

**Determination of B-cell clonality
in Hodgkin's lymphoma**

*Yu.V. Sidorova, N.V. Ryzhikova, S.Yu. Smirnova,
Ye.Ye. Nikulina, B.V. Biderman, A.M. Kovrigina,
T.N. Moiseyeva, N.N. Sharkunov, and A.B. Sudarikov*

ABSTRACT

B-cell origin of Hodgkin's lymphoma was demonstrated using microdissection and single cell PCR of Reed-Sternberg and Hodgkin cells (R. Kuppers et al., 1994). We assessed B-cell clonality in the biopsy samples of 35 patients with Hodgkin's lymphoma without microdissection. B-cell clonality was evaluated using PCR amplification by IGH (FR1, FR2, FR3) and IGK (V_κ-J_κ, V_κ/intron-Kde) gene rearrangements with multiplex BIOMED-2 primer sets and subsequent fragment analysis using ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Clonality was found in 11 out of 35 (31.5%) formalin fixed paraffin-embedded (FFPE) lymph node specimens from patients with Hodgkin's lymphoma. In 11 cases when both FFPE and fresh frozen samples were available, we observed the similar results with the specimens of both types. No correlation was found between the presence of B-cell clones and age, histological type of Hodgkin lymphoma, type of tumor cell growth (syncytial or diffuse), number of eosinophils in tissues, or CD20/CD15 expression on the surface of tumor cells. The high incidence of B-cell clonality determined in Hodgkin's lymphoma biopsy samples makes the B-cell clonality assay unsuitable for differential diagnosis between Hodgkin's lymphoma and B-cell lymphomas.

Keywords: Hodgkin's lymphoma, B-cell clonality, PCR, immunoglobulin gene rearrangements.

Accepted December 14, 2013

Hematology Research Center, Moscow
125167, Novyy Zыkovskiy pr., d. 4a, Moscow, Russian Federation

Yu.V. Sidorova, PhD, Chief scientific worker, Laboratory of molecular hematology

N.V. Ryzhikova, Scientific worker, Laboratory of molecular hematology

S.Yu. Smirnova, Scientific worker, Laboratory of molecular hematology

Ye.Ye. Nikulina, Scientific worker, Laboratory of molecular hematology

B.V. Biderman, PhD, Chief scientific worker, Laboratory of molecular hematology

A.M. Kovrigina, DSci, Head of pathology department

T.N. Moiseyeva, PhD, Chief scientific worker, Department of chemotherapy for hematological disorders and intensive care

N.N. Sharkunov, Postgraduate student, Department of chemotherapy for hematological disorders and intensive care

A.B. Sudarikov, DSci, Head of Laboratory of molecular hematology

Correspondence should be sent to Yu.V. Sidorova

125167, Novyy Zыkovskiy pr., d. 4a, Moscow, Russian Federation
Tel.: +7 (495) 6126511, e-mail: iouliavl@rambler.ru

**Определение В-клеточной клональности
при лимфоме Ходжкина**

*Ю.В. Сидорова, Н.В. Рыжикова, С.Ю. Смирнова, Е.Е. Никулина,
Б.В. Бидерман, А.М. Ковригина, Т.Н. Моисеева,
Н.Н. Шаркунов, А.Б. Судариков*

РЕФЕРАТ

В работах R. Kuppers (1994) с помощью микродиссекции и ПЦР-исследования клональности клеток Березовского—Рид—Штернберга и Ходжкина была доказана В-клеточная природа лимфомы Ходжкина. Мы исследовали материал биопсии 35 пациентов с установленным диагнозом лимфомы Ходжкина без применения микродиссекции. В-клеточная клональность оценивалась по реаранжировкам генов IGH (FR1, FR2, FR3) и IGK (V_κ-J_κ, V_κ/intron-Kde). В работе использовался метод ПЦР с мультиплексными системами праймеров BIOMED-2 и последующий фрагментный анализ на генетическом анализаторе ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems). Клональность была обнаружена у 11 (31,5%) из 35 пациентов в парафиновом материале биоптатов лимфатических узлов. В 11 случаях при исследовании материала парафиновых блоков и свежезамороженного наблюдалось совпадение результатов. Не было найдено корреляции между выявлением клональности и возрастом, гистологическим вариантом лимфомы Ходжкина, характером роста опухолевых клеток (синцитиальный или рассеянный), количеством эозинофилов в тканях, экспрессией CD20 и CD15 на поверхности опухолевых клеток. Высокий уровень выявления В-клеточной клональности в материале биопсии не позволяет использовать данный метод для дифференциальной диагностики лимфомы Ходжкина и В-клеточных лимфом.

Ключевые слова:

лимфома Ходжкина, В-клеточная клональность, ПЦР, реаранжировка генов иммуноглобулинов.

Принято в печать: 14 декабря 2013 г.

ВВЕДЕНИЕ

Лимфома Ходжкина — лимфоидная опухоль, при которой немногочисленные многоядерные опухолевые клетки Березовского—Рид—Штернберга (БРШ) и сходные одноядерные клетки Ходжкина (Х) расположены среди преобладающего реактивного компонента. Согласно классификации ВОЗ, лимфома Ходжкина подразделяется на два основных типа: классическая лимфома Ходжкина (95%) и нодулярный тип лимфоидного преобладания (5%). Среди классической лимфомы Ходжкина выделяют следующие варианты: нодулярный склероз I и II типов (до

70%), смешанно-клеточный вариант (20–25%), вариант с истощением лимфоидной ткани (1–5%), вариант с большим количеством лимфоцитов (5%) [1–3]. Реактивное окружение при лимфоме Ходжкина представлено малыми Т- и В-лимфоцитами, плазматическими клетками, эозинофильными и нейтрофильными лейкоцитами, гистиоцитами, фибробластами и прочими клеточными элементами в различных соотношениях. Ранние иммунофенотипические исследования БРШ/Х-клеток предполагали их нелимфоидную природу (макрофагальную, гранулоцитарную и т. д.). Однако с помощью микродиссекции БРШ/Х-клеток из срезов

парафиновых блоков и ПЦР-исследования (полимеразная цепная реакция) генов иммуноглобулинов была доказана В-клеточная природа данной опухоли [4]. Показано, что в большинстве случаев (75–80 %) классической лимфомы Ходжкина реаранжировки генов IgVH или IgVL κ в клетках БРШ/Х имели функциональный характер. У 60 % пациентов одновременно обнаруживались функциональные реаранжировки IgVH и IgVL κ , однако иммуноглобулин не экспрессировался на их поверхности, предположительно из-за дефектов транскрипции [5–9]. В 20–25 % случаев классической лимфомы Ходжкина, в основном это вирус Эпштейна—Барр (EBV)-ассоциированные случаи, реаранжировки IgVH имели мутации, приводящие к появлению стоп-кодонов [10, 11].

Современные методы ПЦР позволяют выявить клональность по реаранжировкам генов IgVH, IgVL κ в тканях без микродиссекции с частотой 24–49 % в парафиновых блоках [12–16] и до 79 % в замороженных тканях [17]. Цель настоящего исследования — подтвердить высокую частоту обнаружения В-клеточной клональности в материале биопсии при лимфоме Ходжкина, изучить связь данного феномена с возрастом, гистологическим вариантом опухоли, характером роста и количеством опухолевых клеток, степенью эозинофильной инфильтрации, экспрессией на опухолевых клетках маркеров CD20, CD15 и CD30.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Пациенты и образцы

В исследование включено 35 пациентов (14 мужчин и 21 женщина) в возрасте 20–65 лет (медиана 32 года), которым с июня 2012 г. по ноябрь 2012 г. по данным гистологического и иммуногистохимического исследований материала биопсии был поставлен диагноз лимфомы Ходжкина (неселектированная выборка). Гистологические и иммуногистохимические исследования выполнялись в отделении патологической анатомии ФГБУ «Гематологический научный центр» МЗ РФ под руководством д-ра биол. наук А.М. Ковригиной, молекулярно-генетические исследования клональности — в лаборатории молекулярной гематологии ФГБУ «Гематологический научный центр» МЗ РФ под руководством д-ра биол. наук А.Б. Сударикова.

Клинико-морфологические данные пациентов суммированы в табл. 1. Всего было исследовано 35 образцов срезов парафиновых блоков лимфатических узлов. У 11 пациентов был одновременно исследован свежий материал и материал парафинового блока.

Иммуногистохимическое исследование

Иммуногистохимическое исследование было проведено у 21 пациента. Для этого использовалась панель антител, приведенная в табл. 2. Ни в одном случае не было выявлено ассоциации с EBV. Во всех наблюдениях

Таблица 1. Краткая характеристика пациентов

Возраст, лет	20–65 (34)	
Пол (М/Ж)	14/21	
Гистологический тип	Нодулярный склероз I типа (из них 2 рецидива)	<i>n</i> = 18
	Нодулярный склероз II типа	<i>n</i> = 14
	Вариант с большим количеством лимфоцитов	<i>n</i> = 1
	Нодулярное лимфоидное преобладание	<i>n</i> = 2

Таблица 2. Панель моно- и поликлональных антител, использованных для иммуногистохимического исследования

Антитело, клон	Фирма-производитель
CD3, клон F7.2.38	Dako
CD15, клон C3D-1	Leu M1, Dako
CD20, клон L26	Dako
CD30, клон BerH2	Dako
EBV, LMP, клон CS1–4	Dako
BCL-6, клон PG-B6p	Dako
PAX-5	Dako

опухолевые клетки экспрессировали маркер CD30, за исключением 2 случаев нодулярного лимфоидного преобладания со слабой экспрессией CD30. Экспрессия CD15 варьировала. Антиген CD20 на клетках БРШ/Х обнаруживался у 8 пациентов: у 5 — интенсивная мембранная реакция, включая 3 случая нодулярного лимфоидного преобладания; у 3 — гетерогенная (слабая) мембранная экспрессия.

Выделение ДНК из тканей

Для выделения ДНК из ткани, залитой в парафиновый блок, брали 5 срезов по 5 мкм и помещали в пробирки Eppendorf. Ткань депарафинизировали методом нагревания [18–19]. Для выделения ДНК из свежемороженой ткани последнюю размораживали и вырезали кусочек 1 × 1 × 1 мм. ДНК выделяли методом, основанным на растворении ткани в концентрированном аммиаке и последующем осаждении белков ледяной уксусной кислотой [20]. Концентрацию ДНК определяли на UV-спектрофотометре. Образцы ДНК хранили при температуре –20 °С.

Определение В-клеточной клональности методом ПЦР

Для оценки В-клеточной клональности использовали мультиплексные системы праймеров BIOMED-2 concerted action VMH4-CT98-3936 для фрагментного анализа [21]. В-клеточную клональность оценивали по перестройкам V-D-J генов тяжелых цепей иммуноглобулинов IgVH (FR1, FR2, FR3) и легких цепей иммуноглобулинов IgVL κ (V κ -J κ , V κ /intron-Kde); описание реакций приведено в табл. 3. ПЦР проводили на автоматическом термоциклере DNA Engine (BioRad, Hercules, США). Реакционная смесь в конечном объеме 20 мкл включала 100 нг ДНК, 10 мкл смеси 2X для ПЦР (PCR Master Mix Promega), 5 пмоль каждого праймера. Условия ПЦР: предварительная денатурация при температуре 95 °С (5 мин), 35 циклов ПЦР — 92 °С (35 с), 60 °С (35 с), 72 °С (35 с), окончательная пролонгация — 72 °С (10 мин).

Для фрагментного анализа ПЦР-продуктов использовали автоматический анализатор нуклеиновых кислот ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США).

Таблица 3. BIOMED-2 ПЦР-реакции для определения клональности

Реакция	ПЦР-реакция	Диапазон длины амплификатов, пары оснований
A	IGH FR1	310–360
B	IGH FR2	250–295
C	IGH FR3	100–170
D	IGK (V κ -J κ)	120–300
E	IGK (V κ /intron-Kde)	210–390

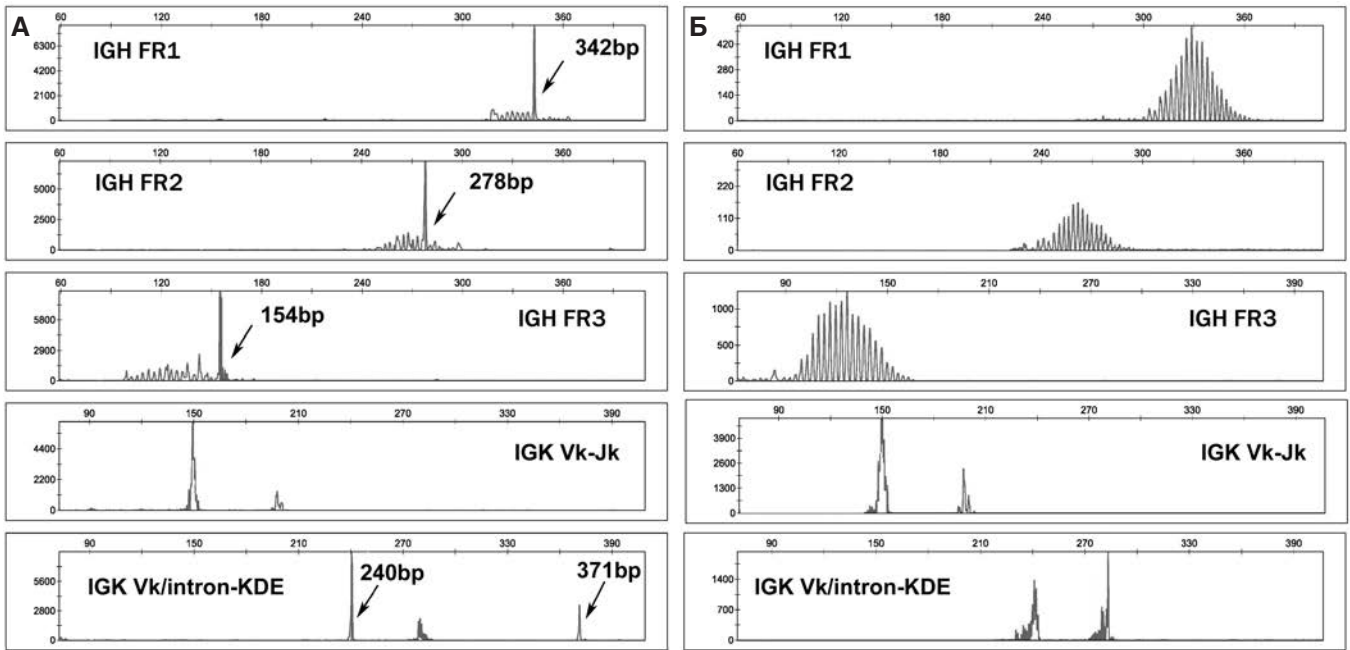


Рис. 1. Моноклональность (А) и поликлональность (Б) по генам IgVH и IgVLκ в материале биопсии лимфатического узла

Для этого 2 мкл разведенного в 20 раз ПЦР-продукта смешивали с 10 мкл формамида (Applied Biosystems, США) и 0,04 мкл GeneScan 500-LIS Size Standard (Applied Biosystems, США). После денатурации при температуре 95 °C в течение 3 мин и последующего охлаждения 10 мкл смеси наносили в лунку 96-луночной плашки и проводили капиллярный электрофорез высокого разрешения на полимере POP-4 (Applied Biosystems, США). Флуоресценцию амплификатов и их профиль (распределение по длинам) оценивали с помощью компьютерной программы GeneMapper v. 4.0 (Applied Biosystems, США).

Статистический анализ

Для сравнения результатов, полученных двумя методами, вычисляли критерий ранговой корреляции Спирмена по формуле:

$$r_s = 1 - 6\sum d^2 / (N^3 - N),$$

где N — число членов совокупности, d — разность рангов для каждого члена выборки, r_s — коэффициент Спирмена.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для оценки клональности мы использовали стандартные критерии: клональный пик при фрагментном анализе должен был в 3 раза превышать поликлональный фон. Для реаранжировок IgVH пик должен наблюдаться минимум в двух реакциях из трех, для реаранжировок IgVLκ — хотя бы в одной из двух (рис. 1). Клональность была выявлена у 11 (31,5 %) из 35 пациентов (табл. 4). У 3 пациентов обнаружены клонально-перестроенные гены как IgVH, так и IgVLκ. Таким образом, в нашем исследовании подтвержден высокий уровень выявления В-клеточной клональности в парафиновых блоках материала биопсии. У 11 больных после исследования материала парафинового блока и свежего материала результаты совпали (в т. ч. и один моноклональный случай).

Мы исследовали связь В-клеточной клональности с возрастом, гистологическим вариантом опухоли, характером роста опухолевых клеток (синцитиальный или рассеянный), количеством эозинофилов в ткани, экспрессией CD20 и CD15 на поверхности опухолевых клеток. Для оценки связи с возрастом пациенты были разделены

Таблица 4. Характеристика пациентов с лимфомой Ходжкина, у которых обнаружена В-клеточная клональность

№	Гистология	Иммуногистохимия	Возраст/пол	Определение В-клеточной клональности по генам	
				IgVH	IgVLκ/KDE
3	НС-I	—	20/Ж	Поли	Моно (E288 bp)
6	НС-II	CD20+/-15+30+EBV-	33/Ж	Моно (A377, B277, C135 bp)	Поли
7	НС-I, рецидив	CD20-15-30+EBV-	40/М	Моно (A342, B278, C154 bp)	Моно (E240, 371 bp)
11	НС-I	—	49/Ж	Поли	Моно (D197, E275 bp)
19	НС-I	CD20-15+/-30+EBV-	33/Ж	Моно (B259, C114 bp)	Поли
20	НС-I, рецидив	—	27/Ж	Поли	Моно (D287, E280 bp)
25	НС-I	—	23/Ж	Моно (A388, B279, C138 bp)	Моно (E373 bp)
27	НС-I	CD20-15+30+EBV-	20/Ж	Олиго	Моно (E282 bp)
29	НС-II	CD20-15+30+EBV-	34/Ж	Моно (A344, B280, C140 bp)	Поли
30	НС-I	CD20-15+30+EBV-	28/Ж	Моно (A339, B273, C130 bp)	Моно (E279 bp)
32	НС-II	—	44/Ж	Поли	Моно (E241 bp)

ПРИМЕЧАНИЕ. Длина клональных продуктов по реакциям: А — FR1 IgVH, В — FR2 IgVH, С — FR3 IgVH, D — IgVLκ (Vκ-Jκ), E — IgVLκ (Vκ/intron-Kde). bp — пары оснований; НС-I — нодулярный склероз I типа; НС-II — нодулярный склероз II типа.

на три возрастные группы в соответствии с эпидемиологическими данными [22]: 15–34, 35–49, 50 лет и старше. При сопоставлении перечисленных выше признаков с В-клеточной клональностью ни с одним из них не было выявлено корреляции, что также подтверждается данными других исследований [23, 24].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, наше исследование подтверждает высокий уровень выявления В-клеточной клональности в материале биопсии при лимфоме Ходжкина, что представляет несомненную ценность для дифференциальной диагностики этой злокачественной опухоли и реактивных лимфаденопатий, однако делает невозможным использование данного метода определения клональности в дифференциальной диагностике лимфомы Ходжкина и В-крупноклеточных лимфом. Важно отметить, что 2 случая рецидива оказались моноклональными. Для оценки прогностического значения выявления В-клеточной клональности при лимфоме Ходжкина необходимы дальнейшие исследования.

КОНФЛИКТЫ ИНТЕРЕСОВ

Авторы подтверждают отсутствие скрытых конфликтов интересов.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Ковригина А.М., Пробатова Н.А. Лимфома Ходжкина и крупноклеточная лимфома. М.: МИА, 2007.
[Kovrigina A.M., Probatova N.A. Limfoma Khodzhhkina i krupnokletochnye limfomy (Hodgkin's lymphoma and large-cell lymphomas). M.: MIA, 2007: 212.]
2. Harris N.L., Jaffe E.S., 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.
3. Harris N.L., Jaffe E.S., Diebold J. et al. The World Health Organization Classification of Neoplastic Diseases of the Hematopoietic and Lymphoid Tissues. *Ann. Oncol.* 1999; 10: 1419–32.
4. Kupperts R., Rajewsky K., Zhao M. et al. Hodgkin disease: Hodgkin and Reed-Sternberg cells picked from histological sections show clonal immunoglobulin gene rearrangements and appear to be derived from B cells at various stages of development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 1994; 91: 10962–6.
5. Marafioti T., Hummel M., Foss H.-D. et al. Hodgkin and Reed-Sternberg cells represent an expansion of a single clone originating from a germinal centre B-cell with functional immunoglobulin gene rearrangements but defective immunoglobulin transcription. *Blood* 2000; 95: 1443–50.

6. Re D., Muschen M., Ahmadi T. et al. Oct-2 and Bob-1 deficiency in Hodgkin and Reed Sternberg cells. *Cancer Res.* 2001; 61: 2080–4.
7. Jundt F., Kley K., Anagnostopoulos I. et al. Loss of PU.1 expression is associated with defective immunoglobulin transcription in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin disease. *Blood* 2002; 99: 3060–2.
8. Ushmorov A., Ritz O., Hummel M. et al. Epigenetic silencing of the immunoglobulin heavy-chain gene in classical Hodgkin lymphoma-derived cell lines contributes to the loss of immunoglobulin expression. *Blood* 2004; 104: 3326–34.
9. Theil J., Laumen H., Marafioti T. et al. Defective octamer-dependent transcription is responsible for silenced immunoglobulin transcription in Reed-Sternberg cells. *Blood* 2001; 97: 3191–6.
10. Kanzler H., Kupperts R., Hansmann M.L. et al. Hodgkin and Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease represent the outgrowth of a dominant tumor clone derived from (crippled) germinal center B cells. *J. Exp. Med.* 1996; 184: 1495–505.
11. Brauning A., Schmitz R., Bechtel D. et al. Molecular biology of Hodgkin's and Reed/Sternberg cells in Hodgkin's lymphoma. *Int. J. Cancer* 2006; 118: 1853–61.
12. Angel C.A., Pringle J.H., Naylor J. et al. Analysis of antigen receptor genes in Hodgkin's disease. *J. Clin. Pathol.* 1993; 46(4): 337–40.
13. Kamel O.W., Chang P.P., Hsu F.J. et al. Clonal VDJ recombination of the immunoglobulin heavy chain gene by PCR in classical Hodgkin's disease. *Am. J. Clin. Pathol.* 1995; 104: 419–23.
14. Manzanal A., Santon A., Oliva H. et al. Evaluation of clonal immunoglobulin heavy chain rearrangements in Hodgkin's disease using the polymerase chain reaction (PCR). *Histopathology* 1995; 27: 21–5.
15. Chute D.J., Cousar J.B., Mahadevan M.S. et al. Detection of immunoglobulin heavy chain gene rearrangements in classic Hodgkin lymphoma using commercially available BIOMED-2 primers. *Diagn. Mol. Pathol.* 2008; 17(2): 65–72.
16. Hebeda K.M., Van Altena M.C., Rombout P. et al. PCR clonality detection in Hodgkin lymphoma. *J. Hemat.* 2009; 2(1): 34–41.
17. Burack W.R., Laughlin T.S., Friedberg J.W. et al. PCR assays detect B-lymphocyte clonality in formalin-fixed, paraffin-embedded specimens of classical Hodgkin lymphoma without microdissection. *Am. J. Clin. Pathol.* 2010; 134(1): 104–11.
18. Wu L., Patten N., Yamashiro C.T., Chui B. Extraction and amplification of DNA from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* 2002; 10: 269–74.
19. Coombs N.J., Gough A.C., Primrose J.N. Optimisation of DNA and RNA extraction from archival formalin-fixed tissue. *Nucl. Acids Res.* 1999; 27: e12.
20. Sidorova J.V., Biderman B.V., Nikulina E.E., Sudarikov A.B. A simple and efficient method for DNA extraction from skin and paraffin-embedded tissues applicable to T-cell clonality assays. *Exp. Dermatol.* 2012; 21(1): 57–60.
21. Dongen J.J., Langerak A.W., Brüggemann M. et al. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia* 2003; 17(12): 2257–317.
22. Jarrett R.F. Viruses and lymphoma/leukaemia. *J. Pathol.* 2006; 208(2): 176–86.
23. Al Saati T., Galoin S., Gravel S. et al. IgH and TcR-gamma gene rearrangements identified in Hodgkin disease by PCR demonstrate lack of correlation between genotype, phenotype, and Epstein-Barr virus status. *J. Pathol.* 1997; 181(4): 387–93.
24. Manzanal A.J., Santon A., Acevedo A. et al. Molecular analysis of the IgH gene in 212 cases of Hodgkin's disease: correlation of IgH clonality with the histologic and the immunocytochemical features. *Mod. Pathol.* 1997; 10(7): 679–85.

Ю.В. Сидорова — кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной гематологии.

Н.В. Рыжикова — научный сотрудник лаборатории молекулярной гематологии.

С.Ю. Смирнова — научный сотрудник лаборатории молекулярной гематологии.

Е.Е. Никулина — научный сотрудник лаборатории молекулярной гематологии.

Б.В. Бидерман — кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной гематологии.

А.М. Ковригина — доктор биологических наук, заведующая патологоанатомическим отделением.

Т.Н. Моисеева — кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник отделения химиотерапии гематологических заболеваний и интенсивной терапии.

Н.Н. Шаркунов — аспирант отделения химиотерапии гематологических заболеваний и интенсивной терапии.

А.Б. Судариков — заведующий лабораторией молекулярной гематологии.

Адрес для переписки: Ю.В. Сидорова, 125167, Новый Зыковский пр., д. 4а, Москва, Российская Федерация, тел.: +7 (495) 6126511, e-mail: iouliavl@rambler.ru

