

ЛИМФОИДНЫЕ ОПУХОЛИ

LYMPHOID MALIGNANCIES

Патоморфологическая диагностика диффузной мелкоклеточной В-клеточной лимфомы красной пульпы селезенки

А.М. Ковригина, С.М. Коржова, Л.С. Аль-Ради, У.Л. Джулакян, Б.В. Бидерман, И.А. Якутик, А.Б. Судариков

ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России, Новый Зыковский пр-д, д. 4а, Москва, Российская Федерация, 125167

Pathomorphological Diagnosis of Splenic Diffuse Red Pulp Small B-Cell Lymphoma

AM Kovrigina, SM Korzhova, LS Al'-Radi, UL Dzhulakyan, BV Biderman, IA Yakutik, AB Sudarikov

Hematology Research Center, 4a Novyi Zykovskii pr-d, Moscow, Russian Federation, 125167

РЕФЕРАТ

Актуальность. В-клеточная лимфома селезенки неклассифицируемая — редкая и малоизученная нозологическая форма, впервые введенная в классификацию опухолей кроветворной и лимфоидной тканей ВОЗ в 2008 г. Эта форма лимфомы предполагает проведение дифференциальной диагностики между вариантным волосатоклеточным лейкозом (ВКЛ) и диффузной мелкоклеточной В-клеточной лимфомой красной пульпы селезенки (ДЛКПС).

Цель. Разработать критерии диагностики ДЛКПС путем сопоставления трепанобиоптатов костного мозга и операционного материала селезенки.

Методы. В патологоанатомическом отделении ГНЦ МЗ РФ проведено сопоставление трепанобиоптатов костного мозга и операционного материала селезенки (2013–2015 гг.) у 71 пациента (мужчины/женщины 1:2,6, возрастной диапазон 44–81 год, медиана 58 лет) с использованием морфологического и расширенного иммуногистохимического исследования. В целях анализа мутационного статуса IgHV и выявления мутаций *MAP2K1*, *NOTCH*, *BRAF* использован метод секвенирования по Сэнгеру, а также ПЦР-исследование. У 5 пациентов на образцах операционного материала селезенки проведено молекулярное исследование.

Результаты. У 5 (7 %) из 71 пациента установлен диагноз ДЛКПС. В двух группах пациентов (с нормальным и высоким числом лейкоцитов) в ткани селезенки морфологическая картина была сходной с опухолевым субстратом ВКЛ. При иммуногистохимическом исследовании во всех случаях отмечалась мономорфная экспрессия опухолевыми клетками CD20, DBA.44 при вариабельности экспрессии CD11c, TRAP, CD103, CD123. Ни в одном из 5 наблюдений не выявлено экспрессии CD25, CD27, Cyclin D1, Annexin-1. В костном мозге в отличие от ВКЛ и его вариантной формы отмечалась преимущественно интерстициально-внутрисосудистая скудная CD20+ лимфоидная инфильтрация (4 из 5 случаев) без различимых ядрышек в ядрах небольших лимфоидных клеток. В 1 наблюдении лимфоидная инфильтрация носила смешанный характер — CD20+ мелкоочагово-интерстициальная с внутрисосудистым компонентом.

ABSTRACT

Background. Unclassifiable splenic B-cell lymphoma/leukemia is a rare and poorly studied disorder introduced in the WHO classification of hematopoietic and lymphoid tissue malignancies for the first time in 2008. This type of lymphoma requires differential diagnosing between hairy cell leukemia-variant (HCL-V) and splenic diffuse red pulp small B-cell lymphoma (SDRPL).

Aim. To develop criteria for diagnosis of SDRPL by comparison of bone marrow biopsies (BMB) and surgical specimens of the spleen.

Methods. In the Department of Morbid Anatomy of the Hematology Research Center, preoperative BMBs and surgical specimens of the spleen (2013–2015) were compared in 71 patients (men/women ratio 1:2.6, age range 44–81, median age 58 years) using morphological and extended immunohistochemical studies. Sanger sequencing and PCR assay were carried out to analyze the mutational status of IgHV and to identify mutations in *MAP2K1*, *NOTCH*, *BRAF*.

Results. SDRPL was diagnosed in 5 (7 %) of 71 patients. In 2 groups of patients (with normal and high WBC count), the morphological features of spleen tissue were similar to those of a neoplastic substrate of HCL-V. The immunohistochemical assay demonstrates monomorphic expression of CD20 and DBA.44 and heterogeneous expression of CD11c, TRAP, CD103, CD123 in all cases. In none of the 5 cases, expression of CD25, CD27, Cyclin D1, Annexin-1 was found. In bone marrow (unlike HCL and HCL-V), predominantly interstitial and intravascular scant CD20+ lymphoid infiltration (4 of 5 cases) was found without detectable nucleoli in nuclei of small lymphoid cells. In 1 case, there was a combined lymphoid infiltration: CD20+ microfocal-interstitial infiltration with an intravascular component. No persistent molecular mutations in the spleen tissue specimens were found.

Conclusion. SDRPL is diagnosed in 7 % of splenic B-cell lymphomas. It is a rare disorder, whose verification requires an integrated approach taking into account clinical

Устойчивых молекулярных мутаций в исследованных образцах ткани селезенки не обнаружено.

Заключение. ДЛКПС составляет 7 % всех В-клеточных лимфом селезенки, является редкой нозологической формой, верификация которой требует комплексного подхода с учетом клинико-лабораторных данных, результатов проточной цитометрии, цитологического, морфологического, расширенного иммуногистохимического и молекулярно-биологического исследований.

Ключевые слова: иммуногистохимия, диффузная мелкоклеточная В-клеточная лимфома красной пульпы селезенки, спленэктомия, биопсия костного мозга.

Получено: 28 апреля 2016 г.

Принято в печать: 29 апреля 2016 г.

Для переписки: Алла Михайловна Ковригина, д-р биол. наук, профессор, Новый Зыковский пр-д, д. 4а, Москва, Российская Федерация, 125167; тел.: +7(495)612-61-12; e-mail: kovrigina.alla@gmail.com

Для цитирования: Ковригина А.М., Коржова С.М., Аль-Ради Л.С. и др. Патоморфологическая диагностика диффузной мелкоклеточной В-клеточной лимфомы красной пульпы селезенки. Клиническая онкогематология. 2016;9(3):287–95.

DOI: 10.21320/2500-2139-2016-9-3-287-295

cal and laboratory data, results of flow cytometry, cytological, morphological, extended IHC and molecular biological studies.

Keywords: immunohistochemistry, splenic diffuse red pulp small B-cell lymphoma, splenectomy, bone marrow biopsy.

Received: April 28, 2016

Accepted: April 29, 2016

For correspondence: Alla Mikhailovna Kovrigina, DSci, Professor, 4a Novyi Zykovskii pr-d, Moscow, Russian Federation, 125167; Tel.: 7(495)612-61-12; e-mail: kovrigina.alla@gmail.com

For citation: Kovrigina AM, Korzhova SM, Al'-Radi LS, et al. Pathomorphological Diagnosis of Splenic Diffuse Red Pulp Small B-Cell Lymphoma. Clinical oncohematology. 2016;9(3):287–95 (In Russ).

DOI: 10.21320/2500-2139-2016-9-3-287-295

ВВЕДЕНИЕ

Первичные лимфомы селезенки составляют около 1 % всех лимфом и представлены преимущественно В-клеточными лимфомами. К первичным В-клеточным лимфомам/лейкозам селезенки, клинически протекающим с выраженной спленомегалией, относятся достаточно хорошо изученные и имеющие строгие критерии диагностики нозологические формы: В-клеточная лимфома из клеток маргинальной зоны, волосатоклеточный лейкоз (ВКЛ), В-клеточная крупноклеточная лимфома, лимфоплазмодитарная лимфома. Кроме этих традиционных В-клеточных лимфоидных опухолей с поражением селезенки в классификации ВОЗ 2008 г. введена новая нозологическая форма — В-клеточная лимфома селезенки/лейкоз неклассифицируемая. К характерным чертам данного варианта лимфомы относят спленомегалию, вовлечение костного мозга, высокий уровень лейкоцитоза и абсолютный лимфоцитоз. В рамках В-клеточной лимфомы/лейкоза неклассифицируемой предполагается дифференциальная диагностика вариантной формы волосатоклеточного лейкоза (ВКЛ-В), характеризующейся в отличие от классического волосатоклеточного лейкоза (ВКЛ-К) aberrантным иммунофенотипом (CD25[—]) и отсутствием мутации *BRAFV600E*, и диффузной мелкоклеточной В-клеточной лимфомы красной пульпы селезенки (ДЛКПС). Однако критерии диагностики остаются малоизученным вопросом. В литературе присутствуют крайне немногочисленные сведения, посвященные диффузной В-клеточной лимфоме красной пульпы селезенки с описанием диагностических критериев при исследовании операционного материала (спленэктомия) [1]. Нередко публикации по данному вопросу содержат описания отдельных наблюдений с диагностикой по материалу трепанобиоптатов костного мозга. Иммунофенотипические характеристики с использованием

проточной цитометрии, цитологические признаки (наличие или отсутствие лимфоцитов с отростчатой цитоплазмой), критерии лабораторной диагностики (уровень лейкоцитов) при анализе литературных данных противоречивы и не позволяют систематизировать характерные признаки для дифференциальной диагностики двух вариантов лимфоидной опухоли в рамках группы В-клеточной лимфомы/лейкоза неклассифицируемой [2–8].

Необходимо отметить, что присутствие в мазках крови лимфоцитов с отростчатой цитоплазмой не является патогномоничным признаком для какой-либо нозологической формы из группы лимфом селезенки и возможно как при В-клеточной лимфоме из клеток маргинальной зоны, ВКЛ, так и при В-клеточной лимфоме/лейкозе неклассифицируемой, включающей ВКЛ-В и ДЛКПС. В 2011 г. были опубликованы данные об обнаружении патогномоничной для ВКЛ-К активирующей мутации *BRAFV600E* [9], что открыло новую страницу в изучении молекулярного патогенеза лимфоидных опухолей, появились уникальные возможности таргетной терапии ВКЛ-К с применением ингибитора мутантного гена — вемурафениба. В последующие годы данные о частоте мутации *BRAFV600E* были уточнены: она встречается примерно в 90 % случаев ВКЛ-К. В 10 % случаев ВКЛ-К была обнаружена экспрессия гена *HV4-34*, что сочеталось с отсутствием мутации *BRAF*. Экспрессия *HV4-34* не является патогномоничной для какого-либо варианта спленической лимфоидной В-клеточной опухоли и может встречаться при ВКЛ-В, В-клеточной лимфоме селезенки из клеток маргинальной зоны, В-клеточной лимфоме неклассифицируемой [1, 10, 11].

В настоящей работе представлен анализ морфологических, иммуногистохимических данных, полученных при исследовании трепанобиоптатов костного мозга и операционного материала селезенки у 71 пациента. Это позволило охарактеризовать критерии дифференциальной

диагностики ДЛКПС в рамках новой нозологической формы — В-клеточной лимфомы селезенки неклассифицируемой. Проведенные молекулярные исследования позволили выявить черты «биологического портрета» данного варианта лимфомы.

Цель исследования — среди группы пациентов с первичными В-клеточными лимфомами селезенки выявить В-клеточную лимфому неклассифицируемую и в рамках новой нозологии охарактеризовать дифференциально-диагностические критерии ДЛКПС.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В 2013–2015 гг. при сопоставлении с клинико-лабораторными данными проводили морфологическое и расширенное иммуногистохимическое исследование трепанобиоптатов костного мозга, выполненных на диагностическом этапе, и операционного материала селезенки у 71 пациента с массивной спленомегалией (соотношение мужчины/женщины 1:2,6; возрастной диапазон 44–81 год, медиана 58 лет).

Расширенное иммуногистохимическое исследование проведено на срезах с парафиновых блоков трепанобиоптатов костного мозга и селезенки с применением иммунофлуоресценции Leica Bond-Max и использованием антител к CD3 (клон F7.2.38, Dako), CD5 (клон 4C7, Leica Novocastra), CD10 (клон 4C7, Dako), CD11c (клон 5D11, Leica Novocastra), CD20 (клон L26, Dako), CD23 (клон 1B12, Leica Novocastra), CD25 (клон 305, Leica Novocastra), CD27 (клон 137B4, Leica Novocastra), Leukemia Hairy cell (клон DBA.44, Dako), CD103 (клон EP206, Epitomics), CD123 (клон BR4MS, Leica Novocastra), TRAP (клон 9C5, Cell Marque), Annexin-1 (клон MRQ-3, Cell Marque), Cyclin D1 (клон SP-4, Thermo Scientific).

Определение мутации V600E гена BRAF. Мутацию V600E гена *BRAF* определяли с помощью аллель-специфической полимеразной цепной реакции в реальном времени на приборе StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems) по методике, описанной ранее [12].

Определение мутаций в генах BRAF и MAP2K1. Мутации в экзонах 11 и 15 гена *BRAF* и в экзонах 2, 3

и 11 гена *MAP2K1* исследовали методом прямого секвенирования по Сэнгеру в соответствии с методикой, описанной ранее [13].

Определение клональных перестроек генов IgHV. Анализ перестроенных генов *IgHV* в опухолевых клетках проводили с использованием методики, описанной в статье [14].

РЕЗУЛЬТАТЫ

При морфологическом и иммуногистохимическом исследовании трепанобиоптатов костного мозга нозологическая принадлежность лимфом селезенки в 70 % случаев верифицирована на дооперационном этапе, что позволяет снизить число диагностических лапаротомий. В 61 (87 %) наблюдении установлен диагноз В-клеточной лимфомы селезенки из клеток маргинальной зоны, в 5 (7 %) — первичной В-крупноклеточной лимфомы селезенки. Из них в 2 случаях была В-крупноклеточная лимфома, богатая Т-клетками/гистиоцитами. При исследовании операционного материала 5 из 71 случая (в 1 из 5 случаев операционный материал селезенки прислан в формалине из другого медицинского учреждения, обследование пациента и диагностика проведены в ГНЦ) первичной В-клеточной лимфомы селезенки не отвечали критериям В-клеточной лимфомы из клеток маргинальной зоны или В-крупноклеточной лимфомы и были отнесены к ДЛКПС в рамках группы В-клеточных лимфом неклассифицируемых.

В отличие от В-клеточной лимфомы селезенки из клеток маргинальной зоны (рис. 1) или лимфомы из клеток мантии, при которых макроскопически ткань селезенки характеризуется белесоватым крапом (вкраплениями), в выделенных нами 5 случаях ДЛКПС в рамках группы В-клеточных лимфом неклассифицируемых ткань селезенки на разрезах имела гомогенный вид (рис. 2). В плане дифференциальной диагностики необходимо подчеркнуть, что морфологически В-клеточная лимфома из клеток маргинальной зоны характеризуется крупнодулярным строением с вовлечением фолликулов белой пульпы и экстрафолликулярными нодулярными струк-

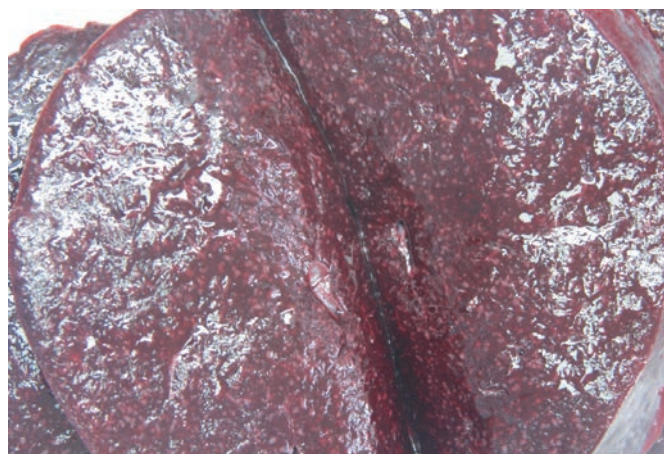


Рис. 1. Спленэктомия. Макропрепарат. В-клеточная лимфома селезенки из клеток маргинальной зоны. Поверхность разреза селезенки с отчетливым белесоватым крапом (вкраплениями)

Fig. 1. Splenectomy. Gross specimen. Marginal zone B-cell splenic lymphoma. The section surface is with distinct off-white impregnations



Рис. 2. Спленэктомия. Макропрепарат. Диффузная мелкоклеточная В-клеточная лимфома красной пульпы селезенки. Поверхность разреза селезенки однородная, вишневого цвета

Fig. 2. Splenectomy. Gross specimen. Splenic diffuse red pulp small B-cell lymphoma. The section surface is homogeneous and cherry-colored

турами в красной пульпе (рис. 3), нередко присутствуют диффузные участки лимфоидного пролиферата.

В 5 из 71 случая ДЛКПС морфологическая картина была однотипной и характеризовалась диффузным пролифератом из лимфоидных клеток среднего размера с узкой светлой цитоплазмой, без отчетливых или укрупненных ядрышек (рис. 4), с внутрисинусным расположением лимфоидных клеток. Отмечались «заблачивание»

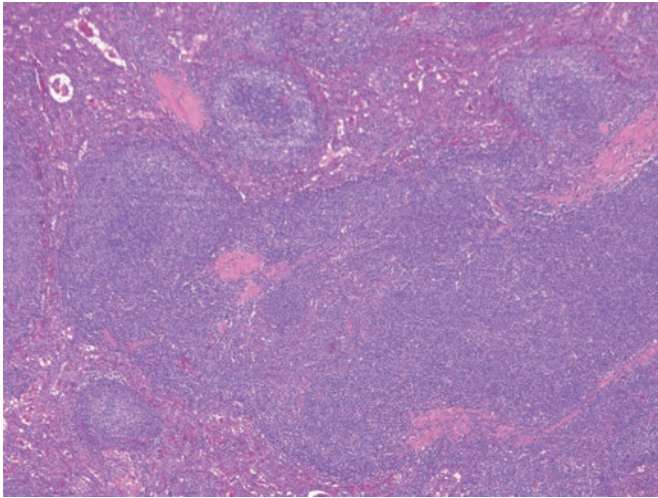


Рис. 3. В-клеточная лимфома из клеток маргинальной зоны селезенки. В белой пульпе ткани селезенки определяются крупные нодулярные структуры с небольшими экстрафолликулярными структурами в красной пульпе двухкомпонентного строения: в центре структур — небольшие лимфоидные клетки, по периферии фолликулоподобных структур — пласты лимфоидных клеток с морфологией моноцитоподобных В-клеток. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 50$

Fig. 3. Marginal zone B-cell splenic lymphoma. Large nodular structures are found in the splenic white pulp with small extrafollicular structures in the red pulp; they have two-component morphology: small lymphoid cells are situated in the center of the structure, and layers of lymphoid cells (with the morphology of monocytoid B-cells) along the periphery of follicle-like structures. Hematoxylin and eosin stain, $\times 50$

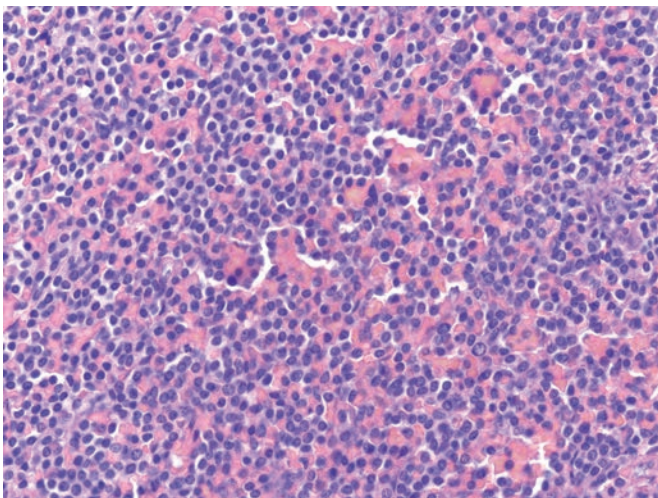


Рис. 4. Спленэктомия. Диффузная мелкоклеточная В-клеточная лимфома красной пульпы селезенки. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 400$

Fig. 4. Splenectomy. Splenic diffuse red pulp small B-cell lymphoma. Hematoxylin and eosin stain, $\times 400$

кровью селезеночных тяжей, очаги массивных кровоизлияний. Среди диффузного лимфоидного пролиферата присутствовали резидуальные периартериолярные зоны. В биоптатах печени лимфоидные клетки с аналогичной морфологией отличались интрасинусоидным расположением (рис. 5). Ткань печени характеризовалась признаками белковой и/или жировой дистрофией.

При иммуногистохимическом исследовании (рис. 6) на срезах с парафиновых блоков ткани селезенки в 5 наблюдениях значимых иммуногистохимических различий не обнаружено. Отмечалась мономорфная экспрессия CD20 (интенсивная мембранная реакция), DBA.44 (рис. 6, А, Б) и варибельность экспрессии CD11с, TRAP, CD123 (рис. 6, В, К, Ж). При реакции с антителами к CD103 в 2 случаях была выявлена мономорфная экспрессия маркера лимфоидными клетками опухоли (рис. 6, Е). Реакций с антителами к CD25, CD27, Cyclin D1 и Annexin-1 (рис. 6, Г, Д, З, И) в клетках опухолевого лимфоидного пролиферата не обнаружено ни в одном наблюдении (при соответствующем внутреннем положительном контроле).

В исследуемой группе было 5 пациентов (2 — мужчины, 3 — женщины) в возрасте 52–71 год. При анализе гемограмм у 2 больных имел место нормальный уровень лейкоцитов ($5 \times 10^9/\text{л}$) с относительным лимфоцитозом, у 3 — лейкоцитоз ($21\text{--}75 \times 10^9/\text{л}$) с абсолютным лимфоцитозом. Размеры селезенки были от $19,0 \times 7,5 \times 5,0$ до $46,6 \times 26,0 \times 15,7$ см. Количество лимфоцитов с отростчатой цитоплазмой в гемограмме составило 12–60 %.

Особый интерес представляют результаты сравнительного изучения трепанобиоптатов костного мозга у пациентов с нормальным и высоким числом лейкоцитов в плане дифференциальной диагностики с ВКЛ-В. В трепанобиоптатах костного мозга в 4 случаях морфологически выявлена достаточно скудная лимфоидная инфильтрация с выраженным внутрисосудистым расположением (рис. 7). Иммуногистоархитектоника визуализирует внутрисосудистый и интерстициальный CD20-позитивный лимфоидный инфильтрат из мелких клеток (рис. 8).

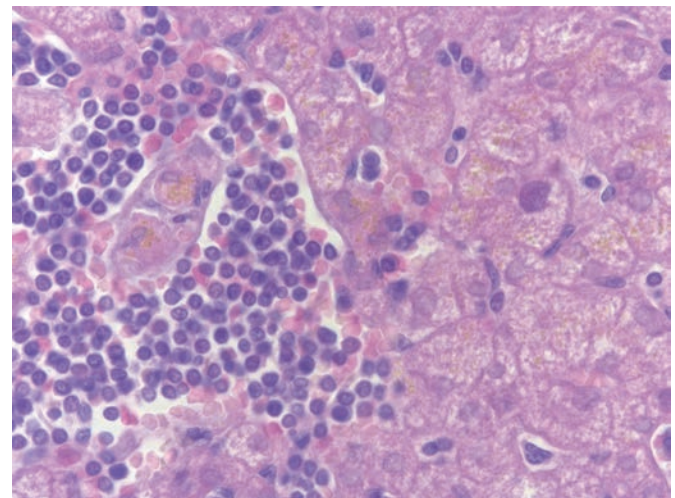


Рис. 5. Биоптат печени. Диффузная мелкоклеточная В-клеточная лимфома красной пульпы селезенки с вовлечением печени: внутрисинусоидное расположение мелких лимфоидных клеток. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 630$

Fig. 5. Liver biopsy specimen. Splenic diffuse red pulp small B-cell lymphoma with liver involvement: intrasinusoidal location of small lymphoid cells. Hematoxylin and eosin stain, $\times 630$

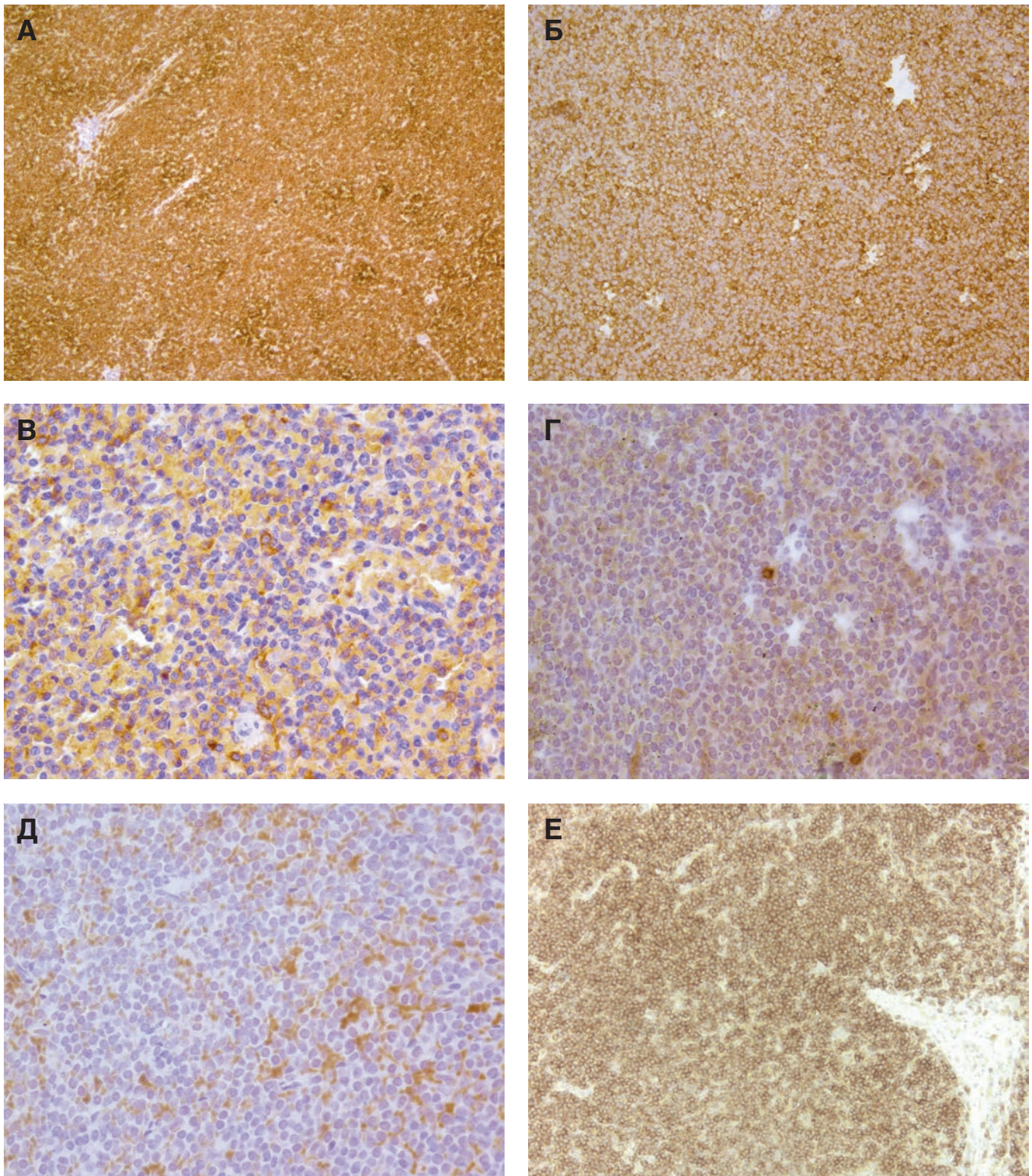


Рис. 6. Диффузная мелкоклеточная В-клеточная лимфома красной пульпы селезенки:

A — экспрессия опухолевыми клетками CD20 (мономорфно). Иммуноферментный метод, $\times 100$; *B* — экспрессия опухолевыми клетками DBA.44 (мономорфно). Иммуноферментный метод, $\times 200$; *B* — экспрессия опухолевыми клетками CD11c (положительно небольшая часть клеток лимфоидного пролиферата). Иммуноферментный метод, $\times 200$; *Г* — реакция с антителами к CD25. Опухолевые клетки отрицательны (внутренний контроль: отдельные лимфоидные клетки положительны). Иммуноферментный метод, $\times 400$; *Д* — реакция с антителами к CD27. Опухолевые клетки отрицательны (внутренний контроль: отдельные клетки положительны). Иммуноферментный метод, $\times 400$; *Е* — экспрессия опухолевыми клетками CD103 (мономорфно). Иммуноферментный метод, $\times 200$

Fig. 6. Splenic diffuse red pulp small B-cell lymphoma:

A — CD20 expression with tumor cells (monomorphically). Immunoenzyme method, $\times 100$; *B* — DBA.44 expression with tumor cells (monomorphically). Immunoenzyme method, $\times 200$; *B* — CD11c expression with tumor cells (a small number of lymphoid proliferation cells is positive). Immunoenzyme method, $\times 200$; *Г* — reaction with anti-CD25 antibodies. Tumor cells are negative (internal control: some lymphoid cells are positive). Immunoenzyme method, $\times 400$; *Д* — reaction with anti-CD27 antibodies. Tumor cells are negative (internal control: some cells are positive). Immunoenzyme method, $\times 400$; *Е* — CD103 expression with tumor cells (monomorphically). Immunoenzyme method, $\times 200$

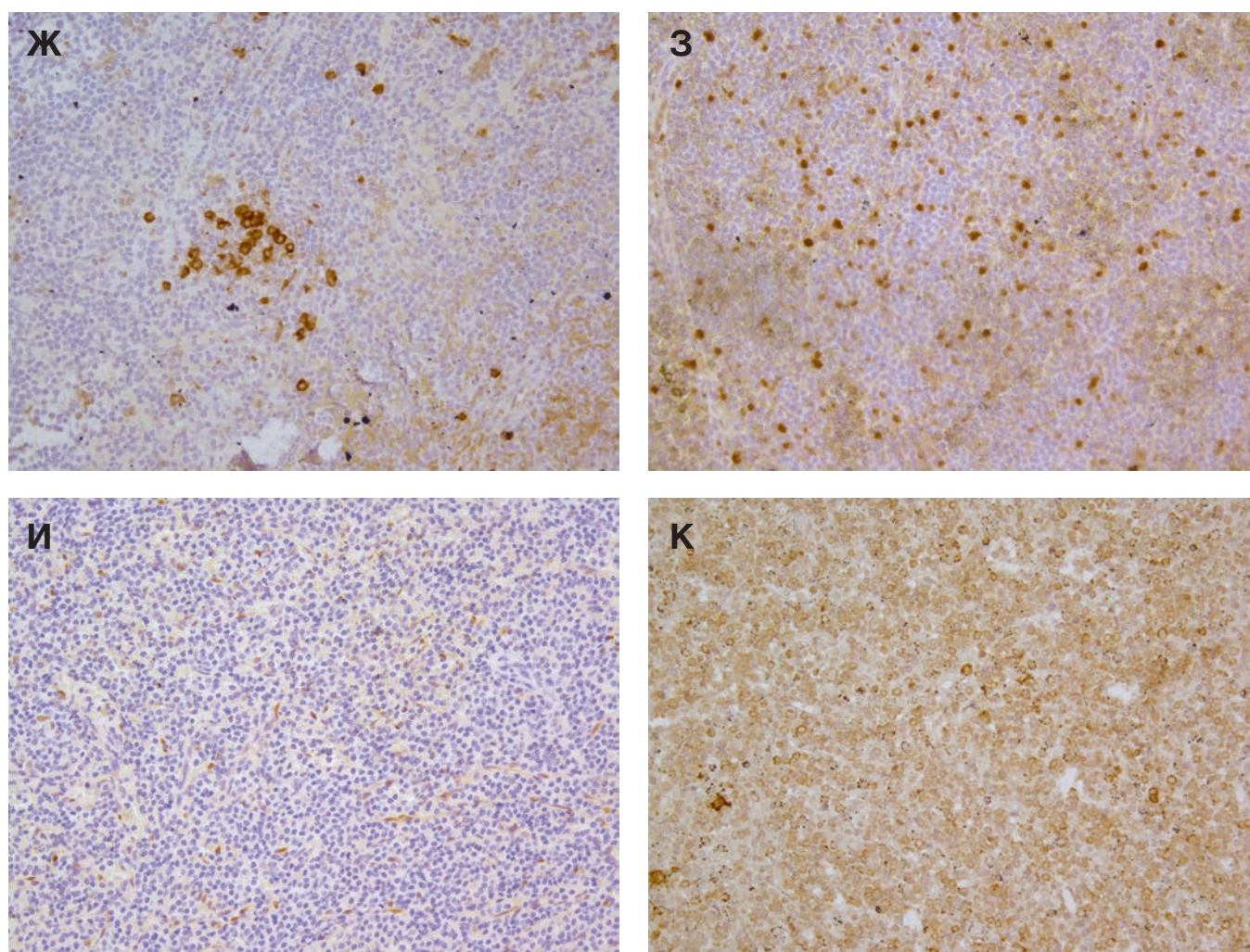


Рис. 6. Диффузная мелкоклеточная В-клеточная лимфома красной пульпы селезенки (продолжение):

Ж — реакция с антителами к CD123. Опухолевые клетки отрицательны (внутренний контроль: отдельные клетки гранулоцитарного ряда положительны). Иммуноферментный метод, $\times 200$; З — реакция с антителами к Annexin-1. Опухолевые клетки отрицательны (внутренний контроль: отдельные клетки гранулоцитарного ряда положительны). Иммуноферментный метод, $\times 200$; И — реакция с антителами к Cyclin D1. Опухолевые клетки отрицательны (внутренний контроль: гистиоциты, клетки эндотелия положительны). Иммуноферментный метод, $\times 200$; К — экспрессия опухолевыми клетками TRAP (положительна часть клеток). Иммуноферментный метод, $\times 200$

Fig. 6. Splenic diffuse red pulp small B-cell lymphoma (continued):

Ж — reaction with anti-CD123 antibodies. Tumor cells are negative (internal control: some granulocyte cells are positive). Immunoenzyme method, $\times 200$; З — reaction with anti-Annexin-1 antibodies. Tumor cells are negative (internal control: some granulocyte cells are positive). Immunoenzyme method, $\times 200$; И — reaction with anti-Cyclin D1 antibodies. Tumor cells are negative (internal control: histiocytes and endothelial cells are positive). Immunoenzyme method, $\times 200$; К — TRAP expression with tumor cells (a small number of lymphoid proliferation cells is positive). Immunoenzyme method, $\times 200$

У 1 из 5 пациентов в костном мозге выявлена очагово-интерстициальная мелкоклеточная лимфоидная инфильтрация с наличием внутрисосудистого компонента.

Результаты молекулярно-генетических исследований (табл. 1):

- ни в одном из 5 случаев мутации *BRAFV600E* не обнаружено;
- секвенирование экзонов 11 и 15 гена *BRAF* и экзонов 2, 3 и 11 гена *MAP2K1* выявило наличие активирующей мутации G128D гена *MAP2K1* у 1 из 5 пациентов;
- у 4 пациентов было показано наличие мутировавших генов варибельного региона иммуноглобулинов (*IgHV*), в перестройках использовались HV-гены 3-го и 4-го семейств. У 1 пациента мутационный статус установить не удалось.

ОБСУЖДЕНИЕ

Пациенты исследованной группы характеризовались нормальным или высоким уровнем лейкоцитов с относительным или абсолютным лимфоцитозом, что требует проведения дифференциальной диагностики при нормальном уровне лейкоцитов с В-клеточной лимфомой селезенки из клеток маргинальной зоны, при лейкоцитозе — с ВКЛ-В, которая характеризуется aberrantным иммунофенотипом (CD25⁻) и отсутствием ответа на таргетную терапию (отсутствует *mutBRAFV600E*). Морфологическая картина при исследовании операционного материала селезенки во всех 5 случаях была идентичной и напоминала субстрат ВКЛ. Вместе с тем поражение костного мозга в этих случаях характеризовалось преимущественно скудной внутрисосудисто-интерстици-

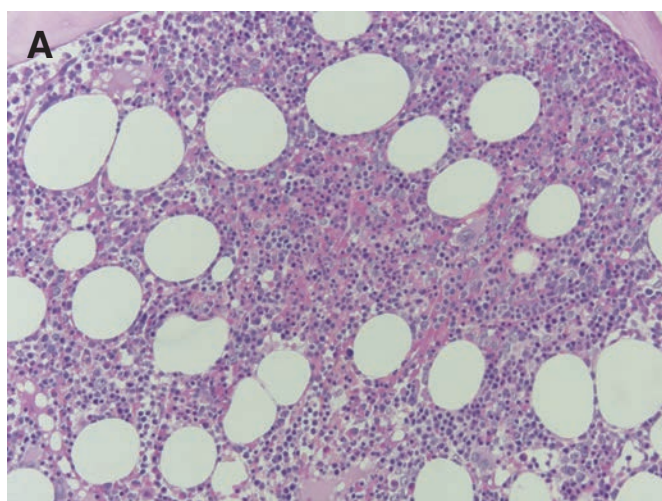


Рис. 7. Трепанобиоптат костного мозга. Диффузная мелкоклеточная В-клеточная лимфома красной пульпы селезенки с вовлечением костного мозга. Среди элементов миелопоэза отмечается интерстициально-внутрисосудистая мелкоклеточная лимфоидная инфильтрация. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 200$

Fig. 7. Bone marrow trepanobiopsy. Splenic diffuse red pulp small B-cell lymphoma with bone marrow involvement. There is interstitial-intravascular small-cell lymphoid infiltration among the elements of myelopoiesis. Hematoxylin and eosin stain, $\times 200$

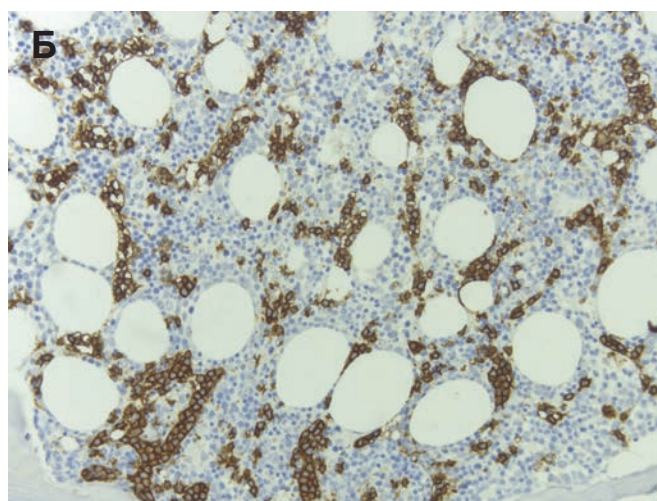


Рис. 8. Трепанобиоптат костного мозга. Диффузная мелкоклеточная В-клеточная лимфома красной пульпы селезенки с вовлечением костного мозга. Экспрессия опухолевыми клетками CD20 с визуализацией преимущественно внутрисосудистого расположения. Иммуноферментный метод, $\times 200$

Fig. 8. Bone marrow trepanobiopsy. Splenic diffuse red pulp small B-cell lymphoma with bone marrow involvement. CD20 expression with tumor cells with mainly intravascular location. Immunoenzyme method, $\times 200$

Таблица 1. Результаты молекулярно-генетических исследований у пациентов с диффузной мелкоклеточной В-клеточной лимфомой красной пульпы селезенки

Пациент №	MAP2K1		BRAF			BRAFV600E	Мутационный статус IgHV	
	Экзон 2	Экзон 3	Экзон 11	Экзон 11	Экзон 15		Сходство с герминальным геном, %	HV
1	-	-	-	-	-	-	88,1	4-34*02
2	-	-	-	-	-	-	93,7	4-59*08
3	-	-	-	-	-	-	Не определяется	
4	-	G128D	-	-	-	-	97,6	3-23*01
5	-	-	-	-	-	-	71,9	3-30*18

альной инфильтрацией (дискордантность лимфомного поражения костного мозга). Необходимо подчеркнуть, что при ВКЛ (классической или вариантной форме) в костном мозге отмечается, как правило, значительная диффузно-интерстициальная лимфоидная инфильтрация. Однако вовлечение костного мозга с преимущественно внутрисосудистым расположением клеток опухолевого лимфоидного субстрата не является патогномичным для ДЛКПС, а встречается при В-клеточной лимфоме из клеток маргинальной зоны (селезенки, экстра nodальной и, иногда, нодальной формах), лимфоме из клеток мантии с поражением костного мозга. Таким образом, наличие высокого уровня лейкоцитоза, спленомегалии в отсутствие *mutBRAFV600E* и экспрессии CD25 при проточной цитометрии нетождественно диагнозу ВКЛ-В и требует углубленного изучения трепанобиоптатов костного мозга на дооперационном этапе при сопоставлении с операционным материалом селезенки и расширенного иммуногистохимического исследования.

В плане комплексной диагностики В-клеточных лимфом неклассифицируемых необходимо отметить, что выполнение молекулярного исследования на наличие мутации *BRAFV600E* в настоящее время считается необходимым условием для верификации/исключения ВКЛ, в т. ч. при отсутствии экспрессии CD25 по данным проточной цитометрии. Вместе с тем

до 10 % ВКЛ-К *BRAFV600E*-негативны, что коррелирует с экспрессией гена *IgHV4-34* [15]. При изучении мутационного статуса *IgHV* ДЛКПС в 1 случае мы выявили экспрессию *HV4-34*. Подобные данные получены G. Kanellis и соавт. [1], D. Martinez и соавт. [16]. Экспрессия *HV4-34* может встречаться также при В-клеточной лимфоме из клеток маргинальной зоны селезенки, лимфоме из клеток зоны мантии, В-ХЛЛ [11, 17, 18] и свидетельствует о гетерогенности соматических мутаций и активации различных сигнальных путей при некоторых вариантах лимфом, но, возможно, и о сходстве основных молекулярных событий в процессе лимфогенеза. Кроме того, у большинства пациентов выявлены мутировавшие гены *IgHV*, аналогично В-клеточным лимфомам селезенки из клеток маргинальной зоны [19]. Выяснить корреляцию мутационного статуса *IgHV* и клинического течения ДЛКПС — задача будущих исследований, учитывая редкость данной патологии. Сейчас лишь констатируем, что у 1 из 5 пациентов исследуемой группы с ДЛКПС через 2 года после диагностики, выполнения спленэктомии без последующего противоопухолевого лечения отмечена трансформация в диффузную В-крупноклеточную лимфому в мезентериальном лимфатическом узле.

В-клеточные лимфомы селезенки относятся к многочисленным вариантам лимфом, в молекулярном

патогенезе которых столь важное значение имеет сигнальный путь МАРК, включающий по крайней мере 4 основных сигнальных каскада. Один из них — RAS-МЕК-ЕРК (ЕРК1/ЕРК2) — каскад внутриклеточной передачи сигнала, участвующий в процессах регуляции пролиферации, апоптоза, выживаемости и дифференцировки клеток, более характерный для эпителиальных опухолей. Вместе с тем в последние годы появились данные о взаимодействии различных сигнальных путей при В-клеточной лимфоме селезенки неклассифицируемой, объединяющей сигнальные пути ЕРК1/ЕРК2, АКТ/mTOR и NOTCH [20], что более характерно для лимфоидных опухолей и создает перспективы для новых терапевтических подходов с использованием ингибиторов mTOR или МЕК1. Согласно полученным нами данным, мутация *MAP2K1*, встречающаяся при солидных опухолях или в части случаев лангергансоклеточного гистиоцитоза [15], обнаружена у 1 пациента с ДЛКПС. Ни в одном наблюдении из исследованной группы 5 пациентов не выявлены мутации *BRAFV600E*, *NOTCH1*.

В результате проведенного расширенного исследования можно сделать вывод об отсутствии какого-либо одного специфичного маркера, позволяющего разграничить ВКЛ-В и ДЛКПС с гетерогенным характером экспрессии CD11c, CD103. Так же как и при В-клеточной лимфоме селезенки из клеток маргинальной зоны, в данном случае иммуногистохимическая верификация основывается на методе исключения — отсутствии экспрессии CD25, CD27, Cyclin D1, Annexin-1.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Согласно полученным нами данным, ДЛКПС составляет 7 % первичных В-клеточных лимфом селезенки. Диагностика этого варианта лимфомы в группе В-клеточной лимфомы селезенки неклассифицируемой предполагает сопоставление трепанобиоптатов костного мозга и операционного материала селезенки, характеризуется отсутствием экспрессии CD25, CD27, Cyclin D1, Annexin-1 при вариабельной экспрессии CD11c, CD103, CD123, TRAP. Диффузный лимфоидный инфильтрат в селезенке, напоминающий по морфологической картине ВКЛ, сочетается в костном мозге со скудной, преимущественно внутрисосудистой лимфоидной инфильтрацией с компонентами интерстициального или мелкоочагового (редко) поражения. Молекулярные исследования позволили выявить признаки гетерогенности молекулярного патогенеза данного варианта лимфомы — отсутствие патогномичной соматической мутации при исследовании *MAP2K1*, *BRAFV600E*, *NOTCH1*. Кроме того, в большинстве исследованных случаев обнаружены мутировавшие гены *IgHV*. Лабораторные гематологические характеристики при ДЛКПС также вариабельны и могут характеризоваться нормальным уровнем лейкоцитов или лейкоцитозом с абсолютным лимфоцитозом. Проведение дифференциальной диагностики с ВКЛ-В только с помощью лабораторных данных (высокий уровень лейкоцитоза/абсолютный лимфоцитоз) в сочетании с отсутствием экспрессии CD25, CD103 при проточной цитометрии не считается достаточным. У пациентов со спленомегалией дифференциальная диагностика ДЛКПС требует комплексного подхода с использованием патоморфологического исследования трепанобиоптата костного мозга и

операционного материала селезенки, цитологического, иммунофенотипического/иммуногистохимического, молекулярно-биологического методов исследования при сопоставлении с клинико-лабораторными данными.

КОНФЛИКТЫ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. А.М. Ковригина, член редакционной коллегии журнала «Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика», не участвовала в рецензировании рукописи.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа не имела спонсорской поддержки.

ВКЛАД АВТОРОВ

Концепция и дизайн: А.М.Ковригина.

Сбор и обработка данных: А.М.Ковригина, С.М. Коржова, Б.В. Бидерман.

Предоставление материалов исследования: все авторы.

Анализ и интерпретация данных: А.М. Ковригина, С.М. Коржова.

Подготовка рукописи: А.М. Ковригина.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы статьи выражают благодарность профессору М. Piris (Испания) за консультативную помощь на диагностическом этапе.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Kanellis G, Mollejo M, Montes-Moreno S, et al. Splenic diffuse red pulp small B-cell lymphoma: revision of a series of cases reveals characteristic clinico-pathological features. *Haematologica*. 2010;95(7):1122–9. doi: 10.3324/haematol.2009.013714.
2. Traverse-Glehen A, Baseggio L, Callet-Bauchu E, et al. Hairy cell leukaemia-variant and splenic red pulp lymphoma: a single entity? *Br J Haematol*. 2010;150:113–5. doi: 10.1111/j.1365-2141.2010.08153.x.
3. Raess PW, Mintzer D, Husson M, Nakashima MO. BRAF V600E is also seen in unclassifiable splenic B-cell lymphoma/leukemia, a potential mimic of hairy cell leukemia. *Blood*. 2013;122(17):84–5. doi: 10.1182/blood-2013-07-513523.
4. Jain P, Pemmaraju N, Ravandi F. Update on the Biology and Treatment Options for Hairy Cell Leukemia. *Curr Treat Opt Oncol*. 2014;15(2):187–209. doi: 10.1007/s11864-014-0285-5.
5. Naresh K. Grey zone lymphoid neoplasms with features overlapping between splenic marginal zone lymphoma and hairy cell leukaemia: splenic B-cell lymphoma/leukaemia, unclassifiable. *J Haematopathol*. 2011;4(2):93–100. doi: 10.1007/s12308-011-0092-x.
6. Mollejo M, Algara P, Mateo MS, et al. Splenic small B-cell lymphoma with predominant red pulp involvement: a diffuse variant of splenic marginal zone lymphoma? *Histopathology*. 2002;40(1):22–30. doi: 10.1046/j.1365-2559.2002.01314.x.
7. Traverse-Glehen A, Baseggio L, Bauchu EC, et al. Splenic red pulp lymphoma with numerous basophilic villous lymphocytes: a distinct clinico-pathologic and molecular entity? *Blood*. 2008;111(4):2253–60. doi: 10.1182/blood-2007-07-098848.
8. Behdad A, Bailey NG. Diagnosis of Splenic B-Cell Lymphomas in the Bone Marrow. *Arch Pathol Lab Med*. 2014;138(10):1295–301. doi: 10.5858/arpa.2014-0291-cc.
9. Tiacci E, Trifonov V, Schiavoni G, et al. BRAF mutations in hairy-cell leukemia. *N Engl J Med*. 2011;364(24):2305–15. doi: 10.1056/nejmoa1014209.
10. Xi L, Arons E, Navarro W, et al. Both variant and IGHV4-34-expressing hairy cell leukemia lack the BRAF V600E mutation. *Blood*. 2012;119(14):3330–2. doi: 10.1182/blood-2011-09-379339.
11. Bikos V, Darzentas N, Hadzidimitriou A, et al. Over 30% of patients with splenic marginal zone lymphoma express the same immunoglobulin heavy variable gene: ontogenetic implications. *Leukemia*. 2012;26(7):1638–46. doi: 10.1038/leu.2012.3.

- 12.** Якутик И.А., Аль-Ради Л.С., Бидерман Б.В. и др. Применение аллель-специфичной ПЦР-РВ для определения мутации В-RAF V600E у больных волосатоклеточным лейкозом. *Гематология и трансфузиология* 2014;59(2):16–9.
[Yakutik IA, Al-Radi LS, Biderman BV, et al. Detection of B-RAF V600E mutation in patients with hairy cell leukemia by allele-specific RT-PCR. *Gematologiya i transfuziologiya*. 2014;59(2):16–9. (In Russ)]
- 13.** Якутик И.А., Аль-Ради Л.С., Джулакян У.Л. и др. Мутации в генах BRAF и MAP2K1 при волосатоклеточном лейкозе и селезеночной В-клеточной лимфоме из клеток маргинальной зоны. *Онкогематология*. 2016;11(1):34–6. doi: 10.17650/1818-8346-2016-11-1-34-36.
[Yakutik IA, Al-Radi LS, Julakyan UL, et al. BRAF and MAP2K1 mutations in hairy cell leukemia and splenic marginal zone B-cell lymphoma. *Oncohematology*. 2016;11(1):34–6. doi: 10.17650/1818-8346-2016-11-1-34-36. (In Russ)]
- 14.** Бидерман Б.В., Никитин Е.А., Сергиенко Т.Ф. и др. Репертуар генов тяжелой цепи иммуноглобулинов при В-клеточном хроническом лимфолейкозе в России и Беларуси. *Онкогематология*. 2012;7(3):38–42.
[Biderman BV, Nikitin EA, Sergienko TF, et al. The repertoire of heavy chain immunoglobulin genes in B-cell chronic lymphocytic leukemia in Russia and Belarus. *Onkogematologiya*. 2012;7(3):38–42. (In Russ)]
- 15.** Waterfall JJ, Arons E, Walker RL, et al. High prevalence of MAP2K1 mutations in variant and IGHV4-34-expressing hairy-cell leukemias. *Nat Genet*. 2014;46(1):8–10. doi: 10.1038/ng.2828.
- 16.** Martinez D, Navarro A, Martinez-Trillos A, et al. NOTCH1, TP53, and MAP2K1 Mutations in Splenic Diffuse Red Pulp Small B-cell Lymphoma Are Associated With Progressive Disease. *Am J Surg Pathol*. 2016;40(2):192–201. doi: 10.1097/pas.0000000000000523.
- 17.** Hockley SL, Giannouli S, Morilla A, et al. Insight into the molecular pathogenesis of hairy cell leukaemia, hairy cell leukaemia variant and splenic marginal zone lymphoma, provided by the analysis of their IGH rearrangements and somatic hypermutation patterns. *Br J Haematol*. 2010;148(4):666–9. doi: 10.1111/j.1365-2141.2009.07962.x.
- 18.** Navarro A, Clot G, Royo C, et al. Molecular subsets of mantle cell lymphoma defined by the IGHV mutational status and SOX11 expression have distinct biologic and clinical features. *Cancer Res*. 2012;72(20):5307–16. doi: 10.1158/0008-5472.can-12-1615.
- 19.** Джулакян У.Л., Бидерман Б.В., Гемджян Э.Г. и др. Молекулярный анализ генов иммуноглобулина в опухолевых В-клетках при лимфоме селезенки из клеток маргинальной зоны. *Терапевтический архив*. 2015;87(7):58–63.
[Julakyan UL, Biderman BV, Gemdzian EG, et al. Molecular analysis of immunoglobulin genes in the tumor B cells in splenic marginal zone lymphoma. *Terapevticheskii arkhiv*. 2015;87(7):58–63. (In Russ)]
- 20.** El-Habr EA, Levidou G, Trigka E-A, et al. Complex interactions between the components of the PI3K/AKT/mTOR pathway, and with components of MAPK, JAK/STAT and Notch-1 pathways, indicate their involvement in meningioma development. *Virchows Arch*. 2014;465:473–85. doi: 10.1007/s00428-014-1641-3.

