимфоциты.

Отмечалась негативная реакция клеток инфильтрата с CD21, CD23, CD5, CD10.

При реакции с CD21 и CD23 отмечалось наличие позитивной, хорошо выраженной, организованной сети ФДК реактивных фолликулов.

При реакции с CD38 отмечалась экспрессия на плазматических клетках.

Периферические мелкоклеточные В-клеточные лимфомы желудка: лимфома из клеток зоны мантии, фолликулярная лимфома; лимфома Беркитта

В исследование вошли 21 больной в возрасте от 14 до 83 лет, средний возраст больных составил 48 лет. В группе больных преобладали мужчины, в соотношении 1,3:1. Отобранные для дифференциальной диагностики с MALT-лимфомой случаи были представлены периферическими мелкоклеточными В-клеточными лимфомами, уступающими по частоте поражения желудка мальтоме: фолликулярная лимфома I, I—II, II цитологической степени — 10 случаев (рис. 10, 11), лимфома из клеток зоны мантии — 6 случаев (рис. 12). Кроме того, сюда условно вошли случаи лимфомы Беркитта — 5 случаев, вследствие того, что данная нозология может иметь средние размеры неопластических клеток (рис. 13). Из нашего исследования исключили В-ХЛЛ, так как за период 1995—2003 гг. не было ни одного случая поражения желудка при данной нозологии.

Все исследованные гастробиоптаты были представлены небольшими кусочками слизистой оболочки желудка из разных отделов. В двух третях исследованного материала отмечались дефекты слизистой оболочки от поверхностной эрозии до изъ-

ing on predominating cell size in the tumor infiltration, i.e. small cell, mixed cell (small and medium) and medium cell tumors.

Table 5

Diagnostically meaningful morphological characteristics

Morphological sign	MALT-lymphoma	Reactive lymphoid cell infiltration	Other lymphomas	
			follicular lymphoma	mantle cell lymphoma
Monocytoid B-lymphocytes	35.2%	Absent	10%	16.6%
Plasma cells	85.9%	100%	70%	33.3%
Plasmocytoid differentiation	21.1%	Absent	10%	Absent
Lymphoepithelial lesions	50.7%	Single in 20%	40%	s in 16.6%
Reactive follicles	30% (of them 15% with colonization)	30% free from colonization signs	20% with colonization	Absent
Blasts	73.2%)	10%	90%	66.6%

s, single.

2. Cytomorphological appearance of cells was changing with cell size increasing: the changes involved nucleus shape, chromatin status and increase in degree of cytological atypia.

3. The presence of tumor cells with markedly atypical morphology was associated with more frequent presence of monocytoid B-cells (15.38 % in group I, 40 % in group II, 80 % in group III), while the number of plasma cells was progressively decreasing (69.23 % in group I, 42.5 % in group II, 20 % in group III). At the same time neoplastic elements with plasmocytoid differentiation were 20 to 30 % in all the three groups.

4. Reactive lymphoid follicles were found in 29.58 % of MALT-lymphomas with colonization signs present in slightly more than half cases. Occurrence of lymphoid follicles was decreasing with increase in tumor cell size, while the number of colonized follicles was rising.

5. LELs were found in 50.7 % of gastrobiopsies and were not pathognomic for MALT-lymphomas because they were also seen in other small-cell lymphomas (in 40 % of FL, 16.6 % of MCL) and even in reactive lymphoid infiltrations (17.39 %).

6. Lymphoid follicles were present more frequently in reactive infiltrations (34.78 %) and less frequently in MALT-lymphomas (29.58 %) with half of the cases demonstrating colonization signs. As to other lymphomas, follicles were found only in FL (1/5), all with colonization signs.

7. It is proposed to make blast count in MALT-lymphomas using combined criteria: individual diffuse cells, blast clusters of less than 20 cells, diffused cells + clusters of less than 20 blasts and blast fields of more than 20 cells. The last group may be defined as 'diffuse large B-cell lymphoma with MALT-lymphoma fields'.

язвления. Активность воспаления при всех вариантах лимфом была слабой и умеренно выраженной.

Обсемененность *Helicobacter pylori* наблюдалась в 8 случаях (38,1 %).

При изучении плотности и характера роста инфильтратов было выявлено следующее: инфильтраты лимфом имели умеренную и выраженную плотность (38,1 и 61,9 % соответственно). Характер роста при лимфоме из клеток зоны мантии и фолликулярной лимфоме был приблизительно в трети случаев очагово-диффузным, и в 2/3 случаев — диффузным. При ЛБ характер роста во всех 5 случаях был диффузным.

Результаты сравнения морфологических признаков ФЛ, ЛКМ, ЛБ отражены в табл. 4.

Среди периферических мелкоклеточных В-клеточных лимфом с помощью иммуногистохимического исследования изучалось 7 случаев фолликулярной лимфомы и 4 случая лимфомы из клеток зоны мантии. Иммунологически все изученные лимфомы (ЛКМ и ФЛ) были В-клеточными, с единичными или группами немногочисленных рассеянных Т-клеток. При этом диагноз ФЛ ставился на основании совокупности CD23, CD38, CD10, встречающихся в различных сочетаниях. Следует отметить, что все 3 случая ФЛ желудка являлись CD10-негативными, при этом клетки опухолевого инфильтрата были либо CD38-позитивными, либо CD23-позитивными. Для ЛКМ диагностически значимой являлась реакция с CD5: все случаи были позитивными.

Сравнительный анализ морфологических признаков лимфоидноклеточных инфильтратов в слизистой оболочке желудка при лимфомах и реактивных инфильтратах приведен в табл. 5.

Таблица 4

Периферические мелкоклеточные В-клеточные лимфомы, лимфома Беркитта — морфологические особенности лимфоидноклеточных инфильтратов в слизистой оболочке желудка

Морфологический признак	Фолликулярная лимфома (10 случаев)	Лимфома из клеток зоны мантии (6 случаев)	Лимфома Беркитта (5 случаев)
1. Размер опухолевых клеток	Смешанный	Малые или средние	Средний
2. Моноцитонидные В-лимфоциты	Имелись в 1 случае	Имелись в 1 случае	Отсутствовали
3. Плазматические клетки	Имелись в 7 случаях	Имелись в 2 случаях	Отсутствовали
4. Плазмацитоидная дифференцировка	Имелась в 1 случае	Отсутствовали	Отсутствовали
5. Лимфоэпителиальные поражения	Имелись в 4 случаях	Имелись в 1 случае (ед)	Имелись в 2 случаях
6. Лимфоидные фолликулы	Имелись в 2 случаях с признаками колонизации	Отсутствовали	Отсутствовали
7. Бластные клетки	Имелись в 9 случаях	Имелись в 4 случаях	Имелись в 5 случаях
Сокращения: ед — единичные.			

8. MALT-lymphoma neoplastic elements do not have characteristic pathognomic immunological signs. They all expressed common leukocyte antigen and B-line differentiation markers. T-cells were mainly present as single cells, loosely diffused in B-cell infiltration, T-cell clusters were seen less frequently. There was a slight predominance of CD8-lymphocytes over CD4-lymphocytes in T-cell population. FDC were sometimes present as small, loose clusters. CD38 were found on plasma cells located as clusters or sheets in surface areas. All cases demonstrated plasma cell polyclonality, i.e. expressed Ig of various classes without restriction of one of the light chains. Immunological diagnosis may therefore be based on identification of changes in immunoarchitecture, if other immunological signs are not available.

9. The diagnosis of MALT-lymphoma of the stomach by gastrobiopsy may be difficult because some morphological characteristics of MALT-lymphoma may be shared by other peripheral small-cell lymphomas (atypical small lymphoid cells, reactive follicles, LELs). Morphoimmunological study is therefore needed, and immunohistochemical analysis is determinant for the diagnosis in some cases.

10. Small B-cell lymphomas that can be diagnosed by gastrobiopsy, beside extranodal MALT-lymphoma of marginal zone, include follicular lymphoma and mantle cell lymphoma that share common morphological characteristics with MALT-lymphoma. The presence of CD5 expression with the absence of CD23 reactivity is a diagnostic criterion for mantle cell lymphomas, while expression of CD10, CD23, CD38 in various combinations is characteristic of follicular lymphoma.

Таблица 5

Диагностически значимые морфологические признаки

Морфологический признак	MALT-лимфома	Реактивный лимфоидноклеточный инфильтрат	Другие лимфомы*
Моноцитонидные В-лимфоциты	35,2%	Отсутствуют	ФЛ-10% ЛКМ-16,6%
Плазматические клетки	85,9%	100%	ФЛ-70% ЛКМ-33,3%
Плазмоцитоидная дифференцировка	21,1%	Отсутствует	ФЛ-10% ЛКМ-отс
Лимфоэпителиальные поражения	50,7%	Единичные в 20%	ФЛ-40% ЛКМ-ед в 16,6%
Лимфоидные фолликулы	30% из них 15% с колонизацией	30% без признаков колонизации	ФЛ-20% с колонизацией ЛКМ-отс
Бластные клетки	73,2%	10%	ФЛ-90% ЛКМ-66,6%

* Другие лимфомы — включают ФЛ, ЛКМ.
Сокращения: отс — отсутствует; ед — единичные.

ВЫВОДЫ

1. В результате гистологического анализа 71 случая MALT-лимфомы желудка на материале гастробиопсий установлено, что наиболее важным морфологическим критерием в оценке опухолевой ткани служат размеры опухолевых клеток. В зависимости от размеров преобладающих в опухолевом инфильтрате клеток выделено 3 группы: из мелких клеток, смешанный (из мелких и средних клеток), из средних по размеру клеток.

2. С увеличением размеров клеток меняется их цитоморфологический облик — форма ядер, состояние хроматина, а также нарастает степень цитологической атипии.

3. Получены данные, свидетельствующие о том, что при наличии опухолевых клеток с выраженной атипичной морфологией в инфильтрате чаще встречаются моноцитонидные В-клетки (I группа — 15,38 % , II группа — 40 % , III группа — 80 %), а количество плазматических клеток прогрессивно уменьшается (I группа — 69,23 % , II группа — 42,5 % , III группа — 20 %). В то же время плазмоцитоидная дифференцировка неопластических элементов колеблется между 20-30 % во всех трех группах.

4. Установлено, что реактивные лимфоидные фолликулы при MALT-лимфоме встречаются в 29,58 % случаев, из которых чуть больше половины были с явлениями колонизации. Частота встречаемости лимфоидных фолликулов снижается по мере укрупнения опухолевых клеток, а количество колонизированных фолликулов возрастает.

5. Лимфоэпителиальные поражения (LELs) в препаратах гастробиопсий наблюдаются в 50,7 % случаев и не являются патогномичным для этой лимфомы, так как могут встречаться при других мелкоклеточных лимфомах (при фолликулярной

лимфоме — в 40 % , лимфоме из клеток зоны мантии — в 16,6 % случаев) и даже в реактивных лимфоидных инфильтратах (17,39 %).

6. Лимфоидные фолликулы чаще встречались в реактивных инфильтратах — 34,78 %; при MALT-лимфоме несколько реже — в 29,58 %, из которых чуть больше половины было с явлениями колонизации. При других лимфомах фолликулы имелись только в случаях ФЛ в 1/5 случаев, при этом с явлениями колонизации.

7. Подсчет количества бластных клеток в MALT-лимфоме предложено проводить с использованием комбинированных критериев: единичные рассеянные клетки, группы бластов менее 20 клеток, рассеянные клетки + группы менее 20 клеток, поля бластов более 20 клеток. Последняя группа должна диагностироваться как «диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома с полями MALT-лимфомы».

8. Неопластические элементы MALT-лимфомы не имели характерных патоморфологических признаков. Все они экспрессировали общий лейкоцитарный антиген, маркеры В-линейной дифференцировки. Т-клетки, чаще единичные, были рыхло рассеяны в В-клеточном инфильтрате, реже наблюдались скопления Т-клеток. Среди Т-клеточной популяции отмечалось незначительное преобладание CD8-лимфоцитов над CD4-лимфоцитами. Определялись ФДК, в основном в виде небольших рыхлых групп. CD38 определялся на плазматических клетках, которые располагались в поверхностных отделах в виде скоплений и пластов. Все исследованные случаи демонстрировали поликлональность плазматических клеток, то есть экспрессировали Ig разных типов и не выявили рестрикции одной из легких цепей. Таким образом, иммунологический диагноз должен основываться на выявлении нарушенной иммуноархитектоники и иммунофенотипических особенностей клеток, позволяющих проводить дифференциальную диагностику MALT-лимфомы с другими мелкоклеточными лимфомами и реактивными лимфоидными инфильтратами.

9. Диагностика MALT-лимфомы желудка на материале гастробиопсий в ряде случаев является сложной, так как отдельные морфологические особенности, характерные для этой лимфомы, могут наблюдаться и при других периферических мелкоклеточных лимфомах (атипичные мелкие лимфоидные клетки, реактивные фолликулы, LEL), в силу чего необходима оценка морфо-иммунологической картины и не редко иммуногистохимическое исследование является решающим в постановке диагноза.

10. Мелкоклеточные В-клеточные лимфомы, диагностируемые по материалу гастробиопсий, помимо экстранодальной лимфомы маргинальной зоны MALT--типа включают фолликулярную лимфому и мантийноклеточную лимфому, которые могут иметь сходные с MALT-омами морфологические характеристики. Диагностическим признаком лимфом из клеток зоны мантии является экспрессия CD5 при отсутствии CD23, а фолликулярной лимфомы — CD10, CD23, CD38 в различных сочетаниях.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. *Aruin L.I., Kapuller L.L., Isakov V.A.* Морфологическая диагностика болезней желудка и кишечника. // Москва, 1998.
2. *Aruin L.I., Kapuller L.L., Isakov V.A.* Morphological diagnostic of stomach and intestine disease.// Moscow, 1998. (in Russian).
3. *Бирбраер В.М., Гулева А.Г., Дмитриева С.Д., и др.* Комплексная диагностика изолированных форм лимфосаркомы желудка.// Под редакцией С.Д.Дмитриевой. — Ростов-на-Дону, 2001.
4. *Birbraer V.M., Guleva A.G., Dmytrieva S.D.* et al. Complex diagnostic of isolated forms of stomach lymphoma (DmytrievaS.D., Ed). //Rostov , 2001.(in Russian).
5. *Arista-Nasr J., Herrera-Goepfert R., Lazos-Ochoa M., et al.* Histologic changes of the gastric mucosa associated with primary gastric lymphoma in endoscopic biopsy specimens.// Arch.Pathol.Lab.Med. — 2000. — V.124. — P.1628–1631.
6. *Barth T., Bentz M., Leithauser F., et al.* Pathogenic complexzity of gastric B-cell lymphoma.//Blood. — 2002. — V.100 (3). — P.1095–1096.
7. *Cabras A.D., Candidus S., Fend F., et al.* Biclinality of Gastric Lymphomas.// Lab.Invest. — 2001. — V.81. — P.961–967.
8. *Cavalli F., Isaacson P.G., Gascoyne R.D., et al.* MALT lymphomas.// Hematol. — 2001. — V. — P.241–258.
9. *Chan J.K.C.* Gastrointestinal Lymphomas: An Overview with on New Findings and Diagnostic Problems. // Seminars in Diagn.Path. — 1996. — V.13. — P.260–296.
10. *Chen X.Y., Liu W.Z., Shi Y., et al.* Helicobacter pylori associated gastric diseases and lymphoid tissue hyperplasia in gastric antral mucosa. //J.Clin.Pathol. — 2002. — V.55. — P. 13–137.
11. *El-Zimaity H.M., El-Zaatari F.A., Dore M.P., et al.* The differential diagnosis of the early gastric mucosa-associated lymphoma: polymerase chain reaction and paraffin section immunophenotyping.// Mod.Pathol. — 1999. — V.12(9). — P.885–893.
12. *Fujiyoshi Y., Inagaki H., Tateyama H., et al.* Mott cell tumor of the stomach with Helicobacter pylori infection.//Pathol. Intern. — 2001. — V.51. — P.43–46.
13. *Harris N.L., Jaffe E.S., Stein H., et al.* A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group.// Blood. — 1994. — V.84. — P.1361–1392.
14. *Harris N.L., Jaffe E.S., Diebold J., et al.* The World Health Organization Classification of Neoplastic Diseases of the Hematopoietic and Lymphoid Tissues. // Ann.Oncol. — 1999. — V.10. — P.1419–1432.
15. *Hiyama T., Haruma K., Kitadai Y.* et al. Clinicopathologic features of gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma: a comparison with diffuse large B-cell lymphoma without a mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma component. // J.Gastroenterol.Hepatol. — 2001. — V.16. — P.734–739.
16. *Hiyama T., Haruma K., Kitadai Y., et al.* B-cell monoclonality in Helicobacter pylori-associated chronic atrophic gastritis. //Virchows Arch. — 2001. — V.438. — P.232–237.
17. *Hsi E.D., Eisbruch A., Greenson J.K., et al.* Classification of primary gastric lymphomas according to histologic features.// Am.J.Surg.Pathol. — 1998. — V.22(1). — P.17–27.

16. *Isaacson P.G., Spencer J.* The biology of low-grade MALT lymphoma.// *Journal of Clinical Pathology.* — 1995. — V.48. — P.395–397.

17. *Yoshino T., Omonishi K., Kobayashi K., et al.* Clinicopathological features of gastric mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphomas: high grade transformation and comparison with diffuse large B cell lymphomas without MALT lymphoma features. // *J.Clin.Pathol.* — 2000. — V.53. — P.187–190.

18. *Zettl A., Meister S., Katzenberger T., et al.* Immunohistochemical analysis of B-cell lymphoma using tissue microarrays identifies particular phenotypic profiles of B-cell lymphomas.//*Histopath.* — 2003. — V.43. — P.209–219.

19. *Zucca E., Bertoni F., Roggero E., et al.* The gastric marginal zone B-cell lymphoma of MALT type.//*Blood.* — 2000. — V.96. — P.410–419.

УДК 616-006.442-078.73

*Г.С. Тумян, Н. Н. Тупицын, Е.Н. Шолохова, А.М. Ковригина,
Н.А. Пробатова*

КЛИНИЧЕСКАЯ И ИММУНОМОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЛИМФОМЫ ХОДЖКИНА

ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

РЕЗЮМЕ

Лимфома Ходжкина относится к злокачественным заболеваниям лимфатической системы с определенной клинической, морфологической и иммунологической характеристикой. В данной работе проведен анализ иммунологических особенностей опухолевой ткани 200 больных классической лимфомой Ходжкина с отдельной характеристикой опухолевого компонента и клеток реактивного фона. Иммунофенотипический анализ опухолевого компонента показал, что иммунологическая верификация диагноза по экспрессии опухолевыми клетками антигена CD15 возможна в 86 % случаев. Выявлено существование двух важных иммунологических параметров, достоверно влияющих на клиническое течение и прогноз лимфомы Ходжкина — это экспрессия антигена CD15 опухолевыми клетками, не имеющими типичного облика клеток Березовского-Штернберга-Рид, и выраженная депляция Т-клеток в опухолевой ткани. Определен ряд морфологических параметров, характеризующих клеточный состав опухолевого компонента и реактивного «фона», ассоциированных с группой неблагоприятного прогноза. К таким параметрам относятся: отсутствие в ткани типичных клеток Березовского—Штернберга—Рид, большое число лакунарных клеток при нодулярном склерозе, обнаружение L&H клеток при смешанно-клеточном варианте заболевания, наличие атипичных клеток в лимфоидной ткани больных лимфомой Ходжкина, небольшое число плазматических клеток в реактивном микроокружении и присутствие среди клеток реактивного фона значительного числа эозинофильных лейкоцитов.

Ключевые слова: лимфома Ходжкина, иммунофенотипирование, прогноз.

Лимфома Ходжкина относится к злокачественным новообразованиям лимфатической системы и отличается своеобразием клинических проявлений, а также морфологических и иммунологических характеристик опухолевой ткани. Современные программы лечения позволяют получить ремиссии у большинства больных [1; 6]. Вместе с тем, остаются актуальными и во многом нерешенными проблемы первичной резистентности и раннего рецидивирования после достижения полной ремиссии [6; 7]. К настоящему времени стало ясно, что прогностические

G. S. Tumyan, N. N. Tupitsyn, E. N. Sholokhova, A. M. Kovrigina, N. A. Probatova

HODGKIN'S LYMPHOMA: CLINICAL AND IMMUNOLOGICAL CHARACTERIZATION

Russian State N. N. Blokhin Memorial Cancer Research Center
Affiliated to the Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

ABSTRACT

Hodgkin's lymphoma is a malignancy of lymphoid tissue with definite clinical, morphological and immunological patterns. This paper analyzes immunological features of tumor tissues from 200 patients with classical Hodgkin's lymphoma and characterizes separately the tumor component and cells of the reactive background. Immunophenotyping of the tumor component demonstrated that immunological verification of the diagnosis by antigen CD15 expression on tumor cells may be made in 86% of cases. There are two important immunological parameters significantly influencing the clinical course and prognosis in Hodgkin's lymphoma, i.e. CD15 expression on tumor cells free from typical features of Berezovsky-Sternberg-Reed cells, and marked T-cell depletion of tumor tissue. We defined several morphological characteristics of cell composition of the tumor component and the reactive "background" associated with poor prognosis. These characteristics include the absence of typical Berezovsky-Sternberg-Reed cells in tumor tissue, a large number of lacunar cells in nodular sclerosis, the presence of L&H cells in mixed cell disease, the presence of atypical cells in lymphoid tissue from patients with Hodgkin's lymphoma, a small number of plasma cells in the reactive microenvironment and the presence of a considerable number of eosinophilic leukocytes among the reactive environmental cells.

Key words: Hodgkin's lymphoma, immunophenotyping, prognosis.

Hodgkin's lymphoma is a malignancy of lymphoid tissue with characteristic clinical presentation, morphological and immunological features of tumor tissue. Modern treatment programs result in remission in most cases [1;6]. However, there are certain problems to be solved as concerns primary resistance and early recurrence after complete response to treatment [6; 7]. It is clear today that prognostic models based on clinical parameters have to a significant extent exhausted their potentialities, and new parameters should be found to predict the disease course [5].

The need in immunophenotyping of tumor tissue to make differential diagnosis raises no doubt today. Much attention is paid to prognostic role of expression of some antigens on Sternberg-Reed (SR) cells [3]. However, the effect of immunomorphological features of

модели, основанные на клинических параметрах, в значительной степени себя исчерпали и необходим поиск новых показателей, позволяющих прогнозировать течение заболевания [5].

На сегодняшний день необходимость иммунофенотипического анализа опухолевой ткани с дифференциально-диагностической целью не вызывает никаких сомнений. Большое внимание уделяется прогностическому значению экспрессии некоторых антигенов клетками Штернберга—Рид (ШР) [3]. Однако неясным и малоизученным остается влияние иммуноморфологических особенностей реактивного компонента на течение и прогноз заболевания. Опухолевый компонент при лимфоме Ходжкина имеет полиморфноклеточный состав и представлен наряду с классическими клетками Штернберга—Рид, другими опухолевыми клеточными элементами: клетками Ходжкина, а также лакунарными, лимфоцитарно-гистиоцитарными (L&H), атипичными, гигантскими и мумифицированными клетками [2]. Вместе с тем, соотношение различных типов опухолевых клеток в пределах установленного гистологического варианта, клеточный состав реактивного «фона», а также взаимосвязь опухолевого и реактивного компонентов изучены недостаточно.

Детальный анализ иммунологических и морфологических особенностей опухолевой ткани при лимфоме Ходжкина может способствовать выделению новых прогностических факторов, влияющих на выбор терапии и клиническое течение заболевания.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа построена на проспективном иммунофенотипическом анализе опухолевой ткани 200 больных классической лимфомой Ходжкина, которые находились под наблюдением ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН с 1992 по 2003 г. У всех больных диагноз заболевания был установлен на основании гистологического исследования согласно классификации ВОЗ от 2001 г. [4]. Наиболее часто встречался вариант с нодулярным склерозом — 57 %, смешанно-клеточный вариант составил 30 %. Богатая лимфоцитами классическая лимфома Ходжкина и вариант с лимфоидным истощением встречались у 5 % и 8 % больных соответственно. В 8 случаях гистологический вариант заболевания не уточнен.

Всем больным проводилось иммунологическое исследование опухолевой ткани на криостатных срезах методом прямой или непрямой реакции иммунофлуоресценции (РИФ). При необходимости дополнительного исследования или ретроспективного пересмотра, в ряде случаев были использованы парафиновые блоки тканей. В работе использовалась широкая панель моноклональных антител (МКА) к дифференцировочным, активационным и линейно ограниченными антигенам лейкоцитов человека.

Имунологическая идентификация опухолевых клеток проводилась, в основном, по цитоплазматической экспрессии антигена CD15 (177 больных — 89 %). Небольшое число больных, которым проводилось исследование опухолевых клеток на антиген CD30 (49 больных — 25 %), обусловлено тем, что этот антиген не имеет самостоятельного диагностического значения при проведении иммунологи-

the reactive component on the disease course and prognosis is unclear and poorly understood. The tumor component in Hodgkin's lymphoma has polymorphocellular composition and besides classical SR cells contains other cell elements such as Hodgkin cells as well as lacunar lymphocytic-histiocytic (L&H), atypical, giant and mummified cells [2]. While relationship of different tumor cell types within a distinguished histological tumor type, cell composition of the reactive "background" as well as relationship between the tumor and reactive components are yet poorly understood.

Detailed analysis of immunological and morphological characteristics of tumor cells in Hodgkin's lymphoma may help to find new prognostic factors influencing choice of treatment and clinical course of the disease.

MATERIALS AND METHODS

This study was based on prospective immunophenotyping of tumor tissue from 200 patients with classical Hodgkin's lymphoma managed at the N. N. Blokhin CRC RAMS during 1992 to 2003. The diagnosis was based on histological findings and made in accordance with the WHO (2001) classification [4] in all cases. Most cases presented with nodular sclerosis (57%) and 30% of the patients had the mixed-cell type. Lymphocyte-rich classical and lymphocyte-depleted Hodgkin's lymphomas were found in 5 and 8% of cases respectively. Histological type of the disease was not determined in 8 cases.

Immunological study of frozen sections by direct or indirect immunofluorescence (IF) was made in all cases. Study of paraffin blocks of tumor tissue was made in some cases requiring additional investigation or retrospective revision of the diagnosis. The analysis was performed using a broad panel of monoclonal antibodies (MAB) to differentiation, activation and lineage-restricted human leukocytic antigens.

Immunological identification of tumor cells was mainly done by cytoplasmic expression of CD15 antigen (177 patients, 89%). There were few (49, 25%) cases whose tumor cells were studied for CD30 because this antigen had no diagnostic value of its own in differentiation of Hodgkin's lymphoma from large-cell lymphomas. Study of CD30 expression was mainly required when morphological analysis failed to distinguish Hodgkin-like large cells from large-cells of anaplastic lymphoma. The presence of CD15+ and CD30+ cells was considered a sign in favor of Hodgkin's lymphoma. And vice versa the absence of CD15+ and the presence of CD30+ cell clusters was considered evidence of large-cell anaplastic lymphoma. Unlike CD30, cytoplasmic expression of CD15 is not found in non-Hodgkin's lymphoma cells. It then follows that CD15 expression is the most informative and important criterion for differentiation of Hodgkin's lymphomas.

The immunological study of the reactive component included:

1) characterization of lineage of predominant lymphoid elements in tumor tissue, i.e. T-lymphocytes by expression of T-cell antigens (CD3, CD5, CD7, CD4 and CD8) and B-lymphocytes by expression of CD19, CD20, CD22, CD37 antigens;

2) identification of non-lineage restricted and activation cell antigens (HLA-DR, CD38, CD23, CD10), study of follicular dendritic cell markers (CD21, CD23), histiocytic-macrophageal (CD163), plasma cells (bright cytoplasmic expression of CD38).

Disease spread was determined basing on Ann-Arbor recommendations with Cotswald

ческого дифференциального диагноза лимфомы Ходжкина и крупноклеточных лимфом. Исследование экспрессии CD30 проводилось, главным образом, в тех случаях, когда морфологически разграничить крупные клетки типа Ходжкина от клеток крупноклеточной анапластической лимфомы не представлялось возможным. Наличие крупных клеток, позитивных по экспрессии антигенов CD15 и CD30, свидетельствовало в пользу лимфомы Ходжкина. И, наоборот, отсутствие экспрессии CD15 и наличие групп (пластов) CD30-позитивных клеток позволяло установить диагноз крупноклеточной анапластической лимфомы. В отличие от антигена CD30, цитоплазматическая экспрессия антигена CD15 не определяется в опухолевых клетках при неходжкинских лимфомах. Следовательно, экспрессия антигена CD15 является наиболее информативным и важным критерием дифференциальной диагностики лимфомы Ходжкина.

Иммунологическое исследование реактивного компонента включало:

1) характеристику линейной принадлежности преобладающих в опухолевой ткани лимфоидных элементов — Т-лимфоцитов по уровню экспрессии Т-клеточных антигенов (CD3, CD5, CD7, CD4 и CD8) и В-лимфоцитов на основании экспрессии антигенов CD19, CD20, CD22, CD37.

2) определение линейно не рестриктированных и активационных антигенов клеток (HLA-DR, CD38, CD23, CD10), а также изучение маркеров фолликулярных дендритных клеток (CD21, CD23), гистиоцитарно-макрофагальных (CD163), плазматических клеток (яркая цитоплазматическая экспрессия CD38).

После иммуноморфологической верификации диагноза уточнялась степень распространения опухоли в соответствии с рекомендациями классификации, принятой в Ann-Arbor с учетом дополнений Cotswald.

Клиническая характеристика больных классической лимфомой Ходжкина представлена в табл. 1.

В наших наблюдениях основным клиническим проявлением злокачественного роста было увеличение лимфатических узлов разных групп. Наиболее часто забо-

Таблица 1

Клиническая характеристика больных лимфомой Ходжкина

	Абс. число	Проценты
Число больных	200	100
Пол		
Мужчины	91	45,5
Женщины	109	54,5
Возраст	14–71 лет	
Медиана	29 лет	
Стадии		
I/II	17/106	8,5 /53
III/IV	32/45	16/22,5
Симптомы интоксикации		
A/B	116/84	58/42

supplement following immunophenotyping verification of the diagnosis. Tabl. 1 presents clinical characteristics of patients with classical Hodgkin's lymphoma.

Table 1

Clinical characteristics of patients with Hodgkin's lymphoma

Characteristics	Number	Percentage
Patients	200	100
Gender		
Males	91	45.5
Females	109	54.5
Age, years	14-71	
Median age, years	29	
Disease stage		
I/II	17/106	8.5/53
III/IV	32/45	16/22.5
Intoxication symptoms		
A/B	116/84	58/42

The presence of enlarged lymph nodes of various levels was the most common clinical manifestation of malignant growth in our patients. Most often the disease started with involvement of cervical (169, 84.5%) and mediastinal (157, 78.5%) lymph nodes, with one third (33 %) of these patients having massive tumor conglomerations. Lung tissue (38, 19 %) and pleura (15, 7.5 %) were the most common sites of extranodal involvement.

RESULTS AND DISCUSSION

In our study 67 % of tumor tissue samples from patients with classical Hodgkin's lymphoma contained CD15+ SR cells and 14 % were free from CD15+ cells (CD15⁻). There was a group of patients (34, 19 %) presenting with SR cells not expressing CD15 while having large CD15+ cells free from typical morphological characteristics of SR cells (CD15^{+/}). The need in identification of this patient group was later confirmed from the clinical standpoint.

Study of T- and B-cells demonstrated that 76 % and 84 % of cases had a small or moderate number of non-tumor lymphocytes respectively. This fact is evidence of marked depletion of lymphoid elements in a vast majority of cases (tabl. 2).

Immunological comparison demonstrated that immunodetection of typical CD15+ SR cells was much rarer associated with marked depletion of T-lymphocytes in tumor tissue as compared to cases with no typical CD15+ cells. At the same time we failed to find any influence of large tumor elements with CD15 expression on the number of B-lymphocytes in the reactive microenvironment. Thus, there is a clear association of the number of morphologically typical SR cells with CD15 expression and degree of T-lymphocytic reaction in tumor tissue (tabl. 3).

Lymphocytes of non-tumor microenvironment expressed various activation antigens unlike normal resting lymph node cells. HLA-DR expression was found in 180 cases.

левание начиналось с поражения шейных (169 больных — 84,5 %) и медиастинальных лимфоузлов (157 больных — 78,5 %), причем у трети больных из этой группы (33 %) определялись массивные опухолевые конгломераты. Наиболее частой экстранодальной локализацией опухолевого поражения являлись легочная ткань (38 больных — 19 %) и плевра (15 больных — 7,5 %).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ

В нашем исследовании в опухолевой ткани больных классической лимфомой Ходжкина CD15+ клетки Штернберга—Рид определялись в 67 % случаев, в 14 % случаев выявить CD15+ клетки не удалось (CD15-). Нами выделена группа больных (34 больных — 19 %), в ткани которых антиген CD15 не экспрессировался клетками ШР, и в то же время выявлялись крупные, CD15-позитивные опухолевые клетки, не имеющие типичных морфологических черт клеток ШР (CD15+/-). Целесообразность выделения этой группы была в дальнейшем нами подтверждена с клинических позиций.

Исследование Т- и В-клеток показало, что в 76 % и 84 % случаев соответственно в опухолевой ткани определялось незначительное или умеренное число неопухолевых лимфоцитов. Этот факт говорит о выраженной деплеции лимфоидных элементов у преобладающего числа больных (табл. 2).

Таблица 2

Количество неопухолевых Т- и В-лимфоцитов в ткани больных ЛХ

Количество клеток	Т-лимфоциты	В-лимфоциты
Незначительное	72 (37%)	112 (58%)
Умеренное	77 (39%)	51 (26%)
Выраженное	48 (24%)	31 (16%)
Всего	197 (100%)	194 (100%)

При проведении иммунологических сопоставлений отмечено, что иммунодетекция типичных CD15+ клеток ШР значительно реже сопровождалась выраженной деплецией Т-лимфоцитов в опухолевой ткани, чем случаи с отсутствием типичных CD15-позитивных клеток. В то же время влияния крупных опухолевых элементов, экспрессирующих антиген CD15, на число В-лимфоцитов реактивного микроокружения не обнаружено. Таким образом, установлено существование определенной ассоциации между количеством морфологически типичных клеток ШР с экспрессией антигена CD15 и выраженностью Т-лимфоцитарной реакции в опухолевой ткани (табл. 3).

Лимфоциты неопухолевого микроокружения экспрессировали различные активационные антигены, что отличало их от нормальных покоящихся клеток лимфатического узла. Экспрессия антигена HLA-DR изучена у 180 больных. В 67 % случаев Т-клетки экспрессировали HLA-DR (количество HLA-DR+ клеток было зна-

Table 2
Extra-tumor T- and B-lymphocyte counts in tissue from patients with Hodgkin's lymphoma

Cell level	T-lymphocytes (%)	B-lymphocytes (%)
Low	72 (37)	112 (58)
Moderate	77 (39)	51 (26)
Marked	48 (24)	31 (16)
Total	197 (100)	194 (100)

Table 3
Relationship between CD15 expression on SR cells and reactive T-lymphocyte level in Hodgkin's lymphoma

Cell level	CD15 expression (%)		
	CD15-	CD15+/-	CD15+
Low	13 (52)	18 (56)	35 (29)
Moderate	8 (32)	9 (28)	51 (44)
Marked	4 (16)	5 (16)	31 (27)
Total	25 (100)	32 (100)	117 (100) (Chi square = 9.9; p=0.03)

T-cells expressed HLA-DR in 67% of cases (the number of HLA-DR+ cells was much greater than that of B-cells). In 15% there was but minor preponderance of HLA-DR+ cells over B-cells. In 18% MAB to HLA-DR stained only B-cell areas which meant no activation of T-cells as judged by this sign.

The patients were divided into three groups basing on the number of CD38+ cells, as follows. Group 1 had no CD38 expression (42%), group 2 demonstrated a moderate proportion of CD38+ lymphocytes (31%) and group 3 had a considerable number of CD38+ cells (27%). Study of sections for the presence of CD23 was performed in 162 patients. Most cases (88%) demonstrated no CD23 expression and only 12% had CD23+ activated lymphocytes.

Cell composition of the microenvironment was determined by degree and nature of CD163, CD38, CD23 and CD21 expression. It was found that 73% of patients had a certain proportion of CD163+ histiocytes in tumor tissue, 60% had zones of CD23+, CD21+ follicular dendritic cells and 55% had different proportions of CD38+ plasma cells.

Immunological analysis of tumor tissue in Hodgkin's lymphoma has therefore demonstrated that, on the one hand, immunological verification of the diagnosis by CD15 expression on tumor cells was possible in 86% of cases. On the other hand, the reactive component in Hodgkin's lymphoma had a heterogenic and a different cell composition, demonstrated signs of marked activation. We analyzed treatment outcomes in patients with classical Hodgkin's lymphoma included in our study to assess prognostic significance of the immunophenotyping parameters identified.

чительно больше, чем количество В-клеток). В 15 % HLA-DR+ клетки лишь незначительно преобладали над В-клетками. В 18 % МКА к HLA-DR антигену окрашивали только В-клеточные зоны, следовательно, активация Т-клеток на основании данного признака отсутствовала.

Таблица 3

Взаимосвязь между экспрессией CD15 клетками ШП и количеством реактивных Т-клеток при лимфоме Ходжкина

Число Т-клеток	Экспрессия CD15		
	CD15-	CD15+/-	CD15+
Незначительное	13 (52%)	18 (56%)	35 (29%)
Умеренное	8 (32%)	9 (28%)	51 (44%)
Выраженное	4 (16%)	5 (16%)	31 (27%)
Всего	25 (100%)	32 (100%)	117 (100%) ($\chi^2=9,9$; $p=0,03$)

По количеству CD38-позитивных лимфоцитов больные были разделены на 3 группы: 1 группа — антиген CD38 не определялся (42 %), 2 — умеренная пропорция CD38+ лимфоцитов (31 %) и 3 группа — значительное количество CD38+ клеток (27 %). Исследование срезов на наличие антигена CD23 проводилось у 162 больных. В большинстве случаев (88 %) — клетки не экспрессировали CD23 антиген и только в 12 % случаев в опухолевом узле определялись CD23+ активированные лимфоциты.

По уровню и характеру экспрессии антигенов CD163, CD38, CD23 и CD21 изучался клеточный состав микроокружения. В частности, у 73 % больных в том или ином соотношении в опухолевой ткани определялись CD163+ гистиоциты, в 60 % случаев встречались зоны CD23+, CD21+ фолликулярно-дендритных клеток и в 55 % случаев в разных соотношениях определялись CD38+плазматические клетки.

Таким образом, иммунофенотипический анализ опухолевой ткани при лимфоме Ходжкина показал, что с одной стороны, иммунологическая верификация диагноза по экспрессии опухолевыми клетками антигена CD15 возможна в 86 % случаев. С другой — реактивный компонент при этой форме заболевания гетерогенный, имеет признаки выраженной активации и различается по клеточному составу. Для изучения прогностического значения полученных иммунофенотипических параметров был проведен анализ результатов лечения исследуемой группы больных классической лимфомой Ходжкина.

Результаты терапии оценены у 183 больных, у которых лечение в полном объеме было завершено более чем за 6 месяцев до настоящего анализа. Больные получали лечение в зависимости от стадии заболевания и факторов прогноза в соответствии со стандартными критериями, принятыми на тот период в отделении химиотерапии гемобластозов. В основном применялись программы комбинированной хи-

Treatment outcomes were assessed in 183 patients who completed treatment at more than 6 months before the analysis. The patients received various treatment modalities depending on disease stage and prognostic factors as assessed by standard criteria used at that time at the Department of Hematological Malignancy Therapy. Most patients received combination chemoradiotherapy (124/68%) and 58 (32%) received polychemotherapy alone. One patient with stage I disease received radical radiotherapy.

Combination therapy at early disease included radiotherapy as local irradiation of initial disease areas at a total dose 36 to 40 Gy. Four patients received irradiation to all lymph node collectors above the diaphragm. In cases with advanced Hodgkin's lymphoma irradiation was delivered to residual disease or massive involvement areas at a total dose 30 to 36 Gy following polychemotherapy. Main polychemotherapy regimens given both alone or in combination with radiotherapy were CVPP (121/66%) or alternating CVPP and ABVD regimens (40/22%). BEACOPP or ABVD were used much less frequently (16/9% and 5/3% respectively). In cases with poor prognosis the treatment was intensified by additional chemotherapy cycles (62/34% patients received more than 6 cycles).

Immediate treatment outcomes were rather good with 159 (87%) complete and 3 (1.5%) partial responses. Twenty one (11.5%) patients did not respond to treatment. Twenty nine of 159 patients developed disease recurrence at 6 to 175 months following complete response. In half of them (55%) disease recurrence was detected within the first two years following treatment. Median recurrence-free survival (RFS) was 73 months, freedom from treatment failure (FFTF) was 67 months. The 5-year overall survival (OS) was 95%, 7 patients died from disease progression.

We studied the effect of various clinical factors on immediate and follow-up outcomes. Male gender ($p < 0.03$), stage IV disease ($p = 0.05$), massive mediastinum involvement ($p = 0.01$), spleen involvement ($p = 0.01$) had a statistically significant effect on disease prognosis. Other clinical and biological factors have lost their prognostic meaning with the implementation of more recent treatment regimens.

As mentioned above, an interesting finding in our verification of Hodgkin's lymphoma by CD15 marker was the absence of typical two- or multiple nuclear morphology of CD15+ SR cells in 19% of cases. Analysis of clinical meaning of CD15 expression demonstrated that it was this patient group that had very poor prognosis with a complete response rate of 64% only. While the presence or absence of CD15 expression on typical SR cells had no effect on response to treatment (tabl.4).

FFTF of patients with CD15+ atypical tumor cells was 43 months. These differences were most marked at a 5-year follow-up (pic. 1).

These results were a basis for a more detailed morphological study of tumor cells different in appearance from typical SR cells. Since CD15-positivity of atypical tumor cells was associated with poor prognosis, we studied morphological features of tumor tissue in all 42 cases with poor disease course. The "poor disease course" was defined as primary resistance or development of recurrence. A comparator group included the same number of patients achieving complete response (45). Morphological study was performed on both tumor and reactive component cells.

миолучевой терапии (124 больных — 68 %). Только полихимиотерапия использовалась у 58 больных (32 %). Один больной с I стадией ЛХ получил радикальную лучевую терапию.

При ранних стадиях заболевания в программе комбинированной терапии лучевое лечение проводилось в виде локального облучения исходных зон поражения в суммарной дозе 36–40 Гр. В 4 случаях облучению подвергнуты все лимфатические коллекторы выше диафрагмы. При продвинутых стадиях лимфомы Ходжкина лучевая терапия применялась после завершения курсов полихимиотерапии на зоны остаточной опухоли или на зоны массивного поражения в суммарной дозе 30–36 Гр. Основными схемами полихимиотерапии, применяемыми в лечении лимфомы Ходжкина, как в комбинированной программе, так и в самостоятельном режиме без лучевой терапии явились курсы CVPP (121 больной — 66 %) или чередование схем CVPP и ABVD (40 больных — 22 %).

Программа BEACOPP (16 больных — 9 %) или ABVD (5 больных — 3 %) применялись значительно реже. В неблагоприятной прогностической группе лечение было усилено за счет увеличения числа курсов химиотерапии (более 6 курсов химиотерапии получили 62 больных — 34 %).

Непосредственные результаты лечения в целом оказались весьма успешными: полные ремиссии достигнуты у 159 больных (87 %), частичные — у 3 больных (1,5 %). Лечение было неэффективным у 21 больного (11,5 %). У 29 из 159 больных в сроки от 6 до 175 месяцев от констатации полной ремиссии развились рецидивы. У половины из них (55 %) рецидивы были диагностированы в течение первых двух лет. Медиана безрецидивной выживаемости (RFS) составила 73 месяца, а медиана выживаемости, свободной от неудач лечения (FFTF) — 67 месяцев. Пятилетняя общая выживаемость (OS) в группе в целом составила 95 %, от прогрессирования заболевания умерли 7 больных.

Изучено влияние различных клинических факторов на непосредственные и отдаленные результаты лечения. Мужской пол больных ($p < 0,03$), IV стадия заболевания ($p = 0,05$), массивное поражение средостения ($p = 0,01$), вовлечение в процесс селезенки ($p = 0,01$) достоверно влияли на прогноз заболевания. Остальные клинические и биологические факторы в условиях современных программ лечения утратили свое прогностическое значение.

Как было сказано ранее, интересной особенностью, выявленной при проведении исследований по верификации лимфомы Ходжкина с помощью маркера CD15, явилось то, что у 19 % больных CD15-позитивные клетки не имели типичной морфологии дву- или многоядерных клеток ШР. При анализе клинического значения экспрессии антигена CD15 установлено, что именно эта группа больных отличалась крайне неблагоприятным прогнозом — частота полных ремиссий составила только 64 %. В то же время, экспрессия CD15 или отсутствие ее на типичных клетках ШР никак не отражались на эффективности терапии (табл. 4).

При экспрессии антигена CD15 на нетипичных опухолевых клетках медиана выживаемости, свободной от неудач лечения, составила 43 месяца. Эти различия особенно наглядны при сроках наблюдения до 5 лет (рис. 1).

Table 4
Relationship between CD15 expression and treatment outcomes in Hodgkin's lymphoma

Antigen expression	Treatment outcomes (%)			Total
	no response	partial response	complete response	
CD15-	2 (9)	1 (4)	20 (87)	23 (100)
CD15+/-	9 (32)	1 (4)	18 (64)	28 (100)
CD15+	9 (8)	1 (1)	99 (91)	109 (100)

Chi squared = 14; p=0,007

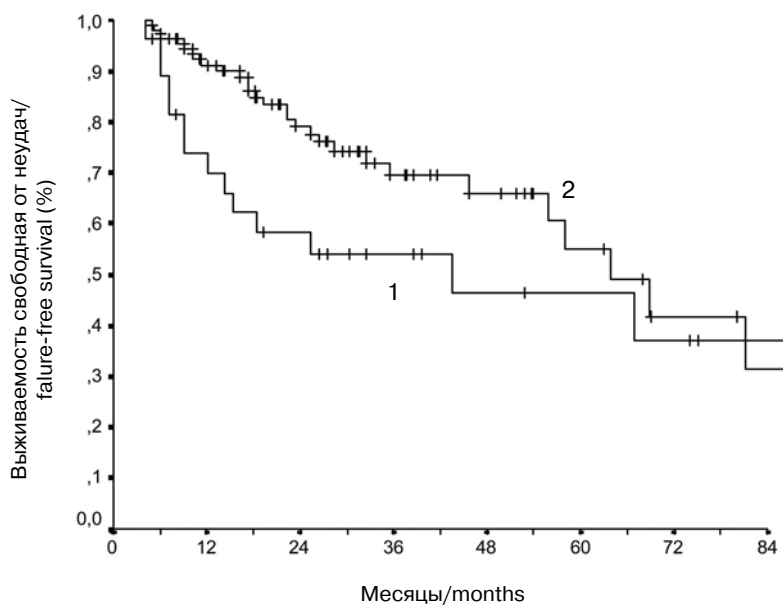


Рис. 1. Выживаемость, свободная от прогрессирования (FFTF) в группах больных ЛХ с разной экспрессией клетками ШР антигена CD15:

кривая 1 (N=28) — кШР CD15(+/-);

кривая 2 (N=109) — кШР CD15(+)

Pic. 1. Freedom from treatment failure (FFTF) in Hodgkin's lymphoma patients with different CD15 expression on SR cells:

curve 1 (N=28) CD15+/- SR cells;

curve 2 (N=109) CD15+ SR cells.

Таблица 4
Зависимость между экспрессией антигена CD15 и результатами лечения больных лимфомой Ходжкина

Экспрессия антигена	Результаты лечения			Всего
	Без эффекта	ЧР	ПР	
CD15-	2 (9%)	1 (4%)	20 (87%)	23 (100%)
CD15+/-	9 (32%)	1 (4%)	18 (64%)	28 (100%)
CD15+	9 (8%)	1 (1%)	99 (91%)	109 (100%)

χ^2 -квадрат = 14; $p = 0,007$

Полученные результаты послужили основанием для более детального морфологического изучения опухолевых клеток, не имеющих типичного облика клеток ШР. Поскольку CD15-положительная реакция на нетипичных опухолевых клетках была ассоциирована с неблагоприятным прогнозом, то были оценены морфологические особенности опухолевой ткани у всех 42 больных с неблагоприятным течением заболевания. Под «неблагоприятным течением заболевания» подразумевалась первичная резистентность и развитие рецидивов. Группа сравнения включала аналогичное число больных с продолжающейся полной ремиссией (45 больных). Морфологическому анализу подвергнуты как клетки опухолевого, так и реактивного компонентов.

Действительно, в опухолевой ткани больных лимфомой Ходжкина наряду с типичными клетками ШР, присутствовали и другие типы опухолевых клеток: клетки Ходжкина, а также лакунарные, лимфоцитарно-гистиоцитарные, атипичные, гигантские и мумифицированные клетки. Анализ клинического течения заболевания в зависимости от клеточного состава опухолевого компонента проведен в рамках наиболее распространенных гистологических вариантов лимфомы Ходжкина (нодулярный склероз и смешанно-клеточный вариант).

Оказалось, что при нодулярном склерозе типичные клетки ШР в неблагоприятной по течению группе отсутствовали в опухолевой ткани в два раза чаще (30 % и 17 %), чем в благоприятной группе. С другой стороны, большое число лакунарных клеток определялось в три раза чаще в ткани больных с неблагоприятным течением заболевания (табл. 5). Это отразилось на кривых выживаемости, свободной от неудач лечения: при небольшом количестве лакунарных клеток в опухолевой ткани медиана выживаемости составила 58 месяцев, а при выраженном количестве — только 18 месяцев.

Кроме этого, присутствие в опухолевой ткани лимфоцитарно-гистиоцитарных L&H клеток при классической лимфоме Ходжкина также ассоциировалось с неблагоприятным течением заболевания в анализируемой группе больных, что наиболее наглядно проявлялось при смешанно-клеточном варианте лимфомы Ходжкина.

Факт появления в том или ином количестве атипичных клеток в опухолевой ткани больных лимфомой Ходжкина неблагоприятно отражается на течении заболе-

Indeed, tumor tissues from patients with Hodgkin's lymphoma contained other tumor cells beside typical SR cells, such as Hodgkin cells, lacunar, lymphocytic-histiocytic, atypical, giant and mummified cells. Analysis of disease clinical course with respect to cell composition of the tumor component was performed in cases with most common histological types of Hodgkin's lymphoma (nodular sclerosis and mixed-cell types).

As appeared, in a subgroup of nodular sclerosis typical SR cells were absent in tumor tissue two-fold more frequently in poor against good prognosis cases (30 vs 17% respectively). While a large number of lacunar cells was detected in poor course group three-fold more frequently (tabl. 5). These findings had an effect on FFTF curves, with a median FFTF reaching 58 months in cases with few lacunar cells in tumor tissue samples versus 18 months in those with a marked lacunar cell component.

Table 5

Lacunar cell levels in lymphoid tissue from patients with nodular sclerosis

Lacunar cell level	Poor prognosis group (%)	Good prognosis group (%)
None	3 (11)	1 (3)
Low	2 (7)	8 (28)
Moderate	10 (37)	15 (52)
Marked	12 (45)	5 (17)
Total	27 (100)	29 (100)
p=0,03		

The presence of L&H cells in classical Hodgkin's lymphoma was also associated with poor disease course which was better seen in mixed-cell Hodgkin's lymphoma.

The presence of any amount of atypical cells in tumor tissue from patients with Hodgkin's lymphoma was a factor of poor disease course. Median survival among patients with no atypical cells in tumor tissue was 58 months versus 25 months for cases presenting with atypical cells (pic. 2).

Thus, we identified a number of morphological characteristics of tumor cell composition associated with poor prognosis. They include:

- the absence of typical SR cells;
- a large number of lacunar cells in nodular sclerosis;
- the presence of L&H cells in mixed-cell disease;
- the presence of atypical cells in tissue from patients with Hodgkin's lymphoma.

Our findings confirmed the results of immunological study assessing the prognostic role of CD15+ tumor cells free from typical SR cell morphology.

Together with immunological and morphological study of tumor cells we focused on analysis of the reactive background which was markedly polymorphous and contained both T- and B-lymphocytes, dendritic cells, histiocytes, plasmocytes, eosinophils. Each of the above-mentioned cell types was characterized in detail as to cell number and location, relationship with surrounding elements. We also analyzed the effect of the

Таблица 5

Количество лакунарных клеток в лимфоидной ткани больных с нодулярным склерозом

Лакунарные клетки	Неблагоприятная группа	Благоприятная группа
Нет	3 (11%)	1 (3%)
Незначительное	2 (7%)	8 (28%)
Умеренное	10 (37%)	15 (52%)
Выраженное	12 (45%)	5 (17%)
Всего	27 (100%)	29 (100%)
p=0,03		

вания. При отсутствии атипичных клеток медиана выживаемости составила 58 месяцев, а при наличии атипичных клеток — 25 месяцев (рис. 2).

Таким образом, установлен ряд морфологических параметров, характеризующих клеточный состав опухолевого компонента и ассоциированных с группой неблагоприятного прогноза. К ним относятся:

- отсутствие в ткани типичных клеток Штернберга—Рид;
- большое число лакунарных клеток при нодулярном склерозе;
- присутствие L&N клеток при смешанно-клеточном варианте заболевания;
- наличие атипичных клеток в ткани больных лимфомой Ходжкина.

Полученные данные подтвердили результаты иммунологического исследования относительно неблагоприятной прогностической роли CD15-позитивных опухолевых клеток, не имеющих типичного морфологического облика клеток Штернберга—Рид.

Помимо иммунологического и морфологического исследования опухолевых клеток, большое внимание было уделено изучению реактивного фона, который, как мы уже отмечали, чрезвычайно полиморфен и представлен Т- и В-лимфоцитами, дендритными клетками, гистиоцитами, плазмócитами, эозинофилами. Каждый из перечисленных клеточных типов микроокружения был детально охарактеризован с точки зрения количества и расположения клеток, их взаимоотношения с окружающими элементами. Кроме того, проведен анализ влияния особенностей клеточного состава реактивного компонента на клиническое течение и прогноз лимфомы Ходжкина. Из множества вариантов клеточного состава наиболее информативными с клинической точки зрения оказались плазмоклеточная реакция (см. рис. 6), имбибиция эозинофилами (см. рис. 7) и уровень Т-лимфоцитов в опухолевой ткани.

Умеренная или выраженная плазмоклеточная инфильтрация опухолевой ткани достоверно влияла на течение заболевания: медиана FTF в этой группе составила 58 месяцев по сравнению с 25 месяцами в группе больных с незначительным числом плазмócитов (рис. 3).

С другой стороны, выраженная имбибиция опухолевой ткани эозинофильными клетками ассоциировалась с худшим прогнозом при лимфоме Ходжкина. Так, выраженное количество эозинофилов определялось в 33 % и 11 % случаев соответственно в неблагоприятной и благоприятной по течению группах больных (табл. 6).

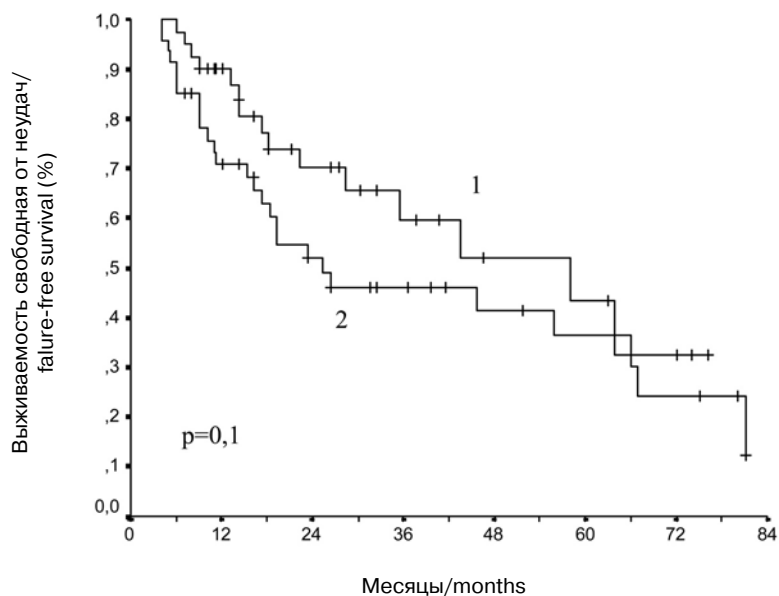


Рис. 2. FFTF больных ЛХ в зависимости от наличия атипичных клеток в опухолевой ткани:

кривая 1 (N=40) — клеток нет (-); кривая 2 (N=47) — есть (+).

Pic. 2. FFTF in Hodgkin's lymphoma with respect to the presence of atypical cells in tumor tissue:

curve 1 (N=40) no cells (-); curve 2 (N=47) cells present (+).

reactive component cell composition on clinical course and prognosis in Hodgkin's lymphoma. Plasmocyte reaction (see pic. 6), eosinophilic imbibition (see pic. 7) and T-lymphocyte level in tumor tissue were the most clinically informative elements of tumor cell composition.

Moderate or marked plasmocyte infiltration of tumor tissue influenced significantly the patients' disease course with median FFTF reaching 58 months in this group versus 25 months in the group with a minor number of plasmocytes in tumor tissue (pic. 3).

On the other hand, marked imbibition of tumor tissue with eosinophilic cells was associated with a poorer prognosis in Hodgkin's lymphoma: marked levels of eosinophils were found in 33 vs 11% of cases with poor vs good disease course respectively (tabl. 6).

Summarizing our morphological findings in tumor tissue from patients with Hodgkin's lymphoma the following conclusions may be made. There are morphological signs within each histological subtype that may predict disease course. Simple identification of disease

Таблица 6

Соотношение эозинофильных клеток в двух различных по клиническому течению группах больных лимфомой Ходжкина

Число эозинофилов	Неблагоприятная группа	Благоприятная группа
Незначительное	18 (43%)	28 (62%)
Умеренное	10 (24%)	12 (27%)
Выраженное	14 (33%)	5 (11%)
Всего	42 (100%)	45 (100%)
p=0,008		

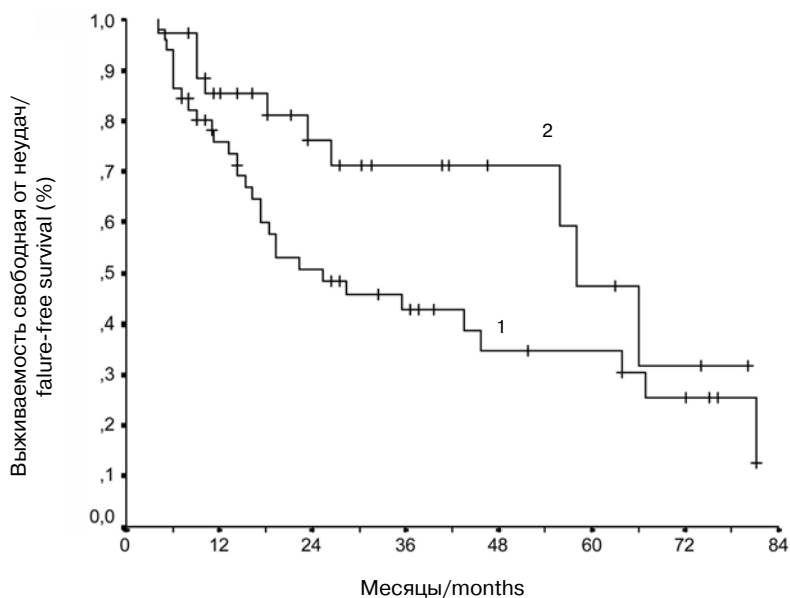


Рис. 3. FFTF больных ЛХ в зависимости от количества плазматических клеток:

кривая 1 (N=51) — незначительное количество;

кривая 2 (N=36) — умеренное или выраженное количество.

Pic. 3. FFTF in Hodgkin's lymphoma with respect to plasma cell level:

curve 1 (N=51) low level; curve 2 (N=36) moderate or marked level.

Обобщая данные морфологического анализа опухолевой ткани больных лимфомой Ходжкина, можно заключить, что в пределах каждого гистологического варианта выявляются морфологические признаки, наличие которых может в какой-то степени предопределять течение заболевания. По-видимому, простое определение варианта заболевания является явно недостаточным, поскольку под заключением

Table 6

Eosinophilic cell levels in two groups of patients with Hodgkin's lymphoma demonstrating different clinical course of disease

Eosinophilic cell level	Poor prognosis group (%)	Good prognosis group (%)
Low	18 (43)	28 (62)
Moderate	10 (24)	12 (27)
Marked	14 (33)	5 (11)
Total	42 (100)	45 (100)
p=0,008		

type is clearly insufficient, since terms such as 'nodular sclerosis' or 'mixed-cell type' refer to tumors with multicolored and heterogenic morphological patterns. It seems reasonable to develop a new prognostic index reflecting all the above-mentioned factors of poor prognosis including morphological characteristics of tumor cells and composition of the reactive cell component.

Clinical assessment of lymphoid cell composition in tumor tissue from patients with Hodgkin's lymphoma resulted in new, interesting findings. In particular, we determined the prognostic role of T-cell depletion level in tumor tissue. As appeared, the 5-year RFS in patients free from T-cell depletion was 92% vs 55% in cases with a moderate/marked T-cell depletion. It should be noted, that T-lymphocyte level in tumor tissue was the only parameter producing a statistically significant effect on both RFS and FFTF of all the clinical and immunomorphological parameters studied (pic. 4 and 5).

Decreased T-cell infiltration of tumor tissue may to a certain extent reflect depletion of T-cell immune reaction that is a preventing factor of SR tumor cell dissemination. T-cell immunodeficiency is a well-known factor of Hodgkin's lymphoma; however, most data were based on lymphocyte count in peripheral blood while there were no data about lymphocyte level in tumor tissue in the literature.

Thus, we identified two important immunological signs associated with poor prognosis. Expression of CD15 on tumor cells free from typical SR cell appearance influences immediate treatment outcomes, while T-lymphocytic depletion is more important for further disease course and follow-up treatment outcomes. Immunological study of tumor tissue in Hodgkin's lymphoma is of both differential diagnostic and prognostic value. Detection of typical CD15+ SR cells in T-lymphocyte environment, on the one hand, is evidence in favor of the diagnosis of Hodgkin's lymphoma, and, on the other hand, may predict a relatively good disease course.

Therefore, immunophenotyping of tumor tissue in Hodgkin's lymphoma is an important component of the diagnosis because it provides reliable verification of the diagnosis and new important information for disease prognosis. Comprehensive study of clinico-immunomorphological factors enlarges our knowledge of peculiar features of tumor tissue in Hodgkin's lymphoma, which in turn improves identification of patients with very poor prognosis requiring a different treatment approach.

«нодулярный склероз» или «смешанно-клеточный вариант» скрывается опухоль с пестрой и гетерогенной морфологической картиной. По всей вероятности, не лишено смысла введение новой прогностической индексации, которая слагалась бы из суммы всех перечисленных неблагоприятных факторов, отражающих как морфологические особенности опухолевых клеток, так и состав реактивного клеточного компонента.

Интересные и новые данные были получены при клинической оценке особенностей состава лимфоидных клеток в опухолевой ткани при лимфоме Ходжкина. В частности, установлена прогностическая роль уровня деплеции Т-клеток в опухолевой ткани. Дальнейший анализ показал, что пятилетняя безрецидивная выживаемость больных, у которых не отмечалось деплеции Т-клеток, составила 92 % по сравнению с 55 % в группе с умеренным/незначительным числом Т-клеток. Необходимо отметить, что уровень Т-лимфоцитов в опухолевой ткани явился единственным показателем из всех исследованных клинико-иммуноморфологических факторов, который достоверно влиял как на безрецидивное течение заболевания, так и на выживаемость, свободную от неудач лечения (рис. 4 и 5).

Снижение Т-клеточной инфильтрации опухолевой ткани может говорить о, своего рода, истощении Т-клеточной иммунной реакции, которая может являться фактором сдерживания диссеминации опухолевых клеток ШР в организме. Т-клеточный иммунодефицит хорошо известен при лимфоме Ходжкина, однако, большинство данных основывалось на анализе лимфоцитов периферической крови, а сведения по опухолевой ткани в литературе отсутствуют.

Таким образом, определены два важных иммунологических признака, ассоциированных с прогнозом заболевания. Оказалось, что экспрессия антигена CD15 опухолевыми клетками, не имеющими типичного облика клеток ШР, влияет на непосредственные результаты лечения, а уровень деплеции Т-лимфоцитов больше определяет дальнейшее течение заболевания и отражается на отдаленных результатах лечения. Иммунологическое исследование опухолевой ткани при лимфоме Ходжкина имеет не только важное дифференциально-диагностическое значение, но и играет определенную прогностическую роль. Определение в опухолевой ткани типичных CD15+ клеток БШР в окружении Т-лимфоцитов, с одной стороны, служит основанием для подтверждения диагноза лимфомы Ходжкина и, с другой стороны, может предопределять относительно благоприятное течение заболевания.

Таким образом, иммунофенотипические исследования опухолевой ткани при лимфоме Ходжкина являются необходимым компонентом диагностического процесса, так как позволяют достоверно верифицировать диагноз и дают важную информацию по оценке прогноза заболевания. Разностороннее изучение клинико-иммуноморфологических факторов расширяет представление об особенностях опухолевой ткани при лимфоме Ходжкина. Это, в свою очередь, увеличивает возможности в определении крайне неблагоприятной группы больных, которая требует иного лечебного подхода.

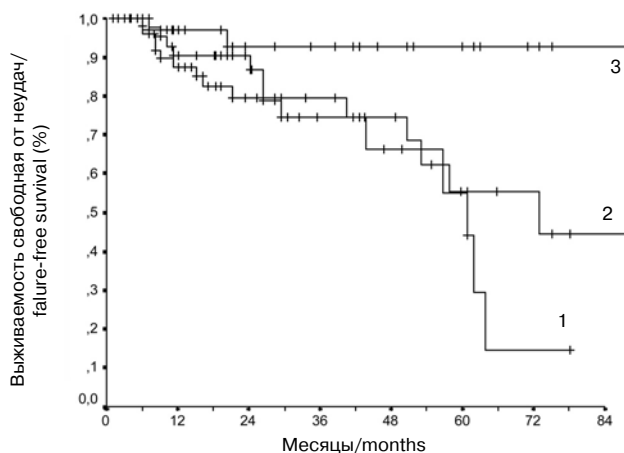


Рис. 4. Безрецидивная выживаемость (RFS) больных ЛХ в зависимости от количества Т-клеток:

кривая 1 (N=54) — незначительное; кривая 2 (N=65) — умеренное;
кривая 3 (N=38) — выраженное количество.

Pic. 4. Recurrence-free survival (RFS) in Hodgkin's lymphoma with respect to T-cell level:

curve 1 (N=54) low level; curve 2 (N=65) moderate level; curve 3 (N=38) marked level.

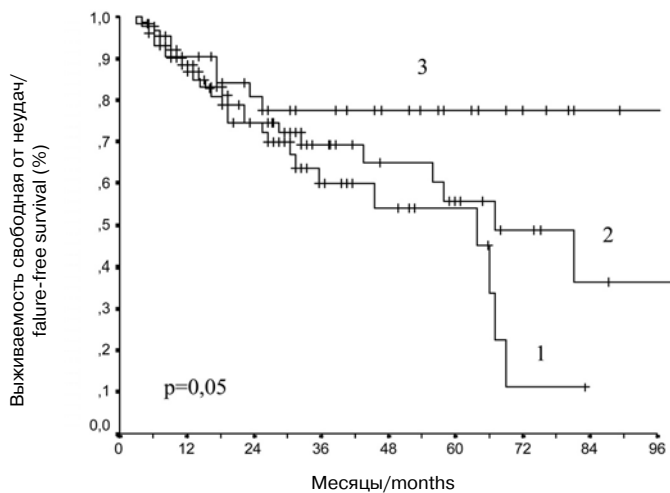


Рис. 5. FFTF больных ЛХ в зависимости от количества Т-клеток:

кривая 1 (N=65) — незначительное; кривая 2 (N=73) — умеренное;
кривая 3 (N=43) — выраженное количество.

Pic. 5. FFTF in Hodgkin's lymphoma with respect to T-cell level:

curve 1 (N=65) low level; curve 2 (N=73) moderate level; curve 3 (N=43) marked level

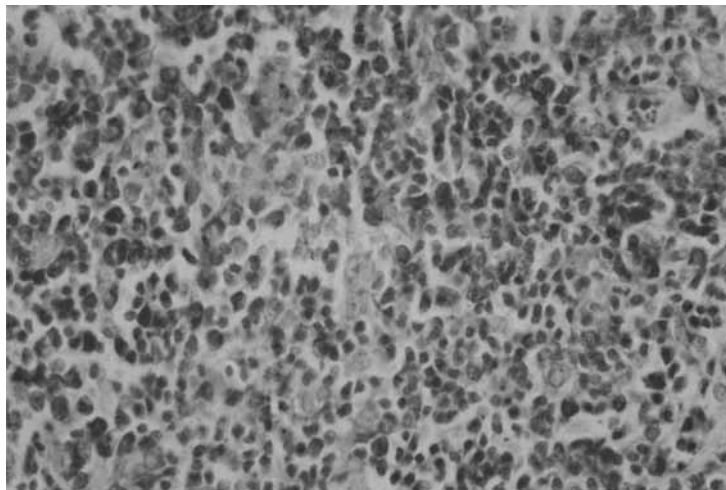


Рис. 6. Большое количество плазматических клеток в ткани больного лимфомой Ходжкина. Окраска по Браше $\times 400$.

Pic. 6. A large number of plasma cells in tissue from a Hodgkin's lymphoma patient. Brachet staining $\times 400$

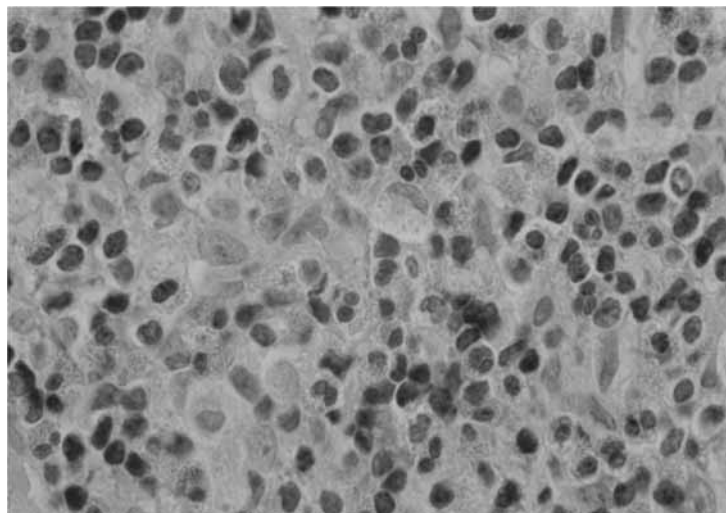


Рис. 7. Большое количество эозинофильных клеток в ткани больного лимфомой Ходжкина. Окраска гематоксилином и эозином $\times 800$.

Pic. 7. A large number of eosinophilic cells in tissue from a Hodgkin's lymphoma patient. Hematoxylin and eosin staining $\times 800$

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. *Демина Е.А.* Лимфогранулематоз. Клиническая онкогематология. Под редакцией Волковой М. А. Медицина 2001, стр. 314–336.
Demina E.A. Lymphogranulomatosis. In: Clinical oncohaematology (Volkova M.A, Ed). Moscow, Meditsina. — 2001. — N.314–336 (in Russian).
2. *Пробатова Н.А.* Морфологические критерии диагностики лимфомы Ходжкина. Материалы VI ежегодной российской онкологической конференции, Москва 2002, стр. 46–47.
Probatova N.A. Morphological criteria of Hodgkin's lymphoma diagnosis. Materials of 6th annual Russian oncology Conference. Moscow.2002.-P.46-47 (in Russian).
3. *Kuppers R., Schwering I., Brauning A.* et al. Biology of Hodgkin's lymphoma. Annals of Oncology 2002; 13(1): P.11–18.
4. *Jaffe E., Harris N., Stein H., Vardiman J.* World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. IARC Press 2001.
5. *Hasenclever D.* The disappearance of prognostic factors in Hodgkin's disease. Annals of Oncology, 2002, 13 (sup 1); P.75–78.
6. *Diehl V., Klimm B.* Hodgkin lymphoma: a curable disease: what next? European Journal of Haematology, v. 75, s. 66, 2005, P.6–14.
7. *Klimm B., Diehl V., Pfistner B.* Current treatment strategies of the German Hodgkin Study Group (GHSG). European Journal of Haematology, v. 75, s. 66, 2005, P.135–141.

УДК: 616-006.441-071:616-097.3

*В.Р. Городецкий^{1,4}, Е.Ю. Варламова³, Н.А. Пробатова¹, Т.Т. Кондратьева¹,
Л.Ю. Гривцова¹, Е.Н. Шолохова¹, Е.В. Гордеев⁵, А.Л. Иванов⁴,
Н.Н. Тупицын¹*

ЛИМФОМЫ С СЕКРЕЦИЕЙ МОНОКЛОНАЛЬНОГО ИММУНОГЛОБУЛИНА

¹ ГУ РОНЦ им.Н.Н.Блохина РАМН;

² Институт ревматологии РАМН;

³ Гематологический научный центр РАМН;

⁴ ЦКБ МПС №2 им. Н.А. Семашко;

⁵ МУЗ Раменская ЦРБ

ABSTRACT

Статья посвящена клинической и иммуноморфологической характеристике лимфом с секрецией моноклонального иммуноглобулина и/или белка Бенс—Джонса.

В результате проведенной работы было показано, что секреция моноклональных иммуноглобулинов (Ig) и/или их фрагментов наблюдается при различных вариантах периферических В-клеточных лимфом. Установлено, что в группе пациентов с Ig-секретирующей формой лимфомы из малых лимфоцитов /хронического лимфолейкоза (B-SLL/CLL) преобладает секреция свободных моноклональных L-цепей с или без PIgM, а у больных с Ig-секретирующей лимфомой селезенки из клеток маргинальной зоны — изолированная секреция PIgG, что соответствует значительной иммунологической зрелости опухолевых клеток этой лимфомы.

Выявлена взаимосвязь между экспрессией маркера CD38 и наличием моноклональной секреции у больных с B-SLL/CLL.

Показано, что моноклональная иммуноглобулинопатия может вносить существенный вклад в клиническую картину больных с Ig-секретирующими лимфомами, вызывая поражение почек (чаще по типу тубулоинтерстициальной нефропатии), синдрома гипервязкости и криоглобулинемического синдрома.

Кроме того, выявление секреции моноклонального Ig при MALT-лимфоме отражает высокую вероятность поражения костного мозга, что в целом не характерно для этой формы лимфом, и может объяснять высокую частоту рецидивов и неэффективность радикального хирургического удаления или лучевой терапии при «локальной» Ig-секретирующей форме MALT-лимфомы.

Ключевые слова: неходжкинские лимфомы, моноклональный иммуноглобулин.

ВВЕДЕНИЕ

Периферические В-клеточные лимфомы представляют гетерогенную группу. Согласно современным представлениям о патогенезе лимфоидных опухолей клет-

*V. R. Gorodetsky^{1,4}, E. Yu. Varlamova³, N. A. Probatova¹, T. T. Kondratyeva¹,
L. Yu. Grivtsova¹, E. N. Sholokhova¹, E. V. Gordeyev⁵, A. L. Ivanov⁴,
N. N. Tupitsyn¹*

MONOCLONAL IMMUNOGLOBULIN-SECRETING LYMPHOMAS

¹ State N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center affiliated to the
Russian Academy of Medical Sciences, Russian Federation;

² Institute of Rheumatology RAMS;

³ Hematology Research Center RAMS;

⁴ N. A. Semashko Central Clinical Hospital No.2; ⁵ Ramenky Central Hospital

ABSTRACT

The paper describes clinical and immunomorphological characterization of lymphomas secreting monoclonal immunoglobulin and/or Bence-Jones protein.

Our study has demonstrated that secretion of monoclonal immunoglobulins (Ig) and/or their fragments is seen in various peripheral B-cell lymphomas. It is shown that Ig-secreting small lymphocytic lymphomas/chronic lymphocytic leukemias (B-SLL/CLL) mainly secrete free monoclonal Ig light-chains with or without PIgM while Ig-secreting marginal zone lymphomas of the spleen secrete PIgG alone which is related to a considerable immunological maturity of this lymphoma cells.

CD38 expression was found associated with the presence of the monoclonal secretion in B-SLL/CLL.

Monoclonal immunoglobulinopathy may contribute considerably to the clinical pattern of Ig-secreting lymphomas by inducing renal damage (mainly as tubulointerstitial nephropathy), hyperviscosity syndrome or cryoglobulinemia syndrome.

Besides, the presence of monoclonal Ig secretion in MALT-lymphoma is associated with a high risk of bone marrow involvement which is not generally characteristic of this lymphoma type and may account for the high rate of disease recurrence and failure of radical surgical removal or radiotherapy in local Ig-secreting MALT-lymphomas.

Key words: non-Hodgkin's lymphoma, monoclonal immunoglobulin.

INTRODUCTION

There are a large variety of peripheral B-cell lymphoma types. According to the current concept of lymphoid tumor pathogenesis, tumor cells may stop maturing at any differentiation stage. They continue to proliferate and thus generate a cell clone as if "frozen"

ки могут прекратить созревание на любом этапе дифференцировки. При этом они размножаются и образуют клон клеток как бы «замороженных» на определенной стадии развития. Однако некоторые опухолевые В-лимфоциты сохраняют генетически детерминированную потенцию к дифференцировке и секреции моноклонального Ig. В опухолевом субстрате в ряде случаев можно выявить плазматоидные лимфоциты и плазматические клетки, являющиеся потомками опухолевых лимфоцитов, а при иммунохимическом исследовании белков сыворотки и мочи - моноклональный Ig и/или его фрагменты (легкие или тяжелые цепи).

Разработка и внедрение в клиническую практику иммунофенотипирования опухолевых лимфоидных клеток привели к переоценке морфологических критериев диагностики лимфом, что наряду с накоплением клинических и цитогенетических данных позволило выявить и охарактеризовать ряд новых вариантов лимфоидных неоплазий.

Однако факт секреции моноклонального Ig и/или его фрагментов и изотип парапротеина до последнего времени не использовались в качестве дифференциально-диагностических критериев В-клеточных лимфом (за исключением лимфоплазмочитарной лимфомы и болезней тяжелых цепей). Также недооценен вклад моноклональной иммуноглобулинопатии в клиническую симптоматику и прогноз Ig-секретирующих лимфом.

Есть все основания полагать, что выделение группы Ig-секретирующих лимфоидных опухолей в каждой категории В-клеточных лимфом в рамках классификации ВОЗ [15] будет способствовать улучшению дифференциальной диагностики, методов терапии и контроля течения В-лимфоидных опухолей с парапротеинемией.

Цель настоящей работы состояла в выделении и клинико-иммуноморфологической характеристике группы лимфом с моноклональной иммуноглобулинопатией.

ХАРАКТЕРИСТИКА БОЛЬНЫХ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Материалом настоящей работы послужили 35 пациентов с различными формами В-лимфоидных опухолей с секрецией P-Ig и/или белка Бенс—Джонса, выявленной при первичном обследовании или появившейся при динамическом наблюдении (табл. 1).

Обследование пациентов включало клинический осмотр больного, общий анализ крови, общий анализ мочи, стандартный набор биохимических тестов, подсчет миелограммы. Гистологическое исследование биоптатов лимфоузлов, селезенки и печени (окраска гематоксилином, эозином и по Браше), а также трепанобиоптатов костного мозга (окраска гематоксилином и эозином) проводилось проф. д.м.н. Н.А. Пробатовой, ГУ РОНЦ им.Н.Н.Блохина РАМН, и зав. отд. патанатомии ЦКБ №2 МПС А.Л.Ивановым. Цитологическое исследование отпечатков лимфоузлов, селезенки и печени (окраска по Романовскому—Гимзе) проведено вед.науч. сотрудником д.м.н. Т.Т. Кондратьевой, ГУ РОНЦ им.Н.Н.Блохина РАМН.

Имунохимические исследования сыворотки крови и мочи проводились в лаборатории гуморального иммунитета ГНЦ РАМН, зав. лаб., к.м.н. Е.Ю. Варламовой.

at a certain developmental stage. However, some tumor B-lymphocytes preserve their genetically determined ability to differentiate and to secrete monoclonal Ig. The tumor substrate may contain plasmocytoid lymphocytes and plasmatic cells that are progeny of tumor lymphocytes, and monoclonal Ig and/or its fragments (light or heavy chains) may be found by immunochemical study of serum and urine proteins.

The development and clinical use of tumor lymphoid cell immunophenotyping has led to reassessment of morphological criteria for the diagnosis of lymphoma and together with the accumulated clinical and cytogenetic findings has allowed identification and characterization of a number of new lymphoid tumor types.

Until recently the presence of secretion of monoclonal Ig and/or its fragments and paraprotein isotype have not been used in the differential diagnosis of B-cell lymphomas (except for lymphoplasmacytic lymphoma and heavy chain disease). There has also been underestimation of the role of monoclonal immunoglobulinopathy in clinical symptoms and prognosis of Ig-secreting lymphomas.

There is a clear evidence that identification of Ig-secreting lymphoid tumors in every WHO B-cell lymphoma type [15] will improve the differential diagnosis, therapy outcomes and control of B-lymphoid tumors with paraproteinemia.

The purpose of this study was to identify and to provide clinical and immunomorphological characterization of lymphomas with monoclonal immunoglobulinopathy.

PATIENTS AND METHODS

The study was performed in 35 patients with various B-lymphoid tumors secreting PIg and/or Bence—Jones protein as discovered at the diagnosis or follow-up assessments (tabl. 1).

The patients' assessment included clinical examination, complete blood count, urinalysis, blood chemistry and myelogram. Histological study of biopsies from lymph nodes, spleen and liver (hematoxylin, eosin and Brachet staining) and bone marrow trephine biopsies (hematoxylin and eosin staining) was performed by N. A. Probatova, M. D. (N. N. Blokhin CRC RAMS) and A. L. Ivanov, Head of Pathology Department, CCH No.2). Cytological study of lymph node, spleen and liver smears (Romanovsky-Giemsa staining) was made by T. T. Kondratyeva, M. D. (N. N. Blokhin CRC RAMS).

Immunochemical study of sera and urine was performed by E. Yu. Varlamova, Ph. D., Head of the Humoral Immunity Laboratory, HRC RAMS.

A recent procedure of immunochemical diagnosis was used to identify and to type monoclonal immunoglobulins or their fragments, as follows:

- 1) serum and concentrated urine agarose gel electrophoresis with electrophoregram densitometry to follow;
- 2) immunofixation and/or immunoelectrophoresis with anti- γ , anti- α , anti- μ , anti- κ , anti- λ monospecific antisera (Beckman-Culter, USA);
- 3) quantitative assay of polyclonal IgG, IgA, IgM by radial immunodiffusion.

The immunophenotyping of tumor lymphocytes was done by N. N. Tupitsyn, M. D., E. N. Sholokhova, Ph. D, and L. Yu. Andreyeva, Ph. D., at the Laboratory of Haematopoiesis Immunology, N. N. Blokhin CRC RAMS. The standard panel of monoclonal antibodies was used, as follows: CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD10, CD19,

Таблица 1
Распределение больных с Ig-серетирующими лимфомами по нозологическим формам, полу и возрасту

Нозологическая форма	Количество больных	Пол		Пределы возрастных колебаний
		М	Ж	
Лимфома селезенки из клеток маргинальной зоны	9	3	6	23–63
Лимфома из малых лимфоцитов/хронический лимфолейкоз	10	7	3	42–77
Лимфома из клеток мантийной зоны	1	1	–	35
Лимфомаплазмочитарная лимфома	5	3	2	41–77
MALT–лимфома	4	4	–	47–61
Диффузная В–клеточная, крупноклеточная лимфома	2	–	2	47; 70
Плазмочитарная лимфома/плазмочитом лимфоузлов	1	–	1	48
Фолликулярная лимфома	1	–	1	26
Неклассифицируемые	2	1	1	61;77
	35	19	16	23–77

Для выявления и типирования моноклональных иммуноглобулинов или их фрагментов применялась современная схема иммунохимической диагностики, включающая:

- 1) электрофорез в геле агарозы сыворотки крови и концентрированной мочи с последующей денситометрией электрофореграмм;
- 2) иммунофиксация и/или иммуноэлектрофорез с моноспецифическими анти-сыворотками: анти- γ , анти- α , анти- μ , анти- κ , анти- λ (Beckman—Coulter, США);
- 3) количественное определение поликлональных IgG, IgA, IgM методом радиальной иммунодиффузии.

Исследование иммунофенотипа опухолевых лимфоцитов проводилось в лаборатории иммунологии гемопоэза ГУ РОНЦ им. Н.Н.Блохина РАМН, проф. д.м.н. Н.Н.Тупицыным, к.м.н. Е.Н.Шолоховой и к.м.н. Л.Ю.Андреевой. Использовалась стандартная панель моноклональных антител: CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD10, CD19, CD20, CD22, CD23, CD37, CD38, анти-HLA-DR класса. Субстрат опухоли, на котором выполнялось иммунофенотипическое исследование, приведен в табл. 2.

Оценка иммунофенотипа лимфоидных клеток периферической крови и костного мозга осуществлялась методом проточной цитометрии на приборе FACScan (Becton Dickinson, США).

Маркер (CD) считался отрицательным (-), если его экспрессировали до 20 % клеток. В случае экспрессии выше 20 % реакция считалась положительной (+).

Table 1

Distribution of patients with Ig-secreting lymphomas with respect to clinical entity, gender and age

Clinical entity	No. of patients	Gender		Age range
		M	F	
Splenic marginal zone lymphoma	9	3	6	23–63
Small lymphocyte lymphoma/ chronic lymphocytic leukemia	10	7	3	42–77
Mantle cell lymphoma	1	1	–	35
Lymphoplasmocytic lymphoma	5	3	2	41–77
MALT-lymphoma	4	4	–	47–61
Diffuse large B-cell lymphoma	2	–	2	47; 70
Lymph node plasmocytic lymphoma/plasmocytoma	1	–	1	48
Follicular lymphoma	1	–	1	26
Unclassified	2	1	1	61; 77
Total	35	19	16	23–77

CD20, CD22, CD23, CD37, CD38, anti-HLA-DR class II MHC. Tumor substrate used for the immunophenotyping is demonstrated in tabl. 2.

Immunophenotyping of lymphoid cells from peripheral blood and bone marrow was done by flow cytometry using a FACScan (Becton Dickinson, USA).

The marker (CD) status was considered negative (), if its expression was <20% cells, and positive if its expression was >20%.

Class and type of immunoglobulins of lymphoid cells from peripheral blood and bone marrow were determined in cytology specimens by direct immunofluorescence with anti- μ , anti- γ , anti- α , anti- κ , anti- λ monospecific antibodies.

Determination of the expressed Ig class and type, beside immunophenotyping of tumor cells from lymph nodes and spleen, was made by immunofluorescence on frozen sections.

The assessment included imaging techniques such as lung x-ray, abdomen ultrasound, chest and abdomen computed tomography (CT), and small pelvic CT in some cases.

Causative relationship between the presence of monoclonal secretion and lymphoid tumor was assessed indirectly basing on:

- 1) identity of the Ig light chain isotype as expressed on tumor cell surface and found in the M-component;
- 2) correlation between the monoclonal secretion level and tumor size in some cases.

RESULTS AND DISCUSSION

Patient distribution with respect to clinical entities was made by the WHO classification [15]. Lymphomas failing to be attributed to a specific entity were referred to as unclassified.

Таблица 2

Субстрат иммунофенотипического исследования

№ больного	Периферическая кровь	Костный мозг	Криостатные срезы	
			Лимфоузел	Селезенка
1				+
2	+	+		
3				+
6				+
7	+*	+*		+
11	+			
12			+	
13	+			
14			+	
15	+			
16			+	
17			+**	
18	+		+	
20			+	
21			+	
22			+	
24			+	
25			+	
26	+			
29	+			
34			+	
35			+***	

* — при прогрессировании болезни; ** — повторное исследование выполнено при прогрессировании болезни; *** — иммуногистохимическое исследование выполнено на срезах с парафиновых блоков д.м.н. А.М.Ковригиной (РОНЦ им.Н.Н.Блохина РАМН).

Класс и тип иммуноглобулинов лимфоидных клеток периферической крови и костного мозга определялся на цитопрепаратах методом прямой иммунофлюоресценции с моноспецифическими антителами — анти- μ , анти- γ , анти- α , анти- κ , анти- λ .

Определение класса и типа экспрессируемых Ig, наряду с исследованием иммунофенотипа опухолевых клеток в лимфоузлах и селезенке, было выполнено иммунофлюоресцентным методом на криостатных срезах.

Из инструментальных методов исследования использовались рентгенография легких, ультразвуковое исследование органов брюшной полости, компьютерная томография органов грудной и брюшной полостей и, в ряде случаев, малого таза.

Причинно-следственная взаимосвязь между моноклональной секрецией и лимфатической опухолью оценивалась косвенно на основании:

- 1) идентичности изотипа легкой цепи Ig, экспрессируемого на поверхности опухолевых клеток и выявляемого в М-компоненте;

Table 2

Immunophenotyping substrate

Patient No.	Peripheral blood	Bone marrow	Frozen sections	
			lymph node	spleen
1				+
2	+	+		
3				+
6				+
7	++	++		+
11	+			
12			+	
13	+			
14			+	
15	+			
16			+	
17			+++	
18	+		+	
20			+	
21			+	
22			+	
24			+	
25			+	
26	+			
29	+			
34			+	
35			++++	

* — at disease progression; ** — repeated assessment at disease progression; *** — immunohistochemical study made on sections from paraffin blocks by A. M. Kovrigina, M. D. (N. N. Blokhin CRC RAMS).

Tabl. 3 demonstrates clinical entities and immunochemical types of Ig-secreting lymphomas.

Immunoglobulin-secreting small B-lymphocytic lymphoma/chronic lymphocytic leukemia (B-SLL/CLL)

Our study confirmed that paraproteinemic B-SLL/CLL cases frequently demonstrated secretion of Bence—Jones protein alone (50%) or in combination with PIgM (40%) (pic. 1).

The cause of excessive (or isolated) production of monoclonal light chains in B-SLL/CLL is unknown. It seems, that the excessive production of light chains during assembly of the whole Ig molecule is characteristic of normal B-lymphocytes at every stage of their differentiation beginning from immature B-lymphocytes. As the B-lymphocyte is maturing the unbalance in production of L-and H-chains is decreasing. Waldman T. A. et al. [32] and Hopper J. E., Papagiannes E. [12] provide indirect evidence in favor of this hypothesis. Since in many cases of chronic lymphocytic leukemia B-lymphocytes seem to

2) и, в ряде случаев, корреляции уровня моноклональной секреции с размерами опухолевой массы.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Распределение больных по нозологическим формам было проведено согласно критериям классификации ВОЗ [15]. В тех случаях, когда лимфома не могла быть однозначно отнесена к какой-либо категории классификации ВОЗ, она рассматривалась в группе «неклассифицируемые формы».

Нозологические формы и иммунохимические варианты Ig-секретирующих лимфом представлены в табл. 3.

Таблица 3
Нозологические формы и иммунохимические варианты Ig-секретирующих лимфом

Нозологическая форма лимфомы	Количество пациентов	Моноклональный Ig							
		Изолированный							PIg+BJ
		G		A	M		BJ		
		к	л		к	л	к	л	
Лимфома селезенки из клеток маргинальной зоны	9	3	2**	–	2	–	1*		1(IgGκ-BJκ)
Лимфома из малых лимфоцитов/хронический лимфолейкоз	10	1	–	–	–	–	4	1	4(IgMκ-BJκ)
Лимфома из клеток мантийной зоны	1	–	–	–	–	–	1	–	–
Лимфоплазмочитарная лимфома	5	–	–	–	4	–	–	–	1(IgMκ-BJκ)
MALT-лимфома	4	–	–	–	1	1	–	–	2(IgMκ-BJκ)
Диффузная В-клеточная, крупноклеточная лимфома	2	–	–	–	–	–	2	–	–
Плазмочитарная лимфома/плазмочитома лимфоузлов	1	–	–	–	–	–	–	–	1(IgAκ-BJκ)
Фолликулярная лимфома	1	–	–	–	1	–	–	–	–
Неклассифицируемые	2	–	–	–	–	–	1	1	–
Итого:	35	6		–	9		11		9

* – биклональная секреция:BJκ-BJл ** – изотип легкой цепи в одном из 2-х случаев установлен на основании изотипа легкой цепи Ig, экспрессируемого опухолевыми лимфоцитами.

Имуноглобулинсекретирующая лимфома из малых лимфоцитов/хронического лимфолейкоза (B-SLL/CLL)

Результаты наших исследований подтвердили тот факт, что у пациентов, страдающих B-SLL/CLL с парапротеинемией, наиболее часто определяется секреция белка Бенс—Джонса изолированно (50 %) или в сочетании с секрецией PIgM (40 %) (рис. 1).

Table 3

Ig-secreting lymphoma: clinical entities and immunochemical subtypes

Lymphoma clinical entities	No. of patients	Monoclonal Ig								PIg+BJ
		isolated								
		G		A	M		BJ			
		κ	λ		κ	λ	κ	λ		
Splenic marginal zone lymphoma	9	3	2**	–	2	–	1*		1 (IgGκ + BJκ)	
Small lymphocyte lymphoma/ chronic lymphocytic leukemia	10	1	–	–	–	–	4	1	4 (IgMκ + BJκ)	
Mantle cell lymphoma	1	–	–	–	–	–	1	–	–	
Lymphoplasmocytic lymphoma	5	–	–	–	4	–	–	–	1 (IgMκ + BJκ)	
MALT-lymphoma	4	–	–	–	1	1	–	–	2 (IgMκ + BJκ)	
Diffuse large B-cell lymphoma	2	–	–	–	–	–	2	–	–	
Lymph node plasmocytic lymphoma/plasmocytoma	1	–	–	–	–	–	–	–	1 (IgAκ + BJκ)	
Follicular lymphoma	1	–	–	–	1	–	–	–	–	
Unclassified	2	–	–	–	–	–	1	1	–	
Total	35	6		–	9		11		9	

* — biclonal secretion BJλ+BJλ; ** — light chain isotype in 1 of 2 cases was determined basing on Ig light chain isotype expression on tumor lymphocytes.

originate from circulating naive B-cells, i.e. are pre-germinal centre cells, the above-mentioned cause of the excessive expression of light chains in B-SLL/CLL seems reasonable.

CD38 expression on tumor lymphocytes in 5 of 7 (72%) patients having B-SLL/CLL with monoclonal secretion was an interesting finding of the immunophenotyping analysis. This immunological marker may be discovered at every stages of B-lymphocyte maturation including plasma cells, and in B-SLL/CLL is characteristic of pre-germinal center cells [20;23]. In our study CD38 was expressed on tumor lymphocytes together with other differentiation markers typical of B-SLL/CLL, i.e. CD5, CD23, CD19.

Immunoglobulin-secreting splenic marginal zone lymphoma

Splenic marginal zone lymphoma (SMZL) and splenic lymphoma with villous lymphocytes (SLVL) are considered a single clinical entity today [6;13;14]. The SLVL is thought to be a "leukemized" SMZL differing from the former only by a moderate peripheral lymphocytosis due to villous lymphocytes. As reported in the literature, patients having SLVL with monoclonal secretion mainly present with the paraprotein in the form of serum IgM (tabl. 4).

Причина избыточной (или изолированной) продукции моноклональных легких цепей при лимфоме из малых лимфоцитов/хроническом лимфолейкозе не ясна. Вероятно, избыток продукции легких цепей в процессе сборки полной молекулы Ig представляет собой характерную особенность нормальных В-лимфоцитов на всех этапах дифференцировки, начиная со стадии незрелого В-лимфоцита. При этом по мере созревания В-лимфоцита, дисбаланс между продукцией L- и H-цепей уменьшается. Косвенные доказательства этого предположения приведены в работах Т.А. Waldaman et al. [32] и J.E. Nopper, E. Paragiannes [12]. Учитывая, что в значительном проценте случаев В-лимфоциты при хроническом лимфолейкозе происходят из пула рециркулирующих «наивных» В-клеток, не прошедших дифференцировку в зародышевом центре, вышеописанная причина избыточной экспрессии легких цепей у пациентов с В-SLL/CLL представляется высоко вероятной.

Интересной иммунофенотипической особенностью была экспрессия CD38 опухолевыми лимфоцитами у 5 из 7 исследованных пациентов с В-SLL/CLL с моноклональной секрецией (72 %). Этот иммунологический маркер может быть обнаружен на разных этапах созревания В-лимфоцитов, в том числе — на плазматических клетках, а при В-SLL/CLL более характерен для прегерминальных клеток [20; 23]. Результаты наших исследований показали, что CD38 выявлялся на опухолевых лимфоцитах с типичной для В-SLL/CLL экспрессией других маркеров дифференцировки: CD5+, CD23+, CD19+.

Иммуноглобулинсекретирующая лимфома селезенки из клеток маргинальной зоны

В настоящее время принято считать, что лимфома селезенки из клеток маргинальной зоны (SMZL) и лимфома селезенки с ворсинчатыми лимфоцитами (SLVL) являются одной нозологической единицей [6; 13; 14]. При этом SLVL представляет собой «лейкемизированную» форму SMZL и отличается от нее лишь умеренным лимфоцитозом в периферической крови за счет ворсинчатых лимфоцитов. По данным литературы у больных SLVL с моноклональной секрецией парапротеин чаще всего представлен сывороточным Ig класса М (табл. 4).

Среди наших пациентов, которым был установлен диагноз лимфомы селезенки из клеток маргинальной зоны, мы не выявили ворсинчатые лимфоциты ни в одном случае, а абсолютный лимфоцитоз наблюдался только у одного пациента. При этом в большинстве случаев (6 из 9 больных) сывороточный парапротеин был представлен иммуноглобулином класса G (рис. 2).

Принимая во внимание имеющиеся клинические и иммунохимические отличия нашей группы больных SMZL от больных SLVL, описанных в литературе, можно предположить, что эти формы лимфом являются хотя и близкими, но тем не менее различаются. И, по-видимому, SMZL происходит из клеток более дифференцированных, которые претерпели процесс изотипического переключения классов тяжелых цепей Ig.

При исследовании отпечатков селезенки в этой группе отмечался значительный клеточный полиморфизм. Опухолевой субстрат был представлен клетками типа малых лимфоцитов, пролимфоцитов, клетками моноцитоидного вида, плазматизированными лимфоцитами и плазматическими клетками. В отдельных случаях,

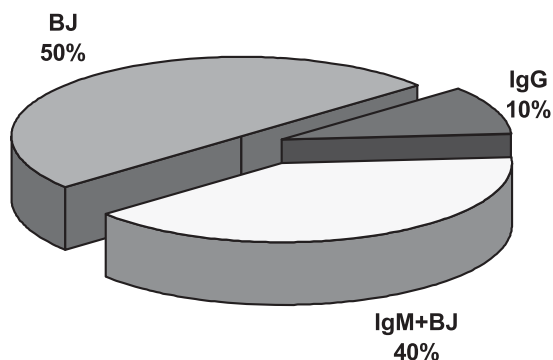


Рис. 1. Распределение типа моноклональной секреции в группе из 10 больных В-CLL/SLL.

Pic. 1. Distribution of monoclonal secretion types among 10 B-CLL/SLL patients

None of our patients with the diagnosis of SMZL had villous lymphocytes and only one of them presented with absolute lymphocytosis. In most (6/9) cases the serum paraprotein was an IgG immunoglobulin (pic. 2).

Basing on the clinical and immunochemical differences as identified in our SMZL patients and in SLVL cases reported in the literature, one may suggest that these two lymphoma types are different (though close) clinical entities. The SMZL seems to originate from more differentiated cells that have already undergone Ig isotype switch.

Splenic smear specimens demonstrated a considerable cell polymorphism in this patient group. The tumor substrates contained small lymphocyte-like cells, prolymphocytes,

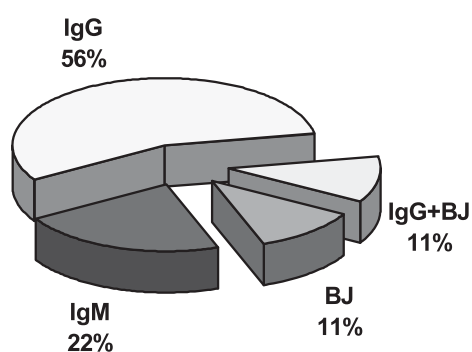


Рис. 2. Распределение типа моноклональной секреции в группе из 9 больных SMZL.

Pic. 2. Distribution of monoclonal secretion types among 9 SMZL patients

Таблица 4

Секреция моноклонального Ig у пациентов с SMZL/SLVL (данные литературы)

Авторы	Количество пациентов с моноклональной секрецией к общему числу больных	Исследуемая среда		Изотип парапротеина
		Сыворотка	Моча	
Theml H. et al.	1/10	+	*	IgM
Neiman R.S. et al.	5/10	+	*	IgM
Fohlmeister I. et al.	1/7	+	*	IgM
Spriano P. et al.	3/8	+	*	IgM
Melo J.V. et al.	9/15	+	+	IgM(4);IgG(2);IgM+BJ(1);BJ(2)
Wu C.D. et al.	1/5	+	*	*
Troussard X. et al.	22/80	+	+	IgM(10);IgG(9);IgM+IgG(2);BJ(1)

* – данные отсутствуют.

также были выявлены крупные атипичного вида лимфоциты, клетки типа иммунобластов и центроцитоидные клетки.

При SMZL/SLVL опухолевый инфильтрат локализован обычно в белой пульпе селезенки, а при вовлечении печени — в портальных трактах. Однако у одного из наших пациентов при гистологическом исследовании была выявлена массивная инфильтрация красной пульпы селезенки с атрофией фолликулов и интрасинусоидальная локализация опухолевых клеток в печени. В литературе описаны немногочисленные, но хорошо документированные случаи SLVL, с такой необычной, присущей скорее волосатоклеточному лейкозу, гистологической картиной поражения селезенки [13; 18; 21].

Иммуноглобулинсекретирующая MALT-лимфома

Интересной гематологической особенностью, выявленной в группе пациентов с Ig-секретирующей формой MALT-лимфомы (с различной локализацией первичного очага), было вовлечение в опухолевый процесс костного мозга. Вообще, метастазирование в костный мозг не характерно для MALT-лимфом, и до недавнего времени полагали, что поражение костного мозга при этой нозологии может встречаться лишь в экзквизитно редких CD5-позитивных случаях [2; 3; 7; 10; 27; 31]. В настоящее время взаимосвязь между экспрессией CD5, моноклональной секрецией и склонностью к метастазированию опухоли в костный мозг при MALT-лимфоме не определена. Кроме того, не ясно, как влияет наличие моноклональной секреции на продолжительность жизни пациентов с MALT-лимфомой и эффективна ли резекция (или лучевая терапия) органа при «локальном» поражении Ig-секретирующей формой MALT-лимфомы, учитывая вероятность раннего метастазирования в костный мозг

Плазмочитарная лимфома/плазмочитом лимфоузлов

Среди наших пациентов мы наблюдали необычную разновидность лимфоидной опухоли — плазмочитарную лимфому/плазмочитому лимфоузлов. Особенностью описанного нами случая было сочетание плазмочитарной лимфомы с синдромом Шегрена и паранеопластическим волчаночно подобным поражением кожи. Известно

Table 4

Monoclonal Ig secretion in patients with SMZL/SLVL (data from the literature)

Authors	Patients with monoclonal secretion/Total of patients	Study material		Paraprotein type
		Serum	Urine	
Theml H. et al.	1/10	+	*	IgM
Neiman R.S. et al.	5/10	+	*	IgM
Fohlmeister I. et al.	1/7	+	*	IgM
Spriano P. et al.	3/8	+	*	IgM
Malo J.V. et al.	9/15	+	+	IgM (4); IgG (2); IgM + BJ (1); BJ (2)
Wu C.D. et al.	1/5	+	*	*
Troussard X. et al.	22/80	+	+	IgM (10); IgG (9); IgM + IgG (2); BJ (1)

* — no data available.

monocytoid-like cells, plasmacytoid lymphocytes and plasmatic cells. Some cases also presented with atypic lymphocytes, immunoblast-like cells and centrocytoid cells.

In SMZL/SLVL the tumor infiltrate is mainly localized in splenic white pulp or in portal tracts in the presence of liver involvement. However, histological study in one of our patients discovered massive infiltration of splenic red pulp with follicle atrophy and the presence of tumor cells in hepatic sinuses. There are few (though well documented) reports of SLVL in the literature with such an unusual histological pattern of spleen involvement that is rather typical of hairy cell leukemia [13; 18; 21].

Immunoglobulin-secreting MALT-lymphomas

There was an interesting hematology feature, i.e. bone marrow involvement, in cases with Ig-secreting MALT-lymphoma (with different primary tumor sites). Bone marrow involvement is not generally typical of MALT-lymphomas, and it was thought until recently that bone marrow involvement in this clinical entity may be seen in exquisitely rare CD5-positive cases [2; 3; 7; 10; 27; 31]. Today the relationship between CD5 expression, monoclonal protein secretion and propensity for bone marrow involvement in MALT-lymphomas is unclear. It is also unknown, how the presence of monoclonal secretion affects survival of patients with MALT-lymphomas and whether resection (or radiotherapy) of the affected organ in local Ig-secreting MALT-lymphoma is reasonable in light of its propensity for early bone marrow involvement.

Lymph node plasmacytic lymphoma/plasmacytoma

One of our patients had an uncommon type of lymphoid tumors, i.e. lymph node plasmacytic lymphoma/plasmacytoma in combination with Sjogren's syndrome and paraneoplastic lupus-like skin lesion. There is a single report of plasmacytic lymphoma in combination with Sjogren's syndrome in the literature [33]. Immunophenotype of tumor plasmatic cells in this case was characterized by CD19 and CD38 coexpression. As known, normal lymphocytes does not lose surface B-cell marker CD19 (that is different

лишь единственное описание сочетания плазмочитарной лимфомы и синдрома Шегрена [33]. Особенностью иммунофенотипа опухолевых плазматических клеток в данном наблюдении была коэкспрессия CD19 и CD38. Как известно, лимфоцит в процессе дифференцировки в плазматическую клетку не теряет CD19 (в отличие от злокачественных плазмочитов) и гиперэкспрессирует CD38 [5;9;30]. Причина и прогностическая значимость коэкспрессии CD19 и CD38 на опухолевых плазмочитах не ясна.

В 1963 году Bunim J.J. и Talal N. [4] впервые сообщили о повышенной частоте выявления неходжкинских лимфом у больных с синдромом Шегрена, который представляет собой аутоиммунно-опосредованную инфильтрацию лимфоцитами ткани экзокринных желез, приводящую к снижению секреторной активности и, в частности, к ксеростомии и ксерофтальмии. Kassan S. с соавт. [17] в 1978 году, проанализировав 136 пациентов с синдромом Шегрена, выявили, что риск возникновения неходжкинской лимфомы у пациентов с этой патологией в 43,8 раза превышает риск развития неходжкинской лимфомы у здоровых людей сравнимого возраста, пола и расовой принадлежности. Интервал от диагностики синдрома Шегрена до развития лимфомы составляет в среднем 10–20 лет (от 0,5 до 29 лет) [16; 29]. Среди лимфоидных опухолей, которые развиваются у пациентов с синдромом Шегрена, чаще всего, по данным литературы, встречаются MALT-лимфома и В-крупноклеточная лимфома. В последнем случае у больных с синдромом Шегрена обычно развивается гипогаммаглобулинемия, лейкопения, отмечается исчезновение аутоантител, в том числе, ревматоидного фактора и антинуклеарного фактора [29]. Патогенез этого «аутоиммунологического паралича» не ясен. Среди наших пациентов у 3 из 34 человек наблюдался синдром Шегрена. Причем двое из них страдали синдромом Шегрена в течение 27–28 лет до развития диффузной В-крупноклеточной лимфомы, а один больной (с диагнозом плазмочитарная лимфома) — в течение 2 лет. У 2 пациентов (с крупноклеточной лимфомой) на момент постановки диагноза лимфоидной опухоли наблюдались нормальные показатели аутоиммунологической активности, а у 1 (с плазмочитарной лимфомой) — парапротеин (IgA) проявлял свойство ревматоидного фактора.

Уровень секреции моноклонального Ig, его физические свойства и тип парапротеина влияют на клиническую картину больных с Ig-секретирующей лимфомой. Известно, что обычно количество сывороточного P₁Ig у пациентов с Ig-секретирующей лимфомой ниже, чем у больных с множественной миеломой [1]. У большинства наших пациентов (30 из 35) количество P₁Ig было ниже 30 г/л, однако у 5 больных мы наблюдали уровень секреции парапротеина, превышающий эту границу.

Основные клинико-лабораторные симптомы, наблюдаемые у наших больных, представлены в табл. 5.

Лабораторное повышение вязкости крови выявлено у 6 пациентов (17 %). Однако клинические проявления, связанные с гипервязкостью, наблюдались только у 3 человек (8,5 %). Отсутствие корреляции между клиническими проявлениями гипервязкости крови и лабораторным обнаружением этого феномена также отмечено другими авторами [1].

Криоглобулинемия была зафиксирована только у одного больного. Криоглобулин был представлен моноклональным IgM, который преципитировал при $t < 37^\circ \text{C}$.

from malignant plasma cells) and increase CD38 expression while differentiating to the plasma cell [5; 9; 30]. The cause and prognostic value of CD19 and CD38 coexpression are unknown.

Bunim J. J. and Talal N. [4] were the first to report in 1963 of increased occurrence of non-Hodgkin's lymphomas in patients with Sjogren's syndrome, an autoimmunity-mediated lymphocyte infiltration of exocrine gland tissue leading to reduction in secretory activity and, in particular, to xerostomia and xerophthalmia. In 1978 Kassan S. et al. [17] analyzed 136 patients with Sjogren's syndrome to discover that the risk of non-Hodgkin's lymphoma in such cases was 43.8-fold as great as that in normal individuals of the compatible age, gender and race. Mean time from the diagnosis of Sjogren's syndrome to lymphoma development is 10-20 years (0.5 to 29 years) [16;29]. MALT-lymphoma and large B-cell lymphoma are most common types of lymphoid tumors in patients with Sjogren's syndrome. In the latter case patients with Sjogren's syndrome develop hypogammaglobulinemia, leukopenia, demonstrate disappearance of autoantibodies including rheumatoid factor and antinuclear factor [29]. Pathogenesis of this "autoimmune paralysis" is unclear. Three of 34 patients had Sjogren's syndrome in our study. Two of them suffered from Sjogren's syndrome for 27-28 years before they developed large B-cell lymphoma and the third patient had Sjogren's syndrome for 2 years before the diagnosis of plasmocytic lymphoma. The 2 patients with large-cell lymphoma presented with normal autoimmunological activity at diagnosis of the lymphoid tumor while in the patient with plasmocytic lymphoma the paraprotein (IgA) demonstrated rheumatoid factor properties.

The level of monoclonal Ig secretion, Ig physical properties and type influence clinical presentation of Ig-secreting lymphoma. As known, the level of serum PIg in Ig-secreting lymphoma is generally lower than in multiple myeloma [1]. Most (30/35) of our patients had PIg levels below 30 g/l, while the remaining 5 cases demonstrated the paraprotein secretion above this level.

Main clinical and laboratory symptoms observed in our patients are presented in tabl. 5.

Laboratory rise in blood viscosity was found in 6 (17%) patients. While only 3 (8.5%) of them presented with clinical symptoms associated with blood hyperviscosity. Other authors also reported the absence of correlation between laboratory blood hyperviscosity and patients' clinical presentation [1].

Cryoglobulinemia was detected in one patient only. The cryoglobulin was monoclonal IgM precipitating at a temperature below 37°C.

Four (11.4%) patients presented with mild hemolysis (1 Coombs-positive and 3 Coombs-negative). Causative relationship between PIg and hemolysis was unclear because the paraprotein was not studied for antierythrocyte activity in any of these cases.

Renal involvement was discovered in 9 of 35 patients (25.7%) including tubulointerstitial nephropathy (with BJ proteinuria) in 8 and mesangioproliferative glomerulonephritis with nephrotic syndrome (against the background of secretion of PIgM alone) in 1 case.

Three (8.5%) patients presented with hemorrhagic syndrome (free from concurrent thrombocytopenia) as petechial eruption on shins and thighs not raising above the skin surface.

Таблица 5

Частота встречаемости клинико-лабораторных симптомов у больных Ig-секретирующими лимфомами (n=35)

Симптом		Частота, % от общего числа больных
Аутоантительная активность PIg		2,8
Вязкость крови	Лабораторное увеличение	17
	Клинические проявления	8,5
Геморрагический синдром (не связанный с тромбоцитопенией)		8,5
Поражение почек	Мезангиопролиферативный гломерулонефрит с нефротическим синдромом	2,8
	Тубулоинтерстициальная нефропатия (на фоне протеинурии ВJ)	40*
Криоглобулинемия		2,8
Снижение уровня поликлональных Ig		50
Гемолиз	Кумбс-положительный	2,8
	Кумбс-негативный	8,6

* – процент вычислен от общего числа больных с протеинурией ВJ (n=20).

У 4 больных (11,4 %) в нашей группе наблюдался слабо выраженный гемолиз (Кумбс-положительный — 1 случай, Кумбс-негативный — 3 случая). Причинно-следственная взаимосвязь между PIg и гемолизом осталась неопределена, т. к. антиэритроцитарная направленность парапротеина не была исследована ни в одном случае.

Поражение почек наблюдалось у 9 из 35 пациентов (25,7 %). Из них в 8 случаях оно было обусловлено тубулоинтерстициальной нефропатией (на фоне протеинурии ВJ), а у одного больного — мезангиопролиферативным гломерулонефритом с нефротическим синдромом (на фоне изолированной секреции PIgM).

В 3 случаях (8,5 %) мы наблюдали геморрагический синдром (без сопутствующей тромбоцитопении), который проявлялся в виде петехиальных, не возвышающихся над поверхностью кожи высыпаний преимущественно на голенях и бедрах.

Снижение уровня поликлональных иммуноглобулинов — хорошо известный факт при множественной миеломе. Однако имеется мало исследований этого феномена при других лимфоидных опухолях с моноклональной секрецией. По нашим данным, снижение уровня одного или нескольких классов поликлональных Ig наблюдалось, в целом, у 50 % больных, но частота выявления этого феномена варьировала среди различных форм Ig-секретирующих лимфом. При лимфоме из клеток маргинальной зоны селезенки — в 33 % случаев, при иммуноцитоме/лимфоплазмоцитоме — у 20 % больных. Наиболее часто этот феномен отмечен у пациентов с В-SLL/CLL (80 %), что согласуется с данными других авторов [22; 8; 24].

Неоднородность исследованной нами группы больных, малая численность каждой из подгрупп, отсутствие протокола и контрольных групп не позволяют достоверно судить о прогностическом влиянии моноклональной секреции. Нами описаны зрелоклеточные формы Ig-секретирующих лимфом, что не позволяет судить

Table 5
Frequency of clinical and laboratory symptoms in patients with Ig-secreting lymphomas (n=35)

Symptom		% of the total number of patients
PIg autoantibody activity		2.8
Blood viscosity	Laboratory increase	17
	Clinical manifestation	8.5
hemorrhagic syndrome (not associated with thrombopenia)		8.5
Renal lesion	Mesangioproliferative Glomerulonephritis with nephrotic syndrome	2.8
	Tubulointerstitial nephropathy (with BJ proteinuria)	40*
Cryoglobulinemia		2.8
Decrease in polyclonal Ig		50
Hemolysis	Coombs-positive	2.8
	Coombs-negative	8.6

* — percentage was calculated from the total number of patients with BJ proteinuria (n=20).

A fall in polyclonal immunoglobulins is a well known feature of multiple myeloma. However, this phenomenon is poorly studied in other lymphoid tumors with monoclonal secretion. In our study decrease in one or several classes of polyclonal Ig was seen in 50% of patients as a whole, while occurrence of this phenomenon varied in different subtypes of Ig-secreting lymphomas to reach 33% for splenic marginal zone lymphoma and 20% for immunocytoma/lymphoplasmocytic lymphoma. This phenomenon was most common in B-SLL/CLL (80%) which is in agreement with other reports [22; 8; 24].

The prognostic significance of monoclonal secretion cannot be determined with certainty due to heterogeneity of our patient group, few cases in each subgroup, the absence of a robust protocol or control. We described mature B-cell Ig-secreting lymphomas, and there is no evidence to state the prognostic significance of the phenomenon. Ig-secretion is considered a factor of good prognosis which was noted by other authors [1].

Investigators are making just the first attempts to identify B-cell tumors by the presence or absence of monoclonal secretion. Practical value of this classification is not high, but it will undoubtedly contribute to our understanding of biological differences between clinically and morphologically similar B-cell tumors as well as to the prospects for their differential treatment.

о прогнозе. Относительно благоприятный прогноз при наличии парапротеинемии, отмечен другими авторами [1].

Попытки выделения В-клеточных опухолей по признаку наличия или отсутствия моноклональной секреции только начались. Прикладное значение такого разделения пока не велико, однако, несомненно, что оно улучшит понимание биологических различий клинически и морфологически сходных В-клеточных опухолей, а, следовательно, и перспективу их дифференцированного лечения.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Андреева Н.Е., Чернохвостова Е.В. Иммуноглобулинопатии. — М., 1985. — 238 с.
2. Adami F., Chilosi M., Lestani M. et al. A CD5+ leukemic involvement with monocytoid features: an unusual B-cell lymphoma mimicking hairy-cell leukemia// Acta Haematol. — 1993. — Vol.89, N2. — P.94–99.
3. Agnarsson B.A., Kadin M.E. An unusual B cell lymphoma simulating hairy cell leukemia// Am.J.Clin.Pathol. — 1987. — Vol.88, N6. — P.752–759.
4. Bunim J.J., Talal N. The association of malignant lymphoma with Sjogren's syndrome// Trans.Assoc. Am.Phys. — 1963. — Vol.76. — P.45–56.
5. Burrows P.D., Kearney J.F., Schroeder H.W.Jr. et al. Normal B lymphocyte differentiation// Baillieres Clin. Haematol. — 1993. — Vol.6, N4. — P.785–806.
6. Catovsky D. Chronic lymphoid leukemias// Postgraduate Haematology. Hoffbrand A.V., Lewis S.M., Tuddenham Edward G.D.(eds). — Oxford: Butterwoth-Heinemann, 1999. — ed. 4. — P.405–433.
7. Cook P., Pugh W.C. CD5 antigen expression in low grade B cell lymphomas of mucosa associated lymphoid tissue (LGBL/MALT) (abstr.)// Mod.Pathol. — 1994. — Vol.7. — P.106A.
8. Deegan M.J., Abraham J.P., Sawdyk M., van Slyck E.J. High incidence of monoclonal proteins in the serum and urine of chronic lymphocytic leukemia patients// Blood — 1984. — Vol.64, N6. — P.1207–1211.
9. Duchosal M.A. B-cell development and differentiation// Seminars in Hematology. — 1997. — Vol.34, N1. — P.2–12.
10. Ferry J.A., Yang W.-I., Zukerberg L.R. CD5+ extranodal marginal zone B-cell (MALT) lymphoma: A low grade neoplasm with a propensity for bone marrow involvement and relapse// Am.J.Clin.Pathol. — 1996. — Vol.105, N1. — P.31–37.
11. Fohlmeister I., Schaefer H.E., Modder B. et al. Chronic lymphoproliferative disorder resembling hairy-cell leukemia (abstr.)// Blut. — 1981. — Vol.42, N6. — P.367–377.
12. Hopper J.E., Papagiannes E. Evidence by radioimmunoassay that mitogen-activated human blood mononuclear cells secrete significant amounts of light chain Ig unassociated with heavy chain// Cell.Immunol. — 1986. — Vol.101, N2. — P.122–131.
13. Isaacson P.G., Matutes E., Burke M., Catovsky D. The histopathology of splenic lymphoma with villous lymphocytes// Blood — 1994. — Vol.84, N11. — P.3828–3834.
14. Isaacson P.G., Norton A.J. Extranodal lymphomas — Edinburgh: Churchill Livingstone, 1994. — P.241–272.
15. Jaffe E. S., Harris N. L., Stein H., Vardiman J. W. (eds). Pathology and Genetics Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. — IARC Press Lyon, 2001.
16. Jaffe E.S., Raffeld M., Medeiros L.J. Histopathologic subtypes of indolent lymphomas: caricatures of the mature B-cell system// Seminars in oncology — 1993. — Vol.20, N 5, Suppl.5. — P.3–30.

17. *Kassan S., Thomas T., Moutsopoulos H.M.* et al. Increased risk of lymphoma in sicca syndrome// *Ann.Int.Med.* — 1978. — Vol.89, N6. — P.888–892.
18. *Melo J.V., Hedge V., Parreira A.* et al. Splenic B cell lymphoma with circulating villous lymphocytes: differential diagnosis of B cell leukaemias with large spleens// *J.Clin.Pathol.* — 1987. — Vol.40, N6. — P.642–651.
19. *Neiman R.S., Sullivan A.L., Jaffe R.* Malignant lymphoma simulating leukemic reticuloendotheliosis// *Cancer* — 1979. — Vol.43, N1. — P.329–342.
20. *Newman R.A., Peterson B., Davey F.R.* et al. Phenotypic markers and BCL-1 gene rearrangements in B-cell chronic lymphocytic leukemia: A cancer and leukemia group B study// *Blood* — 1993. — Vol.82, N4. — P.1239–1246.
21. *Palutke M., Tabaczka P., Mirchandani I., Goldfarb S.* Lymphocytic lymphoma simulating hairy cell leukemia: A consideration of reliable and unreliable diagnostic features// *Cancer* — 1981. — Vol.48, N9. — P.2047–2055.
22. *Pangalis G.A., Moutsopoulos H.M., Papadopoulos N.M.* et al. Monoclonal and oligoclonal immunoglobulins in the serum of patients with B chronic lymphocytic leukemia// *Acta Haematol.* — 1988. — Vol.80, N1. — P.23–27.
23. *Schwonzen M., Pohl C., Steinmetz T.* et al. Immunophenotyping of low-grade B-cell lymphoma in blood and bone marrow: poor correlation between immunophenotype and cytological/histological classification// *Br.J.Haematology* — 1993. — Vol.83, N2. — P.232–239.
24. *Sinclair D., Dagg J.H., Mowat A. McI.* et al. Serum paraproteins in chronic lymphocytic leukaemia// *J.Clin.Pathol.* — 1984. — Vol.37, N4. — P.463–466.
25. *Spriano P., Barosi G., Invernizzi R.* et al. Splenomegalic immunocytoma with circulating hairy cells. Report of eight cases and revision of the literature// *Haematologica* — 1986. — Vol.71, N1. — P.25–33.
26. *Theml H., Burger A., Keiditsch E.* et al. Clinical observations to characterize splenomegalic immunocytomas (abstr.)// *Med. Klin.* — 1977. — Vol.72, N23. — P.1019–1032.
27. *Traweek S.T., Sheibani K.* Monocytoid B-cell lymphoma: the biologic and clinical implication of peripheral blood involvement// *Am.J.Clin.Pathol.* — 1992. — Vol.97, N4. — P.591–598.
28. *Troussard X., Valensi F., Duchayne E.* et al. Splenic lymphoma with villous lymphocytes: clinical presentation, biology and prognostic factors in a series of 100 patients// *Br.J.Haematology* — 1996. — Vol.93, N3. — P.731–736.
29. *Tzioufas A.G., Moutsopoulos H.M., Tatal N.* Lymphoid malignancy and monoclonal proteins// *Sjogren's syndrome. Clinical and immunological aspects.* Talal N., Moutsopoulos H.M., Kassan S.S. (eds). — Berlin: Springer-Verlag, 1987. — P.129–136.
30. *Uckun F.M.* Regulation of human B-cell ontogeny// *Blood* — 1990. — Vol.76, N10. — P.1908–1923.
31. *Ueda G., Oka K., Matsumoto T.* et al. Primary hepatic marginal zone B-cell lymphoma with mantle cell lymphoma phenotype// *Virchows Arch.* — 1996. — Vol.428, N4-5. — P.311–314.
32. *Waldaman T.A., Strober W., Mogielnicki P.* The renal handling of low molecular weight proteins. II. Disorders of serum protein: catabolism in patients with tubular proteinuria, the nephrotic syndrome, or uremia// *J.Clin.Invest.* — 1972. — Vol.51, N8. — P.2162–2174.
33. *Watanabe K., Yatabe Y., Narita M.* et al. An autopsy case of primary nodal plasmacytoma associated with Sjogren's syndrome// *Pathol.Int.* — 1999. — Vol.49, N6. — P.577–579.
34. *Wu C.D., Jackson C.L., Medeikos L.J.* Splenic marginal zone cell lymphoma. An immunophenotypic and molecular study of five cases// *Am.J.Clin.Pathol.* — 1996. — Vol.105, N3. — P.277–285.

УДК 611.018.46:612.08:616-097

*Н.Н. Тупицын¹, Л.Ю. Гривцова¹, М.М. Анохина¹, О.К. Непряхина¹,
J. Brochier², R. Jones³ and John Wijdenes⁴*

БЕСЦИТОКИНОВАЯ АКТИВАЦИЯ GP130 НА МОБИЛИЗОВАННЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТКАХ КРОВИ (CD34+) ВЕДЕТ К ИХ ПРОЛИФЕРАЦИИ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ

¹ ГУ РОНЦ имени Н.Н.Блохина РАМН;

²INSERM U291, Montpellier, France;

³HMDS, Leeds, UK;

⁴Diaclone, Besançon, France

Молекула gp130 — трансдучерный компонент или -цепь рецептора интерлейкина 6 (ИЛ-6Р) — экспрессирована на всех стволовых клетках человека, включая эмбриональные стволовые клетки и гемопоэтические стволовые клетки. Это делает ее перспективной мишенью для воздействия с целью индукции пролиферации или дифференцировки при отсутствии экспрессии на мембране стволовых клеток специфических рецепторов цитокинов семейства ИЛ-6.

В основу проведения работы положены 2 открытых нами ранее феномена.

Первый из них состоит в установлении активированного статуса трансдучерного рецептора gp130 на основе эпитопной структуры молекулы. Инкубация клеток перевиваемых линий множественной миеломы с ИЛ-6 ведет к «исчезновению» функциональных эпитопов gp130 в сайтах димеризации (A1) и присоединения gp80 (B1), а также gp80 в сайтах присоединения gp130 (M182) и связывания ИЛ-6 (M194, M164). Эпитопы вне функциональных сайтов ИЛ-6 сигналинга C7 (gp130) и M91 (gp80) экспрессированы на том же уровне и указывают на присутствие gp130/80 на мембране клеток: активированная форма рецептора — A1-B1-C7+M182-M91+; неактивированная — A1+B1+C7+M182+M91+ (Tupitsyn et al., 1998; Tupitsyn & Brochier, 2000). Второй феномен заключается в возможности активации молекулы gp130 не только цитокинами семейства ИЛ-6, но и моноклональными антителами (МКА). Для активации рецептора должны быть использованы 2 МКА. Наиболее распространенные активирующие пары B1+I2, B1+F1 (Autissier et al., 1998) и МКА B-S12, состоящие из B-S12-A5 и B-S12-G7 (Wijdenes et al., 1995; Fourcin et al., 1996; Muller-Newen et al., 2000).

Целью работы явилось изучение активационного статуса gp130 на мобилизованных стволовых клетках (МСК) крови (продукт лейкофереза) и возможности индукции пролиферации и дифференцировки МСК (CD34+) воздействием с помо-

*N.N. Tupitsyn¹, L.Yu. Grivtsova¹, M.M. Anokhina¹, O.K. Nepryakhina¹,
J. Brochier², R. Jones³ and John Wijdens⁴*

**CYTOKINELESS GP130 ACTIVATION
ON MOBILIZED
HAEMATOPOIETIC STEM CELLS (CD34+)
LEADS TO THEIR PROLIFERATION
AND DIFFERENTIATION**

¹ State N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center
affiliated to the Russian Academy of Medical Sciences,;

² INSERM U291, Montpellier, France;

³ HMDS, Leeds, UK;

⁴ Diaclone, Besançon, France

Molecule gp130 is a transducer component or a b-chain of interleukin 6 receptor (IL-6R) expressed on all human stem cells including embryonic stem cells and haematopoietic stem cells. This makes gp130 a promising target for induction of cell proliferation or differentiation when specific receptors of IL-6 cytokines are not present on stem cell membranes.

This paper is based on 2 phenomena discovered by the authors previously.

The first phenomenon is activated status of the gp130 transducer receptor as established by epitopic structure of the molecule. Incubation of multiple myeloma cell lines with IL-6 results in "disappearance" of gp130 functional epitopes in dimerization (A1) and gp80 joining (B1) sites as well as of gp80 in gp130 joining (M180) and IL-6 binding (M194, M164) sites. Epitopes outside IL-6 functional sites — C7 (gp130) and M91 (gp80) — demonstrate the same level of expression and suggest the presence of gp130/80 on cell membrane: the receptor activated form is A1-B1-C7+M182-M91+ and non-activated form is A1+B1+C7+M182+M91+ (Tupitsyn et al., 1998; Tupitsyn & Brochier, 2000). The second phenomenon is gp130 activation by monoclonal antibodies (MAB) without IL-6 family cytokines. Two MAB are needed to activate the receptor. Most common activation pairs include B1+I2, B1+F1 (Autissier et al., 1998) and MAB B-S12 consisting of B-S12-A5 and B-S12-G7 (Wijdenes et al., 1995; Fourcin et al., 1996; Muller-Newen et al., 2000).

The purpose of this study was to analyze gp130 activation status on mobilized haematopoietic stem cells (MSC) (leukapheresis product) and potential induction of MSC (CD34+) proliferation and differentiation using MAB effect on gp130. gp130 Epitopes on MSC were studied in specimens from 16 patients with haematology malignancies and 15 non-cancer patients (spine cord trauma — SCT). MSC immunophenotype in SCT patients was characterized by a high proportion of CD45-negative cells which was not typical for normal MSC from haematology malignancies patients and

шью МКА на gp130. Эпитопы gp130 изучены на МСК 16 онкогематологических больных и 15 неонкологических больных (травматическая болезнь спинного мозга — ТБСМ). Иммунофенотип МСК больных ТБСМ отличался высокой пропорцией CD45-негативных клеток, что нетипично для нормальных МСК онкогематологических больных и лейкозных CD34+ клеток (Turpitsyn et al., 2006; Kupryshina et al., 2006). Эпитопы gp130/80 изучали с использованием прямых флуорохромных конъюгатов МКА методом проточной цитометрии в гейте CD34+ клеток.

У онкогематологических больных мономорфная экспрессия рецептора gp130 на МСК (от слабой до умеренно положительной) имела место во всех изученных случаях. Изучены 2 эпитопа молекулы gp130 — функциональный эпитоп С7, участвующий в передаче сигнала лейкоз-ингибирующего фактора (ЛИФ) и онкостатина М (ОМ), а также функциональный эпитоп А1, вовлеченный в димеризацию gp130 под действием любого цитокина семейства ИЛ-6. Экспрессия α-цепей ИЛ-6Р на МСК варьировала в широких пределах (от 1 до 60 %). В 3 из 15 случаев gp130 находился в активированном состоянии (С7+А1-). В одном из них gp80 (М91) присутствовал на мембране МСК (60 %), в двух других — отсутствовал (менее 12 %).

У всех 15 больных ТБСМ выявлена экспрессия gp130 на CD34+ МСК. В 13 случаях эпитоп С7 присутствовал на всех CD34+ клетках, в 9 из них отмечено неактивированное состояние gp130 (А1+С7+). У 4 больных рецептор gp130 на МСК находился в димеризованном (активированном) состоянии — С7+А1-. В 2 случаях наблюдалась экспрессия эпитопа А1 при практически полном отсутствии эпитопа С7. В гематологических системах (клетки гемобластозов, стволовые гемопоэтические клетки) такое сочетание эпитопов мембранного gp130 не описано, и теоретически это может соответствовать начальным этапам сигналинга ЛИФ или ОМ.

Проведена оценка активации рецептора gp130 при добавлении к МСК ИЛ-6 у 12 онкогематологических больных. Достоверных колебаний среднего процента gp130-позитивных МСК, выявляемых с помощью МКА С7, не установлено ($p > 0,05$). Средний процент А1-позитивных МСК после инкубации с ИЛ-6 достоверно снижался ($p = 0,02$), что подтверждает возможность димеризации gp130 на стволовых гемопоэтических клетках под действием ИЛ-6.

Влияние анти-gp130 МКА на пролиферацию изучено на моделях линий клеток множественной миеломы RPMI 8226 и стволовых клеток KG-1a. Под влиянием стимулирующих МКА количество клеток в культурах достоверно возрастало в сравнении с контрольной парой МКА В1+И1. Наиболее активными были МКА В-S12, В1+F1 и В1+I2.

Установление экспрессии функциональных эпитопов gp130 на МСК онкогематологических больных послужило основанием для изучения возможности индукции пролиферации и мегакариоцитарной дифференцировки этих CD34+ клеток с помощью анти-gp130 МКА. Использовали цитокиновый коктейль оптимальный для стимуляции мегакариоцитарно-коммитированных предшественников, анти-gp130 МКА В-P8, В1+И1 (контроль) и пары МКА, входящие в состав В-S12. Для культивирования клеток использовали полужидкую среду MegaCult-C (StemCell Technologies, Канада), исследования проводили согласно протоколу

leukemic CD34+ cells (Tupitsyn et al., 2006; Kupryshina et al., 2006). gp130/80 Epitopes were studied by flow cytometry in the CD34+ gate using MAB direct fluoro-chromic conjugates.

All patients with haematology malignancies demonstrated monomorphous expression of gp130 receptor on MSC (from mild to moderate positive reactivity). We studied 2 epitopes of gp130 molecule, i.e. a functional epitope C7 involved in signalling of leukaemia inhibiting factor (LIF) and oncostatin M (OM), and a functional epitope A1 involved in gp130 dimerization under the effect of any cytokine from the IL-6 family. Expression of IL-6R α -chains on MSC varied greatly (from 1 to 60%). gp130 Molecule was in activated state (C7+A1-) in 3 of 15 cases. gp80 (M91) Molecule was present on MSC membranes (60%) in one and absent (less than 12%) in the remaining two cases.

All 15 SCT patients presented with gp130 expression on CD34+ MSC. In 13 cases C7 epitope was present on all CD34+ cells, including 9 cases with non-activated gp130 (A1+C7+). In 4 patients the receptor gp130 was present on MSC in dimeric (activated) state (C7+A1-). Two cases demonstrated expression of epitope A1 in parallel with practically complete absence of C7 epitope. This combination of membrane gp130 epitopes is not described in haematology systems (haematology malignancy cells, haematopoietic stem cells) and may in theory be associated with early stages of LIF or OM signalling.

Activation of receptor gp130 after addition of IL-6 to MSC was assessed in 12 patients with haematology malignancies. We failed to find significant variation in mean percentage of gp130-positive MSC as identified using MAB C7 ($p > 0.05$). Mean percentage of A1-positive MSC decreased significantly ($p = 0.02$) after incubation with IL-6 which was indicative of gp130 dimerization on haematopoietic stem cells under the action of IL-6.

The effect of anti-gp130 MAB on proliferation was studied in models of multiple myeloma cell lines RPMI 8226 and stem cells KG-1a. The number of cells in cultures increased significantly under the effect of stimulating MAB as compared to that of a control MAB pair B1+I1. MAB B-S12, B1+F1 and B1+I2 were most active.

The presence of gp130 functional epitope expression on MSC from patients with haematology malignancies provided rationale for study of potential induction of proliferation and megakaryocytic differentiation of these CD34+ cells using anti-gp130 MAB. We used a cytokine cocktail that was optimal for stimulation of megakaryocyte-committed precursors, anti-gp130 MAB B-P8, B1+I1 (control) and pairs of MAB contained in B-S12. Semiliquid medium MegaCult-C (StemCell Technologies, Canada) was used in cell culture, the study was conducted according to the manufacturer's procedure. 0.1 ml suspension of enriched stem CD34+ cells ($1.1 \times 10^5/\text{ml}$) was mixed with 2 ml medium Iscove MDM /IMDM/ (without cytokines or with the cytokine cocktail optimized for megakaryocyte colony growth or with MAB) and 1.2 ml cold collagen. This cell mixture, 1.5 ml (5×10^3), was transferred onto slides. The slides were incubated 10-12 days at 37°C (5% CO₂, >95% humidity). After incubation the cultures were assessed for colony growth, fixed and dried. Specific megakaryocyte colonies and clusters were identified by CD61 fluorescent staining and studied by an Axiosplan 2 (Carl Zeiss, Germany) luminescent microscope.

There was practically no megakaryocyte colony (CFU- Meg) growth in cultures with/without cytokines if the leukapheresis product contained low levels of CD34+ cells

фирмы-производителя. Смешивали 0,1 мл суспензии обогащенных стволовых CD34+ клеток ($1,1 \times 10^5$ /мл); 2 мл среды Iscove MDM (IMDM) без цитокинов или с коктейлем цитокинов, оптимизированным для роста мегакариоцитарных колоний или с МКА; 1,2 мл холодного коллагена. На стекла наносили 1,5 мл полученной смеси (5×10^3 клеток). Инкубировали 10–12 дней при 37°C (5 % CO₂, >95 % влажности). По окончании инкубации культуры оценивали на предмет роста колоний, фиксировали, высушивали. Специфические мегакариоцитарные колонии и кластеры выявляли окрашиванием на CD61 флуоресцентным методом и изучали на люминисцентном микроскопе Axioplan 2 (Carl Zeiss, Германия).

При низком содержании CD34+ клеток в продукте лейкофереза (< 0,5 %) практически не наблюдалось роста мегакариоцитарных колоний (КОЕ-Мег) в культурах с/без цитокинов. Отчетливый рост КОЕ-Мег наблюдали в образцах лейкоконцентрата (CD34+ >1,0 %) в присутствии цитокинового коктейля.

Сравнительная характеристика действия пар МКА к эпитопам gp130 S12-A5+B-S12-G7, B-S12-G7+B-P8 и B1+I1 (контроль) на рост КОЕ-Мег представлена в табл.

Влияние анти-gp130 МКА на рост КОЕ-Мег

Условия культивирования	Суммарная концентрация МКА	Эффективность стимуляции колониообразования
Среда IMDM без цитокинов	0	-
Среда IMDM + коктейль цитокинов	0	+/- или +
Среда IMDM без цитокинов с МКА B-S12-A5+B-S12-G7	10 мкг/мл	+++
Среда IMDM без цитокинов с МКА B-S12-A5+B-S12-G7	20 мкг/мл	++++
Среда IMDM без цитокинов с МКА B-S12-G7+B-P8	10 мкг/мл	++
Среда IMDM без цитокинов с МКА B-S12-G7+B-P8	20 мкг/мл	+++
Среда IMDM без цитокинов с МКА B1+I1	10-20 мкг/мл	-

Установлено, что стимуляция КОЕ-Мег зависела не только от исходного содержания CD34+ клеток в продукте лейкофереза, но и от пропорции CD61+ клеток в пределах CD34+ клеток. При высокой пропорции CD61+ мегакариоцитарно-коммитированных предшественников (10 %) количество и размеры КОЕ-Мег при использовании МКА почти вдвое большими, чем при использовании коктейля цитокинов. Наиболее эффективной даже в случаях низкого содержания CD61+CD34+ клеток в лейкоконцентрате была смесь МКА B-S12-A5+B-S12-G7.

Таким образом, эпитопы рецептор цитокинов семейства ИЛ-6 gp130 экспрессированы на МСК. В обогащенной популяции CD34+ МСК (продукте лейкофереза) gp130 может присутствовать в неактивированной и активированной формах. Воздействием

(<0.5%). While specimens with high levels of CD34+ (>1.0%) demonstrated marked CFU-Meg growth in the presence of the cytokine cocktail.

Effects of MAB pairs to gp130 epitopes S12-A5+B-S12-G7, B-S12-G7+B-P8 and B1+I1 (control) on CFU-Meg growth are compared in tabl..

Effects of anti-gp130 MAB on CFU-Meg growth

Culture conditions	MAB total concentration	Colony formation stimulation efficacy
Cytokine-free IMDM	0	-
IMDM + cytokine cocktail	0	+/- or +
Cytokine-free IMDM + MAB B-S12-A5+B-S12-G7	10 mcg/ml	+++
Cytokine-free IMDM + MAB B-S12-A5+B-S12-G7	20 mcg/ml	++++
Cytokine-free IMDM + MAB B-S12-G7+B-P8	10 mcg/ml	++
Cytokine-free IMDM + MAB B-S12-G7+B-P8	20 mcg/ml	+++
Cytokine-free IMDM + MAB B1+I1	10-20 mcg/ml	-

CFU-Meg stimulation was found to depend both on baseline content of CD34+ cells in the leukapheresis product and on CD61+ cell proportion within CD34+ cells. When proportion of CD61+ megakaryocyte-committed precursors was high (>10%), amount and size of CFU-Meg after MAB treatment were two-fold greater than those resulting from exposure to cytokine cocktail. The MAB mixture B-S12-A5+B-S12-G7 was the most efficient even in cases with low CD61+CD34+ cell content in the leukaconcentrate.

Thus, epitopes of IL-6 family cytokine receptor gp130 are expressed on MSC. The gp130 may be present in both activated and non-activated forms in enriched CD34+ MSC population (leukapheresis product). MAB treatment induces proliferation and megakaryocytic differentiation of CD34+ cells as manifests itself as increased number and size of CFU-Meg. The anti-gp130 MAB CFU-Meg stimulation ability is related to baseline content of CD34+ MSC and proportion of CD61+ cells in the population. As to potential further usefulness of such scientific developments, we should like to cite Professor G.Janossy (London, UK) who said the following in Haematopoiesis Immunology journal (2006, V.3, №1): "It appears that in this area applied science is a precious commodity where academic departments should have a significant role to play that includes mutually beneficent and respected collaboration with industry and large biotechnological companies."

с помощью МКА можно индуцировать пролиферацию и мегакариоцитарную дифференцировку CD34+ клеток. Это проявляется в увеличении количества КОЕ-Мег и их размера. Способность к стимуляции колониеобразования КОЕ-Мег анти-gp130 МКА взаимосвязана с исходным содержанием CD34+ МСК и пропорцией CD61+ клеток среди них. Относительно возможностей дальнейшего использования подобных научных разработок представляется уместным привести слова профессора G. Janossy (London, UK), высказанные на страницах журнала Haematopoiesis Immunology (2006, V.3, №1): «It appears that in this area applied science is a precious commodity where academic departments should have a significant role to play that includes mutually beneficent and respected collaboration with industry and large biotechnological companies».

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Autissier P., De Vos J., Liautard J., Tupitsyn N. et al. International Immunology. — 1998. — V.10. — P.1881–1889.
2. Fourcin M., Chevalier S., Guillet C. et al. J. Biol. Chem. — 1996. — V.271. — P.11756–11760.
3. Kupryshina N.A., Frenkel M.A., Tupitsyn N.N. //Haematopoiesis Immunology. — 2006. — V.3. — №2. — P.5–21.
4. Muller-Neuwen G., Kuster A., Wijdenes J. et al. J. Biol. Chem. — 2000. — V.275, №7. — P.4579–4586.
5. Tupitsyn N.N., Kadagidze Z.G., Gaillard J.-P. et al. Clinical Laboratory Haematology, 1998, v.20, P.345–352.
6. Tupitsyn N.N., Yarygin V.N., Bryukhovetsky A.S et al. //Journal of Biological regulators and homeostatic agents. — 2006. — V.20. — №1–2.
7. Tupitsyn N.N., Brochier J. Tissue antigens, 2000, №1, P.52
8. Wijdenes J., Heinrich P.C., Muller-Neuwen G. et al. Eur. J. Immunol. — 1995. — V.25. — P.3474–3481

UDK: 611-013.68:616-089.843:616.832-001

*N.N. Tupitsyn¹, V.N. Yaryghin², A.S. Bryukhovetskiy³, L.YU. Grivtsova¹,
G.L. Mentkevich¹, I.S. Dolgoplov¹, A.YU. Zaitsev³, M.I. Davydov¹*

IMMUNOPHENOTYPIC PECULIARITIES OF MOBILIZED STEM (CD34+) CELLS IN BLOOD FROM PATIENTS WITH SEVERE SPINAL CORD INJURY

¹ State N.N.Blokhin Russian Cancer Research Center Affiliated to the Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russian Federation

² Russian State Medical University, Moscow, Russian Federation

³ NeuroVita Clinic of Restorative Interventional Neurology and Therapy, Moscow, Russian Federation

ABSTRACT

Immunophenotype of mobilized stem blood cells (CD34+) was studied in 29 patients with late post-traumatic spinal lesions. The CD34+ cells demonstrated different levels of expression of CD45, CD38, monomorphic determinants HLA-DR and gp130 epitopes. Most patients presented with a CD34+ cell fraction with no or low expression of common leukocytic antigen CD45. Only 2 patients had >15% of HLA-DR-CD38-cells in the CD34+ fraction. A common transducer molecule of interleukin-6 family cytokines gp130 was expressed on stem (CD34+) cells in all the cases, 26% of the patients had an activated gp130 phenotype, i.e. a combination of C7+ and A1- epitopes.

Key words: spinal cord injury, CD34, CD45, gp130 epitopes

INTRODUCTION

Mobilized autologous stem cell (MASC) intrathecal administration is a new treatment approach in patients with a spinal cord injury. We have recently demonstrated (1) that response as recovery or improvement in paretic limb mobility, improvement in pelvic organ function, and partial, mosaic improvement in sensibility was detected in 61% of the cases. Clinical findings were confirmed by a complex urodynamical study and electromyography.

MASC grafting, and mechanism of innervation recovery (improvement) due to intrathecal administration of stem cells is unknown. Autologous mobilized hemopoietic stem cell grafting is commonly used in oncology and oncohematology. The method consists of administration of a blood mononuclear fraction enriched with CD34+ cells as obtained by leukapheresis to restore chemotherapy-depressed hemopoiesis. Such a "substitutive" mechanism of action, i.e. generation of neuronal or glial cells from mobilized CD34+ stem cells after their intrathecal administration to patients with spinal injury, seems unlikely though cannot be definitely excluded.

Mobilization of stem (CD34+) cells into peripheral circulation under the effect of colony stimulating factors is a principal requirement for the treatment approach in question (these mobilization and CD34 appearance/elevation were confirmed in all cases studied). For this reason we focused first of all on detailed study of CD34-positive stem cells, i.e. MASC, in this paper, while not ruling out in principle the role of CD34-negative fraction within the intrathecally grafted cell population.

Detailed characterization of qualitative composition of the CD34+ MASC from the standpoint of their possible nonhemopoietic commitment may be a key to this problem. To study this possibility we analyzed expression of CD45 molecules and coexpression of HLA-DR and CD38 on CD34+ MASC. We also studied expression and activation of receptor gp130, a transducer molecule of interleukin-6 (IL-6) cytokine family, on CD34+ cells. The gp130 is a hemopoietic and non-hemopoietic stem cell coreceptor needed for realization of proliferative and differentiating activities of the following cytokines: IL-6, ciliary neurotrophic factor (CNTF), leukemia-inhibiting factor (LIF), oncostatin M (OM), cardiotrophin-1 (CT-1) and IL-11 (2-4). Activation of gp130 under the effect of any of these cytokines may be assessed by gp130 epitope structure (5).

MATERIALS AND METHODS

The study was performed in 29 patients in late spinal cord post-traumatic period (in most cases — 3 to 10 years after injury). The patient age was ranging from 17 to 65 years (median age 30 years, only 4 patients were above 50); there were 24 males and 5 females.

Autologous stem cell mobilization and harvesting was performed by standard techniques recommended and approved by the European Bone Marrow Transplantation Society (6). Recombinant human G-CSF (filgrastim — Neupogen) given for 4 days twice a day at dosage of 2.5 µ/kg-6.8 µ/kg (mean — 4.3 µ/kg) was used as a colony stimulating factor.

Stem cells and their subpopulations were determined in leukapheresis product according to guidelines provided Keeney et al. (7) by direct immunofluorescent staining of cells with subsequent flow cytometry. To measure CD34+ cell number we used in all cases PE-labelled monoclonal antibodies (mAbs) HPCA-2 (BD, USA) and mouse IgG1-PE as a control. In study of CD34 subpopulation PE/Cy5 or FITC-conjugated HPCA-2 were used as well.

Expression of CD45 on mobilized CD34+ cells was studied in all 29 patients, we used FITC-labelled anti-CD45 conjugate (DakoCytomation, Denmark). To study monomorphic HLA-DR and CD38 on mobilized stem (CD34+) cells corresponding PE- or FITCmAb conjugates were used (DakoCytomation, Denmark).

Monoclonal antibodies to transducer molecule gp130 were kindly given by Jean Brochier (INSERM, France). Two epitopes of gp130 were studied: A1 — at dimerization site and C7 at another functionally active domain. Conjugates of these antibodies with PE/Cy5 (for A1) and PE (for C7) were acquired together with R. Jones (HMDS, Leeds, UK).

Acquisition and analysis of data was made using a FACScan (Becton Dickinson, USA) flow cytometer. Stem cell subpopulations were studied in the CD34+ cell gate with low laser ray scattering characteristics (low SSC) similar to those for lymphoid cells. Subsequent analysis was performed on PC with the program WinMDI.

RESULTS

Absolute number of CD34+ cells collected (just 1 apheresis procedure) in patients was in the range from 1.4 to 59.1×10^7 , mean — 12.7×10^7 . The number of infused CD34+ MASC in average was 5.3×10^6 per each intratecal transfusion (1).

In 21 of 29 patients with spinal injury within mobilized peripheral blood stem (CD34+) cells there was noted a distinctive cell population with a very low (below the level of expression on granulocytes) or no CD45 expression. Percentage of CD45-cells among CD34+ ones was low (5-18.9%) in 5 (17%), moderate (24-49%) in 10 (34%) and high (62-98%) in 6 (21%) patients. Eight patients had no CD45-negative fraction in their CD34+ population. pic. 1 shows low or no expression of CD45 on 94% of CD34+ cells with a CD45-fraction easily seen. There were somewhat inverse correlation (statistically not significant, $R=-0.307$, $p=0.105$) between the percentage of CD34+ cells in apheresis product and the percentage of CD45-cells within CD34+ cells.

Detailed study of CD38 and HLA-DR expression on mobilized CD34+ blood cells was performed in 12 patients with spinal injury. Proportion of CD38-HLADR-cells in the CD34+ population was small (less than 9% in 10 patients) and reached 16 and 23% in 2

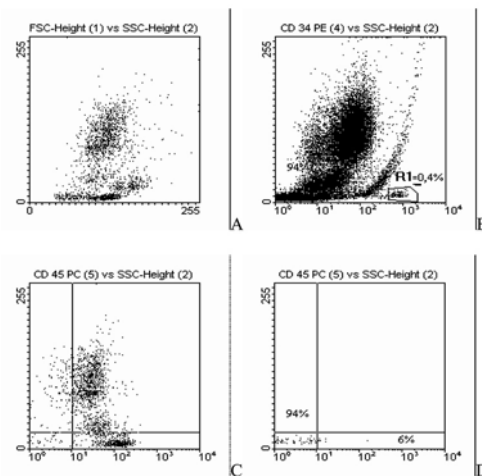
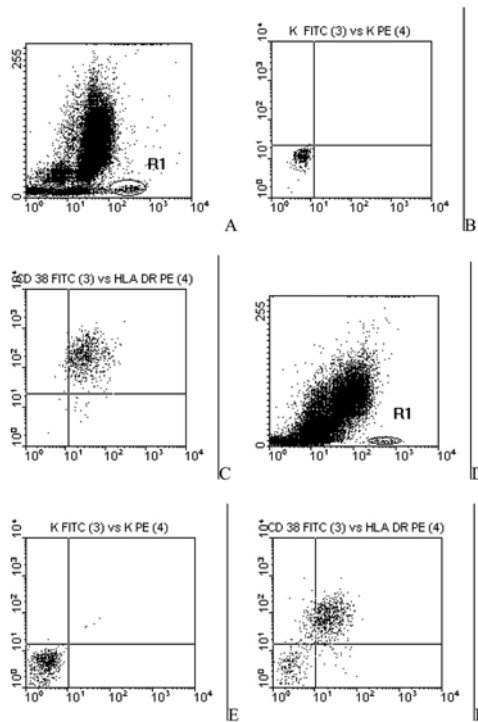


Fig. 1. Mobilized stem (CD34+) blood cells without CD45 expression. A) Light scattering characteristics of cytapheresis product cells. On the X axis — forward scatter (FSC) in conventional units (detector channel); on the Y axis (A-D) — side scatter (SSC) in conventional units (detector channel); B) stem cells (CD34+) ingate R1 are 0.4% of the entire cell population. On the X axis (B-D) — fluorescence signal intensity in conventional units (lg offluorescence channel) by PE — FL2; C) cutoff CD45 expression level (PerCP — FL3) as determined by the lower granulocyte positivity borderline. D) only 6% of cells within gate R1 (stem CD34+ cells) express CD45, the remaining cells are CD45negative. The CD45- fraction contains both absolutely CD45- negative cells and those approaching weak CD45 positivity. There are 2,000 events in dot diagrams A and C; 50,000 events in diagram B and 200 (0.4% of 50,000, gate R1) events in diagram D

cases only (figure 2). In both cases with a large HLA-DR-CD38-proportion in CD34+ stem cells there was no CD45 expression on most CD34+ cells as shown in the case in pic. 2.

Two epitopes of gp130 molecule, i.e. a functional epitope C7 participating in LIF and OM signal transduction and a functional epitope A1 involved in gp130 dimerization under the effect of any of the IL-6 family cytokines (2) were analyzed on mobilized stem cells in 15 patients with spinal injuries. There were different levels of gp130 expression on CD34+ cells: epitope C7 was present on all CD34+ cells in 13 cases, 9 of them had epitope A1 coexpression which was evidence of gp130 being not activated (5). In four patients C7 epitope monomorphous expression on stem cells was noted, while epitope A1 expression was fully absent or found on some cells

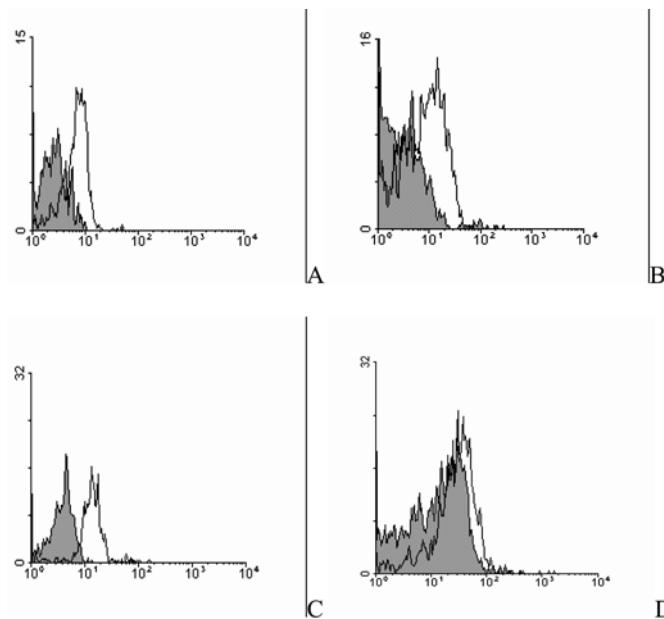


Pic. 2. HLA-DR and CD38 expression on mobilized stem (CD34+) blood cells. A-C) coexpression of the molecules. C-F) fraction HLA-DR-CD38- among CD34+ cells. A) stem (CD34+) cells are 0.44% of the total cell number (gate R1). B) control FL1 vs FL2 staining in the CD34+ gate. C) 95% of CD34+ cells coexpress CD38 and HLA-DR on their membranes, there is just a small proportion (2.3%) of HLA-DR-CD38+ cells. CD45-negative stem cells (CD34+) are 65% in this case. D) stem cell gate, E) control staining, F) 23% of CD34+ cells do not express HLA-DR and CD38 (HLA-DR-CD38). 98% of stem (CD34+) cells do not express CD45 in this case

only. This epitopic structure is indicative of gp130 molecule activation under the effect of certain IL-6-family cytokines (5). Two cases presented with epitope A1 expression and practically full absence of epitope C7. Such a combination of membrane gp130 epitopes has not been described in hemato-logical systems (normal and malignant blood cells, hemopoietic stem cells) so far, and theoretically may be indicative of initial stages of LIF and OM signaling yet failing to lead to gp130 dimerization. Types of gp130 expression are given in pic. 3.

In the present study we were attempted at study of some immunophenotypic peculiarities of MASC in patients with spinal cord injury. Standard mobilization procedure was quite effective to collect enough CD34+ cells for intrathecal infusions.

Antigen CD45 is expressed on all blood cells such as immature precursors, lymphocytes, granulocytes etc. except erythrocytes. The CD45 expression is usually increasing as the leucocytes are maturing. Haematopoietic stem cells (CD34+) may have different levels of CD45 expression ranging from slight to marked expression. The presence of CD45 on stem (CD34+) hematopoietic blood and bone marrow cells is the basis of a best known



Pic. 3. Gp130 epitope expression on membranes of mobilized stem cells in blood from patients with spinal injury (CD34+ cell gate). On the X axis — fluorescence signal intensity (fluorescence channel), on the Y axis — cell number. The shaded peak -control staining, clear peak — epitope C7 (A, C) and A1 (B, D) staining. A, B) cells from patient K.: gp130 is not activated (botheptopes are present on the membrane). C, D) cells from patient B.: gp130 molecule is activated (epitope C7 expression ispresent, epitope A1 is practically absent)

protocol for determination of these cells, i.e. ISHAGE (8). Our findings demonstrate that mobilized stem (CD34+) cells from blood of patients with spinal injury have different patterns of common leukocyte antigen CD45 expression. Most patients presented with a distinct CD45-negative cell fraction (CD34+CD45-) in the MASC population — the finding which is very rarely seen in haematopoietic stem cells.

CD34 expression is characteristic of both haematopoietic and stromal precursors that are a small percentage within CD34+CD38-HLA-DR- fraction (9). According to the published data it is these cells that may potentially differentiate in a nonhematopoietic lineage (9). Our data did not confirm the existence of prominent proportion of CD38-HLADR-cells within MASC in patients with spinal injury.

There are no techniques to directly verify neuronal or glial commitment of mobilized stem cells so far. It is possible that CD45-negative MASC may acquire non-hemopoietic differentiation in a specific microenvironment following intrathecal administration, while according to modern concepts such course of events is absolutely impossible for CD45+CD34+ cells.

We believe that study of possibility for stem cells to differentiate in neuronal or glial lineage under the direct cytokine-free action on gp130 is the most promising approach to verify the hypothesis of the MASC substitutive role. We demonstrated a similar mechanism for hematopoietic stem cells previously (3, 10), though it was not studied in neuronal precursors. That is why we also focused in our study on

measurement of expression and activation of gp130, a transducer receptor of IL-6 family cytokines. To our knowledge there were no such studies so far. Different patterns of gp130 expression and activation were noted, some of them being not typical for haematopoietic stem cells. Our findings confirm gp130 to be expressed on MASC (CD34+) both in non-activated (epitopes A1+C7+) and activated (A1-C7+) states. Besides, there were 2 cases with a practically complete absence of epitope C7 which theoretically might occur at initial OM and LIF signaling stages.

We did not attempt to assess MASC treatment efficacy in patients with spinal cord injury with respect to the presence of CD45-negative cells or gp130 activation status. Clinical response was detected also in patients having no CD45-negative MASC. This may suggest that therapeutic response was induced not only by CD34+CD45- MASC but also by CD34-negative or CD34+CD45+ cells as administered simultaneously. The MASC substitute mechanism of action seems to be most prone to criticism and difficult to prove. It is evident that induction of nerve process growth, myelination, angiogenesis and many other factors also play an important role in regeneration and improvement of tissue innervation under the effect of MASC.

Reprint requests to:

Prof. Nikolai Tupitsyn, MD, PhD

Head, Haematopoiesis' Immunology Lab.

Russian N.N.Blokhin Cancer Research Center

affiliated to The Russian Academy of Medical Sciences

115478 Kashirskoye shosse 24, Moscow, Russia

E-mail: cannt@aha.ru

REFERENCES

1. *Bryukhovetskiy A., Yaryghin V.N., Chekhonin V.P.* et al. Cell technologies in the complex therapy of spinal cord injury: from trial to clinical practice. First international spinal cord injury treatments & trials symposium (ISCITT) 17–20 December 2005, Hong Kong. Programme book. Invited abstracts. P.39.
2. *Tupitsyn N.* Role of cytokine receptor gp130 in growth and differentiation of normal and malignant haematopoietic cells. I. General data. Functional epitopes of gp80/gp130 complex. *Hematology and transfusiology* 2001; 46:9–14.
3. *Tupitsyn N., Andreeva L., Vulfova Yu.* et al. Role of cytokine receptor gp130 in growth and differentiation of normal and malignant haematopoietic cells. III. Cytokine-free haematopoiesis regulation. *Hematology and transfusiology* 2002; 47:3–13.
4. *Rose-John S.* GP130 stimulation and the maintenance of stem cells. *Trends in Biotechnology* 2002; 20:417–419.
5. *Tupitsyn N.N., Kadagidze Z.G., Gaillard J.-P.* et al. Functional interactions of the gp80 and gp130 IL – 6 receptors in human B cell malignancies. *Clin. Lab. Haematol* 1998; 20: 345–352.
6. *Johnsen H., Lanza F., Fruehauf S., Petriz J., Carr T., Walewski J., Wahlin A., Schrezenmeier H., Knudsen L.M.* Sources and Procurement of hematopoietic stem cells. *Blood and Marrow Transplantation. The EBMT Handbook* 2004. 2004, Chapter 5, P. 58–80.
7. *Keeney M, Brown W, Gratama J, Papa S, Lanza F., Sutherland R.* Immunophenotypic characterization of CD34+ cells. Support protocol. *J Biol Regul Homeost Agents.* 2003, 17, 254–60.
8. *Allan D.S., Keeney M., Howson-Jan K.* et al. Number of viable CD34+ cells reinfused predicts engraftment in autologous hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2002; 29: 967–972.
9. *Waller E.K., Olweus J., Lund-Johansen F.* et al. The "common stem cell" hypothesis reevaluated: human fetal bone marrow contains separate populations of hematopoietic and stromal progenitors. *Blood* 1995; 85: 2422–2435.
10. *Autissier P., De Vos J., Liautard J., Tupitsyn N.* et al. Dimerization and activation of the common transducing chain (gp130) of the cytokines of the IL-6 family by mAb. *International Immunology* 1998; 10: 1881–1889.

ОСЛОЖНЕНИЯ ЛЕЧЕНИЯ ОМЛ ПО ПРОГРАММАМ "7+3" И "7+3+VP-16"

Казахский НИИ онкологии и радиологии, г. Алматы

РЕЗЮМЕ

Добавление везида к программе «7+3» (дифференцированная терапия) позволяет улучшить непосредственные и отдаленные результаты лечения больных острыми миелоидными лейкозами (ОМЛ) в группе неблагоприятного прогноза (И.Г. Маркина, 2000). В течение последних лет в Казахстане проводится дифференцированная терапия ОМЛ с учетом клинко гематологических, морфоцитохимических и цитогенетических факторов прогноза, что позволило улучшить результаты лечения у взрослых больных ОМЛ высокого риска. В настоящей работе сравнили частоту инфекционных осложнений, кардио-, нефро- и гепатотоксичности схем «7+3» и «7+3+VP 16». При использовании VP 16 отмечена более низкая частота инфекционных осложнений 77% и 63%, в частности, — пневмоний (54,3% и 25,7%), возросла частота ангин с 14,3% до 31,4%. Показатели гастроинтестинальной токсичности были на том же уровне, а кардиотоксичность ниже (30,5% и 13,8%). Вместе с тем, использование VP 16 привело к некоторому росту гепатотоксичности и существенному повышению частоты нефротоксичности (с 13,8% до 38,8%). Полученные данные, на наш взгляд, указывают на целесообразность дифференцированного включения везида в программы лечения ОМЛ с учетом клинко гематологических, морфо цитохимических, иммунофенотипических и цитогенетических признаков неблагоприятного прогноза.

Ключевые слова: ОМЛ, VP 16, дифференцированная терапия, осложнения.

S.E. Sultangaziyeva

COMPLICATIONS ASSOCIATED WITH AML TREATMENT BY 7+3 AND 7+3+VP-16 SCHEDULES

Kazakhstan Oncology and Radiology Research Institute, Almaty

ABSTRACT

Addition of VP-16 to the chemotherapy protocol "7+3" in prognostically unfavourable adult AML group (differential therapy) significantly improves treatment results - CR rate and survival (Markina I.G., 2000). For several last years we apply differential therapy in high risk AML group based on clinico haematological, morpho cytochemical, immunophenotypic and cytogenetic prognostic factors. This leads to the improvement of treatment results of adult AML in prognostically unfavourable group. We compared the frequency of different complications in "7+3" vs "7+3+VP-16" treatment schedules. There was lower frequency of infections in "7+3+VP-16-group" (77% vs 63%), in particular, pneumonias (54,3% vs 25,7%), at the same time the frequency of tonsillitis rises from 14,3% to 31,4%. There were no any differences in gastrointestinal toxicities. Cardio toxicity was lower in VP-16 group — 30,5% and 13,8%. Use of VP 16 leads to somewhat increase in hepatotoxicity, and to significant increase in nephrotoxicity (13,8% vs 38,8%). The data to our mind confirm usefulness of differential increasing of VP 16 in programme treatment of adult AML based on clinico haematological, morpho cytochemical, immunophenotypic and cytogenetic signs of unfavorable prognosis.

Key words: AML, VP 16, differential therapy, complications.

ВВЕДЕНИЕ

Результаты лечения ОМЛ зависят не только от правильно подобранной химиотерапии, но и от грамотной сопроводительной терапии. Разработка схем полихимиотерапии (ПХТ), появление новых препаратов диктует необходимость совершенствования сопроводительной терапии, так как около 25% больных погибают от осложнений. Отсутствие избирательного действия только на опухоль является существенным недостатком химиопрепаратов [2; 5; 8; 9; 12]. Побочное влияние цитостатических препаратов на здоровые ткани приводит к углублению иммунодепрессии и развитию осложнений со стороны различных органов и систем. Данные осложнения зачастую могут являться причиной смертельных исходов и значительно снижают качество жизни больных в период полихимиотерапии. Клинические проявления побочных эффектов при химиотерапии гемобластозов многообразны, поэтому профилактика и лечение осложнений являются одной из основных составляющих выживаемости больных.

Миелодепрессия является наиболее частым побочным эффектом ПХТ и обычно наступает на 7–12 й дни после введения химиопрепаратов [7; 8; 13; 14]. Проявлениями миелодепрессии являются анемия, гранулоцитопения и тромбоцитопения. Существует четкая зависимость между степенью снижения нейтрофилов в крови и частотой инфекционных осложнений [7; 11]. Нейтропения опасна развитием грозных инфекционных осложнений. В этот период источником инфекции становится эндогенная и экзогенная микробная флора, резко возрастает роль внутрибольничной инфекции. К факторам, усиливающими риск развития инфекции, относятся глубина и длительность гранулоцитопении, иммуносупрессия, изменение

микрофлоры. Инфекции при гемобластозах являются наиболее тяжелыми осложнениями, влияющими на проведение специфической противоопухолевой терапии и на исход основного заболевания [7].

Многие противоопухолевые препараты вызывают осложнения со стороны желудочно-кишечного тракта. Частыми гастроинтестинальными осложнениями являются тошнота и рвота, которые негативно влияют на психологический статус больных, а также стоматит, эзофагит, гастрит и нередко желудочно-кишечное кровотечение. Поражения печени занимают особое место, так как печень является органом метаболизирующим большинство цитостатиков. Более часто гепатотоксические реакции проявляются у пациентов, перенесших гепатит, имеющих незначительное повышение трансаминаз, билирубина и щелочной фосфатазы до лечения. Кроме этого, у больных данной категории риск заражения вирусными гепатитами высокий, что связано с частыми гемотрансфузиями [6]. Реже встречаются нефротоксичность, кардиотоксичность, нейротоксичность, аллергические реакции и другие осложнения [15; 16].

В настоящее время широкое внедрение в практику лечения ОМЛ у взрослых получил вепезид (VP-16). Одни авторы считают, что вепезид может быть применен практически всем больным ОМЛ, другие убедительно доказывают целесообразность дифференцированного подхода и добавления вепезида лишь больным ОМЛ группы высокого риска, формируемой на основании клинико-гематологических, морфо-цитохимических, иммунофенотипических и цитогенетических факторов прогноза [3; 4].

В КазНИИОиР в течение последних лет проводится дифференцированная терапия ОМЛ с интенсификацией вепезидом в прогностически неблагоприятной группе. В настоящей работе мы проанализировали осложнения, возникающие в ходе интенсификации ПХТ ОМЛ вепезидом и без таковой. Результаты свидетельствуют в пользу дифференцированного подхода, так как применение вепезида ассоциируется с большей частотой таких осложнений как гепатотоксичность и нефротоксичность.

ХАРАКТЕРИСТИКА БОЛЬНЫХ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проведено у 72 взрослых больных ОМЛ, проходивших диагностику и лечение в КазНИИОиР.

Диагноз во всех случаях был установлен морфоцитохимически с подтверждением варианта заболевания в соответствии с FAB-классификацией.

При формировании группы высокого риска главными факторами прогноза являлись морфоцитохимические варианты заболевания — благоприятные (M1, M2, M4эоз) и неблагоприятные (прочие). Наряду с ними учитывались гематологические показатели (лейкоцитоз выше $30 \times 10^9/\text{л}$), цитогенетические и иммунофенотипические факторы прогноза.

В данной статье мы не останавливаемся на результатах лечения. Они опубликованы ранее [10] и свидетельствуют о высокой эффективности терапии «7+3» в группе стандартного риска, низкой эффективности данной схемы в группе высо-

кого риска и возможности повышения частоты полных ремиссий добавлением вепезида к программе «7+3» в группе высокого риска. Следует отметить, что у больных старшей возрастной группы (> 60 лет) результаты лечения оказались неудовлетворительными вне зависимости от примененной программы. Количество таких пациентов, леченных по программе «7+3» и «7+3+вепезид» не различалось.

Осложнения, возникшие на фоне и после индукционной терапии, рассматривали относительно примененной программы ПХТ в 2 лечебных группах:

1. По стандартной программе 7+3 (n=36).
2. По дифференцированной программе 7+3+VP-16 (n=36).

РЕЗУЛЬТАТЫ

При анализе осложнений, возникших на фоне и после индукционной терапии, учитывались степень нейтропении, инфекционные осложнения, геморрагический синдром, кардиотоксичность, гепатотоксичность и нефротоксичность.

При анализе осложнений, возникших на этапе проведения индукционной терапии, на первый план выступают инфекционные осложнения, которые охарактеризованы на рис.1 и 2. В 1 лечебной группе инфекционные осложнения встречались в 77,1%, во 2-й — в 62,9%.

Из приведенных на рис.1 и 2 данных видно, что примерно половина всех инфекционных осложнений приходится на пневмонии, затем идут ангина и сепсис. Высокий процент пневмоний наблюдается в первой лечебной группе — 54,3%, больше ангин было во 2-й лечебной группе — 31,4%. Меньше всего инфекционных осложнений наблюдалось во второй лечебной группе. Практически у каждого третьего больного не было инфекционных осложнений в период миелосупрессии, хотя второй шаг индукции вепезидом начинался на 10 й день перерыва после завершения ПХТ по схеме 7+3. Высокая частота данных осложнений требует проведения профилактических мероприятий, назначения наиболее эффективных комбинаций антибактериальных препаратов.

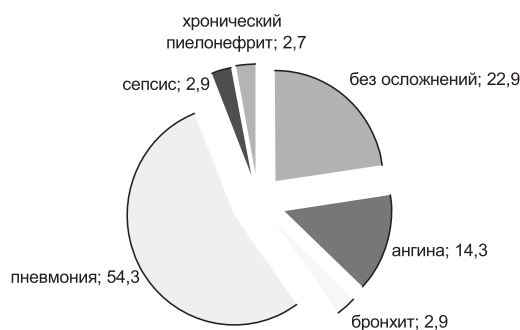


Рис. 1. Инфекционные осложнения (в % случаев) во 1-й лечебной группе (схема 7+3)

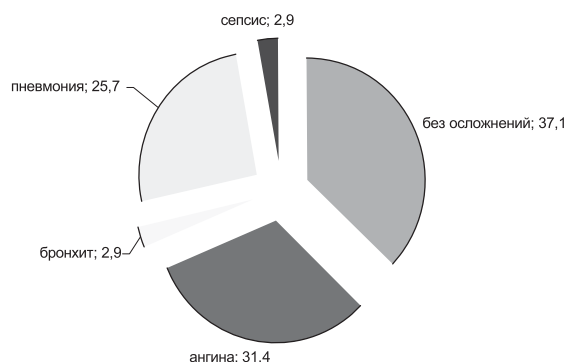


Рис. 2. Инфекционные осложнения (в % случаев) во 2-й лечебной группе (7+3+VP-16)

Геморрагический синдром в постиндукционной аплазии диагностирован у более чем 90% пациентов обеих групп, у 11% больных были желудочно-кишечные кровотечения, у 5% — маточные кровотечения.

Среди гастроэнтерологических осложнений на первый план выступали мукозиты, стоматиты и энтеропатия. Токсическое действие химиопрепаратов вызывали осложнения со стороны жизненно важных органов: сердца, печени и почек. В единичных случаях регистрировался флебит (7,6% пациентов), гипергликемия (3,2%), реактивный панкреатит (1%).

Осложнения, возникшие при проведении индукции ремиссии и после нее, представлены в табл.

Таблица

Сравнительная характеристика осложнений в различных лечебных группах, возникших на этапе индукционной терапии

Характер осложнений	1 группа (n=36)	2 группа (n=36)
Гастроэнтерологические	72,2% (n=26)	72,2% (n=26)
Гепатотоксичность	22,2% (n=8)	30,5% (n=11)
Нефротоксичность	13,8% (n=5)	38,8% (n=14)
Кардиотоксичность	30,5% (n=11)	13,8% (n=5)

Как видно из таблицы, во второй группе больных, пролеченных по дифференцированной программе с добавлением препарата вепезид через 10 дней после проведения ПХТ по стандартной схеме «7+3» по принципу двухшаговой индукции, частота возникновения гепатотоксичности, нефротоксичности была более высокой по сравнению с группой пациентов, получивших стандартную программу «7+3».

Эти данные еще раз подтверждают, что интенсивную терапию на этапе индукции можно и нужно проводить лишь в группах больных, имеющих низкую вероятность достижения полных ремиссий, у другой части больных для индукции ремиссии не требуется более агрессивная терапия, чем 7+3.

Морфоцитохимические, иммунологические, цитогенетические характеристики, клинические признаки различных вариантов острых миелоидных лейкозов, с одной стороны, и неоднозначность результатов их стандартной терапии, с другой стороны, позволяют считать, что разработка и изучение программ дифференцированной терапии ОМЛ — еще одна возможность повышения эффективности лечения ОМЛ [1; 3; 17].

Рецензент: к.м.н. И.Г. Маркина

ЛИТЕРАТУРА

1. Волкова М.А. Клиническая онкогематология.// М: Медицина, 2001.
2. Калетин Г.И. Оценка некоторых новых схем терапии острых лейкозов взрослых.// Дисс. канд. мед. наук. — М., 1999.
3. Маркина И.Г. Клиническое значение иммунофенотипирования острых нелимфобластных лейкозов.// Автореферат на соискание ученой степени канд. мед. наук. — М., 2000
4. Маркина И.Г., Тупицын Н.Н., Андреева Л.Ю. Использование иммунофенотипирования для совершенствования диагностики и прогнозирования результатов терапии острых нелимфобластных лейкозов.//Российский биотерапевтический журнал. №1, 2002.
5. Паровичникова Е.Н. Некоторые положения о современной терапии острых миелобластных лейкозов.// RosOncoWeb.Ru, 2006.
6. Поспелова Т.И., Лосева М.И. и др. Особенности поражения печени у больных гемобластозами в отдаленном периоде клинко-гематологической ремиссии.// Вестник НГМА, 2006.
7. Птушкин В.В., Сидоренко С.В. Лечение и профилактика инфекции у больных с нейтропенией. //Учебно-методическое пособие для врачей. 2000, Москва.
8. Савченко В.Г. Современная стратегия терапии острых миелоидных лейкозов взрослых.// Автореферат дисс. на соискание ученой степени доктора мед. наук. — М., 1993.
9. Савченко В.Г., Паровичникова Е.Н. Лечение острых лейкозов.// Москва, 2004.
10. Султангазиева С.Е. Лечение острых миелоидных лейкозов в различных группах риска. Фармация Казахстана. -2006. — №12. -С.28-31.
11. Amadori S., Stasi R. Emerging therapies for older adults with acute myeloid leukemia.// Education Programm of the 11th Congress of the European Hematology Association, Amsterdam, June 15-18, 2006.
12. Appelbaum FR, Downing J, Willman C. The biology and therapy of acute myelogenous leukemia. // Meeting of Am Soc of Hematol. 1995. 23-35.
13. Bene MC, Bernier M, Casasnovas RO et al. // Leukemia. 1998; 2: 54.
14. Bishop J.F. Treatment of acute myeloid leukemia in adults.// Semin. Oncol 1997; 24: 54-67.
15. Dohner H. In "Die gelbe Reine. Band V. Studienuberblick bei der AML// Phase III-studien.-1.Auflage Stand October 2000, P.15-16.

16. *Freireich E.J.* Four decades of therapy for AML // Leukemia. — 1998 — vol. 12. — Suppl. 1. — P.54-65.

17. *Stock W.* Controversies in Treatment of AML // American Society of Hematology Education Program Book. Orlando, Florida, 2006.