

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

Ключові слова: типовий
хронічний лімфолейкоз,
змішано-клітинний хронічний
лімфолейкоз, імунофенотип,
CD38, CD150, CD180.

ІМУНОФЕНОТИПОВИЙ ПРОФІЛЬ ЗЛОЯКІСНО ТРАНСФОРМОВАНИХ В-ЛІМФОЦИТІВ ХВОРИХ НА ХРОНІЧНИЙ ЛІМФОЛЕЙКОЗ РІЗНИХ МОРФОЛОГІЧНИХ ВАРІАНТІВ

Мета: з'ясувати особливості експресії імунофенотипових маркерів на злоякісно трансформованих В-лімфоцитах при типовому та змішано-клітинному хронічному лімфолейкозі. **Об'єкт і методи:** дослідження проведено на мононуклеарах периферичної крові 32 хворих на хронічний лімфолейкоз (ХЛЛ) (12 жінок та 20 чоловіків, середній вік — $65,4 \pm 1,7$ року), які попередньо не отримували лікування. Профіль експресії поверхневих антигенів В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ досліджували методом проточної цитометрії. **Результати:** встановлено, що для змішано-клітинного морфологічного варіанта ХЛЛ (ЗК-ХЛЛ), який є прогностично більш несприятливим, ніж типовий ХЛЛ (В-ХЛЛ), характерна більша частота CD38-позитивних та CD150- і CD180-негативних випадків. Виявлено відмінності щодо імунофенотипового профілю злоякісно трансформованих лімфоцитів пацієнтів з ХЛЛ: у хворих на ЗК-ХЛЛ середня кількість клітин, позитивних за експресією CD5, CD11c, CD22 є достовірно більшою, а CD23, CD40, CD150 та CD180 — меншою, ніж за типового ХЛЛ. Крім того, для патологічних клітин при ЗК-ХЛЛ характерний більш високий рівень експресії CD5, CD22 та нижчий рівень експресії CD20 і CD23 у порівнянні з В-ХЛЛ ($p < 0,05$). **Висновки:** В-ХЛЛ та ЗК-ХЛЛ відрізняються за профілем експресії деяких імунофенотипових маркерів, визначення яких є доцільним для прогнозування перебігу захворювання та вибору найефективнішої терапії на етапі встановлення діагнозу.

Комплексний аналіз морфологічних та імунофенотипових особливостей злоякісно трансформованих клітин є базовим етапом роботи при диференційній діагностиці гемобластозів та, зокрема, хронічного лімфолейкозу (ХЛЛ). У франко-американсько-британській класифікації, що базується на морфологічній характеристиці лімфоїдних клітин, виділяють 2 варіанти ХЛЛ: типовий (В-ХЛЛ), субстратні клітини якого представлені в основному типовими лімфоцитами, та змішано-клітинний (ЗК-ХЛЛ) — варіант ХЛЛ, пул злоякісно трансформованих клітин якого на 11–54% складають пролімфоцити, а решта клітин — типові лімфоцити та $\leq 10\%$ атипові лімфоцити [1]. Запропоновані в цій класифікації критерії, що характеризують субстратні клітини при ХЛЛ, у подальшому були застосовані Міжнародною робочою групою з ХЛЛ для класифікації ВООЗ [2].

Поряд з морфологічними дослідженнями діагностика ХЛЛ включає визначення імунофенотипу злоякісно трансформованих лімфоцитів. На сьогодні

ні не виявлено патогномонічного маркера для встановлення діагнозу. Уперше для діагностики ХЛЛ було запропоновано бальну шкалу оцінки [3], яка включала наступні імунофенотипові характеристики злоякісно трансформованих клітин: CD5⁺, CD23⁺, FMC7⁻, CD22^{weak}/-, sIgM^{weak}. Згодом цю систему було модифіковано [4] і CD22 було замінено на CD79b (шкала Moreau, CD5⁺, CD23⁺, FMC7⁻, CD79b^{weak}/-, sIgM^{weak}). Згідно з обома системами оцінювання при діагностуванні ХЛЛ сумарна кількість балів становить 4–5, а показник 3 або менше вказує на атиповий імунофенотип (CD5⁻ та/або CD23⁻, та/або FMC7⁺) чи виключає ХЛЛ [5].

За клінічними ознаками ЗК-ХЛЛ асоціюється з більш агресивним перебігом, рефрактерністю до терапії, низькою загальною та безрецидивною виживаністю хворих порівняно з В-ХЛЛ [6–8]. Враховуючи, що значна варіабельність випадків ХЛЛ за клінічними ознаками зумовлена генетичною, епігенетичною, а також фенотиповою гетерогенністю, пошуку нових діагностичних, прогностич-

тичних та предиктивних маркерів серед біологічних показників приділяється багато уваги. Саме тому спектр імунофенотипових маркерів для діагностики ХЛЛ було розширено, і на сьогодні поряд з основною діагностичною панеллю увага зосереджена також на профілі експресії CD11c, CD19, CD20, CD37, CD38, CD40, CD43, CD200, CD150, CD180 та ін. [9–16]. Проте питанню експресії антигенів диференціювання лейкоцитів з урахуванням морфологічних варіантів ХЛЛ належна увага не приділялася. Тому метою роботи було з'ясування особливостей експресії імунофенотипових маркерів на злоякісно трансформованих В-лімфоцитах хворих на В-ХЛЛ та ЗК-ХЛЛ.

ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

У дослідження було включено 32 хворих (12 жінок та 20 чоловіків, середній вік — $65,4 \pm 1,7$ року) на ХЛЛ, які знаходилися на обстеженні в гематологічних відділеннях м. Києва, обласних онкологічних диспансерах і лікарнях України та не отримували лікування з приводу цієї патології. У всіх пацієнтів діагноз ХЛЛ було встановлено вперше, абсолютне число лімфоцитів у периферичній крові знаходилося в межах $18,9\text{--}270,0 \cdot 10^9/\text{л}$. Верифікацію діагнозу проведено за результатами морфологічних, імуноцитохімічних досліджень відповідно до оновленої класифікації ВООЗ 2016 р. у відділі імуноцитохімії та онкогематології Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України. Усі пацієнти були поінформовані та дали згоду на проведення досліджень.

Виділення морфологічних варіантів ХЛЛ відповідно до критеріїв, запропонованих франко-американсько-британською класифікацією, було виконано після мікроскопічного дослідження мазків периферичної крові хворих на ХЛЛ доктором медичних наук Л.М. Скляренко. За цитоморфологічними ознаками ідентифіковано наступні популяції субстратних клітин ХЛЛ: типові лімфоцити, пролімфоцити та атипичні лімфоцити. Залежно від кількості різних типів лімфоцитів у кожному аналізованому випадку нами було виділено наступні морфологічні варіанти ХЛЛ:

- В-ХЛЛ — варіант, субстратні клітини якого склали в основному типові лімфоцити, а кількість пролімфоцитів та атипичних лімфоцитів не перевищувала 10% (19 хворих);
- ЗК-ХЛЛ — варіант ХЛЛ, пул злоякісно трансформованих клітин якого на 11–54% складали пролімфоцити, а решта клітин була представлена типовими лімфоцитами та невеликою популяцією атипичних лімфоцитів (13 хворих).

Імунофенотипування моноклеарів периферичної крові хворих на ХЛЛ, отриманих шляхом центрифугування в градієнті щільності Lymphoprep (Axis-Shield PoC AS, Oslo, Norway), проводили з використанням наступних моноклональних антитіл (МкАт): анти-CD20, анти-CD22, анти-CD37, анти-CD38PE, анти-CD40, анти-CD150FITC (виробни-

цтво Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України), анти-CD23PE, анти-CD11cPE (BC Immunotech, США), анти-CD5, анти-CD180 та анти-MOPC-21 (люб'язно надані професором Е.А. Clark, Університет Вашингтону, Сіетл, США). При застосуванні непрямого варіанта імунофлуоресцентного методу в якості вторинних антитіл було використано козячі антитіла проти F(ab')₂-фрагментів імуноглобулінів миші, кон'юговані з FITC (Sigma-Aldrich, США). Аналіз підготовлених препаратів проводили на проточному цитофлуориметрі Beckman Coulter DxFLEX (Beckman Coulter, США) за допомогою програми CytExpert (DxFLEX Software). Кількість клітин, позитивних або негативних за експресією антигена, вираховували після аналізу 10 тис. подій. Результати аналізу досліджуваного антигена було представлено у формі відсотка позитивних клітин за цим маркером та рівня його експресії на клітинах за показником індекса середньої інтенсивності флуоресценції клітин (iMFI). iMFI відповідав співвідношенню показника MFI клітин після взаємодії з МкАт, направленими до певного кластеру диференціювання лейкоцитів, проти MFI клітин, що реагували з анти-MOPC-21 МкАт. Експресію маркера вважали позитивною за умови виявлення його більше ніж на 5% клітин.

Результати аналізували та обробляли в програмному забезпеченні Prism 4 за допомогою критерію Манна — Уїтні для непараметричних даних. Статистично достовірною різницю між досліджуваними вибірками вважалася за $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Цитофлуориметричне дослідження імунофенотипу лейкоцидних клітин периферичної крові та/або кісткового мозку пацієнтів з лімфопроліферативними захворюваннями першочергово включає ідентифікацію на скатерограмі субстратних клітин за параметрами прямого (forward scatter — FSC) та бокового (side scatter — SSC) світлорозсіювання. Результати наших досліджень свідчать, що на точкових скатерограмах FCS vs SSC лімфоїдна зона субстратних клітин хворих на В-ХЛЛ виглядає більш компактно і розташована дещо лівіше по осі FCS порівняно з такою при ЗК-ХЛЛ ($429\,663 \pm 9996$ та $46\,3391 \pm 18\,175$ у.о. відповідно). Крім того, показники SSC злоякісно трансформованих В-лімфоцитів при В-ХЛЛ також були дещо меншими, ніж при ЗК-ХЛЛ ($178\,132 \pm 6953$ та $198\,183 \pm 6587$ у.о. відповідно) (рис. 1 а, б). Виявлені відмінності у показниках FCS та SSC лейкоцидних клітин хворих на ХЛЛ свідчать про морфологічну однотипність субстратних клітин пацієнтів з В-ХЛЛ та їх поліморфізм при ЗК-ХЛЛ.

У результаті імунофенотипування клітин патологічного клону хворих на В-ХЛЛ та ЗК-ХЛЛ експресію CD20, CD37, CD40 виявлено на В-лімфоцитах усіх досліджених пацієнтів. Експресія CD5 та CD23 була

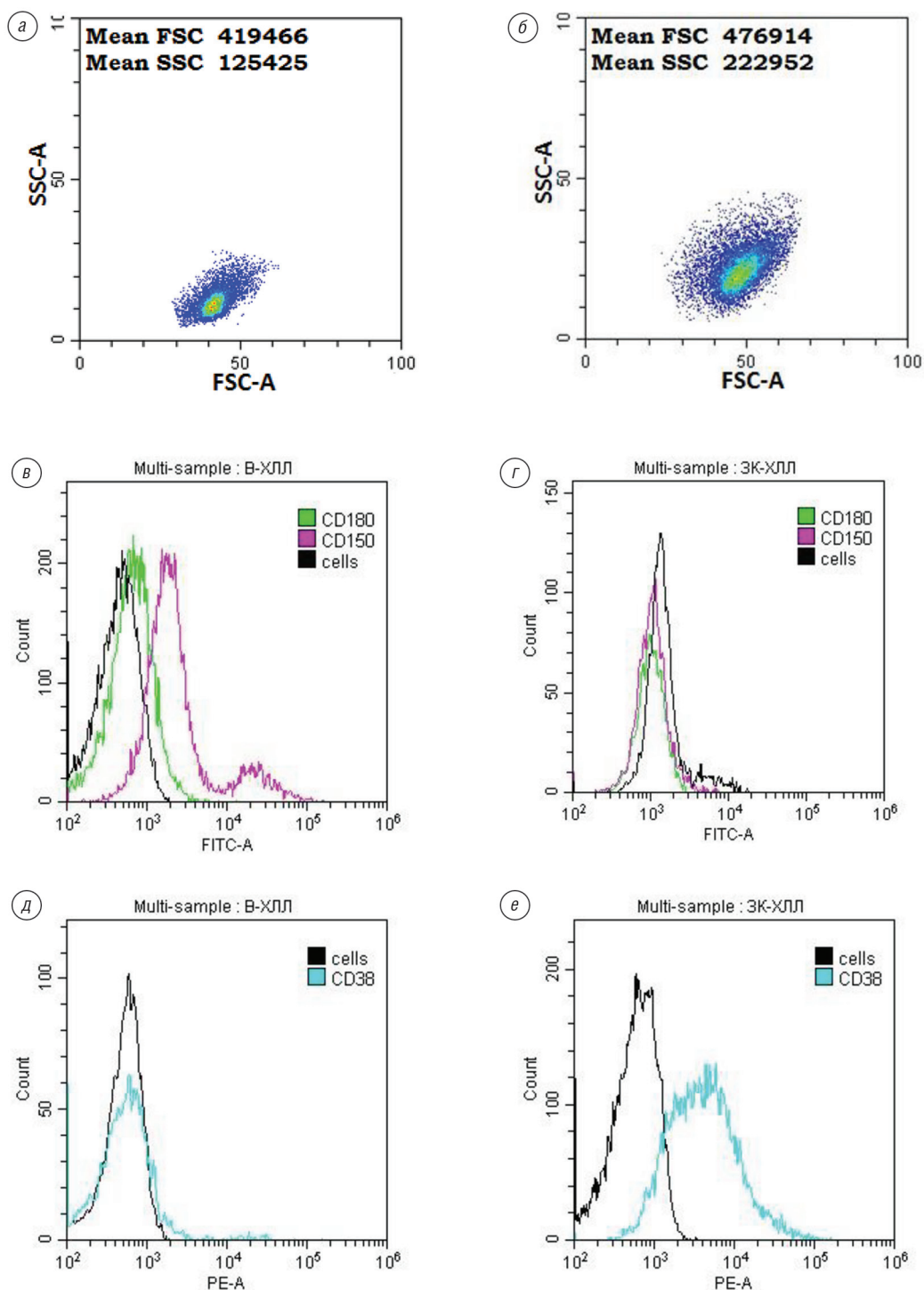


Рис. 1. Репрезентативні результати імунофенотипування злоякісно трансформованих лімфоцитів периферичної крові хворих із різними морфологічними варіантами ХЛЛ. Точкові графіки FCS vs SSC злоякісно трансформованих лімфоцитів хворих на В-ХЛЛ (а) та ЗК-ХЛЛ (б), виділених у градієнті щільності Lymphoprep. Гістограми експресії CD38, CD150 та CD180 при В-ХЛЛ (в, д) та ЗК-ХЛЛ (г, е)

характерною для всієї когорти хворих на В-ХЛЛ, тоді як при ЗК-ХЛЛ CD5 не було виявлено у 1 з 13, а CD23 — у 2 із 13 пацієнтів, що є цілком допустимим при імунофенотипуванні субстратних клітин таких хворих (табл. 1). Серед пацієнтів з В-ХЛЛ та ЗК-ХЛЛ нами було встановлено відмінність за кількістю позитивних випадків щодо експресії CD38, CD150 та CD180. Так, для хворих на В-ХЛЛ характер-

ною є більша частота CD150- та CD180-позитивних випадків, тоді як експресію CD38 частіше спостерігали у разі ЗК-ХЛЛ (див. табл. 1).

Аналіз імунофенотипового профілю злоякісно трансформованих лімфоцитів пацієнтів з ХЛЛ свідчить, що при обох морфологічних варіантах ХЛЛ експресія CD5 була досить високою, проте достовірно вищою у разі ЗК-ХЛЛ. Щодо іншого діагнос-

Таблиця 1
Частота експресії маркерів при різних морфологічних варіантах ХЛЛ

CD маркер	Кількість позитивних випадків (n/%)	
	В-ХЛЛ n = 19	ЗК-ХЛЛ n = 13
CD5	19/100,0	12/92,3
CD11c	17/89,5	13/100,0
CD20	19/100,0	13/100,0
CD22	12/63,2	9/69,2
CD23	19/100,0	11/84,6
CD37	19/100,0	13/100,0
CD38	10/52,6	10/76,9
CD40	19/100,0	13/100,0
CD150	15/78,9	6/46,2
CD180	13/68,4	5/38,5

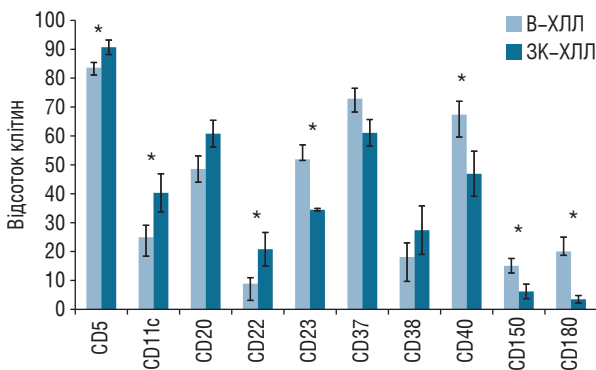


Рис. 2. Експресія маркерів плазматичних мембран В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ з різними морфологічними варіантами. * — $p < 0,05$ між групами порівнянь

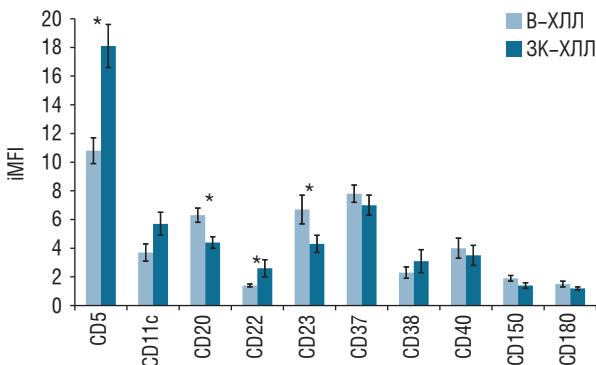


Рис. 3. Рівень експресії антигенів диференціювання лейкоцитів на плазматичній мембрані В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ з різними морфологічними варіантами. * — $p < 0,05$ між групами порівнянь

тичного маркера ХЛЛ, а саме CD23, то його експресію було виявлено на меншій популяції патологічних клітин, ніж CD5. Слід зазначити, що у хворих на ЗК-ХЛЛ як кількість CD23⁺-клітин, так і рівень експресії цього антигена були нижчими, ніж при В-ХЛЛ ($p < 0,05$) (рис. 2, 3).

Для верифікації ХЛЛ, призначення найбільш ефективної індивідуалізованої терапії та визначення мінімальної резидуальної хвороби до переліку маркерів плазматичних мембран лімфоцитів, аналіз яких є важливим, відносять CD20 та CD22 [17–19]. Знижена експресія CD20 при ХЛЛ асоційована з немутованим статусом *IGHV* та наявністю мутацій *NOTCH1*,

що за таких умов робить малоефективним використання терапії на основі анти-CD20 МкАт [20, 21]. Крім того, рівень експресії CD20 та CD22 корелює з певними генетичними аномаліями і, отже, з прогнозом перебігу захворювання [22, 23]. Нами не виявлено достовірної різниці у кількості CD20⁺ клітин при В-ХЛЛ та ЗК-ХЛЛ (див. рис. 2), проте рівень експресії цього маркера при ЗК-ХЛЛ був достовірно нижчим, ніж при В-ХЛЛ ($4,4 \pm 0,4$ та $6,3 \pm 0,5$ відповідно, $p = 0,04$) (див. рис. 3). Експресія CD22, як правило, слабо виражена у разі ХЛЛ [15, 18]. При В-ХЛЛ лише у 25% хворих було виявлено експресію CD22 більш ніж на 20% клітин (середнє значення $8,9 \pm 2,1\%$), тоді як при ЗК-ХЛЛ відмічено достовірно більшу кількість CD22⁺ клітин (середнє значення $20,8 \pm 5,8\%$). Рівень експресії цього маркера на злоскісно трансформованих В-лімфоцитах хворих на ЗК-ХЛЛ був майже у 2 рази вищим за такий у пацієнтів з В-ХЛЛ ($2,6 \pm 0,5$ та $1,4 \pm 0,1$ відповідно). Не виключено, що виявлений зв'язок між рівнем експресії CD22 та морфологічним варіантом ХЛЛ можна пояснити тим, що низький рівень експресії CD22 пов'язують з наявністю *del13q* і асоціюють із початковими стадіями захворювання та сприятливим прогнозом у хворих на ХЛЛ, а високий рівень експресії цього маркера — з наявністю трисомії за 12-ю хромосомою, яку частіше виявляють у хворих із підвищеним вмістом пролімфоцитів, атипичною морфологією лімфоцитів та агресивним клінічним перебігом [23, 24].

Одним з імунофенотипових маркерів, активація якого зумовлює підвищення CD20-опосередкованої загибелі клітин при застосуванні таргетних препаратів ритуксимабу та обінутузумабу, а також що асоційований із чутливістю В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ до цитотоксичної дії бендамустину є CD40 [25, 26]. Лігування CD40 опосередковує активацію ряду сигнальних шляхів, включаючи p38, MAPK, JAK, STAT і фосфоінозитид 3-кіназний, які, у свою чергу, впливають на виживаність та проліферацію клітин. Підвищений рівень експресії CD40 виявлено у разі ХЛЛ з немутованим статусом *IGHV*. Дослідження *in vitro* показали, що частина випадків ХЛЛ є CD40-залежними, що призводить до уникнення апоптозу шляхом експресії антиапоптозних білків BCL-2 та BCL-X_L, стимуляції проліферації через індукцію експресії хемокинів CCL22, CCL17, костимуляторних молекул CD80 і CD86 [27]. Нами встановлено, що кількість CD40-позитивних клітин є достовірно вищою серед когорти хворих із типовим ХЛЛ порівняно із ЗК-ХЛЛ, тоді як за рівнем експресії цього маркера не було виявлено відмінностей (див. рис. 2, 3).

Високий рівень експресії CD37 при В-лімфоцитарних новоутвореннях, у тому числі і ХЛЛ, здатність до індукції апоптозу та інтерналізації робить CD37 привабливою мішенню для цільової імунотерапії [28]. Також розглядається можливість застосування анти-CD37-специфічних

засобів у комбінації з ключовими хіміопрепаратами, які входять до складу різних схем лікування хворих на ХЛЛ [29] та у пацієнтів, резистентних до анти-CD20-терапії або з рецидивами після неї [30]. В усіх досліджених нами випадках ХЛЛ було виявлено експресію CD37, а кількість CD37-позитивних клітин у 75% хворих перевищувала 50%. Середня частка клітин, які були позитивними за CD37 на плазматичній мембрані злоскісно трансформованих В-лімфоцитів серед хворих з різними морфологічними варіантами ХЛЛ, достовірно не відрізнялася. Також не виявлено відмінності в iMFI CD37, який був досить високим як при В-ХЛЛ, так і ЗК-ХЛЛ (див. рис. 2, 3).

Як відомо, на поведінку лейкоемічних клітин і, зрештою, на прогноз перебігу захворювання впливає, зокрема, експресія молекул адгезії. Так, CD11c (субодиниця інтегрину αX , нековалентно зв'язана із субодиницею інтегрину β_2 (CD18)) опосередковує міжклітинну взаємодію та зв'язок з міжклітинним матриксом і експресується у 4–89% випадків ХЛЛ. Значимість визначення експресії CD11c при ХЛЛ є досить суперечливою. У ряді робіт експресію CD11c асоціюють з менш агресивним перебігом захворювання [31, 32], проте його не використовують у якості незалежного прогностичного маркера при ХЛЛ. Результати наших досліджень свідчать, що середній відсоток CD11c⁺ клітин у хворих на ЗК-ХЛЛ, який є прогностично більш несприятливим, ніж В-ХЛЛ, є вищим за такий у разі В-ХЛЛ. Подібну тенденцію відмічено і щодо рівня експресії цього маркера при різних морфологічних варіантах ХЛЛ (див. рис. 2, 3).

На сьогодні одним із сурогатних прогностичних маркерів перебігу захворювання при ХЛЛ прийнято вважати CD38. Експресія CD38 при цій патології асоційована з немутованим статусом *IGHV*, наявністю мутації в *TP53*, *ATM*, *NOTCH1*, підвищеною експресією β_2 -мікроглобуліну в сироватці крові та, відповідно, несприятливим прогнозом, а у хворих відмічають клінічні прояви анемії, тромбоцитопенії та лейкоцитозу [14]. CD38 взаємодіє з CD49d, утворюючи макромолекулярний комплекс, який бере участь у трансендотеліальній міграції, адгезії, інвазії та виживаності В-лімфоцитів ХЛЛ у кістковому мозку та лімфоїдних тканинах, оскільки CD49d опосередковує ролінг і зупинку клітин на ендотелії, а CD38 сприяє виживанню та проліферації лейкоемічних клітин [33, 34]. Аналіз експресії CD38 при різних морфологічних варіантах ХЛЛ свідчить, що середній відсоток CD38⁺ клітин та рівень його експресії на клітинах патологічного клону у хворих на ЗК-ХЛЛ є вищим, ніж при В-ХЛЛ, хоча різниця недостовірна (див. рис. 1 д, е, рис. 2, 3). Враховуючи те, що при ЗК-ХЛЛ частіше було виявлено CD38-позитивні випадки, а експресія цього маркера серед таких у більшості хворих представлена на понад 40% клітин, можна припустити існування зв'язку між експресією CD38 та морфологічним ва-

ріантом ХЛЛ, що також було встановлено у ряді робіт [35, 36]. Відмічено, що при ЗК-ХЛЛ, окрім високого рівня експресії CD38 у субстратних клітинах, частіше відмічають немутований статус *IGHV*, наявність трисомії за 12-ю хромосою, відсутність делецій у довгому плечі 13-ї хромосоми (del13q), мутації *NOTCH1*, що асоційовано з поганим перебігом захворювання [24].

CD150 — один з рецепторів, який бере участь у регуляції життєздатності злоскісно трансформованих В-лімфоцитів хворих на ХЛЛ. Достовірно вищий рівень експресії CD150 виявлено у пацієнтів з ХЛЛ, злоскісно трансформовані В-лімфоцити яких мають мутований статус *IGHV*, не експресують CD38, CD49, CXCR4, CXCL12 та мають нормальний каріотип, що асоційовано зі сприятливим перебігом захворювання [9]. Крім того, за умови наявності CD150⁺ В-лімфоцитів 10-річна виживаність хворих на ХЛЛ досягає 94,7 проти 77,5% у пацієнтів, у яких ХЛЛ має CD150-негативний фенотип [9].

Результати наших досліджень свідчать, що серед хворих на В-ХЛЛ у 15 із 19 (78,9%) відсоток CD150⁺ клітин знаходився в межах 7–36%, з яких у 46,7% перевищував 20%. Поміж хворих на ЗК-ХЛЛ лише у 2 із 6 відсоток CD150⁺-клітин становив 20–25%, тоді як у решти не перевищував 10%. Відмінностей у рівні експресії CD150 при різних морфологічних варіантах ХЛЛ не встановлено (див. рис. 2, 3).

CD150 функціонує окремо або ж у комбінації з іншими поверхневими рецепторами, одним з яких є CD180. Експресія CD180, подібно до CD150, при ХЛЛ асоційована з мутованим статусом *IGHV* та залучена до активації сигнальних шляхів Akt і MAPK [37, 38]. Раніше нами було показано, що CD180 колокалізується із CD150 на плазматичній мембрані у близько 60% випадків ХЛЛ. Одночасна лігація цих рецепторів може призводити до блокування трансляційних процесів та виживаності злоскісно трансформованих В-лімфоцитів і тим самим виступати стримувальним фактором прогресії ХЛЛ [10]. У цій серії експериментів експресію CD180 встановлено у 18 із 31 хворого на ХЛЛ, причому частка CD180-позитивних випадків серед пацієнтів з В-ХЛЛ була у 1,8 разу вищою, ніж у осіб із ЗК-ХЛЛ. Важливо зазначити, що у хворих на В-ХЛЛ кількість CD180-позитивних випадків з експресією цього маркера на >20% клітин становила близько 70%, тоді як при ЗК-ХЛЛ таких не було виявлено. Лише у 5 (38,5%) пацієнтів із ЗК-ХЛЛ, двоє з яких мали атиповий імунотип, експресію CD180 було виявлено на 7–10% злоскісно трансформованих В-лімфоцитів. Згідно з даними [11], у хворих на ХЛЛ країн Азії із CD5⁺ та/або CD23⁺-атиповим імунотипом сильно виражена експресія CD180. Не виключено, що такі відмінності у профілі експресії CD180 можуть бути пояснені особливістю імунотипової характеристики

клітин патологічного клону пацієнтів цього географічного регіону, оскільки такий варіант виявляють у 48–56% хворих на ХЛЛ, тоді як аналогічний показник серед населення Європи є в рази нижчим [4, 39, 40].

Отже, наявність експресії CD150, CD180 на лейкоцитарних клітинах є переважно характеристикою типового ХЛЛ, аніж ЗК-ХЛЛ. Враховуючи функціональне значення цих рецепторів при ХЛЛ, можна припустити, що відсутність експресії CD150 та CD180 на злоякісно трансформованих В-лімфоцитах при ЗК-ХЛЛ опосередковує більш агресивний перебіг захворювання.

Таким чином, серед досліджених антигенів диференціювання плазматичних мембран злоякісно трансформованих В-лімфоцитів нами не виявлено такого, який можна було б запропонувати в якості імунофенотипового маркера для ідентифікації морфологічного варіанта ХЛЛ. Загалом для ЗК-ХЛЛ характерна більш висока частота випадків позитивних за експресією CD38 та негативних за експресією CD150 та CD180, аніж для В-ХЛЛ (див. рис. 1 *в–е*). Крім того, встановлено, що морфологічні варіанти ХЛЛ відрізняються за профілем експресії деяких антигенів. Зазначимо, що під час виконання досліджень експресія антигена була оцінена за двома критеріями — відсотком клітин, що експресують досліджуваний антиген, та рівнем його експресії за показником iMFI. Додільність визначення експресії маркера з урахуванням кількості позитивних клітин перш за все є обґрунтованою при диференційній діагностиці гемобластозів та визначенні прогнозу перебігу захворювання. Нами встановлено, що у хворих на ЗК-ХЛЛ середня кількість злоякісно трансформованих В-лімфоцитів позитивних за експресією CD5, CD11c, CD22 є достовірно вищою, а CD23, CD40, CD150 та CD180 — нижчою, ніж при В-ХЛЛ. Щодо значення показника інтенсивності флуоресценції, то лише для антигенів CD5, CD22 та CD23 було підтверджено достовірні відмінності, виявлені під час оцінки відсотку клітин з експресією цих маркерів. Також нами відмічено відмінність у показниках iMFI CD20, який є вірогідно вищим при В-ХЛЛ порівняно із ЗК-ХЛЛ. Показник інтенсивності флуоресценції на сьогодні активно використовують для підвищення точності діагностики лейкозів, моніторингу експресії маркера, зокрема CD20 та CD23, під час оцінки індивідуальної відповіді пацієнтів на терапію та прогнозування перебігу захворювання [5, 17, 41, 42]. У наших попередніх дослідженнях також було встановлено предиктивну значущість показників iMFI CD5, CD37, CD38, CD40, CD150 та CD180 до цитотоксичної дії бендамустину, флударабіну та циклофосфаміду при В-ХЛЛ *ex vivo* [26]. Отримані дані дозволяють зробити висновки, що морфологічні варіанти ХЛЛ відрізняються за профілем експресії деяких імунофенотипових маркерів, які зумовлюють біологічні властивості

злоякісно трансформованих клітин, а відтак прогноз перебігу захворювання та вибір найбільш оптимальної терапії.

Робота виконувалася в рамках НДР «Розробка та впровадження в клінічну практику новітніх імуноензімоцитохімічних технологій діагностики В-клітинних лімфоїдних новоутворень» (0120U105605).

ВИСНОВКИ

1. У всіх хворих на В-ХЛЛ та ЗК-ХЛЛ злоякісно трансформовані В-лімфоцити є CD20-, CD37- та CD40-позитивними. Серед пацієнтів з В-ХЛЛ виявлено більшу частоту CD150-, CD180-позитивних та CD38-негативних випадків, ніж при ЗК-ХЛЛ.

2. Морфологічні варіанти ХЛЛ відрізняються за імунофенотиповими характеристиками злоякісно трансформованих В-лімфоцитів. У хворих на ЗК-ХЛЛ середня кількість клітин, позитивних за експресією CD5, CD11c, CD22 є достовірно вищою, а CD23, CD40, CD150 та CD180 — нижчою, ніж при В-ХЛЛ. Крім того, субстратні клітини хворих на ЗК-ХЛЛ мають вірогідно вищий рівень експресії CD5, CD22 та нижчий рівень експресії CD20 і CD23, ніж при В-ХЛЛ ($p < 0,05$).

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Bennet JM, Catovsky D, Daniel MT, *et al.* Proposals for the classification of chronic (mature) B and T lymphoid leukemias. French-American-British (FAB) Cooperative Group. *J Clin Patol* 1989; **42** (6): 567–84. doi: 10.1136/jcp.42.6.567.
2. Muller-Hemerlink HK, Montserrat E, Catovsky D, *et al.* Chronic lymphocytic leukemia. World health organization classification of tumors IARC pathology and genetics of tumors of haematopoietic and lymphoid tissues. Lion: IARC Press, 2001: 127–30.
3. Matutes E, Owusu-Ankomah K, Morilla R, *et al.* The immunological profile of B-cell disorders and proposal of a scoring system for the diagnosis of CLL. *Leukemia* 1994; **8** (10): 1640–5.
4. Moreau EJ, Matutes E, A'Hern RP, *et al.* Improvement of the chronic lymphocytic leukemia scoring system with the monoclonal antibody SN8 (CD79b). *Am J Clin Pathol* 1997; **108** (4): 378–82. doi: 10.1093/ajcp/108.4.378.
5. Urbaniak M, Iskierka-Jażdżewska E, Majchrzak A. Atypical immunophenotype of chronic lymphocytic leukemia. *Acta Haematologica Polonica* 2022; **53** (1): 48–52. doi: 10.5603/AHP.a2021.0096.
6. Melo JV, Catovsky D, Gregory WM, *et al.* The relationship between chronic lymphocytic leukaemia and prolymphocytic leukaemia. IV. Analysis of survival and prognostic features. *Br J Haematol* 1987; **65** (1): 23–9. doi: 10.1111/j.1365-2141.1987.tb06130.x.
7. Oscier D, Else M, Matutes E, *et al.* The morphology of CLL revisited: the clinical significance of prolymphocytes and correlations with prognostic/molecular markers in the LRF CLL4 trial. *Br J Haematol* 2016; **174** (5): 767–75. doi: 10.1111/bjh.14132.
8. Lens D, Dyer MJ, Garcia-Marco JM, *et al.* p53 abnormalities in CLL are associated with excess of prolymphocytes and poor prognosis. *Br J Haematol* 1997; **99** (4): 848–57. doi: 10.1046/j.1365-2141.1997.4723278.x.
9. Bologna C, Buonincontri R, Serra S, *et al.* SLAMF1 regulation of chemotaxis and autophagy determines CLL patient response. *J Clin Invest* 2016; **126** (1): 181–94. doi: 10.1172/JCI83013.

10. **Gordiienko I, Shlapatska L, Kholodniuk V, et al.** The interplay of CD150 and CD180 receptor pathways contribute to the pathobiology of chronic lymphocytic leukemia B cells by selective inhibition of Akt and MAPK signaling. *PLoS One* 2017; **12** (10): e0185940. doi: 10.1371/journal.pone.0185940.
11. **Li Y, Tong X, Huang L, et al.** A new score including CD43 and CD180: Increased diagnostic value for atypical chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Medicine* 2021; **10**: 4387–4396. doi: 10.1002/cam4.3983.
12. **Ozdemir ZN, Falay M, Parmaksiz A, et al.** A novel differential diagnosis algorithm for chronic lymphocytic leukemia using immunophenotyping with flow cytometry. *Hematol Transfus Cell Ther* 2021; S2531–1379 (21)01317–1. doi: 10.1016/j.htct.2021.08.012.
13. **Gordiienko I, Shlapatska L, Kholodniuk V, et al.** CD150 and CD180 are involved in regulation of transcription factors expression in chronic lymphocytic leukemia cells. *Exp Oncol* 2017; **39** (4): 291–8.
14. **Giudice V, Serio B, Bertolini A, et al.** Implementation of International Prognostic Index with flow cytometry immunophenotyping for better risk stratification of chronic lymphocytic leukemia. *Eur J Haematol* 2022; **109** (5): 483–93. doi: 10.1111/ejh.13833.
15. **Gluzman DF, Sklyarenko LM, Ivanyvskaya TS, et al.** Chronic lymphocytic leukemia: laboratory diagnosis and prognostic criterions. *Oncology* 2014; **16** (3): 171–6. (in Ukrainian).
16. **Vilpo G, Karhu R, Tobin G, et al.** More extensive genetic alterations in unmutated than in hypermutated cases of chronic lymphocytic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 2003; **37** (4): 417–20. doi: 10.1002/gcc.10227.
17. **Schilhabel A, Walte P, Cramer P, et al.** CD20 expression as a possible novel prognostic marker in CLL: application of EuroFlow standardization technique and normalization procedures in Flow cytometric expression analysis. *Cancers (Basel)* 2022; **14** (19): 4917. doi: 10.3390/cancers14194917.
18. **Okaly GV, Nargund AR, Venkataswamy E, et al.** Chronic lymphoproliferative disorders at an Indian tertiary cancer centre — the panel sufficiency in the diagnosis of chronic lymphocytic leukaemia. *J Clin Diagn Res* 2013; **7** (7): 1366–71. doi: 10.7860/JCDR/2013/5088.3130.
19. **Robak P, Robak T.** Immunotherapy combinations for chronic lymphocytic leukemia: advantages and disadvantages. *Expert Opin Biol Ther* 2022; **17**: 1–15. doi: 10.1080/14712598.2022.2145881.
20. **Olejniczak SH, Stewart CC, Donohue K, et al.** A quantitative exploration of surface antigen expression in common B-cell malignancies using flow cytometry. *Immunol Invest* 2006; **35** (1): 93–114. doi: 10.1080/08820130500496878.
21. **Pozzo F, Bittolo T, Arruga F, et al.** NOTCH1 mutations associate with low CD20 level in chronic lymphocytic leukemia: evidence for a NOTCH1 mutation-driven epigenetic dysregulation. *Leukemia* 2016; **30** (1): 182–9. doi: 10.1038/leu.2015.182.
22. **Tam CS, Otero-Palacios J, Abruzzo LV, et al.** Chronic lymphocytic leukaemia CD20 expression is dependent on the genetic subtype: a study of quantitative flow cytometry and fluorescent in-situ hybridization in 510 patients. *Br J Haematol* 2008; **141** (1): 36–40. doi: 10.1111/j.1365-2141.2008.07012.x.
23. **Balakrishna J, Basumallik N, Matulonis R, et al.** Intensity of antigen expression reflects IGHV mutational status and Dohner-defined prognostic categories in chronic lymphocytic leukemia, monoclonal B-cell lymphocytosis, and small lymphocytic lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2021; **62** (8): 1828–39. doi: 10.1080/10428194.2021.1894641.
24. **Matutes E, Oscier D, Garcia-Marco J, et al.** Trisomy 12 defines a group of CLL with atypical morphology: correlation between cytogenetic, clinical and laboratory features in 544 patients. *Br J Haematol* 1996; **92** (2): 382–8. doi: 10.1046/j.1365-2141.1996.d01-1478.x.
25. **Delgado R, Kielbassa K, Burg J, et al.** Co-stimulatory versus cell death aspects of agonistic CD40 monoclonal antibody selicrelumab in chronic lymphocytic leukemia. *Cancers* 2021; **13** (12): 3084. doi: 10.3390/cancers13123084.
26. **Shcherbina V, Gordiienko I, Shlapatska L, et al.** Sensitivity of chronic lymphocytic leukemia cells to chemotherapeutic drugs ex vivo depends on expression status of cell receptors. *Exp Oncology* 2020; **42** (1): 16–24. doi: 10.32471/exp-oncology.2312-8852.vol-42-no-1.14093.
27. **Scielzo C, Apollonio B, Scarfo L, et al.** The functional *in vitro* response to CD40 ligation reflects a different clinical outcome in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2011; **25** (11): 1760–7. doi: 10.1038/leu.2011.149.
28. **Payandeh Z, Noori E, Khalesi B, et al.** Anti-CD37 targeted immunotherapy of B-Cell malignancies. *Biotechnol Lett*. 2018; **40** (11–12): 1459–66. doi: 10.1007/s10529-018-2612-6.
29. **Li XL, Zhang CX.** New emerging therapies in the management of chronic lymphocytic leukemia. *Oncol Lett* 2016; **12** (5): 3051–4. doi: 10.3892/ol.2016.5108.
30. **Robak T, Robak P.** Anti-CD37 antibodies for chronic lymphocytic leukemia. *Expert Opin Biol Ther* 2014; **14** (5): 651–61. doi: 10.1517/14712598.2014.890182.
31. **Kraus TS, Sillings CN, Saxe DF, et al.** The role of CD11c expression in the diagnosis of mantle cell lymphoma. *Am J Clin Pathol* 2010; **134** (2): 271–7. doi: 10.1309/AJCPGCI3DAXVUMI.
32. **Eistere W, Hilbe W, Stauder R, et al.** An aggressive subtype of B-CLL is characterized by strong CD44 expression and lack of CD11c. *Br J Haematol* 1996; **93** (3): 661–9. doi: 10.1046/j.1365-2141.1996.d01-1704.x.
33. **Zucchetto A, Vaisitti T, Benedetti D, et al.** The CD49d/CD29 complex is physically and functionally associated with CD38 in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia*. 2012; **26** (6): 1301–12. doi: 10.1038/leu.2011.369.
34. **Deaglio S, Vaisitti T, Zucchetto A, et al.** CD38 as a molecular compass guiding topographical decisions of chronic lymphocytic leukemia cells. *Semin Cancer Biol* 2010; **20** (6): 416–23. doi: 10.1016/j.semcancer.2010.08.003.
35. **Chevallier P, Penther D, Avet-Loiseau H, et al.** CD38 expression and secondary 17p deletion are important prognostic factors in chronic lymphocytic leukemia. *Br J Haematol* 2002; **116** (1): 142–50. doi: 10.1046/j.0007-1048.2001.3205.x.
36. **Frater J, McCarron K, Hammel G, et al.** Typical and atypical chronic lymphocytic leukemia differ clinically and immunophenotypically. *Am J Clin Pathol* 2001; **116** (5): 655–64. doi: 10.1309/7Q1J-1AA8-DU4Q-PVLQ.
37. **Porakishvili N, Kulikova N, Jewell AP, et al.** Differential expression of CD 180 and IgM by B-cell chronic lymphocytic leukaemia cells using mutated and unmutated immunoglobulin VH genes. *Br J Haematol* 2005; **131** (3): 313–9. doi: 10.1111/j.1365-2141.2005.05775.x.
38. **Porakishvili N, Memon A, Vispute K, et al.** CD180 functions in activation, survival and cycling of B chronic lymphocytic leukaemia cells. *Br J Haematol* 2011; **153** (4): 486–98. doi: 10.1111/j.1365-2141.2011.08605.x.
39. **Tomomatsu J, Isobe Y, Oshimi K, et al.** Chronic lymphocytic leukemia in a Japanese population: varied immunophenotypic profile, distinctive usage of frequently mutated IGH gene, and indolent clinical behavior. *Leuk Lymphoma* 2010; **51** (12): 2230–9. doi: 10.3109/10428194.2010.527403.
40. **Jang M-A, Yoo E-H, Kim K, et al.** Chronic lymphocytic leukemia in Korean patients: frequent atypical immunophenotype and relatively aggressive clinical behavior. *Int J Hematol* 2013; **97** (3): 403–8. doi: 10.1007/s12185-013-1286-z.
41. **Skarzynski M, Niemann CU, Lee SY, et al.** Interactions between ibrutinib and anti-CD20 antibodies: competing effects on the outcome of combination therapy. *Clin Cancer Res* 2016; **22** (1): 86–95. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-1304.
42. **Bojarczuk K, Siernicka M, Dwojak M, et al.** B-cell receptor pathway inhibitors affect CD20 levels and impair antitumor activity

of anti-CD20 monoclonal antibodies. *Leukemia* 2014; 28 (5): 1163–7. doi: 10.1038/leu.2014.12.

IMMUNOPHENOTYPIC PROFILE OF MALIGNANT B-LYMPHOCYTES OF PATIENTS WITH CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA OF DIFFERENT MORPHOLOGICAL VARIANTS

L.M. Shlapatska, D.F. Gluzman

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

Summary. Aim: to determine the features of the expression of immunophenotypic markers on malignant B cells of typical and mixed cell type chronic lymphocytic leukemia. **Object and methods:** the studies were conducted on peripheral blood mononuclear cells separated by Lymphoprep gradient centrifugation of 32 patients with newly diagnosed and untreated chronic lymphocytic leukemia (CLL) (12 women and 20 men with the average age of 65.4 ± 1.7 years). The profile of the expression of surface antigens on leukemic B-cells of CLL cases was studied by flow cytometry. **Results:** it was determined that CLL of mixed cell type (CLL/PL), which has a worse prognosis than typical CLL (B-CLL), is characterized by a higher frequency of CD38-positive and CD150- and CD180-negative cases. The fol-

lowing differences in the immunophenotypic profile of malignant B cells of patients with CLL were revealed: among patients with CLL/PL, the mean percentage of positive B-cells for CD5, CD11c, CD22 is significantly higher, and CD23, CD40, CD150, and CD180 is lower than in B-CLL. In addition, a higher expression level of CD5, CD22 and a lower expression level of CD20 and CD23 are characteristics of leukemic B cells of patients with CLL/PL in comparison to B-CLL ($p < 0.05$). **Conclusion:** B-CLL and CLL/PL differ in the expression profile of some immunophenotypic markers, the determination of which is expedient for prediction of the course of the disease and choosing the most effective therapy at the diagnostic stage.

Key Words: typical chronic lymphocytic leukemia, mixed cell type chronic lymphocytic leukemia, immunophenotype, CD38, CD150, CD180.

Адреса для листування:

Шлапацька Л.М.
03022, Київ, вул. Васильківська, 45
Інститут експериментальної патології,
онкології і радіобіології
ім. Р.Є. Кавецького НАН України
E-mail: larisash70@ukr.net

Одержано: 14.12.2022