

Новые маркеры (CD160, CD200, LAIR-1) в диагностике В-клеточных лимфопротеративных заболеваний

С.А. Луговская¹, Д.Г. Кисиличина¹, М.Е. Почтарь¹,
Е.В. Наумова¹, Е.А. Никитин², Л.С. Аль-Ради²

РЕФЕРАТ

New markers (CD160, CD200, and LAIR-1) in diagnosis of B-cell lymphoproliferative disorders

S.A. Lugovskaya¹, D.G. Kisilichina¹, M.E. Pochtary¹,
E.V. Naumova¹, E.A. Nikitin², and L.S. Al-Radi²

ABSTRACT

Flow cytometry is used for diagnosis and classification of B-cell lymphoproliferative disorders, measurement of target antigen expression, and residual tumor clone monitoring. An immunological phenotype of neoplastic B-cells does not always correspond to its classic features according to an immunomorphological type of lymphoproliferation that complicates the interpretation of the data obtained and indicates the need in search of additional informative markers. The use of new monoclonal anti-CD160-, anti-CD200-, and anti-LAIR-1-antibodies expands the diagnostic capabilities of flow cytometry.

Keywords: B-cell lymphoproliferative disorders, CD160, CD200, LAIR-1 markers, multiparameter flow cytometry.

¹ Russian Medical Academy of Postgraduate Education, RF Ministry of Health, Moscow

² Hematology Research Center, RF Ministry of Health, Moscow

Контакты: slugovskaya@mail.ru

Принято в печать: 11 февраля 2013 г.

Проточная цитофлуориметрия используется в диагностике, классификации В-клеточных лимфопротеративных заболеваний, оценке плотности целевых антигенов и мониторинге остаточного опухолевого клона. Иммунофенотип опухолевых В-лимфоцитов не всегда соответствует его классической характеристике согласно иммуноморфологическому варианту лимфопротерации, что затрудняет интерпретацию полученных результатов и указывает на необходимость поиска дополнительных информативных маркеров. Использование новых моноклональных антител к CD160, CD200, LAIR-1 расширяет диагностические возможности проточной цитофлуориметрии.

Ключевые слова:

В-клеточные лимфопротеративные заболевания, маркеры CD160, CD200, LAIR-1, многопараметрическая проточная цитофлуориметрия.

ВВЕДЕНИЕ

Гистогенетическая неоднородность лимфопротеративных заболеваний (ЛПЗ) определяет их клиническое разнообразие и различную чувствительность к терапии, что в конечном итоге влияет на прогноз заболевания. Диагностика ЛПЗ основана на морфологическом исследовании цитологического и/или гистологического субстрата опухоли. Однако за морфологической картиной лимфоцита могут скрываться разнообразные заболевания, более точная характеристика которых невозможна без проведения иммунологического исследования (иммуногистохимия, иммуноцитохимия, проточная цитофлуориметрия). Эти методы позволяют определить принадлежность опухолевых клеток к определенной линии, стадии В- или Т-клеточной дифференцировки, подтвердить кло-

нальный характер В-клеточной протерации, выявить коэкспрессию антигенов, молекулярных маркеров, характерных для конкретной опухоли (например, CD5, bcl-2, циклин D1), определить мишени для таргетной терапии с последующим мониторингом остаточного опухолевого клона. Корректная диагностика различных иммуноморфологических вариантов ЛПЗ служит ключевым моментом успешного их лечения.

Проточная цитофлуориметрия — быстрый, высокочувствительный метод, позволяющий фокусироваться на опухолевой клеточной популяции, используя мембраносвязанные и внутриклеточные белки в качестве мишеней. Это позволяет применять метод в специфической диагностике, классификации В-клеточных ЛПЗ (В-ЛПЗ) и мониторинге остаточного опухолевого клона. В настоящее

¹ ГБОУ ДПО «Российская медицинская академия последипломного образования» Министерства здравоохранения РФ, Москва

² ФГБУ «Гематологический научный центр» Министерства здравоохранения РФ, Москва

время установлены основные иммунофенотипические характеристики опухолевых клеток при различных вариантах В-ЛПЗ [1]. Однако иммунофенотип опухолевых В-лимфоцитов не всегда укладывается в классические его характеристики в соответствии с иммуноморфологическим вариантом опухоли, что затрудняет интерпретацию полученных данных. Все это указывает на необходимость поиска новых маркеров в дифференциальной диагностике В-клеточных ЛПЗ. В последние годы в связи с внедрением в практику 4–8-цветной (и более) многопараметрической проточной цитометрии, новых моноклональных антител появились данные об использовании ряда информативных дополнительных маркеров в дифференциально-диагностической панели типирования В-клеточных ЛПЗ. К ним относятся CD160, CD200, LAIR-1.

CD160 (27 кДа) — гликозилфосфатидилинозитол-связанный мембранный белок, активированный НК-клеточный рецептор. Экспрессия мРНК CD160 строго рестриktирована НК-клетками и не выявлена в клетках миелоидной линии, нормальных В-лимфоцитах и В-клеточных линиях, трансформированных вирусом Эпштейна—Барр [2]. В противоположность большинству генов НК-клеточного рецептора, локализованных на хромосомах 12 и 19, ген CD160 расположен на хромосоме 1q42.3. CD160 экспрессирован на большинстве циркулирующих НК-клеток (CD56^{dim}, CD16⁺), а также TCR $\gamma\delta$ ⁺ цитотоксических Т-лимфоцитах крови, минорной популяции цитотоксических клеток с фенотипом CD8^{bright}⁺, CD28[–], TCR $\alpha\beta$ ⁺, минорной популяции лимфоцитов CD4⁺ (около 11–20%), на всех интраэпителиальных интестинальных Т-лимфоцитах с фенотипом CD3⁺, TCR $\alpha\beta$ ⁺, CD56[–] [3]. CD160 имеет широкую специфичность для главного комплекса гистосовместимости (МНС), связываясь с молекулами МНС классов Ia и Ib, включая HLA-G, запуская цитотоксическую функцию НК-клеток, равно как и продукцию цитокинов, включая IFN- γ (интерферон), TNF- α (фактор некроза опухолей), IL-6 (интерлейкин). Только ограниченное число активированных НК-клеточных рецепторов демонстрирует такую одновременную индукцию синтеза цитокинов и их высвобождение в дополнение к цитотоксической функции. Для CD160-опосредованной секреции цитокинов требуются сигнальная молекула PI3K (phosphoinositide-3 kinase), SYK и ERK. В субпопуляции CD8⁺ лимфоцитов CD160 повышает CD3-индуцированную пролиферацию и клеточную цитотоксичность [2].

В норме экспрессия CD160 обнаруживается на 15–20% лимфоцитов CD2⁺, транскрипт CD160 ограничен НК-клетками и Т-лимфоцитами. Гемопозитические стволовые клетки костного мозга (CD34⁺, CD117⁺, CD38^{dim}[–], CD133⁺) экспрессируют CD160 в среднем в 1,7% клеток (диапазон 0,77–2,54%). На костномозговых предшественниках В-лимфоцитов (CD19⁺, CD10⁺, CD34⁺, CD38⁺; CD19⁺, CD10⁺, CD34[–], sIg[–]) экспрессия CD160 отсутствует. Исследование экспрессии CD160 на В-клетках герминативного центра лимфоузлов, а также зрелых поликлональных В-лимфоцитах, выделенных из селезенки и миндалин, также не выявило экспрессию этого маркера (0,29–1,28% позитивных клеток). Пуповинная кровь богата популяцией наивных В1-лимфоцитов CD19⁺, CD5⁺, которые также не экспрессируют CD160. В ходе нормальной В-клеточной дифференцировки экспрессия CD160 определяется в среднем на 2,08% циркулирующих зрелых В-клеток и

0,37% В1-популяции лимфоцитов с низкой интенсивностью флюоресценции. От общего числа лейкоцитов это составляет лишь 0,11% В-лимфоцитов. Плазмодиты костного мозга также не экспрессируют CD160 [4, 5].

Т. Farren и соавт. продолжили изучение экспрессии CD160 и мРНК CD160 на различных стадиях дифференцировки опухолевых В-лимфоцитов, незрелых В-клеточных предшественников пре-В-острого лимфобластного лейкоза (пре-В-ОЛЛ) [4]. Мембранная экспрессия CD160 не определялась на незрелых В-клеточных предшественниках пре-В-ОЛЛ, в то время как при В-клеточном хроническом лимфолейкозе (В-ХЛЛ) (600 наблюдений) экспрессия CD160 отмечалась в 98,3% случаев. В среднем число клеток с экспрессией маркера составило 65,9%. Опухолевые клетки волосатоклеточного лейкоза (ВКЛ) во всех случаях экспрессировали CD160. Среднее число CD160-позитивных клеток составило 67,8%. При ВКЛ отмечалась более высокая средняя интенсивность флюоресценции (MFI), чем при В-ХЛЛ. Среди других В-ЛПЗ экспрессия CD160 наблюдалась только в 15% случаев, из них в 14,7% — при лимфоме из клеток зоны мантии (ЛКЗМ), при этом доля позитивных клеток была менее 1%. С целью подтвердить данные проточной цитометрии изучали экстрагированную РНК из высокоочищенной фракции В-лимфоцитов CD19⁺. Транскрипт CD160 не определялся в нормальных В-клетках, при пре-В-ОЛЛ, фолликулярной лимфоме и ЛКЗМ и выявлялся только в клетках В-ХЛЛ и ВКЛ. Полученные результаты свидетельствуют о том, что CD160 — белок и экспрессия его РНК отсутствуют в нормальных В-лимфоцитах и при большинстве зрелых В-клеточных ЛПЗ, но экспрессируются клетками В-ХЛЛ и ВКЛ. Отмечено, что MFI CD160 была наиболее высокой на циркулирующих в крови клетках В-ХЛЛ и ВКЛ и несколько ниже у тех же больных на опухолевых В-лимфоцитах в лимфоидных тканях. MFI CD160 на опухолевых клетках других В-ЛПЗ сопоставима с таковой на нормальных В-клетках. Во всех случаях поликлонального В-клеточного лимфоцитоза экспрессия CD160 отсутствовала. При исследовании моноклонального В-клеточного лимфоцитоза в 15 из 16 наблюдений регистрировалась экспрессия CD160 [5].

CD200 (прежнее название OX2) — трансмембранный гликопротеид (40–45 кДа), принадлежит к суперсемейству иммуноглобулинов, обладает иммуносупрессивными свойствами. Экспрессируется на тимоцитах, покоящихся и активированных Т- и В-лимфоцитах, субпопуляции клеток CD34⁺, дендритных и эндотелиальных клетках, нейронах. Экспрессия CD200 отсутствует на НК-клетках, моноцитах, гранулоцитах, тромбоцитах. В эксперименте на мышцах связывание CD200 с его рецептором вызывает снижение продукции цитокинов Th1-лимфоцитами (IL-2, IFN- γ), повышает секрецию IL-10, IL-4 Th2-лимфоцитами, способствует *in vitro* дифференцировке Т-лимфоцитов в направлении регуляторных Т-клеток (CD4⁺, CD25⁺, FOXP3⁺) [6].

CD200 постоянно сверхэкспрессируется на лимфоцитах В-ХЛЛ, опухолевых плазматических клетках. Добавление клеток ХЛЛ к смешанной популяции лимфоцитов приводило к иммунному сдвигу от Th1- к Th2-ответу, подтверждая важную роль CD200 в контроле Т-цитотоксического иммунного ответа. Помимо В-ХЛЛ экспрессия CD200 наблюдается на клетках ВКЛ [6]. Нор-

мальные В-лимфоциты также экспрессируют этот маркер, который в отличие от В-ХЛЛ характеризуется слабой MFI и гетерогенным распределением. Опухолевые В-клетки отличаются высокой гомогенной экспрессией CD200. Рассматриваемый маркер нашел свое применение в дифференциальной диагностике В-ХЛЛ и ЛКЗМ. Экспрессия CD200 значительно слабее на клетках ЛКЗМ, чем В-ХЛЛ [7, 8]. Кроме того, экспрессия CD200 рассматривается как неблагоприятный прогностический маркер при множественной миеломе и остром миелоидном лейкозе [9–11].

LAIR-1 (Leukocyte-Associated Ig-Like Receptor-1) (CD305) — трансмембранный гликопротеид (32 кДа), принадлежит к суперсемейству иммуноглобулинов. Экспрессируется на большей части Т-, В-, НК-лимфоцитов, моноцитах, дендритных клетках, тимоцитах, клетках CD34+. Экспрессия LAIR-1 наблюдается на ранних стадиях дифференцировки В-лимфоцитов, но отсутствует примерно на половине В-клеток памяти, всех В-клетках герминативного центра, плазмобластах и плазматических клетках. Стимуляция наивных В-лимфоцитов *in vitro* приводит к их пролиферации и дифференцировке в плазматических клетках, что сопровождается потерей экспрессии LAIR-1. Кроме того, LAIR-1 может функционировать как негативный регулятор в BCR-опосредованном ответе. На Т-лимфоцитах и НК-клетках LAIR-1 выполняет функцию ингибирующего рецептора [12, 13].

Связывание LAIR-1 с коллагеном ингибирует иммунный ответ, приводит к угнетению НК-зависимой цитотоксичности. Молекула LAIR-1 не способна к узнаванию МНС-I, демонстрируя новый МНС-I-независимый механизм регуляции функционирования НК-клеток. Этот маркер рассматривается в свете нового механизма иммунной регуляции, опосредованного внеклеточным коллагеновым матриксом [14]. В рекомендациях EuroFlow в дифференциально-диагностическую панель В-ЛПЗ маркер LAIR-1 включен наряду с CD103, CD11c, CD25 для диагностики ВКЛ.

ХАРАКТЕРИСТИКА ПАЦИЕНТОВ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Имунофенотипирование лимфоцитов крови проведено у 188 человек, из них у 110 пациентов с В-ХЛЛ, у 17 — с ВКЛ, у 7 — лимфомой маргинальной зоны селезенки (ЛМЗС), у 3 — ЛКЗМ. Возраст пациентов варьировал от 30 до 75 лет. Контрольную группу составил 51 условно здоровый человек. Опухолевые клетки В-ХЛЛ имели классический фенотип: CD19+, CD20^{dim/moderate}+, CD5+, CD23+, CD43+, CD10–, FMC-7– с рестрикцией по легким цепям κ- или λ-типа. Имунофенотип опухолевых клеток ВКЛ характеризовался экспрессией CD19+, CD20^{high}, CD5–, CD103+, CD11c+, CD25+, FMC-7+, κ- или λ-тип. Диагноз ЛКЗМ подтвержден наличием транслокации t(11;14) и экспрессией на опухолевых клетках циклина D1. Фенотип опухолевых клеток ЛКЗМ соответствовал CD19+, CD20^{high}, CD5+, CD23–, CD10–, FMC-7+, κ- или λ-тип. Имунофенотип опухолевых В-клеток ЛМЗС характеризовался CD19+, CD20^{high}, CD5–, CD23+/-, CD10–, FMC-7+, κ- или λ-тип.

Панель для диагностики и дифференциальной диагностики перечисленных выше В-ЛПЗ включала следующие антигены (табл. 1).

В качестве дополнительных маркеров в панель были включены моноклональные антитела анти-CD160-PE

Таблица 1. Панель моноклональных антител, используемая в диагностике В-ЛПЗ

Флюорохром	FITC	PE	PC-5 или PerCP 5.5	PC7
CD-маркер	CD3	CD16+, CD56	CD14	CD45
	CD20	CD23	CD19	CD5
	CD43	CD10	CD38	CD19
	slgκ	slgλ		CD19
	CD103	CD11c	CD25	CD19
	FMC-7	CD23	CD19	

(Clone BY55 Immunotech), анти-CD200-PE (Clone MRC OX-104 BD Pharmingen) и анти-LAIR-1-PE (Clone DX26 BD Pharmingen).

Исследование проводилось на проточном цитофлюориметре FACSCanto II (Becton & Dickinson, США) с использованием программного обеспечения FACSDiva (Becton & Dickinson, США). Первичное иммунофенотипирование осуществляли с применением стандартной методики пробоподготовки. Критерием позитивности считали наличие экспрессии маркера на поверхности более чем 20 % опухолевых клеток.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В контрольной группе условно здоровых лиц (n = 51) наблюдалось отсутствие экспрессии CD160 на В-лимфоцитах (диапазон позитивных клеток 0–0,1 %). В 83 % случаев клетки В-ХЛЛ (CD19+, CD5+, CD23+) экспрессировали CD160, однако его экспрессия была слабой и гетерогенной (медиана 40 %, диапазон позитивных клеток варьировал от 0 до 98 %). В 17 % случаев клетки ХЛЛ были CD160-негативными. В 50 % случаев ВКЛ опухолевые клетки экспрессировали CD160 (медиана 28 %, диапазон 0–90 %), тогда как при ЛМЗС экспрессия его отмечалась только в 14 % случаев (медиана 2 %, диапазон 0–80 %). Экспрессия CD160 отсутствовала на В-лимфоцитах при ЛКЗМ (медиана 0 %, диапазон 0–0,2 %) (рис. 1).

На рис. 2 представлены точечные и контурные графики экспрессии CD160 на лимфоцитах в норме и при различных В-ЛПЗ.

Проблема интерпретации результатов оценки CD160 заключалась в отсутствии возможности объективного установления границы между CD160-позитивной и CD160-негативной популяцией В-клеток в связи с

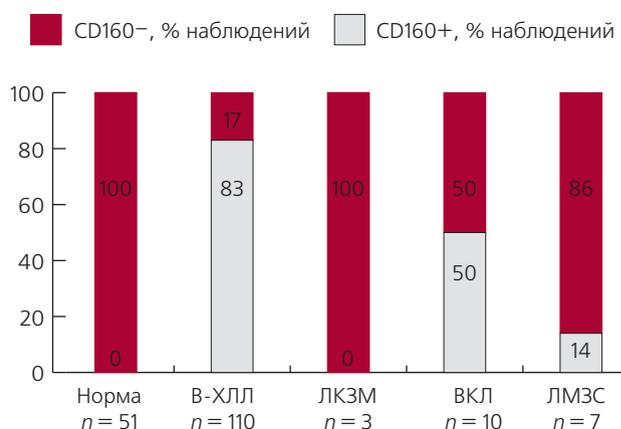


Рис. 1. Частота позитивных и негативных по экспрессии CD160 наблюдений В-ЛПЗ

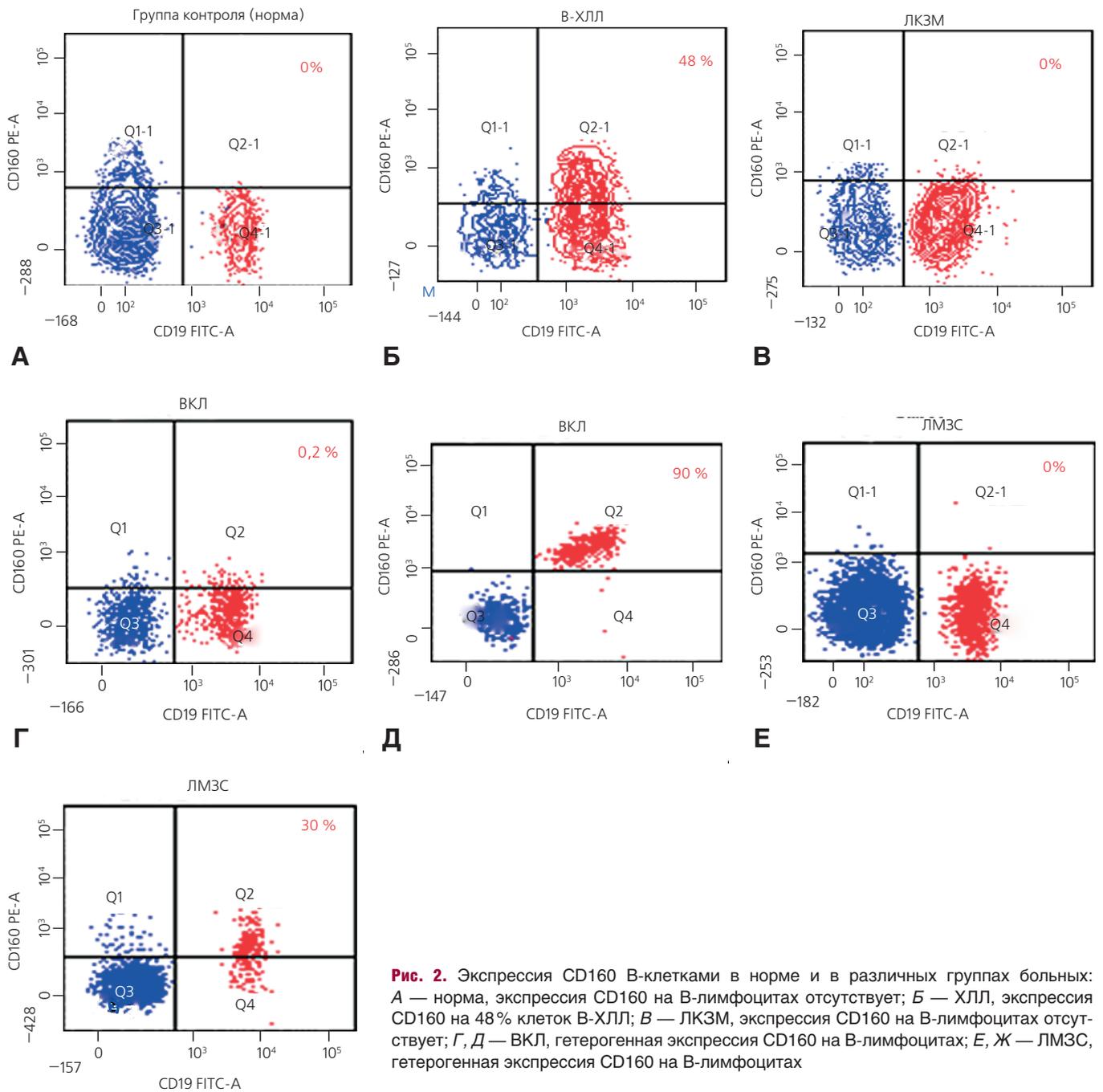


Рис. 2. Экспрессия CD160 В-клетками в норме и в различных группах больных: А — норма, экспрессия CD160 на В-лимфоцитах отсутствует; Б — ХЛЛ, экспрессия CD160 на 48 % клеток В-ХЛЛ; В — ЛКЗМ, экспрессия CD160 на В-лимфоцитах отсутствует; Г, Д — ВКЛ, гетерогенная экспрессия CD160 на В-лимфоцитах; Е, Ж — ЛМЗС, гетерогенная экспрессия CD160 на В-лимфоцитах

Ж

такими особенностями данного маркера, как слабый и гетерогенный характер экспрессии на В-клетках. В настоящей работе при анализе данных определяли не только относительное количество позитивных по данному маркеру клеток, но и вычисляли показатели соотношения значений MFI для CD160+ В-клеток и CD160+ Т-лимфоцитов, т. е. коэффициент MFI CD160 (рис. 3). Пороговой величиной при оценке данного показателя служило среднее значение MFI CD160, определенное для контрольной группы, что составляло $1,0 \pm 0,05$ усл. ед. (нормальные В-клетки не экспрессируют CD160).

При сравнении показателей MFI CD160 для различных групп больных значения, полученные для пациентов с ЛКЗМ и ЛМЗС, не отличались от таковых в контрольной группе (отсутствие экспрессии CD160 на В-клетках) (рис. 4). При этом соотношения MFI CD160 для В-ХЛЛ и ВКЛ превышали пороговую величину и составляли $2,9 \pm 0,9$ и $2,5 \pm 1,2$ усл. ед. соответственно,

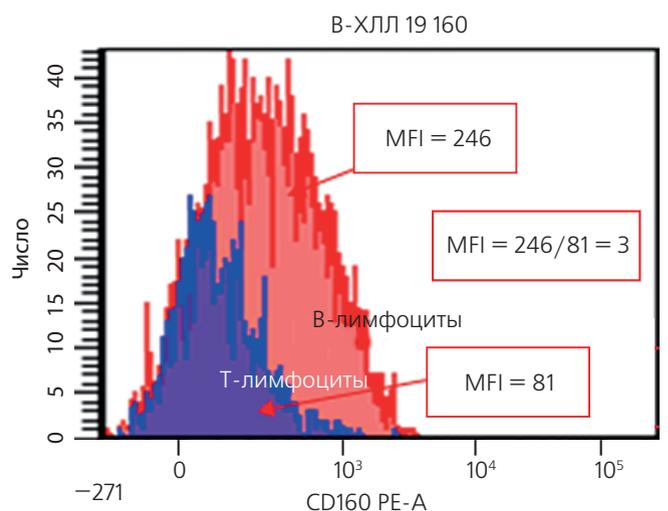


Рис. 3. Пример оценки экспрессии CD160 методом вычисления MFI CD160

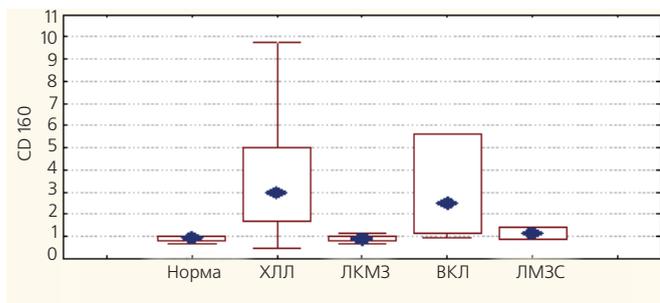


Рис. 4. Сравнение значений MFI CD160 для различных групп пациентов

что выше в сравнении с контролем ($p < 0,001$) и свидетельствует о наличии экспрессии CD160 на опухолевых В-лимфоцитах при данных заболеваниях.

Анализ экспрессии CD200 показал, что большинство В-лимфоцитов крови в контрольной группе экспрессировало этот антиген (медиана 78 %, диапазон 35–95 %) (рис. 6, А). Во всех случаях В-ХЛЛ наблюдалась гомогенная яркая экспрессия CD200 на всей популяции

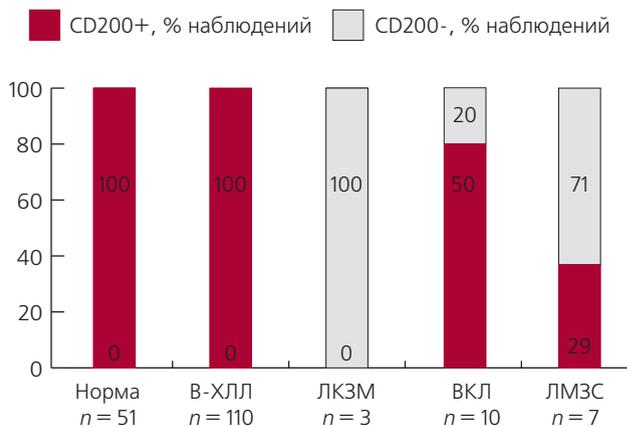


Рис. 5. Частота позитивных и негативных по экспрессии CD200 наблюдений В-ЛПЗ

опухолевых клеток (медиана 100 %, диапазон 99–100 %) (рис. 6, Б). Экспрессия CD200 не выявлялась при ЛКЗМ (медиана 0,8 %, диапазон 0,7–1,2 %) (рис. 6, В), но обнаруживалась в 80 % случаев ВКЛ (медиана 97 %,

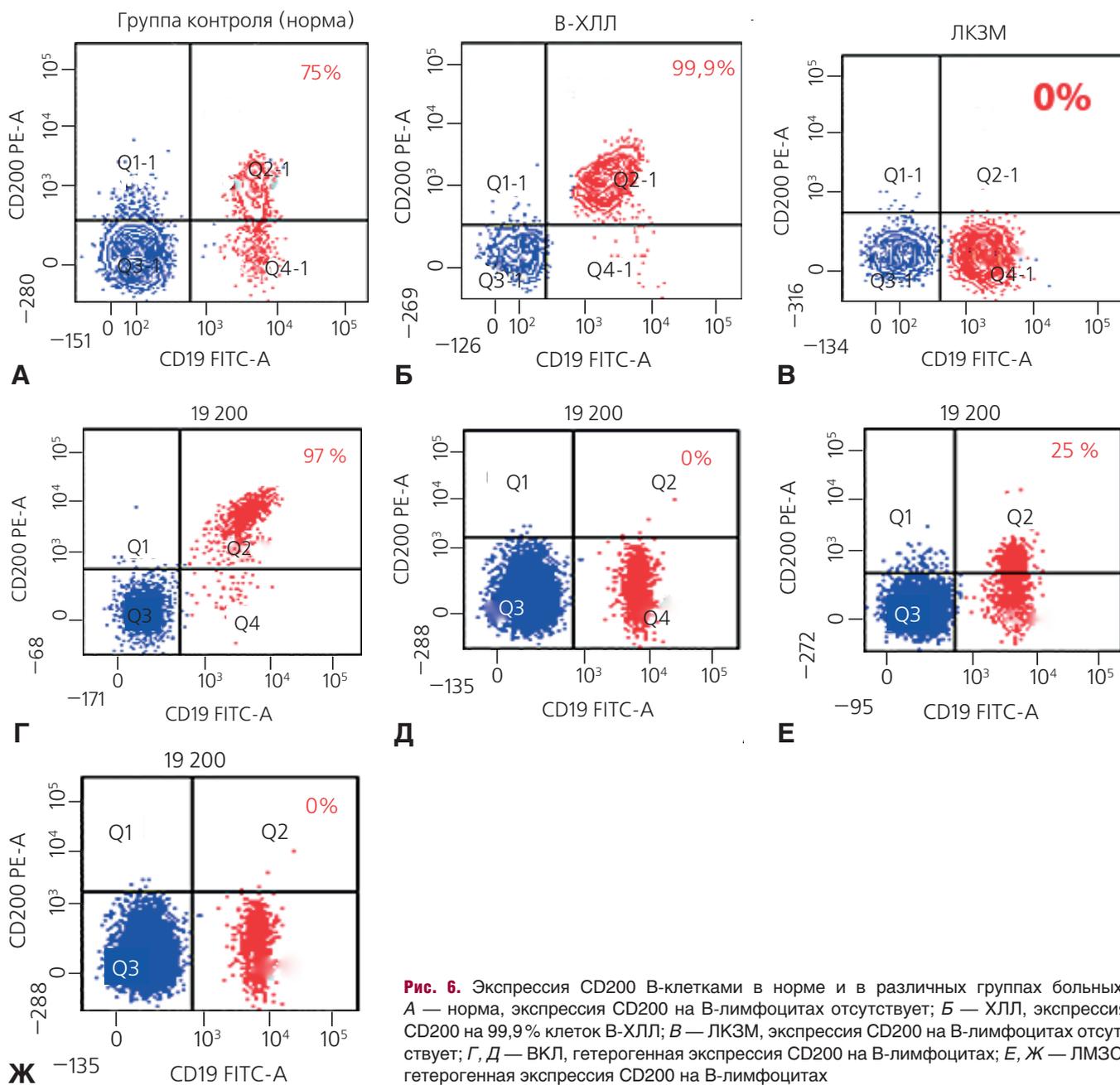


Рис. 6. Экспрессия CD200 В-клетками в норме и в различных группах больных: А — норма, экспрессия CD200 на В-лимфоцитах отсутствует; Б — ХЛЛ, экспрессия CD200 на 99,9% клеток В-ХЛЛ; В — ЛКЗМ, экспрессия CD200 на В-лимфоцитах отсутствует; Г, Д — ВКЛ, гетерогенная экспрессия CD200 на В-лимфоцитах; Е, Ж — ЛМЗС, гетерогенная экспрессия CD200 на В-лимфоцитах

Таблица 2. Сравнение значений MFI CD200 в различных группах пациентов

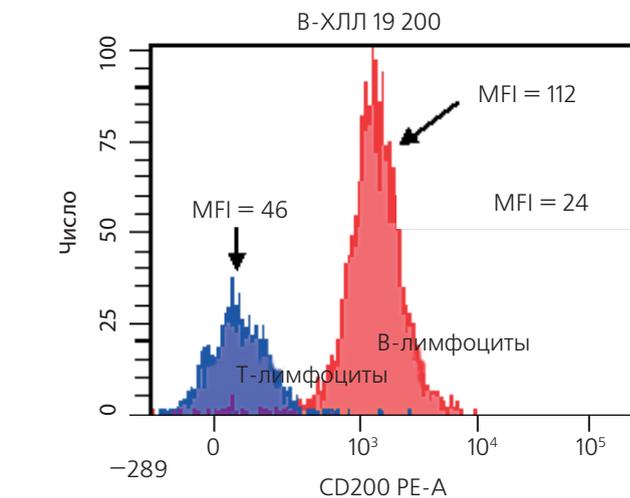
MFI CD200, усл. ед.	Группа				
	контроля, n = 51	ХЛЛ, n = 110	ЛКЗМ, n = 3	ВКЛ, n = 10	ЛМЗС, n = 7
Медиана	11	42	0,9	40,2	1,6
Диапазон	3,2–43,7	8,7–155	0,8–1,1	1,1–72	1–7,6

диапазон 5–99 %) (рис. 6, Г, Д) и в 1/3 случаев ЛМЗС (медиана 2 %, диапазон 0,1–70 %) (рис. 6, Е, Ж).

В случаях CD200-позитивных В-ЛПЗ наблюдалась достаточно яркая экспрессия данного маркера с четким разделением по шкале интенсивности флюоресценции популяций В-клеток и CD200-негативных Т-лимфоцитов того же образца. Для данного маркера вычисление MFI CD200, представляющего собой соотношение значений MFI CD200 В-клеток к значениям MFI CD200 Т-лимфоцитов (рис. 7), использовали с целью получить дополнительную информацию о плотности экспрессии CD200 [7].

При сравнении полученных для различных В-ЛПЗ соотношений MFI CD200 наибольшие величины данного показателя наблюдались при В-ХЛЛ (медиана 42 усл. ед., диапазон 8,7–155 усл. ед.) и у пациентов с ВКЛ (медиана 40,2 усл. ед., диапазон 1,1–72 усл. ед.), статистически значимо ($p < 0,01$) превышая значения MFI CD200 у больных ЛКЗМ (медиана 0,9 усл. ед., диапазон 0,8–1,1 усл. ед.) и ЛМЗС (медиана 1,6 усл. ед., диапазон 1–7,6 усл. ед.) (табл. 2).

Изучение экспрессии LAIR-1 показало, что большинство В-лимфоцитов крови в контрольной группе экспрессировало мембранный LAIR-1 (медиана 80 %, диапазон 70–99,9 %) (рис. 8, А). При В-ХЛЛ отмечалась разно-

**Рис. 7.** Пример оценки экспрессии CD200 методом вычисления MFI CD200

бразная картина экспрессии LAIR-1 — от ее отсутствия до выраженного числа позитивных В-лимфоцитов (медиана 42 %, диапазон 0–80 %) (рис. 8, Б, В). При ВКЛ отмечалась яркая экспрессия LAIR-1 (медиана 99 %, диапазон 80–100 % позитивных В-клеток) (рис. 8, Д), в то время как при ЛМЗС она практически отсутствовала (медиана 0,1 %, диапазон 0–5 %) (рис. 8, Г).

Сравнение значений MFI LAIR-1 (соотношение значений MFI LAIR-1 В-клеток к значениям MFI LAIR-1 Т-лимфоцитов) продемонстрировало статистически значимое ($p < 0,001$) увеличение данного параметра у больных ВКЛ (медиана 44 усл. ед., диапазон 9,8–218 усл. ед.) в сравнении с контрольной группой (медиана

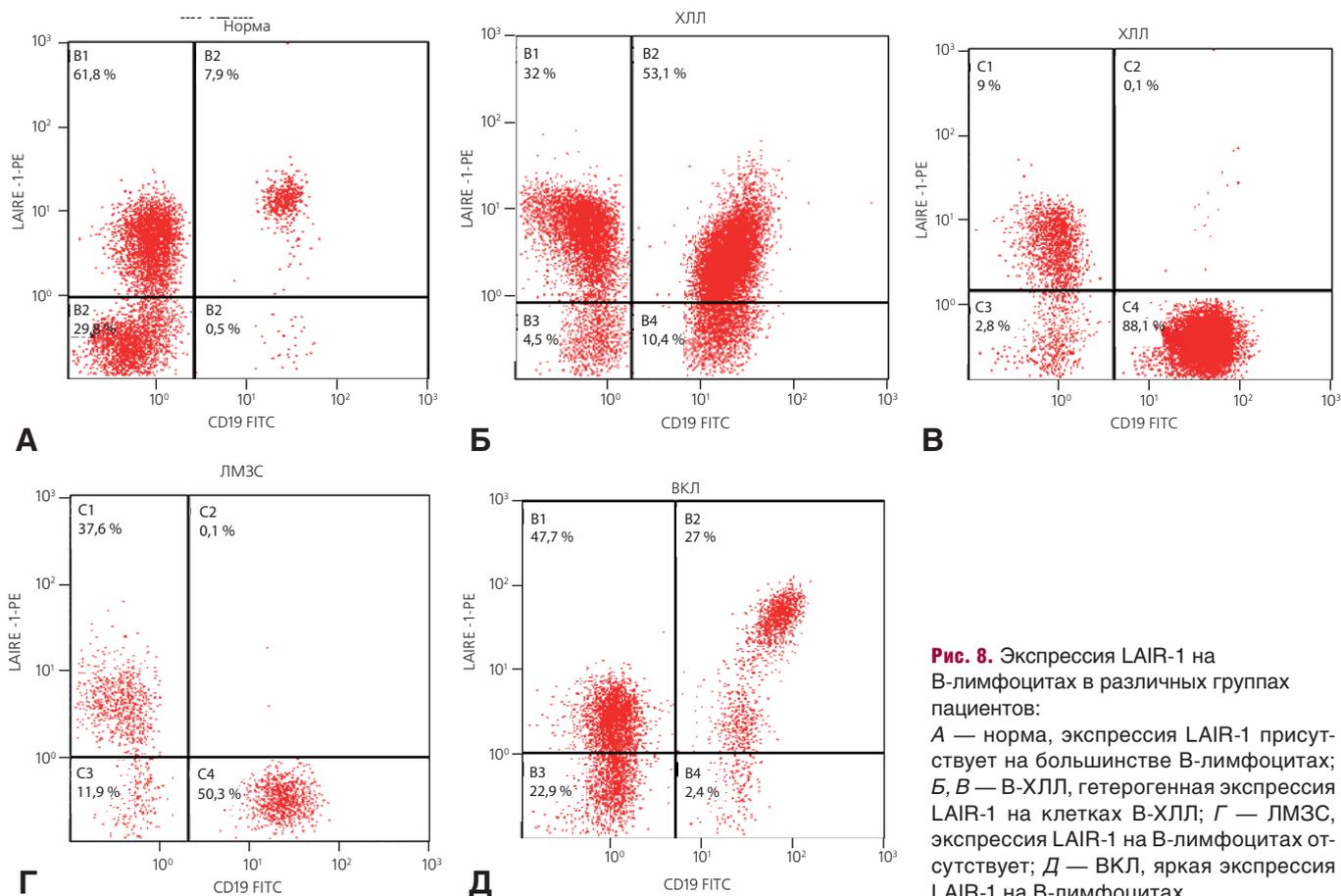
**Рис. 8.** Экспрессия LAIR-1 на В-лимфоцитах в различных группах пациентов: А — норма, экспрессия LAIR-1 присутствует на большинстве В-лимфоцитах; Б, В — В-ХЛЛ, гетерогенная экспрессия LAIR-1 на клетках В-ХЛЛ; Г — ЛМЗС, экспрессия LAIR-1 на В-лимфоцитах отсутствует; Д — ВКЛ, яркая экспрессия LAIR-1 на В-лимфоцитах

Таблица 3. Сравнение значений MFI LAIR-1 в различных группах пациентов

MFI LAIR-1, усл. ед.	Группа контроля, n = 9	ХЛЛ, n = 12	ВКЛ, n = 10	ЛМЗС, n = 7
Медиана	2,6	3,9	44	0,9
Диапазон	2,0–9,0	3,0–11,0	9,8–218	0,8–1,5

2,6 усл. ед., диапазон 2–9 усл. ед.) и пациентами с В-ХЛЛ (медиана 3,9 усл. ед., диапазон 3–11 усл. ед.) (табл. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ И ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диагностическое иммунофенотипирование В-клеточных ЛПЗ требует использования панели моноклональных антител с возможностью обнаружения спектра таргетных антигенов с целью дифференцировать различные варианты В-ЛПЗ. Иммунофенотип опухолевых клеток при многих В-ЛПЗ хорошо изучен, и нередко специфические комбинации антител позволяют дать заключение о конкретном варианте В-клеточной лимфоидной опухоли. Например, клетки В-ХЛЛ отличаются от других В-ЛПЗ комбинацией CD19+, CD5+, CD23+, однако в редких случаях они могут не экспрессировать CD23, что отражает биологическую гетерогенность заболевания. При ЛКЗМ иммунофенотипический профиль опухолевых клеток соответствует CD19+, CD5+, CD23–, однако около 30 % случаев лейкемизации ЛКМЗ описаны с экспрессией антигена CD23. Обнаружение атипичного иммунофенотипа опухолевых клеток затрудняет дифференциально-диагностический алгоритм и диктует поиск новых информативных клеточных маркеров. Одним из таких маркеров является CD160, описанный вначале на НК-клетках и цитотоксических Т-лимфоцитах. Нормальные В-клетки не экспрессируют этот антиген. Усиление регуляции CD160 на субпопуляциях Т-клеток CD3+, CD8+ описано при ВИЧ-инфекции, его экспрессия повышается на эндотелии сосудов при неангиогенезе опухолей, так же как и на клетках CD4+, инфильтрирующих ткани при воспалительных заболеваниях кожи [2].

Аберрантная экспрессия некоторых белков при В-ХЛЛ известна давно и включает пан-Т-клеточный маркер CD5, ZAP-70, участвующий в проведении сигналов с Т-клеточного рецептора, первоначально описанный исключительно в Т- и НК-клетках. Экспрессия ZAP-70 при В-ХЛЛ связана с усилением передачи сигналов от В-клеточного рецептора (BCR), что, в свою очередь, может способствовать более тяжелому клиническому течению заболевания. Впоследствии ZAP-70 был обнаружен не только в опухолевых В-клетках, но и активированных нормальных В-лимфоцитах, клетках памяти и В-лимфоцитах герминативного центра лимфоузлов и периферических В-лимфоцитах [2, 3]. Подобно ZAP-70, экспрессия CD160 клетками В-ХЛЛ является действительно аберрантной, поскольку хорошо изучена на всех этапах нормальной дифференцировки В-лимфоцитов при острых В-линейных лейкозах и В-ЛПЗ. Изучая экспрессию CD160 на В-лимфоцитах крови, лимфоузлов и биоптатов селезенки у 811 больных В-ЛПЗ, показано, что этот маркер универсален только для опухолевых клеток ХЛЛ и ВКЛ [4]. По данным этих авторов, только в 2 % случаев В-ХЛЛ экспрессии CD160 на В-клетках не отмечалось.

В наших исследованиях доля негативных по экспрессии этого маркера случаев была несколько выше

(17 %), что можно объяснить недостаточно большим количеством наблюдений (110 случаев В-ХЛЛ). Экспрессия CD160 отмечалась в 50 % случаев ВКЛ. Учитывая слабый и гетерогенный характер экспрессии CD160, для дополнительной характеристики плотности на мембране клеток этого маркера мы использовали не только процент клеток, экспрессирующих CD160, но и медиану MFI, которая составляла $2,9 \pm 0,9$ и $2,5 \pm 1,2$ усл. ед. при В-ХЛЛ и ВКЛ соответственно. Таким образом, циркулирующие в крови клетки ХЛЛ и ВКЛ имеют значительно более высокую интенсивность экспрессии CD160 по сравнению с нормальными В-клетками ($1,0 \pm 0,05$ усл. ед.). Важно отметить, что экспрессия CD160 на опухолевых клетках ЛКЗМ и ЛМЗС отсутствовала и была эквивалентна нормальным В-лимфоцитам крови, что подтверждается литературными данными. Наличие на мембране опухолевых В-лимфоцитов молекулы CD160, возможно, обеспечивает выживаемость опухолевых клеток В-ХЛЛ и ВКЛ. Взаимодействие CD160 со своими лигандами, которые экспрессируются как опухолевыми В-лимфоцитами, так и другими клетками лимфоидного микроокружения (MHC-I, CD1d, HLA-G), может иметь значение в изучении патофизиологии опухолевых В-клеток, аутокринных, паракринных и/или стромально-клеточных взаимодействий, что открывает новые мишени для терапевтического воздействия [15].

Другая молекула, недавно описанная как ХЛЛ-рестриктированная, — это CD200 [7]. Несмотря на экспрессию этого антигена различными клетками (тимоциты, бластные клетки Т-ОЛЛ, покоящиеся и активированные Т- и В-лимфоциты, фолликулярные дендритные клетки, эндотелий, нейроны), показано, что CD200 постоянно сверхэкспрессируется на клетках В-ХЛЛ, что приводит к снижению иммунного ответа, регулируемого Th1-лимфоцитами. Слабая или негативная экспрессия CD200 на опухолевых В-клетках ЛКЗМ используется как дифференциально-диагностический признак, отличающий В-ХЛЛ от этой лимфомы. Результаты нашего исследования показали, что во всех случаях В-ХЛЛ отмечается яркая гомогенная экспрессия CD200 на всех опухолевых В-лимфоцитах. При ВКЛ экспрессия этого маркера выявлена в 80 % случаев, а при ЛМЗС — в 30 %. Наиболее высокие показатели MFI наблюдались при В-ХЛЛ и ВКЛ, статистически значимо превышая значения MFI CD200 у больных ЛКЗМ и ЛМЗС (см. табл. 2). Сверхэкспрессия CD200 на клетках ВКЛ может играть фундаментальную роль в выживаемости, пролиферации этих клеток, равно как и в ингибции противоопухолевого иммунного ответа. Высокая плотность этого антигена на клетках ВКЛ открывает перспективу использования новой таргетной терапии моноклональными антителами анти-CD200 [15, 16]. Экспрессия CD200 отсутствовала на опухолевых клетках ЛКЗМ. В связи с малым числом наблюдений ЛКЗМ необходимо продолжить исследования экспрессии CD200 при CD5+ ЛПЗ, включая В-ХЛЛ с атипичным фенотипом, с целью дальнейших рекомендаций по включению этого маркера в диагностическую панель.

В связи с рекомендациями EuroFlow для диагностики и дифференциального диагноза ВКЛ в дифференциально-диагностическую панель включен маркер LAIR-1 дополнительно к стандартным маркерам (CD103, CD11c). Изучение экспрессии LAIR-1 показало, что большинство нормальных В-лимфоцитов крови экс-

прессировало мембранный LAIR-1 (70–99,9 %). При В-ХЛЛ отмечался широкий разброс числа позитивных В-лимфоцитов (медиана 42 %, диапазон 0–80 %). Наиболее яркая экспрессия и плотность LAIR-1 отмечалась при ВКЛ (80–100 % позитивных В-клеток), MFI 44 усл. ед. (норма 2,6 усл. ед.), в то время как при ЛМЗС экспрессия этого антигена практически отсутствовала (медиана 0,1 %, диапазон 0–5 %). Трудности диагностики ВКЛ возникают при низком проценте опухолевых клеток в крови и/или костном мозге, отсутствии одного или двух диагностических маркеров (CD11с, CD103 или CD25), что диктует необходимость поиска других дополнительных антигенов. Кроме того, нередко бывают сложности в дифференциальной диагностике ВКЛ и ЛМЗС, т. к. иммунофенотип опухолевых клеток может характеризоваться экспрессией маркеров CD25 или CD11с. Включение в панель нового маркера LAIR-1, возможно, внесет определенную ясность и облегчит интерпретацию результатов иммунофенотипирования. Необходимо продолжить изучение этого маркера с целью как дифференциальной диагностики, так и применения его для мониторинга минимальной остаточной болезни при ВКЛ.

Таким образом, использование многопараметрической проточной цитофлуориметрии и новых маркеров позволяет получить дополнительную информацию об иммунологических особенностях опухолевых клеток, расширить диагностическую панель В-клеточных ЛПЗ и использовать эти данные в дальнейшем мониторинге опухолевой популяции.

КОНФЛИКТЫ ИНТЕРЕСОВ

Авторы подтверждают отсутствие скрытых конфликтов интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon: IARC Press, 2008.
2. Liu F.-T., Qiu Justiniani J., Farren T. et al. CD160 signaling mediates PI3K-dependent survival and growth signals in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2010; 115: 3079–88.
3. Le Bouteiller P., Tabiasco J., Polgar B. et al. CD160: a unique activating NK cell receptor. *Immunol. Lett.* 2011; 138: 93–6.
4. Farren T., Liu F.-T., Stephens C. et al. Inter-Laboratory Assessment of Minimal Residual Disease In Chronic Lymphocytic Leukemia — Evaluation of the Novel CD160FCA Assay. *Blood*, ASH #2723.
5. Farren T., Qiu Justiniani J., Liu F.-T. et al. Differential and tumor-specific expression of CD160 in B-cell malignancies. *Blood* 2011; 118: 2174–83.
6. Brunetti L., DiGiovanna Abate R. et al. CD200/OX2, a cell surface molecule with immuno-regulatory function, is consistently expressed on hairy cell leukaemia neoplastic cells. *Br. J. Haematol.* 2009; 145: 665–7.
7. Gambell P., Cargo C., Nguyen V. et al. CD200 Expression Using Flow Cytometry In B-Cell Lymphoproliferative Disorders. *Int. J. Lab. Hem* 2011; 33(Suppl. 1): 51–2.
8. Sander B. Mantle cell lymphoma: recent insights into pathogenesis, clinical variability, and new diagnostic markers. *Semin. Diagn. Pathol.* 2011; 28: 245–55.
9. Moreaux J., Hose D., Reme T., Jourdan E. CD200 is a new prognostic factor in multiple myeloma. *Blood* 2006; 108: 4194–7.
10. Olteanu H., Harrington A.M., Parameswaran H., Kroft S.H. CD200 expression in plasma cell myeloma. *Br. J. Haematol.* 2011; 153: 402–16.
11. El Desoukey N.A., Afify R.A., Amin D.G., Mohammed R.F. CD200 expression in B-cell chronic lymphoproliferative disorders. *J. Investig. Med.* 2012; 60: 56–61.
12. Harma T., Brondijk C., de Ruiter T. et al. Crystal structure and collagen-binding site of immune inhibitory receptor LAIR-1: unexpected implications for collagen binding by platelet receptor GPVI. *Blood* 2010; 115: 1364–73.
13. Meyaard L. The inhibitory collagen receptor LAIR-1 (CD305). *J. Leuk. Biol.* 2008; 83: 799–803.
14. van der Vuurst de Vries A.-R., Clevers H., Logtenberg T., Meyaard L. Leukocyte-associated immunoglobulin-like receptor-1 (LAIR-1) is differentially expressed during human B cell differentiation and inhibits B cell receptor-mediated signaling. *Eur. J. Immunol.* 1999; 29: 3160–7.
15. Kretz-Rommel A., Bowditch K.S. Rationale for anti-CD200 immunotherapy in B-CLL and other hematologic malignancies: new concepts in blocking immune suppression. *Exp. Opin. Biol. Ther.* 2008; 8: 5–15.
16. Pallasch C.P., Ulbrich S., Brinker R. Disruption of T cell suppression in chronic lymphocytic leukemia by CD200 blockade. *Leuk. Res.* 2009; 33: 460–4.