

Л.М. Склярєнко¹А.С. Поліщук¹Т.С. Іванівська¹В.Н. Зінченко²О.О. Підгорна²Д.Ф. Глузман¹

¹Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України

²Київська міська клінічна лікарня № 9, Київ, Україна

Ключові слова: лімфома з клітин мантиї, бластоїдний варіант, фаза лейкоїзації, цитохімія, імунофенотип, проточна цитометрія.

ІМУНОФЕНОТИПОВА ХАРАКТЕРИСТИКА БЛАСТОЇДНОГО ВАРІАНТА ЛІМФОМИ З КЛІТИН МАНТІЇ

Бластоїдний варіант (БВ) становить до 30% загальної кількості всіх гістопатологічних типів лімфоми з клітин мантиї (ЛКМ). Діагностика БВ ЛКМ з урахуванням лише цитоморфологічних ознак вкрай ускладнена. БВ ЛКМ в фазі лейкоїзації може нагадувати лімфобластну лімфому, центробластний варіант великоклітинної лімфоми, гострий лімфобластний лейкоз та деякі підтипи гострих мієлоїдних лейкозів. **Мета:** встановлення цитоморфологічних та імунофенотипових критеріїв діагностики БВ ЛКМ за умови появи патологічних клітин в периферичній крові і розвитку осередків інфільтрації в кістковому мозку. **Об'єкт і методи:** за допомогою цитохімічних методів, проточної цитометрії та панелі МкАТ проведено вивчення неопластичних клітин крові та кісткового мозку у 55 хворих з класичною ЛКМ і у 9 пацієнтів з БВ ЛКМ у фазі лейкоїзації. **Результати:** у більшості пацієнтів у периферичній крові спостерігався виражений лейкоцитоз ($60\text{--}130 \cdot 10^9/\text{л}$), а в мазках крові — від 50 до 90% аномальних бластних чи бластоподібних клітин. Високий вміст подібних клітин був виявлений і в стерильному пункті кісткового мозку. Аномальні клітини крові та кісткового мозку у чотирьох випадках мали стандартний фенотип: $CD19^+ CD20^+ CD5^+ CD10^- CD23^- Cyclin D1^+$. У н'яти пацієнтів виявлено аберантний фенотип субстратних клітин, який стосується експресії антигенів $CD5$, $CD10$, $CD19$. Експресія $Cyclin D1$, яку відмічено у всіх пацієнтів, може бути використана для верифікації діагнозу БВ ЛКМ. **Висновки:** результати цитоморфологічних, ензімоцитохімічних досліджень та імунофенотипування за допомогою панелі спеціально підібраних МкАТ дозволяють ідентифікувати субстратні клітини крові та кісткового мозку при БВ ЛКМ в стадії лейкоїзації і проводити диференційну діагностику з іншими формами неходжкінських лімфом та гострими лейкоїдами лімфоїдного та мієлоїдного походження.

У класифікації пухлин лімфоїдної тканини 70-х років ХХ століття лімфома з клітин мантиї (ЛКМ) визначалася як «центроцитарна лімфома» або «лімфоцитарна лімфома з проміжним рівнем диференціювання» [1, 2]. Далі, у 80-х роках, для визначення новоутворень, які характеризуються проліферацією атипичних малого і середнього розміру лімфоїдних клітин навколо незмінених зародкових центрів, був введений термін «лімфома мантийної зони» [3, 4]. У четверте видання класифікації ВОЗ (2008) ЛКМ була включена в якості окремої нозологічної форми зі зрілих (периферичних) В-лімфоцитів. У новій переглянутій класифікації ВОЗ (2017) на рівні з класичним морфологічним варіантом передбачене введення окремого бластоїдного варіанта (БВ) ЛКМ [5].

ЛКМ становить 5–10% всіх В-клітинних неходжкінських лімфом, виникає з так званих наївних (naive) В-клітин мантийної зони. БВ становить до 30% всіх випадків ЛКМ. Як правило, виникає *de novo*, але може розвиватися внаслідок трансформації класичної ЛКМ. Це захворювання ха-

рактеризується наявністю неопластичних клітин, які за цитоморфологічними ознаками нагадують лімфобласти, асоціюється з агресивним перебігом та несприятливим прогнозом [6–9].

БВ ЛКМ виявляють частіше у чоловіків віком 50–60 років, але можна діагностувати і у молодших пацієнтів [10]. При цій формі лімфом, яка розпізнається, як правило, в III/IV стадії патологічного процесу (85%), у хворих визначаються різноманітні ураження лімфатичних вузлів, селезінки та кісткового мозку. Часто (40–60%) виявляють осередки екстранодального ураження, нерідко із залученням центральної нервової системи [6]. У частини хворих визначається виражений лейкоцитоз ($\geq 100 \cdot 10^9/\text{л}$) і наявність у периферичній крові циркулюючих патологічних клітин, що нагадує картину гострого лейкозу.

При гістологічному вивченні біоптатів лімфатичних вузлів або екстранодальних осередків уражень виявляють нодулярні інфільтрати, які складаються з лімфоїдних клітин невеликого та середнього розміру з вузьким обідком цитоплазми і помірно або

виражено неправильними контурами ядер із ніжною структурою хроматину [6]. Нерідко картина нагадує зміни, що відбуваються при лімфобластній лімфомі [10]. Циркуючі в крові клітини при БВ ЛКМ є лімфобластоподібними клітинами невеликого та середнього розміру з ядрами та дрібногранулярною структурою хроматину, в яких можуть візуалізуватися невеликого розміру ядерця [11].

У межах БВ ЛКМ можуть бути виокремлені два цитологічних підтипи: лімфобластний і центробластний. У гістологічних препаратах при лімфобластному підтипі визначаються клітини середнього розміру з вузьким обідком цитоплазми, з ядрами з слабкодиспергованим хроматином та непомітними ядерцями. Центробластний підтип представлений великими клітинами, які характеризуються помірними розмірами базофільної цитоплазми, округлими ядрами з дрібнозернистою структурою хроматину та чітко окресленими ядерцями [12].

У трепанобіоптатах кісткового мозку визначаються осередки інтерстиціальної або дифузної інфільтрації клітинами лімфоми. У стернальних пунктатах клітини лімфоми, що інфільтрують кістковий мозок, розташовуються серед нормальних клітин різних ліній гемопоєзу [13]. Проліферативна активність клітин при БВ ЛКМ значно вища, ніж при ЛКМ класичного типу [6].

Диференційна діагностика БВ ЛКМ, дифузних великоклітинних лімфом, лімфобластної лімфоми та гострих лейкозів має проводитися на основі гістологічного і цитологічного вивчення біоптатів пухлин, цитоморфологічного дослідження крові та пунктатів кісткового мозку із залученням сучасних методів імуноцитохімічного та молекулярно-генетичного аналізу.

Метою даного дослідження було встановлення цитоморфологічних та імунофенотипових критеріїв діагностики БВ ЛКМ за умови появи патологічних клітин у периферичній крові та розвитку осередків інфільтрації в кістковому мозку.

ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

У період з 1 вересня 2016 р. по 1 березня 2019 р. проведено дослідження клітин крові та кісткового мозку 64 пацієнтів (37 чоловіків і 27 жінок) із ЛКМ у віковому діапазоні 45–88 років. Серед них — 9 пацієнтів (7 чоловіків, 2 жінки) віком 45–77 років з БВ ЛКМ. Усі пацієнти дали інформовану згоду на використання їх біологічних матеріалів у дослідженні. Вивчали цитологічний склад периферичної крові та кісткового мозку в мазках, пофарбованих за Паппенгеймом. У субстратних клітинах (у мазках, фіксованих 3 хв у парах 10% нейтрального формаліну) за допомогою цитохімічних реакцій визначали активність мієлопероксидази (МПО), кислоти фосфатази (КФ), кислоти неспецифічної естерази (КНЕ) [14]. Імунофенотипування клітин крові та кісткового мозку проводили на проточному цитометрі Beckman Coulter EPICS XL (США) за допомогою мічених

флюорохромами моноклональних антитіл (МкАТ) (Beckman Coulter, Франція).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Дані загального аналізу крові хворих характеризувалися наявністю помірного лейкоцитозу, анемії, тромбоцитопенії, збільшенням кількості лімфоцитів. У всіх пацієнтів при дослідженні периферичної крові лейкоцитоз коливався від $60 \cdot 10^9/\text{л}$ до $100\text{--}130 \cdot 10^9/\text{л}$. У мазках крові та кісткового мозку виявлено клітинні елементи з ознаками бластних клітин (від 50 до 90%). За цитоморфологічними ознаками в окремих хворих вони нагадували лімфобласти, в інших випадках — бласти мієлоїдного походження.

При цитохімічному дослідженні в субстратних клітинах, середнього чи дещо більшого розміру, спостерігали негативну реакцію на МПО, негативну або слабку дифузну реакцію при визначенні активності КФ, переважно слабку дифузну-гранулярну реакцію на КНЕ.

Слід зазначити, що при БВ ЛКМ субстратні клітини не належать до кровотворних клітин-попередників, незважаючи на те, що за цитоморфологічними ознаками нагадують бласти, а є зрілими лімфоїдними клітинами, на поверхневих мембранах яких виявлені важкі та легкі ланцюги імуноглобулінів. При імунофенотипуванні клітин крові та кісткового мозку хворих у зв'язку з необхідністю економії високоартісних реагентів ми використовували МкАТ до лінійноспецифічних та диференційних антигенів різних типів лімфоїдних клітин та кровотворних клітин мієлоїдного походження, умовно поділені на маркери трьох ліній.

У 4 із 9 пацієнтів із БВ ЛКМ фенотип субстратних клітин був звичайний для ЛКМ: $\text{CD19}^+\text{CD20}^+\text{CD5}^+\text{CD10}^-\text{CD23}^-\text{Cyclin D1}^+$. У 2 хворих фенотип бластоподібних клітин дещо відрізнявся від класичного: $\text{CD19}^+\text{CD20}^+\text{CD5}^-\text{CD10}^+\text{CD23}^-\text{Cyclin D1}^+$ та $\text{CD19}^+\text{CD20}^+\text{CD5}^-\text{CD10}^+\text{CD23}^-\text{Cyclin D1}^+$.

У 3 пацієнтів фенотип субстратних клітин периферичної крові та кісткового мозку був іншим. Наводимо приклади результатів цитохімічних та імунофенотипових досліджень крові та кісткового мозку цих хворих з метою диференційної діагностики БВ ЛКМ та деяких інших форм гемобластозів при неможливості виконання ексцизійної біопсії безпосереднього вогнища ураження.

Приклад 1. *Хворий Г.*, 60 років. Попередній діагноз — гостра лейкемія. Кількість лейкоцитів у периферичній крові становила $80 \cdot 10^9/\text{л}$, у лейкограмі було виявлено 85% бластів середнього та більшого розміру. У кістковому мозку кількість бластних клітин сягала 75%. Активність КФ була негативна, КНЕ — слабка дрібногранулярна.

Перша лінія діагностичних МкАТ не дала змоги виявити природу бластів: MPO^- , CD19^- , CD13^- , CD33^- , CD34^- , CD117^- , CD10^- , CD7^- . Негативна

реакція на CD7 та КФ свідчила проти Т-клітинної гострої лейкемії. Негативна реакція на МПО, CD13, CD33, CD117 — проти гострої лейкемії мієлоїдної природи, незважаючи на те, що негативну реакцію на МПО можна спостерігати при цитохімічних варіантах M0 та M5 гострих мієлоїдних лейкемій.

Друга лінія діагностичних МкАТ: суCD3, суCD79а, CD61, CD41, CD36, GLA. Ця панель дозволяє виявити Т- або В-клітинну природу бластів, а також їх еритроїдне або мегакаріобластне походження. У цьому випадку був виявлений антиген суCD79а, тобто бласти мали лімфоїдну природу.

Виявити ступінь зрілості клітин та встановити діагноз дозволяє третя лінія діагностичних МкАТ до легких ланцюгів імуноглобулінів: сум, s μ , s λ , s κ , антигенів CD20, CD5 та Cyclin D1. У зазначеного хворого на субстратних клітинах виявили експресію наступних маркерів — сум⁺, s μ ⁺, CD20⁺, CD5⁺, s λ ⁺, Cyclin D1⁺. Отже, у хворого був встановлений діагноз БВ ЛКМ, а не гострої лімфобластної лейкемії. Особливістю цього випадку, як і наведених далі, була відсутність або наявність невеликої кількості (10–15%) клітин з експресією антигену CD19. Кодекспресія антигену CD19, як відомо, може виявлятися на невеликій кількості бластних клітин при гострих лейкозах мієлоїдної природи.

Приклад 2. *Хворий А.*, 55 років. Попередній діагноз — гострий лейкоз. Кількість лейкоцитів у периферичній крові — $100 \cdot 10^9/\text{л}$. У препаратах крові та кісткового мозку дифузна інфільтрація бластами великого розміру. Активність МПО, КФ, КНЕ — негативна. Результати дослідження імунофенотипу при застосуванні першої лінії МкАТ також були негативними. При використанні МкАТ другої лінії спостерігали експресію суCD79а. Дослідження імунофенотипу за допомогою МкАТ третьої лінії виявило експресію таких маркерів: сум⁺, s μ ⁺, CD20⁺, CD5⁺, s λ ⁺, Cyclin D1⁺. Отже, у *пацієнта А.* встановлено діагноз БВ ЛКМ (CD5⁺).

Приклад 3. *Хворий П.*, 69 років. Попередній діагноз — гострий монобластний лейкоз. Кількість лейкоцитів у периферичній крові — $130 \cdot 10^9/\text{л}$. У препаратах крові та кісткового мозку визначається 80–90% бластів великого розміру. Цитохімічні реакції наступні: на КФ — слабка дрібногранулярна, на КНЕ — помірна дрібногранулярна в частині бластів. Виконано імунофенотипування субстратних клітин із застосуванням трьох етапів досліджень, ідентичне вищезгаданним. Вдалося визначити лінійну приналежність клітин, ступінь їх зрілості та встановити діагноз. Ідентифіковані клітини БВ ЛКМ в стадії лейкоїзації — суCD79а⁺, CD20⁺, сум⁺, s μ ⁺, s λ ⁺, CD5⁺, CD10⁺, Cyclin D1⁺.

Запропонована нами технологія дає можливість ідентифікації лімфоїдних клітин у пунктатах кісткового мозку або периферичній крові і дозволяє провести диференційну діагностику між БВ ЛКМ в стадії лейкоїзації, гострою лімфобластною лейкемією і гострою мієлоїдною лейкемією

при відсутності ознак вираженої гіперплазії лімфатичних вузлів.

Отримані нами результати узгоджуються з даними доступної літератури про імунофенотипові ознаки БВ ЛКМ. Відповідно до них на поверхневих мембранах клітин при цій рідкісній формі неходжкінських лімфом визначається експресія важких ланцюгів IgM/IgD і зазвичай λ -легких ланцюгів імуноглобулінів. Відмічається позитивна реакція при дослідженні експресії CD5, CD43 та негативна реакція з МкАТ до антигенів CD10, CD23, BCL6. Можливий також аберантний фенотип з відсутністю CD5 та експресією BCL6 та CD10. Реакція при визначенні BCL2, як і Cyclin D1, є позитивною в усіх випадках. Останній виявляється навіть при відсутності експресії антигену CD5 [15–18]. Наявність обох маркерів на рівні з виявленням при цитогенетичному дослідженні транслокації t(11;14) є вкрай важливою при підтвердженні діагнозу БВ ЛКМ.

ВИСНОВКИ

Результати цитоморфологічних, ензимоцитохімічних досліджень та імунофенотипування за допомогою панелі спеціально підібраних МкАТ дозволяють ідентифікувати субстратні клітини крові та кісткового мозку при БВ ЛКМ в стадії лейкоїзації і проводити диференційну діагностику з іншими формами неходжкінських лімфом та гострими лейкеміями лімфоїдного та мієлоїдного походження.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

- Gerard-Marchant R, Hamlin I, Lennert K, *et al.* Classification of non-Hodgkin's lymphomas. *Lancet* 1974; 2: 405–8.
- Berard CW, Dorfman RF. Histopathology of malignant lymphomas. *Clin Haematol* 1974; 3: 39–45.
- Weisenburger DD, Kim H, Rappaport H. Mantle-zone lymphoma: a follicular variant of intermediate lymphocytic lymphoma. *Cancer* 1982; 49 (7): 1429–38.
- Harris N, Jaffe E, Stein H, *et al.* A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood* 1994; 84: 1361–92.
- Gluzman DF, Sklyarenko LM, Koval SV, *et al.* Diagnosis of hematopoietic and lymphoid tissue tumors (based on WHO 2016 classification materials). In: *Seminars on Hematology*, Vol. 27. Kiev: DIA 2017. 64 p. (in Russian).
- Shrestha R, Bhatt VR, Murthy GS, Armitage JO. Clinicopathological features and management of blastoid variant of mantle cell lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2015; 56 (10): 2759–65.
- Fisher RI. Mantle-cell lymphoma: classification and therapeutic implications. *Ann Oncol* 1996; Suppl 6: S35–9.
- Bhatt VR, Loberiza FR Jr, Smith LM, *et al.* Clinicopathological features, management and outcomes of blastoid variant (BV) of mantle cell lymphoma (MCL): a Nebraska Lymphoma Study Group (NLSG) experience. *Leuk Lymphoma* 2016; 57 (6): 1327–34.
- Pott C, Schrader C, Bruggemann M, *et al.* Blastoid variant of mantle cell lymphoma: late progression from classical mantle cell lymphoma and quantitation of minimal residual disease. *Eur J Haematol* 2005; 74 (4): 353–8.
- McKay P, Leach M, Jackson R, *et al.* British Committee for Standards in Haematology. Guidelines for the investigation

and management of mantle cell lymphoma. *Br J Haematol* 2012; **159** (4): 405–26.

11. Viswanatha DS, Foucar K, Berry BR, *et al.* Blastic mantle cell leukemia: an unusual presentation of blastic mantle cell lymphoma. *Mod Pathol* 2000; **13**: 825–33.

12. Bernard M, Gressin R, Lefrere F, *et al.* Blastic variant of mantle cell lymphoma: a rare but highly aggressive subtype. *Leukemia* 2001; **15** (11): 1785–91.

13. Lee MJ, Kee KH, Leon HJ. Mantle cell lymphoma, blastoid variant, diagnosed on the basis of cytomorphology and flow cytometric immunophenotyping of the lymph node aspirate and peripheral blood. *J Korean Med Sci* 2002; **17** (2): 173–8.

14. Gluzman DF, Sklyarenko LM, Nadgorny VA. Diagnostic oncohematology. Kiev: DIA 2011. 253 p. (in Russian).

15. Morice WG, Hodnefield JM, Kurtin PJ, *et al.* An unusual case of leukemic mantle cell lymphoma with blastoid component showing loss of CD5 and aberrant expression of CD10. *Am J Clin Pathol* 2004; **122** (1): 22–7.

16. Khanna R, Belurkar S, Lavanva P, *et al.* Blastoid variant of mantle cell lymphoma with leukemic presentation. A rare case report. *J Clin Diagn Res* 2017; **11** (4): 16–8.

17. Nakatsuka SI, Nagatomo J, Nagano T, *et al.* Classical type and blastoid variant mantle cell lymphoma in some lymph node: histology and cytological findings from touch imprint specimen. *Diagn Cytopathol* 2017; **45** (4): 364–70.

18. Vose JM. Mantle cell lymphoma: 2017 update on diagnosis risk stratification, and clinic management. *Am J Hematol* 2017; **92** (8): 806–13.

IMMUNOPHENOTYPICAL FEATURES OF BLASTOID VARIANT OF MANTLE CELL LYMPHOMA

*L.M. Sklyarenko¹, A.S. Polishchuk¹, T.S. Ivanivska¹,
V.N. Zinchenko², O.O. Pidgorna², D.F. Gluzman¹*

¹R.E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology,
Oncology and Radiobiology, NAS of Ukraine

²City Clinical Hospital № 9, Kyiv, Ukraine

Summary. *Blastoid variant (BV) constitutes about 30% of all histopathological subtypes of mantle cell lymphoma (MCL). It is very difficult to diagnose blastoid variant of mantle cell lymphoma (MCL-BV) on the basis*

of cytomorphology alone. MCL-BV with leukemic presentation mimics lymphoblastic lymphoma, centroblastic large cell lymphoma, acute lymphoblastic leukemia and some types of acute myeloid leukemia. Objective: to define cytomorphological and immunophenotypical criteria for diagnosing MCL-BV in the setting of the appearance of pathological cells in peripheral blood and the development of the infiltration foci in bone marrow. Object and methods: immunophenotyping and flow cytometry of neoplastic cell in 55 patients with classic mantle cell lymphoma and in 9 cases of MCL-BV with leukemic presentation were studied. Results: peripheral blood smears in most cases leukocytosis ($60-130 \cdot 10^9/l$) along with 50–90% abnormal blast or blast-line cells. On bone marrow examination the high level of cells also were seen. The abnormal blood and bone marrow cells of four patients with MCL-BV were: $CD19^+CD20^+CD5^+CD10^-CD23^-Cyclin D1^+$. Five patients have aberrant phenotype of blast-line cells in the form of anomalous expression $CD5, CD10, CD19$ antigens. $Cyclin D1$ expression confirmed the diagnosis of MCL-BV in all patients. Conclusion: the results of cytomorphological, enzymochemical studies and immunophenotyping using the panel of specially selected MABs allow identification of the blood and bone marrow substrate cells in the MCL-BV in the stage of leukemia, and conduct differential diagnosis with other forms of non-Hodgkin's lymphomas and acute leukemias of lymphoid and myeloid origin.

Key Words: mantle cell lymphoma, blastoid variant, leukemization phase, cytochemistry, immunophenotyping, flow cytometry.

Адреса для листування:

Скляренко Л.М.

03022, Київ, вул. Васильківська, 45

Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України

E-mail: vals@onconet.kiev.ua

Одержано: 17.04.2019