Клиническая онкогематология. 2019;12(3):243–6

ОНКО клиническая ГЕМАТОЛОГИЯ

ЛИМФОИДНЫЕ ОПУХОЛИ

Клиническое наблюдение волосатоклеточного лейкоза и лимфоплазмоцитарной лимфомы, установленных одновременно методом клеточного биочипа

А.Н. Хвастунова[1,2], Л.С. Аль-Ради[3], О.С. Федянина[1,2], С.А. Луговская[4], С.А. Кузнецова[1,2]

[1] ФГБУ «НМИЦ детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, ул. Саморы Машела, д. 1, Москва, Российская Федерация, 117997

[2] ФГБУН «Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН», ул. Косыгина, д. 4, Москва, Российская Федерация, 119991

[3] ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, Новый Зыковский пр-д, д. 4а, Москва, Российская Федерация, 125167

[4] ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России, ул. Баррикадная, д. 2/1, Москва, Российская Федерация, 125993

РЕФЕРАТ

В работе представлено клиническое наблюдение сочетания волосатоклеточного лейкоза и лимфоплазмоцитарной лимфомы с секрецией PIgMк. С помощью клеточного биочипа, позволяющего одновременно исследовать иммунофенотип и проводить морфологический и цитохимический анализы лейкоцитов, в периферической крови у пациента с лейкопенией были обнаружены малые популяции ворсинчатых (3 % от общего числа лимфоцитов) и плазматических клеток (2 %), включая клетки Мотта (0,2 %). Результаты, полученные методом клеточного биочипа, способствовали быстрому установлению предварительного диагноза, который затем был подтвержден стандартными методами диагностики.

Ключевые слова: клеточный биочип, волосатоклеточный лейкоз, лимфоплазмоцитарная лимфома, ворсинчатые клетки, плазматические клетки, клетки Мотта.

Получено: 12 ноября 2018 г.
Принято в печать: 2 мая 2019 г.

Для переписки: Алина Николаевна Хвастунова, канд. биол. наук, ул. Саморы Машела, д. 1, Москва, Российская Федерация, 117997; тел.: +7(495)287-65-70; e-mail: alina_shunina@mail.ru

Клиническая онкогематология. 2019;12(3):243–6

ONCO clinical HEMATOLOGY

LYMPHOID TUMORS

A Case of Hairy Cell Leukemia Diagnosed Simultaneously with Lymphoplasmacytic Lymphoma by Anti-CD Antibody Microarray Method

AN Khvastunova[1,2], LS Al-Radi[3], OS Fedyanina[1,2], SA Lugovskaya[4], SA Kuznetsova[1,2]

[1] Dmitry Rogachev National Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, 1 Samory Mashela str., Moscow, Russian Federation, 117997

[2] Center for Theoretical Problems of Physicochemical Pharmacology, 4 Kosygina str., Moscow, Russian Federation, 119991

[3] National Medical Hematology Research Center, 4a Novyi Zykovskii pr-d, Moscow, Russian Federation, 125167

[4] Russian Medical Academy of Postgraduate Education, 2/1 Barrikadnaya str., Moscow, Russian Federation, 1125993

ABSTRACT

The paper deals with a combined case of hairy cell leukemia and lymphoplasmacytic lymphoma with IgMκ paraprotein secretion. The use of anti-CD antibody microarray enabled the simultaneous assessment of immunophenotype as well as morphological and cytochemical analysis. Small populations of hairy (3 % of total lymphocyte count) and plasma (2 %) cells including Mott cells (0.2 %) were found in the peripheral blood of a patient with leukopenia. The results obtained by the anti-CD antibody microarray method speeded up provisional diagnosis which was later confirmed by standard diagnostic methods.

Keywords: anti-CD antibody microarray, hairy cell leukemia, lymphoplasmacytic lymphoma, hairy cells, plasma cells, Mott cells.

Received: November 12, 2018
Accepted: May 2, 2019

For correspondence: Alina Nikolaevna Khvastunova, PhD in Biology, 1 Samory Mashela str., Moscow, Russian Federation, 117997; Tel.: +7(495)287-65-70; e-mail: alina_shunina@mail.ru

© 2019 практическая медицина

Для цитирования: Хвастунова А.Н., Аль-Ради Л.С., Федянина О.С. и др. Клиническое наблюдение волосатоклеточного лейкоза и лимфоплазмоцитарной лимфомы, установленных одновременно методом клеточного биочипа. Клиническая онкогематология. 2019;12(3):243–6.

doi: 10.21320/2500-2139-2019-12-3-243-246

For citation: Khvastunova AN, Al-Radi LS, Fedyanina OS, et al. A Case of Hairy Cell Leukemia Diagnosed Simultaneously with Lymphoplasmacytic Lymphoma by Anti-CD Antibody Microarray Method. Clinical oncohematology. 2019;12(3):243-6 (In Russ).

doi: 10.21320/2500-2139-2019-12-3-243-246

ВВЕДЕНИЕ

Основные трудности морфологической диагностики волосатоклеточного лейкоза (ВКЛ) заключаются в лейкопении, из-за которой в крови пациента присутствует очень незначительное количество опухолевых клеток (ворсинчатых лимфоцитов). Ранее мы показали, что использование клеточного биочипа, прозрачной пластиковой подложки с иммобилизованными моноклональными антителами к антигенам лейкоцитов, позволяет рассортировать выделенные в градиенте плотности лейкоциты крови по их поверхностным антигенам для последующего морфологического и цитохимического исследований связавшихся клеток. С помощью этого метода можно проводить морфологическую диагностику ВКЛ и обнаруживать ворсинчатые лимфоциты даже в тех случаях, когда опухолевая популяция составляет 0,1 % от общего числа лимфоцитов [1–3]. Кроме того, клеточный биочип может быть использован для исследования иммунофенотипа клеток с характерной морфологией, в т. ч. ворсинчатых, двуядерных и плазматических клеток, включая клетки Мотта и др. [1–3].

Морфологически ворсинчатые клетки представляют собой лимфоциты среднего или крупного размера, имеющие широкую бледную цитоплазму с характерными ворсинками с изрезанным или фестончатым краем [4]. Могут встречаться клетки с умеренно базофильной цитоплазмой и тонкими короткими выростами, часто локализованные только на одном из полюсов клетки [5]. Наличие лимфоцитов с выростами цитоплазмы свойственно ВКЛ, вариантной форме ВКЛ, лимфоме из клеток маргинальной зоны селезенки (ЛКМЗС) и диффузной В-мелкоклеточной лимфоме из клеток красной пульпы селезенки [4–9].

Клетки Мотта — плазматические клетки, которые заполнены тельцами Рассела. Тельца Рассела — оксифильные внутриклеточные белковые агрегаты. Впервые данные клетки были описаны Ф. Моттом (F. Mott) в 1905 г. [10] и названы в его честь. В последующих исследованиях выявили, что этот тип плазматических клеток содержит в основном иммуноглобулины класса М (IgM) [11, 12]. Морфологические характеристики клеток Мотта могут различаться в зависимости от размера и количества телец Рассела [13]. Клетки Мотта встречаются при лимфопролиферативных заболеваниях, таких как множественная миелома, В-клеточные лимфомы, а также при тиреоидите Хасимото, ревматоидном артрите и язвенном колите [14–16]. В литературе тельца Рассела и клетки Мотта подробно описаны при экстранодальных лимфомах из клеток маргинальной зоны, например при MALT-лимфоме желудка. У.Л. Джулакян и соавт. [17] представили единичный случай ЛКМЗС, морфологически состоящей из пластов клеток Мотта (второй случай опухоли из клеток Мотта, описанный в России).

В данной статье представлено клиническое наблюдение, когда, несмотря на лейкопению, в крови пациента с помощью клеточного биочипа были обнаружены популяции ворсинчатых и плазматических клеток, в т. ч. клетки Мотта.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Изготовление клеточного биочипа подробно описано в нашей работе [1]. В панель биочипа входили антитела к следующим поверхностным антигенам лейкоцитов: CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD10, CD11c, CD13, CD14, CD15, CD16, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD25, CD33, CD38, CD41, CD43, CD45, CD45RA, CD45R0, CD56, CD85j, CD103, CD123, CD200, CD235a, HLA-DR, IgM, κ- и λ-легким цепям иммуноглобулина, а также смесь мышиных IgG. На рис. 1, *А* представлена схема расположения антител на биочипе, где цифрами обозначены номера CD-антигенов, антитела к которым иммобилизованы на подложке в соответствующей области. Суспензия мононуклеарных клеток, выделенная из крови путем центрифугирования в градиенте плотности Histopaque-1077, исследовалась в соответствии с протоколом, описанным ранее в наших работах [2, 9]. Два биочипа инкубировали с суспензией мононуклеарных клеток крови пациента (5×10^6 клеток/мл в PBS с 1 % BSA и 20 % эмбриональной телячьей сыворотки) без перемешивания в течение 30 мин при температуре 4 °C, затем отмывали от неспецифически связавшихся клеток и высушивали. После этого один биочип окрашивали по Паппенгейму для последующего морфологического анализа (рис. 1, *Б*), на втором — исследовали активность тартрат-резистентной кислой фосфатазы по методу Гольдберга—Барки с добавлением тартрата натрия [2].

КЛИНИЧЕСКОЕ НАБЛЮДЕНИЕ

У больного А., 60 лет, во время лечения пневмонии выявлена панцитопения: гемоглобин — 100 г/л, эритроциты — 3×10^{12}/л, тромбоциты — 90×10^9/л, лейкоциты — 2×10^9/л, лимфоциты — 76 %. При обследовании обнаружили незначительную спленомегалию, размер которой по данным УЗИ составлял 125 × 65 × 68 мм, и умеренную лимфаденопатию с увеличением внутригрудных лимфатических узлов до 16 мм, надключичных — до 14 мм.

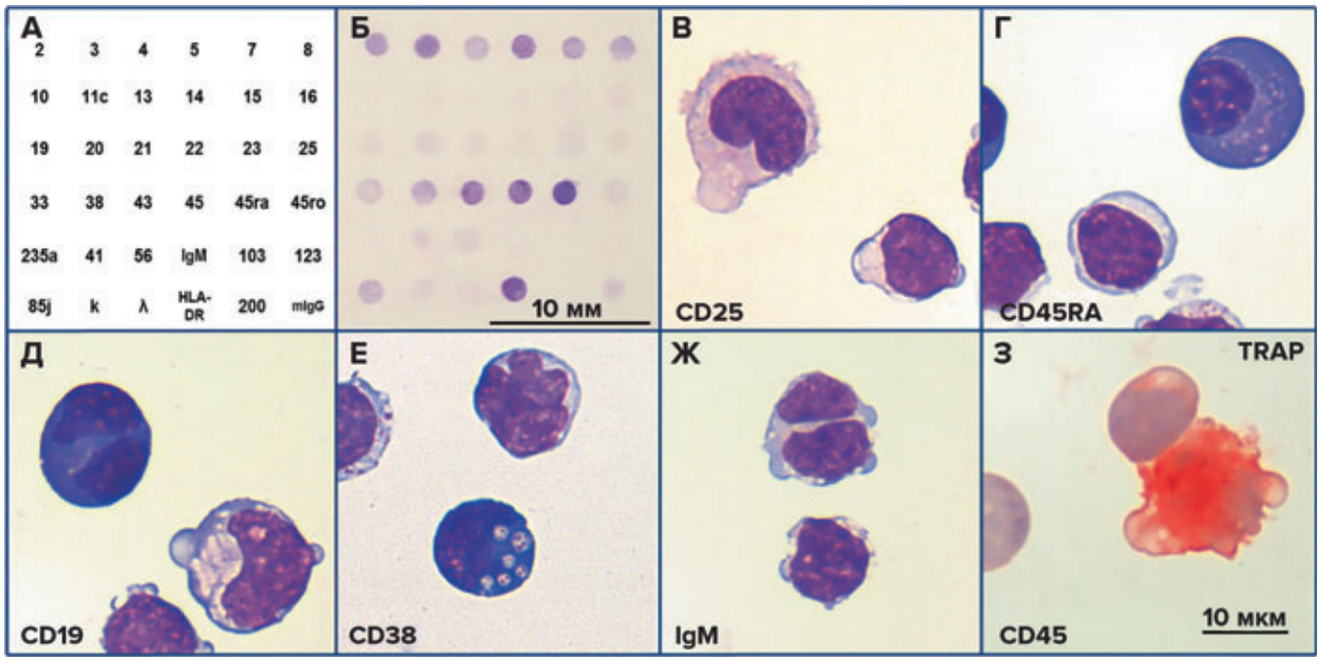

Рис. 1. Результаты исследования крови пациента с помощью клеточного биочипа:
А — схема расположения пятен антител на биочипе; *Б* — биочип со связавшимися мононуклеарами крови пациента, окраска по Паппенгейму; *В–Ж* — морфология лимфоцитов крови пациента, связавшихся в пятнах биочипа, окраска по Паппенгейму, ×1000; *В* — ворсинчатая клетка в пятне анти-CD25-антитела (слева); *Г* — плазматическая клетка в пятне анти-CD45RA-антитела (справа); *Д* — двуядерная плазматическая клетка в пятне анти-CD19-антитела (вверху); *Е* — клетка Мотта в пятне анти-CD38-антитела (внизу); *Ж* — двуядерный лимфоцит в пятне IgM (вверху); *З* — ворсинчатая клетка, положительная по TRAP (внизу), окраска гематоксилином Майера, ×1000

Fig. 1. The results of blood analysis using anti-CD antibody microarray method:
A — layout of antibodies spotted on microarray; *Б* — microarray with bound mononuclear cells of patient's blood, Pappenheim stain; *B–Ж* — morphology of lymphocytes bound on microarray spots, Pappenheim stain, ×1000; *B* — a hairy cell captured by anti-CD25 spot (on the left); *Г* — a plasma cell captured by anti-CD45RA spot (on the right); *Д* — a binuclear plasma cell captured by anti-CD19 spot (at the top); *E* — a Mott cell captured by anti-CD38 spot (at the bottom); *Ж* — a binuclear lymphocyte captured by IgM spot (at the top); *З* — a hairy cell, TRAP positive (at the bottom), Mayer hematoxylin stain, ×1000

Лимфоциты крови пациента были исследованы с помощью клеточного биочипа. Субпопуляционный состав лимфоцитов был в пределах нормы, определенной нами для биочипа [1]: CD3 — 76 %, CD4 — 47 %, CD8 — 29 %, CD16+CD56+ — 9 %, CD19 — 15 %, CD20 — 15 %. Наблюдалось повышенное число связавшихся клеток на антителах к опухолеспецифическим маркерам: CD11c — 7 %, CD103 — 5 %, CD123 — 5 %. При морфологическом исследовании были обнаружены ворсинчатые лимфоциты (рис. 1, *В*) с иммунофенотипом CD19+CD20+CD22+CD103+CD25+CD11c+CD123+CD200+HLA-DR+κ+CD10–CD5–CD23–, которые составляли 3 % от общего числа лимфоцитов. Реакция TRAP была резко положительной в 3 % лимфоцитов и выявлялась в виде гранул ярко-красного цвета в цитоплазме клетки (рис. 1, *З*). Таким образом, была выявлена моноклональная популяция В-лимфоцитов, соответствующая ВКЛ.

Помимо этого были обнаружены плазмоцитоидные клетки (рис. 1, *Г*) — популяция плазматических клеток малого размера с аберрантным иммунофенотипом CD38+CD45RA+CD19+CD56+/–, которая составляла 2 % всех лимфоцитов в формуле крови. Среди них присутствовали двуядерные плазматические клетки (рис. 1, *Д*), клетки Мотта с тельцами Рассела (рис. 1, *Е*) (0,2 % всех лимфоцитов). Таким образом, по данным исследования методом клеточного биочипа пациенту был установлен предварительный диагноз ВКЛ и одновременно выявлены минимальные признаки второго зрелоклеточного лимфоплазмоцитарного заболевания.

Кроме того, среди В-лимфоцитов были найдены двуядерные клетки (рис. 1, *Ж*) с фенотипом CD19+CD20+CD22+IgM+HLA-DR+CD45RA+κ+/–λ+/– в количестве 6 % от всех В-клеток и 0,5 % всех лимфоцитов. Данные двуядерные формы обнаруживались как среди В-лимфоцитов с экспрессией легких цепей κ, так и λ и, следовательно, не могут рассматриваться как показатель клональности. Двуядерные лимфоидные клетки неопухолевой природы могут появиться в крови в ответ на опухоль или вирусы [4]. В литературе описаны случаи, когда двуядерные лимфоциты с данным иммунофенотипом встречались при персистентном поликлональном В-клеточном лимфоцитозе [18].

При последнем иммунофенотипическом исследовании лимфоцитов крови методом проточной цитометрии была выявлена моноклональная популяция В-лимфоцитов с фенотипом CD19k+CD20+CD103+CD25+CD11c+LAIR-1+. Диагноз ВКЛ был подтвержден выявлением гетерозиготной мутации BRAF, приводящей к аминокислотной замене V600E и лимфоидной пролиферации, морфологически типичной для ВКЛ, в трепанобиоптате и миелограмме (75 %).

Дополнительно при иммунофенотипировании лимфоцитов костного мозга выявлена популяция плаз-

матических клеток с аберрантным иммунофенотипом CD138+CD38+CD45^{low}CD19–CD56+/–CD117–CD28–. Иммунохимическое исследование белков сыворотки показало моноклональную секрецию парапротеина IgMκ (5,7 г/л). В миелограмме также обнаружено умеренное увеличение плазматических клеток — 4,5 %.

На основании перечисленных выше данных пациенту был установлен диагноз ВКЛ и лимфоплазмоцитарной лимфомы с секрецией PIgMκ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Клеточный биочип представляет собой чрезвычайно удобный инструмент для быстрой постановки предварительного диагноза. При этом используется только одна пробирка крови, а высокая поверхностная концентрация клеток на биочипе позволяет обнаружить редко встречающиеся опухолевые клетки даже при лейкопении. Биочип может использоваться для разработки новых методов диагностики онкогематологических заболеваний. Это особенно важно в ситуациях, когда для установления диагноза необходимо определить иммунофенотип клеток конкретной морфологии, при нетипичной морфологии и аберрантном иммунофенотипе, а также для диагностики случаев с сочетанием двух онкогематологических заболеваний.

КОНФЛИКТЫ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана грантом Российского фонда фундаментальных исследований № 18-015-00272 и стипендией президента СП-1929.2016.4.

ВКЛАД АВТОРОВ

Концепция и дизайн: все авторы.
Сбор и обработка данных: все авторы.
Предоставление материалов исследования: все авторы.
Анализ и интерпретация данных: все авторы.
Подготовка рукописи: все авторы.
Окончательное одобрение рукописи: все авторы.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы признательны д-ру биол. наук А.Б. Сударикову (ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России) за предоставленные данные по наличию мутации BRAF V600E в опухолевых клетках пациента.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Khvastunova AN, Kuznetsova SA, Al-Radi LS, et al. Anti-CD antibody microarray for human leukocyte morphology examination allows analyzing rare cell populations and suggesting preliminary diagnosis in leukemia. Sci Rep. 2015;5(1):12573. doi: 10.1038/srep12573.

2. Хвастунова А.Н., Аль-Ради Л.С., Капранов Н.М. и др. Использование клеточного биочипа в диагностике волосатоклеточного лейкоза. Онкогематология. 2015;10(1):37–45. doi: 10.17650/1818-8346-2015-1-37-45.

[Khvastunova AN, Al-Radi LS, Kapranov NM, et al. Cell-binding microarray application in diagnosis of hairy cell leukemia. Oncohematology. 2015;10(1):37–45. doi: 10.17650/1818-8346-2015-1-37-45. (In Russ)]

3. Khvastunova AN, Al-Radi LS, Fedyanina OS, Kuznetsova SA. Simultaneous finding of chronic lymphocytic leukemia and residual hairy cell leukemia using a lymphocyte-binding anti-CD antibody microarray. Clin Case Rep. 2018;6(4):753–5. doi: 10.1002/ccr3.1416.

4. Bain BJ. Leukemia Diagnosis. 4th edition. Singapore: Blackwell Publishing; 2010. doi: 10.1002/9781444318470.

5. Луговская С.А., Почтарь М.Е. Гематологический атлас. М. – Тверь: Триада, 2011. 368 с.

[Lugovskaya SA, Pochtar ME. Gematologicheskii atlas. (Hematology atlas.) Moscow – Tver: Triada Publ.; 2011. 368 p. (In Russ)]

6. Shao H, Calvo KR, Gronborg M, et al. Distinguishing hairy cell leukemia variant from hairy cell leukemia: Development and validation of diagnostic criteria. Leuk Res. 2013;37(4):401–9. doi: 10.1016/j.leukres.2012.11.021.

7. Robak T. Hairy-cell leukemia variant: recent view on diagnosis, biology and treatment. Cancer Treat Rev. 2011;37(1):3–10. doi: 10.1016/j.ctrv.2010.05.003.

8. Traverse-Glehen A, Baseggio L, Callet-Bauchu E, et al. Splenic red pulp lymphoma with numerous basophilic villous lymphocytes: a distinct clinicopathologic and molecular entity? Blood. 2008;111(4):2253–60. doi: 10.1182/blood-2007-07-098848.

9. Хвастунова А.Н., Аль-Ради Л.С., Федянина О.С. и др. Особенности морфологии и иммунофенотипа опухолевых клеток лимфомы из клеток маргинальной зоны селезенки (исследование с помощью клеточного биочипа). Онкогематология. 2017;12(1):71–7. doi: 10.17650/1818-8346-2017-12-1-71-77.

[Khvastunova AN, Al-Radi LS, Fedyanina OS, et al. Determination of morphology and immunophenotype of circulating lymphoma cells in patients with splenic marginal zone lymphoma using an anti-CD antibody microarray. Oncohematology. 2017;12(1):71–7. doi: 10.17650/1818-8346-2017-12-1-71-77. (In Russ)]

10. Mott F. Observations on the brains of men and animals infected with various forms of trypanosomes. Preliminary note. Proc Royal Soc London B. 1905;76(509):235–42. doi: 10.1098/rspb.1905.0016.

11. Jacob H, Lutcke A. Subakute sklerosierende leukoencephalitis unter dem initialbild einer akuten epidemischen encephalitis (akute parkinsonistische encephalitis) mit ausgepragter entwicklung von Maulbeerzellen und Russell-Korperchen. J Neurol Sci. 1971;12(2):137–53. doi: 10.1016/0022-510X(71)90045-1.

12. Greenwood BM, Whittle HC. Cerebrospinal fluid IgM in patients with sleeping sickness. Lancet. 1973;302(7828):525–7. doi: 10.1016/s0140-6736(73)92348-9.

13. Alanen A, Pira U, Lassila O, et al. Mott cells are plasma cells defective in immunoglobulin secretion. Eur J Immunol. 1985;15(3):235–42. doi: 10.1002/eji.1830150306.

14. Posnett DN, Mouradian J, Mangraviti DJ, Wolf DJ. Mott cells in a patient with a lymphoproliferative disorder. Differentiation of a clone of B lymphocytes into Mott cells. Am J Med. 1984;77(1):125–30. doi: 10.1016/0002-9343(84)90446-7.

15. El-Okda M, Hyeh Y, Xie SS, Hsu SM. Russell bodies consist of heterogeneous glycoproteins in B-cell lymphoma cells. Am J Clin Pathol. 1992;97(6):866–71. doi: 10.1093/ajcp/97.6.866.

16. Kurihara K, Sakai H, Hashimoto N. Russell body-like inclusions in oral B-lymphomas. J Oral Pathol.1984;13(6):640–9. doi: 10.1111/j.1600-0714.1984.tb01466.x.

17. Джулакян У.Л., Двирнык В.Н., Менделеева Л.П. Селезеночная В-клеточная лимфома из клеток маргинальной зоны с выраженной плазмоклеточной дифференцировкой: вариант опухоли из клеток Мотта? Онкогематология. 2015;10(4):34–7. doi: 10.17650/1818-8346-2015-10-4-34-37.

[Dzhulakyan UL, Dvirnyk VN, Mendeleeva LP. Splenic B-cell marginal zone lymphoma with marked plasmocytic differentiation: tumor variant from Mott cells? Oncohematology. 2015;10(4):34–7. doi: 10.17650/1818-8346-2015-10-4-34-37. (In Russ)]

18. Mossafa H, Malaure H, Maynadie M, et al. Persistent polyclonal B lymphocytosis with binucleated lymphocytes: a study of 25 cases. Br J Haematol. 1999;104(3):486–93. doi: 10.1046/j.1365-2141.1999.01200.x.