

## ДИНАМИКА ИЗМЕНЕНИЙ ИММУНОФЕНОТИПА В-ЛИМФОЦИТОВ НА РАЗЛИЧНЫХ СТАДИЯХ ХРОНИЧЕСКОГО ЛИМФОЛЕЙКОЗА, ИХ ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ И ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЯ

<sup>1</sup>Жевак Т.Н., <sup>1</sup>Чеснокова Н.П., <sup>1</sup>Шелехова Т.В., <sup>1</sup>Бизенкова М.Н., <sup>1</sup>Царева О.Е.

<sup>1</sup>ГБОУ ВПО «Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского Минздрава России», Саратов, Россия (410012, г. Саратов, ГСП ул. Большая Казачья, 112), e-mail: zhevakt@rambler.ru

В статье представлены результаты собственных клинико-лабораторных исследований динамики изменения иммунофенотипа В-лимфоцитов на различных стадиях развития В-клеточного варианта хронического лимфолейкоза. У 60 больных с В-клеточным хроническим лимфолейкозом, находящихся на обследовании и стационарном лечении в клинике профпатологии и гематологии (г. Саратов) в период с 2007 по 2013 год и рандомизированных в 4 группы наблюдения (0-I, II, III, IV стадии) в соответствии с классификацией K.R. Rai et al. (1975), проведено определение содержания в крови CD-маркерных молекул. Исследование характера экспрессии маркерных молекул (CD19, CD5, CD20, CD23, CD38) на В-лимфоцитах периферической крови проводилось на проточном цитометре Facs-Calibur (BD, США, 2006) с использованием стандартной панели моноклональных антител для типирования ХЛЛ. Обследование больных с указанной формой патологии позволило выявить определенные закономерности изменений иммунофенотипа В-лимфоцитов, обнаруживающие параллелизм со стадией заболевания. Уже на ранних стадиях патологии было отмечено появление атипизма В-лимфоцитов, характеризующегося усилением коэкспрессии CD19 и CD5, выраженной активацией В-клеток в виде повышения экспрессии CD23 и CD38.

Ключевые слова: В-клеточный вариант хронического лимфолейкоза, маркерные CD-молекулы (CD19, CD5, CD20, CD23, CD38).

## DYNAMIC CHANGES OF IMMUNE PHENOTYPE OF B-LYMPHOCYTES IN DIFFERENT STAGES OF CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA

<sup>1</sup>Zhevak T.N., <sup>1</sup>Chesnokova N.P., <sup>1</sup>Shelekhova T.V., <sup>1</sup>Bizenkova M.N., <sup>1</sup>Tsareva O.E.

<sup>1</sup>Saratov State Medical University n.a. V.I. Razumovsky, Saratov, Russia (410012, Saratov, street B.Kazachya, 112), e-mail: zhevakt@rambler.ru

The research work presents results of clinical laboratory investigations of dynamic changes of immune phenotype of B-lymphocytes in different stages of B-cell mode of chronic lymphocytic leukemia. The detection of the content of CD-marker molecules in 60 patients with different stages of B-cell mode of chronic lymphocytic leukemia (0-I, II, III, IV according K.R. Rai et al. classification, 1975) was conducted. Investigation of the character of expression of marker molecules (CD19, CD5, CD20, CD23, CD38) on B-lymphocytes of peripheral blood with using of standard panel of monoclonal antibodies for flow cytometry «Facs-Calibur» (BD, USA, 2006) was carried out. The examination of patients with this pathology reveals some regularities of changes of immune phenotype of B-lymphocytes which were parallel with stages of the disease. The appearance of atypia of B-lymphocytes characterized by co-expression of CD19 and CD5 as well as significant activation of B-cells characterized by expression of CD23 and CD38 were observed.

Keywords: B-cell mode of chronic lymphocytic leukemia, marker CD-molecules (CD19, CD5, CD20, CD23, CD38).

Самым частым видом лейкозов среди взрослого населения является В-клеточный хронический лимфолейкоз (В-ХЛЛ). В настоящее время в России насчитывается около 14 000 больных этим заболеванием, а ежегодная заболеваемость ХЛЛ превышает 3000 россиян [3].

Усилиями отечественных и зарубежных авторов достигнуты большие успехи в изучении онкогенетики В-ХЛЛ, согласно которым характер клинического течения заболевания, эффективность использования методов комплексной полихимиотерапии и

прогнозирования патологии определяется, в частности, особенностями мутаций, затрагивающими те или иные структурные компоненты генома малигнизированных клеток [1; 4; 7; 8]. Несмотря на вышеуказанное, принципы генетической детерминации В-ХЛЛ в динамике развития патологии до сих пор остаются в значительной мере невыясненными, что затрудняет использование показателей экспрессии CD-маркерных молекул в качестве диагностических и прогностических критериев заболевания.

**Целью** настоящего исследования явился мониторинг экспрессии маркерных молекул на лимфоцитах крови при В-ХЛЛ и установление их взаимосвязи с динамикой сдвигов клеточного состава периферической крови. Систематизация существующих представлений в комплексе с полученными нами результатами исследований характера экспрессии маркерных молекул на клетках лимфоидной ткани позволит расширить традиционные принципы и методы классификации стадийности указанной патологии, а также оценки эффективности комплексной терапии заболевания и прогнозирования его течения.

#### **Материал и методы исследования**

Для решения поставленной задачи проведено комплексное клиничко-лабораторное обследование 60 больных с В-ХЛЛ на различных стадиях развития патологии, находящихся на обследовании и стационарном лечении в клинике профпатологии и гематологии г. Саратова в период с 2007 по 2015 год. Больные рандомизированы в 4 группы наблюдения в соответствии со стадией заболевания по классификации Rai K.R., 1975 [1; 4; 7].

Верификация диагноза осуществлялась с использованием традиционных методов диагностики: изучения анамнестических данных, мониторинга показателей периферической крови (с помощью гематологического автоматического анализатора Micros-60 (ABX, Франция)), компьютерной томографии, рентгенологического и ультразвукового исследования, изучения миелограммы. Исследование характера экспрессии маркерных молекул (CD19, CD5, CD20, CD23, CD38) на лимфоцитах периферической крови проводилось на проточном цитометре Facs-Calibur (BD, США, 2006) с использованием стандартной панели моноклональных антител для типирования ХЛЛ.

Математическая обработка данных выполнена с применением современных статистических прикладных программ Microsoft Office: пакеты Excel и Microsoft Graf, Statistica 6.0 (Stat Soft Inc.). Данные в тексте представлены в виде медиан с указанием интерквартильного диапазона (25–75-й процентиля). Для межгруппового сравнения использовали непараметрический U-критерий Манна-Уитни, точный Z-критерий Фишера и показатель достоверности  $p$ ; оценка различий проводилась по общепринятому порогу значимости ( $p \leq 0,05$ ).

#### **Результаты и их обсуждение**

При изучении картины периферической крови больных с 0-I стадиями В-ХЛЛ выявлены следующие изменения: развитие умеренного лейкоцитоза и абсолютного лимфоцитоза, относительное снижение содержания гранулоцитов и моноцитов в периферической крови, что соответствовало данным литературы [1; 4; 6; 7].

Однако целью настоящего исследования явилось установление закономерностей динамических изменений экспрессии маркерных молекул на В-лимфоцитах у пациентов 4-х групп наблюдения. Для этого на скатерограммах, полученных при иммунофенотипировании лимфоцитов периферической крови сначала выделялся лимфоцитарный гейт по наличию на поверхности клеток антигенов CD45 и CD19. CD45-молекула, являющаяся панлейкоцитарным маркером, позволяет идентифицировать весь пул лейкоцитов. В-линейная принадлежность лимфоцитов может быть подтверждена наличием на их поверхности антигена CD19 [6].

Касаясь характеристики и биологической значимости основных антигенов, экспрессированных на мембранах В-лимфоцитов, следует отметить, что антиген CD19 является гликопротеином 95К, который присутствует в норме на всех периферических В-клетках, а также предшественниках В-клеток в костном мозге. Антиген CD19 – один из самых ранних маркеров, позволяющих отнести лимфоцит к В-клеточному ряду, появляется на клетке раньше молекул CD10 (маркера пре-В-лимфоцитов) и до обнаружения в цитоплазме В-клеток Ig M [2; 5].

Результаты проведенных исследований позволили обнаружить преобладание лимфоцитов В-линейной дифференцировки у пациентов I-й группы наблюдения, содержание которых было около 80% (табл. 1). Как известно, в соответствии с общепринятыми данными литературы уровень лимфоцитов крови у взрослого человека колеблется в диапазоне от 20 до 40% от общего содержания лейкоцитов крови, содержание В-лимфоцитов составляет лишь около 20-30% среди популяции всех лимфоцитов крови, уровень Т-лимфоцитов – около 50-65% и около 10% приходится на лимфоциты, не имеющие рецепторов, свойственных Т- или В-клеткам [6; 7].

Таблица 1

Динамика экспрессии дифференцировочных антигенов  
на различных стадиях В-ХЛЛ

Показатель	Группы наблюдения			
	I (0-I стадия)	II (II стадия)	III (III стадия)	IV (IV стадия)
CD45, %	96,85 (95,29;	97,89 (96,67;	98,25 (95,83;	99,30 (97,91;

	98,80)	98,345) p=0,533830	99,22) 0,767344 p=0,442877; p <sub>1</sub> =0,361497	99,78) p=0,064926; p <sub>1</sub> =0,008972; p <sub>2</sub> =0,164677
CD19, %	79,98 (78,77; 84,00)	82,08 (78,50; 85,57) p=0,395159	90,48 (87,86; 91,40) p=0,006592; p <sub>1</sub> =0,000622	86,46 (84,65; 93,00) p=0,044254; p <sub>1</sub> =0,059127; p <sub>2</sub> =0,290197

*Примечание:* p – по сравнению с показателями I группы наблюдения;

p<sub>1</sub> – по сравнению с показателями II группы наблюдения;

p<sub>2</sub> – по сравнению с показателями III группы наблюдения.

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о резком усилении пролиферативной активности В-системы лимфоцитов.

Следующим этапом обследования пациентов с 0-I стадиями развития патологии было установление и определение массы неопластического клона В-лимфоцитов. Для решения этой задачи проведено определение специфической для В-ХЛЛ коэкспрессии молекул CD5 и CD19. Результаты проведенных исследований позволили выявить высокую степень сочетанной экспрессии указанных молекул, что является одним из признаков развития морфологического и функционального атипизма клеток уже на ранней стадии заболевания (табл. 2). Касаясь биологической значимости выявленного нами факта высокой степени сочетанной экспрессии маркерных молекул, следует отметить, что антиген CD5 представляет собой гликопротеин 65К, который в норме выявляется на всех зрелых Т-лимфоцитах, а также указанный маркер экспрессируется на ранних стадиях онтогенеза В-клеток и определяется на 90% В-лимфоцитов плода и новорожденных. У взрослых этот антиген в норме находится на поверхности только 5-15% В-лимфоцитов, а по некоторым данным, даже менее чем на 3% [2; 5]. Однако результаты наших исследований свидетельствуют о выраженной экспрессии этого антигена на поверхности лимфоцитов В-линейной принадлежности и, соответственно, о преобладании клеток неопластического клона в популяции В-лимфоцитов. Таким образом, обнаруженный нами высокий уровень CD5-положительных В-лимфоцитов свидетельствует о формировании атипизма малигнизированных клеток уже на начальной стадии В-ХЛЛ.

Таблица 2

#### Особенности иммунофенотипа В-лимфоцитов при В-ХЛЛ

	Группы наблюдения
--	-------------------

Показатель	I (0-I стадия)	II (II стадия)	III (III стадия)	IV (IV стадия)
CD19/CD5, %	74,86(64,71; 81,00)	80,15 (75,12; 85,30) p=0,064926	79,00(58,28; 90,41) p=0,520283; p <sub>1</sub> =0,442877	87,00(79,15; 93,75) p=0,012093; p <sub>1</sub> =0,064926; p <sub>2</sub> =0,130040
CD20, %	71,08 (67,49; 79,64)	67,47 (54,88; 74,61) p=0,119845	56,62 (41,62; 67,12) p=0,049844; p <sub>1</sub> =0,147553	48,50 (15,30; 59,35) p=0,035323; p <sub>1</sub> =0,047523; p <sub>2</sub> =0,049871
CD19/CD23, %	19,60 (18,84; 22,80)	20,81 (17,17; 27,00) p=0,724416	23,46 (19,56; 26,39) p=0,046492; p <sub>1</sub> =0,121103	27,95 (24,89; 53,00) p=0,043288; p <sub>1</sub> =0,049529; p <sub>2</sub> =0,072441
CD38, %	21,08 (19,00; 25,71)	16,84(1,85; 25,16) p=0,158466	69,75(58,07; 80,42) p=0,000724; p <sub>1</sub> =0,000037	64,05(49,71; 86,75) p=0,007466; p <sub>1</sub> =0,000622; p <sub>2</sub> =0,755736

*Примечание:* p – по сравнению с показателями I группы наблюдения;

p<sub>1</sub> – по сравнению с показателями II группы наблюдения;

p<sub>2</sub> – по сравнению с показателями III группы наблюдения.

Далее было проведено определение антигенов CD20 и CD23 на мембранах В-лимфоцитов у пациентов с 0-I стадиями В-ХЛЛ. В норме CD20 присутствует на всех зрелых В-клетках. В онтогенезе В-лимфоцитов антиген CD20 появляется после CD19 и CD10, т.е. характеризует более поздние стадии дифференцировки. В свою очередь антиген CD23 (гликопротеин 45К) является характерным антигеном активированных В-лимфоцитов, а также экспрессируется на различных типах клеток: В-клетках лимфоидных органов и зародышевых центров, моноцитах, макрофагах, дендритных клетках, эозинофилах [2; 5].

Как оказалось, более 50% В-лимфоцитов пациентов I группы наблюдения несли на своей поверхности молекулу CD20 (табл. 2), что свидетельствовало о достаточной степени

дифференцировки у преобладающего количества В-лимфоцитов. В то же время содержание клеток, ко-экспрессирующих CD19 и CD23, составляло более 20% (табл. 2), что указывало, в соответствии с общепринятыми данными, на развитие антигенной стимуляции [2; 5].

Экспрессия антигена CD38 на В-лимфоцитах периферической крови у пациентов на 0-I стадиях В-ХЛЛ наблюдалась на ~ 20% клеток исследуемого пула (табл. 2). Известно, что CD38 экспрессируется на общем лимфоидном предшественнике, то есть до их дифференцировки в В-клетки. В то же время экспрессия CD38 отмечается на потомках В-клеток, образующихся при антигензависимом этапе созревания В-лимфоцитов – плазматических клетках [2]. Таким образом, обнаруженный нами факт экспрессии CD38 свидетельствует об изменении иммунофенотипа В-лимфоцитов, связанном с антигенной стимуляцией.

Обследование второй группы наблюдения (пациенты со II стадией ХЛЛ по К. Rai, 1975) позволило обнаружить прогрессирующее нарастание лейкоцитоза и лимфоцитоза, относительное снижение содержания гранулоцитов и моноцитов в периферической крови.

Относительное количество лимфоцитов, позитивных по антигену CD19, у пациентов II группы наблюдения не отличалось от такового показателя пациентов I группы наблюдения (табл. 1). В то же время большинство CD19-положительных клеток ко-экспрессировали CD5 молекулы так же, как и на 0-I стадиях патологии (табл. 2). Таким образом, неопластический клон В-лимфоцитов был преобладающей популяцией клеток и у пациентов этой группы наблюдения.

Показатели экспрессии молекул CD20, CD23 и CD38 не отличались от аналогичных показателей 0-I стадий (табл. 2).

Гематологическая картина пациентов III группы наблюдения характеризовалась развитием анемии, лейкоцитоза и абсолютного лимфоцитоза, связанного с резким преобладанием в лейкоцитарной формуле В-лимфоцитов, как и на предыдущих стадиях развития патологии (табл. 1). Интенсивность ко-экспрессии на В-лимфоцитах CD19 и CD5-антигенов оставалась стабильно высокой (табл. 1). Показатель экспрессии антигена CD20 снижался по сравнению с аналогичным показателем I группы наблюдения, не отличаясь от значения такового показателя пациентов II группы наблюдения (табл. 2). В то же время нарастала выраженность экспрессии CD23 по отношению к соответствующему показателю пациентов I группы наблюдения при отсутствии достоверных различий со II стадией заболевания (табл. 2). Отличительной особенностью экспрессии маркера CD38 на мембранах В-лимфоцитов на указанной стадии заболевания явилось резкое возрастание содержания клеток, позитивных по указанному антигену (табл. 2). Известно, что молекула CD38, являясь маркером активации, обеспечивает и адгезию лимфоцитов к эндотелию сосудов [1].

У пациентов с IV стадией В-ХЛЛ в периферической крови отмечался лейкоцитоз, абсолютный лимфоцитоз, у большинства пациентов наблюдалась анемия и фиксировалась тромбоцитопения.

Как и на всех предыдущих стадиях развития В-ХЛЛ, на IV стадии абсолютный лимфоцитоз характеризовался преобладающим содержанием В-лимфоцитов, позитивных по CD19 (табл. 1), которые в свою очередь были преимущественно представлены клетками опухолевого клона, характеризующимися сочетанной экспрессией CD19 и CD5-маркеров (табл. 2). Для иммунофенотипа неопластических В-лимфоцитов пациентов указанной группы было характерно снижение экспрессии CD20 по сравнению со всеми предыдущими стадиями (табл. 2). Одновременно наблюдалось увеличение относительного содержания В-лимфоцитов, позитивных по антигену CD23, по отношению к таковому показателю пациентов с 0-I и II стадиями патологии (табл. 2). У пациентов с IV стадией заболевания сохранялась также резко выраженная экспрессия CD38, как и на III стадии патологии, достоверно отличаясь от такового показателя пациентов с 0-I и II стадиями В-ХЛЛ (табл. 2).

Таким образом, на фоне прогрессирующего лейкоцитоза и лимфоцитоза у пациентов с В-ХЛЛ были выявлены определенные закономерности изменения иммунофенотипа, свойственные различным стадиям заболевания. Так, уже на 0-I стадиях патологии возникало усиление ко-экспрессии CD19 и CD5, наблюдалась активация В-клеток, сопровождающаяся экспрессией CD23 и CD38. Характерными признаками прогрессирующего течения заболевания являлось резкое возрастание ко-экспрессии CD19 и CD5 на IV стадии заболевания. Позитивность В-лимфоцитов по маркеру активации (молекула CD23) у пациентов III и IV групп несколько увеличивалась на фоне одновременного снижения уровня позитивности В-клеток по антигену CD20. В то же время обнаружено резкое возрастание экспрессии на В-лимфоцитах антигена CD38 на III и IV стадиях патологии. Прогрессирующее в динамике заболевания усиление экспрессии CD38 играет исключительно важную роль в патогенезе метастатических стадий заболевания, развития лейкозной инфильтрации внутренних органов и тканей, поскольку обеспечивает адгезию атипичных В-лимфоцитов рецепторами эндотелия сосудов. Прогрессирующее в динамике заболевания усиление экспрессии CD38 свидетельствовало об усилении адгезивно-агрегационных свойств атипичных лимфоцитов и их способности к метастазированию и формированию инфильтратов.

Результаты проведенных нами исследований позволили сделать следующие выводы.

### **Выводы**

1. В целях оптимизации диагностики прогрессирующего течения В-ХЛЛ целесообразен мониторинг показателей ко-экспрессии молекул: CD19 и CD5, и экспрессии CD20, CD23 и

CD38, позволяющий объективно оценивать эффективность комплексной терапии заболевания.

2. Одним из дополнительных диагностических критериев развития начальных стадий В-ХЛЛ является резкое усиление ко-экспрессии CD19 и CD5 и наличие не резко выраженной позитивности по антигенам CD23 и CD38.

3. Прогрессирующие по мере развития патологии экспрессия антигенов CD38 и CD23, а также ко-экспрессия молекул CD19 и CD5 являются дифференциально-диагностическими критериями развития терминальных стадий патологии.

4. Выраженная экспрессия CD38, характерная для III и IV стадий патологии, обеспечивает адгезию атипичных В-лимфоцитов рецепторами эндотелия сосудов и играет исключительно важную роль в патогенезе метастатических стадий заболевания, развития лейкозной инфильтрации внутренних органов и тканей.

### Список литературы

1. Гематология / Рукавицын О.А., Павлов А.Д., Морщакова Е.Ф. [и др.]; под ред. О.А. Рукавицына. – СПб. : ООО «Д.П.», 2007. – 912 с.
2. Зайчик А.Ш., Чурилов Л.П. Механизмы развития болезней и синдромов. - СПб. : ЭЛБИ-СПб, 2002. – Кн. 1-я. – 507 с.
3. Злокачественные образования в России в 2012 году (заболеваемость и смертность) / под ред. Каприна А.Д., Старинского В.В., Петровой Г.В. – М. : ФГУ «МНИСИ им. П.А. Герцена Росмедтехнологий», 2014. – 250 с.
4. Клиническая онкогематология : руководство для врачей / под ред. М.А. Волковой. - 2-е изд. – М. : Медицина, 2007. – 1120 с.
5. Ледванов М.Ю., Киричук В.Ф. Введение в клиническую иммунологию (лекции). – М., 1996.
6. Луговская С.А., Почтарь М.Е. Гематологический атлас. - 3-е изд. – Москва – Тверь : Триада, 2011. – 368 с.
7. Руководство по гематологии / под ред. А.И. Воробьева. - 4-е изд. – М. : Ньюдиамед, 2007. – Т. 3. - 1275 с.
8. Robbins and Cotran pathologic basis of disease. – 7th ed. / ed. by V. Kumar, A.K. Abbas, N. Fausto. – Philadelphia, Pennsylvania : Elsevier, 2005.

**Рецензенты:**

Понукалина Е.В., д.м.н., профессор, профессор кафедры нормальной физиологии им. И.А. Чуевского ГБОУ ВПО «Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского» Минздрава России, г. Саратов;

Моррисон В.В., д.м.н., профессор, профессор кафедры патологической физиологии им. акад. А.А. Богомольца ГБОУ ВПО «Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского» Минздрава России, г. Саратов.