

# ИММУНОЛОГИЯ ГЕМОПОЭЗА

УДК 616.—006

Периодическое научное издание. Выходит дважды в год

Основан в 2006 году

1/2006, Том 3

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

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР Н.Н.ТУПИЦЫН

Редакционная коллегия:

З.Г. Кадагидзе (зам. главного редактора)

Е.Г. Турнянская (Москва)

Е.В. Артамонова (Москва)

Ж. Брошь (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

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 № ФС 77-24174 от 19.04.2006

Отпечатано в типографии ООО «Диджитал»

Тираж 1000 экз.

При перепечатке материалов ссылка на «Иммунологию гемопоэза» обязательна

# HÆMATOPOÏESIS IMMUNOLOGY

UDK 616.—006

Semi-annual scientific oncoimmunological periodicals

Founded in 2006

1/2006, Vol. 3

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

EDITOR-IN-CHIEF N.N.TUPITSYN

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. Grivtsova (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. Pavlovskaiia (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 (Lipetzk)

E.N. Sholokhova (Moscow)

A.A. Iarilin (Moscow)

Address of Editorial Office: 24, Kashirskoye sh., Moscow, Russian Federation, 115478

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 77-24174 от 19.04.2006

Published in Limited company "Digital"

Printrun 1000 copies

No reproduction is permitted without reference to Journal Hematopoiesis immunology

## СОДЕРЖАНИЕ

<i>Н. Н. Тупицын</i> От редактора .....	4
<i>George Janossy</i> Cellular immunodiagnosis in onco-haematology .....	6
<i>Д. А. Широков, Е. Л. Кадырова, М. М. Анохина, Т. Т. Кондратьева, В. Э. Гурцевич, Н. Н. Тупицын</i> Описание случая HHV-8+ HIV- первичной лимфомы серозных полостей . . .	8
<i>Л. Ю. Гривцова, Н. Н. Тупицын</i> Субпопуляции трансплантируемых стволовых кроветворных клеток .....	24
<i>I. Dolgoplov</i> Graft-versus-host and graft-versus-tumor effects after allogeneic stem cell transplantation in cancer .....	43
<i>Е. В. Артамонова, З. Г. Кадагидзе, В. П. Летягин, Л. В. Манзюк, С. А. Шинкарев, Н. А. Гадецкая, Н. Н. Тупицын</i> От теории к практике: MUC-1 — новая мишень для терапии злокачественных опухолей. ....	56
<i>Н. А. Купрышина</i> Имунофенотипическая и морфоцитохимическая характеристика острых миелоидных лейкозов с экспрессией антигена стволовых клеток CD34 .....	70
<i>Е. В. Чигринова, А. И. Павловская, Н. Н. Тупицын</i> Роль иммунофенотипирования в диагностике опухолевого поражения костного мозга при периферических В-клеточных неходжкинских лимфомах .....	90

Организация 3-й Российской с международным участием конференции «Иммунология гемопоза» и публикация данного тома периодического издания «Иммунология гемопоза» поддержаны Российским фондом Фундаментальных исследований, грант № 06-04-58034-г.

## CONTENTS

<i>N. N. Tupitsyn</i>	
<b>Message from the Editor</b> .....	<b>4</b>
<i>George Janossy</i>	
<b>Cellular immunodiagnosis in onco-haematology</b> .....	<b>6</b>
<i>D. Shirokov, E. Kadyrova, M. Anokhina, T. Kondratyeva, V. Gourtsevich, N. Tupitsyn</i>	
<b>A case of HHV-8-Associated HIV-negative primary effusion lymphoma</b> .....	<b>9</b>
<i>L. Yu. Grivtsova, N. N. Tupitsyn</i>	
<b>Subpopulations of haematopoietic stem cell transplants</b> .....	<b>25</b>
<i>I. Dolgopolov</i>	
<b>Graft-versus-host and graft-versus-tumor effects after allogeneic stem cell transplantation in cancer</b> .....	<b>43</b>
<i>E. V. Artamonova, Z. G. Kadagidze, V. P. Letyagin, L. V. Manzuk, S. A. Shinkarev, N. A. Gadetskaya, N. N. Tupitsyn</i>	
<b>From theory to practice:</b>	
<b>MUC-1 — a new target for cancer therapy</b> .....	<b>57</b>
<i>N. A. Kupryshina</i>	
<b>Immunological and morphocytochemical peculiarities of CD34- positive acute myeloid leukaemia CD34</b> .....	<b>71</b>
<i>E.V. Chigrinova, A.I. Pavlovskaya, N.N. Tupitsyn</i>	
<b>Role of immunophenotyping in diagnosis of bone marrow involvement in B-NHL</b> .....	<b>91</b>

**От редактора**

“What is the message, Nikolai?”

Jean Brochier<sup>1</sup>

С этого года (2006) «Иммунология гемопоэза» («Hematopoiesis Immunology») является периодическим изданием и будет выходить 2 раза в год. Мы по-прежнему ищем оптимальный формат издания, интересный как для нас – сотрудников лаборатории иммунологии гемопоэза, так и для читателей. Это можно реализовать лишь при условии высокого качества публикаций и приоритетности их тематики. Первое издание «Иммунологии гемопоэза» содержало в основном оригинальные статьи, второе – обзорные. В настоящем томе к этим двум вариантам публикаций добавился третий – публикации результатов завершенных диссертационных работ соискателей и аспирантов лаборатории (защищенных или апробированных). Это крупные (20–30 стр.), иллюстрированные статьи, дающие не фрагментарное, а достаточно целостное представление об определенном 3–4-летнем, завершеном разделе работы лаборатории. Второе нововведение настоящего тома состоит в попытке издания публикаций на двух языках – русском и английском. В силу лимита времени реализовать это стремление удалось не в полной мере. Постараемся устранить этот недочет в следующих томах.

Я выражаю также благодарность выдающемуся иммунологу профессору G. Janossy (Англия), любезно согласившемуся быть председателем конференции «Иммунология гемопоэза» (6 июня 2006 г.) и принять участие в издании данного тома.

Н. Н. Тупицын

**Message from the Editor**

What is the message, Nikolai?”

Jean Brochier<sup>1</sup>

Since this year (2006) the *Hematopoiesis Immunology* has become a periodical with two issues per year. We are continuing our attempts to find an optimal format that will be of interest both for us, workers of the *Hematopoiesis Immunology Laboratory*, and for our readers. This may be achieved only provided high-quality presentations on top-priority topics are published. The first issue of the *Hematopoiesis Immunology* mainly included

---

<sup>1</sup> Вопрос задан Жаном Брошье Н.Н.Тупицыну в Монпелье в отношении готовившейся к публикации статьи [1], в которой впервые было описано перераспределение эпитопов gp130 – активация в процессе димеризации под действием интерлейкина-6.

<sup>1</sup> Jean Brochier addressed this question to N. N. Tupitsyn in Montpellier in relation to the reference [1] that was in press at that moment and described for the first time redistribution of gp130 activation epitopes during dimerization under the effect of interleukin-6.

original reports while the second one consisted of reviews. This volume, besides the two types mentioned above, also contains summaries of theses (approved or ready for approval) for an university degree written by the laboratory workers. They are large (20 to 30 pages), illustrated essays that present an integral picture rather than fragments of the laboratory effort for a certain 3- or 4- year period of research. Another innovation is an attempt to publish the presentations in two languages — Russian and English. For lack of time (edition deadline is the 6th of June, i. e. the conference date) this attempt has not been fully successful, so only some articles are in English or in the two languages and the rest are just in Russian. We shall try and correct this shortcoming in future issues: the presentations will be both in English and Russian.

I am very pleased to thank the outstanding immunologist Professor G. Janossy (London, UK) for his kind consent to preside at the conference HÆmatopolesis Immunology (June 6, 2006) and to contribute to publication of this volume.

N. N. Tupitsyn

#### Reference

1. *Tupitsyn N., Kadagidze Z., Gaillard J-P., Shlokhova E., Andreeva L., Liautard J., Duperray C., Klein B., Brochier J.* Functional interactions of gp80 and gp130 IL-6 receptors in human B cell malignancies. *Clin. Lab. Haem.-1998. —V. 20. —P. 345–352.*

*George Janossy*

## CELLULAR IMMUNODIAGNOSIS IN ONCO-HAEMATOLOGY

Professor of Immunology, University College London

Cellular immunology is a basic and applied science which has developed from the 1970s with new modern methods. This acquired knowledge can then be used to cross-fertilize the areas of sister sciences such as haematology, oncology and histopathology in the area of diagnosing diseases, primarily those of the immune system such as leukaemias and lymphomas. This exciting new development has taken place in two interacting phases: (i) the basic science of elucidating the normal cellular development of the immuno-haematological system such as the bone marrow, thymus and peripheral organs, and (ii) the applied science of diagnostic methods based on these findings. As a result, a new interactive bio-medical 'platform' has been created as summarized in their book by Keating and Cambrosio [1]. In this lecture<sup>1</sup> examples of these events will be recalled to illustrate a number of practical approaches which renders modern immunodiagnosis so efficient.

Many elements contributed to this progress. These include:

(i) the production of monoclonal antibodies that recognize cellular differentiation antigens used to define stages of development. These molecules are frequently functional ligands, and the antibodies can be used in different forms labeled with different fluorochromes (for flow cytometry) and/or enzymes (for immunohistology). This 'universe of antigens' is the world of CD antigens recently also referred to as 'proteomics' [2];

(ii) the use of methods with directly labeled antibodies that also include cell permeabilization methods, to investigate both membrane associated and intracellular antigens; (iii) the setting up of modern microscopy and flow cytometry for investigating, simultaneously, multiple antigens. The tandem expression of antigens is then utilized to observe pathological combinations of protein expression as the signs of asynchrony in malignancy. Such an approach is appropriately sensitive to observe aberrant cells in lower, miniscule numbers, e.g. in detecting minimal residual disease (MRD) in patients undergoing ablative therapy [3].

(iv) These methods have been modified in order to become quantitative for two different reasons: to count the absolute numbers and percentages of different cells in the samples, and also to count the numbers of molecules displayed on individual cells - as both of these sets of parameters can herald pathological changes. The examples of using the antibody CD45 to panleucocytic antigen expressed in different levels in different haematopoietic cell types, will be used to illustrate some of these practical developments in three different clinical situations.

---

<sup>1</sup>Lecture at the conference «HÆmatopoïesis Immunology», June 6, 2006

As soon as these techniques had spread for use in a number of laboratories in different countries, efforts were made to develop guidelines and common routine laboratory practices. This was to interpret the observations with the same or similar medical terminology and to establish normal value ranges that are valid in different age groups [1]. At first, in the 1990s these efforts were still complicated and tended to ignore the issue of cost-effectivity and applicability in laboratories that had no access to extra research income. Nevertheless, it has soon emerged that it is feasible to simplify many of these methods. As a result the technology has become even more precise and powerful.

The three examples of this process are:

- (i) the identification of MRD by one or two staining combination in acute lymphoblastic leukaemia (ALL) as introduced by a European collaborative network [4];
- (ii) the most recent inventive simplification of this field that exploits the different drug-sensitivity of normal and malignant ALL blast cells (5), and
- (iii) the drastic simplification of flow cytometry to count CD4+ T cells in HIV infected patients with developing AIDS [2].

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. It is collaboration between these institutions which leads to the optimal development of these modern areas of technology. These interactions appear to be necessary in the final determining phase of these applications where simpler, user-friendly technology is introduced with strict quality assurance and impressive operational economy.

1. *Keating, P. and Cambrosio, A.* Biomedical platforms - realigning the normal and pathological in late 20th century medicine. MIT Press, 2003
2. *Janossy G.* Clinical flow cytometry, a hypothesis-driven discipline of modern cytomics. *Cytometry A* 2004; 58: 87-97.
3. *Campana D.* Determination of minimal residual disease in leukaemia patients. *Br J Haematol* 2003;121: 823-38.
4. *Lucio P.* et al. Flow cytometric analysis of normal B cell differentiation: a frame of reference for the detection of minimal residual disease in precursor-B-ALL. *Leukemia* 1999; 13: 419-27.
5. *Coustan-Smith E., Ribeiro R.C., Stow P., Zhou Y., Pui C.H., Rivera G.K., Pedrosa F., Campana D.* A simplified flow cytometric assay identifies children with acute lymphoblastic leukemia who have a superior clinical outcome. *Blood* 2006 released in electronic form March 2006.

УДК: 616-006.441-02:578.825.13:578.28НIV

Д. А. Широков<sup>1</sup>, Е. Л. Кадырова<sup>2</sup>, М. М. Анохина<sup>1</sup>, Т. Т. Кондратьева<sup>3</sup>,  
В. Э. Гурицевич<sup>2</sup>, Н. Н. Тупицын<sup>1</sup>

## ОПИСАНИЕ СЛУЧАЯ HHV-8+ HIV- ПЕРВИЧНОЙ ЛИМФОМЫ СЕРОЗНЫХ ПОЛОСТЕЙ

<sup>1</sup> Лаборатория иммунологии гемопоэза, ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва

<sup>2</sup> Лаборатория вирусного канцерогенеза, ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва

<sup>3</sup> Лаборатория цитологии, ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва

### Резюме

Первичная лимфома серозных полостей (Primary effusion lymphoma, PEL) — это редкая опухоль В-клеточного происхождения, ассоциированная в 100% случаев с вирусом герпеса человека 8 типа (HHV-8) и в большинстве случаев с вирусом иммунодефицита человека (HIV). Мы описали первый в России случай HIV- HHV8+ PEL. Диагноз был верифицирован на клетках плеврального экссудата. До сих пор в мире было описано только 22 подобных случая.

**Ключевые слова:** первичная лимфома серозных полостей, ВИЧ, вирус герпеса человека 8 типа.

### Клинический случай

Мужчине 56 лет был поставлен диагноз: В-клеточная лимфома с поражением серозных полостей. С 2002 года наблюдался и получал терапию по поводу сердечно-сосудистой патологии. При контрольном обследовании был обнаружен двусторонний плеврит; выполнена пункция, цитологическое заключение — лимфосаркома. Направлен в ГУ РОНЦ РАМН для диагностики и лечения.

Объективно: состояние относительно удовлетворительное, жалобы на слабость, отдышку. Аускультативно с двух сторон ослабленное дыхание, в нижних отделах не проводится. Перкуторно справа жидкость до 4 межреберья, слева до 7 межреберья. В анализах крови, мочи — без выраженной патологии. ЭхоКГ: дилатационная кардиомиопатия (расширение всех полостей сердца). Кальциноз створок митрального и аортального клапанов. Недостаточность митрального, аортального, трехстворчатого клапанов. Рентгенологическое исследование органов грудной клетки: выраженные застойные явления в малом круге кровообращения. Двусторонний плеврит, перикардит. Четких признаков опухолевого поражения не выявлено. Сканирование лимфоузлов: поражения не выявлено. Миелограмма и трепанобиопсия костного мозга — без патологии. УЗИ: периферические лимфоузлы не увеличены. Печень не увеличена, не изменена. Селезенка



УДК: 616-006.441-02:578.825.13:578.28HIV

*D. Shirokov<sup>1</sup>, E. Kadyrova<sup>2</sup>, M. Anokhina<sup>1</sup>, T. Kondratyeva<sup>3</sup>, V. Gourtsevich<sup>2</sup>,  
N. Tupitsyn<sup>1</sup>*

## A CASE OF HHV-8-ASSOCIATED HIV- NEGATIVE PRIMARY EFFUSION LYMPHOMA

<sup>1</sup> Laboratory of Haematopoiesis<sup>1</sup> Immunology, N. N. Blokhin RCRC RAMS, Moscow

<sup>2</sup> Laboratory of Viral Carcinogenesis, N. N. Blokhin RCRC RAMS, Moscow

<sup>3</sup> Laboratory of Cytology, N. N. Blokhin RCRC RAMS, Moscow

### Abstract

Primary effusion lymphoma (PEL) is a rare B-cell neoplasm which is 100% associated with HHV-8 and with HIV in the most of cases. We are describing the first Russian case of HIV HHV-8+ PEL. Diagnosis was verified on the pleural effusion cells. There were only 22 similar cases described worldwide.

**Key words:** primary effusion lymphoma, HIV-negative, HHV-8.

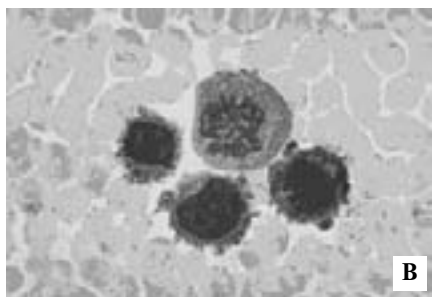
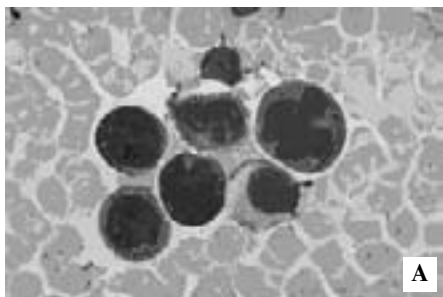
### Case report

The patient, a 56-year old male, HIV-seronegative, had the diagnosis of dilation cardiomyopathy since 2002, tachysystolic perpetual cardiac fibrillation since 2003, cardiac asthma, type 2 diabetes mellitus. Since 2002 he received therapy for cardiovascular disease. Check examination discovered two-side pleuritis; puncture and cytological study supposed malignant lymphoma. The patient was referred to the N.N.Blokhin Russian Cancer Research Center for diagnosis and treatment.

The patient's condition was objectively satisfactory, he complained of weakness, dyspnea. Auscultation found diminished breath sounds, no conduction in lower segments. By percussion there was fluid up to 4th intercostals space on the right and up to the 7th intercostals space on the left. Blood analysis and urinalysis discovered no marked pathology. By echocardiography dilation cardiomyopathy (dilation of all heart cavities), mitral and aortic valvular cusp calcinosis, mitral, aortic, tricuspid insufficiencies were found. Chest x-ray discovered marked congestive events in lesser circulation, two-side pleuritis, pericarditis. There was no clear evidence of neoplastic disease. Lymph node scan was negative. Bone marrow myelogram and trephine biopsy found no abnormalities. By ultrasound there was no enlargement of peripheral lymph nodes. The liver was not enlarged, free from changes. The spleen was 15.5 × 7.7 cm in size, had a homoge-

15.5×7.7см структура однородная. В брюшной полости и малом тазу свободная жидкость. Заключение: асцит, двусторонний плеврит, спленомегалия. Плевральная пункция: по данным иммуноморфологического анализа, периферическая В-клеточная лимфома, цитологическое заключение: крупноклеточная лимфома.

При цитологическом исследовании осадка плевральной жидкости были обнаружены преимущественно крупные опухолевые клетки с выраженной базофилией цитоплазмы, с наличием светлого ободка вокруг ядра, состоящим из множества мелких вакуолей (рис. 1А, В). Ядра опухолевых клеток крупные, с резко выраженным полиморфизмом (многодольчатые, «бугристые», почкующиеся), располагаются как центрально, так и слегка эксцентрически, в большинстве из них — заметны крупные нуклеолы. Отмечается большое количество митозов. Часть клеток с более округлыми ядрами напоминают иммуно- и плазмобласты.



**Рис. 1. А, В. Клетки плеврального выпота больного. Цитоцентрифужный препарат (cytospin), окраска по Лейшману. Увеличение ×1000**

**Рис. 1. А, В. The patient's pleural effusion cells. Cytocentrifuge preparation (cytospin), Leischman staining. Magnification ×1000**

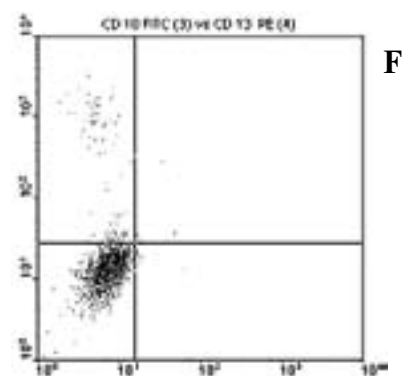
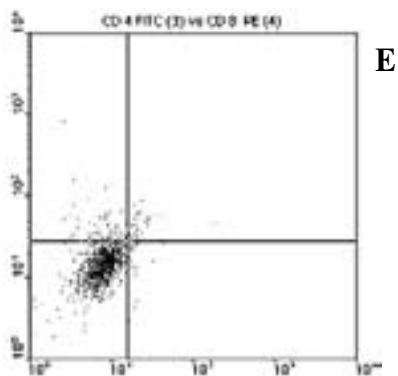
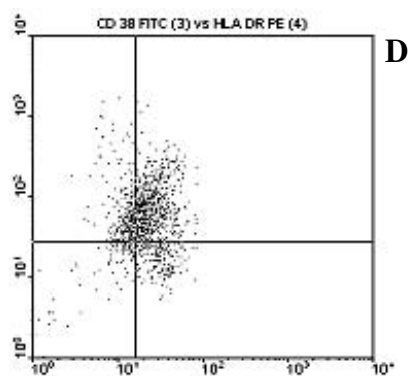
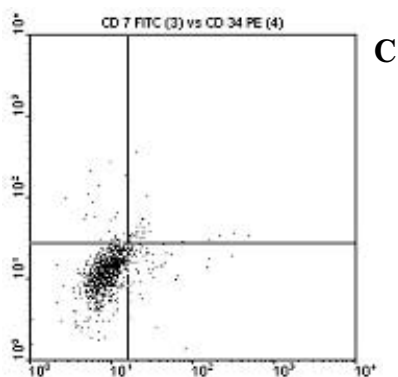
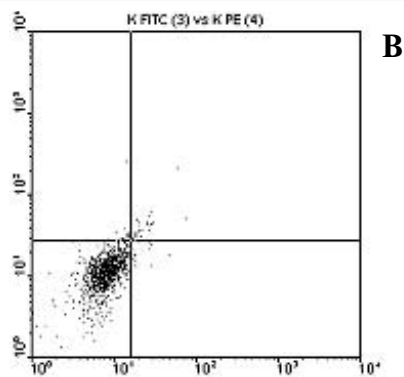
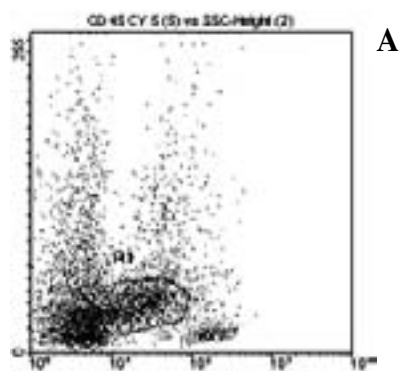
Иммунофенотипирование клеток плевральной эффузии проводили тройным иммунофлуоресцентным окрашиванием (CD45PE/Cy5 в каждой пробе) с применением широкой панели моноклональных антител. Дальнейший анализ проводили на проточном цитометре FACSCAN (BD, Mountain View CA). Результаты представлены на рис. 2. Цитометрически опухолевые клетки характеризовались более высокими в сравнении с лимфоцитами уровнями бокового светорассеяния лазерного луча (SSC). Отмечена слабая экспрессия CD45, что расценено как следствие выраженной анаплазии (рис. 2А). В-клеточный иммунофенотип подтвержден на основании экспрессии маркера CD20 на большинстве клеток (рис. 2J), однако, CD19 практически отсутствовал (рис. 2M). Следует отметить, что отсутствие экспрессии одного или нескольких пан-В-клеточных маркеров весьма характерно

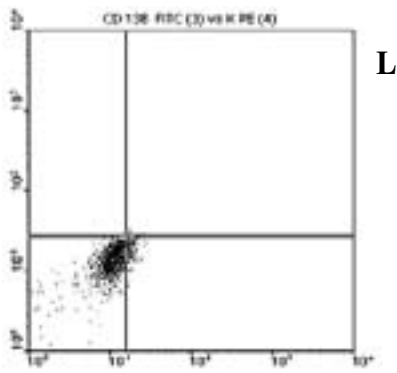
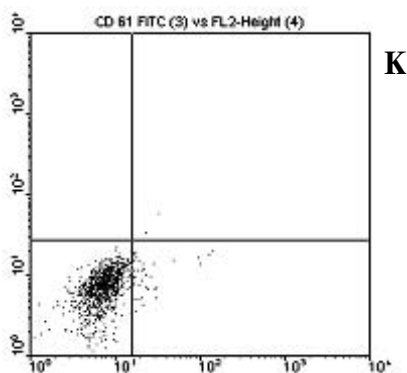
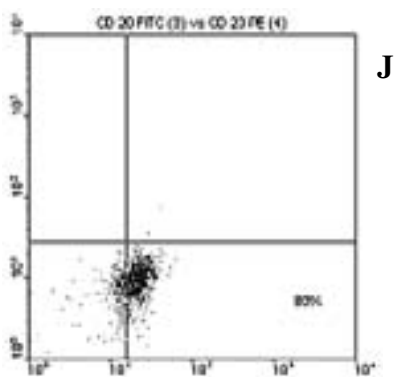
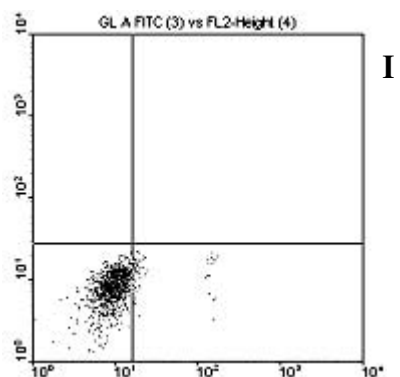
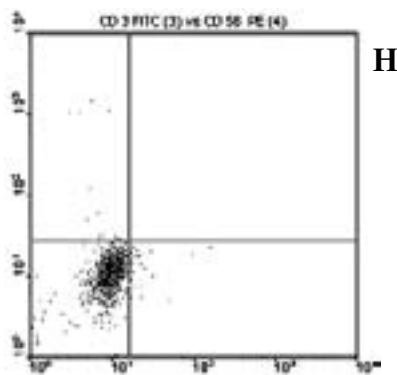
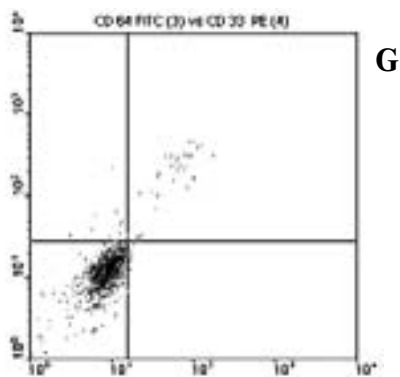
neous structure. There was free fluid in the abdomen and small pelvis. Conclusion: ascites, two sided pleuritis, splenomegaly. By pleural puncture and immunomorphological analysis peripheral B-cell lymphoma was diagnosed; by cytology large-cell lymphoma was defined.

Cytological study of pleural fluid cells discovered mainly large tumor cells with marked cytoplasmatic basophilia and a light thin rim around the nucleus consisting of multiple small vacuoles (Pic. 1 A, B). Tumor cell nuclei were large, demonstrated marked polymorphism (multilobular, knobby, budding nuclei) and were located both in the center and slightly eccentrically, most of the nuclei had large nucleoli. There were a large number of mitoses. Some cells with more round nuclei looked like immuno- or plasmoblasts.

Pleural effusion cell immunophenotyping was performed in direct 3-color immunofluorescent staining (CD45PE/Cy5 in each tube) with the wide panel of monoclonal antibodies (mAbs). Subsequent flow cytometry was done on FACScan (Becton Dickinson, Mountain View, CA). Findings are presented in Pic. 2. By cytometry the tumor cells were characterized by higher levels of laser ray side scattering (SSC) as compared to lymphocytes. CD45 expression was weak which was considered a result of marked anaplasia (Pic. 2 A). B-cell immunophenotype was confirmed by low levels of pan-B-cell antigen CD20 expression on 80% cells (Pic. 2 J) though CD19 was practically absent (Pic. 2 M). It should be mentioned that no expression of any pan-B-cell markers is rather typical of PEL. Additional markers were HLA-DR and CD38 (Pic. 2 D), while there was practically no expression (4% (Pic. 2 L) of plasma cell marker syndecane-1 (CD138) which is found on PEL cells rather frequently. There was no B-cell activation antigen Fc RII, CD23 (Pic. 2 J). We found no expression of T-cell differentiation markers CD7, CD5, CD4, CD3, CD8, myeloid and monocytic antigens CD13, CD33, CD64; NK-cell marker CD56, erythroid marker glycophorin A and megakaryocytic antigen GpIIb/IIIa — CD61 (Pic. 2). There was no expression of stem cell antigen CD34 or common ALL antigen CD10 in our case (Pic. 2).

Pleural effusion supernatant from the patient was tested in indirect immunofluorescence (20) for the detection of antibodies to proteins of two different gammaherpesviruses: 1) the latency-associated nuclear antigen — LANA-1 of HHV-8, and 2) capsid antigen (two VCA proteins — BNRF, p143, and BcLF1, p150) and early antigen (two EA protein subunits — R: BORF2+BaRF1, p85, and D: BMRF, p54) complexes of EBV. Latently infected by HHV-8, EBV-free cell line BCBL-1 (obtained from Dr. A.Gessain, Pasteur Institute, Paris, France) was used as a test-cell line containing virus-specific antigen LANA-1. Quantitative EBV antibody profile was detected in a TPA-induced cell-line P3HR-I, a clone version of Burkitt's lymphoma (Pic.3J) line. Cell-line RAJI induced by both TPA and n-sodium butyrate was used for EBV detection as a positive control. All details of the reaction, diagnostic titers and specific pictures of luminescence in the test-cells are described elsewhere [26]. The presence of anti-LANA antibodies of IgG class in the pleural effusion supernatant was determined by specific bright-green, dot-line nuclear luminescence against the background of red-brown negative cells. A specimen was considered anti-HHV-8-positive if the

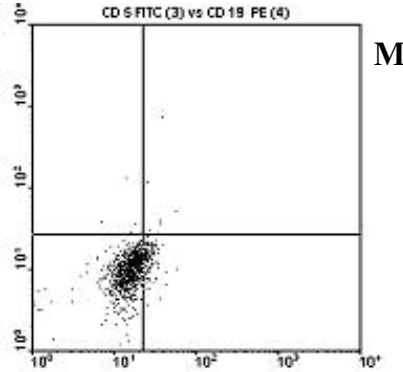




для PEL. Дополнительными маркерами явились HLA-DR и CD38 (рис. 2D), при этом экспрессия маркера плазматических клеток синдекана-1 (CD138), весьма характерного для PEL, в данном случае отсутствовала — 4% (рис. 2L). Отсутствовал активационный антиген В-клеток FcεRII — CD23 (рис. 2J). Отсутствовали маркеры Т-клеточной дифференцировки — CD7, 5, 4, 3, 8 (рис. 2), миелоидные и моноцитарные антигены — CD13, 33, 64 (рис. 2), маркер NK-клеток CD56, эритроидный маркер гликофорин А, а также мегакариоцитарный антиген CD61 (GpIb/IIIa). Не наблюдалось экспрессии стволовклеточного антигена CD34, общего антигена ОЛЛ — CD10.

Сыворотка, полученная от больного, была протестирована в реакции непрямой иммунофлуоресценции [20] на наличие антител к белкам двух герпесвирусов: 1) латентному ядерному белку LANA HHV-8, и 2) капсидному (два белка VCA — BNRF; p143 и BcLF1, p150) и раннему (две субъединицы белка EA — R: BORF2+BaRF1, p85 и D: BMRF, p54) белкам EBV. В качестве тест-клеток, содержащих вирус-специфический антиген LANA-1, использовали перевиваемую клеточную линию BCBL-1 (полученную от Dr. A.Gessain, Pasteur Institute, Paris, France), инфицированную только HHV-8 и свободную от EBV. Присутствие в сыворотке антител к VCA EBV определяли на индуцированной TPA клеточной линии P3HR-I, являющейся клоновым вариантом линии P3J лимфомы Беркитта. В качестве положительного контроля для выявления EA EBV использовали клеточную линию RAJI, индуцированную совместно TPA и n-бутиратом натрия. Все нюансы постановки реакции отражены в литературе [26]. Присутствие антител к LANA HHV-8 (класса IgG) в исследуемой сыворотке определяли по специфическому пунктирному внутриядерному ярко-зеленому свечению на фоне негативных клеток, окрашенных в красновато-коричневый цвет. Сыворотка больного считается серопозитивной к HHV-8, если в разведении 1:160 обнаруживают характерное свечение (13). Для подтверждения специфичности проводимых реакций одновременно ставили несколько контролей: в качестве позитивного использовали сыворотки с заведомо высокими титрами антител к соответствующим вирус-специфическим антигенам. При негативном контроле испытуемую сыворотку заменяли раствором PBS. Контакт сыворотки с фиксированными клетками был 60 мин при 37°C. Для визуализации антител использовали ФИТЦ-меченые иммуноглобулины против IgG (H) человека. Супернатант плеврального экссудата пациента содержал высокие титры анти-HHV-8-антител (анти-LANA) (1:320). Более того, были найдены высокие титры антител к EBV. Конечные титры антител к комплексу VCA EBV были 1:640 (IgG), 1:20 (IgA); и к комплексу EA EBV — 1:80 (IgG).

Для точной верификации диагноза «первичная лимфома серозных полостей» была проведена PCR с ДНК, выделенной из клеток плевральной эффузии. Реакцию ставили с тремя парами праймеров к трем генам HHV-8: K1, ORF26 и vIL-6 (K2). Ген K1, кодирующий трансмембранный белок, предполагается участвовать в трансформации клеток, является чрезвычайно варибельным и играет, скорее всего, важнейшую роль в эволюции данного вируса. ORF26, в свою очередь, кодирует большой капсид-



**Рис. 2. Проточно-цитометрический анализ клеток плеврального экссудата больного:**

А — ось абсцисс — экспрессия CD45 PE/Cy5 (FL-3), ось ординат — SSC, R1 — гейт анализируемых клеток; В—М — клетки в гейте R1, ось абсцисс — FL-1 (FITC), ось ординат — PE (FL-2), перечень маркеров дан в табл. 1

**Pic. 2. Flow cytometry of pleural effusion cells:**

А — x-axis shows CD45 PE/Cy5 (FL-3) expression (CD45 is present in each tube), y-axis shows SSC, R1 is the gate of analyzed cells. B—M — cells in the R1 gate, x-axis shows FL-1 (FITC), y-axis shows FL-2 (PE), mAbs combinations are listed above each picture

characteristic luminescence was found in a 1:160 dilution [13]. Several controls were used simultaneously to confirm specificity of the reactions. Sera with known high titers of antibodies to virus-specific antigens were used as positive controls. Sera were incubated with the fixed cells at 37°C for 60 min. and cell-bound antibodies were then visualized with FITC-labeled immunoglobulins to human IgG (H). The patient's pleural effusion supernatant contained high levels of anti-HHV-8 antibodies (anti-LANA) (1:320), showing intensive nuclear staining in BCBL-1 test-cells. LANA-1 accumulates nuclear bodies in interphase nuclei, producing a characteristic stippled pattern. Moreover, high titers of antibodies to EBV were found. End-point titers of the antibodies to complex VCA of EBV were 1:640 (IgG), 1:20 (IgA); and to complex EA of EBV — 1:80 (IgG).

PCR analysis of pleural effusion cells was performed to verify the diagnosis, using three primer pairs to three HHV-8 genes such as K1, ORF26 and K2 (vIL-6). K1 encoding the transmembrane protein is thought to participate in cell transformation, is very variable and probably plays a key role in the virus evolution. ORF26 encodes a large capsid protein and unlike K1 is a conservative gene. And finally, the unique gene K2 encodes viral interleukin-6 which is a homologue of human interleukin-6 and belongs to a viral gene group captured by HHV-8 from the cell genome during evolution. DNA isolation for PCR was performed by standard procedure involving extraction in

ный белок вируса и, в отличие от K1, является консервативным геном. Наконец, уникальный ген K2, кодирующий вирусный интерлейкин-6 — гомолог интерлейкина-6 человека, принадлежит к группе вирусных генов, захваченных HHV-8 в процессе своей эволюции из клеточного генома. Использовались следующие пары праймеров: 1) vIL-6 forward: 5'-CAGCCATATGATGTGCTGGTTCAAGTTGTG-3', vIL-6 reverse: 5'-AGCACTCGAGTTACTTATCGTGACGTCAG-3'. 2) ORF26 forward: 5'-AGCCGAAAGGATTCCACCAT-3', ORF26 reverse: 5'-CTGGACGTAGACAACACGGGA-3'. 3) K1 forward: 5'-GACCTTGTGGACATCCCGTACAATC-3', K1 reverse: 5'-AGGCCATGCTGTAAGTAGCACGGTT-3'. 4) GAPDH forward 5'-AGTCCAGTGAGCTTCCCGTTCAGC-3', GAPDH reverse 5'-TGGTATCGTGGAAGGACTCATGAC-3'. PCR во всех 3 случаях дала положительный результат (рис. 3А). В качестве положительного контроля на наличие ДНК в пробе использовали праймеры к гену GAPDH человека (глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы). Позитивным контролем была ДНК, выделенная из клеток линии BCBL-1, для негативного контроля в PCR-смеси вместо ДНК была добавлена бидистиллированная H<sub>2</sub>O, используемая в экспериментах. Таким образом, можно однозначно заключить, что данная лимфома плевральной полости является HHV-8-ассоциированной.

Кроме того, мы решили посмотреть экспрессию мРНК гена vIL-6 HHV-8 и сравнить ее с экспрессией мРНК hIL-6 — гомолога этого гена у человека. РНК для RT-PCR экстрагировали гуанидин-тиоционатным буфером (4М гуанидин тиоцианат, 25 мМ натрия цитрат pH 7.0, 0.5% натрия N-лауроилсаркозилат, 0.1% β-меркаптоэтанол) с дальнейшей очисткой белков смесью фенол-хлороформ. RT-PCR была проведена в 2 стадии, кДНК была синтезирована с помощью M-MuLV обратной транскриптазы (Fermentas, Литва). Для амплификации использовали следующие пары праймеров: 1) vIL-6 forward: 5'-CAGCCATATGATGTGCTGGTTCAAGTTGTG-3', vIL-6 reverse: 5'-AGCACTCGAGTTACTTATCGTGACGTCAG-3'. 2) hIL-6 forward: 5'-CCTGAACCTTCCAAAGATGG-3', hIL-6 reverse: 5'-CATTTGCCGAAGAGCCCTCA-3'. 3). Для разделения ПЦР-амплифицированных фрагментов использовали 1,7% легкоплавкую агарозу на 1x TBE-буфере, содержащую бромистый этидий. Выяснилось, что клетки опухоли экспрессируют оба цитокина (рис. 3В), что согласуется с литературными данными [13; 23]. Позитивным контролем на наличие РНК в пробе была RT-PCR с праймерами к β-глобину: β-globin forward: 5'-CTGGGCAGGCTGCTGGTG-3', β-globin reverse: 5'-GCTTGTACAGTGCAGCTC-3' (см. рис. 3В).

Первичная лимфома серозных полостей (первичная выпотная лимфома, PEL) — это неоплазия из В-клеток, прошедших этап созревания в зародышевом центре лимфатического узла, и представленная серозными эффузиями в различных полостях тела [16]. Она ассоциирована с вирусом герпеса человека 8 типа (HHV-8) и протекает, как правило, на фоне иммунодефицита. Большинство описанных в литературе случаев связаны с ВИЧ-инфекцией [10], в литературе на сегодняшний день описано лишь около 22 случаев HHV-8+ HIV- PEL.

Лимфатические экссудаты накапливаются в плевральной, перикардиальной и перитонеальной полостях, причем поражается в основном только одна по-



phenol/chloroform with ethanol precipitation to follow. The primer pairs used for amplification were (1) vIL-6 (K2) forward: 5'-CAGCCATATGATGTGCTG-GTTCAAGTTGTG-3'; vIL-6 (K2) reverse: 5'-AGCACTCGAGTTACTTATCGTG-GACGTCAG-3'; (2) ORF26 forward: 5'-AGCCGAAAGGATTCCACCAT-3'; ORF26 reverse: 5'-CTGGACGTAGACAACACGGA-3'; (3) K1 forward: 5'-GACCTTGTG-GACATCCCGTACAATC-3', K1 reverse: 5'-AGGCCATGCTGTAAGTAGCACG-GTT-3'. PCR products were identified in all the three cases (Pic. 3A). Primers to human gene GAPDH (glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase) was used as a positive control in tests for the presence of DNA in the specimen. DNA isolated from BCBL-1 cells was used as a positive control, for the negative control the DNA was replaced by bidistilled experimental H<sub>2</sub>O. The conclusion may therefore be made that the pleural cavity lymphoma cells in this case contained HHV-8 DNA.

Besides, we measured HHV-8 vIL-6 mRNA as well as mRNA of hIL-6. RNA for RT-PCR was extracted by guanidine thiocyanate buffer (4M guanidine thiocyanate, 25 mM sodium citrate pH 7.0, 0.5% sodium N-laurylsarcosylate, 0.1% β-mercaptoethanol) with protein purification by phenol-chloroform mixture to follow. RT-PCR was done by a two-stage procedure. cDNA was synthesized with total RNA using M-MuLV reverse transcriptase (Fermentas, Lithuania). We used the following primer pairs for amplification: (1) vIL-6 forward: 5'-CAGCCATATGATGTGCTGGTTCAAGTTGTG-3', vIL-6 reverse: 5'-AGCACTCGAGTTACTTATCGTGGACGTCAG-3'; (2) hIL-6 forward: 5'-CCTGAACCTTCCAAAGATGG-3', hIL-6 reverse: 5'-CATTTGCCGAAGAGCCCT-CA-3'. 1.7% readily-melttable ethidium bromide-containing agarose in 1x TBE (89mM Tris, 89mM boric acid, 2mM EDTA) buffer was used to separate PCR-amplified fragments. The tumor cells expressed both cytokines. RT-PCR with primers to β-globin (β-globin forward: 5'-CTGGGCAGGCTGCTGGTG-3', β-globin reverse: 5'-GCTTGT-CACAGTGCAGCTC-3') was used as a positive control (Pic. 3B).

Primary effusion lymphoma (PEL) is a neoplasia that originates from post germinal center B-cells and manifests itself as serous effusions in various body cavities [16]. The tumor is associated with human herpes virus-8 and mainly occurs in immunodeficiency patients. Most published cases were HIV-associated [10], there were about 22 cases of HHV-8+ HIV PEL described in the literature so far.

Lymphatic effusion is accumulated in any of the pleural, pericardial or peritoneal cavities with only a single one being affected in most cases. Only in one case reported [22] pleural, pericardial as well as peritoneal cavities were affected. In the case reported in our article fluid was accumulated in all 3 cavities, diagnosis being stated while examining pleural cells. Other extranodal areas such as gastrointestinal tract and soft tissues may be involved [23]. This lesion is not accompanied by lymphadenopathy or organomegaly. Some patients have a history of Kaposi's sarcoma (1), rare cases are associated with multicentric Castelman's disease [28]. No nodal or extranodal involvement except of serous cavities was detected in the case described.

HHV-8 DNA is found in all cases of PEL and EBV coinfection in all transformed cells in EBV-positive cases [1; 4; 15]. Effusion fluid contains high levels of cytokines, in particular, IL-6 and IL-10 [2].

лость. Только в одном описанном случае [22] и плевральная, и перикардиальная, и перитонеальная полости были затронуты опухолевым процессом. В описанном нами случае экссудат накапливался во всех 3-х полостях, диагноз был верифицирован на клетках из плевральной полости. Другими экстранодальными областями поражения могут быть гастроинтестинальный тракт и мягкие ткани [23]. Лимфоаденопатии и органомегалии при данной патологии не наблюдаются. Некоторые пациенты в анамнезе имеют саркому Капоши [1], изредка встречаются случаи, ассоциированные с мультицентрической болезнью Кастельмана [28].

В трансформированных клетках во всех случаях обнаруживают ДНК HHV-8, в большинстве случаев опухолевые клетки коинфицированы EBV [1; 4; 15]. В выпотной жидкости обнаруживают высокие уровни цитокинов, в частности ИЛ-6 и ИЛ-10 [2].

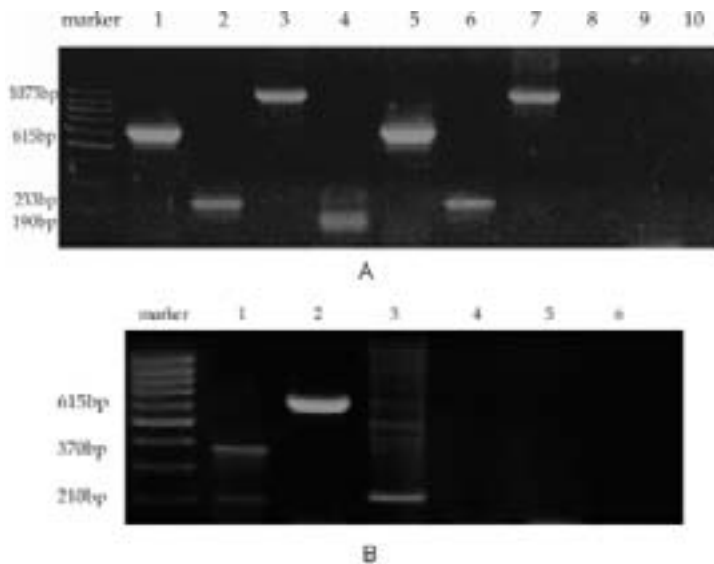
По морфологии клетки первичной выпотной лимфомы в основном крупные плеоморфные. Наблюдают большое разнообразие клеточных вариантов от клеток с круглым или яйцевидным ядром до очень крупных клеток с ядром неправильной формы и выраженной цитоплазмой [22].

Клетки выпотной лимфомы обычно экспрессируют общий лейкоцитарный антиген CD45, но, как правило, не имеют пан-В-клеточных маркеров: CD19, CD20, CD79a (18). Поверхностная и цитоплазматическая экспрессия иммуноглобулинов также часто отсутствует. Кроме того, обычно клетки позитивны по активационным антигенам: CD30, CD38, CD138. Описан случай aberrантной экспрессии CD3 [6]. Гены иммуноглобулинов в лимфомных клетках перестроены и мутированы [19], а в некоторых клетках обнаруживаются aberrантные перестройки генов Т-клеточного рецептора [14]. В то же время никаких специфических хромосомных aberrаций пока обнаружено не было.

Клинический прогноз очень неблагоприятный в независимости от проведенной терапии, медиана выживания меньше 6 мес.

Мы описали случай первичной выпотной лимфомы у мужчины 56 лет, серонегативного по ВИЧ. Таким образом, наш случай оказался 23-м детально документированным сообщением о PEL, а Россия стала 8-й страной, в которой наблюдали подобные случаи. Иммунофенотип лимфомных клеток был достаточно типичным для PEL. Трансформированные клетки практически не имели маркеров линейной принадлежности. Интересно, что была обнаружена экспрессия В-клеточного маркера CD20, который, согласно литературным данным, чаще всего отсутствует на клеточной мембране при данном заболевании. Другой интересной находкой было отсутствие экспрессии плазмноклеточного маркера CD138 (синдекана-1), который, как правило, экспрессируется при PEL. Также был обнаружен CD38, являющийся, как и CD138, плазмноклеточным маркером. В целом, все эти результаты подтверждают наличие у пациента PEL.

Диагноз был подтвержден наличием ДНК HHV-8 в лимфомных клетках, что было показано молекулярно-биологическими исследованиями. Помимо того, что эта лимфома сама по себе довольно редка, ее тяжело отличить от других В-круп-



**Рис. 3А. Результаты PCR с ДНК из клеток плеврального выпота:**

1–4: ДНК пациента, 5–7: позитивный контроль (ДНК клеток линии BCBL-1), 8–10: негативный контроль. Линии 1, 5, 8 — использовались праймеры к vIL-6, линии 2, 6, 9 — использовались праймеры к ORF26, линии 3, 7, 10 — использовались праймеры к K1, линия 4 — использовались праймеры к GAPDH

**Рис. 3В. Результаты RT-PCR с РНК из клеток плеврального выпота:**

1–3: кДНК пациента, 4–6: негативный контроль (бидистиллированная H<sub>2</sub>O). Линии 1, 4 — использовались праймеры к hIL-6, линии 2, 5 — использовались праймеры к vIL-6, линии 3, 6 — использовались праймеры к β-глобину

**Fig. 3. PCR analysis of HHV-8 sequences in PEL cells:**

1–4: patient's DNA; 5–7: positive control (DNA from BCBL-1 cell line), 8–10: negative control. Lanes 1, 5, 8: primers to vIL-6 were used; lanes 2, 6, 9: primers to ORF26 were used; lanes 3, 7, 10: primers to K1 were used; lane 4: primers to GAPDH were used

By morphology PEL cells are mainly pleomorphic. There is a great variety of cells ranging from those with a round or oval nucleus to very large cells with an irregular nucleus and apparent cytoplasm [22].

Effusion lymphoma cells mainly express a common leukocytic antigen CD45 but as a rule have no pan-B-cell markers such as CD19, CD20, CD79a (18). There is no surface or cytoplasmic immunoglobulin expression in many cases. Besides, the cells mainly have a positive status of activation antigens, such as CD30, CD38, CD138. A case of CD3 aberrant expression was described [6]. Immunoglobulin genes in lymphoma cells

ноклеточных лимфом. По сути единственным четким подтверждением диагноза первичная выпотная лимфома является анализ на наличие в трансформированных клетках ДНК HHV-8. В нашей же стране подобный анализ не входит в рутинную клиническую практику. Неожиданным оказалось то, что пациент оказался ВИЧ-серонегативным. Как уже было сказано выше, случаи первичной лимфомы серозных полостей в ВИЧ-серонегативных пациентах крайне редки. В настоящее время в мире описано всего около 22 HHV-8+ HIV- PEL в 7 странах: Франции (7), Израиле [3; 17; 21], Италии [5; 8; 9; 12], Испании (11), Аргентине [24], Венгрии [19] и США [22; 25; 27]. Анализируя эти случаи, можно отметить следующие общие черты: пациенты, как правило пожилого возраста, мужского пола, пораженной в подавляющем большинстве случаев оказывается плевральная полость.

Подводя итог, можно сказать, что в России это первый описанный случай ВИЧ-негативной первичной лимфомы серозных полостей, подтвержденный цитологическими, иммунофенотипическими и генетическими исследованиями.

## References

1. *Ansari M.Q., Dawson D.B., Nador R., Rutherford C., Schneider N.R., Latimer M.J., Picker L., Knowles D.M., McKenna R.W.* Primary body cavity-based AIDS-related lymphomas. *Am. J. Clin. Pathol.* — 1996. — V.105, №2. — P. 221-229.
2. *Aoki Y., Yarchoan R., Braun J., Iwamoto A., Tosato G.* Viral and cellular cytokines in AIDS-related malignant lymphomatous effusions. *Blood.* — 2000. — V. 96, №4 — P.1599-1601
3. *Ariad S., Benharroch D., Lupu L., Davidovici B., Dupin N., Boshoff C.* Early peripheral lymph node involvement of human herpesvirus 8-associated, body cavity-based lymphoma in a human immunodeficiency virus-negative patient. *Arch. Pathol. Lab. Med.* — 2000. — V.124, №5. — P.753-755.
4. *Arvanitakis L., Mesri E.A., Nador R.G., Said J.W., Asch A.S., Knowles D.M., Cesarman E.* Establishment and characterization of a primary effusion (body cavity-based) lymphoma cell line (BC-3) harboring kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV/HHV-8) in the absence of Epstein-Barr virus. *Blood.* — 1996. — V. 88. — P.2648-2654.
5. *Ascoli V., Carnovale Scalzo C., Danese C., Ascoli V., Scalzo C.C., Danese C., Vacca K., Pistilli A, Lo Coco F.* Human herpes virus-8 associated primary effusion lymphoma of the pleural cavity in HIV-negative elderly men. *Eur. Respir. J.* -1999. — V.14. — P.1231-1234.
6. *Beatty M.W., Kumar S., Sorbara L., Miller K., Raffeld M., Jaffe E.S.* A biophenotypic human herpesvirus 8-associated primary bowel lymphoma. *Am. J. Surg. Pathol.* — 1999. — V.23, №8. — P. 992-994.
7. *Boulanger E., Hermine O., Femand J.P., Radford-Weiss I., Brousse N., Meignin V., Gessain A.* Human herpesvirus 8 (HHV-8)-associated peritoneal primary effusion lymphoma (PEL) in two HIV-negative elderly patients. *Am. J. Hematol.* — 2004. — V.76, №1. — P.88-91.
8. *Buonaiuto D., Rossi D., Guidetti F., Vivenza D., Berra E., Deambrogi C., Ariatti C., Franceschetti S., Conconi A., Ronco M., Valente G., Colombi S.* Human herpesvirus type 8-associated primary lymphomatous effusion in an elderly HIV-negative patient: clinical and molecular characterization. *Ann. Ital. Med. Int.* — 2002. — V.17, №1. — 54-59.

are rearranged and mutated [19], some cells present with aberrant changes in T-cell receptor genes [14]. While there were no specific chromosomal aberrations found so far.

The clinical course of PEL is very poor depending upon therapy with a median survival less than 6 months.

We are describing the first Russian case of PEL in a 56-year male patient; particular feature of the case was HIV-negativity. So, it is 23rd case of HIV-negative well-documented PEL, and Russia becomes the 8th country in which such cases were observed. The lymphoma cell immunophenotype was rather typical for PEL. The transformed cells had practically no differentiation lineage-specific antigens. Of interest however was our finding of weak expression of B-cell marker CD20, which according to literature data may be absent on cell membrane of the lymphoma type in question. Another interesting finding was the absence of expression of plasma cell marker CD138 (syndecane-1) which is frequently present in the cases of PEL. CD38 which is also present on plasmacytes was clearly expressed. As a whole the immunophenotyping findings suggested that the patient had PEL.

The diagnosis was confirmed by the presence of HHV-8 in lymphoma cells as verified by molecular biological studies. Being rare, this lymphoma type is difficult to differentiate from other B-cell lymphomas. Testing of transformed cells for HHV-8 DNA is in fact the only way to obtain a clear evidence of the diagnosis of PEL. Such a test is not done routinely in the clinical practice. The patient appeared to be HIV-seronegative. As mentioned above, PEL in HIV-seronegative patients is very rare. Just 22 HHV-8+ HIV PEL cases are described so far in only 7 countries — France [7], Israel [3; 17; 21], Italy [5; 8; 9; 12], Spain [11], Argentina [24], Hungary (19), USA [22; 25; 27]. All these cases have common features, such as predominantly advanced age, male gender, and involvement of pleural cavity in a vast majority of cases.

In conclusion, the rare, 1st in Russia case of HIV-negative primary effusion lymphoma verified by cytology, immunophenotype and genetic studies is described.

---

9. *Carbone A., Glohini A., Vaccher E., Zagonel V., Pastore C., Dalla Palma P., Branz F., Saglio G., Volpe R., Tirelli U., Gaidano G.* Kaposi's sarcoma associated herpesvirus DNA sequences in AIDS-related and AIDS-unrelated lymphomatous effusions. *Br. J. Haematol.* — 1996. — V.94. — P. 533-543.

10. *Cesarman E., Chang Y., Moore P.S. Said J.W., Knowles D.M.* Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-related body-cavity-based lymphomas. *N. Eng. J. Med.* — 1995. — V.332. — P.1186-1191.

11. *Cobo F., Hernandez S., Hernandez L., Pinyol M., Bosch F., Esteve J., Lopez-Guillermo A., Palacin A., Raffeld M., Montserrat E., Jaffe E.S., Campo E.* Expression of potentially oncogenic HHV-8 genes in an EBV-negative primary effusion lymphoma occurring in an HIV-seronegative patient. *J. Pathol.* — 1999. — V.189, №2. — P. 288-293.

12. *Danese C., Angrisani L., Colotto M., Clarice A., Ferranti E.* A five year follow-up of an HHV-8 related lymphoma in an HIV-negative elderly patient. *Clin. Ter.* — 2004. — V.155, №11-12. — P.543-546.

13. Gao S.-J., Kingsley L., Li M., Zheng W., Parravicini C., Ziegler J., Newton R., Rinaldo C.R., Saah A., Phair J., Detels R., Chang Y., Moore P.S. KSHV antibodies among Americans, Italians and Ugandans with and without Kaposi's sarcoma. *Nat. Med.* — 1996. — V.2, №8. — P.925-928.
14. Hollingsworth H.C., Stetler-Stevenson M., Gagneten D., Kingma D.W., Raffeld M., Jaffe E.S. Immunodeficiency-associated malignant lymphoma. Three cases showing genotypic evidence of both T- and B-cell lineages. *Am. J. Surg. Pathol.* — 1994. — V.18, №11. — P.1092-1101.
15. Horenstein M.G., Nador R.G., Chadburn A., Hyjek E.M., Inghirami G., Knowles D.M., Cesarman E. Epstein-Barr virus latent gene expression in primary effusion lymphomas containing Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus/human herpesvirus-8. *Blood.* — 1997. — V.90. — P.1186-1191.
16. Jaffe E.S., Harris N.L., Stein H. and Vardiman. J.W. Pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. World Health Organization classification of tumours, IARC Press, Lyon 2001, pp. 179-180.
17. Klepfish A., Sarid R., Shtalrid M., Shvidel L., Berrebi A., Schattner A. Primary effusion lymphoma (PEL) in HIV-negative patients--a distinct clinical entity. *Leuk. Lymphoma.* — 2001. — V.41, №3-46. — P.439-443.
18. Knowles D.M., Inghirami G., Ubriaco A., Dalla-Favera L. Molecular genetic analysis of three AIDS-associated neoplasms of uncertain lineage demonstrates their B-cell derivation and the possible pathogenetic role of the Epstein-Barr virus. *Blood.* — 1989. — V.73, №3. — P.792-799.
19. Matolcsy A., Nador R.G., Cesarman E., Knowles D.M. Immunoglobulin VH gene mutational analysis suggests that primary effusion lymphomas derive from different stages of B cell maturation. *Am. J. Pathol.* — 1998. — V.153, №5. — P. 1609-1614.
20. Moore P.S., Gao S.-J., Dominguez G., Cesarman E., Lungu O., Knowles D.M., Garber R., Pellett P.E., McGeoch D.J., Chang Y. Primary characterization of a herpesvirus agent associated with Kaposi's sarcoma. *J. Virol.* — 1996. — V.70, №1. — P.549-558.
21. Munichor M., Cohen H., Sarid R., Manov I., Iancu T.C. Human herpesvirus 8 in primary effusion lymphoma in an HIV-seronegative male. A case report. *Acta Cytol.* — 2004. — V. 48, №3. — P.425-430.
22. Nador R.G., Cesarman E., Chadburn A., Dawson D.B., Ansari M.Q., Sald J, Knowles D.M. Primary effusion lymphoma: a distinct clinicopathologic entity associated with Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Blood.* — 1996. — V.88. — P.645-656.
23. Otsuki T., Kumar S., Ensoli B. Kingma D.W., Yano T., Stetler-Stevenson M., Jaffe E.S., Raffeld M. Detection of HHV-8/KSHV DNA sequences in AIDS-associated extranodal lymphoid malignancies. *Leukemia.* — 1996. — V.10: 1358-1362.
24. Perez S.L., Rudoy S. Anti-CD20 Monoclonal Antibody Treatment of Human Herpesvirus 8-Associated, Body Cavity-Based Lymphoma with an Unusual Phenotype in a Human Immunodeficiency Virus-Negative Patient. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* — 2001. — P. 993-996.

25. *Said J.W., Tasaka T., Takeuchi S., Asou H., de Vos S., Cesarman E., Knowles D.M., Koeffler H.P.* Primary effusion lymphoma in women: report of two cases of Kaposi's sarcoma herpes virus-associated effusion-based lymphoma in human immunodeficiency virus-negative women. *Blood.* — 1996. — V. 88. — P.3124-3128.
26. *Stepina V.N., Gourtsevich V.E., Mazurenko N.P., Yarymova N.M., Kaverznyeva M.M., Lorye Y.I.* Humoral antibodies to the capsid antigen of Epstein-Barr virus in Hodgkin's disease. *Neoplasma.* — 1976. — V.23, №5. — P. 523-532.
27. *Strauchen J.A., Hauser A.D., Burstein D., Jimenez R., Moore P.S., Chang Y.* Body-cavity-based malignant lymphoma containing Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus in an HIV negative man with previous Kaposi sarcoma. *Ann. Intern. Med.* — 1996. — V.125. — P.822-825.
28. *Teruya-Feldstein J., Zauber P., Setsuda J.E., Berman E.L., Sorbara L., Raffeld M., Tosato G., Jaffe E.S.* Expression of human herpesvirus-8 oncogene and cytokine homologues in an HIV-seronegative patient with multicentric Castleman's disease and primary effusion lymphoma. *Lab. Invest.* — 1998. — V.78. — P.1637-1642.

*Л. Ю. Гривцова, Н. Н. Тупицын*

## СУБПОПУЛЯЦИИ ТРАНСПЛАНТИРУЕМЫХ СТВОЛОВЫХ КРОВЕТВОРНЫХ КЛЕТОК

ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

### Резюме

Статья посвящена анализу субпопуляционного состава трансплантируемых мобилизованных стволовых (CD34+) клеток крови.

С использованием метода проточной цитофлуориметрии в тройной флуоресцентной метке изучен иммунологический фенотип 50 образцов обогащенной мононуклеарной фракции клеток крови (лейкоконцентратов), полученных у 45 онкологических больных взрослого и детского возраста. При этом в пределах фракции только CD34+ клеток оценена экспрессия антигенов, ассоциированных со стволовой кроветворной клеткой: линейно-неограниченных молекул HLA-DR, CD38, CD71, CD45, CD117, CD10 молекул миелоидной рестрикции CD13, CD33, лимфоидных антигенов, свойственных как T-(CD7) так и B-клеткам. Особое внимание уделено Thy-1 антигену или молекуле CD90, экспрессия которой характерна для популяции наиболее ранних стволовых клеток.

В ходе выполнения данной работы показана значительная гетерогенность иммунологического фенотипа CD34+ клеток. Так, в момент стимуляции кроветворения среди CD34+ клеток крови преобладают фракции полипотентных стволовых кроветворных клеток с фенотипом CD34+HLA-DR+CD38+CD71+, а также популяции миелоидно-коммитированных предшественников, отличающихся по уровням экспрессии молекул CD13 и CD33.

Показано, что среди мобилизованных стволовых клеток крови присутствует пропорция ранних стволовых CD34+ клеток, экспрессирующих Thy-1 антиген. Фракция CD34+ CD90+ клеток неоднородна в отношении экспрессии молекул HLA-DR, CD71, CD38. Среди Thy-1+ стволовых клеток возможно присутствие субпопуляции миелоидно-коммитированных клеток-предшественников с иммунофенотипом CD34+CD90+CD33+.

Дальнейшие сопоставления иммунологического фенотипа трансплантируемых стволовых кроветворных клеток с клиническими данными позволят более детально оценить роль каждой отдельной субпопуляции при трансплантации стволовых кроветворных клеток.

**Ключевые слова:** CD34, иммунофенотипирование, гемопоэтические стволовые клетки, субпопуляции.



*L. Yu. Grivtsova, N. N. Tupitsyn*

## SUBPOPULATIONS OF HAEMATOPOIETIC STEM CELL TRANSPLANTS

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

### Abstract

Subpopulations of transplantable mobilized peripheral CD34+ blood stem cells in apheresis products (50 samples from 45 oncological patients) have been studied. The expression of the following antigens on CD34+ cells with 3 color flow cytometry was analysed: non-lineage — HLA-DR, CD38, CD71, CD45, CD117, CD10; myeloid — CD13, CD33; B- and T-cell lymphoid. Particular attention was paid to analysis of immature stem cell population — Thy-1 (CD90)+. CD34+ cells were highly heterogeneous, predominant fractions being CD34+ HLA-DR+ CD38+ CD71+ cells and myeloid-committed (CD13+ and or CD33+) cells.

Amongst mobilized peripheral stem (CD34+) cells the different proportion of early haematopoietic stem cells (CD34+) with Thy-1 (CD90) expression was usually present. This fraction was not homogeneous according to HLA-DR, CD38 and CD71 expression. In some cases expression of myeloid CD33 antigen on CD34+ Thy-1+ cells was noted. Further studies are needed to estimate clinical significance of Thy-1 (CD90)+ stem (CD34+) cell estimation in peripheral stem cell transplants.

**Key words:** CD34, immunophenotyping, hemopoietic stem cells, subpopulation, Thy-1 antigen.

### Introduction

Transplantation of hemopoietic stem cells is the principal approach to counter severe cytopenia and an important component of modern chemotherapy protocols in various cancer types, in particular haematology malignancy. The purpose of this procedure is to restore hemopoiesis affected by high-dose cytostatic therapy as soon and fully as possible.

Assessment of hemopoietic tissue transplant quality, i.e. capacity of hemopoietic cells to fully restore hemopoiesis, is a difficult problem. This capacity is determined both by amount and composition of stem cell subpopulations. Discovery of CD34 antigen helped to address this problem [1]. The CD34 molecule is a specific, early stage hemopoietic differentiation antigen. Although expression and structure of the molecule are described in detail [2], its functions and clinical potential are subject to thorough study worldwide [3].

While being morphologically homogeneous, CD34+ cells demonstrate different functional properties and proliferative activity. The cell repopulation capacity and proliferation

## Введение

Основным способом преодоления тяжелых цитопений, и неотъемлемой частью современных химиотерапевтических протоколов при различных онкологических заболеваниях, и, особенно, при гемобластозах, является трансплантация стволовых кроветворных клеток. Цель процедуры — максимально быстрое и полное восстановление кроветворения, поврежденного высокими дозами цитостатических препаратов.

Серьезной проблемой при трансплантации кроветворной ткани является вопрос оценки качества трансплантата, то есть потенциальной способности трансплантируемых кроветворных клеток полноценно восстановить кроветворение. Эти параметры зависят как от количества стволовых клеток, так и от их субпопуляционного состава.

Решению данной проблемы способствовало открытие антигена CD34 [1]. Молекула CD34 является стадийноспецифичным антигеном, определяющим клетки ранних этапов гемопоэтической дифференцировки. Спектр экспрессии данной молекулы и ее структура в настоящее время детально описаны [2], а функции антигена CD34 и возможности клинического применения стволовых клеток являются предметом детального изучения во всем мире [3].

Несмотря на морфологическую однородность, CD34+ клетки гетерогенны по функциональным свойствам и уровню пролиферативной активности. Установлено, что по мере дифференцировки клетки от истинно стволовой (обладающей широким спектром возможностей к дифференцировке и пролиферации) до унипотентной (способной к дифференцировке только по одному ростку кроветворения) репопулирующая способность и потенциал пролиферации снижаются.

В пределах пула стволовых кроветворных клеток экспрессия самого стволово-клеточного антигена CD34 варьирует в широких пределах — от яркой на истинно стволовой, полипотентной клетке до слабой на унипотентных гемопоэтических предшественниках. Однако, независимо от уровней экспрессии CD34 на мембране стволовых кроветворных клеток, именно суммарное количество трансплантируемых CD34+ клеток определяет скорость восстановления кроветворения при трансплантации гемопоэтической ткани [4].

Вместе с тем хорошо известно, что даже трансплантация адекватной дозы (более  $3 \times 10^6$ ) CD34+ клеток не всегда приводит к успешному, полноценному, трехростковому восстановлению кроветворения. Имеются данные о том, что примерно 10% случаев трансплантаций сопровождается длительными тромбоцитопениями (30 и более дней) [5; 6]. В ряде случаев после восстановления гемопоэза отмечают повторные отсроченные цитопении, приводящие к серьезным инфекционным осложнениям. Таким образом, проблема посттрансплантационных осложнений все еще существует и, возможно, решить ее поможет более детальное изучение отдельных субпопуляций составляющих пул CD34+ клеток.

Особенно важными с точки зрения полноты восстановления кроветворения после трансплантации представляются выявление и детальная характеристика фракции наиболее ранних полипотентных стволовых клеток крови. Эта минорная фракция клеток с минимальными признаками дифференцировки составляет ме-

potential are found to decrease as the cell proceeds in differentiation from the true stem (with a broad-range potential for differentiation and proliferation) to the unipotent (able to differentiate in a single hemopoietic lineage only) cell.

Expression of CD34 antigen itself varies in a broad range within the hemopoietic stem cell pool from high on true, polypotent stem cells to low on unipotent hemopoietic progenitors. However, it is the total number of CD34+ cells in the transplant rather than CD34+ expression level that determines how rapidly hemopoiesis recovers after hemopoietic tissue transplantation [4]. It is also well known, that transplantation of an adequate dose (more than  $3 \times 10^6$ ) of CD34+ cells does not always result in successful three-lineage hemopoiesis recovery. As reported, about 10% of transplantations are accompanied by delayed platelet engrafting (30 days or longer) [5; 6]. There were cases with recurrent delayed cell engrafting leading to serious infectious complications. Post-transplant complications are still a serious problem, while a more detailed subpopulation study of the CD34+ cell pool may help to solve it.

Detection and comprehensive characterization of the earliest polypotent hemopoietic stem cell fraction is the most important issue as to complete post-transplant hemopoiesis recovery. This minor fraction with minimal signs of differentiation is less than 5% of all CD34+ hemopoietic stem cells. These cells provide for sustained, long-lasting rather than rapid hemopoiesis recovery [7; 8; 9].

### **Patients, materials and methods**

This paper presents results of multi-color flow cytometry of mobilized peripheral blood stem cells and their subpopulation.

50 cell samples were obtained from aphereses collected in 45 cancer patients primed with recombinant-human granulocyte colony-stimulating factor after chemotherapy (mainly patient were leukapheresed when CD34+ cells in peripheral blood increased above 10 cells per mL)

CD34+ hemopoietic stem cell pool was studied during stem cell mobilization with growth factors (mainly neupogen) in combination with cytostatic chemotherapy.

Phycoerythrin (PE) or fluoresceinisotiocyanate (FITC) direct conjugates of monoclonal antibodies HPCA-2 IgG1 (Becton Diskinson, USA) were used to detect CD34+ stem cells.

Three-color antibody combination (PE-FITC-PerCP) were used for immunostaining and flow cytometry analysis of stem cells subpopulation. We studied expression on CD34+ peripheral blood stem cells the following antigens: CD71, CD90, HLA-DR, CD38, CD117, CD50, CD45, CD56, CD7, CD10, CD19, CD33. Isotype-matched non-reactive antibodies conjugated to FITC, PE, PerCP were used as negative controls.

Expression of antigens HLA-DR, CD38, CD45, CD33, CD13, CD71 on CD34+ hemopoietic stem cells was evaluated in all cases. CD7 and CD19 expression on CD34+ cells was assessed in 44 and 38 specimens respectively. Antigen Thy-1 (CD90) expression on CD34+ stem cells was measured in 35 specimens. Numbers of stem cells expressing common leukocytic antigen CD50 and c-kit receptor, CD117, was counted in 25 and 10 specimens respectively. Percentages of common antigen CD10+ CD34+ stem cells were measured in 16 cases.

нее 5% среди всех CD34+ стволовых кроветворных клеток. Данные клетки обеспечивают не столько быстрое, сколько устойчивое, длительное восстановление кроветворения [7–9].

### Материалы и методы

В настоящей работе приводятся результаты иммуноцитофлуориметрического исследования обогащенной фракции мобилизованных стволовых клеток периферической крови. Материал получен в ходе процедуры сепарации клеток периферической крови у 45 онкологических больных на аппаратах BAXTER CS 3000 Plus и Cobe Spectra.

Пул стволовых CD34+ кроветворных клеток изучали в процессе мобилизации стволовых клеток с помощью ростовых факторов (в основном, Нейпоген®) в сочетании с цитостатической химиотерапией.

Для выявления стволовых CD34+ клеток использованы моноклональные антитела НРСА-2, меченные фикоэритрином (PE) или флуоресцеинизотиоцианатом (FITC) Becton Dickinson (США).

При исследовании субпопуляций стволовых кроветворных клеток использованы коммерческие прямые флуорохромные конъюгаты моноклональных антител фирм Becton Dickinson (США) и Immunotech (Coulter, Франция) к следующим антигенам: CD71, CD90, HLA-DR, CD38, CD117, CD50, CD45, CD56, CD7, CD10, CD19, CD33, CD13.

В исследование включен анализ 50 образцов обогащенной мононуклеарной фракции клеток крови (лейкоконтратов), полученных у 45 онкологических больных взрослого и детского возраста. Оценка экспрессии антигенов HLA-DR, CD38, CD45, CD33, CD13, CD71, на стволовых кроветворных CD34+ клетках проведена во всех случаях. Экспрессия молекул CD7 и CD19 на CD34+ клетках оценена в 44 и 38 образцах соответственно. Оценка экспрессии антигена Thy-1 (CD90) на стволовых CD34+ клетках проведена нами в 35 образцах. Количество стволовых клеток, экспрессирующих общелейкоцитарный антиген CD50 и c-kit — рецептор, CD117, оценено в 25 и 10 образцах, соответственно. Уровни common антигена (CD10) на стволовых CD34+ клетках оценены в 16 случаях.

В исследовании нами использованы методы двойной и тройной иммунофлуоресцентной окраски клеток.

Клетки лейкоконцентрата освобождали от эритроцитов стандартным методом лизиса (FACS Lysing solution, Becton Dickinson). Окрашивали прямыми конъюгатами моноклональных антител (МКА) к антигену CD34 и к панлейкоцитарному антигену CD45 (при использовании тройной флуоресцентной метки). На втором этапе клетки докрашивали антителами к дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека, связанным в той или иной степени со стволовой кроветворной клеткой (панель указана выше).

Сбор и учет данных проводили на проточном цитометре FACScan (Becton Dickinson) с использованием программы Lysis II. При анализе данных учитывалось пять параметров: прямое светорассеяние — FSC (forward scatter), боковое светорассеяние — SSC (900 light/side scatter) и 3 канала флуоресцентного сигнала. При исследова-

Cells samples were freed from red cells by standard lysis (FACS Lysing solution, Becton Dickinson, USA) and stained with direct conjugates of monoclonal antibodies (MAb) to CD34 and to panleukocytic antigen CD45+ (using triple fluorescent labels). The cells were further stained with antibodies to human leukocyte differentiation antigens demonstrating hemopoietic stem cell binding (see above).

Data collection and processing was made using a flow cytometer FACScan (Beckton Dickinson) and a Lysis II software. Analysis of data was made with respect to five parameters: forward scatter (FSC), 90° light/side scatter (SSC) and 3 fluorescent signal channels. At least 50,000 events were accumulated in a narrow CD34+ cell gate (pic. 1) to have at least 500 CD34+ cells depending upon their percentage.

Flow cytometry findings were analyzed using a WinMDI, version 2.8, program. Statistical analysis of data included correlation analysis and comparison of mean values.

## Results

We found that hemopoietic stem cells, though homogeneous, may be characterized not only by expression of specific antigens, but also by size and granularity. Our findings confirmed that a gate for stem cell analysis can be chosen by light scatter parameters.

We demonstrated that a low SSC range (minimum number of cytoplasmatic uptakes) corresponded to the principal stem cell fraction, the cell size varying considerably (uniform distribution along FSC axis) (pic. 2). The type of the stem cells therefore corresponded to small, medium size and large lymphocytes. This finding was in agreement with previous data obtained by characterization of stem cell colony-forming units (CFU) and may be useful for further detailed characterization of individual stem cell subpopulations.

Immunophenotyping of mobilized hemopoietic stem cells in our study demonstrated HLA-DR molecule to be monomorphously expressed on CD34+ cells (84.6±2.2%). There were HLA-DR-negative stem cell populations in few cases.

HLA-DR expression was negatively correlated with that of most lineage-committed antigens on stem cells. Significant correlation with HLA-DR expression on stem cells was found only for stem cells with phenotypes CD34+CD38+ and CD34+CD13+ ( $R=0.357$ ,  $p=0.028$ ;  $R=0.40$ ,  $p=0.014$ , respectively).

Population of CD34+ cells expressing antigens CD38 and CD71 was more heterogeneous than that of CD34+HLA-DR+ cells. We found significant correlations between the number of CD71-expressing stem cells and the number of CD34+ cells expressing early lymphoid markers (CD7, CD19, CD10;  $p<0.03$ ). Further analysis discovered that transferrin receptor could be coexpressed with myeloid antigens CD13 and CD33 ( $p=0.01$ ).

High levels of CD38 expression on stem cells practically ruled out coexpression of T-cell antigen CD7 and CD13 molecule. While combinations such as CD34+CD38+CD33+ and CD34+CD38+CD71+ were quite possible ( $p=0.010$ ).

Study of myeloid antigen expression on hemopoietic stem cells discovered that existence of stem cells expressing both CD13 and CD33 at certain stages of differentiation was unlikely ( $R=0.787$ ,  $p=0.004$ ).

нии субпопуляций стволовой клетки накапливали не менее 50 000 событий в узком гейте CD34+ клеток (рис. 1) с тем, чтобы, в зависимости от процента CD34+ клеток, их общее количество было не менее 500. Уровни неспецифического связывания определялись по изотипическим контролям, меченым соответствующими флуорохромами

Данные проточной цитометрии обработаны с использованием программы WinMDI, версия 2.8. Статистическая обработка данных включала корреляционный анализ и сопоставление средних величин.

## Результаты

В ходе выполнения работы нами показано, что стволовую кроветворную клетку можно, несмотря на ее морфологическую однородность, охарактеризовать цитометрически не только на основании экспрессии специфических антигенов, но также по размеру и гранулярности. Полученные нами данные подтвердили возможность выбора области анализа (гейта), при определении стволовых клеток, на основании параметров светорассеяния.

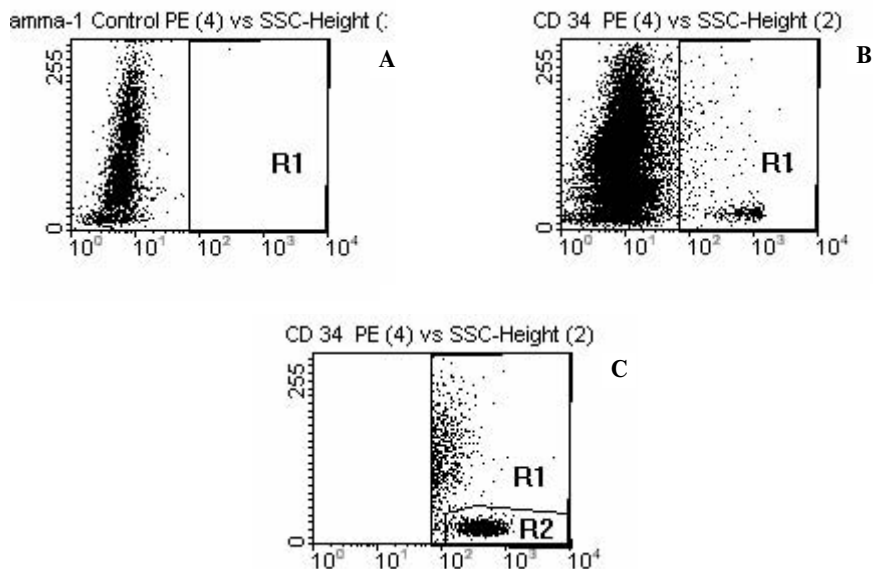
Мы показали, что (рис. 2) основной фракции стволовых клеток соответствует область низких значений SSC (количество включений в цитоплазму минимально), тогда как размер (достаточно равномерное распределение вдоль оси FSC) их значительно варьирует. Таким образом, по характеристикам светорассеяния стволовая клетка соответствует малому, среднему или крупному лимфоциту. Это подтвердили данные, полученные ранее в ходе характеристики колониеобразующих единиц (КОЕ) стволовой клетки. Сведения могут оказаться весьма существенными при дальнейшей детальной характеристике отдельных субпопуляций стволовых клеток.

Характеристика иммунологического фенотипа мобилизованных стволовых кроветворных клеток в нашем исследовании показала мономорфность экспрессии молекулы HLA-DR на CD34+ клетках ( $84,6\% \pm 2,2\%$ ). В редких ситуациях нами отмечалось присутствие популяции стволовых клеток, отрицательных в отношении экспрессии HLA-DR.

Отмечено существование отрицательных корреляций между экспрессией HLA-DR и большинством линейно-коммитированных антигенов в пределах стволовых клеток. Только для стволовых клеток с фенотипом CD34+CD38+ и CD34+CD13+ показаны достоверные значимые корреляции в отношении экспрессии на стволовой клетке молекулы HLA-DR ( $R = 0,357, p = 0,028$ ;  $R = 0,40, p = 0,014$ , соответственно).

Популяция CD34+ клеток, экспрессирующих антигены CD38 и CD71, оказалась более гетерогенной по сравнению с CD34+HLA-DR+ клетками. Нами выявлены достоверные корреляции между числом стволовых клеток экспрессирующих антиген CD71 и числом CD34+ клеток, экспрессирующих ранние лимфоидные маркеры (CD7, CD19, CD10),  $p < 0,03$ . При дальнейшем анализе установлена возможность коэкспрессии трансферринового рецептора и миелоидных антигенов CD13 и CD33 ( $p = 0,01$ ).

Высокие уровни экспрессии CD38 на стволовых клетках практически исключали возможность коэкспрессии Т-клеточного антигена CD7, а также молекулы CD13. Вместе с тем сочетания CD34+CD38+CD33+ и CD34+CD38+CD71+ были весьма вероятны ( $p = 0,010$ ).



**Рис. 1. Проточная цитометрия. Гейтинг стволовых клеток для анализа их субпопуляций:**

А — Изотипический контроль. По оси X — экспрессия IgG1PE, по оси Y — гранулярность клеток (параметр SSC).

В — Выбор гейта для сбора CD34+ клеток и анализа их субпопуляций. По оси X — уровни экспрессии CD34 антигена (PE), по оси Y — параметр SSC. Все CD34+ клетки включены в гейт R1.

С — Сбор клеточных событий осуществлен в гейте R1, включающем стволовые клетки (гейт R2). Последующий анализ субпопуляций проводится в гейте R2

**Fig. 1. Flow cytometry. Stem cell gating for subpopulation analysis:**

A — Isotypic control. On the X axis: IgG1PE expression, on the Y axis: cell granularity (parameter SSC).

B — Gate selection for CD34+ cell collection and subpopulation analysis. On the X axis: CD34 (PE) expression levels, on the Y axis: SSC values. All CD34+ cells are included in gate R1.

C — Recording of cell events was made in gate R1 that included stem cells (gate R2). Further subpopulation analysis is done in gate R2

Expression of lymphoid antigens was generally low and exceeded 5% only in few cases. While some concentrated WBC specimens from adult patients contained a considerable stem cell portion (up to 50%) with a low expression of T-cell antigen CD7. Several concentrated WBC specimens from children had considerable portions of cells with a CD34+CD19+ phenotype (up to 60%).

При изучении экспрессии миелоидных антигенов на стволовой кроветворной клетке нами выявлена низкая вероятность существования на определенных этапах дифференцировки стволовой клетки, экспрессирующей одновременно антигены CD13 и CD33 ( $R = -0,787$ ;  $p = 0,004$ ).

Экспрессия изученных лимфоидных антигенов в большинстве случаев была минимальной и редко превышала 5%. Тем не менее, в ряде изученных образцов лейкоконцентратов у взрослых пациентов нами выявлена значительная пропорция стволовых клеток (до 50%) со слабой экспрессией Т-клеточного антигена CD7. Ряд образцов лейкоконцентратов у детей имел значительные пропорции клеток с фенотипом CD34+CD19+ (до 60%).

На значительном проценте мобилизованных стволовых CD34+ клеток выявлена экспрессия c-kit-рецептора, молекулы CD117 (63,6 -93,0%).

Средний процент CD90+ CD34+ клеток в нашем исследовании составил  $18,5 \pm 3,3\%$ . Однако уровни CD90+ клеток в пределах CD34+ фракции варьировали в достаточно широких пределах (от 0,1 до 70,6 %).

В отношении характера экспрессии Thy-1+ на стволовых клетках можно сказать, что большинство CD34+ клеток в нашем исследовании экспрессируют молекулу CD90 достаточно слабо, и только в редких ситуациях это отчетливая, отдельная фракция антигенпозитивных клеток (рис. 3А, см. 3 стр. обложки). При этом только в 8 случаях из 35 исследованных содержание CD34+CD90+ клеток превысило 30,0% от общего количества стволовых кроветворных клеток. Значительная пропорция Thy-1+ стволовых клеток (более 50,0% от числа всех CD34+ клеток) выявлена только в 4 образцах.

Интересно отметить, что по характеристикам светорассеяния Thy-1+ стволовые кроветворные клетки представляли достаточно гомогенную по размерам популяцию (рис. 3 В, см. 3 стр. обложки) и имели низкие показатели SSC, так же, как и большинство CD34+ клеток. Тогда как показатель FSC (показатель, характеризующий размер клеток) для Thy-1 позитивных стволовых клеток был более низким по сравнению со всеми клетками пула CD34+.

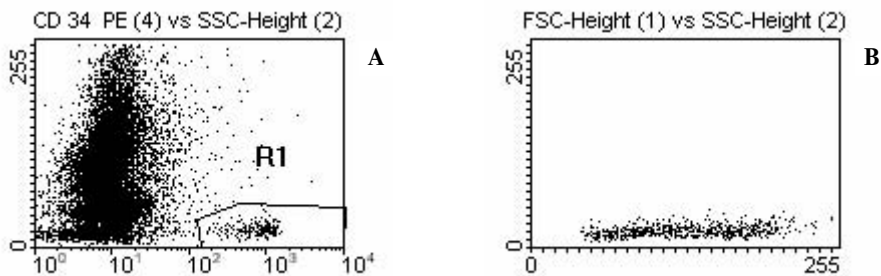
Значимых достоверных корреляций между количеством CD34+ лейкоцитов и числом Thy-1-позитивных стволовых клеток нами не выявлено ( $R = -0,027$ ;  $p = 0,878$ ).

Экспрессию Thy-1 антигена на стволовых кроветворных CD34+ клетках мы сопоставили с экспрессией других дифференцировочных антигенов лейкоцитов человека. При этом не выявлено достоверно значимых корреляций для антигенов CD38 и HLA-DR. Вместе с тем в ряде случаев мы наблюдали присутствие одновременно выраженного процента (более 50,0%) и Thy-1+ и HLA-DR+ стволовых (CD34+) клеток в кроветворной ткани. Подобная ситуация наблюдалась также в отношении молекулы CD38.

Значимых корреляций в отношении экспрессии на стволовых клетках c-kit рецептора (CD117) и Thy-1 антигена ( $p = 0,7$ ,  $n = 6$ ) нами не получено. Средние уровни CD117+CD34+ стволовых клеток составили  $82,1 \pm 4,1\%$ . В 2-х образцах из 6 сумма Thy-1+CD34+ и CD117+CD34+ клеток превышала 100%.

Факты, установленные в отношении Thy-1+ стволовых кроветворных CD34+ клеток и молекул HLA-DR, CD38, CD117, могут косвенно указывать на коэкспрессию одного из перечисленных антигенов и молекулы CD90 на уровне одной стволовой клетки.





**Рис. 2. Проточная цитометрия. Характеристика светорассеяния (FSC/SSC) стволовых CD34+ гемопоэтических клеток:**

А — Гейт CD34+ клеток (R1). По оси X — уровни экспрессии CD34 антигена, по оси Y — распределение относительно параметра SSC, гранулярности клеток.

В — Характеристика светорассеяния стволовых CD34+ клеток. На цитограмме отражены только CD34+ клетки (клетки, попавшие в гейт R1). Ось X — параметр FSC (forward scatter) — отражающий размер, чем правее расположено клеточное событие, тем больше размер данной клетки. По оси Y- параметр SSC, характеризующий характер клеточных включений: чем выше расположено клеточное событие, тем выше гранулярность и разнообразнее характер включений в цитоплазму клетки

**Pic. 2. Flow cytometry. Light scatter (FSC/SSC) characteristics of CD34+ hemopoietic stem cells:**

А — CD34+ gate (R1). On the X axis: CD34 expression levels, on the Y axis: cell distribution with respect to SSC (cell granularity).

В — Characteristic of CD34+ stem cell scatter. The cytogram shows CD34+ cells only (cells in gate R1). On the X axis: FSC (forward scatter) values reflecting cell size: the further to the right the cell event the greater the cell. On the Y axis: SCC values reflecting character of cell uptakes: the higher the cell event the higher cell granularity and more diverse cytoplasmatic uptakes.

A considerable portion of CD34+ mobilized stem cells demonstrated expression of c-kit receptor CD117 (63.6–93.0%).

Average percentage of CD90+CD34+ cells in our study was 18.5±3.3. However, levels of CD90+ cells within CD34+ fractions varied within a rather broad range (0.1 to 70.6%).

As to Thy-1 expression on stem cells, most CD34+ cells in our study expressed CD90 at a rather low level and only few cases had a distinct fraction of CD34+CD90+ cells (pic. 3 A see cover, page 3). Only in 8 of 35 cases the portion of CD34+CD90+ cells was above 30.0% of the total number of hemopoietic stem cells. A noticeable fraction of Thy-1+ stem cells (more than 50.0% of the total CD34+ cell number) was found in 4 specimens only.

Достоверно значимые корреляции установлены в отношении экспрессии Thy-1 и одного из пан-миелоидных антигенов, молекулы CD33 ( $p=0,037$ ,  $n=33$ ) на стволовых CD34+ кроветворных клетках.

Получены высокодостоверные корреляции, подтверждающие возможность одновременного присутствия в трансплантированной ткани CD34+ клеток, экспрессирующих как Thy-1 антиген, так и трансферриновый рецептор, молекулу CD71 ( $p=0,009$ ,  $n=30$ ). При использовании трехцветного флуоресцентного анализа у двух пациентов мы подтвердили факт коэкспрессии Thy-1 антигена и трансферринового рецептора на уровне одной стволовой CD34+ клетки.

### Обсуждение

В настоящей работе мы изучали пул стволовых мобилизованных клеток в 50 образцах цитоконцентратов у 45 онкологических больных методом проточной цитофлуориметрии с использованием тройной флуоресцентной метки.

В настоящее время хорошо известно, что пул CD34+ клеток включает коммитированные (лимфоидные, миелоидные, мегакариоцитарные, эритроидные), отвечающие за восстановление конкретного ростка кроветворения клетки, а также фракцию линейно не коммитированных, ранних стволовых клеток, определяющих стабильность восстановления кроветворения в течение длительного срока.

В начале изучения стволовых клеток характеристика субпопуляций являлась чисто исследовательским, поисковым аспектом. Было показано соответствие различных типов CFU и иммунологического фенотипа CD34+ клеток, изучался пролиферативный потенциал и восстанавливающая способность каждой отдельно взятой фракции. С открытием новых клеточных кластеров дифференцировки иммунофенотип стволовых клеток детализирован. Именно на основании иммунологического фенотипа CD34+ клеток продемонстрированы более детальные различия между стволовыми клетками костного мозга, периферической крови, пуповинной крови и еще раз подтверждены преимущества использования периферической крови в качестве источника стволовых клеток при трансплантации кроветворной ткани [11].

Сейчас проблема изучения субпопуляций из чисто научной переходит в разряд клинически значимых. В настоящее время накоплен достаточно большой материал, демонстрирующий влияние отдельных субпопуляций стволовых клеток на скорость восстановления того или иного ростка кроветворения. Хорошо известно, что более длительно после трансплантации восстанавливается количество тромбоцитов, именно поэтому значительное внимание во всем мире уделяется фракции CD34+CD61+, то есть мегакариоцитарным предшественникам. Целый ряд исследований продемонстрировал существование достоверных корреляций между количеством клеток указанного типа и скоростью восстановления тромбоцитов [12; 13]. Значительный интерес представляют наблюдения о связи данной популяции со скоростью восстановления нейтрофилов крови в ходе трансплантации кроветворной ткани.

В ряде исследований выявлена связь между скоростью восстановления тромбоцитов и нейтрофилов и наличием в трансплантируемом материале субпопуляций стволовой клетки, экспрессирующих L-selectin, молекулу CD44, и молекулу CD41.

Interestingly that as to light scatter characteristics the Thy-1+ stem cells made a population that was homogeneous by size and had low SSC values (a cytometry parameter reflecting cell granularity), like most CD34+ cells. While FSC values (characteristic of cell size) of Thy-1-positive stem cells were lower as compared to those for all cells from the CD34+ pool (pic. 3 B see cover, page 3).

No any correlations between percentage of CD34+ leukocytes and counts Thy-1-positive stem cells were found ( $R = -0.027$ ,  $p = 0.878$ ).

We compared Thy-1 expression with that of other human leukocyte differentiation antigens on CD34+ hemopoietic stem cells. There were no significant correlations between expressions of CD38 and HLA-DR antigens. While some specimens presented with a noticeable percent (more than 50.0%) of both Thy-1+ and HLA-DR+ stem (CD34+) cells. A similar situation was observed with the CD38 molecule.

We found no significant correlations of c-kit receptor (CD117) and Thy-1 antigen expression levels ( $p = 0.7$ ,  $n = 6$ ). Mean content of CD117+CD34+ stem cells was  $82.1 \pm 4.1\%$ . The total of Thy-1+CD34+ and CD117+CD34+ cells was above 100% in 2 of 6 specimens.

Our findings concerning expression of Thy-1 and molecules HLA-DR, CD38, CD117 on hemopoietic CD34+ stem cells may be an indirect evidence of coexpression of any of the above-mentioned antigens and CD90 in a single stem cell.

There was a significant correlation between expression levels of Thy-1 and CD33, a panmyeloid antigen, ( $p = 0.037$ ,  $n = 33$ ) on CD34+ hemopoietic stem cells.

There were highly significant correlations confirming the presence of CD34+ cells expressing both Thy-1 and transferrin receptor CD71 ( $p = 0.009$ ,  $n = 30$ ) in the transplant. Three-color fluorescent analysis confirmed coexpression of Thy-1 antigen and transferrin receptor on a single CD34+ stem cell in two patients.

## Discussion

We have studied a mobilized peripheral blood stem cell pool in 50 apheresis product from 45 cancer patients by flow cytometry using multi-colour fluorescence staining (triple fluorescent labels).

It is well known today that the CD34+ pool includes committed (lymphoid, myeloid, megakaryocytic, erythroid) cells responsible for recovery of specific hemopoietic cell lineages and a fraction of not lineage-committed, early stem cells ensuring sustained hemopoiesis recovery.

Subpopulation characterization of stem cells was purely investigational at the start. It discovered correlation between different types of CFU and cells with CD34+ immunological phenotype, assessed proliferative potential and repopulating capacity of every individual fraction. Discovery of new cell differentiation clusters resulted in a more detailed stem cell immunophenotyping. It was CD34+ immunological phenotype that served as a basis to find more detailed differences between stem cells from bone marrow, peripheral blood, umbilical cord blood and to confirm advantages of peripheral blood as a source of stem cells for hemopoietic grafting [11].

Now the subpopulation study is shifting from a purely scientific to a clinically significant area. There are a rather large amount of data to demonstrate the effect of individual stem

Важным для сокращения критической тромбоцитопении оказалось присутствие в трансплантируемой ткани клеток с фенотипом CD34+ GPIb+/GPIIb+, CD34+GlyA+, CD34+CD41a+. Подтверждена значительная роль субпопуляций стволовых клеток, экспрессирующих рецепторы Flt-3 и G-CSF для восстановления нейтрофильного и гранулоцитарного ростков кроветворения [9; 12].

С точки зрения молекул HLA-DR и CD38 наибольший интерес представляет фракция стволовых клеток, не экспрессирующих данные антигены. Популяция клеток CD34+CD38-HLA-DR-, не экспрессирующих также линейно ограниченные антигены включает наиболее ранние стволовые кроветворные клетки. Показано, что длительность тромбоцитопении находится в прямой зависимости от числа CD34+HLA-DR-CD38- клеток в трансплантируемом материале. При значительном содержании в материале трансплантации субпопуляций стволовых клеток с подобным иммунофенотипом возникает риск задержки восстановления кроветворения [9; 13; 14].

Как показали наши исследования, подобная ситуация является достаточно редкой в силу применяемых схем мобилизации (GM-CSF, G-CSF) и в большинстве образцов популяция стволовых клеток, отрицательных одновременно для HLA-DR, CD38 является минимальной. Среди трансплантируемых мобилизованных стволовых кроветворных клеток преобладает популяция стволовых клеток с фенотипом CD34+CD38+HLA-DR+. Описанный нами факт отсутствия корреляционных связей между стволовыми клетками, экспрессирующими молекулу HLA-DR, и клетками, экспрессирующими изученные дифференцировочные антигены лейкоцитов человека возможно лишь отражает факт почти гомогенной экспрессии HLA-DR в большинстве изученных случаев.

Достаточно выраженной среди трансплантируемых мобилизованных CD34+клеток оказалась пропорция миелоидно-коммитированных предшественников (CD13+, CD33+). Это обеспечило нашим пациентам значительное сокращение (нейтрофилы свыше 600 клеток в течение 10 дней, тромбоциты до 1000 клеток в течение 14 дней) сроков восстановления основных показателей крови после трансплантации и высокодозной химиотерапии.

Факт отрицательной корреляционной связи между количеством стволовых клеток, экспрессирующих панмиелоидные антигены CD33 и CD13, говорит о низкой вероятности существования на определенных этапах дифференцировки стволовой клетки, экспрессирующей одновременно антигены CD13 и CD33. Данный тезис подтверждается детальным изучением миелоидных предшественников во фракции обогащенных стволовых кроветворных клеток, свидетельствующем о существовании фракции CD34++CD13+CD33- [15].

В отношении характеристики наиболее ранних стволовых кроветворных клеток наибольший интерес представляет Thy-1 антиген или молекула CD90, поскольку отследить фракцию CD34+ негативных по экспрессии молекул HLA-DR и CD38 часто затруднительно в силу их малого количества.

Именно наличие стволовых CD34+ клеток, экспрессирующих Thy-1 антиген в материале трансплантации, связывают с длительным и устойчивым восстановлением кроветворения [16]. Стволовые гемопоэтические клетки, составляющие фракцию

cell subpopulations on the rate of recovery for individual hemopoietic lineages. As known, platelets need the longest time for post-transplant recovery that is why the CD34+CD61+ cell fraction, i.e. megakaryocyte precursors are in the focus of attention worldwide. Numerous studies confirmed significant correlations between the number of cells of a particular type and time of platelet engrafting [12; 13]. Of interest are studies of relationship between this cell population and time of post-transplant neutrophil engrafting.

Several investigators demonstrated relationship of platelet and neutrophil recovery rates with the presence of stem cell subpopulations expressing L-selectin, CD44 and CD41 molecules. The presence of CD34+ GPIIb+/GPIIIb+, CD34+GlyA+, CD34+CD41a+ cells in the transplant was found important for reduction of critical thrombopenia duration. Stem cell subpopulations expressing receptors FLt-3 and G-CSF were confirmed to play a significant role in recovery of neutrophils and granulocytes [9; 12].

As to HLA-DR and CD38 molecules, of the most interest is the stem cell fraction not expressing these antigens. The CD34+CD38 HLA-DR cell population not expressing lineage-restricted antigens includes the earliest hemopoietic stem cells [9; 13; 14]. Thrombopenia duration was found to correlate directly with the count of CD34+CD38 HLA-DR cells in the transplant. There is a risk of delay in hemopoiesis recovery after transplantation of material with a considerable content of stem cells having this immunophenotype.

As demonstrated in our study, this situation was rather unlikely with the mobilization schedules applied (GM-CSF, G-CSF) and the stem cell subpopulation free from both HLA-DR and CD38 expression being minimal in most specimens. The phenotype CD34+CD38+HLA-DR+ is predominating in mobilized hemopoietic stem cell transplants. The absence of correlation between HLA-DR+ stem cells and those expressing human leukocyte differentiation antigens as described in this paper may just reflect a next to homogeneous HLA-DR expression in most cases studied.

There was a rather large fraction of myeloid lineage-committed precursors (CD13+, CD33+) in the mobilized CD34+ cell transplants. This ensured a considerable reduction in time to recovery of principal blood parameters after transplantation and high-dose chemotherapy for our patients (neutrophils above 600 cells within 10 days, platelets up to 1000 cells within 14 days).

The negative correlation between the counts of stem cells expressing pan-myeloid antigens CD33 and CD13 suggests that the existence of a «healthy» stem cell simultaneously expressing CD13 and CD33 receptors at a certain differentiation stage is unlikely. This suggestion is confirmed by the existence of a CD34+CD13+CD33 fraction as demonstrated by a detailed study of myeloid precursors in an enriched hemopoietic stem cell fraction [15].

As to characterization of earliest hemopoietic stem cells, it is Thy-1 antigen (CD90 molecule) that is of the most interest because there are few CD34+ cells that are negative for HLA-DR and CD38 and their tracing is therefore difficult.

The presence of CD34+ stem cells expressing Thy-1 in the transplants is associated with sustained and stable hemopoiesis recovery [16]. Thy-1+ hemopoietic stem cells can maintain long-term bone marrow culture [17]. These cells are found in a so called cobble-stone area forming cell subpopulation and among cells repopulating hemopoietic organs after transplantation in SCID-hu mice [18; 19; 20].

Thy-1 позитивных клеток, способны поддерживать рост долгосрочных культур костного мозга [17]. Данные клетки выявляются в популяции, формирующей так называемую «область булыжника» (cobble-stone area forming cells), и среди клеток, репопулирующих кроветворные органы при трансплантации у SCID-hu мышей [18–20].

Популяция Thy-1+ стволовых клеток не является однородной, и сведения по иммунофенотипу этих клеток достаточно противоречивы. Фракция стволовых клеток, экспрессирующих Thy-1 антиген, очень незначительна, и, по данным различных исследований, составляет от 1 до 10% от всех CD34+ клеток периферической крови. Пропорция данных клеток в костном мозге, может быть более выраженной (от 3 до 25% среди всех CD34+ клеток) [21]. Высока пропорция данных клеток и в пуповинной крови и в зародышевой ткани [8; 13].

В нашем исследовании случаи высокого содержания Thy-1+ стволовых клеток среди мобилизованных стволовых кроветворных клеток были редкими. Факт преобладания образцов с низким содержанием Thy-1+ стволовых кроветворных (CD34+) клеток может быть объяснен, во-первых, особенностью применяемых мобилизационных протоколов. Кроме того, возможна разница во времени стимуляции общего количества стволовых CD34+клеток и фракции ранних стволовых клеток с фенотипом CD34+CD90+ [22; 23].

Данные, полученные в отношении иммунологического фенотипа Thy-1+ стволовых клеток, подтверждает их значительную гетерогенность. Отсутствие корреляций с молекулами HLA-DR и CD38, установленное нами, подтверждает возможность существования популяций CD34+HLA-DR- и CD34+CD38- в пределах фракции Thy-1+стволовых клеток, описанную ранее [13].

Несмотря на имеющиеся в литературе сведения [24; 25] об одновременной экспрессии молекул CD90 и CD117 (c-kit-рецептора) на CD34+ клетках, значимых корреляций для двух данных антигенов нами не получено. Однако количества оцененных в нашей работе образцов мало для окончательных выводов. Дальнейший набор материала позволит более точно оценить частоту встречаемости субпопуляции CD117+CD90+ среди мобилизованных стволовых кроветворных клеток и подтвердить факт коэкспрессии обеих молекул в пределах одной стволовой кроветворной клетки

В отношении субпопуляций стволовых клеток, экспрессирующих трансферриновый рецептор, молекулу CD71, вопрос остается спорным. Экспрессия данной молекулы ассоциирована в основном с ранними бипотентными эритроидными предшественниками (CFU-Ery, BOE-Ery) [26]. Это объясняет выявленный нами факт коэкспрессии в пределах CD34+ клеток молекулы CD71 и миелоидных антигенов CD13 и CD33. Фракция так называемых активно пролиферирующих, ранних стволовых клеток HPP-CFC, на которых возможна коэкспрессия и CD71 и HLA-DR [27; 28], в анализируемом нами материале не была доминирующей. Для CD71 установлено наличие достоверных корреляций с клетками, экспрессирующими лимфоидные антигены. Возможность существования общего CD34+CD71+ предшественника T- и B- клеток подтверждается и выявленной нами коэкспрессией в пределах одной стволовой клетки трансферринового рецептора и Thy-1 антигена. Однако данный вопрос нуждается в дальнейшем изучении.

The Thy-1+ stem cell population is not homogeneous, and data concerning immunophenotyping of these cells are equivocal. The Thy-1 expressing stem cell fraction is rather small (1 to 10% of all CD34+ peripheral blood cells). The portion of these cells in bone marrow may be larger and reach 3 to 25% of all CD34+ cells [21]. The umbilical cord blood and embryo tissue contain large fractions of such cells [8; 13].

In our study cases with high content of Thy-1+ cells among mobilized hemopoietic stem cells were rare. The predominance of specimens with a low content of Thy-1+ (CD34+) hemopoietic stem cells might be due to specific mobilization protocols applied. Another reason may be a difference between stimulation periods for the total CD34+ stem cell pool and the fraction of CD34+CD90+ early stem cells [22; 23].

The data concerning the Thy-1+ immunological phenotype confirm heterogeneity of this stem cell type. The absence of correlations with HLA-DR and CD38 molecules established in this study may be indicative of the existence of CD34+HLA-DR and CD34+CD38 subsets within the Thy-1+ stem cell fraction as described elsewhere [13].

In opposite to the published findings [24; 25] of coexpression of CD90 and CD117 (c-kit receptor) molecules on CD34+ cells, we failed to find any significant correlations for these two antigens. However there were too few specimens in our study to make a definite conclusion. Further accumulation of material will help to assess accurately occurrence of CD117+CD90+ subpopulations among mobilized hemopoietic stem cells and to confirm coexpression of the two molecules within a single hemopoietic stem cell.

As to stem cell subpopulations expressing transferrin receptor CD71, the problem remains to be solved. The molecule expression is mainly associated with early bipotent erythroid precursors (CFU-Ery, BOE-Ery) [26]. This accounts for coexpression of CD71 and myeloid antigens CD13 and CD33 on CD34+ cells. The fraction of actively proliferating early stem cells HPP-CFC on which coexpression of CD71 and HLA-DR may be found [27; 28] was not predominating in our material. CD71 was found to correlate significantly with lymphoid antigen-expressing cells. The coexpression of transferrin receptor and Thy-1 antigen within a single stem cell found in our study may confirm the existence of a common CD34+CD71+ precursor for T- and B-cells. However, this problem should be a matter of further study.

Of interest is the significant relationship between expressions of Thy-1 and panmyeloid antigen CD33 on mobilized CD34+ stem cells. There are reports of CD33 expression at early cell differentiation stages, in particular of CD33 expression on cells of a CD34+CD38 lin human fetal hepatocyte fraction [29]. CD13 was demonstrated to appear on CD34+ stem cells (bone marrow and umbilical cord blood) earlier than CD33 antigen [15]. It seems most likely that the relationship between contents of Thy-1+ and CD33+ in mobilized CD34+ cells reflects the presence of Thy-1+CD34+ myeloid lineage-committed precursors.

## Conclusion

This study involving subpopulation characterization in transplanting mobilized hemopoietic peripheral blood stem cell demonstrated a considerable heterogeneity immunological phenotype of CD34+ cells.

Fractions of polypotent hemopoietic stem cells of a CD34+HLA-DR+CD38+CD71+ phenotype and populations of myeloid lineage-committed precursors with different lev-

Вероятно, заслуживает внимания установленная нами достоверная взаимосвязь экспрессии молекулы Thy-1 и панмиелоидного антигена и CD33 на мобилизованных стволовых CD34+кроветворных клетках. Имеются данные об экспрессии антигена CD33 на ранних этапах клеточной дифференцировки, в частности об экспрессии CD33 на фракции CD34+CD38-lin- клеток фетальной печени человека [29]. С другой стороны на CD34+ стволовых кроветворных клетках (костный мозг и пуповинная кровь) продемонстрировано более раннее появление CD13 на мембране стволовой клетки по сравнению с CD33 антигеном [15]. Скорее всего, в случае мобилизованных CD34+ клеток крови, корреляции между содержанием Thy-1+ и CD33+ клеток отражают возможность присутствия в популяции Thy-1+CD34+ миелоидно-коммитированных предшественников.

### Заключение

В ходе выполнения данной работы по характеристике субпопуляций трансплантируемых мобилизованных стволовых клеток крови нами показана значительная гетерогенность иммунологического фенотипа CD34+ клеток.

В момент стимуляции кроветворения преобладают фракции полипотентных стволовых кроветворных клеток с фенотипом CD34+HLA-DR+CD38+CD71+, а также популяции миелоидно-коммитированных предшественников, отличающихся по уровням экспрессии молекул CD13 и CD33.

Среди мобилизованных стволовых клеток крови присутствует пропорция ранних стволовых CD34+ клеток, экспрессирующих Thy-1 антиген.

Фракция CD34+ CD90+ клеток является гетерогенной в отношении экспрессии антигенов HLA-DR, CD71, CD38. Среди Thy-1+ стволовых клеток возможно присутствие субпопуляции миелоидно-коммитированных клеток-предшественников.

Дальнейшие сопоставления иммунологического фенотипа трансплантируемых стволовых кроветворных клеток с клиническими данными позволят оценить роль каждой отдельной субпопуляции при трансплантации стволовых кроветворных клеток.

### References

1. *Civin C.I., Strauss L.C., Brovall C., Facler M.J., Schwartz J.F., Shafer J.H.* Antigenic analysis of hematopoiesis III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. *J Immunol.* — 1984. — V.133. — P.157-64.
2. *Sutherland D.R., Keating A.* The CD34 antigen: structure, biology and potential clinical applications. *J Hematotherapy* — 1992. — V.1. — P. 115-129.
3. *Spangrude G.J.* Biological and clinical aspects of hematopoietic stem cells. *Ann. Rev. Med.* — 1994. — V. 45. — P.93-104.
4. *Siena S., Bregni M., Brando B. et al.* Circulation of CD34+ hematopoietic stem cells in the peripheral blood of high-dose cyclophosphamide-treated patients: enhancement by intravenous recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood.* — 1989. — V. 74. — P.1905-1914.



els of CD13 and CD33 molecule expression were predominating at the hemopoiesis stimulation phase.

There was a portion of early CD34+ stem cells expressing Thy-1 antigen among the mobilized hemopoietic stem cells.

The CD34+CD90+ fraction was heterogeneous as to expression of HLA-DR, CD71, CD38 antigens. A subpopulation of myeloid lineage-committed precursors may be present among Thy-1+ stem cells.

Further comparison of immunological phenotypes of transplanted hemopoietic stem cells with clinical findings will help to assess the role of every individual subpopulation in hemopoietic stem cell grafting.

---

5. *Dercksen M.W., Rodenhuis S., Dirkson M.K.* et al. Subset of CD34+ cells and rapid hematopoietic recovery after peripheral blood stem cell transplantation. *J. Clin. Oncol.* — 1995. — V.13. — P.1922-1932.

6. *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 Transpl.* — 2002. — V.29. — P.967-972.

7. *Udomsakdi C., Lansdorp P.M., Hogge D.E., Reid D.S., Eaves A.C., Eaves C.J.* Characterization of primitive hematopoietic cells in normal human peripheral blood. *Blood.* — 1992. — V.80, №10. — P.2513-2521.

8. *Lanza F., Campioni A., Moretti S., Dominici M., Punturieri M.* et al. CD34(+) cell subset and long-term culture colony-forming cells evaluated on both autologous and normal bone marrow stroma predict long-term hematopoietic engraftment in patients undergoing autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Exp. Haematol.* — 2001. — V. 29, №12. — P.484-493.

9. *Mayani H., Lansdorp P.M.* Thy-1 expression is linked to functional properties of primitive hematopoietic progenitor cells from human umbilical cord blood. *Blood.* — 1994. — V.83, №9ю — P. 2410-17.

10. *Van Epps D.E., Bender J., Lee W., Schilling M.* et al. Harvesting, characterization and culture of CD34+ cells from human bone marrow, peripheral blood, and cord blood. *Blood Cells.* — 1994. — V. 20, №2-3. — P.411-23.

11. *Knudsen L.M., Jensen L., Jarlbaek L.* et al. Subsets of CD34+ hematopoietic progenitors and platelet recovery after high dose chemotherapy and peripheral blood stem cell transplantation. *Haematologica.* — 1999. — V. 84. — P. 517-24.

12. *Olweus J., Terstappen L.W., Thompson P.A.* et al. Expression and function receptors for stem cell factor and erythropoietin during lineage commitment of human hematopoietic progenitor cells. *Blood.* — 1996. — V.88. — P.1594-1607.

13. *Terstappen L.W.M.M., Huang S., Safford M., Lansdorp P.M., Loken M.R.* Sequential generation of hematopoietic colonies derived from single non- lineage-committed CD34+CD38- progenitor cells. *Blood.* — 1991. — V.77. — P.1218-1276.

14. *Srouf E.F., Brandt J.E., Briddell R.A.* et al. Human CD34+HLA-DR- bone

marrow cells content progenitor cells capable of self-renewal, multilineage differentiation and long-term in vitro hematopoiesis. *Blood Cells*. — 1991. — V.17. — P. 287-295.

15. *Gaipa G., Coustan-Smith E., Todisco E., Maglia O., Biondi A., Campana D.* Characterization of CD34+, CD13+CD33- cells, a rare subset of immature human hematopoietic cells. *Haematologica*. — 2002. — V. 87. — P.347-56.

16. *Shimazaki C., Sumikuta T., Inaba T.* CD34+CD90+ cells and late hematopoietic reconstitution after autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Leuk. Lymphoma*. — 2004. — V.45№4. — P.661-668.

17. *Petzer A.L., Hogge D.E., Lansdorp P.M.* et al. Self-renewal of primitive human hematopoietic cells (long-term-culture-initiating cells) in vitro and their expansion in defined medium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 1996. — V.93, №4. — P.1470-1474.

18. *Chen B.P., Galy A., Kyoizumi S., Namikawa R., Scarborough J., Webb S., Ford B., Cen D-Z., Chen S.C.* Engraftment of human hematopoietic precursor cells with secondary transfer potential in SCID-hu mice. *Blood*. — 1994. — V.84, №2. — P. 2497-2505.

19. *Shin C.C., Hu MC-T., Hu J., Medeiros J., Forman S.J.* Long-term ex vivo maintenance and expansion of transplantable human hematopoietic stem cells. *Blood*. — 1999. — V.94, №5. — P.1623-1636.

20. *Graig W., Kay R., Cutler R.L., Lansdorp P.M.* Expression of Thy-1 on human hematopoietic progenitor cells. *J. Exp. Med*. — 1993. — V.177. — P.1331-42.

21. *Lansdorp P.M.* CDw90 cluster workshop report. Schlossman SF, et al. eds. *Leukocyte Typing V*. — Oxford University Press, 1995. — P. 976-978.

22. *Humeau L., Bardin F., Maroc Ch.* et al. Phenotypic, molecular and functional characterization of human peripheral blood CD34+/Thy-1+ cells. *Blood*. — 1996. — V.87, № 3. — P. 949-955.

23. *Stewart A.K., Imrie K., Kreating A., Anania S.* et al. Optimizing the CD34+ and Thy-1+ stem cells content of peripheral blood collections. *Exp. Haematol*. — 1995. — V.23, №14. — 1619-1627.

24. *D'Areola G., Musto P., Cascavilla N., Carotenuto M.* Thy-1(CDw90) and c-kit receptor (CD117) expression on CD34+ hematopoietic progenitor cell: a five dimensional flow cytometric study. *Haematologica*. — 1998. — V. 83. — P. 587-592.

25. *Murrey L.J., Tsukamoto A., Hoffman R.* CD34+Thy-1+Lin- stem cells from mobilized peripheral blood. *Leuk. Lymphoma*. — 1996. — V.22. — P.37-42.

26. *Olweus J.* Early events in human myelopoiesis. *Arch Pathol Microbiol Soc* 1998; 78: 1-7.

27. *Verfaillie C., Blakolmer K., Philip M., Mc Glave P.* Purified primitive human hematopoietic progenitor cells with long-term in vitro repopulating capacity adhere selectively to irradiated bone marrow stroma. *J. Exp. Med*. — 1990. — V.172.- P.509-511.

28. *Lansdorp P.M., Dragowska W.* Maintenance of hematopoiesis in serum-free bone marrow cultures involves sequential recruitment of quiescent progenitors. *Exp. Hematol*. — 1993. -V.21, №10. — P.1321-1327.

29. *Muench M.O., Cupp J., Poliakoff J., Roncarolo M.* Expression of CD33, CD38 and HLA-DR on CD34+ human fetal liver progenitors with a high proliferative potential. *Blood*. — 1994. — V.83, №11. — P.3170-3181.

УДК: 616-097:612.419.014:616-006-089.843

*I. Dolgoplov*

## **GRAFT-VERSUS-HOST AND GRAFT-VERSUS-TUMOR EFFECTS AFTER ALLOGENEIC STEM CELL TRANSPLANTATION IN CANCER**

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

### **Abstract**

Acute graft-vs-host disease (GVHD) is a major obstacle to safe allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT), leading to a significant morbidity and mortality. GVHD occurs when transplanted donor T lymphocytes react to foreign host cells. It causes a wide variety of host tissue injuries. Recognition of the foreign host antigens by donor T cells and activation, stimulation, and proliferation of T cells is crucial in GVHD.

It is now clear that the graft-versus-tumor (GVT) effect which accompanies allogeneic bone marrow transplantation for hematological malignancies and solid tumors is a powerful therapeutic weapon which could improve our ability to treat refractory malignant disorders. The role of the use of the reduced intensity conditionings and graft from mismatched donor has to be defined in numerous experimental and clinical works. NK cell alloreactivity basing on KIR epitope-mismatching in the GVH direction may confer unique potential for GVL effect and for engraftment.

Future experimental and clinical studies on GVHD will shed further light on the better understanding of the disease pathobiology and generate the tools to treat malignant disorders with allogeneic HSCT with specific GVT effect devoid of GVHD.

### **Graft-versus-Host disease**

Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) can cure a variety of malignant and nonmalignant disorders [1; 2]. Graft-vs-host disease (GVHD) is a major cause of morbidity and mortality even when siblings are matched at the human leukocyte antigen (HLA) locus [3–5]. GVHD occurs when transplanted donor-derived T cells recognize and react to histoincompatible recipient antigens and cells. Three factors are required for the occurrence of graft-vs-host (GVH) reaction as outlined by Billingham, in his historical Harvey lecture in 1966 [6]. The first requirement for GVH reaction is that the graft must contain a sufficient number of immunologically competent cells. The second requirement is that the host should have important transplantation isoantigens lacking in the graft. The third is that the host immune system must be incapable of mounting an effective immune response against the graft.

### **Genetic basis of acute GVHD**

Major histocompatibility antigens encoded by the major histocompatibility complex (MHC) genetic loci have a major impact on transplantation and on the biological progress of GVHD [3]. Particularly class I and class II HLA are cell surface molecules controlling T-cell recognition and histocompatibility [3; 7]. HLA class I antigens (HLA-A, HLA-B, and HLA-C) have a wide distribution and are found on all nucleated cells [3]. HLA class II antigens (DR, DQ, and DP) are found more selectively on the cells of the immune response system [3]. CD4 + T cells recognize foreign antigens via the presentation of class II HLA molecules. Minor histocompatibility antigens (miH) are peptides derived from intracellular proteins presented by MHC molecules to donor T cells [8]. miH are critical in matched-sibling allogeneic bone marrow graft.

### **Pathophysiology of acute GVHD**

Distinct clinical forms of GVHD including acute and chronic GVHD are, in large part, a consequence of damage to host tissues by activated donor-derived T lymphocytes in response to the MHC disparities. A three-phase model elucidates the three major processes that lead to GVHD. The first phase involves tissue damage secondary to the conditioning regimen, while the second phase consists of donor T-cell activation, stimulation, and proliferation. Activated cells from damaged recipient tissues secrete many inflammatory cytokines, such as interleukin-1 (IL-1), tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha), granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), and interferon-gamma (IFN-gamma) [9]. Those two phases make the afferent phase of GVHD. Recognition of the foreign host antigens by donor T cells and activation, stimulation, and proliferation of T cells is crucial in the afferent phase 2 of acute GVHD. Host APCs are particularly essential at the second phase of the GVH reaction. Finally, the effector phase comprises the third phase of GVHD pathophysiology [9]. A variety of complex mechanisms are involved in this phase of GVHD, which is responsible for end-organ dysfunction and tissue damage.

### **Clinical aspects of acute GVHD**

GVHD is clinically divided as acute and chronic GVHD based on the time of onset, distinct pathobiological pathways, and different clinical presentations. Historically, GVHD occurring within the first 100 days following allogeneic HLA matched familial BMT following chemoradiotherapy preparative regimen and methotrexate&cyclosporine A prophylaxis is called acute GVHD. Acute GVHD is a clinicopathological syndrome involving mostly three organ systems the skin, the gastrointestinal tract, and the liver. Any one organ or combination of these organs may be affected. Clinically significant acute GVHD, defined as grade II–IV, occurs in 9–50% of patients who receive an allogeneic HLA-matched BMT. The incidence of acute GVHD varies with the degree of histoincompatibility, recipient age, the source and number of infused donor T lymphocytes, GVHD prophylaxis strategy, and to a lesser degree with other factors [3; 10]. The incidence of clinically significant GVHD may be greater than 70% in unrelated HLA-matched allogeneic BMT, and even as high as 80–90% in HLA-haploidentical (MHC-mismatched) transplantation [11; 12]. In related HLA-nonidentical allogeneic BMT, the risk of grade II–IV

GVHD are 75%, 78%, and 80% for one-, two-, or three-HLA locus mismatches, respectively [13].

### **Clinical presentations of acute GVHD**

#### *Skin*

The first and the most common clinical manifestation of acute GVHD is often a pruritic maculopapular skin rash. The rash usually occurs at or near the time of white blood cell engraftment. In the early stages of acute cutaneous GVHD, involvement of the nape of the neck, ears, and the shoulders, as well as the palms of the hands and the soles of the feet, can be seen and may look like a «sunburn. In severe GVHD, the skin lesions may progress to generalized erythroderma, bullae formation, or desquamation and may even evolve to epidermal necrolysis. The progression of skin GVHD can be clinically defined into four stages depending on the extent of involvement of the skin [3] (see tabl. 2).

#### *Liver*

The liver is the second most commonly affected organ in acute GVHD [14; 15]. The earliest manifestation of liver GVHD is jaundice with onjugated hyperbilirubinemia and an elevated alkaline phosphatase concentration. This is a reflection of damage to the bile canaliculi leading to cholestasis. Cholestatic jaundice is a common feature, but hepatic failure with encephalopathy is unusual unless the GVHD is long-standing.

#### *Gastrointestinal tract*

Gut GVHD is frequently the most severe and difficult to treat. Diarrhea and abdominal cramping are generally the hallmarks of gut involvement. Clinical manifestations include nausea, vomiting, crampy abdominal pain, distention, paralytic ileus, intestinal bleeding, and voluminous, often bloody, diarrhea [14; 15]. Voluminous secretory diarrhea may persist even with cessation of oral intake, and can be in excess of 10 liters per day. Since the symptoms are nonspecific, endoscopic biopsy confirmation is often needed.

#### *Hematolymphoid organs*

GVHD can also involve the hematolymphoid organs as described in early animal studies on GVHD. In lymph nodes, there is diminution of germinal centers lasting for many months after BMT. Abnormal CD4/CD8 ratios can be found in both the circulating blood and lymph nodes [16]. This compromised immune state may lead to frequent and serious infectious complications. GVHD may also affect hematopoiesis, and it may cause a reduction in peripheral blood counts, particularly thrombocytes.

#### *Grading and staging of acute GVHD*

The stage of each organ involved is combined for the clinical staging and grading of acute GVHD. The overall clinical grade of acute GVHD has a major impact on survival after BMT and is used to assess response to the prophylaxis or treatment. GVHD is graded from I to IV according to severity (tabl. 1 and 2).

### **Prophylaxis of acute GVHD**

GVHD prophylaxis is essential in all patients undergoing allogeneic BMT with the present approaches [3]. Different combinations of methotrexate, cyclosporine (CsA), FK 506,

Table 1.

**Acute GvHD staging**

Organ	Stage 1	Stage 2	Stage 3	Stage 4
Skin	rash over <25% of body area	Rash > 25% of body area	Generalized erythroderma	Generalized erythroderma with bullous formation
Liver	Bilirubin 2-3 mg/dl	Bilirubin 3.1-6 mg/dl	Bilirubine 6.1-15 mg/dl	Bilirubin >15 mg/dl
Gut	Diarrhea >500 ml/d	Diarrhea >1000 ml/d	Diarrhea >1500 ml/d	Diarrhea >2000 ml/d or severe abdominal pain with or without ileus

Table 2.

**Acute GvHD grading**

Overall grade	Skin	Liver		Gut	ECOG performance
I (very limited)	+1 to +2	0	And/or	0	0
II (moderate severe)	+1 to +3	+1	And/or	+1	0-1
III (Severe)	+2 to +3	+2 to +4	And/or	+2 to +3	2-3
IV (life-threatening)	+2 to +4	+2 to +4	And/or	+2 to +4	3-4

and glucocorticoids have been widely used to prevent acute GVHD. GVHD pharmacologic prophylaxis is commonly administered in the immediate posttransplant period, gradually tapering off after 100 days and stopping around day 180 [3]. Immunosuppression with pharmacologic agents such as CsA, MTX, and corticosteroids are more effective when used in combination than as single agents [17; 18].

*Marrow T-cell depletion for GVHD prevention*

One attractive method to prevent GVHD is to eliminate donor T lymphocytes. T-cell depletion (TCD) or CD34+ cell selection is an effective technique in preventing acute GVHD. TCD reduces the incidence of GVHD but has potential adverse effects. TCD adversely affects engraftment due to graft rejection by residual recipient T cells that survived the conditioning regimen. TCD also increases leukemic relapse, infections, and secondary malignancies. Most of the systems available for isolation of CD34+ cells are based on incubation with monoclonal antibodies against the CD34 antigen and subsequent binding of the target cells to columns or magnetic beads. Four selection techniques including immunoaffinity columns (Ceptrate LC), immunomagnetic beads (Dynabeads, Baxter Isolex 50) and submicroscopic magnetic beads (MACS) were used to select CD34+ or other cells. The mean purity of CD34+ cells ranges from 40-80%. Low dose of T-cells in graft (< 105 CD3+ cells) makes unnecessary the use of pharmacological GvHD prophylaxis.

**Chronic Graft-versus-Host disease**

Chronic graft-versus-host disease (GVHD) occurs in approximately 60-80% of long-term survivors of allogeneic hematopoietic cell transplant (HCT) [19, 20]. This immunologic complication is a major cause of morbidity and mortality accounting for

about one-quarter of deaths in long-term survivors of transplants performed for leukemia. Chronic GVHD, as initially defined, resembled an autoimmune disorder occurring 100 days after allogeneic transplantation. The classification for severity of chronic GVHD is depicted in tabl. 3.

Table 3.

### Classification for severity of chronic GvHD

<b>Limited chronic GVHD</b>
Either or both
1. Localized skin involvement.
2. Hepatic dysfunction due to chronic GVHD.
<b>Extensive chronic GVHD</b>
1. Generalized skin involvement, or
2. Localized skin involvement and/or hepatic dysfunction due to chronic GVHD, Plus
3a. Liver histology showing chronic aggressive Hepatitis, bridging necrosis, or cirrhosis, or
b. Involvement of eye (Schirmer's test with less than 5mm wetting), or
c. Involvement of minor salivary glands or oral Mucosa demonstrated of labial biopsy, or
d. Involvement of any other target organ.

### Immunology and pathology of chronic GVHD

Donor T cells play a central role in the immunologic attack on host tissues in both acute and chronic GVHD. While the cytokine production pattern of acute GVHD is mostly TH1 type, TH2 cytokines predominate in chronic GVHD [21]. Furthermore, the elevation of TH2 cytokines is consistent with the clinical manifestations of chronic GVHD in both man and animal models (eg associations of elevated IL-5 with eosinophilia, IL-4 with gammopathy and possibly scleroderma) [22]. Most patients with chronic GVHD have evidence of B cell dysregulation with a high prevalence of autoantibodies to several cell surface and intracellular antigens, although the role of these autoantibodies in the pathogenesis of chronic GVHD is unclear. [23; 24].

### Clinical manifestations

#### *Oral mucosal involvement*

The oral mucosa is most frequently involved by chronic GVHD. The clinical findings range from erythema, leukoplakia, lichenoid lesions, ulcers, mucosal atrophy, cicatricial changes and xerostomia. Involvement of major salivary glands invariably leads to severe xerostomia, rampant caries, periodontal disease, and occasionally sialadenitis [25].

#### *Skin and soft tissues*

There are two main forms of cutaneous chronic GVHD, namely, lichenoid and sclerodermatous types. Early in the therapy; cyclosporine; tacrolimus; extracorporeal photochemotherapy; allogeneic stem cell transplantation likely to rise due to the increasing availability and use of unrelated donors as well as the inclusion of older recipients of non-meloablative ('reduced conditioning') regimens.

*Xerophthalmia*

Ocular involvement occurs in approximately 60% of patients with chronic GVHD. The most frequent ocular manifestations include keratoconjunctivitis sicca, cicatricial lagophthalmos, and sterile conjunctivitis and uveitis. Xerophthalmia must be recognized early in order to avoid serious complications such as corneal epithelial defects and ulceration.

*Liver*

Cholestasis predominates the clinical picture of chronic liver GVHD. However, isolated liver involvement by chronic GVHD, without the clinical signs and symptoms of other organ involvement, is uncommon. Hepatic failure resulting from progression of chronic GVHD is uncommon in long-term survivors. When hepatic failure occurs, the most frequent etiology is hepatitis C infection [26].

*GI tract*

Esophageal involvement in chronic GVHD results in dysphagia and retrosternal pain from mucosal desquamation with fibrosis, esophageal webs, distal peptic esophagitis, and stricture [27].

*Obstructive lung disease*

Interstitial lung disease encompasses a broad range of etiologies, from regimen-related toxicity to infection and possibly to immunologic injury related to GVHD. The occurrence of obliterative bronchiolitis, however, is limited to patients who develop chronic GVHD. Symptoms such as cough may begin 3 to 20 months after transplantation and then progress to dyspnea, progressive airflow obstruction, and finally respiratory failure [28; 29]. Patients with obstructive lung disease due to chronic GVHD infrequently respond to therapy, although some patients may survive long term.

**Neuromuscular and CNS involvement**

Neuromuscular involvement in chronic GVHD is uncommon, sensory and motor neuropathy, myositis, dermatomyositis and myasthenia gravis have been reported to be associated with chronic GVHD.

*Immunodeficiency*

The most important complication associated with chronic GVHD is immunodeficiency, leading to susceptibility to wide ranges of opportunistic infections and frequently to death. Antimicrobial prophylaxis against *Pneumocystis carinii*, cytomegalovirus (CMV), and pneumococcus is crucial in the prevention of potentially fatal infections. Late onset CMV infection also occurs preferentially in patients with chronic GVHD, especially in the setting of corticosteroid usage.

**Graft-versus-tumor effect**

The term graft-versus-tumor (GVT) is used here to describe the immune-mediated response which conserves a state of continued remission of a hematological malignancy following allogeneic marrow stem cell transplants. Indirect evidence supports the existence of this important "graft-versus-tumor" (GVT) reaction associated with allogeneic marrow grafting, including the following observations: (1) abrupt withdrawal of immuno-



suppression or a flare of acute graft-versus-host disease (GVHD) can re-establish complete remission in some patients with relapsed leukemia, (2) the risk of leukemic relapse is higher for recipients of syngeneic marrow grafts compared with recipients of allogeneic grafts, (3) GVHD after allogeneic transplantation may be protective against relapse; and (4) T-cell depletion of an allogeneic donor graft results in an increased relapse rate, especially for patients with chronic myelogenous leukemia (CML) [30-33]. Recently, evidence has accumulated confirming that donor leukocyte products can induce a direct GVT reaction; for patients who relapse with CML after allogeneic bone marrow transplantation (BMT), the infusion of unmodified donor leukocytes will induce complete remissions in 60% to 80% of patients [34]. Similar therapy results in complete remissions for the majority of patients treated for posttransplantation B-cell lymphoproliferative disorders [35].

The mechanisms of GVT involved in the effect are not completely known. However, because graft-versus-host disease (GVHD) is intimately associated with GVT, it can be assumed that similar mechanisms control GVHD and GVT. In GVT reactions, the alloresponse suppresses residual leukemia, lymphoma or solid tumor cells. The dominant antigens on tumor cells driving the GVT response are not known: major or minor histocompatibility antigens coexpressed on GVHD targets and tumor cells could induce a nonspecific GVT alloresponse [36]. The response against either normal or malignant bone marrow-derived cells may also overlap. Additionally, leukemia cells could induce a more specific alloresponse if they express antigens, either not present or underexpressed in cells of other tissues. Clearly a GVT effect is more likely to result in tumor eradication, if the immune attack is directed against the earlier cells in the hierarchy. However, a situation could be imagined where immune regulation does not damage dormant tumor progenitors but prevents large-scale production of blast cells.

### **T Cells and GVT**

The relative contribution of the CD4+ and CD8+ T cell subsets to GVL reactivity has been investigated extensively both in animal models and in man and we can conclude that in general both CD4+ and CD8+ T cell subsets contribute to GVL reactions. However, the dominant mechanism is strain specific and varies with the degree of donor-recipient histocompatibility. After BMT there is an increase of CD4+ precursors recognizing leukemia demonstrated by helper T lymphocyte precursor frequency assays [37]. Depletion of CD4+ cells from the responding population significantly reduced the cytotoxic T lymphocyte precursor frequency against the recipient's leukemia cells whereas CD8+ depletion had only a modest effect [38]. Clinical trials with CD8-depleted marrow transplants or CD8-depleted peripheral blood leukocytes to treat relapsed leukemia after BMT lend support to the possibility that the residual GVL effect is mediated by CD4+ cells. It is possible that the separation of GVL and GVHD observed may simply be the result of transplanting low but nevertheless sufficient residual doses of immunocompetent cells, since similar results have been obtained using unmanipulated T cells.

### **Natural Killer (NK) Cells and GVT**

Autologous antileukemic effects of NK cells in animals and man have been recognized for at least a decade [39]. Alloresponding NK cells recognize differences in the target's MHC

class I and class II molecules. In man, low NK function and delayed recovery after BMT for myeloid leukemias correlated with subsequent relapse of leukemia suggesting that NK function played a part in the GVL effect [40]. Inhibition of natural killer (NK) cell lysis is signaled through specific receptors which bind to polymorphic determinants of major histocompatibility complex (MHC) class I molecules. In humans, one receptor is the lectin-like heterodimer CD94-NKG2A, which recognizes human leukocyte antigen (HLA)-E, a non-classical MHC class Ib molecule whose expression is, in turn, upregulated by the binding of signal sequence peptides of other MHC class I molecules. Other receptors are a family of Ig-like molecules known as killer cell inhibitory receptors (KIR).<sup>5</sup> The KIRs with two Ig domains (KIR2D) identify HLA-C allotypes: KIR2DL2 (formerly designated p58.1) recognizes an epitope shared by group 1 HLA-C allotypes (Cw2, 4, 5, and 6), whereas KIR2DL1 (p58.2) recognizes an epitope shared by the reciprocal group 2 HLA-C allotypes (Cw1, 3, 7, and 8). One KIR with three Ig domains KIR3DL1 (p70) recognizes an epitope shared by HLA-Bw4 alleles. Finally, a homodimer of molecules with three Ig domains KIR3DL2 (p140) recognizes HLA-A3 and -A11 [41]. Consequently, the NK cells from any given individual will be alloreactive toward cells from others which lack their KIR ligands and, conversely, will be tolerant of cells from another individual who has the same or additional KIR ligands. Full haplotype-mismatched hematopoietic stem cell transplants have recently been used for treatment of bad-risk leukemia patients lacking a matched donor [42].

Since it first became accepted in the 1980s that GVT was a clinical as well as an experimental reality, much progress has been made in understanding and characterizing the GVT reaction. While the separation of GVT from GVHD is theoretically predicted and has, in limited circumstances, been achieved clinically, our inability to identify antigens driving tumor-specific alloresponses remains the biggest single obstacle to improving the strength and specificity of GVT in clinical practice. However, progress in this field is gaining momentum and we can expect that the next century will see major advances in manipulation of the alloimmune response to the benefit of patients with a variety of malignant disorders.

#### **Haploidentical stem cell transplantation and induction of «graft-versus-tumor» effect.**

From 2001 to 2005 26 transplantations from haploidentical relatives were performed in 23 poor-prognosis pts with hematological malignancies and solid tumors. The median age was 11 (0.9-18) years. Diagnoses were: AML-4 patients (CR2-2, secondary AML-1, CR1-1), CML-4 (CP -3, blast crisis -1), NHL-3 (PR2-1, CR2-1, DP-1), JMML-4 (blast crisis-3, CR-1), ALL-1 (CR2-1), neuroblastoma stage IV -5 (DP-1, PR 1-3, PR 2-1), Ewing's sarcoma metastatic relapse — 1 (DP-1), and melanoma stage IV — 1. One pt with CML had relapsed 7 mo after PBSCT from mother and was grafted 16 mo later from father. Two patients with JMML rejected grafts 1 and 2 mo after transplantations, respectively. One of them was regrafted with bone marrow from the same donor, experienced fast engraftment and achieved mixed chimerism, which has turned to the complete chimerism after cyclosporine A stop. An other one received second transplantation from other donor (father) and died in early posttransplant period from severe VOD.

For the first transplantation 13 pts received 3 antigen, 8 pts 2 antigen and 2 pts 1 antigen mismatched grafts. For the second one all three donors were 3/6 HLA matched. Mothers as donors

were chosen in 19 cases. RIC regimens included fludarabine 180 mg/m<sup>2</sup>, horse ATG 40 mg/kg and busulfan 8 mg/kg (n=19) or treosulfan 22500-30000 mg/m<sup>2</sup> (n=7). The PBSC with a median number of  $6.3 (2.0-12.4) \times 10^6$  CD34+ cell/kg with  $4.6 (2.2-8.6) \times 10^8$  CD3+/kg were infused after incubation in vitro with vincristine and methylprednisolone to obtain a functional T-cell depletion. Cyclosporine A and short methotrexate were used as a GvHD prophylaxis.

WBC and PLT levels  $>1.0 \times 10^9/l$  and  $>20 \times 10^9/l$  were reached on day+12 (9-18) and +11 (0-22), respectively.

In 25 cases patients were available for analysis of chimerism by d+30. In 4 cases mixed chimerism (MC) was observed, 20 pts experienced full donor chimerism (CC) and 4 patient rejected graft. Out of 3 MC one pt rejected graft soon, one experienced CC by d+60 and one kept MC until death from progression of melanoma (4 months). By d+90 16 pts available for analysis achieved CC. Two of them experienced MC and relapsed 7 and 11 mo. after PBSCT. Acute GvHD grade 0 was observed in 7 pts, grade I in 7, II in 7 and III in 5 pts, respectively, and was sensitive to ATG+steroids therapy. Six out of 15 pts survived more than 100 days experienced chronic GvHD (40%) (disseminated in 2, limited in 4).

Some «graft-versus-tumor» effect was seen in patients with hematological malignancies as well as with solid tumors. A complete disappearance of Ph-chromosome in patients with CML was observed. A shift to the mixed chimerism was accompanied by disease relapse. In patients with solid tumor the evidence of GvT effect was observed in cases of neuroblastoma, melanoma, Ewing's sarcoma.

Ex. 1. A 16-years old girl was admitted with a metastatic lung relapse of Ewing's sarcoma six months after completion of multimodal therapy receiving for localized left shoulder tumor. She received second line ICE chemotherapy with no decrease in tumor volume. She had surgery and 2 and 3 metastases were removed from right and left lung, respectively. No histological response was seen. An appearance of 2 new focuses in right lung was observed within 2 following weeks. She received a reduced-intensity conditioning including fludarabine 180 mg/m<sup>2</sup>, busulfan 8 mg/kg and ATG 40 mg/kg. She also received 10.8 Gy of hole lung irradiation as a part of conditioning. Donor was 4/6 HLA mismatched mother. The girl was grafted on d0 and +1 with  $2.2 \times 10^6$  CD34/kg and  $6.7 \times 10^8$  CD3/kg after 30' incubation of innoculum with vincristine and methylprednisolone. GvHD prophylaxis consisted of short methotrexate and cyclosporine A. The level of WBC  $>1.0 \times 10^9/l$  was reached on day+12. The girl required no PLT transfusion. A complete donor chimerism was observed on d+90. In early posttransplant period grade I skin GvHD was seen. A cyclosporine A related encephalopathy occurred on d+60 and the GvHD consisted of MMF and methylprednisolone. The recovery of immunity was prompt and fast. The decrease in the size of metastases was observing progressively from d+30 until their complete disappearance by day +90. At this moment the girl is disease-free and well, with no evidence of GvHD. This patient remained alive without any evidence of disease for 20 months after graft. She suffered from disseminated GvHD with lung involvement. She died from bronchoalveolitis. As far as we know this is the first report of a successful family mismatched transplantation with evidence of «graft-versus-tumor» effect in patients with relapsed Ewing's sarcoma refractory to second-line therapy.

Ex. 2.-year old patient with stage IV neuroblastoma (bone, bone marrow involvement) in partial remission after conventional treatment got an allogeneic transplantation of PBSC from 3/6

HLA matched father. He relapsed in bone marrow and bone. 4,5 months after graft. After stop of cyclosporine A he experienced a complete disappearance of neuroblastoma cells from bone marrow. We observed an appearance of GvHD of grade I and started micophenolate mofetil and steroids. Now the boy alive in CR with a minor immunosuppression 6 mo after graft.

Eleven pts are alive and well in CR. Two patients alive in disease progression (one with slowly progressive large cell NHL and one with neuroblastoma). Ten pts died: Five from DP, 1 from sepsis, 1 from fungal pneumonia, 2 from disseminated chronic GvHD, and 1 from sever VOD after second graft.

DFS, EFS and OS for hematological malignancies were 60%, 51.6% and 68.8% with a median follow-up of 35, 30 and 36.4 mo., respectively. DFS, EFS and OS for patients with solid tumors were 42.9%, 33.3% and 57.1% with a median follow-up of 10.3, 10.3 and 15 mo), respectively.

Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation can be curative of a variety of malignant and nonmalignant conditions. Although significant improvements have been made, early transplant-related mortality and GVHD remain as major obstacles to safe transplantation. Recent, less damaging nonmyeloablative allogeneic stem cell transplantation approaches seem promising, with two possible advantages: first, decreasing the intensity of conditioning results in a lesser early transplant-related mortality, and second, decreasing the intense conditioning regimen, which clearly plays a role in graft-vs-host disease, may have further benefits in reducing GVHD. Purine nucleoside analogs such as fludarabine and cladribine are used in the recent nonmyeloablative preparative regimens and have shown some tendency toward a lower incidence of GVHD. These drugs also eliminate T cells responsible for alloreactions, and clinical studies evaluating their role in GVHD postallografting are intriguing. The value of this promising treatment modality needs to be validated in future randomized studies. As information from research and clinical studies in this field accumulates, our understanding of the biology of GVHD continues to evolve. In the future, we may have the tools to treat malignant diseases with allogeneic transplantation with specific GVT effects devoid of GVHD. Since it first became accepted in the 1980s that GVT was a clinical as well as an experimental reality, much progress has been made in understanding and characterizing the GVT reaction. While the separation of GVT from GVHD is theoretically predicted and has, in limited circumstances, been achieved clinically, our inability to identify antigens driving tumor-specific alloresponses remains the biggest single obstacle to improving the strength and specificity of GVT in clinical practice. However, progress in this field is gaining momentum and we can expect that the next century will see major advances in manipulation of the alloimmune response to the benefit of patients with a variety of malignant disorders.

## References

1. *Thomas E.D., Storb R., Clift R.A., et al.* Bone-marrow transplantation (second of two parts). *N. Engl. J. Med.* — 1975. — P. 292:895.
2. *Armitage J.O.* Bone marrow transplantation. *N. Engl. J. Med.* — 1994. — P. 330:827.
3. *Chao N.J.* Graft-vs-host disease (2nd edition). 1999. — Austin: R.G. Landes Co.
4. *Biggs J.C., Szer J., Crilley P., et al.* Treatment of chronic myeloid leukemia with allo-

geneic bone marrow transplantation after preparation with BuCy2. *Blood*. — 1992. — V.80. — P.1352.

5. *Ferrara J.L.M.* Pathogenesis of graft-vs-host disease. In K Atkinson (ed): *Clinical bone marrow and blood stem cell transplantation* (2nd edition). Cambridge: Cambridge University Press, 2000. — P.147.

6. *Billingham R.E.* The biology of graft-vs-host reactions. *The Harvey lectures*. New York: Academic Press, 1966. — P. 62:21.

7. *Hansen J.A., Choo S.Y., Geraghty D.E., Mickelson E.* The HLA system in clinical marrow transplantation. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* — 1990. — V.4. — P.507.

8. *den Haan J.M., Meadows L.M., Wang W., et al.* The minor histocompatibility antigen HA-1: a diallelic gene with a single amino acid polymorphism. *Science*. -1998. — V.279. — P.1054.

9. *Ferrara J.L.M., Levy R., Chao N.J.* Pathophysiologic mechanisms of acute graft-vs.-host disease. *Biol. Blood Marrow Transplant.* -1999. — V.5. — P.347.

10. *Hansen J.A., Petersdorf E.V.* Unrelated donor hematopoietic cell transplantation.. ED Thomas, KB Blume, SJ Forman (eds): *Hematopoietic cell transplantation* (2nd edition). Oxford: Blackwell Scientific Publications. — 1999. — P. 915.

11. *Martin P.J.* Increased disparity for minor histocompatibility antigens as a potential cause of increased GVHD risk in marrow transplantation from unrelated donors compared with related donors. *Bone Marrow Transplant.* -1991. — V.8. — P.217.

12. *Balduzzi A., Gooley T., Anasetti C., et al.* Unrelated donor marrow transplantation in children. *Blood*. -1995. — V.86. — P.3247.

13. *Anasetti C., Beatty P.G., Storb R., et al.* Effect of HLA incompatibility on graft-vs-host disease, relapse, and survival after marrow transplantation for patients with leukemia or lymphoma. *Hum. Immunol.* — 1990. — V.29. — P.79.

14. *McDonald G.B., Shulman H.M., Sullivan K.M., Spencer G.D.* Intestinal and hepatic complications of human bone marrow transplantation (part 2). *Gastroenterology*. — 1986. — V.90. — P.770.

15. *Strasser S.I., McDonald G.B.* Gastrointestinal and hepatic complications. E.D. Thomas, K.B. Blume, S.J. Forman (eds): *Hematopoietic cell transplantation* (2nd edition). Oxford: Blackwell Scientific Publications. — 1999. — P.627.

16. *Sale G.E., Alavaikko M., Schaeffers K.M., Mahan C.T.* Abnormal CD4:CD8 ratios and delayed germinal center reconstitution in lymph nodes of human graft recipients with graft-vs-host disease (GVHD): an immunohistological study. *Exp. Hematol.* — 1992. — V.20. — P.1017.

17. *Herve P., Tiberghien P., Racadot E., Plouvier E., Cahn J.Y.* Prevention and treatment of acute graft-vs-host disease: new modalities. *Bone Marrow Transplant.* — 1993. — V.11 (suppl.1). — P.103.

18. *Storb R., Deeg H.J., Whitehead J., et al.* Methotrexate and cyclosporine compared with cyclosporine alone for prophylaxis of acute graft-vs-host disease after marrow transplantation for leukemia. *N. Engl. J. Med.* — 1986. — V.314. — P.729.

19. *Ratanatharathorn V., Nash R.A., Przepiorka D. et al.* Phase III study comparing methotrexate and tacrolimus (prograf, FK506) with methotrexate and cyclosporine for graft-versushost disease prophylaxis after HLA-identical sibling bone marrow transplantation. *Blood*. — 1998. — V.92. — P.2303-2314.

20. *Nash R.A., Antin J.H., Karanes C.* et al. Phase 3 study comparing methotrexate and tacrolimus with methotrexate and cyclosporine for prophylaxis of acute graft-versus-host disease after marrow transplantation from unrelated donors. *Blood.* — 2000. — V.96. — P. 2062-2068.
21. *Hakim F., Mackall C.L.* The immune system: effector and target of graft-versus-host disease Ferrara JL, Deeg HJ, Burakoff SJ (eds). *Graft-vs-Host Disease.* Marcel Dekker: New York. — 1997. — pp.257-289.
22. *Claman H.N.* Graft-versus-host disease and animal models for scleroderma. *Curr. Opin. in Rheumatol/* — 1990. — V.2. — P.929-931.
23. *Quaranta S., Shulman H., Ahmed A.* et al. Autoantibodies in human chronic graft-versus-host disease after hematopoietic cell transplantation. *Clin. Immunol.* — 1999. — V.91. — P.106-116.
24. *Lister J., Messner H., Keystone E.* et al. Autoantibody analysis of patients with graft versus host disease. *J. Clin. Lab. Immunol.* — 1987. — V.24. — P.19-23.
25. *Redding S.W., Callander N.S., Haveman C.W.* et al. Treatment of oral chronic graft-versus-host disease with PUVA therapy: case report and literature review. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endo.* — 1998. — V.86. -P.183-187.
26. *Strasser S.I., Sullivan K.M., Myerson D.* et al. Cirrhosis of the liver in long-term marrow transplant survivors. *Blood.* — 1999. — V.93. — P.3259-3266.
27. *McDonald G.B., Sullivan K.M., Schuffler M.D.* et al. Esophageal abnormalities in chronic graft-versus-host disease in humans. *Gastroenterol.* — 1981. — V.80. — P.914-921.
28. *Ralph D.D., Springmeyer S.C., Sullivan K.M.* et al. Rapidly progressive air-flow obstruction in marrow transplant recipients. Possible association between obliterative bronchiolitis and chronic graft-versus-host disease. *Am. Rev. Resp. Dis.* — 1984. — V.129. — P. 641-644.
29. *Clark J.G., Crawford S.W., Madtes D.K.* et al. Obstructive lung disease after allogeneic marrow transplantation. Clinical presentation and course. *Ann. Int. Med.* — 1989. — V.111. — P.368-376.
30. *Truitt R., Johnson B., McCabe C.* et al: Graft versus leukemia, in Ferrara J, Deeg H, Burakoff S (eds): *Graft-vs-Host Disease.* New York, NY, Marcel Dekker, Inc. — 1997. — pp. 385-424.
31. *Horowitz M., Gale R., Sondel P.,* et al: Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood.* — 1990. -V.75. — P.555-562.
32. *Gale R., Horowitz M., Ash R.,* et al: Identical-twin bone marrow transplants for leukemia. *Ann. Intern. Med.* -1994. — V.120. — P.646-652.
33. *Weiden P., Sullivan K., Flournoy N.,* et al. Antileukemic effect of chronic graft-versus-host disease: Contribution to improved survival after allogeneic marrow transplantation. *N. Engl. J. Med.* — 1981. — V.304. — P.1529-1533.
34. *Porter D., Roth M., McGarigle C.* et al: Induction of graft-versus-host disease as immunotherapy for relapsed chronic myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* -1994. — V.330. — P.100-106.
35. *Kolb H., Schattenberg A., Goldman J.* et al. Graft-versus-leukemia effect of donor lymphocyte transfusions in marrow grafted patients. *Blood.* -1995. -V.86. — P.2041-2050.

36. *Barrett A.J., Malkovska V.* The graft-versus-leukemia effect. *Curr. Opin. Oncol.* — 1996. — V.8. — P.89-95.
37. *Hoffmann T., Theobald M., Bunjes D.* et al. Frequency of bone marrow T cells responding to HLA-identical non-leukemic and leukemic stimulator cells. *Bone Marrow Transplant.* — 1993. — V.12. — P.1-8.
38. *Jiang Y.Z., Kanfer E.J., MacDonald D.* et al. Graft-versus-leukaemia following allogeneic bone marrow transplantation: emergence of cytotoxic T-lymphocytes reacting to host leukaemia cells. *Bone Marrow Transplant.* — 1991. — V.8. — P.253-258.
39. *Hercend T., Takvorian T., Nowill A.* et al. Characterization of natural killer cells with antileukemic activity following allogeneic bone marrow transplantation. *Blood.* — 1986. — V.67. — P.722-730.
40. *Jiang Y.Z., Barrett A.J., Goldman J.M.* et al. Association of natural killer cell immune recovery with a graft-vs.-leukemia effect independent of graft vs. host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *Ann. Hematol.* — 1997. — V.74, №1. — P.1-6.
41. *Lanier, L.L.* NK receptors. *Annu. Rev. Immunol.* — 1998. — V.16. — P.359-393.
42. *Ruggeri L., Capanni M., Urbani E., Perruccio K.* et al. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched T lymphocytes may participate in the elimination hematopoietic transplants. *Science.* — 2002. — V.295. — P. 2097-2100.

*Е. В. Артамонова, З. Г. Кадагидзе, В. П. Летягин, Л. В. Манзюк,  
С. А. Шинкарев, Н. А. Гадецкая, Н. Н. Тупицын*

## ОТ ТЕОРИИ К ПРАКТИКЕ: MUC-1 — НОВАЯ МИШЕНЬ ДЛЯ ТЕРАПИИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ

ГУ РОНЦ имени Н.Н. Блохина РАМН

### Резюме

Изучали экспрессию опухолеассоциированного антигена MUC-1 (детерминанты, распознаваемые моноклональными антителами (МКА) ICO-25 и LU-BCRU-G7) при раке молочной железы (РМЖ), а также оценивали возможность использования анти-MUC-1 МКА в терапии злокачественных опухолей.

Иммуногистохимические исследования показали, что детерминанта ICO-25 выявлялась при РМЖ в 94,0 % случаев (включая 56,3 мономорфных и 37,7 мозаичных реакций), достоверно коррелировала с РЭА и не была связана с лимфоидно-маркофагальной инфильтрацией, а также со стадией заболевания. Показатели общей и безрецидивной выживаемости больных РМЖ снижались при нарастании экспрессии маркера ( $p > 0,05$ ). МКА ICO-25 выявляли метастазы в регионарных лимфатических узлах на 9,7% чаще, чем при стандартном гистологическом исследовании. Gal 1-3GlcNAc (Le<sup>c</sup> — детерминанта LU-BCRU-G7) изучен при раннем РМЖ (T1-2N0M0). Антиген обнаруживался в 56,8 % случаев и был достоверно взаимосвязан с рецептором трансферрина CD71, а также с размером опухоли более 3 см. Экспрессия Le<sup>c</sup> коррелировала с ухудшением выживаемости больных РМЖ ранних стадий (в подгруппе с III степенью злокачественности различия достоверны). Метастазы LU-BCRU-G7+ РМЖ имели тропизм к ткани легкого. У 85 % больных РМЖ (18 из 21) и у 75 % доноров (6 из 8) в периферической крови выявлялись В-лимфоциты, связывающие Gal 1-3GlcNAc.

Клинические испытания препарата Имутеран (создан на основе МКА ICO-25) по I фазе проведены у 10 больных. Эскалацию разовых и суммарных доз осуществляли по модифицированной шкале Фибоначчи. Основными побочными эффектами были аллергические реакции. Для II фазы клинических испытаний был рекомендован режим введения Имутерана по 35 мг (700 % от стартовой дозы) в/в капельно 1 раз в неделю. На настоящий момент в исследование по II фазе включено 20 больных, которым проведено 26 курсов лечения. Эффект оценен у 16 пациентов. Объективных регрессий не наблюдали. Стабилизация длительностью 11,8+4,3 нед. (медиана 10 нед.) зарегистрирована в 37,5 % случаев, прогрессирование — в 62,5 %. Из-за токсичности (аллергические реакции — 2, парез кишечника — 1) лечение было прекращено у 15 % (3 из 20) больных. Исследование продолжается.

**Ключевые слова:** MUC-1, иммуногистохимия, моноклональные антитела, Имутеран, клинические испытания.



*E. V. Artamonova, Z. G. Kadagidze, V. P. Letyagin, L. V. Manzuk, S. A. Shinkarev,  
N. A. Gadetskaya, N. N. Tupitsyn*

## FROM THEORY TO PRACTICE: MUC-1 — A NEW TARGET FOR CANCER THERAPY

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

### Abstract

We've studied the expression of MUC-1 with MABs ICO-25 and LU-BCRU-G7 on breast cancer cells as well as the ability of using anti-MUC-1-MABs ICO-25 for treatment of cancer. Immunohistochemical study showed that ICO-25 epitope was found on breast cancer cells in 94 % of all cases (including 56,3 % monomorphic and 37,7 % mosaic reaction), MUC-1 expression correlated with CEA ( $p < 0,05$ ) and did not correlate with levels of lymphocyte or macrophage infiltration and stage of breast cancer. Overall and relapse-free survival were decreasing with the increasing of expression of antigen. MABs ICO-25 revealed metastases in lymph nodes 9,7 % more, than usual histological study. Gal 1-3GlcNAc (Le<sup>c</sup> — determinant of MUC-1, MABs LU-BCRU-G7) expression rate on tumor cells was 56,8 % in early stages of breast cancer. It was correlating with CD71 ( $p < 0,05$ ) and with tumor more than 3 sm in size ( $p < 0,05$ ). Le<sup>c</sup> expression was associated with the decreasing of survival of patients with breast cancer T1-2N0M0. LU-BCRU-G7+ breast tumor metastases had tropism to lung. In the blood of 85 % of breast cancer patients and 75 % of donors Le<sup>c</sup>-binding B-lymphocytes were found.

Based on MABs ICO-25 the medicine Imuteran was created. 10 patients were included in the first phase of study of Imuteran. Escalation of doses was carried out. Main toxicities were allergic reactions. The recommended regimen for the second phase is 35 mg (i.v. infusion) 1 time per week. 20 patients were included in the studies of phase II. 26 cycles of treatment were carried out. There was no complete and partial response. Stabilization was registered in 37,5 % of all cases (11,8+4,3 weeks, median 10 weeks) and progression was found in 62,5 %. The treatment of 15% patients was canceled because of toxicity.

**Key words:** MUC-1, immunohistochemistry, MABs, clinical trial.

### Список сокращений

МКА — моноклональные антитела

РМЖ — рак молочной железы

ОВ — общая выживаемость

БРВ — безрецидивная выживаемость

ИБХ — институт биоорганической химии

С точки зрения истории онкологии рубеж второго и третьего тысячелетий ознаменовался настоящим прорывом в химиотерапии злокачественных опухолей. Этим прорывом стало получение и широкое внедрение в клиническую практику таргетных препаратов — т. е. лекарственных агентов, имеющих специфические мишени для реализации своего противоопухолевого эффекта. Именно поэтому знания, накопленные экспериментаторами в отношении огромного числа опухолеассоциированных антигенов, рассматриваются в настоящее время не только в контексте диагностической и прогностической ценности этих маркеров, но и с точки зрения их потенциала для разработки новых лекарств, таких как полученные к различным детерминантам моноклональные антитела (МКА), антисмысловые олигонуклеотиды, малые молекулы — ингибиторы трансдукции сигнала и т. д.

Большим семейством опухолеассоциированных антигенов являются эпителиальные муцины. Муцины — это большие, экстенсивно гликозилированные макромолекулы, часто экспрессируемые и секретируемые различными видами эпителия. С точки зрения основных физиологических функций они являются защитными агентами и физиологическими лубрикантами, и их экспрессия в большинстве случаев возрастает и/или изменяется при раке.

К настоящему моменту идентифицированы различные семейства муцинов, из них MUC-1 (CD227) по праву считается наиболее клинически значимым как опухолевый маркер в целом и, особенно, как маркер рака молочной железы [19]. Он представляет собой целый комплекс гликопротеинов и включает в себя полипептидное тело с множеством олигосахаридных боковых цепей, содержащих O-соединения с сериновыми или треониновыми остатками. В то время как зрелая молекула MUC-1 «заякорена» к клеточной поверхности характерным трансмембранным доменом, большая часть муцина экспрессируется экстрацеллюлярно в удлинённой форме, вытянутой на гораздо большее расстояние от мембраны клетки по сравнению с другими экспрессируемыми клеточной поверхностью макромолекулами. Огромный регион белкового тела муцина MUC-1 содержит переменное число высококонстантных последовательно повторяющихся цепочек или юнитов, каждый из которых состоит из 20 аминокислот.

Точные физиологические функции муцина MUC-1 в нормальных клетках все еще являются предметом для обсуждения, однако его важнейшее значение как маркера большинства карцином человека не подлежит сомнению. В злокачественных клетках экспрессия MUC-1 возрастает, его ориентация внутри ткани перестает быть вытянутой, стремящейся поляризоваться на апикальной поверхности клетки. Гликозилирование (с боковыми цепями в O-соединениях с сериновыми и треониновыми остатками) вследствие неопластической трансформации часто изменяется и нарушается. Неполное или aberrантное гликозилирование в злокачественных клетках ведет к укорачиванию и меньшему ветвлению боковых олигосахаридных цепей, аккумуляции предшествующих структур и увеличению или экспозиции *de novo* регионов белкового тела муцина. MUC-1 освобождается от своей поверхностной локализации и может циркулировать в крови (маркер СА 15,3), сигнализируя о существовании опухоли, а, при последовательном его определении, и о рецидивировании, прогрессировании или ответе на лечение.

В настоящее время к различным эпитомам MUC-1 получено огромное количество МКА [10; 14]. Большинство из них узнают эпитопы внутри белкового тела молекулы [22; 23], и лишь относительно небольшая часть, в основном, недавно полученных антител реагирует с эпитопами, включающими углеводные детерминанты [20]. Чрезвычайно интересными и перспективными представляются нам МКА LU-BCRU-G7, полученные к терминальному дисахариду Gal 1-3GlcNAc. Уникальность детерминанты заключается в том, что она отсутствует на нормальной ткани молочной железы, а также на эпителии при доброкачественных гиперпластических процессах.

Из-за того, что различные МКА направлены против различных эпитопов муцина MUC-1, данные по его экспрессии при раке молочной железы неоднозначны. Помимо фенотипической характеристики первичной опухоли, МКА к MUC-1 широко используются при раке молочной железы для мониторинга рецидивов и ответа на химиотерапию [18; 21], для выявления микрометастазов в регионарные лимфоузлы [8; 17]. Имеются сообщения о способности дериватов MUC-1 индуцировать реакцию HLA-рестриктированных цитотоксических Т-лимфоцитов против клеток линий рака молочной железы, приводящую к лизису клеток-мишеней [12]. Ведутся исследования возможностей использования экспрессирующих MUC-1 аутологичных и аллогенных опухолевых клеток, а также синтетических полипептидных последовательностей для вакцинации больных раком молочной железы [13; 15].

Среди большого количества антител к различным эпитомам MUC-1 имеются отечественные МКА ICO-25, полученные А.Ю.Барышниковым и Р.И.Якубовской. Детерминанта ICO-25 с высокой частотой выявляется на клетках опухолей эпителиального генеза, включая рак молочной железы, рак яичников, рак маточной трубы, рак желудка, рак толстой кишки и т. д., и в настоящее время эти антитела в нашей стране широко используются в исследованиях рака молочной железы и ряда других опухолей [4; 6].

При иммуногистохимическом исследовании рака молочной железы специфическая реакция с МКА ICO-25 сохранялась после обработки срезов трипсином и липазой и исчезала после применения нейраминидазы, что свидетельствует об углеводной природе антигенной детерминанты [9]. В нормальной нелактующей молочной железе МКА ICO-25 взаимодействовали только с апикальной мембраной ацинусов и протоков. При непролиферативных и пролиферативных формах мастопатий с дисплазией эпителия I-II степени антиген также выявляли в апикальной мембране эпителиальных клеток. При этом в многоядном пролиферирующем эпителии протоков реакцию обнаруживали только в клетках, непосредственно выстилающих просвет.

МКА ICO-25 реагировали не только с первичной опухолью, но и с метастатическими опухолевыми клетками в регионарных лимфоузлах и костном мозге больных [1; 2]. Так, частота выявления метастазов в регионарные лимфоузлы превышала результаты стандартного патоморфологического исследования для рака молочной железы на 10,8 %, для рака желудка — на 27,2 %, причем наличие морфологически не определяемых микрометастазов при раке желудка коррелировало с прогрессированием заболевания при дальнейшем наблюдении [8]. Исследование костного моз-

га с помощью моноклональных антител ICO-25 позволяло выявить даже одну раковую клетку на миллион гемопоэтических, а обнаружение опухолевых клеток в стернальном пунктате больных раком молочной железы коррелировало с увеличением частоты выявления метастазов в кости при дальнейшем наблюдении [3].

Результаты иммуногистохимических исследований послужили предпосылкой для создания на основе МКА ICO-25 оригинального отечественного препарата Имутеран, разработанного совместно в РОНЦ им. Н.Н.Блохина РАМН и МНИОИ им. П.А.Герцена МЗ РФ. Эксперименты, проведенные на модели гетеротрансплантата рака толстой кишки человека (РТК1), привитого мышам nude, показали, что введение МКА ICO-25 приводит к выраженному торможению роста опухоли, а токсикологические исследования продемонстрировали, что Имутеран по классификации степени опасности острого и хронического токсического воздействия является малоопасным веществом [5; 7; 16]. Эти данные позволили передать Имутеран для дальнейшего применения в клинике.

В представленной нами работе проведено изучение экспрессии MUC-1 (детерминанты МКА ICO-25 и LU-BCRU-G7) клетками рака молочной железы, а также представлены результаты I — II фазы клинических испытаний препарата Имутеран (создан на основе МКА ICO-25) у больных с диссеминированными злокачественными опухолями эпителиального генеза.

## **I. Экспрессия MUC-1 клетками рака молочной железы**

### *I. 1. Детерминанта ICO-25*

Реакция иммунофлюоресценции (РИФ) с МКА ICO-25 к MUC-1 поставлена нами на криостатных гистологических срезах опухолей 183 больных раком молочной железы (включая 138 случаев протокового рака, 15 — долькового, 15 — смешанного дольково-протокового, 5 — медулярного, 5 — тубулярного, 1 — папиллярного и 1 случай рака с метаплазией). Результаты представлены в табл. 1.

Детерминанта МКА ICO-25 выявлялась на опухолевых клетках у 94,0 % (172/183) пациенток. В 56,3 % (103/183) случаев отмечен мономорфный тип экспрессии (антигенположительными были более 70 % опухолевых клеток); в 37,7 % наблюдений (69/183) реакция носила мозаичный характер (антигенположительными были от 10 % до 70 % клеток); 6,0 % опухолей (11/183) — антигенотрицательными.

Антиген локализовался диффузно и в цитоплазме, и на мембране опухолевых клеток, свечение в РИФ было очень ярким. Интенсивность окрашивания клеток одной и той же опухоли в случае мозаичной реакции изменялась от полностью негативной до очень сильной, причем ярко-, слабо- и неокрашенные клетки располагались как зонами (реже), так и соседствовали друг с другом (чаще). При наличии в препарате участков сохранной ткани молочной железы MUC-1 выявлялся также на апикальной части клеточной мембраны эпителия протоков (в отличие от раковых клеток, клетки нормального эпителия характеризовались только мембранным типом реакции).

Анализ экспрессии MUC-1 (детерминанта ICO-25) при различных гистотипах РМЖ показал, что все 11 антигеннегативных случаев относились к протоковому

Таблица 1.

**Экспрессия MUC-1 клетками рака молочной железы**

Гистогический тип опухоли	Тип реакции (количество больных, %)			Всего больных
	Мономорфная	Мозаичная	Отрицательная	
Протоковый рак	76–55,1 %	51–37,0 %	11–8,0 %	138
Дольковый рак	8–53,3 %	7–46,7 %	-	15
Редкие формы	19–63,3 %	11–36,7 %	-	30
Вся группа	103–56,3 %	69–37,7 %	11- 6,0 %	183

раку. Необходимо также отметить, что во всех 5 случаях медуллярного рака этот маркер был представлен на подавляющем большинстве опухолевых клеток.

При анализе взаимосвязи экспрессии MUC-1 с другими антигенами клеток рака молочной железы (РЭА, HLA-I, HLA-DR, CD71, CD29) обнаружена значимая положительная корреляция между MUC-1 и РЭА (=14,152;  $p=0,007$ ): все 100 % опухолей, мономорфно экспрессирующих РЭА, мономорфно экспрессировали MUC-1; в РЭА-мозаичной группе мономорфная экспрессия MUC-1 встречалась чаще, чем в РЭА-отрицательной (68,4 % и 49,3 % соответственно); единственный MUC-1-отрицательный случай был также РЭА-отрицательным. В тестах направленных оценок зависимую переменную установить не удалось, MUC-1 и РЭА оказались равнозначными. Необходимо заметить, что для нормального эпителия молочных желез экспрессия РЭА и цитоплазматическая локализация MUC-1 нехарактерны. Вероятно, появление РЭА-положительных и MUC-1-положительных фенотипов взаимосвязано и является отражением злокачественной трансформации и связанных с ней процессов анаплазии и дедифференцировки.

Экспрессия MUC-1 не влияла на уровни инфильтрации опухоли различными субпопуляциями иммунокомпетентных клеток включая CD45 (все лимфоциты); CD7, CD5, CD4, CD8 (Т-клетки и их субпопуляции); CD19, CD37 (В-клетки), CD38 (плазматические клетки) и CD163 (макрофаги).

Экспрессия MUC-1 также не была связана со степенью распространенности процесса, оцененной по размеру опухоли (индекс Т), наличию метастазов в регионарные лимфоузлы (индекс N) и стадии заболевания.

При изучении безрецидивной выживаемости больных раком молочной железы в зависимости от наличия MUC-1 на опухолевых клетках оказалось, что показатели БРВ снижались при нарастании экспрессии маркера (различия не достоверны,  $p>0,05$ ) (табл. 2).

Аналогичная тенденция отмечена и для общей выживаемости, которая также снижалась при нарастании экспрессии MUC-1: показатель 5-летней ОВ при отрицательной, мозаичной и мономорфной реакции составил 75,0+21,7 %; 74,8+5,9 % и 67,1+5,4 % соответственно ( $p>0,05$ ).

МКА ICO-25 использованы нами для изучения криостатных срезов регионарных лимфоузлов 72 больных раком молочной железы. При стандартном морфологическом исследовании метастазы в регионарные лимфоузлы были выявлены в 45,8 % случаев (33

Таблица 2.

**Безрецидивная выживаемость больных раком молочной железы в зависимости от экспрессии MUC-1 опухолевыми клетками**

Экспрессия MUC-1 (число больных)	Безрецидивная выживаемость		
	5 лет %±m	10 лет %±m	Медиана
Отсутствует (8)	70,0±18,2	-	не достигнута
Мозаичная (59)	63,5±6,4	56,0±7,5	не достигнута
Мономорфная (82)	51,1±5,8	41,6±6,8	72 мес.

из 72). Частота выявления метастазов с помощью МКА ICO-25 оказалась на 9,8 % выше, чем при гистологическом исследовании, и достигла 55,6 % (40 из 72): иммуногистохимически метастазы были обнаружены в том числе в 7 случаях, гистологически считавшихся отрицательными. Полученные нами данные свидетельствуют о целесообразности дополнительного использования этого метода в группе больных с индексом N0.

*I. 2. Терминальный дисахарид Gal 1-3GlcNAc (Le<sup>c</sup> — детерминанта LU-BCRU-G7)*

Реакция с МКА LU-BCRU-G7 к Le<sup>c</sup> поставлена нами на депарафинированных гистологических срезах опухолей 88 больных раком молочной железы ранних стадий (T1-2N0M0). В 59 случаях выявлен протоковый рак, в 7 — дольковый рак, в 13 — смешанный рак, в 5 — медуллярный рак, в 4 — другие формы.

Терминальный дисахарид Gal 1-3GlcNAc (Le<sup>c</sup>) обнаруживался на злокачественных клетках в 56,8 % наблюдений (50 из 88), включая 21,6 % (19 из 88) мономорфных и 35,2 % (31 из 88) мозаичных реакций. 43,2 % (38 из 88) опухолей были антигеннегативными.

Экспрессия детерминанты МКА LU-BCRU-G7 не была взаимосвязана с гистологическим типом опухоли и степенью ее злокачественности, однако возрастала по мере уменьшения степени дифференцировки раковых клеток: антиген выявлялся в 50 % (8 из 16) случаев с высокой дифференцировкой, в 57,1 % (12 из 21) наблюдений с умеренной дифференцировкой и в 61,5 % (8 из 13) случаев с низкой дифференцировкой,  $p > 0,05$ .

Обнаружение Le<sup>c</sup> было достоверно взаимосвязано с наличием на раковых клетках рецептора трансферрина CD71 ( $p = 0,026$ ) и не коррелировало с экспрессией антигенов главного комплекса гистосовместимости I и II классов, молекул адгезии CD29, а также с инфильтрацией опухоли CD45+ лейкоцитами, CD7+ Т-лимфоцитами и CD163+ макрофагами.

Интересно, что МКА ICO-25 и LU-BCRU-G7 по-разному реагировали с одной и той же опухолью. Как известно, в составе каркаса промежуточной области углеводных цепей O-связанных гликопротеинов, к числу которых относится MUC-1, имеется углеводная цепь 1-го типа, которая соединяет промежуточную область с сердцевинной областью углеводной цепи и состоит как раз из Gal 1-3GlcNAc. В норме этот участок «прикрыт» периферической областью углеводной цепи. В результате нарушения процессов гликозилирования, наблюдаемых при раке, Gal 1-

3GlcNAc становится терминальным дисахаридом, доступным для антител. Таким образом, две углеводные детерминанты, входящие в состав одних и тех же гликопротеинов MUC-1, могут быть совершенно различно экспрессированы злокачественной опухолью.

Так как у всех пациенток метастазы в регионарные лимфоузлы отсутствовали, мы провели анализ взаимосвязи Gal 1-3GlcNAc (Le<sup>c</sup>) только с величиной опухоли. Оказалось, что на опухолях более 3 см дисахарид выявлялся достоверно чаще, чем при размере опухоли менее 3 см (85 % — 17 из 20 и 48,4% — 33 из 68 соответственно,  $p=0,004$ ). Показатели общей и безрецидивной выживаемости больных раком

Таблица 3.

**Безрецидивная и общая выживаемость больных раком молочной железы в зависимости от экспрессии Galβ1-3GlcNAc (Le<sup>c</sup>) опухолевыми клетками**

Экспрессия Galβ1-3GlcNAc (число больных)	БРВ		ОВ	
	5 лет, %±m	Медиана	5 лет, %±m	
Отсутствует (38)	79,0±6,0	не достигнута	81,1±6,4	не достигнута
Выявлена (50)	65,7±6,8	не достигнута	79,6±5,8	не достигнута

молочной железы оказались несколько лучшими в Le<sup>c</sup>-негативной группе (табл. 3), различия не достоверны.

В подгруппе опухолей с III степенью злокачественности (30 пациенток) оказалась экспрессия Le<sup>c</sup> коррелировала с достоверным ухудшением выживаемости больных РМЖ ранних стадий ( $p=0,05$ ).

Дополнительный анализ характера метастазирования в случаях прогрессирования процесса в сроки более 6 мес. после операции показал, что LU-BCRU-G7-положительные опухоли имели тропизм к ткани легкого: из 8 больных с метастазами в легкие антиген выявлялся у 7 (87,5 %), тогда как в группе без метастазов в легкие антигенположительными были только 53,2 % (41 из 77) случаев,  $p=0,047$ .

**II. Анализ субпопуляций В-лимфоцитов у больных раком молочной железы: Le<sup>c</sup>-специфичные В-клетки**

В последние годы появилось все больше данных о роли так называемого «естественного» гуморального иммунитета, обусловленного полиреактивными пентамерными IgM, продуцируемыми CD5-позитивными В-лимфоцитами, в противоопухолевой защите при раке молочной железы [11]. Мы провели исследование субпопуляционного состава В-лимфоцитов крови 21 больной раком молочной железы и 8 здоровых доноров с оценкой способности В-лимфоцитов специфически связывать флуоресцентно меченый дисахарид Gal 1-3GlcNAc (Le<sup>c</sup>) в составе флуорохромного зонда Le<sup>c</sup>-PAA-flu (в дальнейшем обозначаемым просто Le<sup>c</sup>). В качестве контроля к Le<sup>c</sup> использовался меченый флуорохромом

лактозамин — дисахарид, схожий по структуре с Le<sup>c</sup> (Gal 1-4GlcNAc). Флуоресцентно меченые пробы были любезно представлены профессором Н.В.Бовиным (ИБХ РАН, Москва).

У 85 % больных (18 из 21) и у 75 % доноров (6 из 8) выявлялись В-клетки, связывающие дисахарид Le<sup>c</sup>. Средние уровни Le<sup>c</sup>-связывающих В-лимфоцитов составляли 6,0 % (0,73 — 32,0 %) и 5,4 % (1,5 — 16,0 %) соответственно, различия не достоверны. В-клетки, связывающие большие количества Le<sup>c</sup> и дающие яркий флуоресцентный сигнал при проточно-цитометрическом анализе, выявлены в 78 % (14 из 18) позитивных случаев больных раком молочной железы (0,6 — 3,9 %, медиана — 0,9 %).

Одним из направлений работы явилась оценка связывания Le<sup>c</sup> с субпопуляцией CD5-позитивных В-лимфоцитов, которые во многом определяют антительный ответ на углеводные антигены и продуцируют т.н. естественные антитела IgM класса. Le<sup>c</sup>+ CD5+В-клетки были оценены у 12 больных из 21.

Во всех случаях рецепторы к Le<sup>c</sup>+ были экспрессированы как на CD5-позитивных, так и на CD5-негативных В-лимфоцитах. CD5-позитивные В-клетки составляли в среднем 50% от В-лимфоцитов, высокоаффинных к Le<sup>c</sup>+

В настоящее время нами проводится изучение специфических к Le<sup>c</sup> антител в сыворотке крови больных раком молочной железы.

### III. Результаты I—II фазы клинических испытаний нового отечественного препарата Имутеран (МКА ICO-25).

Применение различных биологических агентов или биотерапия — это новое перспективное направление лекарственной терапии злокачественных новообразований. Важнейшим разделом этого направления является использование МКА к различным опухолеассоциированным антигенам. Эти антитела, самостоятельно или в составе иммуноконъюгатов, иммунолипосом и т. д., способны оказывать непосредственное повреждающее воздействие на раковую клетку, а также вызывать лизис опухолевых клеток, опосредованный эффекторными клетками иммунной системы.

Как мы уже говорили ранее, предпосылками для создания препарата Имутеран явились высокая специфичность МКА ICO-25, низкий уровень экспрессии MUC-1 в нормальных тканях и высокое содержание антигена в раковых клетках, а также продемонстрированные на модели *in vivo* противоопухолевый эффект и низкая токсичность.

Лекарственная форма: стерильный раствор мышинных моноклональных антител ICO-25 в концентрации 5 мг/мл; во флаконе — 5 мл (25 мг).

#### III. 1. Результаты I фазы клинических испытаний Имутерана.

В соответствии с решением Фармакологического комитета МЗ РФ в НИИ КО РОНЦ РАМН им. Н.Н.Блохина была проведена I фаза клинических испытаний препарата Имутеран в качестве противоопухолевого средства.

В исследование включено 10 больных с диссеминированными злокачественными опухолями. У всех пациентов диагноз был морфологически верифицирован, возможности других методов специфического лечения были полностью исчерпаны. Распределение больных в зависимости от нозологии представлено в табл. 4.



Таблица 4.

**Распределение больных в зависимости от нозологии (I фаза)**

Диагноз	Число больных
Рак молочной железы	6
Метастазы из невыявленного первичного очага	2
Рак яичников	1
Рак тела матки	1
Всего	10

Таблица 5.

**Эскалация доз Имутерана по модифицированной шкале Фибоначчи**

% от дозы	Разовая доза Имутерана	Кол-во введений	Курсовая доза Имутерана	Кол-во больных
100 %	5 мг	4	20 мг	1
350 %	17,50 мг	4	70 мг	2
525 %	26,25 мг	4	105 мг	1
700 %	35,00 мг	4	140 мг	3
925 %	46,25 мг	4	185 мг	1
		1	46,25 мг	2

Задачами I фазы клинических испытаний является определение разовой и максимально переносимой дозы препарата, режима введения и дозолимитирующей токсичности. Побочные эффекты оценивались по критериям ВОЗ.

В ходе I фазы проводилась эскалация разовых и суммарных доз Имутерана по модифицированной шкале Фибоначчи (схема эскалации доз представлена в табл. 5). Стартовая разовая доза составила 5 мг.

Имутеран растворяли в 250 мл изотонического раствора NaCl и вводили внутривенно капельно со скоростью 5 мл/мин в 1; 8; 15 и 22-й дни курса (1 раз в неделю — 4 введения).

В рамках I фазы 10 больных получили 10 курсов терапии Имутераном (всего 34 введения). Восемью пациентам запланированное лечение проведено полностью, у двух после первого введения Имутерана в дозе 92,5 % от первоначальной (46,25 мг) из-за развившихся осложнений лечение было прекращено.

Наблюдались следующие побочные реакции:

- озноб — во время инфузии, сразу по окончании инфузии или через несколько часов — у 60 % (6/10) больных при 32,4 % введений (11/34); у 3 пациенток озноб отмечен во время 1-го введения препарата в дозах 17,5 мг (1 больная) и 46,25 мг (2 больные); еще у 3 — при повторных введениях в дозе 26,25 мг (1 больная), 35 мг (1 больная) и 46,25 мг (1 больная);
- тошнота и однократная рвота — у 20 % (2/10) больных при 5,9 % введений (2/34);
- крапивница, отек Квинке — у одной больной (10 %) при первом введении Имутерана в дозе 46,25 мг — лечение прекращено;

- сильные боли в костях — у одной больной (10 %) с метастазами в кости при первом введении Имутерана в дозе 46,25 мг в сочетании с ознобом, подъемом АД — лечение прекращено;
- падение АД, ортостатический коллапс — у 2 больных (20 %) при 11,8 % введений (4/34);
- повышение АД — у 2 больных (20 %) при 8,8 % введений (3/34).

Таким образом, у 2 из 10 пациенток (20 %) после первого введения Имутерана в дозе 46,25 мг (92,5 % от первоначальной) из-за побочных реакций лечение было прекращено.

Существенного влияния Имутерана на основные показатели периферической крови (гемоглобин, лейкоциты, тромбоциты), свертывающей системы (протромбиновое время, фибриноген, РКМФ этаноловый тест, толерантность плазмы к гепарину) и биохимию (глюкоза, креатинин, билирубин, общий белок, трансаминазы, щелочная фосфатаза) не отмечено.

В результате I фазы клинических испытаний программа эскалации доз была выполнена полностью. При введении Имутерана в дозе 46,25 мг (925 % от первоначальной) у 2 из 3 пациенток отмечены реакции, потребовавшие прекращения лечения. Основными побочными эффектами Имутерана были реакции гиперчувствительности (озноб, коллапс, крапивница, отек Квинке). Для II фазы клинических испытаний был рекомендован следующий режим лечения: Имутеран по 35 мг (700 % от стартовой дозы) внутривенно капельно 1 раз в неделю 4 введения. Для профилактики реакций гиперчувствительности была рекомендована премедикация: дексаметазон 20 мг в/м, димедрол 1 % — 3,0 в/м за 30 мин до введения.

### III. 2. Промежуточные результаты II фазы клинических испытаний Имутерана

В рамках проводимой программы лечение Имутераном по II фазе получили 20 больных диссеминированными злокачественными опухолями (табл. 6), у которых возможности других методов специфического лечения были полностью исчерпаны (в том числе проведено по 3-5 линий химиотерапии).

Метастазы в печень были выявлены в 45 % случаев (9 из 20), в лимфоузлы — в 35 % (7 из 20), в кости — в 20 % (4 из 20), в легкие — в 20 % (4 из 20, в 1 случае в сочета-

Таблица 6.

**Распределение больных в зависимости от нозологии (II фаза клинических испытаний Имутерана)**

Диагноз	Число больных
Рак молочной железы	6
Рак толстой кишки	5
Рак яичников	6
Рак маточной трубы	2
Эп. гегрминог. опухоль яичников	1
Всего	20

нии с плевритом), диссеминация по брюшине — в 30 % (6 из 20), метастазы в мягкие ткани — в 10 % (2 из 20), рецидив в малом тазу — в 20 % случаев (4 из 20). Большинство больных (13 из 20) имели сочетанное поражение органов и систем (от 2 до 4).

На первом этапе II фазы 7 пациентов получали лечение в следующем режиме: по 35 мг в/в кап. 1 раз в нед. — 4 введения, с последующим 3-недельным перерывом. В дальнейшем лечение осуществлялось еженедельно, без перерыва, до запланированного контрольного обследования.

Всего проведено 26 курсов лечения (23 полных и 3 неполных): 16 пациентов получили по 1 курсу, 3 — по 2 курса и еще 1 — 4 курса лечения Имутераном.

У 85 % больных (17 из 20) при проведении 23 курсов из 26 (88,5 %) осложнений не отмечено.

У 2 пациенток при проведении 1-го курса лечения на 2-м и 3-м введениях препарата соответственно развилась аллергическая реакция в виде бронхоспазма в сочетании с аллергическим дерматитом и бронхоспазма в сочетании с отеком Квинке. У одной пациентки во время 1-го курса развился парез кишечника, имитирующий кишечную непроходимость (по месту жительства произведено хирургическое вмешательство). Таким образом, у 15 % больных (3 из 20) зарегистрирована неприемлемая токсичность, потребовавшая прекращения лечения (эффективность его в этих случаях не оценивалась).

Еще у одной пациентки после повторного пересмотра гистологических препаратов в РОНЦ установлен диагноз злокачественной герминогенной опухоли яичников, из анализа эффективности больная исключена, т.к. опухоли неэпителиальной природы не экспрессируют MUC-1.

Таким образом, эффективность Имутерана оценена у 16 больных, результаты представлены в табл. 7.

Объективных регрессий опухоли не наблюдалось.

У 6 из 16 пациентов (37,5 %, включая 1 случай минимальной регрессии) отмечена стабилизация процесса со средней продолжительностью  $11,8 \pm 4,3$  нед., медиана — 10 нед. Контроля роста опухоли удалось достигнуть у 2 из 4 больных раком молочной железы (длительность стабилизации 15 нед. и 9 нед.); у 2 из 5 больных раком толстой кишки (длительность 9 нед. и 9 нед.) и у 2 из 2 больных раком маточной трубы (длительность 19 нед. и 11 нед.). Следует отметить, что все 6 больных со стабилизацией лечения Имутераном начинали на фоне прогрессирования, ранее им было проведено по 3–5 линий химиотерапии.

Прогрессирование болезни выявлено в 62 % случаев (10 из 16).

Влияния препарата на показатели периферической крови, биохимию и свертывающую систему во время проведения II фазы клинических испытаний также не отмечено.

Оценивая промежуточные результаты II фазы клинических испытаний Имутерана, необходимо отметить, что препарат может сдерживать прогрессирование процесса, давая стабилизации у трети больных с диссеминированными злокачественными эпителиальными опухолями, такими как рак маточной трубы, молочной железы и толстой кишки. У части больных (10–15 %), несмотря

Таблица 7.

**Эффективность Имутерана (II фаза клинических испытаний)**

Диагноз	Число б-х/ оценено	Число курсов/ полных	Эффект (оценено 16 больных)
Рак молочной железы	6 (4)	7 (5)	2/4 – стабилизация 15 и 9 нед. 2/4 – прогрессирование 2 – не оценены (аллергическая реакция, лечение прекращено)
Рак толстой кишки	5 (5)	6 (6)	2/5 – стабилизация 9 и 9 нед. 3/5 – прогрессирование
Рак яичников	6 (5)	6 (5)	5/5 – прогрессирование 1 – не оценена (парез кишечника – лечение прекращено)
Рак маточной трубы	2 (2)	6 (6)	2/2 – стабилизация 19 и 11 нед.
Всего	19 (16)	25 (22)	6/16 (37,5 %) – стабилизация 11,8+4,3 нед (медиана 10 нед.) 10/16 (62,5 %) - прогрессирование

на проведение премедикации, возникают тяжелые побочные реакции гиперчувствительности, вероятно, обусловленные тем, что Имутеран является препаратом нативных мышинных моноклональных антител, что затрудняет проведение клинических испытаний. Возможность избежать или значительно уменьшить эти реакции заключается в создании гуманизированных МКА, позволяющих свести к минимуму направленный на них иммунный ответ реципиента. В настоящее время такие работы уже ведутся под руководством академика РАН Г. П. Георгиева.

**Литература**

1. Артамонова Е.В., Овсянников С.В., Тупицын Н.Н. и др. Иммунологическая диагностика метастазов рака молочной железы и рака желудка в лимфатические узлы. Врач. — 2003. — №1. — С.34-6.
2. Артамонова Е.В., Тупицын Н.Н., Кадагидзе З.Г. и др. Роль эпителиальных антигенов в диагностике и стадировании рака молочной железы. Архив патологии. — 2002. — Том 64, № 6. — С. 13-15.
3. Артамонова Е.В., Паниченко А.В., Рязанцева С.Н. и др. Моноклональные антитела в диагностике метастазов рака молочной железы. IX Российский национальный конгресс «Человек и лекарство». — Москва, 8 — 12 апреля 2002г. — Тез. Докл., С. 29.
4. Барышников А.Ю., Тоневицкий А.Г. Моноклональные антитела в лаборатории и клинике. — М.: ВНИТЦ. — 1997. — С.99-105.
5. Барышников А.Ю. Моноклональные антитела в биотерапии рака. Мат. I Всерос. Научно-практ. Конф. «Биотерапия рака». — Москва, 18-20 июня 2002 г. — С.15-17.
6. Кармакова Т.А. Моноклональные антитела к антигену мембран жировых глобул женского молока и их использование при морфологическом исследовании опухолей человека: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — М.: — 1997. — 24С.
7. Кармакова Т.А., Немцова Е.Р., Безбородова О.А. и др. Имутеран — новый пре-

парат для иммунотерапии рака. Мат. I Всерос. Научно-практ. Конф. «Биотерапия рака». — Москва, 18-20 июня 2002г. — С.33-35.

8. *Овсянников С.В., Давыдов М.И., Тупицын Н.Н.* и др. Иммуноморфологическое обоснование расширенных лимфодиссекций при раке желудка. Онкология и радиология Казахстана. — 2002. — Т. 1, № 2. — С. 42-48.

9. *Якубовская Р.И.* Антигены молочной железы человека и возможности их использования в диагностике и терапии опухолей: Авторф. дис. ... д-ра биол. наук. — М.; 1992. — 69С.

10. *Blockzijl A., Nilsson K., Nilsson O.* Epitope characterization of MUC1 antibodies. Tumor Biology. — 1998. — V.19, suppl.1. — P. 46-56.

11. *Brandlein S., Pohle T., Ruoff N.* et al. Cancer Research. -2003. -V.63. -P.7995-8005.

12. *Carmon L., El-Shami K.M., Paz A.* et al. Novel breast-tumor-associated MUC1-derived peptides: characterization in Db-/- x beta2microglobulin (beta2m) null mice transgenic for a chimeric HLA-A2.1/Db- beta2microglobulin single chain»// Int.J.Cancer. — 2000. — V.85, N3. — P.391-397.

13. *Guckel B., Rentzsch C., Stumm S.* et al. Cellular vaccination strategies in the treatment of breast cancer. An.Oncol. — 2002. — V.13, Suppl.5. — P.58.

14. *Imai S., Haga S. and Kiyozuka Y.* Epitope characterization of MUC-1 antibodies. Tumor Biology. — 1998. — V.19, suppl.1. — P. 30-34.

15. *Jiang X.P., Yang D.C., Elliott R.L., Head J.F.* Vaccination with a mixed vaccine of autogenous and allogeneic breast cancer cells and tumor associated antigens CA15-3, CEA and CA125 — results in immune and clinical responses in breast cancer patients. Cancer Biother. Radiopharm. — 2000. — V.15, N5. — P.495-505.

16. *Karmakova T., Bezborodova O., Nemtsova E., Yakubovskaya R.* Antitumor efficiency of monoclonal antibody in therapy of nude mice with xenograft of human colon carcinoma. Proceed. 10th NCI-EORTC Symp. On New Drugs in cancer therapy, Amsterdam, 1998, p.88.

17. *Machetti A., Buttitta F., Bertacca A.* et al. mRNA markers of breast cancer nodal metastases: comparison between mammaglobin and carcinoembryonic antigen in 248 patients. J.Pathol. — 2001. — V.195, N 2. — P.186-190.

18. *Norum L.F., Varaas T., Kierulf B., Nustad K.* Carcinoma-associated MUC-1 detected by immunoradiometric assays. Tumor Biology. — 1998. — V.19, Suppl.1. — P.134-146.

19. *Petrakou E., Murray A., Price M.R.* Epitope mapping of anti- MUC-1 Mucin protein core monoclonal antibodies. Tumor Biology. — 1998. — V.19, suppl.1. — P. 21-29.

20. *Price M.R., Rye P.D., Petrakou E.* et al. Summary report on the ISOBM TD-4 Workshop: analysis of 56 monoclonal antibodies against the MUC-1 mucin. Tumor Biology. — 1998. — V.19, suppl.1. — P. 1-20.

21. *Rye P.D., McGuckin M.A.* MUC1: antibodies and immunoassays. Tumor Biology. — 2001. — V.22, N4. — P. 269-272.

22. Taylor-Papadimitriou J. Report on the First International Workshop on Carcinoma-Associated Mucins. Int.J.Cancer. — 1991. — V.49. — P.1-5.

23. *Xing P.X., Tjandra J., Reynolds K.* et al. Reactivity of anti-human milk fat globule antibodies with synthetic peptides. J.Immunol. — 1989. — V.142. — P.3503-3509.

*Н. А. Купрышина*

## ИММУНОФЕНОТИПИЧЕСКАЯ И МОРФОЦИТОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ОСТРЫХ МИЕЛОИДНЫХ ЛЕЙКОЗОВ С ЭКСПРЕССИЕЙ АНТИГЕНА СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК CD34

ГУ РОНЦ имени Н.Н. Блохина РАМН

### Резюме

Морфоцитохимическое и иммунофенотипическое исследование blasts выполнено у 81 больного острым миелоидным лейкозом: M0 — 10 (12,3 %), M1 — 18 (22,2 %), M2 — 18 (22,2 %), M3 — 5 (6,2 %), M4 — 17 (21 %), M5 — 8 (9,9 %), M6 — 3 (3,7 %) больных, M7 и смешанно-линейный — по 1 пациенту. Частота экспрессии CD34 при различных ФАБ — вариантах составила: M0 — 100 %, M1 — 66,7 %, M2 — 94,4 %, M3 — 20,0 %, M4 — 78,6 %, M5 — 50,0 %. Антиген присутствовал на клетках всех 3 больных вариантом M6, у больного смешанно-линейным лейкозом и отсутствовал при M7 ОМЛ. CD34-позитивные ОМЛ характеризуются достоверно более низким содержанием в лейкозном клоне морфологически дифференцированных миелобластов с зернистостью ( $p = 0,000$ ) и монобластов с типичной моноцитотидной формой ядер ( $p = 0,001$ ) по сравнению с CD34-негативными. Отличительными цитохимическими признаками CD34-позитивных ОМЛ являются низкая активность миелопероксидазы (МПО) при M0-M3 ОМЛ ( $p = 0,003$ ) и ингибируемой  $\alpha$ -нафтилацетат эстеразы при M4-M5 ( $p = 0,006$ ), а также сниженное содержание липидов ( $p = 0,005$ ) и PAS-положительного вещества в диффузной форме ( $p = 0,000$ ). Иммунофенотипической особенностью CD34+ по сравнению с CD34- ОМЛ являются более высокие уровни экспрессии маркеров ранних этапов гранулоцитарной дифференцировки: HLA-DR ( $p = 0,000$ ) и CD38 ( $p = 0,000$ ). Установлена прямая корреляционная зависимость экспрессии антигена CD34 с молекулой CD13 ( $p = 0,01$ ) и обратная с CD33 ( $p = 0,0001$ ). Примерно в четверти случаев (23,4 %) ОМЛ обнаруживаются бласты с фенотипом лейкоэмических стволовых клеток (ЛСК) CD34+CD38-. Оценка дисплазии клеток остаточного гранулоцитарного роста была выполнена в 58 (71,6 %), эритроидного — в 55 (67,9 %) и мегакариоцитарного — в 56 (69,1 %) наблюдениях. Стволовклеточный антиген CD34- (>10 %) экспрессировался у 62 из 81 больного (76,5 %). Для ОМЛ с экспрессией антигена CD34 характерна дисплазия клеток гранулоцитарного роста, выявляемая почти вдвое чаще, чем в CD34-негативном. Установлена прямая корреляция пропорции CD34+ blasts с наличием пельгероидных форм нейтрофилов ( $p = 0,002$ ).

**Ключевые слова:** Острый миелобластный лейкоз (ОМЛ), стволовклеточный антиген CD34, миелопероксидаза (МПО).

UDK: 616-006,446,8-097.616-076.5:612.419.014

*Kupryshina N.A.*

## IMMUNOLOGICAL AND MORPHOCYTOCHEMICAL PECILIARITIES OF CD34- POSITIVE ACUTE MYELOID LEUKAEMIA

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

### Abstract

Morphocytochemical and immunophenotic peculiarities of CD34+ blast cell cases were investigated in 81 patients newly diagnosed acute myeloid leukemia (AML). AML M0 FAB subtype was diagnosed in 10 (12,3 %) patients, in 18 (22,2 %) — AML M1, in 18 (22,2 %) — AML M2, in 5 (6,2 %) — AML M3, in 17 (21,0 %) — AML M4, in 8 (9,9 %) — AML M5, in 3 (3,7 %) — AML M6. AML M7 and mixed-linear subtypes were also detected. Stem cell antigen CD34 (? 10 %) was present in 62/81 (76,5 %) pts. The CD34-positive were 100 % AML M0 patients, 66,7 % — AML M1, 94,4 % — AML M2, 20,0 % — AML M3, 78,6 % — AML M4, 50,0 % — AML M5 pts. The specific peculiarities of CD34+ compared to CD34- cases were as follows: morphological — less prominent granularity ( $p = 0,0001$ ) and monocytoid shape nuclei ( $p = 0,001$ ); cytochemical — lower MPO activity in M0 — M3 cases ( $p = 0,003$ ) and ANAE in M4 — M5 cases ( $p = 0,006$ ) as well as sudan black positivity ( $p = 0,005$ ) and diffuse PAS-positivity ( $p = 0,0001$ ); immunophenotypic — higher levels of HLA-DR ( $p = 0,0001$ ) and CD38 ( $p = 0,0001$ ). Proportion of CD34+ blasts was in positive correlation with CD13+ ones ( $p = 0,01$ ), and in negative correlation with CD33+ ones ( $p = 0,0001$ ). Leukemic stem cells (CD34+CD38-) were noted in 23,4 % AML cases. The definition of dysgranulopoiesis, dyserythropoiesis and dysmegakaryopoiesis was performed in 58 (71,6 %) and 55 (67,9 %) and 56 (69,1 %) of cases respectively. Dysplasia of granulocytes in AML CD34+ was observed 2 times more frequent compared to CD34- AML. Moreover, CD34 expression was associated with the count of pseudo Pelger-Huet anomaly granulocytes ( $p = 0,002$ ).

**Key words:** acute myeloid leukemia (AML), stem cell antigen CD34, myeloperoxidase (MPO).

### Список сокращений

- ГСК — гемопоэтическая стволовая клетка
- ДГ — дисплазия клеток гранулоцитарного роста
- ДЛД — двухлинейная дисплазия
- ДМ — дисплазия клеток мегакариоцитарного роста
- ДЭ — дисплазия клеток эритроидного роста
- ЛСК — лейкемическая стволовая клетка
- МДС — миелодиспластический синдром
- МкАТ — моноклональное антитело
- МКЦ — мегакариоцит

- МЛД — мультилинейная дисплазия  
МПО — миелопероксидаза  
НЭ — неспецифическая эстераза ( $\alpha$ -нафтилацетат эстераза)  
ОМЛ — острый миелоидный лейкоз  
СКК — стволовая кроветворная клетка  
ТЛД — трехлинейная дисплазия

## Введение

Диагностика острых миелоидных лейкозов (ОМЛ) традиционно основывается на сравнительных морфологическом, цитохимическом и иммунофенотипическом принципах. Бластные клетки гранулоцитарных лейкозов имеют сходство с нормальными клетками гранулоцитарной линии по наличию зернистости и активности фермента миелопероксидазы (МПО). Монобластные лейкозы сходны с нормальными клетками этой линии по морфологии клеток, форме ядра и активности фермента неспецифической эстеразы. На основании степени выраженности морфоцитохимических признаков выделяют варианты ОМЛ, различающиеся по степени дифференцированности бластов (M0-M3, M5a, M5b и т. д.). При отсутствии четких морфоцитохимических характеристик бластов важную роль в диагнозе имеет иммунофенотип, подтверждающий миелоидную природу лейкоза и степень зрелости бластных клеток. Особенно важную роль иммунофенотипирование играет при эритробластных (M6), мегакариобластных (M7) и ОМЛ с минимальной дифференцировкой (M0).

Важно подчеркнуть, что морфологические и цитохимические признаки позволяют идентифицировать наиболее зрелую фракцию бластных клеток, имеющих четкие признаки той или иной гемопозитической линии. Вместе с тем, установление линейной принадлежности бластов не дает информации относительно уровня злокачественной трансформации и структуры лейкозного клона.

При современной интенсивной полихимиотерапии ОМЛ прогностическая роль большинства традиционных клинических, гематологических и морфоцитохимических (ФАБ-вариант) признаков в прогнозе ОМЛ нивелируется (И.Г. Маркина, Н.Н. Тупицын, Л.Ю. Андреева, 2002). Все это диктует необходимость поиска новых молекулярных критериев диагностики и прогноза ОМЛ.

В современной классификации ВОЗ 2001 г. наряду с традиционными морфоцитохимическими и иммунофенотипическими признаками бластных клеток учитываются молекулярные и цитогенетические характеристики, такие как наличие повторяющихся хромосомных aberrаций и специфических изменений (дисплазии) клеток остаточного миелопоэза.

Наряду с этим в литературе широко освещаются вопросы изучения возможностей использования в диагностике показателей наименее зрелой фракции ОМЛ. Современные методы позволяют идентифицировать ранние CD34+ предшественники и проводить их детальный иммунофенотипический и функциональный анализ. Перспективность изучения фракций стволовых клеток в лейкоэмическом клоне определяется следующими положениями:



1. Во фракции CD34+ бластных клеток при ОМЛ находятся лейкозные стволовые клетки. Существуют данные (Н.Т. Hassan, A. Zander, 1996; Costello R.T. et al., 2000) о том, что от уровня их представительства в лейкозном клоне и степени их эрадикации в ходе терапии зависят результаты лечения в целом.

2. С фракцией CD34+ клеток в лейкозном клоне достоверно часто ассоциируется aberrантный иммунофенотип злокачественных клеток и экспрессия линейно не свойственных антигенов, что может служить основой для мониторинга минимальной резидуальной болезни (МРБ) (A. Macedo, A. Orfao, M. Gonzales et al., 1995, D.M. Bahia, M. Yamamoto, M.L. Chauffaile et al., 2001).

3. Многочисленными работами показана ассоциация резистентности blastов с наличием фракции CD34+ лейкозных клеток, что может определять неудовлетворительные результаты лечения у этих больных (O. Legrand, S. Zompi, J.Y. Perrot et al., 2004).

4. Одним из методов лечения больных ОМЛ является высокодозная химиотерапия с аутологичной трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток (ГСК). Это требует четкой характеристики CD34+ стволовых клеток с целью разграничения нормального и лейкозного клонов (J.L. Harousseau, J.Y. Cahn, Pignon et al., 1997, P.A. Cassileth, D.P. Harrington, F.R. Appelbaum et al., 1998).

Проведение анализа, направленного на характеристику наиболее "ранней" фракции бластных клеток, стало возможным с открытием специфического маркера стволовых клеток — антигена CD34 — в середине 1980-х гг.

Относительно влияния на прогноз данные по экспрессии CD34 противоречивы: одни авторы указывают на неблагоприятный прогноз CD34-позитивных случаев (S.J. Wells, R.A. Bray, L.L. Stempora et al., 1996, Н.Т. Hassan, A. Zander, 1996), обратную корреляцию с частотой полных ремиссий (E. Solary, R.O. Casasnovas, L. Campos et al., 1992), другие не отмечают связи с прогнозом (S. Ciolli, F. Leoni, R. Saporal et al., 1993). Определенную роль играет не только процентное содержание CD34+ blastов в лейкозном клоне, но и уровни экспрессии антигена (G.M. Rigolin, F. Lanza, L. Ferrari et al., 1995).

Многочисленные работы показали неблагоприятную прогностическую роль экспрессии CD34 при ОМЛ (D. Raspadori, F. Lauris, M.A. Ventura et al., 1997, R. Costello, F. Malet, H. Chambost et al., 1999). Эти данные подтверждены исследованиями, проводимыми в клинике ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН (И.Г. Маркина, Н.Н. Тупицын, Л.Ю. Андреева, 2002, О.Ю. Баранова, М.А. Волкова, М.А. Френкель, 2005).

Следует отметить, что возможности исследования наименее зрелого компонента бластных клеток при ОМЛ весьма ограничены, однако, помимо CD34 в последние годы к маркерам бластных клеток добавились такие как AC 133, CD117 (в сопоставлении с другими общемиелоидными маркерами), а также целый ряд линейно не рестриктированных антигенов — HLA-DR, CD71, CD38 и т.д.

Таким образом, исследование наиболее ранней фракции бластных клеток ОМЛ, экспрессирующих антиген CD34, представляется в настоящее время актуальным.

### Материалы и методы

Исследуемую группу составил 81 больной острым миелоидным лейкозом (ОМЛ). У всех пациентов диагноз установлен впервые, без предшествующего химиолучевого лечения или миелодиспластического синдрома (МДС). В группу были включены больные, проходившие обследование в лаборатории иммунологии гемопоэза (руководитель д.м.н., профессор Н.Н. Тупицын) ГУ РОНЦ имени Н.Н.Блохина РАМН (директор — академик, профессор М.И. Давыдов) за период с 2003 по 2005 гг.

Среди обследованных больных несколько больше было женщин — 47 (58,0 %), чем мужчин — 34 (42,0 %). Средний возраст у мужчин и у женщин больных ОМЛ не различался: муж. —  $46,1 \pm 3,1$  лет, жен. —  $48,6 \pm 2,6$  г. соответственно.

Морфологическое, цитохимическое и иммунофенотипическое исследование бластов производилось в аспиратах костного мозга. Забор костного мозга в количестве 0,5–1 мл осуществлялся в пробирки Vacutainer с сухим ЭДТА. Из присланного материала готовили мазки костного мозга для морфологического и цитохимического исследования, с оставшимися клетками проводили иммунофенотипирование.

Показатели клеточности костного мозга оценивали в соответствии с нормативами, указанными Воробьевым А.И., Бриллиант М.Д., Андреевой Н.Е. и соавт. (1985). Клеточность костного мозга подсчитывали в камере Горяева, содержание миелокариоцитов выражали в количестве клеток  $\times 10^9$  /л. Количество мегакариоцитов определяли в камере Горяева (в пересчете  $\times 10^6$ /л) и на мазках костного мозга при морфологическом подсчете, а также контролировали в мазках, окрашенных на неспецифическую эстеразу.

Подсчет миелограммы производился двумя независимыми морфологами (по 250 клеток) на мазках костного мозга, окрашенных по методу Паппенгейма.

У всех больных выполняли подсчет бластограммы, включающий определение размера бластов, ядерно-цитоплазматического соотношения, соотношения клеток с правильными и неправильными формами ядер, количества бластов, содержащих зернистость и палочки Ауэра, числа клеток с вакуолизацией цитоплазмы и степени ее базофилии.

При цитохимическом исследовании определяли активность ферментов миелопероксидазы (МПО),  $\alpha$ -нафтил-ацетат эстеразы (НЭ) самостоятельно и в реакции с ингибированием фторидом натрия (NaF), наличие липидов в реакции с суданом черным Б, PAS — положительного вещества в диффузной или гранулярной форме. Количество бластов с положительной цитохимической реакцией выражалось в процентах.

ОМЛ у всех больных устанавливался на основании ВОЗ классификации (2001 г.), число бластных клеток во всех случаях превышало 20 %. Вариант ОМЛ определялся в соответствии с критериями ФАБ-классификации 1991г. (J.M. Bennet, D. Catovsky, M.T. Daniel et al., 1991) с учетом морфоцитохимических и иммунофенотипических характеристик бластных клеток.

Распределение больных по ФАБ-вариантам представлено в табл. 1.

Иммунофенотипирование у всех больных проводилось методом прямой иммунофлуоресценции с использованием тройной флуоресцентной метки. Панель мо-

ноклональных антител включала антитела к общелейкоцитарному антигену CD45, стволовоклеточному антигену CD34, линейно-нерестриктированным антигенам CD38 и HLA-DR, антигенам миелоидной линии дифференцировки CD13 и CD33, моноцитарной — CD14 и CD64, эритроидной — гликофорин А (GlyA), мегакариоцитарной — CD61, общему антигену острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ) — CD10, В-, Т-линейным и NK-клеточному антигену CD56. Маркер расценивался как положительный, при обнаружении его на более чем 10 % лейкоэмических клеток для CD34 и на более чем 20 % бластов для остальных антигенов. Панель исследования бластов у больных ОМЛ представлена в табл. 2.

Анализ данных иммунофенотипирования проводился методом проточной цитофлуориметрии на приборе FACScan (Becton Dickinson, США). Собиралось не менее 10 000 событий.

Установление гейта бластных клеток проводилось на основании характеристик светорассеяния в метке с общелейкоцитарным антигеном CD45 (Иммунодиагностика гемобластозов человека. Пособие для врачей. Н.Н.Тупицын и др., 2003). Бластные клетки характеризуются более слабой экспрессией CD45 в сравнении с лимфоцитами и более низкими характеристиками светорассеяния в сравнении со зрелыми/ созревающими клетками гранулоцитарного ряда. Принцип метода представлен на рис. 1.

Помимо бластных клеток были оценены особенности остаточных элементов миелопоэза. Был проведен анализ частоты признаков дисплазии гранулоцитарного, эритроидного и мегакариоцитарного ростков. Оценка дизгемопоэза проводилась двумя независимыми цитологами.

Диагностика дисплазии элементов гранулоцитарного, эритроидного и мегакариоцитарного ростков основывалась на принципах классификации ВОЗ 2001 г. Дисплазия должна быть представлена более чем в 50 % клеток каждой гемопоэтической линии. Обычно подсчитывается 100 клеток гранулоцитарного и эритроидного ростков. Однако в связи с цитопенией практически дисплазия регистрирует-

Таблица 1.

**Распределение больных ОМЛ по ФАБ-вариантам**

Вариант	Число больных	
	Абсолютное	%
M0 (малодифференцированный миелобластный)	10	12,3
M1 (миелобластный без созревания)	18	22,2
M2 (миелобластный с созреванием)	18	22,2
M3 (промиелоцитарный)	5	6,2
M4 (миеломонобластный)	14	17,3
M4 эоз (миеломонобластный с эозинофилией)	3	3,7
M5a (монобластный без созревания) и M5b (монобластный с созреванием)	5/8	9,9
M6 (эритробластный)	3	3,7
M7 (мегакариобластный)	1	1,2
Смешанно-линейный	1	1,2
Всего	81	100

Таблица 2.

## Панель исследования бластов больных ОМЛ

Показатели	Анализируемый признак	Число обследованных больных (%)		
Морфологические	1. % бластов	81 (100)		
	2. бластограмма	81 (100)		
Цитохимические	1. Пероксидаза	80 (98,8)		
	2. Липиды	52 (64,2)		
	3. PAS-положительное вещество	80 (98,8)		
	4. α-нафтил-ацетат эстераза с ингибированием NaF	80 (98,8)		
Имунофенотипические	1. Ранний антиген CD34	81 (100)		
	2. Общелейкоцитарный АГ CD45	81 (100)		
	3. Линейно-нерестриктированные АГ CD38	76 (93,8)		
	4. Миелоидные	HLA-DR	81 (100)	
		CD13	81 (100)	
		CD33	81 (100)	
	5. Монокитарные	CD64	55 (67,9)	
		CD14	19 (23,5)	
	6. Общий АГ ОЛЛ	CD10	79 (97,5)	
		CD19	81 (100)	
		CCD20	76 (93,8)	
	7. В-линейные	CD23	72 (88,9)	
		8. Т-линейные CD7	CD3	81 (100)
			CD5	76 (93,8)
	9. NK-клеточный	CD4	72 (88,9)	
		CCD8	72 (88,9)	
		CD56	70 (86,4)	

ся при подсчете, по крайней мере, 25 клеток гранулоцитарного и эритроидного ряда и 5 мегакариоцитов (или наличие трех дисплазированных МКЦ). Соответственно количеству диагностированных клеточных линий с признаками дисплазии принято различать одно-, двух- и трехлинейную дисплазию. В то же время в классификации ВОЗ выделяется в отдельный вариант ОМЛ с мультилинейной дисплазией, включающий изменения 2 или 3 линий миелопоэза.

В нашей работе при анализе дисплазии был произведен парциальный подсчет числа нормальных и различных видов дисплазированных форм клеток в каждой клеточной популяции (гранулоцитарной, эритроидной, мегакариоцитарной).

При подсчете дисплазированных форм нейтрофилов (гранулоцитограмма) нами учитывалось наличие гипогранулярных и пельгероидных форм нейтрофилов, а также содержание МПО в нейтрофилах. Определение дисплазии клеток эритроидного ростка включало в себя подсчет клеток с мегалобластоидными чертами и признаками дисплазии. При наличии расширенного эритроидного ряда проводилось окрашивание мазков костного мозга на сидерофильные гранулы. Дисплазия мегакариоцитарного ростка основывалась на определении одноядерных клеток и микроформ мегакариоцитов на мазках костного мозга, окрашенных по методу Паппенгейма и на мазках, окрашенных на неспецифическую эстеразу. Мегака-

риоциты (МКЦ) содержат фермент неспецифическую эстеразу, не ингибируемую фторидом натрия, и становятся легко различимы в световом микроскопе. Этот метод помогает распознавать микро- и одноядерные формы МКЦ, трудно различимые при морфологической окраске (табл. 3).

Оценка дисплазии клеток гранулоцитарного ростка была выполнена в 58 (71,6 %), эритроидного — в 55 (67,9 %) и мегакариоцитарного — в 56 (69,1 %) наблюдениях.

Анализ данных цитометрии проводили на ПК с использованием программы WinMDI.

Статистическая обработка данных включала корреляционный анализ, сравнение средних. Для определения достоверности параметрических признаков применялся критерий Стьюдента. Сравнительный анализ непараметрических данных

Таблица 3.

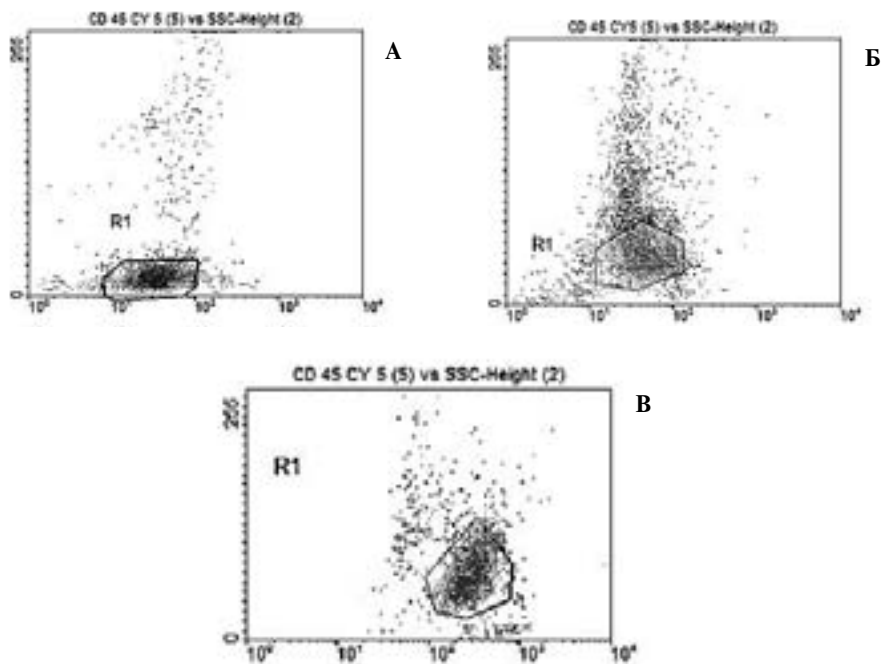
### Морфологические и цитохимические показатели миелопоэза больных ОМЛ

Росток миелопоэза	Показатель	Количество обследованных больных / общее кол-во больных, %
Гранулоцитарный росток	1. Морфологические: - нормальные - пельгероидные - гипогранулярные	58 / 81 (71,6)
	2. Активность МПО	58 / 81 (71,6)
Эритроидный росток	1. Морфологические: - нормальные - мегалобластоидные - дисплазированные	55 / 81 (67,9)
	2. Кольцевые сидеробласты	2 / 81 (2,5)
Мегакариоцитарный росток	Морфологические: - нормальные - одноядерные - микроформы	56 / 81 (69,1)
Двухлинейная дисплазия (ДЛД)	-	56 / 81 (69,1)
Трехлинейная дисплазия (ТЛД)	-	40 / 81 (49,4)

производился при помощи построения таблиц сопряженности признаков (с использованием критерия  $\chi^2$ ). Статистический анализ проведен с использованием статистической программы SPSS 10.0 для Windows.

### Результаты исследования

В нашем исследовании стволовых клеточный антиген CD34  $\geq 10$  % определялся у 62 из 81 больного ОМЛ (76,5 %). Частота экспрессии антигена при различных ФАБ-вариантах составила: М0 — 100 %, М1 — 66,7 %, М2 — 94,4 %, М3 — 20,0 %, М4 — 78,6 %, М4эоз — 100 %, М5 — 50 %. Антиген CD34 присутствовал на клетках



**Рис. 1. Выделение гейта бластных клеток на основании характеристик светорассеяния и экспрессии общелейкоцитарного антигена CD45:**

А — гейт бластных клеток при M0 ОМЛ;

Б — гейт бластных клеток при M2 ОМЛ;

В — гейт бластных клеток при M5 ОМЛ

всех 3 больных M6 вариантом, у больного смешано-линейным лейкозом и отсутствовал при M7 (1 наблюдение).

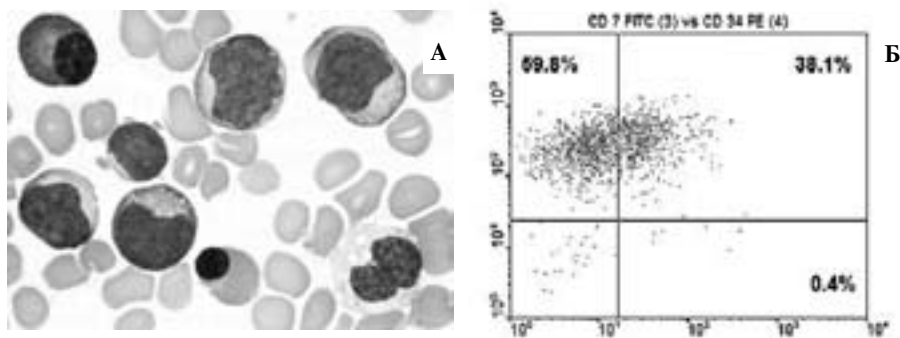
Проведенные нами исследования свидетельствуют о том, что высокие уровни экспрессии этого антигена ( $> 50\%$ ) были характерны только для бластных клеток с минимальными признаками дифференцировки (рис. 2А — см. 3 стр. обложки, 2Б). При варианте M0 антиген CD34 более чем в  $50\%$  клеток был выявлен во всех случаях, число CD34+ клеток в среднем составило  $82,5\%$ . При всех остальных вариантах ОМЛ (M1–M6) среднее число CD34-положительных клеток не превышало  $50\%$  ( $11,0\text{--}49,1\%$ ) и было достоверно ниже ( $p < 0,01$ ) (рис. 3). Полученные результаты свидетельствуют о том, что интенсивность экспрессии стволовклеточного антигена на ранних предшественниках принципиально отличается от наличия его на более дифференцированных клетках.

Проведенный корреляционный анализ между экспрессией антигена CD34 и морфоцитохимическими характеристиками бластов выявил ряд закономерностей. Экспрессия антигена CD34 достоверно ассоциировалась с низкими показателями содержания зернистости ( $r = -0,51$ ;  $p = 0,000$ ), числа судан-позитивных ( $r = -0,38$ ;  $p = 0,005$ ) и PAS-позитивных бластов ( $r = -0,43$ ;  $p = 0,000$ ), то есть отмечалась обратная корреляционная связь между интенсивностью экспрессии CD34 и морфоцитохимическими параметрами, характерными для дифференцировки миелобластов. Взаимосвязь между экспрессией CD34 и МПО, в целом по всей группе больных ОМЛ отсутствовала ( $p = 0,08$ ), однако достоверная отрицательная корреляция была установлена при M0-M4 вариантах ( $p = 0,02$ ), при которых экспрессия МПО является диагностическим маркером (рис. 4). Эта достоверность увеличивалась при анализе гранулоцитарных (M1-M3) вариантов лейкоза ( $p = 0,003$ ).

Аналогичное исследование было выполнено для оценки связи между экспрессией антигена CD34 и признаками, специфичными для монобластов. Установлено, что имела обратная корреляционная зависимость экспрессии антигена CD34 с числом бластов с неправильной (моноцитойдной) формой ядер ( $r = -0,36$ ;  $p = 0,001$ ) и активностью фермента неспецифической эстеразы ( $r = -0,30$ ;  $p = 0,006$ ).

Полученные данные свидетельствуют о том, что высокий уровень экспрессии на большинстве бластов характерен для наименее зрелых предшественников M0 и утрачивается по мере дифференцировки бластных клеток, выявляемой с помощью морфоцитохимических методов.

В норме в популяции CD34+ стволовых кроветворных клеток (СКК) отсутствует активность МПО. Этот фермент появляется в клетках, коммитированных в гранулоцитарном направлении. Особый интерес представляют наблюдения с высо-



**Рис. 2.** Картина костного мозга и экспрессия антигена CD34 на бластах при M0 варианте ОМЛ:

А. — Бластные клетки при M0 ОМЛ;

Б. — CD7 FITC—CD34 PE

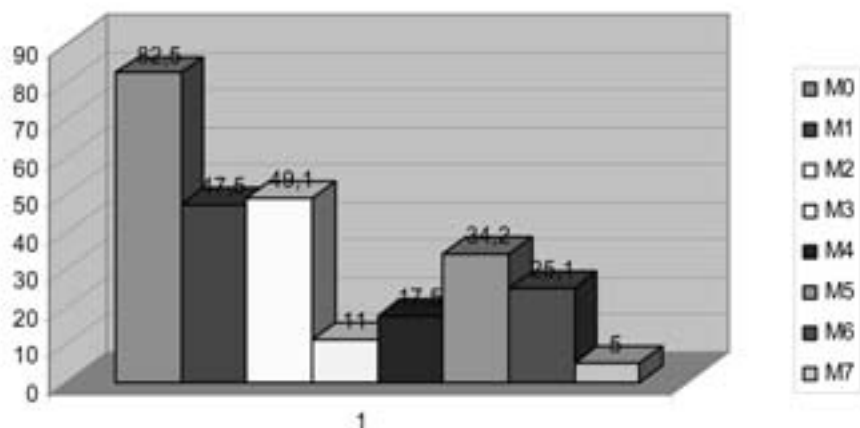


Рис.3. Показатели экспрессии антигена CD34 при различных ФАБ-вариантах

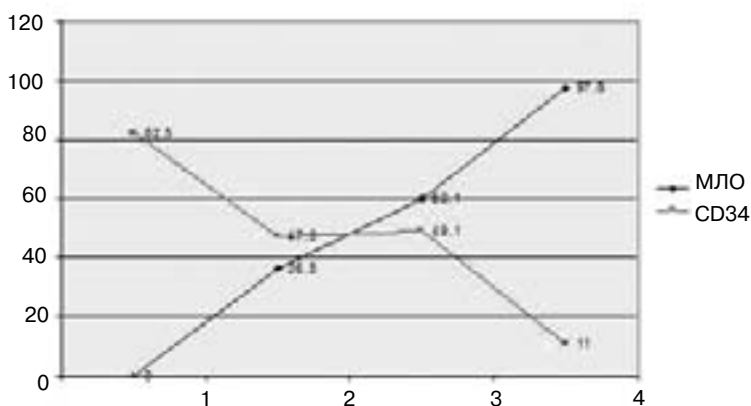


Рис. 4. Показатели активности МПО и экспрессии антигена CD34 при M0-M3 вариантах ОМЛ:

1. — M0 ОМЛ; 2. — M1 ОМЛ; 3. — M2 ОМЛ; 4. — M3 ОМЛ

кой экспрессией CD34 антигена и наличием МПО в бластах. В нашем исследовании у 9 (11,1 %) пациентов ОМЛ (2 больных M1, 4 — M2 и 3 — M4), наблюдались одновременно высокие показатели экспрессии антигена CD34 (> 50 %) и числа МПО+ (> 50 %) бластов. Суммарное количество МПО+ и CD34+ бластов превышало 100 %. Следовательно, в части CD34+ бластов определялся специфический гранулоцитарный фермент — МПО. Эти наблюдения указывают на возможность



обнаружения асинхронности в процессе созревания лейкоэмических клеток с сохранением экспрессии CD34 на МПО+ дифференцированных бластах. Подобная своеобразная характеристика бластов может быть использована для мониторинга остаточной болезни.

Полученные данные свидетельствуют о значительном разнообразии связей между антигенным профилем и энзимным статусом бластов при ОМЛ. При ранних формах ОМЛ (M0 и M1) высокие показатели экспрессии антигена стволовых клеток CD34 сочетаются с отсутствием или низкими показателями специфического фермента (МПО), что с большой долей вероятности исключает их одновременное присутствие на одной клетке. При дифференцированных формах в редких случаях (около 10 %) наблюдается коэкспрессия CD34 и МПО, характерная для аберрантного фенотипа.

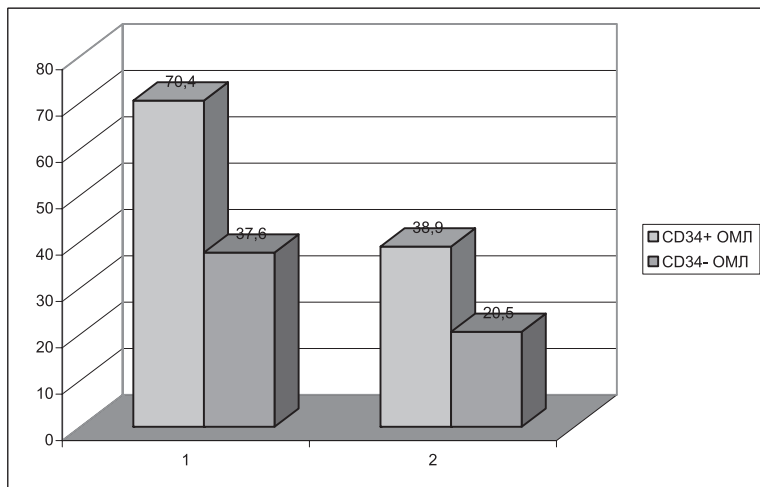
По своим иммунофенотипическим характеристикам CD34+ бластные клетки имели ряд особенностей. Так отмечена взаимосвязь экспрессии CD34 и других маркеров ранних этапов гранулоцитарной дифференцировки бластов: CD38 ( $r = 0,46$ ;  $p = 0,000$ ) и HLA-DR ( $r = 0,52$ ;  $p = 0,000$ ), свидетельствующие о возможно высоком уровне поражения при ОМЛ (рис. 5).

Независимо от степени дифференцировки клеток лейкоэмический клон в своем составе имеет фракцию ранних, так называемых лейкоэмических стволовых клеток (ЛСК). По данным литературы клетки с фенотипом CD34+CD38- являются самыми ранними в популяции нормальных и лейкоэмических стволовых клеток. В этих клетках определяется повышенная экспрессия гена множественной лекарственной устойчивости и сниженная экспрессия антигенов, опосредующих апоптоз.

Анализ частоты обнаружения этой фракции составил отдельный раздел работы.

Как видно из данных табл. 4, фракция CD34+CD38- гемопоэтических предшественников определялась при всех вариантах ОМЛ и составила 23,4 % больных. Исключение представили варианты M3, M6 и M7, при которых бласты с подобной характеристикой отсутствовали. Наличие примитивных (CD34+CD38-) стволовых лейкоэмических элементов можно наблюдать при большинстве ФАБ-вариантов ОМЛ примерно у четверти больных. Вероятно, данная группа пациентов должна включаться в первую очередь в группу мониторинга минимальной остаточной болезни, поскольку именно эта фракция клеток может избегать медикаментозного уничтожения и обуславливать неудачи лечения больных ОМЛ.

Экспрессия молекулы HLA-DR, ассоциированной с ранними этапами гранулоцитарной дифференцировки бластов, выявлялась в нашем исследовании в большинстве случаев (72,2–100 %) при всех вариантах ОМЛ, кроме M3. Тем не менее, интенсивность ее экспрессии была достоверно выше по средним показателям при наиболее раннем M0 варианте ( $84,4 \pm 3,0$  % позитивных клеток) по сравнению с гранулоцитарными (M1–M2) вариантами лейкоза ( $51,3 \pm 8,3$  % и  $56,5 \pm 4,2$  %, соответственно;  $p < 0,01$ ). При монобластных (M4–M5) вариантах ОМЛ экспрессия HLA-DR выявлялась в подавляющем большинстве наблюдений (87,5–100 %), отличия по среднему числу позитивных клеток ( $77,1 \pm 5,1$  % и  $78,9 \pm 10,8$  % соответ-



**Рис. 5. Показатели экспрессии антигенов HLA-DR и CD38 на бластах в зависимости от наличия экспрессии антигена CD34 при ОМЛ:**

1 — показатели экспрессии молекулы HLA-DR;

2 — показатели экспрессии антигена CD38

ственно) по сравнению с M0 (84,4 %) были недостоверны. При M3 варианте HLA-DR-позитивным оказался один из 5 пациентов.

Бласты при ОМЛ, коммитированные к дифференцировке в миелоидном направлении, характеризуются экспрессией панмиелоидных антигенов CD33 и CD13. Анализ особенностей экспрессии миелоидных антигенов в зависимости от наличия или отсутствия стволовомклеточного антигена CD34 выявил некоторые закономерности. Так экспрессия антигена CD34 имела положительную корреляционную связь с экспрессией CD13 и отрицательную с CD33 ( $p = 0,01$  и  $p = 0,000$  соответственно).

Анализ особенностей экспрессии миелоидных антигенов отдельно в CD34-по-

Таблица 4.

**Частота выявления ранней фракции бластных клеток с фенотипом CD34+CD38- при различных ФАБ-вариантах**

Вариант	Число больных	
	Абс.	%
M0	3 / 10	33,3
M1	4 / 18	22,2
M2	6 / 17	35,3
M4	4 / 16	25,0
M5	1 / 7	14,3
Всего	18 / 81	23,4

зитивных и CD34-негативных группах больных показал, что в большинстве наблюдений определялись оба миелоидных антигена (табл. 5).

Фенотип бластных клеток CD34+CD33+CD13+ был наиболее частым при всех ФАБ-вариантах, за исключением М3 ОМЛ.

Экспрессия только одного антигена CD13 была характерна для CD34-позитивных ОМЛ. Клетки с фенотипом CD34+CD13+CD33- появляются на ранних стадиях лейкемической миелоидной клеточной дифференцировки. Клетки с подобными характеристиками были типичны для больных М0 и обнаруживались у четверти пациентов М1 ОМЛ. Следует подчеркнуть, что именно этот субтип бластов характеризуется как наиболее ранний по морфоцитохимическим показателям миелоидной дифференцировки (отсутствие зернистости, низкие показатели активности МПО и содержания липидов).

Экспрессия одного миелоидного антигена CD33, напротив, была более типична для CD34-негативных случаев, преимущественно это были пациенты М5 ОМЛ. Характерным для наиболее раннего М0 варианта было то, что при этом варианте средние показатели числа CD13+ (84,0±4,1 %) бластов были существенно выше, а CD33+ (35,3±9,3 %) — существенно ниже по сравнению с остальными вариантами ОМЛ (35,8-68,1 % и 65,3-82,9 % соответственно;  $p < 0,05$ ).

Между экспрессией моноцитарного антигена CD64 и антигеном CD34 выявлена обратная корреляционная зависимость ( $p < 0,001$ ). При монобластных (М4-М5) вариантах лейкоза с высокой активностью ингибируемой  $\alpha$ -нафтилацетат эстеразы, экспрессия специфического антигена CD64 отсутствовала в 19 % наблюдений (у 4/21). Все эти CD64-негативные случаи характеризовались высокой экспрессией антигена CD34 по сравнению с остальными монобластными лейкозами с более низкими уровнями экспрессии CD34 (93,8 % против 28,6 %).

Острый эритромиелоз (М6) и острый мегакариобластный лейкоз установлены в 3 и 1 случае соответственно. Иммунологически бласты при М6 ОМЛ характеризовались слабой экспрессией антигена CD34 (17,2–39,7 %) и наличием специфической молекулы — Gly A (рис. 6А, 6Б, 6В). При М7 ОМЛ бласты расценены как

Таблица 5.

## Субпопуляции миелоидных предшественников при различных вариантах ОМЛ

Субпопуляции бластных клеток	М0 n=10	М1 n=18	М2 n=18	М3 n=5	М4 n=17	М5 n=8	Всего* n=76
CD34+/33+/13+	6/10 (60)	6/12 (50)	16/17 (94,1)	1/1 (100)	12/14 (85,7)	2/4 (50)	43/58 (74,2)
CD34+/33-/13+	4/10 (40)	4/12 (33,3)	0	0	2/14 (14,3)	0	10/58 (17,2)
CD34+/33+/13-	0	2/12 (16,7)	1/17 (5,9)	0	0	2/4 (50)	5/58 (8,6)
CD34-/33+/13+	0	6/6 (100)	1/1 (100)	3/4 (75)	3/3 (100)	1/4 (25)	14/18 (77,8)
CD34-/33-/13+	0	0	0	1/4 (25)	0	0	1/18 (5,6)
CD34-33+13-	0	0	0	0	0	3/4 (75)	3/18 (16,6)

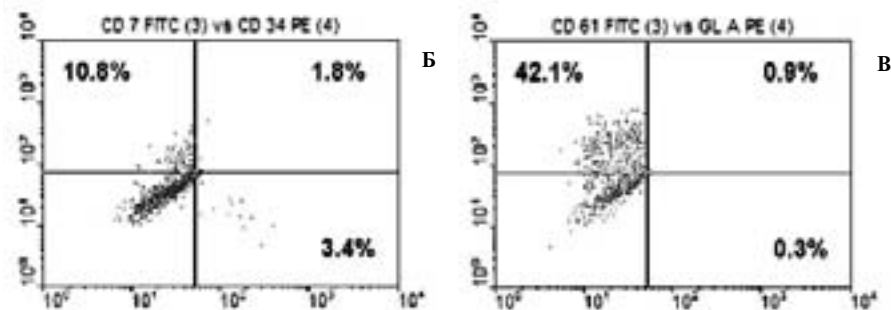
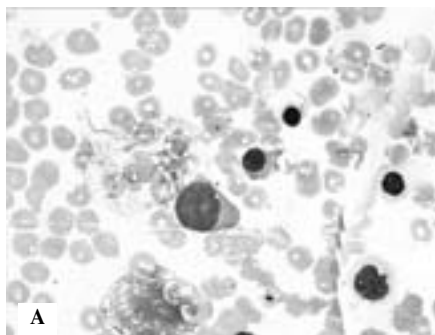
\* — число больных, имеющих признак / число обследованных (%)

CD34- негативные с экспрессией специфического антигена мегакариобластов CD61 (рис. 7).

При остром лейкозе со смешанными линиями дифференцировки бласты характеризовались высокой экспрессией антигена CD34 и одновременным присутствием разнолинейных маркеров: миелоидных — CD33, CD13 и В-лимфоидных — CD10, CD19 (рис. 8).

Особенностью лейкемических бластов при ОМЛ является нарушение нормальной антигенной структуры поверхностных мембран. Аберрантный иммунофенотип характеризуется совместной экспрессией миелоидных и лимфоидных антигенов, наличие которых в большинстве случаев коррелирует с незрелостью клоногенных элементов и ранними этапами дифференцировки. Частота аберрантной экспрессии линейно не специфических антигенов в наших исследованиях представлена в табл. 6.

Экспрессия антигена CD7, обычно выявляемого на ранних этапах клеточной дифференцировки, в нашем исследовании обнаруживалась у 17 из 81 больного

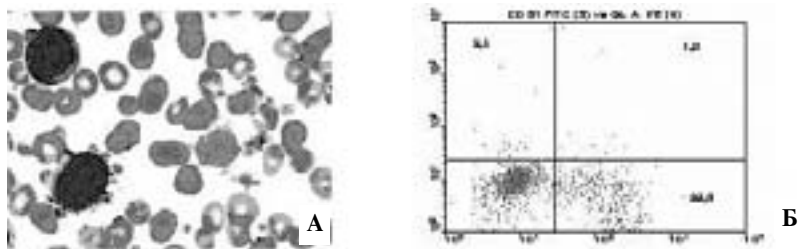


**Рис. 6.** Картина костного мозга и данные иммунофенотипирования при М6 ОМЛ:

А. — Картина костного мозга;

Б. — CD7 FITC — CD34 PE;

В. — CD71 FITC — Gly A PE



**Рис. 7.** Картина костного мозга и данные иммунофенотипирования при М7 ОМЛ:

А. — картина костного мозга;

Б. — CD61 FITC — Gly A PE

(21 %). CD7 антиген отсутствовал при М3, М5б, М6 и М7 вариантах ОМЛ. Отмечена высокая достоверная прямая корреляция экспрессии антигена CD7 со стволовым CD34 ( $r = 0,31$ ;  $p = 0,005$ ), которая, возможно, характеризует особенности ранних предшественников в лейкозном клоне при большинстве вариантов ОМЛ.

Может показаться, что в определенное противоречие вступает наиболее частая экспрессия В-лимфоидного антигена CD19 при М2 варианте, по морфоцитохимическим признакам достаточно зрелом остром миелолейкозе. Однако в нашей выборке антиген CD34 был представлен почти во всех случаях М2 варианта и имел тенденцию к корреляции с лимфоидным маркером CD19.

Наличие aberrантной экспрессии CD56, CD4, CD5 и CD10, продемонстрированное в наших исследованиях, может быть использовано в мониторинге минимальной остаточной болезни в период ремиссии, а также для отличия лейкоэмических и нормальных предшественников при мобилизации клеток для аутологичной трансплантации.

Таблица 6.

**Частота линейно не ассоциированных антигенов при различных вариантах ОМЛ**

Антиген	M0	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	Всего*
CD7	3/10 (30)	4/14 (28,6)	3/18 (16,7)	0	4/17 (23,5)	2/8 (25)	0	1	17/81 (21)
CD5	0	1/18 (5,6)	1/18 (5,6)	0	1/16 (6,3)	0	0	0	3/77 (3,9)
CD4	0	2/18 (11,1)	2/16 (12,5)	0	3/16 (18,8)	3/7 (42,9)	0	0	10/72 (13,9)
CD10	0	0	0	0	0	1/8 (12,5)	0	0	1/79 (1,3)
CD19	0	0	4/18 (22,2)	0	1/17 (5,9)	1/8 (12,5)	0	0	6/80 (7,5)
CD56	0	5/17 (29,4)	4/18 (22,2)	0	3/14 (21,4)	3/5 (60)	0	0	15/71 (21,1)

\* — число позитивных случаев / число обследованных (%)

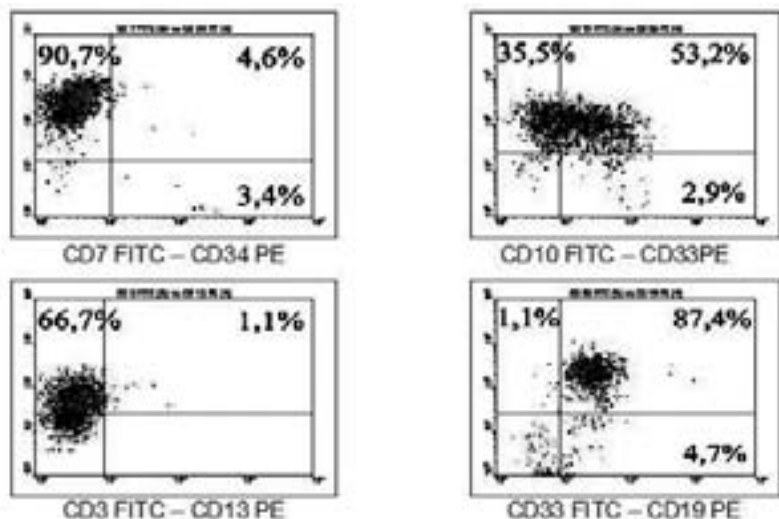


Рис. 8. Экспрессия антигенов CD34, CD33, CD13, CD10, CD19, CD7 и CD3 при остром смешанно-линейном лейкозе

Вариантом aberrантной экспрессии может быть сочетание антигенов разных миелоидных линий. Так, на миелоблестах различной степени дифференцировки (M0-M3) отмечались: экспрессия моноцитарного антигена CD64 в 35,5 % (у 11 из 31 обследованного), эритроидного GlyA — в 9,1 % (у 4/14), мегакариоцитарного CD61 — в 8,5 % (у 3/34) случаев. Полученные данные могут объясняться, по-видимому, асинхронностью появления антигенных и энзимных характеристик бластов.

Подобные наблюдения имеют большое значение в диагностической практике и свидетельствуют о необходимости использования различных подходов для оценки бластов при ОМЛ.

В настоящее время при характеристике ОМЛ важное значение приобрела оценка мультилинейной дисплазии остаточных ростков миелопоэза. Самыми распространенными видами дисплазии у 56 обследованных больных ОМЛ явились ДГ и ДМ, выявленные примерно у половины пациентов (44,8 % и 51,8 % соответственно). ДЭ зафиксирована лишь единичных наблюдениях (8,9 %). В группу мультилинейной дисплазии (МЛД) (23,2 %) вошли случаи с дисплазией двух ростков, как правило, гранулоцитарного и мегакариоцитарного. Трехлинейная дисплазия (ТЛД) в обследованной группе больных отсутствовала.

При исследовании частоты различных видов дисплазии в зависимости от экспрессии антигена CD34 на бластах выявлено, что ДГ встречалась почти вдвое чаще (55,6 % против 30,8 %,  $p < 0,1$ ) в CD34-позитивных наблюдениях, в то время как ДМ, ДЭ и ДЛД не зависели от показателей этого антигена.

Для уточнения особенностей ДГ были проанализированы показатели различных изменений нейтрофилов: размер, наличие зернистости и пельгероидных форм.

Пельгероидные формы нейтрофилов обнаруживались у половины пациентов. При наличии стволовоклеточного антигена CD34 на бластах число пельгероидных форм нейтрофилов было достоверно выше, чем в CD34-негативных (87,1 % против 12,9 % ;  $p = 0,002$ ).

Дисплазия клеток эритроидного ряда наблюдалась только при отсутствии CD34 антигена, однако малое число наблюдений не позволяет сделать выводы на этот счет.

В целом наши данные по оценке взаимосвязи дисплазии с уровнем зрелости бластных клеток и наличием в них выраженной пропорции CD34 антигена свидетельствует о наличии достоверных ассоциаций. Это может служить дополнительным указанием на существование взаимосвязи между экспрессией CD34 на бластах и дисплазией распознаваемых элементов миелопоэза.

Таким образом, полученные в работе данные свидетельствуют о том, что экспрессия CD34 на бластных клетках ОМЛ характеризует морфоцитохимически и иммунологически менее зрелые формы лейкоза и имеет ассоциацию с миелодиспластическими проявлениями в клетках остаточных ростков.

## Выводы

1. На основе мембранного антигена стволовых клеток CD34 бластные клетки при ОМЛ могут быть разделены на 2 типа — менее зрелые (CD34+) и более зрелые (CD34-) по большинству морфоцитохимических и иммунофенотипических признаков.

2. CD34-позитивные ОМЛ характеризуются достоверно более низким содержанием в лейкозном клоне морфологически дифференцированных миелобластов с зернистостью ( $p = 0,000$ ) и монобластов с типичной моноцитойдной формой ядер ( $p = 0,001$ ) по сравнению с CD34-негативными.

3. Отличительными цитохимическими признаками CD34-позитивных ОМЛ являются низкая активность миелопероксидазы при M0-M3 ОМЛ ( $p = 0,003$ ) и ингибируемой  $\alpha$ -нафтилацетат эстеразы при M4-M5 ( $p = 0,006$ ), а также сниженное содержание липидов ( $p = 0,005$ ) и PAS-положительного вещества в диффузной форме ( $p = 0,000$ ).

4. Иммунофенотипической особенностью CD34+ по сравнению с CD34- ОМЛ являются более высокие уровни экспрессии маркеров ранних этапов гранулоцитарной дифференцировки — HLA-DR ( $p = 0,000$ ) и CD38 ( $p = 0,000$ ).

5. Примерно в четверти случаев (23,4 %) ОМЛ обнаруживаются бласты с фенотипом стволовых лейкозных клеток CD34+CD38-. Эта фракция наиболее выражена при M0 (33,3 %) и M2 (35,3 %), отсутствует при M3 и присутствует с промежуточной частотой (14,3-25,0 %) при остальных вариантах ОМЛ.

6. Установлена прямая корреляционная зависимость экспрессии антигена CD34 с молекулой CD13 ( $p = 0,01$ ) и обратная с CD33 ( $p = 0,000$ ). Это позволило выявить новый иммуноподвариант ОМЛ — CD34+CD13+CD33-, характерный для незрелых миелоидных лейкозов M0 и M1.

7. Для CD34-позитивного ОМЛ более характерен, в сравнении с CD34-негативным, аберрантный иммунофенотип blasts:

- с коэкспрессией лимфоидных антигенов CD7 и CD19,
- с коэкспрессией эритроидных и мегакариоцитарных маркеров при гранулоцитарных и монобластных лейкозах,
- отсутствием FcγRI (CD64) при монобластных вариантах,
- с коэкспрессией CD34 и МПО в 11,1 % случаев ОМЛ.

Эти признаки могут использоваться для мониторинга минимальной остаточной болезни.

8. Для ОМЛ с экспрессией антигена стволовых клеток CD34 характерна дисплазия клеток гранулоцитарного роста, выявляемая почти вдвое чаще, чем в CD34-негативном. Установлена достоверная прямая корреляция пропорции CD34+ blasts с наличием пельгероидных форм нейтрофилов ( $p = 0,002$ ).

### Список литературы

1. Баранова О.Ю., Волкова М.А., Френкель М. А. и др. Первичные острые миелоидные лейкозы с миелодисплазией: клинико-лабораторные особенности и прогноз. Гематология и трансфузиология. — 2005. —Т. 50 N4. —С. 10-20.
2. Маркина И. Г., Тупицын Н. Н., Андреева Л. Ю. Использование иммунофенотипирования для совершенствования диагностики и прогнозирования результатов терапии острых нелимфобластных лейкозов. Российский Биотерапевтический Журнал. — 2002. —Т. 1 N1. —С. 3-13.
3. Bahia D.M., Yamamoto M., Chauffaile M.L. et al. Aberrant phenotypes in acute myeloid leukemia: a high frequency and its clinical significance. Haematologica. — 2001. —V.86 N8. — p. 801-806.
4. Bennett J.M., Catovsky D., Daniel M.T. et al. Proposal for the recognition of minimally differentiated acute myeloid leukemia (AML-M0). Br. J. Haematol. — 1991. — V.78 N3. — p. 458-459.
5. Cassileth P.A., Harrington D.P., Appelbaum F.R. et al. Chemotherapy compared with autologous or allogeneic bone marrow transplantation in the management of acute myeloid leukemia in first remission. N. Engl. J. Med. —1998. —V.339. —p.1649-1656.
6. Ciolli S., Leoni F., Caporale R. et al. CD34 expression fails to predict the outcome in adult acute myeloid leukemia. Haematologica. —1993. —V.78 N3. —p.420.
7. Costello R., Mallet F., Chambost H. et al. The immunophenotype of minimally differentiated acute myeloid leukemia (AML-M0): reduced immunogenicity and high frequency of CD34+ / CD38- leukemic progenitors. Leukemia. —1999. —V.13 N10. —p.1513-1518.
8. Costello R.T., Mallet F., Gaugler B. et al. Human acute myeloid leukemia CD34+/CD38- progenitor cells have decreased sensitivity to chemotherapy and Fas-induced apoptosis, reduced immunogenicity, and impaired dendritic cell transformation capacities. Cancer Research. —2000. —V.60. —p.4403-4411.
9. Harousseau J.L., Cahn J.Y., Pignon et al. Comparison of autologous bone marrow transplantation and intensive chemotherapy as postremission therapy in adult acute myeloid leukemia. Blood. —1997. —V.90. —p.2978-2986.



10. *Hassan H.T., Zander A.* Stem cell factor as a survival and growth factor in human normal and malignant hematopoiesis. *Acta Haematol.* —1996. — V.95 N.3-4. — p.257-262.
11. *Jaffe E.S., Harris N.L., Stein H., Vardiman J.W.* Pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. — IARC Press Lyon, 2001.
12. *Macedo A., Orfao A., Ciudad J.* et al. Phenotypic analysis of CD34 subpopulations in normal human bone marrow and its application for the detection of minimal residual disease. *Leukemia.* —1995. —V.9. —p.1896-1901.
13. *Macedo A., Orfao A., Gonzales M.* et al. Immunological detection of blast cell subpopulations in acute myeloblastic leukemia at diagnosis: implications for minimal residual disease studies. *Leukemia.* —1995. —V.9 N6. —p.993-998.
14. *Macedo A., Orfao A., Vidriales M.B.* et al. Characterization of aberrant phenotypes in acute myeloblastic leukemia. *Ann. Hematol.* —1995. —V.70 N4. —p.189-194.
15. *Raspadori D., Lauris F., Ventura M.A.* et al. Incidence and prognostic relevance of CD34 expression in acute myeloblastic leukemia: analysis of 141 cases. *Leuk. Res.* —1997. — V.21 N7. —p.603-607.
16. *Rigolin G.M., Lanza F., Ferrari L., Castoldi G.* CD34+/CD33+ blast cells: correlation with FAB subtypes. *Leuk. Lymphoma.* —1995. —V.18 N1. —p.43-48.
17. *Solary E., Casasnovas R.O., Campos L.* et al. Surface markers in adult acute myeloblastic leukemia: correlation of CD19+, CD34+ and CD14+/ DR- phenotypes with shorter survival. Group d'Etude Immunologique des Leucemies (GEIL). *Leukemia.* — 1992. — V.6 N5. —p.393-399.
18. *Wells S.J., Bray R.A., Stempora L.L., Farhi DC.* CD117/ CD34 expression in leukemic blasts. *Am. J. Pathol.* —1996. —V.106 N2. —p.192-195.

*Е. В. Чигринова, А. И. Павловская, Н. Н. Тупицын*

## **РОЛЬ ИММУНОФЕНОТИПИРОВАНИЯ В ДИАГНОСТИКЕ ОПУХОЛЕВОГО ПОРАЖЕНИЯ КОСТНОГО МОЗГА ПРИ ПЕРИФЕРИЧЕСКИХ В-КЛЕТОЧНЫХ НЕХОДЖКИНСКИХ ЛИМФОМАХ**

ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

### **Резюме**

Периферические В-клеточные неходжкинские лимфомы (В-НХЛ) обладают специфической тропностью к костному мозгу. С целью изучения особенностей костномозговой инвазии, выделения специфических гистологических типов поражения, а также определения возможных иммуноморфологических отличий с экстрамедуллярными субстратами был проанализирован материал костного мозга 58 больных разными вариантами В-НХЛ. Во всех случаях диагноз был установлен в соответствии с критериями классификации ВОЗ (2001). В выбранной группе были представлены следующие нозологии В-НХЛ: ДВКЛ — 20 (37%), ЛМЗ — 10 (17%), ФЛ — 7 (12%), В-ХЛЛ/ЛМЛ — 6 (10%), лимфома Беркитта — 4 (7%), плазмоклеточные варианты — 2 (3.5%), ЛПЛ — 2 (3.5%), первичная медиастинальная В-клеточная лимфома — 1(2%). В основу изучения костномозгового субстрата лимфом легли данные исследования аспирата — (цитология и проточная цитофлуориметрия) и трепанобиоптата (гистология и иммуногистохимия). Проточная цитофлуориметрия оказалась наилучшим методом для определения иммунофенотипа CD5+ В-НХЛ, в то время как иммуногистохимия трепанобиоптатов позволила выделить характерные типы роста и провести дифференциальный диагноз с реактивной лимфоидной инфильтрацией гемопоэтической ткани. Профили экспрессии иммунологических маркеров клеток медуллярного и экстрамедуллярного опухолевых субстратов были однотипными. Предположен диагностический алгоритм исследования для получения максимально достоверной информации о наличии/отсутствии поражения костного мозга, а также для проведения межвариантной диагностики в рамках классификации ВОЗ (2001) при каждой нозологии В-НХЛ.

**Ключевые слова:** периферические В-клеточные неходжкинские лимфомы, костный мозг, аспират костного мозга, трепанобиопсия костного мозга, проточная цитофлуориметрия, иммуногистохимия.

UDK: 616.419 — 006 — 078.73: 616 — 006.444

*E.V. Chigrinova, A.I. Pavlovskaya, N.N. Tupitsyn*

## ROLE OF IMMUNOPHENOTYPING IN DIAGNOSIS OF BONE MARROW INVOLVEMENT IN B-NHL

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

### Abstract

Bone marrow (BM) is a frequent site of involvement in mature B-cell non-Hodgkin's lymphomas (B-NHL) and evidence of an infiltrated BM may implicate different therapeutical regimens. To evaluate the specific features of bone marrow involvement in B-NHL, its typical histological and immunomorphological patterns, possible discordance with other involved sites BM material from 58 patients was studied. All cases were classified according to the WHO classification (2001). Selected group included DLBCL- 20 cases (37%), all types of marginal zone lymphoma (LMZ) — 10 (17%), follicular lymphoma (FL) — 7 (12%), B-CLL/SLL — 6 (10%), Burkitt's Lymphoma — 4 (7%), plasma cell variants — 2 (3.5%), lymphoplasmacytic lymphoma (LPL) — 2 (3.5%), mediastinal large B-cell lymphoma — 1(2%). Analysis was based on comparison of cytologic and flow cytometry data of aspirate investigation as well as morphological and immunohistochemical data of BM trephine biopsy investigation.

Flow cytometry immunophenotyping offers the sensitive detection of BM involvement especially for CD5+ B-NHL. However, paraffin immunohistochemical immunophenotyping offers preservation of architecture, evaluation of histologically distinctive types of BM involvement in B-NHL and permits carrying out differential diagnosis with reactive lymphoid infiltration. We also saw no immunological differences in tumor cell antigen expression between BM and extramedullary B-NHL sites. Our results permit to compose diagnostic algorithm of bone marrow immunomorphological investigation in each type of B-NHL.

**Key words:** non-Hodgkin's lymphomas, bone marrow, aspirate, trephine biopsy, flow cytometry, immunohistochemistry.

### Список сокращений

ВОЗ — Всемирная Организация Здравоохранения

НХЛ — неходжкинские лимфомы

В-НХЛ — В-клеточные неходжкинские лимфомы

КМ — костный мозг

МА — молекула адгезии

МкАт — моноклональное антитело

ПЦ — проточная цитофлуориметрия

ИГХ — иммуногистохимия

РИФ — реакция иммунофлуоресценции

**В-ХЛЛ/ЛМЛ** — В-клеточный хронический лимфолейкоз/ лимфома из малых лимфоцитов

**ЛКМ** — лимфома из клеток мантии

**ЛМЗ** — лимфома маргинальной зоны

**ЛПЛ** — лимфоплазмочитарная лимфома

**ФЛ** — фолликулярная лимфома

**ДВКЛ** — диффузная В-клеточная крупноклеточная лимфома

**ПМВЛ** — первичная медиастинальная В-клеточная лимфома

**MALT** — mucosa- associated lymphoid tissue lymphoma

**CD** — cluster differentiation

Все варианты В-клеточных периферических неходжкинских лимфом (В-НХЛ) обладают тропностью к костному мозгу с наиболее частым поражением гемопоэтической ткани в качестве экстранодальной локализации (т.н. homing-effect).

Верификация распространения лимфомы на костный мозг играет чрезвычайно важную роль в клинической практике по следующим причинам:

1. Полноценное первичное стадирование лимфомы, которое определяет адекватную терапевтическую тактику, в первую очередь — для мелкоклеточных вариантов В-клеточных лимфом. Вовлечение костного мозга, например при фолликулярной лимфоме, определяет IV — диссеминированную стадию процесса и требует проведения системной химиотерапии, а не комбинированного, химиолучевого лечения, применяющегося в начальных стадиях процесса. При I-II стадиях MALT-лимфом с поражением желудка, при которых установленным этиотропным агентом является *Helicobacter pylori*, с успехом применяется эрадикационная антихеликобактерная терапия. При диссеминированном процессе с вовлечением костного мозга речь может идти только о системной полихимиотерапии (S.N. Malek et al., 2003).

2. На основании исследования костного мозга можно осуществлять мониторинг полноты ремиссии у пациентов после проведенного лечения. Эта диагностическая задача стала актуальной с внедрением в клиническую практику новых химиотерапевтических агентов, а также — терапевтических моноклональных антител, что позволило добиться полных ремиссий при ряде В-НХЛ, например при В-лимфоме из малых лимфоцитов/хроническом лимфолейкозе (F. Bosch, A. Ferrer, A. Lopez-Guillermo et al., 2002). Важно отметить, что полнота достигнутой ремиссии после индукционных режимов полихимиотерапии определяет интенсивность и количество курсов консолидации при В-НХЛ.

3. Костный мозг при наличии лимфомного поражения может быть единственным диагностическим материалом в случае лимфом с первичным поражением костей/костного мозга или с недоступным первичным экстрамедуллярным очагом (изолированное поражение забрюшинных и медиастинальных лимфоузлов, селезенки; тяжелый соматический статус больного; пан- или тромбоцитопения).

Гистологические дифференциально-диагностические критерии, такие как объем, форма, локализация поражения, а также цитологические особенности лимфомных клеток, определяемые на стандартно окрашенных препаратах костного мозга, являются

важными, но не абсолютными (Д.Ш.Османов, 2004). Так, паратрабекулярный и диффузный типы лимфоидной инфильтрации считаются маркерными для лимфом, в то время как очаговый тип поражения костного мозга может иметь большое сходство с реактивным процессом, а выявление минимальной интерстициальной или интрасиноидальной локализации лимфомных клеток вообще крайне затруднительно даже при высочайшей квалификации морфолога (Bain, 2001; Feller and Diebold 2004).

Для повышения чувствительности обнаружения минимального поражения костного мозга при В-НХЛ в настоящее время используются иммунологические и молекулярно-биологические методы (Е.В. Чигринова, 2005). Иммунофенотипирование лимфомных клеток костномозгового пунктата (аспирата) позволяет выявить неопластические клетки даже при незначительном содержании лимфоцитов/ пролимфоцитов в костном мозге (Valet et al., 1997). Это становится возможным на основании знаний об особенностях иммунофенотипа клеток первичной опухоли, их линейной принадлежности и стадии дифференцировки. Важным преимуществом метода проточной цитофлуориметрии является возможность оценки коэкспрессии нескольких молекул (2-3 и более) на уровне одной клетки (Н.Н.Тупицын, З.Г. Кадагидзе, 2003).

Другим иммунологическим методом выявления поражения костного мозга при В-НХЛ является иммуногистохимическое исследование материала трепанобиоптатов (Е.В.Чигринова, 2004). Этот метод позволяет не только установить линейную принадлежность опухоли и соотнести иммунофенотип неопластических клеток костномозгового субстрата лимфомы с экстрамедуллярным компонентом, но и оценить диагностически значимую локализацию опухолевых клеток в их взаимоотношении с костной и гемопоэтической тканью (Bain, 2001; Feller and Diebold 2004).

Анализ чувствительности иммунологических методов обнаружения поражения костного мозга при В-НХЛ путем сопоставления данных иммунофенотипирования (проточная цитофлуориметрия и иммуногистохимия) со стандартными методами (цитологическое и гистологическое исследования), несомненно, является актуальной задачей, решение которой позволит более точно стадировать В-НХЛ и определять вариант в рамках современной классификации ВОЗ (2001) (N Harris et al.,WHO,2001). В свою очередь максимально точное стадирование и определение иммуноморфологического варианта лимфомы позволит выбрать наиболее оптимальную лечебную тактику как при первичном процессе, так и в случае рецидива у каждого конкретного больного с В-НХЛ.

### **Цель исследования**

Целью настоящего исследования явилась оценка значения иммунофенотипирования для диагностики поражения костного мозга при различных морфоиммунологических вариантах периферических В-НХЛ.

### **Материалы и методы**

В настоящее исследование включено 58 больных с разными вариантами В-клеточных периферических неходжкинских лимфом (НХЛ), проходивших обследование и лечение амбулаторно в гематологическом кабинете поликлиники, и ста-

ционарно в отделении химиотерапии гемобластозов НИИ КО ГУ РОНЦ им Н.Н. Блохина РАМН.

Возраст больных на момент диагностики В-НХЛ колебался в пределах 16-82 лет, медиана составила 54 года. Соотношение по полу (м : ж) = 0,87. Анамнестические подробности заболевания и жизни больных были получены при тщательном анализе медицинской документации или в непосредственной беседе с пациентами.

При первичном обследовании, в процессе лечения, а также при оценке качества ремиссии всем больным проводился стандартный набор общеклинических диагностических тестов, составленный с учетом специфики диссеминации В-НХЛ.

Таким образом, в каждом конкретном случае стадия процесса устанавливалась на основании комплексного исследования и тщательного сбора анамнеза. Распределение пациентов в соответствии с преимущественным органом поражением представилось следующим образом (табл. 1).

Процентное соотношение вовлечения разных органов при первичной экстра nodальной локализации следующее (табл. 2).

Диагноз В-НХЛ в рамках современной классификации ВОЗ (2001) устанавливался на основании комплексного иммуноморфологического исследования доступного биопсийного материала больных.

Основой первичной диагностики служило иммуноморфологическое исследование экстрамедуллярного компонента (при его наличии), полученного путем хирургической биопсии. Фиксация и заливка в парафин биопсийного материала

Таблица 1.

**Распределение пациентов в соответствии с преимущественным органом поражением**

Локализация опухоли	Количество больных	Процент
Первичная nodальная	34	58.6%
Первичная экстра nodальная	24	41.4%

Таблица 2.

**Преимущественное органное поражение при первичной экстра nodальной локализации В-НХЛ**

Орган	Количество больных	Процент
ЖКТ	6	25%
Селезенка	3	13%
Кости/костный мозг	5	21%
Мягкие ткани	3	13%
Печень+селезенка	2	8%
Яичники	2	8%
Кольцо Вальдейера	1	4%
Молочная железа	1	4%
Средостение	1	4%

проводились по принятым в отделе патологической анатомии опухолей человека ГУ РОНЦ им Н.Н. Блохина РАМН стандартным протоколам. Гистологическое исследование проводили на срезах с парафиновых блоков, окрашенных гематоксилином-эозином, а также дополнительно, в зависимости от типа ткани по Браше и пикрофуксином. В подавляющем большинстве случаев иммунофенотипирование опухолевой ткани проводили на свежемороженых (криостатных) срезах биопсийного материала (фиксация в ацетоне) в лаборатории иммунологии гемопоза отдела клинической иммунологии НИИ КО ГУ РОНЦ им Н.Н. Блохина РАМН. При отсутствии свежего биопсийного материала для типирования срезов с парафиновых блоков, а также в качестве дополнительного метода в сложных диагностических ситуациях применяли иммуноферментное окрашивание (иммуногистохимия) в отделе патологической анатомии опухолей человека.

У 16 больных солидный экстрамедуллярный компонент отсутствовал либо был недоступен. У одного пациента в качестве первичного экстрамедуллярного компонента, с применением проточной цитофлуориметрии был исследован серозный экссудат (асцитическая жидкость). Материал предварительно подвергался центрифугированию с последующим приготовлением мазков из клеточного концентрата. Еще в одном наблюдении экстрамедуллярный субстрат (лимфатический узел) был исследован иммуноцитологически на материале тонкоигольной биопсии. Окраску цитологических препаратов в обоих случаях производили по методике Лейшмана. Все цитологические препараты изучались в лаборатории клинической цитологии.

Стандартная панель моноклональных антител (МкАт), используемая в лаборатории иммунологии гемопоза отдела клинической иммунологии НИИ КО ГУ РОНЦ им Н.Н. Блохина РАМН для диагностики НХЛ различными методами, представлена в табл. 3.

Распределение В-НХЛ по вариантам в рамках классификации ВОЗ (2001) отражено в табл. 4.

Исходя из темы работы, основой исследования явилась детальная морфологическая и иммунофенотипическая характеристика костного мозга больных В-НХЛ. С этой целью были применены методы цитологического анализа (миелограмма) и проточная цитометрия аспирата, гистологическое и иммуногистохимическое исследование трепанобиоптата КМ (табл. 5). Следует отметить, что в 5 случаях КМ был единственной локализацией процесса.

Аспират КМ получали путем пункции тела или рукоятки грудины, а также задних остей подвздошных костей. Цитологическое исследование пунктата проводили в лаборатории иммунологии гемопоза на мазках, окрашенных по методу Романовского-Гимза, с предварительной фиксацией в 96 %-ном метаноле.

Имунофенотипирование аспирата костного мозга проводилось методом проточной цитофлуориметрии (ПЦ) на приборе FACScan (Becton Dickinson) с двух- и трехцветным мечением, при использовании прямых конъюгатов моноклональных антител с флуорохромами типа FITC (флуоресцеин-изотиоциант), PE (фикоэритрин) и PerCP( перидинин-хлорофилл).

Таблица 3.

**Панель моноклональных антител (МкАт) для иммунодиагностики лимфом**

Тип маркера	Иммунофлуоресценция свежзамороженные срезы	Проточная цитофлуориметрия	Иммуногистохимия парафиновые срезы
Линейно не рестриктированные	CD45,CD23,CD10,CD30,CD38 HLA-DR	=РИФ	CD45,CD23,CD10*,CD30, HLA-DR
В- линейные	CD19,CD20,CD21, CD138,κ,λ, Ig	=РИФ	CD20,CD21,CD45RA, CD796CD138,κ,λ, Ig
T/NK- линейные	CD45RO,CD3,CD56, CD5,CD7,CD4,CD8	=РИФ	CD45RO,CD3, CD5, CD4,CD8
Миеломоноцитарные	CD15,CD68,CD163	CD13,CD33,CD64	CD15,CD68,CD163
Дополнительные	Bcl-2,Bcl-6, cyclin D1,Ki-67	Bcl-2, Ki-67	Bcl-2,Bcl-6, cyclin D1,Ki-67
Предшественников	CD34,TdT	=РИФ	=РИФ

\* — на момент проведения работы лаборатория иммунологии гемопоэза не располагала данным антителом для фиксированного материала

Таблица 4.

**Варианты неходжкинских лимфом в соответствии с классификацией ВОЗ (2001)**

Вариант ВОЗ(2001)	Количество больных	Процент
ДВКЛ	20	35%
Лимфома маргинальной зоны*	10	17%
Фолликулярная лимфома	7	12%
Лимфома из малых лимфоцитов/В-ХЛЛ	6	10%
Мантийноклеточная лимфома	6	10%
Лимфома Беркитта	4	7%
Плазмноклеточные НХЛ	2	3,5%
Лимфоплазмацитарная лимфома	2	3,5%
Первичная медиастинальная В-клеточная лимфома	1	2%
Всего	58	100%

\* — в рубрике объединены все подварианты лимфомы маргинальной зоны, вошедшие в работу

Таблица 5.

**Методы исследования костного мозга при неходжкинских лимфомах**

Метод	Абсолютное кол-во больных	Процент больных от общего числа
Цитологический (миелограмма)	58	100%
Гистологическое исследование трепанобиоптатов	51	88%
Проточная цитометрия аспирата	31	53%
Иммуногистохимия Трепанобиоптата	40	69%



В табл. 6 приведена частота морфологической верификации и иммунофенотипического подтверждения диагноза В-НХЛ методом ПЦ в материале аспирата.

Трепанобиопсию костного мозга также выполняли из верхней задней ости подвздошных костей. Материал трепанобиоптатов рутинно подвергался фиксации в растворе Карнуа и декальцинации в растворе на основании азотной кислоты, с последующей заливкой в парафин. Гистологическое исследование проводили на срезе с парафиновых блоков, окрашенных гематоксилин-эозином и пикрофуксином.

Иммунофенотипирование трепанобиоптатов костного мозга проводили в сочетании иммунофлуоресцентного и иммуноферментного методов на депарафинированных срезах в лаборатории иммунологии гемопоэза. Панель МкАт, рутинно используемых для диагностики НХЛ на материале трепанобиоптатов КМ, представлена ранее (см. табл. 3).

Соотношение позитивных и негативных результатов гистологического и иммунологического методов исследования трепанобиоптатов КМ рассмотрено в табл. 7.

Таким образом, у всех больных было проведено комплексное исследование КМ, позволившее на основании полученных данных выделить приоритетный метод, исходя из клинической ситуации и варианта В-НХЛ.

### Результаты исследования и обсуждение

Биологические особенности В-НХЛ предопределяют тропность лимфомных клеток к костному мозгу (homing-effect), определяя тем самым гемопоэтическую

Таблица 6.

#### Частота выявления поражения костного мозга при НХЛ по данным цитологии и проточной цитофлуориметрии

Метод	Частота поражения	
	Количество исследованных аспиратов КМ	Процент позитивных результатов
Цитология	58	64%
ПЦ	31	84%

Таблица 7.

#### Частота выявления поражения костного мозга при В-НХЛ по данным гистологии и иммуногистохимии

Метод	Частота поражения	
	Количество исследованных трепанобиоптатов КМ	Процент позитивных результатов
Гистология	51	94%
Иммуногистохимия	40	62.5%

ткань одним из основных органов диссеминации опухолевого процесса. Это один из ключевых этапов развития лимфоидной опухоли, изменяющий как течение самой болезни, так и общий соматический статус пациента.

Каждая нозологическая форма периферической В-НХЛ, выделенная в последнем пересмотре ВОЗ (2001), отражает уровень блока нормальной В-линейной дифференцировки, приводящего к иммортализации конкретного этапа, со всеми молекулярно-биологическими свойствами лимфоидных клеток данного «возраста» (N. Harris et al., 2001). Иными словами, при единой направленности вектора диссеминации каждый вариант периферической В-линейной НХЛ имеет свои особенности, обусловленные степенью зрелости лимфомных клеток, к основным из которых относятся вероятность лейкемизации на ранних этапах заболевания и характер интрамедуллярного распространения.

Задача оптимизации диагностики поражения костного мозга при В-НХЛ привела нас к необходимости создания персонифицированных диагностических алгоритмов для каждой нозологии на основании подбора оптимального сочетания иммуноморфологических методов исследования двух основных типов материала костного мозга — аспирата и трепанобиоптата.

Наиболее уместной основой составления диагностических комбинаций с нашей точки зрения стал вероятностный показатель тропности к костному мозгу, который определяет количество костномозгового опухолевого компонента, влияющего, в свою очередь, на цель диагностики. Так, если иммунофенотипирование выраженного костномозгового субстрата лимфом с высокой тропностью (вероятность лейкемизации  $>50\%$ ) служит, в первую очередь, межвариантной дифференциальной диагностике, то для В-НХЛ со средней и низкой вероятностью лейкемизации ( $\leq 50\%$ ) первая задача иммунологического исследования — исключение реактивного (доброкачественного) характера процесса, определяющее стадирование лимфомы.

### **В-ХЛЛ/ЛМЛ**

Все 6 случаев данного варианта лимфомы характеризовались отчетливым патологическим лимфоцитозом в аспирате костного мозга. Во всех наблюдениях, даже при невысоких цифрах неопластических лимфоцитов (25,8 %) характерный облик клеток, в сочетании с известной иммуноморфологией экстремедуллярного компонента позволили с большой долей вероятности уже на уровне стандартной цитологии предположить поражение костного мозга при В-ХЛЛ/ЛМЛ. Иммунофенотипирование методом проточной цитофлуориметрии подтвердило специфический характер процесса. Наиболее важным моментом исследования стала возможность анализа диагностической коэкспрессии молекул CD5 и CD23 на поверхности CD19+ лимфоцитов, а также количественное определение уровня экспрессии CD20 (рис. 1) (N. Harris et al., 2001).

При морфологическом исследовании материала трепанобиоптатов, проведенного в 2 случаях из 6, никакой дополнительной диагностической информации получено не было — классический облик неопластических лимфоцитов, а также ха-

рактерный тип интрамедуллярной диссеминации в виде дисперсии между элементами нормального гемопоэза (интерстициальный тип) послужили простым подтверждением данных комплексного исследования аспирата (рис. 2).

Иммуногистохимическое исследование материала трепанобиоптата не требовалось ни в одном случае, кроме того, сложности применения диагностических антител CD5 и CD23 на парафиновом материале и невозможность оценки их коэкспрессии на лимфоидном компоненте определили в представленных случаях абсолютное преимущество метода проточной цитофлуориметрии.

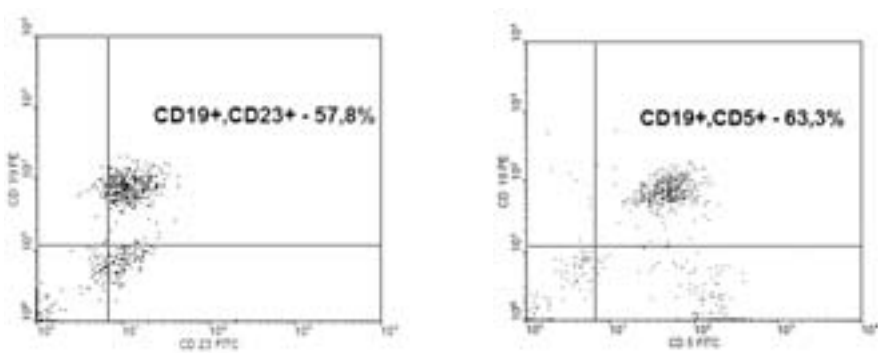


Рис. 1. Коэкспрессия В-лимфоцитами (CD19+) молекул CD5 и CD23

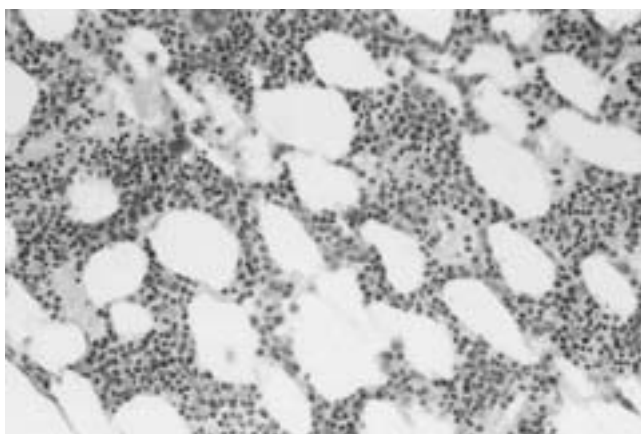


Рис. 2. Морфологическая картина трепанобиоптата костного мозга при В-ХЛЛ/ЛМЛ. Интерстициальный тип роста лимфомы. Гематоксилин–эозин  $\times 250$ . Больной Б., 66 лет

На этом основании требует обсуждения вопрос вообще о целесообразности проведения трепанобиопсии костного мозга при В-ХЛЛ/ЛМЛ на этапе первичной диагностики при условии наличия отчетливого патологического лимфоцитоза в материале аспирата костного мозга (Vain, 2001 (article)). Наши данные могут свидетельствовать в пользу отказа от морфологического (гистологического) исследования костного мозга в классических случаях В-ХЛЛ/ЛМЛ при условии возможности проведения комплексного иммуноморфологического исследования аспирата с использованием проточной цитофлуориметрии.

### **Лимфома из клеток мантии (ЛКМ)**

Данная нозология, как и В-ХЛЛ/ЛМЛ, относится к лимфомам с высоким риском лейкемизации на ранних этапах развития заболевания. Частота поражения костного мозга на момент первичной диагностики, по данным некоторых иностранных авторов превышала 90 % (Cohen с соавт., 1998).

Все 6 случаев ЛКМ нашего исследования отличались наличием выраженного лейкемического субстрата — минимальный процент патологических лимфоцитов при подсчете миелограммы составил 50 %.

Выраженный патологический лимфоцитоз аспирата костного мозга позволил с успехом применить метод проточной цитофлуориметрии для характеристики иммунофенотипа во всех наблюдениях. Помимо определения диагностической экспрессии Т-клеточного антигена CD5 на клональных В-лимфоцитах, одним из важных поисковых событий для ЛКМ была возможность количественной оценки уровня экспрессии молекулы CD20 на лимфомных клетках с помощью ПЦ (рис. 3). Низкие уровни экспрессии пан-В-клеточного маркера CD20 являются хорошим диагностическим ориентиром для проведения дифференциальной диагностики ЛКМ с В-ХЛЛ/ЛМЛ и считается лучшей альтернативой определению экспрессии молекулы FMC7 (Hubl с соавт., 1998).

При исследовании материала трепанобиоптатов основной особенностью лимфомы была тенденция к образованию очагов в гемопозитической ткани с межтрабекулярной локализацией и тенденцией к слиянию, при этом характер интрамедуллярной диссеминации лимфомы был одинаков во всех 6 случаях (табл. 8).

Стандартное морфологическое исследование трепанобиоптата является, с нашей точки зрения, обязательным во всех случаях, ввиду частой трансформации ЛКМ в более агрессивный бластоидный вариант. Явление не поддается диагностике методом ПЦ, так как не сопровождается изменением профиля экспрессии иммунологических маркеров — видимые преобразования касаются только морфологического облика клеток (Dunphy, S.E. Wheaton, S.L. Perkins 1997). Два подобных случая детально описаны нами (рис. 4).

Таким образом, при ЛКМ наилучшим методом иммунофенотипирования может считаться проточная цитофлуориметрия, однако даже комплексного иммуноморфологического исследования материала аспирата, как при В-ХЛЛ/ЛМЛ, недостаточно — для исключения трансформации в бластоидный вариант требуется обязательное сочетание со стандартной морфологией трепанобиоптата.

Таблица 8.

**Уровни относительного лимфоцитоза в аспирате КМ при ЛКМ в сопоставлении с гистологическим типом поражения в трепанобиоптате**

Пациенты ФИО/пол/ возраст	Процент лимфоидных элементов в аспирате КМ/клеточный тип	Гистологический тип поражения в трепанобиоптате КМ/клеточный тип
Б.,/ж/ 61 год	72% лимфоциты 1.6% пролимфоциты*	Исследование не проводилось
В.,/ж/ 62 года	68% лимфоциты 5% пролимфоциты*	Исследование не проводилось
К.,/м/ 43 года	32% лимфоциты 15% пролимфоциты*	Диффузный/лимфоцитарное
К.,/м/ 47 лет	50.8% лимфоциты 4.8% пролимфоциты*	Очагово-диффузный/лимфоцитарное
Э.,/м/ 82года	53% пролимфоциты * 4.3% бласты	Диффузный/ бластное
М.,/ж/ 56 лет	10.8% лимфоциты	Очагово-диффузный/лимфоцитарное

\*— термин «пролимфоцит» обозначались клеточные элементы, имевшие бльшие размеры, по сравнению с общей лимфойной популяцией. Также к отличительным чертам подобных клеток относились неправильные «фестончатые» очертания ядер и более нежная структура хроматина с видимыми одним или несколькими ядрышками. В современной литературе, включая классификацию ВОЗ (2001), данным термином обозначаются определенные клеточные типы, встречающиеся в разной пропорции только при В-ХЛЛ/ лимфоме из малых лимфоцитов, а также составляющие субстрат В- клеточного пролимфоцитарного лейкоза. Для лимфомы из клеток мантии характерен плеоморфизм клеточного субстрата, за исключением относительно мономорфного бластоидного варианта

### Лимфома маргинальной зоны селезенки

Полученные нами результаты полностью подтвердили данные иностранных авторов о высокой тропности данного варианта периферической В-НХЛ к костному мозгу (J. Dierlamm et al., 1996). Во всех 6 случаях, описанных в работе, в аспирате костного мозга на момент первичной диагностики определялся четкий патологический лимфоцитоз в 5 из 6 случаев (табл. 9).

Важной деталью явилось отсутствие возможности изучения очагов экстрамедуллярного роста лимфомы, поэтому вся диагностическая нагрузка в рамках классификации ВОЗ (2001) легла на костномозговой компонент. Тем не менее, тщательный сбор клинических данные оказался крайне полезным — сведения о наличии спленомегалии с изменением экзогенной структуры органа во всех случаях, а также наличии «виллезных» лимфоцитов в периферической крови помогли в отношении конкретизации варианта лимфомы.

Исследование аспириата методом проточной цитофлуориметрии позволило определить во всех наблюдениях CD5- и CD103- (для случаев с «виллезным» компонентом) негативный В-иммуноподривариант периферической лимфомы.

Таким образом, цитометрически были исключены такие варианты периферических В-НХЛ как В-ХЛЛ/ЛМЛ, лимфома из клеток мантии и волосатоклеточный лейкоз, однако, информации, полученной с помощью ПЦ, было явно недостаточно для проведения дифференциальной диагностики с фолликулярной лимфомой (CD10 «-» ситуации).

При исследовании трепанобиоптатов все наблюдения поделились поровну между двумя основными гистологическими типами поражения — очаговым, с выра-

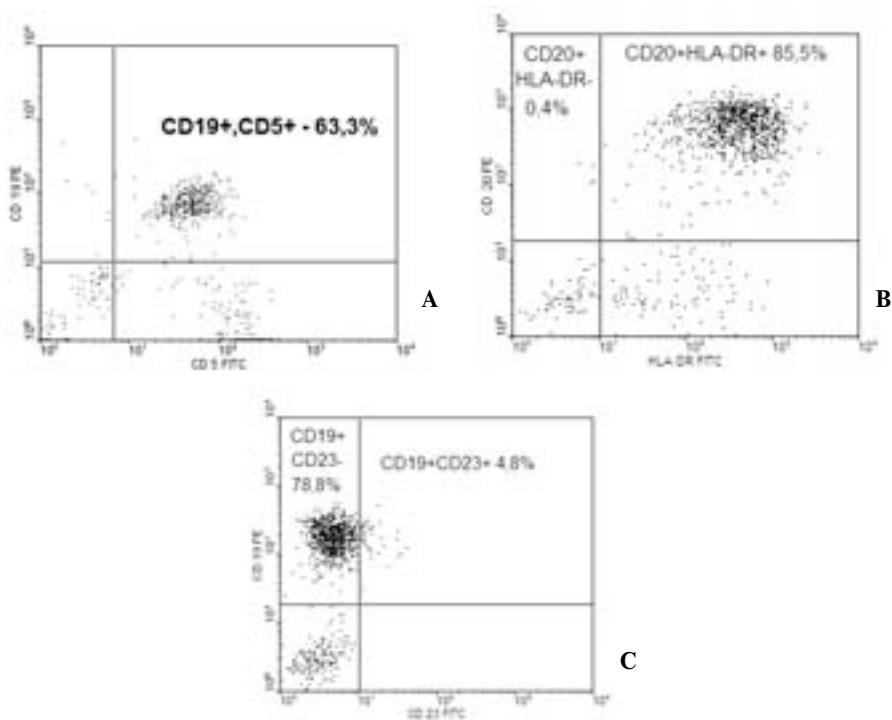
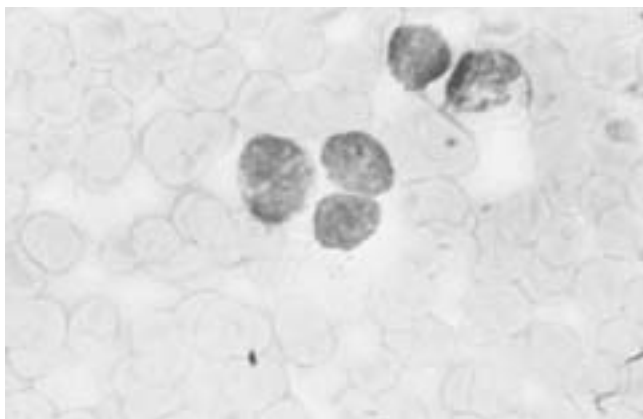


Рис. 3. Экспрессия CD5 В-лимфоцитами, при отсутствии CD23. Яркая экспрессия CD20. Больной Э., 82 года

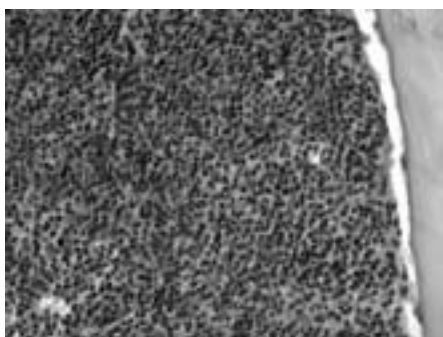
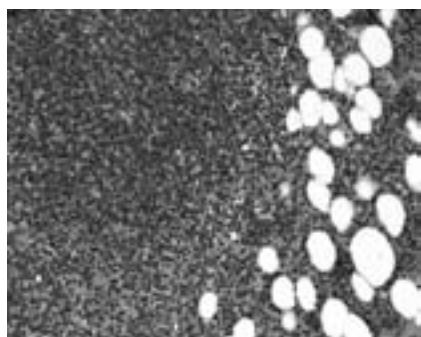
женной зональностью и межтрабекулярной локализацией, а также интрасинусоидальным, с локализацией лимфоидных элементов внутри дилатированных микрососудов костного мозга, причем последний присутствовал также в сочетании с первым (рис. 5). Патологические нодулы, как уже отмечалось, характеризовались, помимо четких контуров выраженной зональностью, определявшей их крайнее сходство с реактивными лимфоидными фолликулами.

Таким образом, показания для иммуногистохимического исследования трепанобиоптатов костного мозга были двойки — помимо необходимости проведения дифференциальной диагностики с фолликулярной лимфомой требовалось также исключение реактивной природы процесса.

Иммуногистохимическое исследование определило мономорфную В-клеточную композицию очагов, исключившую реактивную природу процесса. Выявление конгломератов В-клеток ( $CD20^+$ ,  $CD79\alpha^+$ ) в синусоидах помогло не только определить патогномичный тип инфильтрации, но и выделить поражение костного мозга там, где оно не было распознано на световом уровне (рис. 6 см. вкладку).



**Рис. 4.** Субстрат дискордантной ЛКМ. Бластный компонент аспирата. Окраска по Романовскому-Гимзе  $\times 1000$ . Больной Э., 82 года



**Рис. 5.** Морфологическая картина трепанобиоптата костного мозга при лимфоме маргинальной зоны селезенки. Справа — диффузный интрасинусоидальный тип поражения. Гематоксилин-эозин  $\times 400$ . Больной О. 58 лет. Слева — очаговый межтрабекулярный тип поражения. Гематоксилин-эозин  $\times 200$ . Больная Ч., 54 года

Важным диагностическим подспорьем оказалось обнаружение фолликулярных дендритных клеток в центральных отделах нодулей — признака, считающегося патогномоничным для всех лимфом маргинальной зоны (рис. 7 см. вкладку).

Отсутствие паратрабекулярной локализации и типичной центроцитоидно-центробластной морфологии, в сочетании с тенденцией к образованию лимфоидных «сладжей» в микрососудах позволило с высокой долей вероятности провести дифференциальный диагноз с фолликулярной лимфомой (R. Henrique et al., 1999).

Таблица 9.

**Уровни относительного лимфоцитоза в аспирате КМ в сопоставлении с гистологическим типом поражения в трепанобиоптате при лимфоме маргинальной зоны селезенки**

Пациенты ФИО/пол/ возраст	Процент лимфоидных элементов в аспирате КМ/клеточный тип	Гистологический тип поражения в трепанобиоптате КМ/локализация (иммуноморфологическое исследование)
А.,/ж/ 57 лет	85% лимфоциты	Диффузный/Интерстициально/ Интрасинусоидально*
Г.,/м/ 54 года	60% лимфоциты	Нодулярный/межтрабекулярно/ Интрасинусоидально*
Л.,/ж/ 57 лет	80% лимфоциты	Диффузный/Интрасинусоидально**
О.,/м/ 58 лет	55% лимфоциты	Диффузный/ Интерстициально/ Интрасинусоидально*
Р.,/ж/47 лет	54.6% лимфоциты	Нодулярный/межтрабекулярно/ Интрасинусоидально*
Ч.,/ж/ 54 года	5.8% бласты 18% лимфоциты	Нодулярный/межтрабекулярно
* — тип поражения, выявляющийся только при иммуногистохимическом окрашивании		
** — в случае больной Л. патологическая лимфоидная инфильтрация не была выявлена на уровне световой микроскопии. Поражение КМ в материале трепанобиоптата было определено только с использованием метода иммуногистохимии		

Таким образом, можно сказать, что для такой иммунологически и цитогенетически «бесцветной» лимфомы как лимфома маргинальной зоны селезенки существуют отчетливые патогномичные признаки поражения костного мозга иммуноморфологического уровня, поэтому определяющим (при отсутствии возможности проведения спленэктомии) является иммуногистохимическое исследование трепанобиоптата костного мозга (V. Costes et al., 2002). Исследование можно считать незаменимым при проведении дифференциальной диагностики с фолликулярной лимфомой (CD10 «-» случаи) и реактивным процессом, а также для правильного стадирования (выявление незаметной на световом уровне интрасинусоидальной инфильтрации).

### Фолликулярная лимфома (ФЛ)

По данным иностранных авторов ФЛ лейкоцизируется в 40–60% случаев. В нашей работе поражение костного мозга было подтверждено в 4 из 7 случаев. Как известно, особенности лейкоцизации ФЛ проявляются в достаточно редком появлении патологического лимфоцитоза в аспирате костного мозга, а также специфическом интрамедулярном росте опухолевых очагов в тесном контакте с трабекулами (паратрабекулярный тип). В материале аспирата костного мозга больных ФЛ нашего исследования клетки, подозрительные в отношении опухолевых, были обнаружены только в 3 случаях, причем в двух из них процент от общего числа миеелокариоцитов составил менее 5%. Подобная минимальная концентрация клеток с морфологией опухолевых (типа центроцитоидных) не позволила провести исследование их иммунофенотипа методом проточной цитофлуориметрии. ПЦ, проведенная в третьем случае (процент лимфоидных клеток составил 27.4%), помогла выделить преобладание Т-клеточной популяции, при отсутствии маркеров кло-нальности на В-клетках, то есть исключить наличие лимфомного компонента.



При исследовании трепанобиоптатов мелкоклеточная лимфоидная инфильтрация была выявлена во всех случаях (табл. 10).

Важным морфологическим аспектом в пользу диагноза ФЛ, были цитологические особенности лимфоидных клеток — сочетание небольшого размера с плотной структурой хроматина «угловатых» ядер, при этом патогномичная паратрабекулярная локализация процесса была обнаружена в 4 случаях из 7; в 2 из них лимфоидные скопления локализовались также и межтрабекулярно (рис. 8).

В 3 случаях паратрабекулярная локализация лимфоидных скоплений вообще обнаружена не была, лимфоидные очаги локализовались исключительно межтрабекулярно.

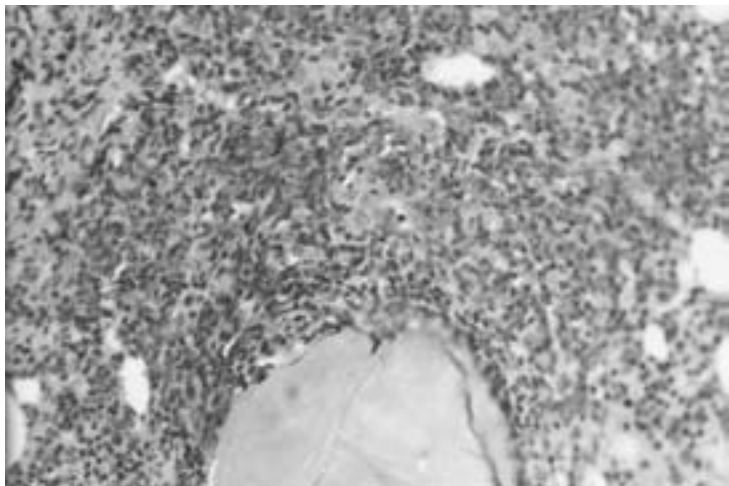
Основой диагноза во всех случаях (за исключением одного) ФЛ служило первичное иммуноморфологическое исследование экстрамедуллярного субстрата. Информация об исходном иммуноморфологическом варианте лимфомы у пациента с мелкоклеточной «центроцитоидной» инфильтрацией костного мозга, как видно из табл. 10, в 100 % случаев заставила морфолога сделать заключение в пользу костномозговой инвазии мелкоклеточной лимфомы, предположительно — ФЛ.

При проведении иммуногистохимического исследования первичной задачей для нас было, конечно, проведение дифференциального диагноза с реактивным процессом. Иммунологический уровень решения подобной проблемы базируется на знаниях о фракционном соотношении лимфоидных Т- и В-клеток, которое

Таблица 10.

**Результаты иммуногистохимического исследования трепанобиоптатов в группе больных с фолликулярной лимфомой**

Пациенты ФИО/пол/ возраст	Гистологический тип поражения/топика Процесса	Гистологический диагноз	Клеточный состав	Иммунологический диагноз
В., /ж/57 лет	Очаговый/ межтрабекулярно	Мелкоклеточная лимфома	Т- и В- клетки В- без атипии; соотношение- 2:1	Реактивный процесс
М.,/ж/ 58 лет	Очаговый/меж- и паратрабекулярно	Мелкоклеточная лимфома	Мономорфно В; центроцитоидно- центробластный	Фолликулярная лимфома
С.,/ж/71 год	Очаговый/ паратрабекулярно	Фолликулярная лимфома (?)	Т- и В- клетки В- без атипии; соотношение- 2:1	Предел метода: Реактивный процесс (?) Минимальное поражение (?)
Т.,/ж/ 47 лет	Очаговый/меж- и паратрабекулярно	Мелкоклеточная лимфома	Мономорфно Т В-единичные, без атипии	Реактивный процесс
Х.,/ж/ 58 лет	Очаговый/ межтрабекулярно	Мелкоклеточная лимфома	Мономорфно В; центроцитоидно- центробластный	Фолликулярная лимфома
Г. /м/	Очаговый/меж- и паратрабекулярно	Мелкоклеточная лимфома	Мономорфно В; центроцитоидно- центробластный	Фолликулярная лимфома
Б.,/м/52 года	Очаговый/ межтрабекулярно	Мелкоклеточная лимфома	Мономорфно В; центроцитоидно- центробластный	Фолликулярная лимфома



**Рис. 8. Морфологическая картина трепанобиоптата при ФЛ. Паратрабекулярный гистологический тип роста. Гематоксилин -Эозин  $\times 400$ . Больная М., 58 лет**

в норме смещено в сторону преобладания Т-компонента. Сведения иностранных исследователей, посвященные этому вопросу, сводятся к довольно простым практическим рекомендациям для периферических мелкоклеточных В-НХЛ, которые были приняты нами за диагностическую основу:

- Определение значительного увеличения в костном мозге В-лимфоцитов (CD20+, CD79 $\alpha$ +), с тенденцией к образованию скоплений и изменением внешнего облика — явный признак В-НХЛ;
- Мономорфный Т-клеточный состав лимфоидной инфильтрации у пациента с экстрамедуллярной В-НХЛ — реактивный процесс;
- Сочетанная композиция лимфоидных очагов (присутствие Т- и В-клеток) с обязательным существенным преобладанием Т-клеток (CD3+, CD45RO+) — вероятнее реактивный (доброкачественный) характер изменений.

В 1 случае ФЛ состав очагов оказался мономорфно Т-клеточным, что было расценено нами как реактивный процесс. Еще в 2 наблюдениях лимфоидные скопления, в том числе и с паратрабекулярной локализацией были представлены В- и Т-клетками с преобладанием последних. В-лимфоциты (CD79 $\alpha$ +, CD20+) не имели цитологических признаков «центроцитоидности», характеризовались малым размером, округлой формой ядер. На иммуноморфологическом уровне наблюдаемые изменения не имели типичных черт лимфомного поражения, и были расценены нами как реактивные. Оценка клональности В-клеток (IgVh — генов) в подобных случаях, несомненно, даст более объективную информацию. В 4 остальных — лимфоидный компонент состоял на 90% из В-клеток с морфологией центроцитоидных, причем некоторые В-клетки имели морфологию центробластов — в этих наблюдениях был установлен диагноз ФЛ.

Таким образом, в 43% случаев морфологический диагноз поражения костного мозга при фолликулярной лимфоме иммунологически подтвержден не был, и иммуноморфологическое исследование явилось основополагающим для исключения поражения костного мозга или правильного стадирования опухоли. Подводя итог в отношении диагностики поражения костного мозга при ФЛ, можно сказать, что во всех случаях нозологии оптимальным сочетанием диагностических методов является иммуноморфологическое исследование и аспирата и трепанобиоптата, причем основополагающим может быть исследование последнего. Диагноз лейкомизации лимфомы не может быть установлен только на основании стандартного морфологического исследования трепанобиоптата даже при обнаружении типичного centrocytoidного облика лимфоидных клеток и/или их паратрабекулярной локализации. Иммуногистохимическое исследование трепанобиоптата является абсолютным показанием, даже при констатации отсутствия поражения по данным иммунологического исследования материала аспирата костного мозга методом проточной цитофлуориметрии. Проведение последнего, однако, желательно даже в случаях ФЛ с минимальным процентом лимфоидных элементов подозрительной морфологии или общим относительным увеличением количества зрелых лимфоцитов более 15 % от числа всех миелокариоцитов.

#### **Лимфома маргинальной зоны. Вариант, ассоциированный со слизистыми (MALT-тип)**

Во всем мире нозология относится к вариантам периферических мелкоклеточных В-клеточных НХЛ с низкой тропностью к костному мозгу (J. Dierlamm et al., 1996; C. Montalban et al., 1995). Косвенным подтверждением данного утверждения можно считать малое количество случаев, попавших в наше исследование. Во всех наблюдениях имела место классическая локализация лимфомы (желудок), а также доказанная связь с *Helicobacter pylori*.

Лимфоидная инфильтрация костного мозга во всех случаях была обнаружена только при исследовании трепанобиоптатов, при этом никаких качественно-количественных изменений состава миелограмм обнаружено не было. Во всех наблюдениях предположительным морфологическим диагнозом была, с учетом знаний об иммуноморфологии первичного субстрата, лейкомизация мелкоклеточной лимфомы, поэтому диагностика поражения костного мозга была решающей для стадирования нозологии (табл. 11).

Доказанное поражение костного мозга определило бы IV стадию процесса что, в свою очередь, привело бы к необходимости значительной интенсификации лечения с применением системной полихимиотерапии взамен антибактериальных курсов эрадикации *Helicobacter pylori* (S.N. Malek et al., 2003).

Как следует из табл. 11, в 2 случаях очаги оказались смешанно — Т- и В-клеточными, в третьем — мономорфно Т, то есть, исходя из сформулированного выше диагностического алгоритма, убедительных данных за поражение костного мозга получено не было (рис. 9 см. вкладку).

Таким образом, можно сказать, что обнаружение лимфоидной инфильтрации любого типа в материале трепанобиоптатов костного мозга пациентов с лимфо-

мой MALT-типа есть абсолютное показание для проведения иммуногистохимического исследования, определяющего стадию и итоговую клиническую тактику.

### Диффузная В-клеточная крупноклеточная лимфома (ДВКЛ)

Довольно интересным оказался уже тот факт, что пациенты с нозологией, вероятность лейкемизации которой по данным иностранных авторов не более 30%, составили самую многочисленную группу в данной работе (M.G. Conlan et al., 1990; K. Foucar et al., 1982).

Хочется подчеркнуть, что как раз для этого варианта из всех периферических В-НХЛ нами были получены самые любопытные результаты.

По отношению к диагностическим методам верификации поражения костного мозга все пациенты с данной нозологией разделились на две группы — с и без показаний для иммуногистохимического исследования трепанобиоптатов костного мозга. Группа без показаний для иммуногистохимического исследования — 6 человек из 20 (30%). В данных наблюдениях субстрат ДВКЛ определялся как в трепанобиоптате, так и в аспирате костного мозга (рис. 10).

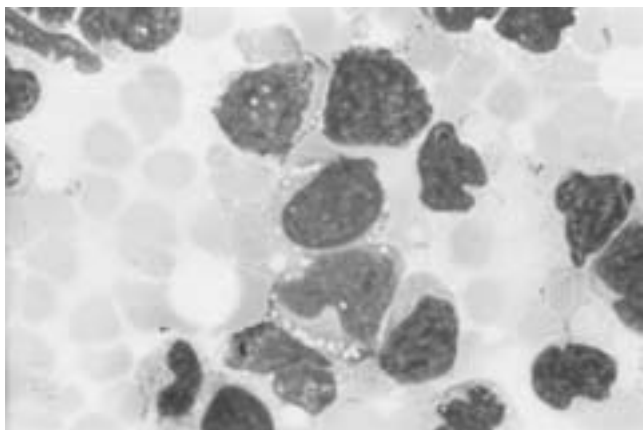
При сопоставлении обоих исследований был обнаружено, что при относительно невысоком уровне патологических бластов аспирата (не более 20%), при гистологическом исследовании трепанобиоптатов тех же больных определялось субтотальное замещение нормальной гемопоэтической ткани субстратом опухоли. Исходя из сопоставления собственных данных с анализом современной литературы, можно высказать предположение, что в основу феномена легли биологические особенности лимфомы, определяющие не интерстициальную, «поклеточную» диссеминацию лимфомы, а мультифокальный, саркомоподобный ее рост (B.J.Bain, 2001; C.F. Feller and J. Diebold, 2004). Подтверждением сказанному может быть явление интактности островков нормального гемопоэза, выявленное во всех 6 образцах костного мозга (рис. 11 см. вкладку).

Таблица 11.

### Результаты иммуногистохимического исследования трепанобиоптатов в группе больных с MALT-лимфомой

Пациенты ФИО/пол/ возраст	Гистологический тип поражения/топика Процесса	Гистологический диагноз	Клеточный состав по данным ИГХ**	Иммунологический диагноз
Г./м/ 36 лет	Очаговый/пара- и межтрабекулярно	Мелкоклеточная лимфома Фолликулярная (?)	Мономорфно Т;В- единичные, без атипии	Реактивный процесс
И./ж/ 31 год	Очаговый /межтрабекулярно	Мелкоклеточная лимфома (?)	Мономорфно Т;В- единичные, без атипии	Реактивный процесс
Т./м/ 52 года	Очаговый /не определяется*	Мелкоклеточная лимфома	Т- и В- клетки В- без атипии; соотношение- 2:1	Предел метода: Реактивный процесс (?) Минимальное поражение (?)

\* — топические характеристики процесса уточнить не представилось возможным из-за деформации при взятии материала трепанобиоптата.  
\*\* — ИГХ — иммуногистохимия



**Рис. 10.** Субстрат ДВКЛ. Аспират. Окраска по Романовскому-Гимзе  $\times 1000$ . Больная В., 71 год

Отчетливый патологический бластоз костного мозга в 6 случаях позволил применить метод проточной цитофлуориметрии, определивший принадлежность опухолевых клеток к периферическим этапам В-клеточной дифференцировки (CD20+, CD19+, CD37+, CD34-, CD10-). Сочетание подобных иммунологических характеристик опухолевых клеток аспирата с характерной гистологической картиной материала трепанобиоптатов позволило установить диагноз лейкемизации ДВКЛ (рис. 12).

Иммуногистохимическое исследование трепанобиоптатов, проведенное в некоторых случаях, не принесло дополнительной информации по сравнению с данными ПЦ и даже более того выглядело более скудным по причине более узкой панели антител для фиксированного материала.

В остальных 14 случаях ДВКЛ лимфоидная инфильтрация костного мозга, подозрительная в отношении поражения костного мозга была выявлена только при исследовании трепанобиоптатов, причем цитологические характеристики лимфоидных клеток в 10 случаях создавали прецедент гистологической дискордантности с экстрамедуллярным субстратом (рис. 13).

В двух случаях лимфоидный субстрат костного мозга имел бластную морфологию. Именно иммуногистохимическое исследование трепанобиоптатов этих больных позволило установить диагноз в рамках классификации ВОЗ, так как в одном наблюдении биопсия экстрамедуллярного компонента не могла быть проведена по техническим причинам, а другой вообще относился к редким случаям изолированной костномозговой/костной локализации лимфомы. Основой диагноза лейкемизации ДВКЛ в обоих случаях стало иммунологическое определение принадлежности бластных клеток к периферическим этапам В-линейной дифференци-

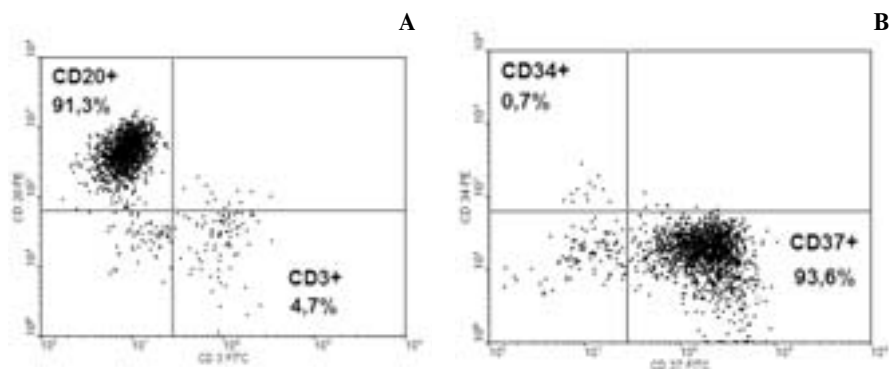


Рис. 12. Экспрессия опухолевыми бластами молекул периферических этапов В-линейной дифференцировки CD20 и CD37 при отсутствии маркера клеток-предшественников CD34. Больная В., 71 год

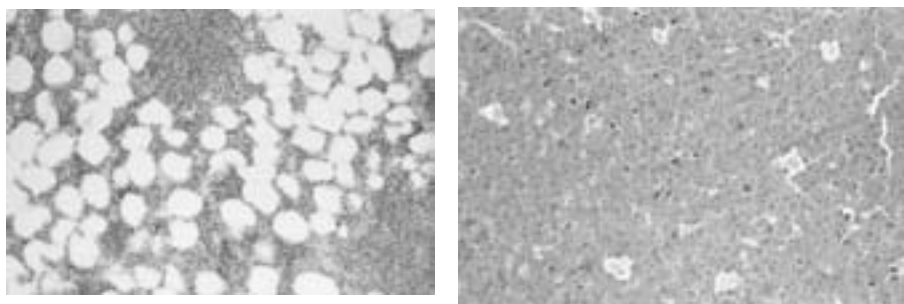


Рис. 13. Гистологическая дискордантность экстрамедуллярного и костномозгового субстратов ДВКЛ. Справа — лимфоузел. Гематоксилин-эозин  $\times 400$ . Слева — трепано-биоптат костного мозга. Гематоксилин-эозин  $\times 200$ . Больная К., 49 лет

ровки (CD20+, CD3-) в сочетании с характерным центробластно/иммунобластным обликом клеток и локальным диффузным (мультифокальным) гистологическим типом роста.

Анализ 10 случаев с мелкоклеточным и смешанным характером лимфоидной инфильтрации, по нашему мнению, представляет собой один из ключевых моментов всего исследования.

В современной мировой литературе явление дискордантных гистологических ситуаций при крупноклеточной В-клеточной лимфоме обсуждается довольно мало. Суммируя весь доступный литературный материал, можно выделить три основные причины дискордантности, выделяемые зарубежными коллегами (M. Kremer et al, 2003):

1. Трансформация в более агрессивный вариант (крупноклеточную НХЛ) наиболее характерно для В-ХЛЛ (синдром Рихтера). Представляет собой явление опухолевой прогрессии.

2. Реактивный процесс. Мелкоклеточные инфильтраты в костном мозге в противопоставление экстрамедуллярной В-клеточной крупноклеточной лимфоме имеют Т-клеточную природу, с разным преобладанием CD4+/CD8+ популяций.

3. Истинная биклональность. Одновременное сосуществование двух лимфопрлиферативных процессов, с разными иммуноморфологическими и молекулярно-биологическими клональными особенностями.

Иммуногистохимическое исследование трепанобиоптатов в 9 случаях ДВКЛ стало основополагающим для диагностики качества процесса (табл. 12).

Во всех случаях с лимфоцитарным типом поражения мелкоклеточный лимфоидный компонент оказался представленным мономорфно Т-клетками (CD3+, CD45RO+).

Таблица 12.

**Сопоставление данных морфологического и иммуногистохимического исследований трепанобиоптатов костного мозга в группе больных с ДВКЛ**

Пациенты ФИО/пол/ возраст	Гистологический тип поражения/топика Процесса	Клеточный состав	Гистологический диагноз	Клеточный состав по данным ИГХ**	Иммунологически и диагноз
Б., /м/ 69 лет	Очаги/ Межтрабекулярно	Лимфоцитарный	Мелкоклеточная лимфома	Мономорфно Т; В- единичные, без атипии	Реактивный процесс
Б., /м/ неизв.	Очаги/ Межтрабекулярно	Лимфоцитарный	Мелкоклеточная лимфома (?)	Мономорфно Т; В- единичные, без атипии	Реактивный процесс
К., /ж/49 лет	Очаги/ Межтрабекулярно	Лимфоцитарный	Дискордант/ мелкоклеточная лимфома (?) Реакт (?)	Мономорфно Т; В- единичные, без атипии	Реактивный процесс
П., /ж/51 год	Очаги/ Межтрабекулярно	Лимфоцитарный	Дискордант/ мелкоклеточная лимфома (?) Реакт (?)	Мономорфно Т; В- единичные, без атипии	Реактивный процесс
Р., /ж/ неизв.	Очаги/ Межтрабекулярно	Лимфоцитарный	Мелкоклеточная лимфома	Мономорфно Т; В- единичные, без атипии	Реактивный процесс
С., /м/ 56 лет	Очаги/ Межтрабекулярно	Лимфоцитарный	Дискордант/ мелкоклеточная лимфома (?) Реакт (?)	Мономорфно Т; В- единичные, без атипии	Реактивный процесс
Б., /м/ 43 года	Очаги/ Межтрабекулярно + паратрабекулярно	Смешанный	Дискордант/ мелкоклеточная лимфома (?) Реакт (?)	Преобладают Т; В- крупные, с атипией, ядерным плеоморфизмом, дискретные	В- крупноклеточная
К., /м/ 60 лет	Очаги/ Межтрабекулярно	Смешанный	Дискордант/ мелкоклеточная лимфома (?) Реакт (?)	Преобладают Т; В- крупные, с атипией, ядерным плеоморфизмом, дискретные	В- крупноклеточная
С., /ж/ 53 года	Очаги/ Межтрабекулярно + паратрабекулярно	Смешанный	Дискордант/ мелкоклеточная лимфома (?) Реакт (?)	Преобладают Т; В- крупные, с атипией, ядерным плеоморфизмом, дискретные	В- крупноклеточная

Ситуации со смешанным составом очагов (как бы центроцитойдно-центробластного типа) на микроскопическом уровне стандартного окрашивания выглядели подобными фолликулярной лимфоме, причем паратрабекулярная локализация инфильтратов, обнаруженная в двух случаях, еще более усиливала сходство. При проведении иммуногистохимического исследования было обнаружено, что весь мелкоклеточный компонент экспрессировал Т-клеточные маркеры, а В-клеточные антигены (CD20, CD79 $\alpha$ ) несли только крупные бластные клетки с выраженным ядерным плеоморфизмом и высокой митотической активностью. Дискретное расположение последних среди плотного Т-компонента напоминало гистологическую картину варианта ДВКЛ богатого Т-клетками (T-cell rich), что на самом деле было, по-видимому, ни чем иным как уникальным морфологическим отражением феномена реактивности Т-клеточного звена иммунитета в ответ на начинающуюся костномозговую инвазию ДВКЛ (рис. 14 см. вкладку).

Немаловажным фактом в этом свете является то, что все случаи (кроме одного) с первичной экстранодальной локализацией ДВКЛ попали в группу с гистологической дискордантностью или, как было определено иммуногистохимически, с феноменом Т-клеточной реакции. Большую часть случаев с первичной нодальной локализацией экстрамедуллярного субстрата ДВКЛ отличало как раз минимальное количество Т-клеток в костном мозге и быстрые темпы интрамедуллярного роста с появлением патологических бластов в аспирате. Безусловно, наши наблюдения могут служить лишь прологом для последующих глубоких исследований механизмов противоопухолевой активности или толерантности иммунной системы. Таким образом, возвращаясь к основной задаче работы, следует сказать, что оптимальная комбинация иммунологических методов определения характера лимфоидной инфильтрации при ДВКЛ может быть определена только после комплексного морфологического исследования как аспирата, так и трепанобиоптата костного мозга.

При обнаружении отчетливого бластоза в аспирате костного мозга может быть применена проточная цитофлуориметрия, однако метод должно быть обязательно дополнено стандартным исследованием трепанобиоптата, и при обнаружении характерной гистологической картины ДВКЛ проведение иммуногистохимического исследования можно считать нецелесообразным.

Обнаружение лимфоидной инфильтрации, морфологически отличающейся от основного экстрамедуллярного субстрата ДВКЛ, является абсолютным показанием для проведения иммуногистохимического исследования трепанобиоптата костного мозга.

### **Лимфома Беркитта**

Частота поражения костного мозга в нашем исследовании составила 50 %, причем лейкокемия возникла в 2 случаях из 4 на ранних этапах развития заболевания.

Костномозговой компонент как в аспирате, так и трепанобиоптате отличался типичными для нозологии чертами — бластный компонент аспирата имел морфологию L3, а в материале трепанобиоптата обнаруживалась характерная морфологическая картина «звездного неба» (рис. 15) (B.J.Bain, 2001 ; C.F. Feller and J. Diebold 2004).

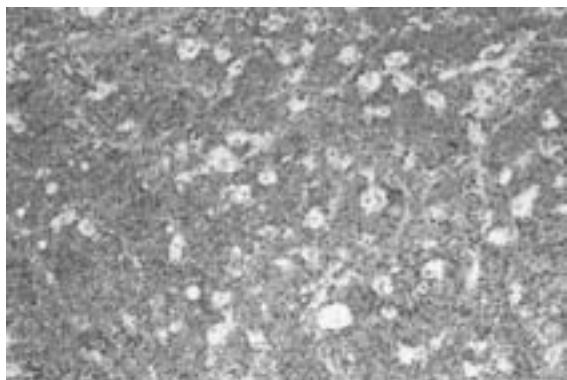


Комплексное исследование аспирата с применением проточной цитофлуориметрии позволило определить классический для лимфомы Беркитта иммунофенотип — сочетание экспрессии молекул периферических этапов В-клеточной дифференцировки с экспрессией молекулы CD10 (разумеется, что при отсутствии морфологии L3 была бы показана оценка пролиферативной активности — уровень Ki-67 и наличия транслокации t(8;14).

Морфологическая картина трепанобиоптата костного мозга сыграла второстепенную роль уточнения и тем более не требовала проведения иммуногистохимии трепанобиоптатов. В двух других случаях фенотип лимфомы был установлен на основании морфоиммунофенотипического исследования экстрамедуллярного компонента. В аспирате костного мозга никаких изменений не определялось, однако при проведении морфологического исследования трепанобиоптатов была выявлена мелкоклеточная очаговая лимфоидная инфильтрация, которая в одном случае образовывала единичную нодулярную структуру с четкими контурами и зональностью, а в другом — множественные интрестициальные межтрабекулярные скопления без четких контуров (рис. 16).

Дискордантный тип лимфоидных инфильтратов послужил показанием для проведения иммуногистохимического исследования трепанобиоптатов. Состав очагов в обоих случаях оказался смешанным Т- и В-клеточным, со значительным преобладанием клеток Т-линии. Морфология В-клеток более всего напоминала облик малого лимфоцита и не имела ничего общего с субстратом лимфомы Беркитта. Таким образом, в этих случаях поражение костного мозга было исключено (рис. 17 см. вкладку).

Подводя итог, можно сказать, что при лейкемизации высокий пролиферативный потенциал клеток лимфомы Беркитта приводит к быстрой интрамедуллярной диссеминации с появлением лейкозоподобной картины аспирата костного мозга. Специфичность цитологического облика бластов (L3), в сочетании с ха-



**Рис. 15.** Морфологическая картина «звездное небо» лимфомы Беркитта в материале трепанобиоптата костного мозга. Больная Б. 16 лет. Гематоксилин-Эозин  $\times 250$

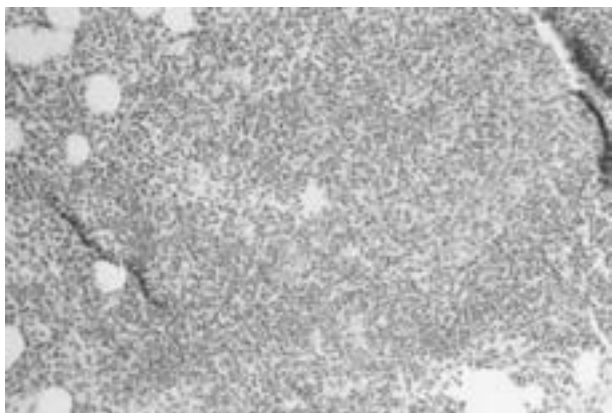
рактерным иммунологическим профилем экспрессии маркеров периферических этапов В-линейной дифференцировки определяют комплексное исследование аспирата при лимфоме достаточным не только для установления поражения костного мозга, но и для непосредственной диагностики варианта в рамках классификации ВОЗ (2001). В этой связи встает вопрос не только о целесообразности проведения иммуногистохимического исследования трепанобиоптатов костного мозга, но и вообще о необходимости проведения даже стандартного морфологического исследования костного мозга при лейкомизации лимфомы Беркитта (В.Ж.Вайн, 2001). Для случаев с гистологической дискордантностью ситуация выглядит обратной, так как только на основании комплексного иммунологического исследования как аспирата так и обязательно трепанобиоптата можно установить истинную природу нехарактерной для лимфомы Беркитта лимфоидной инфильтрации КМ.

### Нестандартные диагностические ситуации

К нестандартным диагностическим ситуациям можно отнести единичные примеры лейкомизации лимфом, вовлечение костного мозга при которых рассматривается в мировой литературе как казуистика или составляет в процентном отношении менее 5 %. Детальное описание характерных черт их лейкомизации крайне важно, так как может послужить моделью для создания диагностических алгоритмов.

Из подобных вариантов периферических В-НХЛ в нашем исследовании встретились нодальный вариант лимфомы маргинальной зоны и первичная В-клеточная медиастинальная лимфома с поражением костного мозга.

Таким образом, подводя итог можно сказать, что иммуногистохимическое ис-



**Рис. 16.** Морфологическая картина мелкоклеточной лимфоидной инфильтрации в трепанобиоптате больного лимфомой Беркитта. Гематоксилин-эозин  $\times 200$ . Больной К., 28 лет

следование костного мозга при периферических В-клеточных неходжкинских лимфомах является необходимым диагностическим мероприятием, которое с успехом может служить межвариантной диагностике или стадированию лимфом. Максимальную информацию ИГХ — исследование может дать только при наличии у патолога данных комплексного исследования материала всех субстратов опухоли в каждом конкретном клиническом случае.

### **Выводы**

1. Иммунофенотипирование лимфоидных клеток костного мозга (проточная цитометрия, иммуногистохимия) является методом выбора в диагностике и стадировании неходжкинских лимфом по костному мозгу. Это обусловлено отсутствием патогномичных цитологических и гистологических признаков опухолевого поражения костного мозга для большинства вариантов лимфом, выделяемых согласно классификации ВОЗ (2001).

2. В-клеточный хронический лимфолейкоз или лимфома из мелких лимфоцитов характеризуются интерстициальным типом поражения костного мозга опухолевыми В-лимфоцитами, коэкспрессирующими антигены CD5 и CD23. Диагноз (или поражение костного мозга) устанавливается при иммуноцитометрическом исследовании аспирата костного мозга, трепанобиопсия с иммуногистохимическим исследованием не показаны.

3. Генерализация мантийноклеточной лимфомы сопровождается поражением костного мозга по очаговому (позже — очагово-диффузному) межтрабекулярному типу, реже — в сочетании с паратрабекулярным. Диагностический иммунофенотип опухолевых В-лимфоцитов (CD5+CD23-) устанавливается по пунктату костного мозга, иммуногистохимического исследования не требуется. Морфологическое изучение трепанобиоптата костного мозга показано для диагностики трансформации в бластоидный вариант.

4. Поражение костного мозга при фолликулярной лимфоме носит очаговый характер: паратрабекулярный, межтрабекулярный тип или их сочетание. Комплексное иммуноморфологическое исследование трепанобиоптата и аспирата костного мозга показано во всех случаях, так как позволяет провести дифференциальный диагноз с лимфомой маргинальной зоны селезенки и реактивными процессами.

5. Лимфома маргинальной зоны селезенки характеризуется интрасинусоидальным, фолликулоподобным и диффузным интерстициальными типами поражения костного мозга. Интрасинусоидальный и фолликулоподобный межтрабекулярный рост опухолевых клеток в костном мозге являются специфическими для данного варианта лимфомы и устанавливаются только при иммуногистохимическом исследовании на основании подтверждения В-клеточной природы опухолевых элементов и обнаружения CD21+CD23+ фолликулярных дендритных клеток.

6. Поражение костного мозга при диффузной В-крупноклеточной лимфоме во многом взаимосвязано с первичной локализацией опухоли: для первичных нодальных локализаций более характерен диффузный локализованный тип роста бластных клеток, для экстранодальных — морфологически «дискордантные» ситу-

ации с формированием в костном мозге очаговых структур из Т-лимфоцитов. Иммуногистохимическое исследование трепанобиоптата необходимо при отсутствии лимфомных (бластных) клеток в аспирате костного мозга или при морфологических признаках «дискордантности».

7. Лимфома Беркитта характеризуется высокой частотой поражения костного мозга по типу острого лейкоза (цитологически L3-вариант). В срезах трепанобиоптатов костного мозга среди диффузно растущих бластных клеток отмечаются вкрапления разрозненных макрофагов (картина «звездного неба» как и в первичной опухоли). Периферический иммунофенотип В-бластов с высокой пролиферативной активностью устанавливаются по пунктатам костного мозга. Иммуногистохимическое исследование трепанобиоптатов необходимо при обнаружении нетипичных форм лимфоидной инфильтрации.

8. В костном мозге больных с иммуноморфологически диагностированной лимфомой желудка MALT-типа могут обнаруживаться очаговые мелкоклеточные лимфоидные инфильтраты (межтрабекулярные, паратрабекулярные), напоминающие на морфологическом уровне лимфомное поражение. В большинстве случаев состав этих инфильтратов преимущественно Т-клеточный (реактивные), что может быть установлено при иммуногистохимическом исследовании трепанобиоптатов костного мозга.

9. При плазмоцитомах и лимфоплазмоцитарных опухолях костный мозг может быть единственной экстранодальной локализацией лимфомного поражения, доступной для гистологического исследования. Иммунологическая верификация диагноза основывается на установлении моноклональности (/) с подтверждением плазмоклеточной дифференцировки (CD138).

### Список литературы

1. Османов Д.Ш. Поражение костного мозга при неходжкинских лимфомах: Дис. д-ра мед. наук — М., 2004 — (ГУ РОНЦ им. Н.Н.Блохина РАМН).
2. Тупицын Н.Н., Кадагидзе З.Г. Иммунодиагностика гемобластозов человека. Пособие для врачей. М.: Издательская группа ГУ РОНЦ им Н.Н. Блохина РАМН, 2003 — 42 С.
3. Чигринова Е.В. Возможности типирования трепанобиоптатов костного мозга при неходжкинских лимфомах. Иммунология гемопоэза. М.:Издательская группа ГУ РОНЦ им Н.Н. Блохина РАМН, 2004 — С. 105-108.
4. Чигринова Е.В. Поражение костного мозга при неходжкинских лимфомах. Иммунология гемопоэза — М.:Издательская группа ГУ РОНЦ им Н.Н. Блохина РАМН, 2005 — С. 112- 144
5. Bain B.J. et al. Bone marrow pathology. Blackwell Science, 2001, Ltd, London.
6. Bain B.J. Bone marrow trephine biopsy. J Clin Pathol. 2001 — V. 54 P. 737-742.
7. Bosch F., Ferrer A., Lopez-Guillermo A. et al. Fludarabine, cyclophosphamide and mitoxantrone in the treatment of resistant or relapsed chronic lymphocytic leukaemia. Br. J. Haemat — 2002 — V. 119. P. 976-984.
8. Cohen P.L, Kurtin P.J., Donovan K.A. and Hanson C.A. Bone marrow and periferal blood involvement in mantle cell lymphoma. Br. J. Haemat — 1998 — V. 101 — P. 302-310.

9. *Conlan M.G., Bast M., Armitage J.O., Weisenburger D.D.* Bone marrow involvement by non-Hodgkin's lymphoma: the clinical significance of morphologic discordance between the lymph node and bone marrow. Nebraska Lymphoma Study Group. *J. Clin. Oncol* — 1990 — V.8, №7 — P.1163-1172.
10. *Costes V., Duchayne E., Taib J.* et al. Intrasinusoidal bone marrow infiltration: a common growth pattern for different lymphoma subtypes. *Br. J. Haemat* — 2002 — V.119 — P.916-922.
11. *Kremer M., Spitzer M.*, et al. Discordant bone marrow involvement in diffuse large B-cell lymphoma: comparative molecular analysis reveals a heterogeneous group of disorders. *Lab. Invest* — 2003 — V.83, №1 — P.107-114.
12. *Dierlamm J., Pittaluga S., Wlodarska I.*, et al. marginal zone b-cell lymphomas of different sites share similar cytogenetic and morphologic features. *Blood* — 1996 — V.87 — P. 299-307.
13. *Dunphy C.H., Wheaton S.E., Perkins S.L.* CD23 expression in transformed small lymphocytic lymphomas/chronic lymphocytic leukemias and blastic transformations of mantle cell lymphoma. *Mod. Pathol* — 1997 — V.10, №8 — P. 818-822.
14. *Feller A.C., Diebold J.* Histopathology of nodal and extranodal non-Hodgkin's lymphoma. Third, Completely Revised and Updated Edition — 2004 — Berlin — New York: Springer, 2004.
15. *Foucar K., Robert W.* et al. Bone Marrow and blood involvement by lymphoma in relationship to the Lukes-Collins classification. *Cancer* — 1982 — V.49 — P. 888-897.
16. *Harris N., Jaffe E.S., Diebold J.* et al. World Health Organisation classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissue: report of the Clinical Advisory Committee meeting-Airlie House, Virginia, November 1997// *J. Clin. Oncol* — 1999 — V.17 — P. 3835-3849.
17. *Henrique R., Achten R., Maes B., Verhoef G. and De Wolf-Peeters C.* Guidline for subtyping small B-cell lymphomas in bone marrow biopsies. *Virchows Arch* — 1999 — V.435 — P. 549-558.
18. *Malek S.N.* et al. Malt Lymphomas. *Curr Treat Option Oncol* — 2003 — V. 4, №4 — P. 269-279.
19. *Montalban C., Castrillo J.M., Abraira V.* et al. Gastric B-cell mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma: clinicopathological study and evaluation of the prognostic factors in 143 patients. *Ann Oncol* — 1995 — V.6 — P.355-362.
20. *Valet G.K., Hoffkes H.G.* Automated classification of patients with chronic lymphocytic leukemia and immunocytoma from flow cytometric three-color immunophenotypes. *Cytometry* — 1997 — V.30, №6 — P. 275-288.





