

Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины

НЕХОДЖКИНСКИЕ ЛИМФОМЫ: ОСНОВЫ КЛАССИФИКАЦИИ И ИММУНОЦИТОХИМИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ

Ключевые слова:

неходжкинские лимфомы, современные классификации, поражения костного мозга, иммуногистохимическая диагностика.

Совершенствование методов диагностики неходжкинских лимфом является одной из наиболее важных проблем современной онкогематологии. Проведение иммуногистохимических и молекулярно-генетических исследований позволяет выделить различные типы В-клеточных и Т-/ЕК-клеточных новообразований в соответствии с современной классификацией Всемирной организации здравоохранения (2008). Раннее выявление поражения костного мозга при неходжкинских лимфомах облегчает выбор наиболее рациональных схем лечения.

ВВЕДЕНИЕ

Неходжкинские лимфомы — гетерогенная группа опухолей, возникающих из различного типа клеток лимфоидной ткани и различающихся по ряду клинических, цитоморфологических, иммунологических и молекулярно-генетических признаков.

Лимфоидные опухоли в общей структуре злокачественных новообразований занимают 5-е место после рака молочной железы, предстательной железы, легкого и толстой кишки. По данным Национального канцер-регистра, в Украине в 2011 г. заболеваемость неходжкинскими лимфомами составляла 5,1 на 100 тыс. населения.

Лимфомы диагностируют на основе гистологического изучения срезов, полученных при биопсии лимфатических узлов, или материала из экстранодальных очагов поражения. При уточненном выделении отдельных форм и вариантов лимфом важным является цитологическое изучение отпечатков удаленных при биопсии лимфатических узлов. В настоящее время с целью дифференциальной диагностики и уточнения гистогенеза различных форм неходжкинских лимфом все шире применяют иммуногистохимические (ИГХ) исследования с использованием панели моноклональных антител и методы молекулярно-генетического анализа.

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ КЛАССИФИКАЦИИ НЕХОДЖКИНСКИХ ЛИМФОМ

Из множества классификационных схем, разработанных в прошлом столетии с целью систематизации злокачественных лимфом, широкое признание, начиная с середины 70-х гг., получили только некоторые.

Принципиально новыми в классификации Н. Рарраорт 1966 г. [32] являлись учет цитологических признаков и выделение опухолей с нодулярным (фолликулярным) и диффузным характером роста.

В первой половине 80-х гг. в связи с достижениями клеточной иммунологии и активным внедрением иммуноморфологических методов исследования в клиническую гематологию наметился новый морфофункциональный подход к изучению злокачественных лимфом. Это привело к появлению классификаций R.J. Lukes и R.D. Collins, R.F. Dorfman и Британской классификации [10]. Несмотря на использование различной терминологии для обозначения разновидностей злокачественных лимфом, перечисленные классификации имели ряд общих черт. Прежде всего, в них был расширен спектр опухолей лимфоидного происхождения и выделены в самостоятельную группу лимфомы с нодулярным характером роста. Авторы Британской классификации отмечали, что разные варианты лимфом с диффузным характером роста могут иметь морфологические признаки плазмочитарной дифференцировки, что может служить подтверждением их принадлежности к В-клеточной системе иммунитета.

R.J. Lukes и R.D. Collins [10], представляя в 1974 г. свою классификацию, назвали ее функциональной. Основные, новаторские на тот период положения, которыми руководствовались авторы при ее построении, заключались в следующем: 1) неходжкинские лимфомы — это злокачественные опухоли из В- и Т- клеток системы иммунитета; 2) нодулярные лимфомы образуются из клеток зародышевых центров лимфоидных фолликулов, что указывает на их В-клеточное происхождение; 3) злокачественные лимфомы возникают в результате блока дифференцировки (нарушения трансформации) лимфоидных клеток. Опухолевые элементы нодулярных В-лимфом, по аналогии с нормальными клетками зародышевых центров фолликулов, были подразделены на 4 категории: малые (small cells) и крупные (large cells) клетки с расщепленными (cleaved) и нерасщепленными (non-cleaved) ядрами. В пояснении к классификации авторы отмечали, что к формированию

фолликулоподобных, или нодулярных, структур более склонны клетки с расщепленными ядрами, хотя какое-то количество крупных клеточных элементов с нерасщепленными ядрами в опухолях подобного типа всегда присутствует.

В 1974 г. в журнале «Lancet» была опубликована классификация, получившая название Кильской [15]. Стоит отметить, что Кильская классификация и функциональная классификация R.J. Lukes и R.D. Collins были близки по сути рассматриваемых нозологических форм. Однако авторы Кильской классификации посчитали преждевременным и недостаточно обоснованным подразделение лимфом с учетом их В- и Т-клеточного происхождения. В Кильской классификации впервые все неходжкинские лимфомы были разделены на две большие группы: высокой степени злокачественности (бластные) и низкой степени злокачественности (небластные).

В 1976 г. экспертами Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) была предложена Гистологическая и цитологическая классификация опухолевых заболеваний кроветворной и лимфоидной тканей [28]. В основу систематизации легли принцип гистоструктуры опухоли и общая клиническая характеристика. Стоит подчеркнуть, что классификацию ВОЗ 1976 г. в течение ряда лет рассматривали как наиболее простую и отвечающую требованиям практического здравоохранения. Основной смысл ее состоял в унификации терминов и конкретизации нозологических форм лимфом с целью получения сопоставимых результатов при микроскопическом исследовании. В ней учитывались новейшие на тот период гистогенетические и иммунологические концепции, включая изменения представлений о лимфопоэзе. В классификации была использована традиционная терминология — понятная для клиницистов и широко распространенная среди патологов.

При сопоставлении перечисленных выше классификационных схем злокачественных лимфом выявляют их значительное сходство в отношении сущности выделяемых вариантов. В то же время, несмотря на то что в них так или иначе были отражены изменившиеся представления о нормальном лимфопоэзе, применяли разную, порой несопоставимую терминологию, использовали различные принципы деления лимфом на подварианты. Все это создавало серьезные проблемы для клиницистов.

Авторы всех классификаций отмечали сходство структуры клеток многих вариантов злокачественных лимфом с клетками зародышевых центров лимфоидных фолликулов. Единство распространялось на точку зрения, согласно которой опухолевые клетки, сходные с клетками зародышевых центров, способны формировать фолликулоподоб-

ные структуры, и именно они ответственны за нодулярный (фолликулярный) тип роста.

В 1982 г. по инициативе Национального института рака США была организована международная программа по изучению ценности и практической значимости 6 основных классификаций. Результатом такой работы явилось создание и опубликование новой «компромиссной» классификационной схемы — «Рабочей формулировки для клинического применения» («Working Formulation for clinical usage») [National Cancer Institute sponsored study of classifications of non-Hodgkin's lymphomas, 1982], призванной унифицировать разнообразную терминологию. В ней были учтены не две, а три степени злокачественности неходжкинских лимфом — кроме низкой и высокой еще и промежуточная. К недостаткам «Рабочей формулировки» стоит отнести отсутствие иммунологической характеристики различных вариантов злокачественных лимфом. Практически не были представлены и экстранодальные формы опухолей.

Со времени опубликования «Рабочей формулировки» (1982 г.) поступило много новой информации, значительно расширились представления о природе лимфоидных опухолей, были выделены и описаны новые типы (формы, варианты) лимфом и внесены определенные коррективы в ранее выделенные. Кроме того, была предпринята попытка модернизации одной из наиболее популярных международных классификаций — Кильской, с включением в нее Т-клеточных лимфом, что само по себе было явлением, несомненно, прогрессивным [35]. Как справедливо отмечала Н.А. Пробатова и соавторы [6], авторы Кильской классификации исходили из того, что она дает возможность интегрировать Т-клеточные злокачественные новообразования, не нарушая главную концепцию, лежащую в основе ее построения. Однако модифицированная Кильская классификационная система 1988 г., несмотря на ее прогрессивный характер, также не была лишена недостатков. В ней отсутствовали иммунологические критерии выделения вариантов В- и Т-клеточных неходжкинских лимфом и не учитывались клинические особенности различных форм лимфоидных опухолей.

ЕВРОПЕЙСКО-АМЕРИКАНСКАЯ КЛАССИФИКАЦИЯ НЕХОДЖКИНСКИХ ЛИМФОМ

В начале 90-х годов XX века появились объективные предпосылки для очередного «пересмотра» известных и популярных среди патологов, иммунологов и гематологов классификационных систем. В результате совместных согласованных усилий 19 крупным патологам во главе с N.L. Harris удалось сформулировать положения, которые легли в основу создания принципиально новой методологии систематизации неходжкинских лимфом — Европей-

ско-Американской классификации лимфоидных опухолей (REAL) [16]. Продолжение и расширение исследований по изучению неходжкинских лимфом на основе REAL завершились разработкой и выходом в свет в 2001 г. новой классификации опухолей кроветворной и лимфоидной ткани ВОЗ [20].

ИГХ диагностика злокачественных лимфопролиферативных заболеваний предполагает определение на поверхностной мембране опухолевых клеток дифференцировочных антигенов с помощью моноклональных антител. Под дифференцировочными антигенами подразумеваются белковые макромолекулы, указывающие на линейное происхождение В- или Т-клеток и уровень дифференцировки неопластических клеток. Количество моноклональных антител, использующихся не только для исследовательских, но и практических целей, продолжает неуклонно расти. Все они, полученные в разных лабораториях, на основании идентичной специфичности сгруппированы в кластеры дифференцировки («Clusters of Differentiation»), обозначаются символом CD и имеют порядковый номер.

Антигенный состав поверхностной мембраны и цитоплазмы клеток злокачественных лимфом, как правило, не отличается от их нормальных аналогов той же стадии дифференцировки. Более того, новые дифференцировочные антигены элементов нормального лимфопоэза были открыты при изучении опухолевых лимфоидных клеток и послужили основанием для формирования представлений о нормальных (неопухолевых) эквивалентах последних («Postulated cell of origin»). По существу, в процессе диагностики проводится сопоставление иммунофенотипа (набора маркеров) клеток неходжкинской лимфомы с иммунофенотипом клеток нормальной лимфоидной ткани, находящихся на той же стадии дифференцировки.

В новой классификации ВОЗ опухолей гемопозитической и лимфоидной тканей (2008 г.) в разделе, посвященном лимфомам, использованы основные принципы и, с небольшими изменениями, рубрификация опухолей, которые были приняты в пересмотренной REAL 1994 г.

КЛАССИФИКАЦИЯ НЕХОДЖКИНСКИХ ЛИМФОМ ВОЗ (2008)

В-клеточные опухоли из клеток-предшественников В-лимфоцитов

- В-лимфобластная лимфома/лейкоз из клеток-предшественников (В-клеточный острый лимфобластный лейкоз из клеток-предшественников).

В-клеточные опухоли из периферических (зрелых) В-лимфоцитов

- Хронический лимфолейкоз/лимфома из малых лимфоцитов (лимфоцитарная лимфома)
- В-клеточный пролимфоцитарный лейкоз

- Лимфома маргинальной зоны селезенки (+/- ворсинчатые лимфоциты)
- Волосатоклеточный лейкоз
- Лимфоплазмочитарная лимфома
- Болезни тяжелых цепей
- Плазмочелочная миелома/плазмочитома
- Экстранодальная В-клеточная лимфома маргинальной зоны MALT-типа
- Нодальная В-клеточная лимфома маргинальной зоны (+/- моноцитоподобные В-лимфоциты)
- Фолликулярная лимфома
- Лимфома из клеток мантийной зоны
- Диффузная В-крупноклеточная лимфома
- Медиастинальная диффузная В-крупноклеточная лимфома
- Первичная лимфома экссудатов
- Лимфома/лейкоз Беркитта

Т- и ЕК-клеточные опухоли из клеток-предшественников Т-лимфоцитов

- Т-лимфобластная лимфома/лейкоз из клеток-предшественников (Т-клеточный острый лимфобластный лейкоз из клеток-предшественников)

Т-клеточные лимфомы из периферических (зрелых) Т-лимфоцитов

- Т-клеточный пролимфоцитарный лейкоз
- Т-клеточный лейкоз из больших гранулодержащих лимфоцитов
- Агрессивный ЕК-клеточный лейкоз
- Т-клеточная лимфома/лейкоз взрослых (HTLV-1)
- Экстранодальная ЕК-/Т-клеточная лимфома, назальный тип
- Т-клеточная лимфома, ассоциированная с энтеропатией
- Гепатолиенальная Т-клеточная лимфома
- Т-клеточная панникулитоподобная лимфома подкожной клетчатки
- Грибовидный микоз/синдром Сезари
- Анапластическая крупноклеточная лимфома, Т-/0-клеточная, с первичным поражением кожи
- Периферическая Т-клеточная лимфома, неутонченная
- Ангиоиммунобластная Т-клеточная лимфома
- Анапластическая крупноклеточная лимфома, Т-/0-клеточная, с первичным системным поражением

ДИАГНОСТИКА РАЗЛИЧНЫХ ФОРМ НЕХОДЖКИНСКИХ ЛИМФОМ

При выделении вариантов (типов) лимфом учитываются не только их гисто- и цитоморфологические особенности, но и своеобразие клинических проявлений, иммунофенотип опухолевых клеток, генетические аномалии. Значимость каждого из этих критериев в диагностике конкретного типа лимфомы различна.

Основным преимуществом современной классификации лимфом является принцип морфоиммунологических сопоставлений. Основываясь на этом принципе, все лимфомы подразделяют на опухоли из клеток-предшественников и опухоли из периферических (зрелых) иммунокомпетентных клеток.

На практике из неходжкинских лимфом выделяют те разновидности новообразований лимфоидной ткани, которые встречаются наиболее часто, а именно крупноклеточную В-лимфому (31%), фолликулярную лимфому (22%), хронический лимфолейкоз (7%) и лимфогранулематоз (лимфому Ходжкина). Также к широко известным лимфоидным опухолям следует отнести MALT-лимфому (8%) и лимфому из клеток мантийной зоны (6%) [1].

Более 90% неходжкинских лимфом имеют В-клеточное происхождение и большинство из них представлены опухолями из периферических (зрелых) лимфоидных клеток [8]. Важное значение имеет не только определение уровня дифференцировки, но и получение сведений о гистогенетическом происхождении опухолевых клеток, то есть о «микрoанатомии В-клеточного иммунного ответа». Следует отметить, что Т-клеточный иммунный ответ не имеет столь характерного микрoанатомического субстрата, как В-клеточный. Функциональная специализация и связанные с ней иммунофенотипические особенности Т-клеток различных органов еще недостаточно изучены. Только современные представления о последовательных этапах В- и Т-клеточной дифференцировки в норме позволяют патологам и клиницистам понять основы систематизации и выделения различных нозологических иммуноморфологических вариантов неходжкинских лимфом.

Европейско-Американская классификация и классификации ВОЗ 2001 и 2008 гг., по существу, представляют собой список (перечень) основных иммуноморфологических вариантов лимфом с указанием наиболее вероятного нормального аналога злокачественных клеток. Рубрика под названием «Postulated cell of origin», сопровождающая каждый раздел двух последних классификаций, имеет глубокий смысл.

Лимфомы, возникающие из клеток, находящихся на разных уровнях дифференцировки, и из разных микрoанатомических зон периферических лимфоидных органов, имеют уникальные иммунофенотипические характеристики. Именно они в совокупности с некоторыми биологическими признаками опухоли (пролиферативная активность, признаки апоптоза и др.), по-видимому, определяют особенности клинического течения, реакции на лечение и прогноз. Таким образом, современная диагностика злокачественных лимфопролиферативных заболеваний с учетом новой

классификации ВОЗ должна основываться на результатах клинических, патогистологических, ИГХ исследований, цитоморфологического исследования периферической крови и пунктатов костного мозга (КМ), дополненных данными иммунофенотипирования клеток, а для уточненной диагностики в сомнительных случаях — данными молекулярно-генетического анализа [2].

При поведении иммунодиагностики лимфом устанавливают иммуноподвариант лимфомы (в рамках морфоиммунологического диагноза), оценивают степень распространенности процесса (лейкемизация, поражение КМ), констатируют наличие или отсутствие минимальной резидуальной болезни [5].

ИММУНОФЕНОТИПИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ЛИМФОМ В-КЛЕТОЧНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Процесс дифференцировки лимфоцитов В-ряда от ранних предшественников до плазматической клетки протекает в два этапа.

Первый — антигеннезависимый этап дифференцировки В-клеток (иначе — дифференцировки лимфоидных клеток-предшественников) — происходит у человека в КМ, являющемся центральным органом иммунной системы. Критические точки В-клеточного онтогенеза, отражающие стадии дифференцировки В-клеток в КМ: стволовая клетка — про-В — пре-пре-В — пре-В — ранняя (незрелая) В-клетка — зрелая (virgin — девственная) В-клетка. Термин «лимфобласт» закреплен только за клетками с фенотипом клеток-предшественников и не используется для обозначения бласттрансформированных лимфоцитов. В качестве маркеров при выделении стадий дифференцировки В-клеток-предшественников в КМ используют антиген CD10 (common — общий) и молекула IgM.

На наиболее раннем распознаваемом этапе дифференцировки (про-В) начинается перестройка (реаранжировка) генов, кодирующих синтез тяжелых цепей иммуноглобулинов, а на мембране клеток появляется антиген CD19. Эта молекула определяется на В-клетках на всех стадиях созревания. Антиген CD10 не определяется. Отличительной чертой пре-пре-В-клеток является постоянство экспрессии CD10. Цитоплазматическая су-цепь является характерным признаком пре-В лимфоцитов. На стадии пре-В происходит перестройка только генов легких цепей, а затем Х-цепей (легкие полипептидные цепи иммуноглобулинов еще не синтезируются).

Переход к конечным этапам антигеннезависимой дифференцировки характеризуется синтезом («сборкой») двух мембранных рецепторов: IgM (ранняя, незрелая В-клетка) и IgM + IgD (девственная, зрелая В-клетка). Морфологически это

малые лимфоциты (наивные В-клетки), покидающие КМ со сформированным иммуноглобулиновым рецепторным аппаратом и поступающие в периферические органы иммунной системы — прежде всего в кровь и далее — в лимфатические узлы, селезенку и другие ткани. Наивные В-клетки обладают высоким рециркуляторным потенциалом, и часть из них позитивна по антигену CD5 [18, 21].

Встреча зрелой В-клетки (лимфоцита) с антигеном может состояться в любом участке иммунной системы, но чаще это происходит во вторичных лимфоидных органах — паракортикальной зоне лимфатических узлов, периартериолярных лимфоидных муфтах селезенки, а также в лимфоидной ткани слизистых оболочек. В этом процессе, как известно, принимают участие также и аксессуарные клетки, являющиеся неотъемлемым компонентом иммунной системы. Антиген либо фиксируется и длительно удерживается системой презентующих (представляющих) дендритных клеток, либо бактерии обезвреживаются макрофагами путем фагоцитоза.

После взаимодействия с антигеном все последующие события составляют новый цикл в развитии В-клетки, называемый антигензависимой дифференцировкой.

Заклоченная в капсулу ткань лимфатического узла — это место, где формируется иммунный ответ. Скопления наивных В-лимфоцитов — это основные структуры так называемой кортикальной (тимуснезависимой) зоны. В узле, находящемся в состоянии «покоя», они имеют сферическую форму (гомогенные компактные шаровидные образования) и называются первичными лимфоидными фолликулами.

При развитии иммунного ответа архитектоника лимфатического узла изменяется. В лимфоидном фолликуле формируется так называемый зародышевый, или светлый, центр (более бледная окраска в гистологических препаратах). Таким образом, мономорфный первичный фолликул, состоящий из малых лимфоцитов, превращается в слоистую шарообразную структуру. Такой фолликул называется вторичным. Лимфоциты, окружающие зародышевый центр вторичного фолликула, образуют зону мантии. В свою очередь, краевая зона мантии носит название маргинальной.

Процесс активации после встречи с антигеном характеризуется появлением на поверхности В-лимфоцитов антигена CD23 и, в части случаев, CD5, после чего экспрессия мембранного IgD утрачивается. Эти клетки отличаются высокой пролиферативной активностью, и после их поступления в первичный лимфоидный фолликул формируется зародышевый центр [24, 25]. В последнем и начинается антигензависимое созревание В-клеток (второй этап нормальной В-клеточной дифференцировки).

Единого мнения относительно последовательности этапов морфологической трансформации лимфоидных клеток в зародышевых центрах фолликулов до настоящего времени нет. Еще в 1974 г., по предложению R.J. Lukes и R.D. Collins, элементы зародышевых центров были охарактеризованы как клетки малых размеров с расщепленным ядром (small cleaved cells), крупные клетки с расщепленным ядром (large cleaved cells), малые клетки с нерасщепленным ядром (small noncleaved cells), крупные клетки с нерасщепленным ядром (large noncleaved cells). Следует отметить, что расщелина в ядре — это важный и «стабильный» цитоморфологический признак В-лимфоцитов зародышевых центров вторичных лимфоидных фолликулов.

В современных классификациях для обозначения малых клеток с расщепленным ядром используют термин «центроцит». В свою очередь, малые клетки с нерасщепленным ядром характеризуются как «фолликулярный В-бласт», а крупные клетки с нерасщепленным ядром получили название «центробластов».

Центробласты — крупные активно пролиферирующие клетки, которые образуются из активированных В-лимфоцитов и заполняют базальную (темную) зону зародышевых центров фолликулов. Большинство этих клеток погибают в результате апоптоза, поскольку ген антиапоптоза *BCL2* в них не функционирует [17, 29, 30]. Выжившие клетки уменьшаются в размерах, ядра их сморщиваются, становятся как бы расщепленными (центроциты). В результате соматических гипермутаций, то есть замены нуклеотидов внутри генного комплекса VDJ, кодирующего переменные области тяжелых цепей иммуноглобулинов, изменяется аффинность к антигену, вызвавшему активацию В-клеток и формирование зародышевых центров [12, 19]. Центроциты с низкой аффинностью к антигену подвергаются апоптозу, а с высокой — проходят дальнейшие этапы дифференцировки. На них вновь появляются мембранные иммуноглобулины, и они проходят этап изотипического переключения классов тяжелых цепей Ig. В результате из центроцитов в апикальной светлой зоне центров фолликулов формируются плазматические клетки [24, 25]. Клетки, прошедшие этапы соматических гипермутаций и переключения классов иммуноглобулинов, могут дифференцироваться не только в плазматические, но и В-клетки памяти [14]. Если же соматическая гипермутация состоялась, а изотипическое переключение классов тяжелых цепей иммуноглобулинов не происходит, то такая клетка обычно становится IgM⁺ клеткой памяти [22].

В процессе иммунной (антигензависимой) дифференцировки лимфоцитов образуется еще один клеточный элемент с крупным пузырьковидным ядром, центрально расположенным ядрышком и пиронинофильной или базофильной цитоплаз-

мой — иммунобласт, который может дифференцироваться в направлении плазмоцитарного ряда через промежуточный этап лимфоплазмоцитарной клетки.

Биологический смысл дифференцировки В-клеток заключается в создании клона плазматических клеток, синтезирующих и секретирующих антитела (иммуноглобулины), специфически взаимодействующие с антигеном, индуцировавшим иммунный ответ. Кроме того, образуются В-клетки памяти, обеспечивающие вторичный (более быстрый) иммунный ответ на повторный контакт с антигеном. Антигензависимый этап дифференцировки В-лимфоцитов начинается в зародышевых центрах и заканчивается в зоне мозговых тяжей лимфатических узлов.

В определенном смысле основные этапы антигензависимой дифференцировки В-клеток схематически можно представить в виде двух «самостоятельных» линий. **Внутрифолликулярная дифференцировка:** лимфоцит — «фолликулярный В-бласт» — центробласт — центроцит (крупная клетка) — центроцит (малая клетка) — В-клетка памяти или плазматическая клетка; **дифференцировка за пределами лимфоидного фолликула:** лимфоцит — «иммунобласт» — лимфоплазмоцитарная клетка — плазматическая клетка.

Таким образом, в ходе созревания В-лимфоциты проходят сложный путь дифференцировки, обеспечивающий выполнение присущих им функций в иммунной системе организма. При возникновении злокачественных новообразований лимфоидной природы происходит нарушение данных процессов [7].

ИММУНОФЕНОТИПИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ЛИМФОМ Т-/ЕК- КЛЕТОЧНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Что касается Т-лимфопоэза, то наиболее ранние (претимические) этапы дифференцировки Т-лимфоцитов человека, происходящие в КМ, изучены еще недостаточно. Костномозговые предшественники Т-клеток попадают в вилочковую железу и проходят в ней следующие 3 стадии развития (схема Рейнхарц): субкапсулярные (ранние) — кортикальные — медуллярные (зрелые) тимоциты [33]. На каждой стадии дифференцировки тимоциты имеют уникальный, характерный для данного этапа иммунологический фенотип.

Наиболее многочисленными лимфоидными элементами вилочковой железы являются кортикальные тимоциты. Это наиболее иммунологически изученный этап внутритимической дифференцировки Т-клеток. Маркером кортикальных тимоцитов является антиген CD1a. Кроме того, на этих клетках одновременно экспрессируются антигены CD4 и CD8 («дубльпозитивная фракция»).

Медуллярные (зрелые) тимоциты характеризуются отсутствием молекулы CD1a, экспрессией мембранного CD3 и Т-клеточных рецепторов $\alpha\beta$ TCR и $\gamma\delta$ TCR [12]. Антигены CD4 и CD8 определяются на разных клетках, и таким образом формируются две функционально различающиеся субпопуляции Т-лимфоцитов: CD4⁺-клетки, обладающие функцией хелперов/индукторов, и CD8⁺-клетки, являющиеся эффекторами цитотоксической/супрессорной функции.

Дифференцировка внутри вилочковой железы не является конечным этапом созревания Т-лимфоцитов. Зрелые Т-лимфоциты циркулируют в крови, оседают в периферических лимфоидных органах и после контакта с антигеном участвуют в генерации иммунного ответа.

В целом Т-/ЕК-клеточные лимфомы встречаются значительно реже и составляют 10–12% общего числа неходжкинских лимфом [20]. Они характеризуются отсутствием морфологически идентифицируемых нормальных аналогов, выраженным клеточным полиморфизмом, чрезвычайным разнообразием гистологических форм, отсутствием специфического иммунологического профиля, свойственного для каждого варианта Т-лимфом [20]. Все это в значительной степени затрудняет диагностику Т-клеточных лимфом.

Казалось бы, приведенные данные не имеют прямого отношения к исследуемой нами проблеме поражения КМ при различных иммуноморфологических вариантах неходжкинских лимфом. Однако это впечатление обманчиво. Дело в том, что В-клеточные лимфомы представляют собой клональную пролиферацию В-клеток на разных стадиях (уровнях) дифференцировки, начиная от костномозговых клеток-предшественников до зрелых плазматических клеток. Во всех вариантах они в определенном смысле повторяют путь нормальной В-клеточной дифференцировки в КМ и за его пределами в периферических органах иммунной системы. Действительно, даже перечисление форм и цитологических вариантов неходжкинских В-клеточных лимфом в соответствии с клеточным субстратом опухоли (лимфобластный, лимфоцитарный, центроцитарный, центробластный, иммунобластный, плазмобластный и т.д.) подтверждает сказанное.

В последние годы стало очевидным, что изучение соматических гипермутаций, происходящих в генах варибельных областей тяжелых цепей иммуноглобулинов клеток зародышевых (герминальных) центров вторичных лимфоидных фолликулов периферических органов иммунной системы, имеет не только научное, но и практическое значение [26, 27]. Сведения о мутационном статусе U_H -генов позволяют определить уровень дифференцировки В-клеток по отношению к герминальным центрам фолликулов, в том числе и при злокачествен-

ных лимфомах (префолликулярные и постфолликулярные этапы созревания).

В соответствии с этими данными, неходжкинские лимфомы по происхождению лимфоидных клеток, составляющих субстрат опухоли, условно подразделяют на три группы: опухоли из В-клеток прегерминальных, герминальных (внутрифолликулярных) и постгерминальных этапов дифференцировки.

К опухолям из В-клеток прегерминальных (префолликулярных) этапов дифференцировки относятся лимфобластные и мантийно-клеточные лимфомы.

Герминальное происхождение имеют фолликулярная лимфома и лимфома Беркитта [9, 11, 23, 31]. Гены вариабельных областей тяжелых цепей иммуноглобулинов в опухолевых клетках содержат множество соматических гипермутаций. Этот механизм не исключается, и «накопление» мутаций приводит к «внутриклоновой» гетерогенности.

К опухолям, имеющим постгерминальное (постфолликулярное) происхождение, относятся лимфомы из клеток маргинальной зоны и лимфоплазмочитарные лимфомы [13, 36].

При В-лимфоцитарной лимфоме/хроническом лимфолейкозе неопластические клетки могут иметь как прегерминальное (из наивных В-клеток), так и постгерминальное происхождение. Этот вопрос в последние годы является предметом глубоких молекулярно-биологических и клинических исследований [34]. При диффузной В-крупноклеточной лимфоме также прослеживается гетерогенность в происхождении опухолевых клеток, составляющих субстрат болезни. Клетки могут иметь как герминальное (фолликулярное), так и постгерминальное происхождение. Все эти данные имеют важное прогностическое клиническое значение.

Таким образом, названия всех обозначенных в классификации ВОЗ (2008) иммуноморфологических вариантов В-лимфом отражают стадию дифференцировки в ряду нормальных В-клеток либо указывают на локализацию опухоли в В-зависимых зонах периферических лимфоидных органов.

ВОПРОСЫ ЛЕЙКЕМИЗАЦИИ ЛИМФОМ

Опухолевые клетки, составляющие субстрат как В-, так и Т-клеточных лимфом, являются трансформированными потомками лимфоидных элементов КМ и/или тимуса, «остановившимися» на том или ином этапе развития в результате блока дифференцировки. Известно, что домом (home) циркулирующих лимфоидных клеток в организме человека является КМ. Так называемый эффект дома (homing effect) обеспечивается межклеточными взаимодействиями и взаимодействием клеток с внеклеточным матриксом КМ.

Вовлечение в опухолевый процесс КМ как реализация «инстинкта дома» («homing effect») может происходить с различной частотой практически при всех иммуноморфологических вариантах В- и Т-клеточных лимфом [4]. Обращение к проблеме поражения КМ при неходжкинских лимфомах во многом продиктовано не только ее чрезвычайной актуальностью, но и в значительной степени обусловлено потребностями клиники.

Иммуноцитологические исследования являются обязательными при установлении диагноза лимфомы. При проведении иммунологической диагностики лимфом важно помнить, что это в основном системные опухолевые заболевания, для установления иммунофенотипического варианта которых требуется применение различных ИГХ методов или проточной цитофлуориметрии с учетом исследуемого опухолевого субстрата (биопсийный материал, кровь, пунктат КМ).

В большинстве случаев диагноз злокачественной неходжкинской лимфомы можно заподозрить на основании рутинного морфологического анализа. ИГХ методы позволяют верифицировать диагноз лимфомы на основании монотипии клеточных элементов лимфатического узла, моноклональности или аберрантного иммунофенотипа клеток.

Основные задачи, решаемые с помощью иммунологических методов при диагностике неходжкинских лимфом: установление линейной принадлежности неопластических клеток (В-линейные или Т-/ЕК-линейные); определение стадии дифференцировки клеток при В- или Т-/ЕК-клеточных лимфомах из клеток-предшественников или зрелых (периферических) лимфоидных клеток; идентификация нормального тканевого эквивалента злокачественно трансформированных клеток. Наибольшую сложность представляет дифференциальный диагноз группы морфологически сходных периферических В-клеточных мелкоклеточных лимфом, к которым, в соответствии с классификацией ВОЗ (2008), относятся В-клеточный хронический лимфолейкоз/лимфома из малых лимфоцитов, лимфома из клеток мантии, фолликулярная лимфома, лимфома маргинальной зоны, лимфоплазмочитарная лимфома.

В целом, иммуноморфологические классификации опухолей гемопоэтической и лимфоидной ткани представляют собой перечень основных типов новообразований с указанием наиболее вероятного нормального аналога для злокачественно трансформированных клеток в каждом из подвариантов. Необходимость определения нормального эквивалента лимфоидных клеток связана с тем, что характеристика опухолевого роста, процесс прогрессирования, уровень пролиферативной активности и чувствительность к химиотерапии во многом зависят от биологических особенно-

стей, линейной принадлежности и уровня дифференцировки клеток новообразования.

Клиническая практика требует точного нозологического диагноза опухолей лимфоидной ткани на основании интегрированного гистологического, ИГХ, а в некоторых случаях и молекулярно-генетического исследования опухолевого субстрата [3].

Знания о строении и функциях иммунной системы помогают в установлении подвариантов лимфом. Данный подход основан на том, что лимфомы, возникающие из клеток разных отделов периферических лимфоидных органов, находящихся на различных стадиях дифференцировки, имеют уникальный иммунофенотип. Биологические особенности иммунофенотипически различных лимфом (пролиферативная активность, склонность к апоптозу, способность к рециркуляции, чувствительность к терапии и т.п.) во многом обуславливают клиническое течение, результаты лечения и отдаленный прогноз у больных лимфомами.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бабиченко ИИ, Ковязин ВА. Новые методы иммуногистохимической диагностики опухолевого роста. Москва: Рос Университет дружбы народов, 2008. 109 с.
2. Глузман ДФ, Склярченко ЛМ, Надгорная ВА. Опухоли кроветворной и лимфоидной тканей. Киев: ДИА, 2008. 196 с.
3. Криволапов ЮА, Леенман ЕЕ. Морфологическая диагностика лимфом. СПб.: КОСТА, 2006. 208 с.
4. Османов ДШ. Поражение костного мозга при неходжкинских лимфомах. [Автореф дис... докт мед наук]. Москва: ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, 2004. 41 с.
5. Петров СВ, Райхлин НТ. В: Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека, 4-е изд. Казань, 2012: 274–338.
6. Пробатова НА. Морфологическая диагностика неходжкинских злокачественных лимфом (лимфосарком). Арх патол 1990; (9): 72–5.
7. Хансон КП, Имянитов ЕН. Эпидемиология и биология неходжкинских лимфом. Практ онкол 2004; 5 (19): 163–9.
8. Armitage JO, Weisenburger DD. New approach to classifying non-Hodgkin's lymphomas: clinical features of the major histologic subtypes. Non-Hodgkin's lymphoma classification project. J Clin Oncol 1998; 16 (8): 2780–95.
9. Bahler DW, Campbell MJ, Hart S, *et al.* IgVH gene expression among human follicular lymphomas. Blood 1991; 78 (6): 1561–8.
10. Bennett M, Farrer-Brown G, Henry K, *et al.* Classification of non-Hodgkin's lymphomas. Lancet 1974; 11 (2): 405–6.
11. Chapman CJ, Wright D, Stevenson FK. Insight into Burkitt's lymphoma from immunoglobulin variable region gene analysis. Leuk Lymphoma 1998; 30 (3–4): 257–67.
12. Delves PJ, Roitt IM. The immune system. First of two parts. N Engl J Med 2000; 343 (1): 37–49.
13. Dunn-Walters DK, Isaacson PG, Spencer J. Analysis of mutations in immunoglobulin heavy chain variable region genes of microdissected marginal zone (MGZ) B cells suggests that the MGZ of human spleen is a reservoir of memory B cells. J Exp Med 1995; 182 (2): 559–66.
14. French DL, Laskov R, Schaff MD. The role of somatic hypermutation in the generation of antibody diversity. Science 1989; 244 (4909): 1152–7.
15. Gerard-Marchant R, Hamlin I, Lennert K, *et al.* Classification of non-Hodgkin's lymphoma. Lancet 1974; 2: 406–8.
16. Harris NL, Jaffe ES, Stein H, *et al.* A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. Blood 1994; 84 (5): 1361–92.
17. Hockenbery DM, Zutter M, Hickey W, *et al.* BCL2 protein is topographically restricted in tissues characterized by apoptotic cell death. Proc Natl Acad Sci USA 1991; 88 (16): 6961–5.
18. Inghirami G, Foitl DR, Sabichi A, *et al.* Autoantibody-associated cross-reactive idiotype-bearing human B lymphocytes: distribution and characterization, including Ig VH gene and CD5 antigen expression. Blood 1991; 78 (6): 1503–15.
19. Jacob J, Kelsoe G, Raewsky K *et al.* Intracloonal generation of antibody mutants in germinal centres. Nature 1991; 354: 389–92.
20. Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW (eds.). World Health Organization classification of tumors. Pathology and genetics of tumors of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon: IARC Press, 2001. 351 p.
21. Kipps TJ. The CD5 B cell. Adv Immunol 1989; 47: 117–85.
22. Klein U, Kiippers R, Rajewsky K. Evidence for a large compartment of IgM-expressing memory B cells in humans. Blood 1997; 89 (4): 1288–98.
23. Kosmas C, Stamatopoulos K, Papadaki T, *et al.* Somatic hypermutation of immunoglobulin variable region genes: focus on follicular lymphoma and multiple myeloma. Immunol Rev 1998; 162 (1): 281–92.
24. Liu YJ, Zhang J, Lane PJ, *et al.* Sites of specific B cell activation in primary and secondary responses to T cell-dependent and T cell-independent antigens. Eur J Immunol 1991; 21 (12): 51–62.
25. MacLennan IC. Germinal centers. Ann Rev Immunol 1994; 12 (1): 117–39.
26. MacLennan IC, Gray D. Antigen-driven selection of virgin and memory B cells. Immunol Rev 1986; 91 (1): 61–85.
27. Maizels N. Somatic hypermutation: how many mechanisms diversify V region sequences? Cell 1995; 83 (1): 9–12.
28. Mathe G, Rappaport H, O'Connor GT, Torloni H. Histological and cytological typing of neoplastic diseases of hematopoietic and lymphoid tissues. Geneva: World Health Organization, 1976. 45 p.
29. McDonnell TJ, Deane N, Piatt FM, *et al.* BCL-2-immunoglobulin transgenic mice demonstrate extended B cell survival and follicular lymphoproliferation. Cell 1989; 57 (1): 79–88.
30. Nunez G, London L, Hockenbery D, *et al.* Deregulated Bcl-2 gene expression selectively prolongs survival of growth factor-deprived hemopoietic cell lines. J Immunol 1990; 144 (9): 3602–10.
31. Ottensmeier CH, Thompsett AR, Zhu D, *et al.* Analysis of VH genes in follicular and diffuse lymphoma shows ongoing somatic mutation and multiple isotype transcripts in early disease with changes during disease progression. Blood 1998; 91 (11): 4292–9.
32. Rappaport H. The changing concepts for the classification of malignant neoplasia of the hematopoietic system. Bull Cancer 1974; 61 (1): 11–23.
33. Reinherz EL, Kung PC, Goldstein G, *et al.* Discrete stages of human intrathymic differentiation: analysis of normal thymocytes and leukemic lymphoblasts of T-cell lineage. Proc Natl Acad Sci USA 1980; 77 (3): 1588–92.

34. Schroeder HW, Dighiero G. The pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia: analysis of the antibody repertoire. *Immunol Today* 1994; 15 (6): 288–94.

35. Stansfeld AG, Diebold J, Noel H, *et al.* Updated Kiel classification for lymphomas. *Lancet* 1988; 1 (8580): 292–3.

36. Zhu D, Oscier DG, Stevenson FK. Splenic lymphoma with villous lymphocytes involves B cells with extensively mutated Ig heavy chain variable region genes. *Blood* 1995; 85 (6): 1603–7.

NON-HODGKIN'S LYMPHOMA: PRINCIPLES OF CLASSIFICATION AND IMMUNOCYTOCHEMICAL DIAGNOSIS

A.F. Jalilov

Summary. *Improvement of diagnosis of non-Hodgkin's lymphomas is one of the most important problems in modern oncohematology. Immunohistochemical and molecular and genetic studying makes it pos-*

sible to determine the different types of B-cell and T-/NK-cell neoplasms according to the modern WHO classification. Early detection of involvement of the bone marrow in non-Hodgkin's lymphomas facilitate the task of selecting the most accurate treatment schemes.

Key words: non-Hodgkin's lymphoma, advanced classification, bone marrow lesions, immunohistochemical diagnosis.

Адрес для переписки:

Джалилов А.Ф.

03022, Киев, ул. Васильковская, 45

Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины

E-mail: exponcol@onconet.kiev.ua

Получено: 11.09.2013