

АНОТАЦІЯ

Поліщук А.С. Імуноцитохімічні характеристики деяких форм В-клітинних неходжкінських лімфом в стадії лейкемізації – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктор філософії у галузі знань 09 - Біологія за спеціальністю 091 – Біологія (Онкологія). – Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького Національна академія наук України. Київ, 2021.

Відповідно до даних Національного канцер-реєстру України неходжкінські лімфоми характеризуються зростанням рівня захворюваності та смертності. В Україні загальна кількість випадків захворювання на неходжкінські злоякісні лімфоми в 2020 році становила 2382 (серед них 1186 чоловіків і 1196 жінок). Показник смертності становив – 2,8 на 100 тисяч населення [2].

За даними МОЗ України, на теперішній час в Україні понад 32 тисячі людей хворіють на злоякісні лімфоми і відмічено тенденцію до зниження середнього віку захворілих. Не дивлячись на те, що близько 80% випадків лімфом є виліковними, важливою умовою успішного лікування є правильна та своєчасна діагностика.

Сучасна класифікація неходжкінських злоякісних лімфом (НХЛ) базується на аналізі клінічних даних, результатів морфологічного, імуногістохімічного, цитогенетичного і молекулярно-генетичних досліджень. Більш 85% НХЛ мають В-клітинне походження (В-НХЛ), інші лімфоїдні пухлини виникають з Т-клітин чи природних кілерних клітин (ПК-клітин).

Дана дисертаційна робота присвячена дослідженню цитоморфологічних, цитохімічних та імунофенотипових характеристик лімфоїдних клітин крові та кісткового мозку для виявлення розповсюдження патологічного процесу в організмі, проведенню диференційної діагностики та встановленню діагнозу у випадках неможливості проведення біопсії

лімфатичного вузла чи отримання матеріалу із екстранодальних осередків ураження.

Основна увага досліджень в даній дисертаційній роботі була зосереджена на порівняльному аналізі цитоморфологічних, цитохімічних та імунофенотипових характеристик субстратних клітин при деяких формах В-клітинних лімфопрліферативних захворювань, та розробці алгоритмів диференційної діагностики: В-клітинного хронічного лімфолейкозу (В-ХЛЛ), лімфоми з малих лімфоцитів (ЛМЛ), моноклонального В-клітинного лімфоцитозу (МВЛ); лімфоми червоної пульпи селезінки (ЛЧПС), волосковоклітинного лейкозу - варіанту (ВКЛ-В), волосковоклітинного лейкозу (ВКЛ), лімфоми маргінальної зони селезінки (ЛМЗС); лімфоми з клітин мантийної зони (ЛКМ), бластоїдного варіанту лімфоми клітин мантиї (БВ-ЛКМ), дифузної В-великоклітинної лімфоми (ДВВКЛ).

За результатами наших досліджень основними критеріями діагностики та встановлення діагнозу В-ХЛЛ, є наявність патологічних клітин, які за даними морфологічного дослідження є малими лімфоцитами, у яких виявляється реакція на кислу фосфатазу (КФ) від слабкої дрібногранулярної до помірної дифузногранулярної, яка інгібується при додаванні інгібіторів – іонів тартрату. Злоякісно трансформовані клітини при ХЛЛ мають наступний імунофенотип: CD19⁺, CD20⁺, CD22⁺, CD23⁺ CD5⁺. У випадках відсутності одного з антигенів CD23, або CD5, необхідно проводити диференційну діагностику з ЛКМ (Циклін D1⁺) та фолікулярною лімфомою (ФЛ) (CD10⁺).

В-ХЛЛ та ЛМЛ в класифікації ВООЗ (2017 р.) пухлин лімфоїдної та кровотворної тканин розглядається як єдина нозологічна форма ХЛЛ/ЛМЛ. Основою для цього слугувала подібність їх цитоморфологічних ознак, імунофенотипу, молекулярно-генетичних та гістопатологічних особливостей. Проте на основі порівняльного аналізу було встановлено, що дані патології мають характерні відмінності. При встановленні діагнозу ХЛЛ важливими діагностичними критеріями є дифузна інфільтрація кісткового мозку субстратними клітинами (> 30%) та абсолютний лімфоцитоз в крові (>

$5 \times 10^9/\text{л}$). Діагноз ЛМЛ може бути встановлений у випадках коли цитоморфологічні та імунофенотипові характеристики подібні до ХЛЛ, але не спостерігаються інфільтрація кісткового мозку субстратними лімфоїдними клітинами (від 15 до 30%) та абсолютний лімфоцитоз в периферичній крові ($< 5 \times 10^9/\text{л}$).

Вперше на підставі комплексного дослідження було поглиблено охарактеризовано особливості патологічних клітин в периферичній крові (п/к) та кістковому мозку (к/м) у пацієнтів з МВЛ (новою нозологічною формою у порівнянні з попередньою класифікацією ВООЗ 2008 р.). Чи виконує дана патологія роль відправної точки у розвитку інших гематологічних патологій або ж є процесом, який розвивається в організмі безсимптомно достеменно не встановлено. В нашій роботі ми продемонстрували можливий зв'язок даного захворювання з іншими гематологічними патологіями: мієлодиспластичними синдромами (МДС), гострими мієлоїдними лейкозами (ГМЛ) та ХЛЛ, однак для підтвердження даних результатів необхідне подальше дослідження. Даний процес може бути діагностованим при умові відсутності інфільтрації кісткового мозку субстратними клітинами ($< 15\%$) та абсолютному лімфоцитозі в периферичній крові ($< 5 \times 10^9/\text{л}$), з цитоморфологічними та імунофенотиповими характеристиками патологічних клітин подібних до В-ХЛЛ та ЛМЛ.

Вперше визначені маркерні імуноцитохімічні ознаки субстратних клітин при ЛЧПС та ВКЛ-В. Дані патології виділяються в якості окремих підгруп В-клітинної лімфоми/лейкозу селезінки некласифікованої в класифікації ВООЗ 2017 р. пухлин лімфоїдної та кровотворної тканин. Як при ЛМЗС та ВКЛ особливістю даних захворювань є наявність патологічних клітин з характерними цитоплазматичними виростами. Натомість, вперше на основі комплексного порівняльного дослідження встановлено, що ці пухлини мають ряд відмінних морфоцитохімічних та імунофенотипових характеристик. Диференційна діагностика та встановлення уточненого

діагнозу є критично важливими, враховуючи, що перебіг захворювання і прогноз при цих патологічних процесах є різними. Відрізняється і тактика лікування.

Імунофенотипова характеристика лімфоцитів з ворсинчатою цитоплазмою

	CD19	CD20	CD22	CD11c	CD25	CD103	Циклін D1
ЛМЗС	+	+	+	-/+	-/+	-/+	-
ВКЛ	+	+	+	+	+	+	+
ЛЧПС	+	+	+	+/-	-	-/+	-
ВКЛ-В	+	+	+	+	-/+	+/-	-

В класифікації ВООЗ (2017 р.) пухлин лімфоїдної та кровотворної тканин виділяють окрему нозологічну форму БВ-ЛКМ. Результати, отримані нами при проведенні імунофенотипуванні та при вивченні цитоморфологічних характеристик субстратних клітин периферичної крові та кісткового мозку, повністю узгоджуються з даними доступної літератури.

БВ-ЛКМ поділяють на два цитологічні підтипи: лімфобластний і центробластний. В нашій роботі хворих на лімфобластний підтип БВ-ЛКМ лікарі найчастіше скеровували на дослідження як лімфобластну лімфому або гостру лімфобластну лейкемію (ГЛЛ). При центробластному підтипі процес розцінюється як монобластний варіант гострої мієлоїдної лейкемії (ГМЛ М5). В частині випадків була підозра на наявність дифузної В-великоклітинної лімфоми (ДВВКЛ) в стадії лейкемізації. Складністю встановлення правильного попереднього діагнозу є морфологічна подібність субстратних клітин до бластів.

Доведено, що в субстратних клітинах при БВ-ЛКМ не виявляється мієлопероксидаза (МПО), у більшості випадків кисла неспецифічна естераза (КНЕ) – та, КФ – негативні, проте у деяких випадках спостерігається дрібногранулярна реакцію на КНЕ та КФ, яка повністю інгібувалася при додаванні іонів тартрату. У всіх хворих спектр експресованих на

поверхневих мембранах антигенів відповідав зрілим В-лімфоцитам: CD19⁺, CD20⁺, CD22⁺, CD23⁻ CD5⁺, Циклін D1⁺.

Отримані нами дані дозволяють стверджувати, що результати цитоморфологічного, цитохімічного та імунофенотипового досліджень, з використанням панелі спеціально підібраних моноклональних антитіл, яка дозволяє поетапно встановити направленість процесу та ступінь зрілості клітин (1 етап - CD19, CD13, CD33, CD3, CD117, CD10, CD7 – Т/В-клітинне, мієлоїдне походження бластів; 2 етап- суCD3, CD79а, CD61, CD41, CD36, GLA – Т/В клітинне, еритроїдне або мегакаріоцитарне походження субстратних клітин; 3 етап- CD20, CD5, Cyclin D1, су μ , см, s λ , s κ – ступінь зрілості субстратних В-клітин) дозволяють ідентифікувати патологічні клітини крові та кісткового мозку при БВ-ЛКМ та проводити диференційну діагностику з іншими формами гемобластозів.

ДВБКЛ складає більше 30% всіх В-клітинних неходжкінських лімфом, 40% з яких є екстранодальними з первинною локалізацією в легенях, нирках, печінці, кістках, шкірі, ЦНС і т.д. Залучення в патологічний процес кісткового мозку спостерігається не більше ніж у 27% випадків.

Результати наших досліджень свідчать про те, що при встановленні діагнозу ДВБКЛ цитоморфологічне, цитохімічне та імунофенотипове дослідження патологічних клітин кісткового мозку та периферичної крові є дуже важливим, для підтвердження процесу лейкемізації чи при проведенні диференційної діагностики. В нашій роботі ми дослідили окремі чотири випадки (пацієнти, які були скеровані на дослідження з підозрою на ДВБКЛ) з певними складнощами при встановленні діагнозу. Саме висвітлення таких випадків у подальшому може значно спростити діагностику для лікарів.

На основі проведеного дослідження ми встановили, що диференційний діагноз ДВБКЛ необхідно проводити із: метастазами злоякісних анонімних пухлин у кістковому мозку, лімфоною Ходжкіна, плазмоклітинною лімфоною, лімфоною Беркітта спорадичного типу, бластоїдним варіантом лімфоми з клітин мантийної зони.

Підсумовуючи отримані дані можна стверджувати, що комплексне дослідження периферичної крові та кісткового мозку хворих вкрай необхідне, оскільки воно є важливим допоміжним засобом, а в окремих випадках основним методом дослідження та встановлення діагнозу.

Ключові слова: імуноцитохімічна характеристика, неходжкінські злоякісні лімфоми, диференційна діагностика, периферична кров, кістковий мозок, субстратні клітини.

SUMMARY

Polishchuk A.S. Immunocytochemical characteristics of some forms of B-cell non-Hodgkin's lymphomas in the stage of leukemization. – Qualifying scientific work preserving manuscript rights

Thesis for the degree of Doctor of Philosophy in the field of 09 Biology in the speciality 091 – Biology (Oncology). – R.E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2021.

According to the National Cancer Registry of Ukraine, the incidence and mortality of non-Hodgkin's lymphomas are increasing. In Ukraine, according to the latest data in 2020, the total number of non-Hodgkin's malignant lymphoma cases was 2,382 (1,186 in men and 1,196 in women). Mortality rate was 2.8 per 100,000 population [2].

According to the Ministry of Health, more than 32,000 active cases of malignant lymphomas are registered now in Ukraine with the lower average year of patients at diagnosis. About 80% of cases of lymphoma are curable, but an important condition for successful treatment is correct and timely diagnosis.

The current classification of non-Hodgkin's lymphomas (NHL) is based on the analysis of clinical data, the results of morphological, immunohistochemical, cytogenetic and molecular biological studies. About 85% of NHLs are of B-cell origin (B-NHL), other lymphoid tumors arise from T- or natural killer cells (NK-cells).

This dissertation is devoted to the study of cytomorphological, cytochemical and immunophenotypic characteristics of lymphoid cells in peripheral blood and bone marrow for assessing the extent of leukemization and differential diagnosis, especially in cases when biopsy of lymph nodes is not possible or samples from extranodal pathologic foci could not be accessible.

The dissertation focuses on the comparative analysis of the cytomorphological, cytochemical and immunophenotypic characteristics of substrate cells in some forms of B-cell lymphoproliferative diseases that allows for

elaborating the algorithms for differential diagnosis. The following forms of lymphoproliferative diseases were included into the study: chronic lymphocytic leukemia (B-CLL), small lymphocytic lymphoma (LML), monoclonal B-cell lymphocytosis (MBL); splenic diffuse red pulp small B-cell lymphoma (SDRPL), hairy cell leukemia variant (HCL-v), hairy cell leukemia (HCL), lymphoma of the marginal zone of the spleen (SMZL); mantle cell lymphoma (MCL), blastoid variant of mantle cell lymphoma (MCL-BV), and diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL).

According to the results of our research the main criteria for diagnosing and establishing the diagnosis of B-CLL are the presence of pathological cells, representing morphologically small lymphocytes with weakly fine-granular to moderate diffuse-granular reaction to acid phosphatase (AP), inhibited by tartrate ions. Malignantly transformed cells in CLL have the following immunophenotype: CD19⁺, CD20⁺, CD22⁺, CD23⁺ CD5⁺. In cases where either CD23 or CD5 antigen is absent, a differential diagnosis with MCL (Cyclin D1⁺) and follicular lymphoma (FL) (CD10⁺) should be made.

CLL and LML in the WHO classification 2017 of lymphoid and hematopoietic tumors are considered as the single nosological form of CLL/LML based on the similarity of their cytomorphological features, immunophenotype, molecular genetics and histopathological features. However, a comparative analysis revealed certain differences between these pathologies. The results of our studies indicate that diffuse infiltration by bone marrow substrate cells (> 30%) and absolute lymphocytosis in the peripheral blood (> 5x10⁹/l.) are important diagnostic criteria for the diagnosis of CLL. LML can be diagnosed in cases when histomorphological and immunophenotypic characteristics are similar to CLL, but bone marrow infiltration by substrate lymphoid cells (from 15 to 30%) is absent and absolute lymphocytosis in peripheral blood do not exceed 5x10⁹/l.

For the first time, the features of pathological cells in the peripheral blood (p/b) and bone marrow (b/m) of patients with MBL (a new nosological form compared with the previous WHO classification of 2008) have been further

characterized based on a comprehensive study. Whether this pathology is a starting point in the development of other hematological pathologies or represents an asymptotic process has not been fully established. Our work has demonstrated a possible link with other hematological pathologies: myelodysplastic syndromes (MDS), acute myeloid leukemia (AML) and CLL, but further investigation is required to confirm these findings. This process can be diagnosed in the absence of bone marrow infiltration with substrate cells (<15%) and absolute lymphocytosis in peripheral blood (<5x10⁹/l), with cytomorphological and immunophenotypic characteristics of B-CLL and LML-like pathologic cells.

For the first time, the marker immunocytochemical signatures of substrate cells have been identified in SDRPL and HCL-v. These pathologies are delineated as distinct subgroups of B-cell lymphoma/leukemia of the spleen unclassified in the modern classification of tumors of hematopoietic and lymphoid tissues (WHO 2017). As in SMZL and HCL, a feature of these diseases is the presence of pathological cells with characteristic cytoplasmic projections. Instead, for the first time on the basis of a comprehensive comparative study it was established that these tumors have a number of distinctive morphocytochemical and immunophenotypic characteristics. Differential diagnosis and accurate diagnosis is critical, given that the course of the disease and the prognosis of these pathological processes are different. The tactics of treatment also differ.

Immunophenotypic characteristics of lymphocytes with villous cytoplasm

	CD19	CD20	CD22	CD11c	CD25	CD103	CyclinD1
SMZL	+	+	+	-/+	-/+	-/+	-
HCL	+	+	+	+	+	+	+
SDRPL	+	+	+	+/-	-	-/+	-
HCL-v	+	+	+	+	-/+	+/-	-

In the 2017 WHO classification , of tumors of lymphoid and hematopoietic tissues a separate nosological form is delineated - blastoid variant of mantle cell

lymphoma (MCL-BV). Our results obtained by immunophenotyping and study of cytomorphological characteristics of substrate cells of peripheral blood and bone marrow are fully consistent with the available literature.

MCL-BV is divided into two cytological subtypes: lymphoblastic and centroblastic. Patients with the lymphoblastic subtype of MCL-BV were most often referred by doctors for examination as lymphoblastic lymphoma or acute lymphoblastic leukemia (ALL). In the centroblastic subtype, the process is regarded as a monoblastic variant of acute myeloid leukemia (AML). In some cases the presence of diffuse B-cell lymphoma (DLBCL) in the leukemization stage was suspected. The difficulty in establishing a correct preliminary diagnosis is the morphological similarity of the substrate cells to blasts.

It was found that in the substrate cells of MCL-BV myeloperoxidase (MPO) is lacking, in most cases acidic nonspecific esterase (NSE) - and AP – are negative, but in some cases there is a small granular reaction to NSE and AP, which is fully inhibited by tartrate ions. In all patients, the spectrum of antigens expressed on the surface membranes corresponded to that of mature B-lymphocytes: CD19⁺, CD20⁺, CD22⁺, CD23⁻ CD5⁺, Cyclin D1⁺.

Our findings allow us to conclude that the results of cytomorphological, cytochemical and immunophenotypic examinations, using a panel of specially selected monoclonal antibodies, allows us to determine step-by-step the lineage of origin and cell maturity of the pathological process (Stage 1 - CD19, CD13, CD33, CD3, CD117, CD10, CD7 - T / B- cells, myeloid generation of blasts; Stage 2 - cyCD3, CD79a, CD61, CD41, CD36, GLA - T/B-cell, erythroid or megakaryocytic gestation of substrate cells; stage 3 CD20, CD5, Cyclin D1, κ , μ , $s\lambda$, $s\kappa$ - maturity level of substrate B- cells) for the identification of pathological cells in blood and bone marrow in MCL-BV and differential diagnosis with other forms of hematoblastoses.

DLBCL makes more than 30% of all B-cell non-Hodgkin's lymphomas, 40% of them are extranodal with primary localization in lungs, kidneys, liver, bones,

skin, CNS, etc. Involvement of the bone marrow in the pathological process is observed in no more than 27% of cases.

The results of our research indicate that cytomorphological, cytochemical and immunophenotypic examinations of pathological cells in the bone marrow and peripheral blood is very important to determine the diagnosis of DLBCL and to confirm the process of leukemization. We investigated four separate cases (patients who were screened for suspected DLBCL) with certain complications when the diagnosis was established. Representation of these cases can significantly improve diagnosis for physicians in the future.

The differential diagnosis of DLBCL should be made with: metastases of malignant anonymous tumors in the bone marrow; Hodgkin's lymphoma; plasma cell lymphoma; Burkitt's lymphoma of sporadic type; blastoid variant *of* mantle cell lymphoma.

Summarizing the obtained data, it can be argued that a comprehensive study of peripheral blood and bone marrow of patients with NHL is essential because it is an important tool, and in some cases the main method of research and diagnosis.

Key words: immunocytochemical characteristics, non-Hodgkin's malignant lymphomas, differential diagnosis, peripheral blood and bone marrow, substrate cells.