

Immunophenotypical and cytogenetic features of tumor cells in the patient with chronic lymphocytic leukemia associated with prolonged exposure to irradiationS.N. Kolyubayeva¹, I.A. Sukhina¹, V.Yu. Nikitin¹, T.V. Isakova¹, A.S. Polyakov¹, S.N. Malakhova¹, L.A. Myakoshina², Yu.N. Vinogradova², and N.V. Ilin²**ABSTRACT**

In this article, we describe immunophenotypical and cytogenetic features of tumor cells in the patient with chronic lymphocytic leukemia (CLL) and prolonged exposure to irradiation in the history. Finding of 0.67% to 0.73% of metaphases with dicentric chromosomes confirmed the effect of radiation in this patient. Chromosome banding with mitogen stimulation of peripheral lymphocytes revealed 2% of cells with 47,XY, +12 karyotype, while FISH detected the greater number of cells with trisomy 12 in interphase bone marrow cells and peripheral lymphocytes. Immunophenotyping of bone marrow cells revealed the difference from "classic" CLL, i.e. simultaneous low-positive CD22 and CD79b expression as well as CD38 expression on the surface of tumor cells.

Keywords: chronic lymphocytic leukemia, fluorescence in situ hybridization, trisomy 12, irradiation, radiation-specific damage.

¹ Military Medical Academy

194044, ul. Akademika Lebedeva, d. 6, St. Peterburg, Russian Federation

² Russian Research Centre for Radiology and Surgical Technologies, RF Ministry of Health

197758, ul. Leningradskaya, d. 70, p. Pesochnyy, St. Peterburg, Russian Federation

S.N. Kolyubayeva, PhD, DSci, Head of Research laboratory (molecular genetic studies) and Research department (medicobiological studies)
ksnwm2@mail.ru

I.A. Sukhina, PhD, Chief scientific worker, Research laboratory (general immunology and immunogenetics)

V.Yu. Nikitin, MD, PhD, DSci, Head of Research laboratory (general immunology and immunogenetics)

T.V. Isakova, Junior scientific worker, Research laboratory (molecular genetic studies)

A.S. Polyakov, Head of Department, Division of intermediate course of internal medicine

S.N. Malakhova, Head of Laboratory department, Clinic of intermediate course of internal medicine

L.A. Myakoshina, Scientific worker

Yu.N. Vinogradova, MD, PhD

N.V. Ilin, MD, PhD, DSci, Prof., Head of Department of radiotherapy for systemic diseases and post-irradiation disorders

Correspondence should be sent to S.N. Kolyubayeva194044, ul. Akademika Lebedeva, d. 6, St. Peterburg, Russian Federation
Tel: +7(812)2923229**Корреспондентский адрес:**

С.Н. Колубаева

194044, ул. Академика Лебедева, д. 6, Санкт-Петербург,

Российская Федерация

Тел: +7(812)2923229

Принято в печать: 22 мая 2013 г.**Иммунофенотипические и цитогенетические особенности опухолевых клеток у больного хроническим лимфоцитарным лейкозом, имевшего длительный контакт с источником радиации**С.Н. Колубаева¹, И.А. Сухина¹, В.Ю. Никитин¹, Т.В. Исакова¹, А.С. Поляков¹, С.Н. Малахова¹, Л.А. Мякошина², Ю.Н. Виноградова², Н.В. Ильин²**РЕФЕРАТ**

В работе приводятся иммунологические и цитогенетические характеристики опухолевых клеток пациента с хроническим лимфоцитарным лейкозом (ХЛЛ), имевшего длительный контакт с источником ионизирующей радиации. Методом дифференциальной окраски хромосом с использованием митогенов в крови выявлено 2% клеток с кариотипом 47,XY, +12. Наличие 0,67–0,73% метафаз с дицентрическими хромосомами подтвердило воздействие радиации на пациента. Методом флюоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) выявлено большое число клеток с трисомией хромосомы 12 как в костном мозге, так и периферической крови. Возможность анализировать специфичные для ХЛЛ повреждения в интерфазных ядрах — преимущество метода FISH по сравнению со стандартным цитогенетическим исследованием. Иммунофенотипирование позволило выявить отличия от «классического» ХЛЛ, заключающиеся в одновременной экспрессии CD22 и CD79b, а также экспрессии CD38 на поверхности большинства опухолевых клеток.

Ключевые слова:

хронический лимфоцитарный лейкоз, радиационно-специфичные повреждения, дицентрические хромосомы, флюоресцентная гибридизация *in situ*, трисомия 12, облучение.

ВВЕДЕНИЕ

Хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ) характеризуется индолентным течением и представляет собой опухоль из мономорфных малых лимфоцитов В-клеточного происхождения. При наличии лимфаденопатии и числе лейкоцитов не более $15 \times 10^9/\text{л}$ опухоль можно трактовать как лимфому из малых лимфоцитов. При нарастании лейкоцитоза диагностируется ХЛЛ [1, 2].

При «классическом» ХЛЛ опухолевые В-клетки имеют следующий иммунофенотип: CD19⁺,

CD20^{dim}, CD23⁺, CD5⁺, FMC7⁻, CD22⁻, CD79b⁻, sIgκ⁺ или λ⁺. В ряде случаев встречается слабая экспрессия CD22. Повторяющиеся хромосомные aberrации при ХЛЛ также хорошо изучены. Почти 1/3 пациентов при ХЛЛ имеет делецию 13q, которая определяет благоприятный прогноз. Наличие делеции 17p (утрата или мутация TP53) обуславливает неблагоприятный прогноз и резистентность к любой терапии. Делеция 11q22 и трисомия хромосомы 12 у пациентов определяют промежуточный прогноз [3]. ХЛЛ/лимфоцитарная лимфома с трисомией 12, делецией 11q и, как пра-

¹ Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова

194044, ул. Академика Лебедева, д. 6, Санкт-Петербург, Российская Федерация

² ФГУ «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий» МЗ РФ

197758, ул. Ленинградская, д. 70, п. Песочный, Санкт-Петербург, Российская Федерация

Таблица 1. Анализ хромосомных aberrаций в метафазах культуры лимфоцитов периферической крови больного при стимуляции митогенами ФГА и PWM с использованием дифференциальной окраски хромосом

Митоген	Количество проанализированных метафаз	Выявленные повреждения	
		Метафазы с дицентрическими хромосомами	Метафазы с другими хромосомными aberrациями
PWM	270	45,XY, dic(9;13) [1] 45,XY, dic(13;20) [1] Эндоредупликация [2]	47,XY, +21 [1]
ФГА	150	46,XY, dic(5;12), +12 [1]	47,XY, +12 [3] 46,XY, t(7;14)(q35;q13) [1] 47,XY, +X [1] 48,XY, +3, +mar [1]

ПРИМЕЧАНИЕ. В квадратных скобках указано количество клеток.

вило, с мутацией NOTCH1 в сочетании с высокой экспрессией CD38 и ZAP-70 чаще трансформируется в диффузную В-крупноклеточную лимфому (синдром Рихтера)[4–6]. Что касается механизмов развития ХЛЛ, то это единственное гематологическое заболевание, при котором не доказан вклад мутагенного действия радиации [7]. В литературе появились сообщения [8, 9], в которых обсуждается высокий риск заболевания ХЛЛ у лиц, подвергшихся облучению при аварии на Чернобыльской АЭС или в результате воздействия других источников радиации. Однако имеются данные, в которых не выявлено связи между возникновением заболевания и облучением. Возможно, неоднозначность результатов связана с продолжительным периодом между дебютом заболевания и началом лечения. В то же время С.С. Zent и соавт. [10] полагают, что в связи с индолентностью ХЛЛ число неустановленных случаев может значительно снизиться, если для диагностики будет использоваться метод проточной цитометрии и иммунофенотипического исследования.

В настоящей работе проанализированы хромосомные аномалии, специфичные для ионизирующей радиации и ХЛЛ, которые были выявлены как методом флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH), так и с помощью дифференциальной окраски хромосом. Кроме того, было проведено иммунофенотипирование клеток костного мозга.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Костномозговую взвесь культивировали в течение 24 ч, кровь — 72 ч. Культивирование, фиксацию и окраску осуществляли по принятой в лаборатории методике [11]. Для выявления специфичных при ХЛЛ хромосомных aberrаций использовали метод FISH. Для этого применяли ДНК-зонды фирмы Abbott, направленные на определение характерных для ХЛЛ повреждений, таких как делеция генов *ATM*, *TP53*, делеция в q плече хромосомы 13 и трисомия хромосомы 12. Для идентификации нарушений кариотипа использовали международную номенклатуру [12]. Анализ хромосомных повреждений проводили с помощью микроскопа 90i компании Nikon (Япония) при увеличении 10 × 100. При использовании фитогемагглютинина (ФГА) в качестве митогена анализировали 150 клеток, поуквид митогена — 270 клеток.

Иммунофенотипирование костного мозга выполнено на проточном цитометре Cytomics FC500 (США) с применением следующих трехцветных комбинаций моноклональных антител Beckman Coulter (США): CD3FITC/CD19PE/CD45PC5, CD10FITC/CD20PE/CD19PC5, SmIg α FITC/SmIg λ PE/CD19PC5, CD5FITC/CD23PE/CD19PC5, FMC7FITC/CD38PE/CD19PC5, CD22FITC/CD79bPE/CD19PC5, CD103FITC/CD24PE/CD19PC5, CD25FITC/CD11cPE/CD19PC5.

В работе использовали методы статистики с оценкой значимости различий показателей с помощью *t*-критерия Стьюдента и точного критерия Фишера, корреляционный анализ, программу Microsoft Excel 7,0 и пакет прикладных программ Statistica 6.0.

КЛИНИЧЕСКОЕ НАБЛЮДЕНИЕ

Больной В., 78 лет, поступил в клинику 3.10.11 г. с диагнозом хронического лимфоцитарного лейкоза III стадии (по Rai). Проводилась терапия хлорамбуцилом.

Пациент имел контакт с источниками ионизирующей радиации во время военной службы в течение 40 лет. С 2010 г. у больного отмечается лейкоцитоз до $23,1 \times 10^9/\text{л}$ с абсолютным лимфоцитозом $21 \times 10^9/\text{л}$.

В клиническом анализе крови имела место трехростковая цитопения (анемия, тромбоцитопения и агранулоцитоз). Миелограмма: гиперклеточный костный мозг, клетки лимфоидного ряда — 80,2% (лимфоциты полиморфные, преимущественно со зрелым хроматином ядра, имелись формы с расщепленными ядрами).

В табл. 1 представлены результаты цитогенетического анализа лимфоцитов периферической крови больного при стимуляции митогенами ФГА и поуквид (PWM). Как следует из данных табл. 1, количество дицентрических хромосом (dic) при использовании обоих митогенов статистически значимо не различалось (0,74 и 0,67%). Обнаруженные радиационно-специфичные aberrации (рис. 1, Б) соответствуют анамнезу больного, из которого следует, что он имел длительный контакт с радиацией. Об этом же свидетельствуют и клетки с эндоредупликацией (рис. 2). Как видно из табл. 1, в ФГА-стимулированных лимфоцитах выявлены метафазы со специфичными для ХЛЛ цитогенетическими повреждениями (трисомия хромосомы 12 — 2%) (рис. 1, А). При использовании митогена PWM (проанализировано 270 метафаз) этих повреждений не обнаружено. Учитывая, что при иммунофенотипировании установлен В-клеточный ХЛЛ, следует сделать вывод, что митоген PWM не вызывает деления тех клеток, в которых обнаружена трисомия хромосомы 12. В то же время митоген ФГА (ФГА-П, компания «Пан-Эко», Москва), по-видимому, приводит к делению многих субпопуляций лимфоцитов, в т. ч. и клеток — носителей трисомии 12.

Следует отметить, что при использовании ФГА-стимуляции обнаружена одна метафаза, содержащая как дицентрическую, так и дополнительную хромосому 12 (см. табл. 1). Кроме основных для ХЛЛ aberrаций выявлены дополнительные (рис. 1, В), которые в совокупности могут свидетельствовать о неблагоприятном прогнозе. В материале костного мозга среди проанализированных 20 метафаз определена 1 метафаза с дицентрической

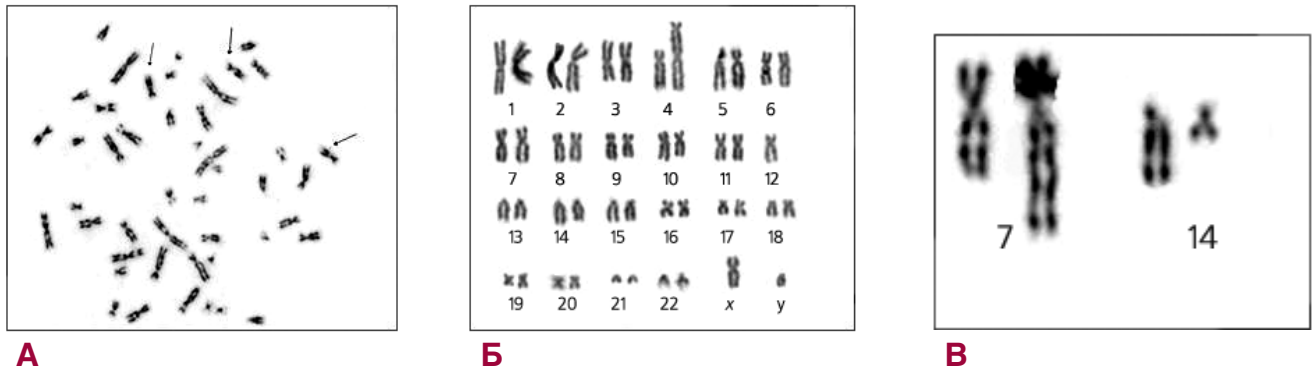


Рис. 1. Метафазные пластинки из ФГА-стимулированной культуры лимфоцитов периферической крови больного ХЛЛ.

Ув. 10×100 , микроскоп Eclipse 90i (Nikon, Япония);

А — метафазная пластинка с кариотипом 47,XY, +12 (стрелками указаны хромосомы 12 [3]); Б — кариотип метафазной пластинки 46,XY, dic(4;12); В — частичный кариотип пластинки с t(7;14)(q36;q13)

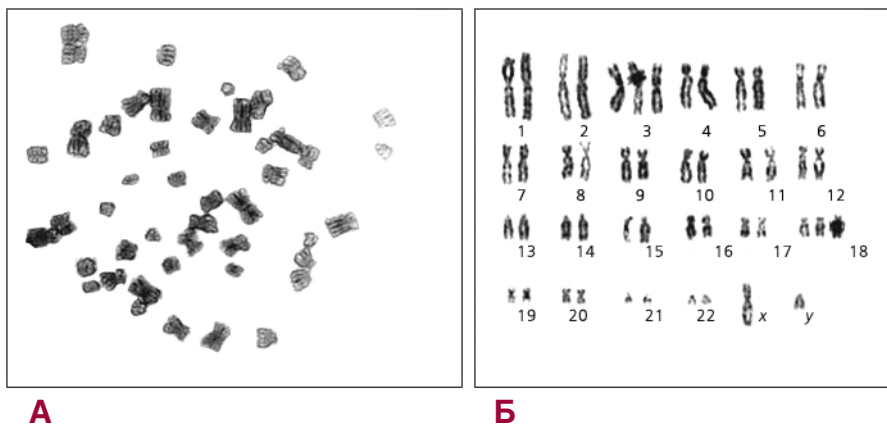


Рис. 2. Метафазные пластинки из культуры PWM-стимулированных лимфоцитов периферической крови больного ХЛЛ. Ув. 10×100 , микроскоп Eclipse 90i (Nikon, Япония);

А — метафаза с эндоредупликацией хромосом; Б — кариотип метафазной пластинки (48,XY, +3, +18)

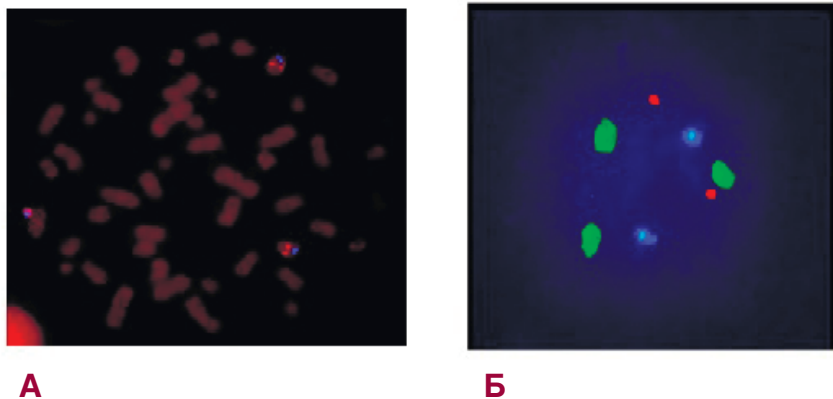


Рис. 3. Флюоресцентная гибридизация *in situ* в культуре PWM-стимулированных лимфоцитов периферической крови больного ХЛЛ. Ув. 10×100 , микроскоп Eclipse 90i (Nikon, Япония);

А — метафазная пластинка с трисомией 13q (ДНК-зонд Abbott 13q14.3 — оранжевая метка; 13q34 — синяя метка); Б — интерфазное ядро с трисомией 12 (ДНК-зонд Abbott 13q14.3 — оранжевая метка; 13q34 — синяя метка, CEP12 — зеленая метка)

хромосомой и 1 метафаза, содержащая изохромосому по 17q (делеция *TP53*).

С помощью метода FISH (рис. 3) анализировали повреждения как в интерфазных ядрах, так и в метафазах. При этом трисомия хромосомы 12 зарегистрирована в интерфазных ядрах клеток как в костном мозге, так и в периферической крови. Содержание интерфазных клеток с трисомией составляло в костном мозге 13 %, а в периферической крови — 22 %. Встречались единичные метафазы с трисомией по 13q (рис. 3, А и Б). Следует отметить, что анализ методом FISH проводился в PWM-стимулированных культурах, при этом в метафазах трисомия 12 не обнаружена, как это уже отмечено при использовании дифференциальной окраски хромосом.

При иммунофенотипировании трансформированные В-лимфоциты ХЛЛ (рис. 4) характеризовались положительной экспрессией антигенов CD22^{dim} и CD79b^{dim to mod}.

Предел средней интенсивности флюоресценции (MFI) CD79bPE составил 91,9–103,0 ед. Таким образом, у пациента с В-ХЛЛ установлены следующие иммунофенотипические особенности опухолевых клеток, отличающие их от типичного В-ХЛЛ: CD19⁺, CD20^{dim}, CD23⁺, CD5⁺, FMC7⁻, CD22^{dim}, CD79b^{dim to mod}, CD38^{mod to bright}, sIgλ⁺.

ОБСУЖДЕНИЕ

Обращает на себя внимание тот факт, что антиген CD38, показатель плохого прогноза [13], присутствовал на большинстве опухолевых клеток (99,3 %). В работах S.M. Escudier и соавт. [14] и E. Schlette [15] также были получены данные, указывающие на связь между экспрессией CD79b и трисомией 12.

Сопоставление цитологических, иммунологических и цитогенетических показателей выявило полное соот-

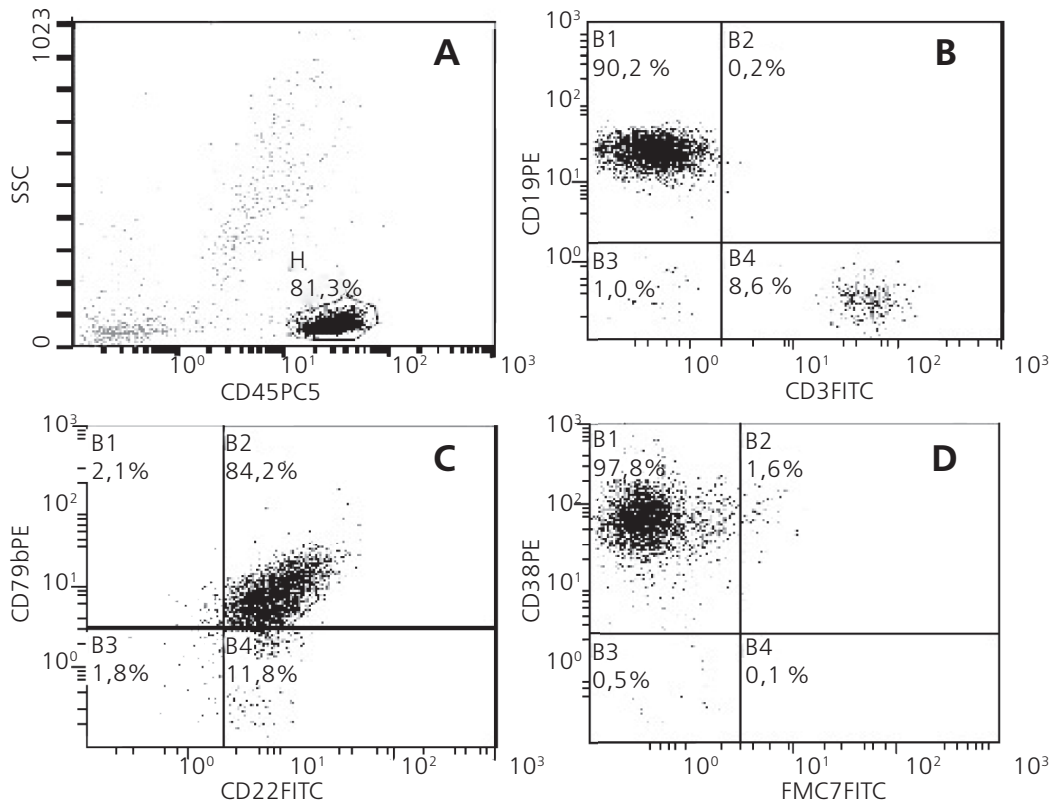


Рис. 4. Проточная цитометрия клеток костного мозга больного ХЛЛ:

A — гейтирование популяции лимфоцитов (гейт H) по интенсивности экспрессии антигенов CD45 и SSC; **B** — распределение В-(CD19) и Т-(CD3)клеток в выделенной популяции лимфоцитов; **C** — нетипичная для В-ХЛЛ (квадрант B2) коэкспрессия антигенов CD79b и CD22; **D** — экспрессия лейкозными клетками (97,8%) маркера неблагоприятного прогноза CD38

ветствие между ними. С помощью цитогенетического метода подтверждено воздействие радиации, что следует и из анамнеза больного, который в силу своей профессии имел в течение длительного времени контакт с ракетным топливом. В иммунофенотипе опухолевых клеток выявлены отличия от типичного В-ХЛЛ, что также может быть объяснено воздействием радиации. Однако в литературе возникновение ХЛЛ не связывают с облучением. По-видимому, это обусловлено длительным индолентным течением ХЛЛ, иногда продолжающимся 20–30 лет [1]. По этой причине среди пострадавших в результате аварии на Чернобыльской АЭС увеличение заболеваемости ХЛЛ выявлено только спустя много лет [7, 8].

Неблагоприятный исход заболевания у больного, представленного в настоящей работе, по всей вероятности, связан с дополнительными факторами отрицательного воздействия на организм, в частности радиации.

Недавно установлены дополнительные генетические признаки [5, 6], определение которых у больных ХЛЛ может свидетельствовать об ухудшении прогноза и трансформации заболевания в диффузную В-крупноклеточную лимфому.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выявлены отклонения цитогенетических и иммунологических параметров у больного хроническим лимфоцитарным лейкозом, имевшего длительный контакт с источниками ионизирующей радиации, в сравнении с «классическим» В-клеточным хроническим лимфоцитарным лейкозом. Они заключаются в обнаружении характерных для облу-

чения повреждений: дицентрических хромосом и наличия экспрессии антигенов CD38 и CD79b на поверхности большинства опухолевых клеток.

Результаты настоящего исследования позволяют предположить, что ионизирующая радиация может вносить свой вклад в механизмы формирования и развития хронического лимфоцитарного лейкоза спустя много лет после облучения.

КОНФЛИКТЫ ИНТЕРЕСОВ

Авторы подтверждают отсутствие скрытых конфликтов интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Новик А.А. Классификация злокачественных лимфом. СПб.: ЭЛБИ, 2000.
2. Novik A.A. Klassifikatsiya zlokachestvennykh limfom [Classification of malignant lymphomas]. SPb.: ELBI, 2000.
3. O'Brien S. Diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia. In: Neoplastic Diseases of the Blood, 3rd ed. Ed. by P.H. Wiernk, S. O'Brien, M.J. Keating. New York, Edinburgh, 2001: 151–9.
4. Austen B., Skowronska A., Baker C. et al. Mutation status of the residual ATM allele is an important determinant of the cellular response to chemotherapy and survival in patients with chronic lymphocytic leukemia containing an 11q deletion. J. Clin. Oncol. 2007; 25: 5448–7.
5. Bea S., Lopez-Guillermo A., Ribas M. et al. Genetics imbalances in progressed B-cell chronic lymphocytic leukemia and transformed large-cell lymphoma (Richter's syndrome). Am. J. Pathol. 2002; 161: 957–8.
6. Del Giudice I., Rossi D., Chiaretti S. et al. NOTCH1 mutations in +12 chronic lymphocytic leukemia (CLL) confer an unfavorable prognosis, induce a distinctive transcriptional profiling and refine the intermediate prognosis of +12 CLL. Haematologica 2012; 97(3): 437–41.
7. Rossi D., Rasi S., Fabbri G. et al. Mutations of NOTCH1 are an independent predictor of survival in chronic lymphocytic leukemia. Blood 2012; 119(2): 521–6.

7. Chumak V.V., Romanenko A.Y., Voillegue P.G. et al. The Ukrainian-American study of leukemia and related disorders among Chernobyl cleanup workers from Ukraine: II. Estimation of bone marrow doses. *Rad. Res.* 2008; 170(6): 691–7.
8. Romanenko A.Y., Finch S.C., Hatch M. et al. The Ukrainian-American study of leukemia and related disorders among Chernobyl cleanup workers from Ukraine: III. Radiation risk. *Rad. Res.* 2008; 170: 711–20.
9. Krestinina L.Y., Preston D.L., Ostroumova E.V. et al. Protracted radiation exposure and cancer mortality in the Techa river cohort. *Rad. Res.* 2005; 164: 602–11.
10. Zent C.S., Kyasa M.J., Evans R., Schichman S.A. Chronic lymphocytic leukemia incidence is substantially higher than estimated from tumor registry date. *Cancer* 2001; 92: 1325–30.
11. Богданов А.Н., Саржевский В.О., Колубаева С.Н. и др. Случай острого лимфобластного лейкоза с t(9;22) и несколькими дополнительными перестройками. *Гематол. и трансфузиол.* 2008; 53(30): 35–8.
12. An International System for human Cytogenetic Nomenclature. Recommendations of the International Standing Committee on the Human Cytogenetic Nomenclature. Ed. by L. Shaffer, N. Tommerup. Basel: S. Karger, 2009.
13. Zucchetto A. Surface-antigen expression profiling (SEP) in B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL): Identification of markers with prognostic relevance. *J. Immunol. Meth.* 2005; 305: 20–32.
14. Escudier S.M., Pereira-Leahy J.M., Drach J.M. et al. Fluorescent in situ hybridization and cytogenetic studies of trisomy 12 in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1993; 81: 2702–7.
15. Schlette E. CD79b expression in chronic lymphocytic leukemia. Association with trisomy 12 and atypical immunophenotype E. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2003; 123: 561–6.

