

**Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный медицинский исследовательский центр онкологии
имени Н.Н. Блохина»
Министерства здравоохранения Российской Федерации**

На правах рукописи

МОЖЕНКОВА АННА ВАСИЛЬЕВНА

**ИММУНОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ОПУХОЛЕВОГО
КЛОНА И КЛЕТОК ОКРУЖЕНИЯ В КОСТНОМ МОЗГЕ ПРИ
ФОЛЛИКУЛЯРНОЙ ЛИМФОМЕ**

14.01.12 – онкология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

Доктор медицинских наук, профессор
Френкель Марина Абрамовна

Москва – 2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	3
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	9
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	29
ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	37
3.1. Характеристика кроветворения больных фолликулярной лимфомой на разных стадиях заболевания.....	37
3.2 Характеристика кроветворения больных ФЛ в зависимости от наличия или отсутствия поражения костного мозга.....	38
3.3. Характеристика кроветворения больных ФЛ в зависимости от варианта лейкомиического пула в аспирате костного мозга.....	50
3.3.1. Морфоиммунологическая характеристика вариантов лейкомиического пула.....	50
3.3.2. Характеристика кроветворения больных ФЛ с разными вариантами лейкомиического пула.....	59
3.3.3. Сравнение морфологических показателей лейкомиического пула в аспирате костного мозга, в трепанобиоптате и в пунктате лимфоузла	61
3.3.4. Характеристика лимфоидных клеток лейкомиического пула с помощью метода компьютерной микроскопии	64
3.4. Влияние микроокружения на кроветворение.....	67
ГЛАВА 4 ЗАКЛЮЧЕНИЕ	72
ВЫВОДЫ	83
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	85
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	86
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	88

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

Фолликулярная лимфома (ФЛ) является индолентным В-клеточным лимфопролиферативным новообразованием, происходящим из фолликулярного центра лимфатических узлов. Она составляет 10-11% среди всех неходжкинских лимфом (НХЛ) в России, 20% в странах Европы и США и занимает второе место по частоте среди индолентных НХЛ. Опухоль представлена двумя типами неопластических клеток герминального центра лимфоузла: центробластами и центроцитами. В число экстранодальных областей поражения при ФЛ входит костный мозг. Результаты современных работ, посвященных изучению прогноза при ФЛ, свидетельствуют о важности использования гематологических показателей для прогноза заболевания. На основании анализа клинических данных индекс прогноза FLIPI-1 для пациентов с ФЛ был уточнен и заменен на FLIPI-2 с включением показателей уровня гемоглобина (Hb) и результатов исследования костного мозга. Однако до настоящего времени отсутствуют исследования гемопоэза больных ФЛ при разных стадиях заболевания, нет сведений о гематологических показателях пациентов без поражения костного мозга и при опухолевой инфильтрации. Дополнительный интерес представляет вопрос об особенностях гемопоэза при различных типах опухолевого субстрата в костном мозге. Остается дискуссионной проблема влияния элементов микроокружения: Т-лимфоцитов и моноцитов на процессы угнетения гемопоэза.

Исследование гемопоэза больных ФЛ, включающее детальное морфоиммунологическое изучение опухолевого субстрата в костном мозге, показателей периферической крови, данных миелограммы, количественную оценку клеток микроокружения при разных стадиях болезни позволит ответить на ряд существенных клинических вопросов. Полученные результаты дадут возможность расширить понимание биологических особенностей этой неоплазии и оценить значение ряда факторов прогноза.

Цель исследования: оценить изменения показателей гемопоэза больных ФЛ в зависимости от стадии болезни, от опухолевой инфильтрации костного мозга элементами различного цитологического типа и от характеристики клеток микроокружения.

Задачи исследования:

1. Оценить показатели крови и данные миелограмм у больных ФЛ при разных стадиях заболевания, в зависимости от отсутствия или наличия поражения костного мозга.
2. Охарактеризовать морфологические типы опухолевого пула в костном мозге на основе подсчета лимфоцитограмм и провести корреляционный анализ иммунофенотипического профиля центроцитов и центробластов.
3. Изучить показатели периферической крови и миелограмм у больных с разным морфологическим типом лейкоемического пула.
4. Проанализировать показатели гемопоэза в зависимости от количественных параметров клеток микроокружения: Т-лимфоцитов и моноцитов.
5. Сопоставить данные исследования аспиратов костного мозга, трепанобиоптатов и пунктатов лимфатического узла для уточнения цитологического типа лимфомы.

Научная новизна

Проведена комплексная морфо-иммунологическая оценка показателей крови и костного мозга больных ФЛ при разных стадиях заболевания, в зависимости от наличия или отсутствия поражения костного мозга. Изменение гемопоэза включало анемию и тромбоцитопению, гранулоцитопозэ оставался в норме. Было установлено, что частота и глубина анемии и тромбоцитопении связана с величиной опухолевой нагрузки.

Впервые дана детальная характеристика лейкоемического клона в костном мозге на основании подсчета лимфоцитограммы. Определены особенности иммунофенотипического профиля центроцитов и центробластов, выявлена более высокая экспрессия антигена CD38 на центробластах.

Проанализированы особенности гемопоэза больных в зависимости от состава опухолевого пула в костном мозге. Установлено, что угнетение гемопоэза не ассоциируются с типом лейкемических клеток. Показано, что лейкоцизация в крови коррелирует с центроцитарным, но не с центробластным типом опухоли, что свидетельствует о различии в их функциональных особенностях. Выявлены случаи расхождения морфологической характеристики опухолевых клеток в аспирате костного мозга по сравнению с трепанобиоптатом и пунктатом лимфатического узла.

Теоретическая и практическая значимость

Исследования аспирата костного мозга являются необходимым условием для диагностики варианта опухоли, определения стадии заболевания, что влияет на прогноз у больных ФЛ. Использование компьютерной микроскопии позволяет объективизировать характеристику лимфоидных клеток костного мозга для уточнения диагноза.

Методология и методы исследования

В исследование были включены 152 первичных пациента ФЛ, которые наблюдались, проходили обследование, получали лечение или рекомендации по его проведению в отделении химиотерапии гемобластозов отдела гематологии и трансплантации костного мозга и/или в научно-консультативном отделении амбулаторных методов диагностики и лечения ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России с января 2006 по декабрь 2016г. В зависимости от наличия или отсутствия поражения костного мозга все пациенты были разделены на три группы: I группа — без поражения костного мозга, II группа — поражение костного мозга только по трепанобиоптату, III группа — поражение костного мозга по трепанобиоптату и аспирату. Всем пациентам было проведено морфологическое исследование аспирата костного мозга. В большинстве случаев — гистологические исследования лимфоузлов, трепанобиоптата, ИГХ лимфоузлов и/или трепанобиоптата. При наличии опухолевого клона в аспирате проводилось иммунофенотипическое исследование костного мозга, при бластоидном типе опухолевых клеток проводилось цитохимическое

исследование. Гистологическое и иммуногистохимическое исследование лимфоузлов и трепанобиоптатов костного мозга проводилось в патологоанатомическом отделении отдела морфологической и молекулярно-генетической диагностики опухолей НИИ клинической онкологии им. акад. РАН и РАМН Н.Н. Трапезникова ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Материал биопсии фиксировали в нейтральном забуференном формалине, заливали в парафин, окрашивали гематоксилином и эозином, пикрофуксином, метиленовым зеленым – пиронином (по Браше). Окраска цитологических препаратов экстрамедуллярной опухолевой ткани проводилась по методу Лейшмана, а костного мозга — по методике Романовского-Гимза.

Морфологическое исследование аспириатов костного мозга у всех 152 пациентов и иммунофенотипическое исследование аспириатов костного мозга у 33 пациентов было проведено в лаборатории иммунологии гемопоза централизованного клиничко-лабораторного отдела НИИ клинической онкологии им. акад. РАН и РАМН Н.Н. Трапезникова ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Взятие аспириата костного мозга (в объеме 0,5–1 мл.) проводилось в пробирки Vacutainer с сухим ЭДТА. В полученном материале было подсчитано число миелокариоцитов, приготавливались мазки костного мозга и проводилось исследование иммунофенотипа лимфоидных клеток.

Препараты костного мозга были окрашены по методу Паппенгейма. Подсчет миелограммы проводился двумя врачами, по 250 клеток каждым (в каждом случае исследовалось 500 миелокариоцитов).

Количество миелокариоцитов оценивали при подсчете на гематологическом анализаторе Micros 60. У 33 пациентов с наличием опухолевого поражения в аспирате костного мозга проводился подсчет лимфоцитограммы двумя независимыми экспертами по 100 клеток каждым. Было выделено три типа лимфоидных клеток: типичные лимфоциты, центроциты, центробласты.

Морфологические исследования элементов опухолевого клона в костном мозге были дополнены изучением особенностей структуры хроматина ядер

лимфоидных клеток с помощью компьютерной микроскопии. Исследование проводилось на обычных мазках аспиратов костного мозга, окрашенных по методу Паппенгейма. Были проанализированы препараты аспиратов пациентов с ФЛ и в качестве контроля мазки периферической крови доноров. Изображения клеток формировались с использованием цветовой модели RGB (Red, Green, Blue) на автоматизированном микроскопе Olympus BX43 со спектральной камерой Impers IPX-4MIST-GCFB.

Имунофенотипическое исследование лимфоцитов костного мозга в аспирате проводилось при наличии опухолевого поражения в аспирате. Исследование проводилось на проточном цитометре FACScan (Becton Dickinson США) методом прямой иммунофлуоресценции с использованием тройной метки для оценки коэкспрессии двух-трех антигенов на мембране одной клетки. Анализ данных проведен с помощью программы WinMDI. Панель моноклональных антител включала антитела к В-линейным антигенам (CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, иммуноглобулины), Т-линейным антигенам (CD3, CD4, CD5, CD7, CD8), нелинейным антигенам CD10, CD38, HLA-DR, общелейкоцитарному антигену CD45.

Статистическая обработка материала и расчеты показателей проведены с использованием компьютерной программы электронных таблиц Microsoft Excel и SPSS 17.0 for Windows.

Достоверность различий значений средних показателей оценивали с помощью t-критерия Стьюдента. Для параметров качественной оценки применялся точный критерий Фишера. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Положения, выносимые на защиту

1. Показатели периферической крови позволяют выявить анемию у пациентов с ФЛ на всех стадиях заболевания, тромбоцитопению на продвинутых стадиях.
2. Степень и частота анемии и тромбоцитопении ассоциируется с величиной опухолевой нагрузки и с поражением костного мозга.

3. Показатели нейтрофильного ростка в периферической крови и костном мозге сохраняются в нормальных пределах практически у всех пациентов с ФЛ.

4. На основании результатов подсчета лимфоцитограмм в костном мозге выделяются три группы пациентов с центробластной, смешанной и centroцитарной характеристикой опухолевого пула.

5. Иммуный профиль опухолевых клеток различается в зависимости от морфологической характеристики: центробласты чаще экспрессируют антиген CD38, чем centroциты.

6. Лейкемизация опухолевых клеток в периферической крови ассоциируется с пролиферацией в костном мозге centroцитов, но не центробластов.

7. Компьютерная микроскопия может быть использована для детальной характеристики структуры хроматина ядер лимфоидных клеток, что позволяет уточнить дифференциальную диагностику ФЛ.

8. ФЛ отличается гетерогенностью морфологической характеристики опухолевых клеток в различных локализациях. У 10% пациентов констатированы расхождения в типе лимфомы: центробластной или centroцитарной при сравнении данных аспирата костного мозга, трепанобиоптата костного мозга и пунктата лимфоузла.

Степень достоверности и апробация результатов

Результаты диссертационной работы были представлены на XV Российской конференции с международным участием «Злокачественные лимфомы» (Москва 2018).

Морфологическое и иммунофенотипическое исследования аспирата костного мозга внедрены к применению в качестве необходимой диагностической процедуры у больных ФЛ в отделении химиотерапии гемобластозов отдела гематологии и трансплантации костного мозга ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В 1925 г. Brill N.E., Baehr G. и Rosenthal N. впервые подробно описали 2 случая генерализованной гиперплазии лимфатических узлов и селезенки с фолликулярным характером роста опухоли. В 1927 г. Symmers D. подтвердил эту форму описанием еще 3 случаев. В практику был введен термин болезни Брилля-Симерса. [1-2]. В дальнейшем уточнение гистологической картины болезни и внедрение иммуногистологических и иммунофенотипических подходов для характеристики клеток позволило заменить этот термин на фолликулярную лимфому в классификации ВОЗ 1976 года. В предшествующей классификации Rappaport (1966 г.) эта нозологическая форма определялась как смешанная лимфоцитарно-гистиоцитарная, гистиоцитарная или недифференцированная. В классификации Kiel (1974 г.) она обозначалась как центробластно/центроцитарная фолликулярная, фолликулярная диффузная, центробластная фолликулярная. В соответствии с Lukes-Collins (1974 г.) элементы субстрата опухоли определялись как мелкие расщепленные, крупные расщепленные, мелко- и крупноклеточные нерасщепленные из клеток фолликулярного центра. В REAL классификации (1994 г.) был принят термин — лимфома из клеток фолликулярного центра, фолликулярная.

Появление метода иммунофлюоресцентного окрашивания лимфоцитов (A. Coons 1942 год) позволило охарактеризовать антигенную структуру лимфоидных клеток в норме на разных этапах дифференцировки и установить их опухолевые аналоги при различных вариантах лимфопролиферативных заболеваниях (ЛПЗ). Были получены доказательства клонального происхождения неопластических клеток при ФЛ в лимфоузле и при их миграции в другие В-клеточные области, в частности, в костный мозг [3]. В 3-ем издании ВОЗ классификации (2001г.) использован подход REAL классификации неходжкинских лимфом (НХЛ). Было предложено отмечать при гистологическом исследовании опухоли характер роста — фолликулярный, если количество фолликулов в лимфоузле превышает 75% площади, фолликулярный и диффузный 25–75% и менее 25% — диффузный. Установлена цитологическая градация трех типов, 3 тип в свою очередь был

подразделен на 3а (наряду с центробластами присутствуют центроциты) и 3в с (солидные пласты центробластов). При пересмотре ВОЗ классификации 2008г., деление на степени ФЛ несколько изменилось. Описание 1–2 степени осталось прежним, а 3а и 3в степени были изменены на 3А и 3В, поскольку было установлено, что они имеют различия по клиническому прогнозу, иммуногистохимическим и цитогенетическим профилям. В 4 пересмотренном издании ВОЗ 2017 [4] года диагностика вариантов ФЛ значительно расширена и включает 4 варианта заболевания:

1. In situ фолликулярное новообразование, называемое ФЛ in situ,
2. Дуоденальный тип ФЛ,
3. Тестикулярная ФЛ,
4. Диффузный вариант ФЛ

Первичная кожная лимфома фолликулов и вариант детской лимфомы представляют особые самостоятельные нозологические формы.

ФЛ составляет 10-11% среди всех неходжкинских лимфом (НХЛ) в России [5], около 20% в странах Европы и США и занимает второе место по частоте среди индолентных НХЛ [6]. ФЛ чаще встречается у пожилых людей. Средний возраст пациентов на момент постановки диагноза составляет 65 лет [7]. У лиц моложе 40 лет ФЛ наблюдается сравнительно редко. Данные пациентов с ФЛ, возраст которых составлял 18–40 лет, показали, что по частоте поражения различных анатомических областей, клиническому течению, прогнозу заболевания ФЛ у молодых людей не отличалась от ФЛ у людей более старшего возраста и не нуждались в более агрессивной химиотерапии [8,9]. В ВОЗ классификации 2008г. впервые в качестве отдельной нозологической формы выделен педиатрический тип ФЛ. Педиатрический тип ФЛ в большинстве схож с ФЛ взрослых. На ФЛ у детей приходится 1-2% от всех неходжкинских лимфом, по данным разных авторов [10]. Особенности являются – отсутствие в большинстве случаев белка BCL2 и t(14;18), чаще отмечается 3 цитологический тип, в большинстве случаев опухоль локализована [11,12].

Патогенетические механизмы возникновения ФЛ являются следствием комплекса генетических и эпигенетических нарушений. Первым из них является $t(14;18) (q32;q21)$, которая выявляется в 80–90% случаев [13-17]. Эта транслокация возникает на ранних костномозговых этапах созревания пре-В клеток в результате ошибочной рекомбинации VDJ [18]. При этом ген BCL2 на 18 хромосоме сопоставляется с локусом гена тяжелых цепей, что приводит к постоянно высокой экспрессии антиапоптотического химерного белка BCL2 [18]. Транслокация $t(14;18)$ может быть обнаружена у 50–70% здоровых людей в небольшой пропорции лимфоцитов [19-26]. Частота клеток, несущих транслокацию, повышается с возрастом, курением, при контакте с пестицидами [26]. Клон клеток-носительниц транслокации успешно проходит антиген-независимый этап и дозревает до стадии наивных В-клеток IgM+IgD+. При встрече с антигеном в лимфоузле клетка-носительница $t(14;18) (q32;q21)$ активируется и делится. Потомки этой клетки устойчивы к апоптозу вследствие экспрессии BCL2, и их пролиферация не может быть завершена обычными механизмами ограничения иммунного ответа. Размноженный клон длительно персистирует, в нем дополнительно накапливается 4–6 мутаций. Только у 5% пациентов это нарушение остается единственным.

В-Лимфопоз

Ранний В-лимфоидный предшественник образуется из общего лимфоидного предшественника в процессе регуляции важных поверхностных маркеров, необходимых для развития В-клеток. К ним относятся B220 изоформы CD45, рецептор интерлейкина-7 (IL-7 α), повышается экспрессия генов RAG1/2 [27-30]. Появление CD19 и повышение активности RAG1/2 и TdT указывает на вступление клетки в следующую про-В стадию дифференцировки [31]. На этом этапе происходит перестройка переменного домена D-J тяжелых цепей на обеих гомологичных хромосомах. После первой геномной перестройки про-В-клетки вступают в следующую пре-В стадию. Она характеризуется наличием пре-В клеточного рецептора (пре-BCR) на поверхности клетки [32]. На поздней пре-В

стадии начинается рекомбинация легких цепей, которая заканчивается заменой суррогатных легких цепей путем рекомбинации каппа и лямбда легких цепей [33]. На этой стадии BCR полностью собран. Если вновь созданный Ig связывается с аутоантигеном, то такие В-клетки погибнут путем апоптоза. С продуктивно перестроенным BCR-Ig незрелые В-клетки созревают в костном мозге и мигрируют затем в качестве наивных клеток во вторичные лимфоидные органы (лимфатические узлы и селезенка).

В Т-клеточно богатых зонах периферических лимфоидных органов происходит селекция наивных В-клеток. Те В-клетки, которые не получили от Т-клеток спасительного сигнала, уходят в апоптоз. Оставшиеся В-клетки возвращаются в лимфоузлы где формируют первичные лимфоидные фолликулы. Морфология клеток первичного фолликула соответствует малому лимфоциту, эти клетки имеют фенотип периферических В-клеток (CD19+, CD20+, CD21+, CD22+, CD24+, CD37+, HLA-DR), чаще всего содержат IgM+IgD или IgM. Антигены CD23, CD5, CD38, CD10 отсутствуют. Эти клетки постоянно циркулируют между костным мозгом и вторичными лимфоидными органами, пока в Т-клеточной зоне лимфоузла или лимфоидной ткани, ассоциированной со слизистыми оболочками (мукоза-ассоциированная лимфоидная ткань — MALT) они не встретят антиген. В-клетки, которые встретились с антигеном на дендритных клетках, макрофагах или в растворимой форме [34] и имеют высокоафинный BCR (SIg), отбираются антиген-специфичными CD4+ T_{FH}-клетками для входа в зародышевый центр [35] где происходит их полная активация [36,37]. Отражением активации и пролиферации В-лимфоцитов является появление на мембране CD23+, повышение экспрессии HLA-DR, утрата мембранного IgD. Большинство этих активированных В-клеток дифференцируется в коротко-живущие плазмобласты, которые секретируют низко-аффинные антитела, однако небольшое количество В-клеток возвращается в В-клеточные фолликулы для пролиферации и формирования зародышевого центра.

В ходе иммунного ответа в фолликулах формируются зародышевые центры, или центры размножения. Фолликулы, в которых сформировался зародышевый

центр, называют вторичными. Реакции зародышевого центра происходят в течение нескольких дней после воздействия антигена и последующих антигенных изменений. Каждый зародышевый центр образуется из 3–10 наивных В-клеток и в конечном счете содержит 10000–15000 В-клеток. Таким образом для формирования зародышевого центра требуется 10 генераций [34,35]. Часть наивных В-клеток перемещается от зародышевого центра, образуя зону мантии, наружная область мантии лимфоидного фолликула называется маргинальной или краевой [38].

В зародышевом центре происходит аффинное созревание В-клеток. Процесс аффинного созревания включает соматическую гипермутацию и последующую клональную селекцию, в результате чего образуются длительно-живущие плазматические клетки и В-клетки памяти. Реакции зародышевого центра зависят от микроокружения, которое состоит из фолликулярных дендритных клеток (ФДК), макрофагов и Т-клеток (T_{FH} и T_{reg}).

Активированные В-клетки утрачивают CD23 и превращаются в пролиферирующие клетки — центробласты. Это крупные клетки с везикулярным ядром, 1–3 заметными нуклеолами и узким ободком базофильной цитоплазмы.

Центробласты имеют иммунофенотип CD77+, CD10+, CD19+, CD20+, CD38+. На поверхности центробластов исходно присутствует IgM, в то время как IgD экспрессирован слабо или отсутствует (табл. 1[39]).

Таблица 1 — Иммунофенотип В-клеток фолликулов

Маркеры	Наивные зрелые В-клетки	Центробласты	Центроциты	В-клетки памяти
HLA-DR	+	+	+	+
CD20	+	+	+	+
CD38	-	+	+	-
CD77	-	+	+	-
CD23	-/+	-	+	-
CD10	-	+	-	-
Ig	M+D	M	G,A,E	G,A,E
Зоны фолликула	Мантия	Темная зона ФЦ	Светлая зона ФЦ	

Сокращения: ФЦ – фолликулярный центр

К опухолям, нормальными аналогами которых являются бластные клетки зародышевого центра, относят случаи Диффузной В-крупноклеточной лимфомы (ДВККЛ) и лимфомы Беркитта (ЛБ).

Большинство центробластов гибнет путем апоптоза, поскольку ген антиапоптоза *bcl-2* в них не функционирует. Центробласты агрессивно пролиферируют, чему способствует экспрессия внутриклеточного фактора *Bcl-6*, и претерпевают соматическую гипермутацию необходимую для разнообразия реаранжировки *IgV* генов, продуцируя мутантные клоны с различной аффинностью к антигену. Далее следует селекция В-клеток, которые экспрессируют рецепторы антигенов с большей аффинностью уже в светлой зоне.

После того как в центробластах останавливается процесс деления, они становятся центроцитами — клетками средних размеров с неровными ядрами, незаметными нуклеолами и скудной цитоплазмой, которые накапливаются между центробластами и затем мигрируют на противоположенный полюс зародышевого

центра. Итогом поляризации зародышевого центра является появление «темной зоны», которая содержит центробласты и плотно упакованные centroциты и «светлой зоны», которая содержит centroциты, большое количество фолликулярных дендритных клеток (ФДК) и многочисленные Т-клетки.

Миграция В-клеток в светлую зону совпадает с прекращением деления и мутагенеза. В-центробласты уменьшаются в размере и превращаются в В-centroциты. На молекулярном уровне этому соответствует ослабление экспрессии внутриклеточного фактора bcl-6 и начало экспрессии фактора Blimp-1, обеспечивающего дифференцировку В-centroцитов в плазматические клетки. В светлой зоне В-клеток меньше, также в светлой зоне находятся T_{FH} клетки, ФДК, макрофаги и небольшое количество наивных В-клеток. В-клетки зародышевых центров рециркулируют между двумя зонами и повторяют циклы мутации и селекции, что в конечном счете приводит к появлению плазматических клеток и В-клеток памяти, которые секретируют высокоаффинные антитела [40].

Опухолевые клетки при ФЛ являются аналогами нормальных центробластов и centroцитов фолликулярного узла.

Лимфомы маргинальной зоны MALT типа, селезеночного типа и нодального типа соответствуют В-клеткам памяти постзародышевого центра, которые происходят из маргинальной зоны и пролиферируют в экстранодальной ткани, ткани селезенки и нодальной ткани соответственно. Множественная миелома происходит из плазматических клеток, которые вернулись в костный мозг.

Таким образом, анализ этапов созревания В-клеточного пула в норме не только дает возможность охарактеризовать различные опухоли В-клеточного происхождения, но также понять значение клеток микроокружения, которые необходимы для успешных реакций зародышевого центра.

В-клеточные НХЛ, как правило, повторяют стадии нормальной дифференцировки В-клеток. Это сходство является основой для их классификации. В зависимости от стадии развития В-лимфоцита, на которой

возникает заболевание, НХЛ делят на прегерминальные, герминальные и постгерминальные (табл 2 [41])

Таблица 2 — Варианты В-клеточных лимфом в зависимости от стадии созревания В-лимфоцитов.

Стадия развития В-лимфоцитов в лимфоузле	Тип В-клеточной лимфомы
Прегерминальный центр	Лимфома зоны мантии
Герминальный центр	Фолликулярная лимфома, лимфома Беркитта, лимфома маргинальной зоны, ДВККЛ GCB*
Постгерминальный центр	Множественная миелома, ABC-ДВККЛ**

ДВККЛ GCB* germinal centre B-cell-like

ABC-ДВККЛ** activated B-cell-like

Морфологические и иммунофенотипические параметры дают основание для выделения разных типов опухолевых элементов. Однако не существует единого антигенного маркера специфичного для конкретного заболевания. Только применение комбинации морфологических признаков и панели из нескольких антигенных маркеров необходимы для постановки диагноза.

Диагностика ФЛ

При ФЛ преимущественно поражаются лимфоузлы, частота поражения костного мозга при ФЛ составляет от 40 до 70% [42]. Наиболее частой экстранодальной областью является желудочно-кишечный тракт, преимущественно 12-перстная кишка, часто сочетающейся с поражением мезентериальных узлов. К другим экстранодальным проявлениям ФЛ относятся поражения кожи, орбиты, молочной железы и яичек, которые встречаются редко [43-48]. Морфологические, иммунофенотипические и генетические особенности этих локализаций сходны с нодальной ФЛ. Особое место среди вариантов ФЛ

занимает ФЛ *in situ*. Впервые в классификации ВОЗ в 2008 года она была выделена отдельной формой, однако до настоящего времени ее клиническое и прогностическое значение остается неясным.

Диагностика ФЛ базируется на морфоиммуногистохимическом исследовании опухолевой ткани, морфоиммунофенотипическом изучении аспирата костного мозга и периферической крови и цитогенетическом исследовании [49]. В биоптатах лимфоузлов определяется характер пролиферации опухолевых клеток: нодулярная либо нодулярно-диффузная и учитывается клеточный состав опухолевых инфильтратов. Опухолевые лимфоциты представляют собой гетерогенную группу клеток: центроциты — мелкие клетки с угловатыми, скрученными ядрами, в которых может определяться расщелина, без нуклеол. И центробласты — крупные клетки с округлыми или овальными ядрами, с дисперсным хроматином, с 1–3 нечеткими нуклеолами. ФЛ разделяется на 3 типа. Это деление основывается на количественной оценке центробластов в опухолевых фолликулах в 10–20 полях зрения при большом увеличении микроскопа ($\times 400$): 1. цитологический тип — центроцитарный количество центробластов не должно превышать 5 в поле зрения; 2 цитологический тип смешанный — число центробластов — 6–15 в поле зрения и 3 тип центробластный — количество центробластов в поле зрения превышает 15 [50]. 3 цитологический тип делится на 3А (присутствуют центроциты) и 3В (определяются только со́лидные пласты центробластов) [4].

Поражение костного мозга при ФЛ

Исследование клеток гемопоэза включает изучение трепанобиоптата и аспирата костного мозга, отпечатков трепана и данных периферической крови.

Для ФЛ в трепанобиоптате характерен паратрабекулярный тип поражения и гораздо реже, интерстициальный тип [4]. Паратрабекулярный тип поражения костного мозга характеризуется скоплениями опухолевых клеток, как правило, на фоне очагового фиброза стромы костного мозга. Скопления образуют слои вдоль

костных трабекул. Поскольку, в аспиратах определяются преимущественно элементы из интерстициальной зоны, то результаты трепанобиопсии более информативны, чем аспирата костного мозга [51].

Цитологическое исследование аспирата костного мозга и отпечатков трепанобиоптата позволяет оценить величину лимфоидного клона, охарактеризовать морфологические особенности атипичных лимфоидных элементов. Однако известно, что число лимфоцитов в миелограмме в норме может существенно колебаться в зависимости от качества взятия материала, разбавления периферической кровью. У разных исследователей (табл.3) количество лимфоцитов в норме в аспиратах костного мозга различается очень существенно [51]. Остается дискуссионным вопрос, какой уровень лимфоцитов в костном мозге позволяет судить о наличии опухолевого поражения. Причем, показано, что даже нормальное число лимфоцитов в костном мозге не исключает возможности вовлечения при ФЛ. Точная диагностика опухолевого клона возможна лишь при использовании проточной цитофлуориметрии [52,53].

Таблица 3 — Количество лимфоцитов в аспиратах костного мозга в норме.[54]

Автор	Год	Число исследований	Пол	Возраст (годы)	Объем пунктата (мл)	Клеточность $\times 10^9/л$	Лимфоциты %
Jacobsen К.М.	1941	28	м, ж	20-29	$\leq 0,5$	-	14,6 (6,7–22,5)
Segerdahl E.	1935	52	м	20-30	0,2	-	16,8 (7,2–26,3)
		40	ж	20-30	3,0	-	18,1 (10,5–25,7)
Vaughan S.L., Brockmyr F.	1947	50	м, ж	17- 45	-	-	16,2 (7,5–26,5)
Wintrobe M.M., Lee R.G., Boggs D.R. et al.	1974	12	м	>18	0,1-0,2	-	16,2 (8,6–23,8)

Bain B.J.	1996	50	м, ж	21-56	-	-	13,1 (6–20)
den Ottonlander G.J.	1996	67	м, ж	>18	-	-	16,1 (6,0–26,2)
Mazza J.J.			м, ж	>18	-	-	16,2 (11–23)
Грибова И.А., Воробьев П.А.	2002	-	м, ж	>18	-	118,4 (41,6 – 195,0)	9,0 (4,3–13,7)
Аринкин М.И.	1938		м, ж	>18	-	-	10–13
Алексеев Г.А.	1940		м, ж	>18	-	-	1,2–11,5
Фарбер В.Б.	1941		м, ж	>18	-	-	4,0–19,8
Пинус А.Г.	1951		м, ж	>18	-	-	2,9–10
Владос Х.Х, Файнштейн Ф.Э.	1952		м, ж	>18	-	-	4–8,4
Opitz H., Weicker H.	1954		м, ж	>18	-	-	7,50 (2,5–15)
Юрковский О.И. Грицюк А.М.	1997	-	м, ж	>18	-	50-250	1,2–11,5
Тодоров Й.	1960	-	м, ж	>18	-	-	14 (4,0–35,0)

Представленные данные могут свидетельствовать о том, что оценка доли лимфоидных клеток в костном мозге как в норме, так и у больных ФЛ не всегда абсолютно точна. Подсчет миелограммы может также проводиться и по отпечаткам трепанобиоптатов костного мозга. Сравнение данных исследования костного мозга по аспиратам и отпечаткам трепаната показало, что частота выявления ФЛ и степень поражения костного мозга были выше при исследовании трепанатов. [51]. Объяснение этого различия может быть связано с наличием молекул адгезии на опухолевых лимфоцитах, препятствующих попаданию их в аспират. На этом основании диагностическое преимущество остается за отпечатками трепаната [51,55].

Морфологическое исследование мазков аспирата костного мозга и периферической крови включает, наряду с анализом количественного соотношения форменных элементов, исследование цитологических особенностей лимфоидных клеток. Наличие лимфоцитов с расщепленным ядром

патогномонично для ФЛ. Однако клетки с подобной характеристикой могут встречаться и при других лимфопролиферативных заболеваниях, в том числе при ХЛЛ [56,57]. Нам не встретились данные о зависимости между соотношением centroцитов и centroбластов в костном мозге и цитологическими типами ФЛ. До настоящего времени остается открытым вопрос взаимосвязи количества centroбластов в миелограмме и частотой трансформации ФЛ в ДБККЛ.

Исследование костномозгового кроветворения при ФЛ имеет существенное клиническое значение для стадирования заболевания, так как отражает максимальную степень диссеминации процесса и влияет на лечебную тактику. Было показано, что наряду с опухолевой нагрузкой независимое прогностическое значение имеет уровень показателей красной крови. В работах, посвященных изучению анемии при НХЛ и, в частности, при ФЛ, была установлена достоверная корреляция между анемией и длительностью безрецидивной (БРВ) и общей выживаемостью (ОВ). Анемия наблюдается в 8–32% случаев ФЛ, чаще встречается при наличии поражения костного мозга и является неблагоприятным прогностическим фактором [58-60]. Причины анемии при ФЛ многофакторны, однако большинство случаев составляет анемия хронических заболеваний. Происходит снижение выработки эндогенного эритропоэтина, уменьшение продолжительности жизни эритроцитов, слабая реутилизация железа и супрессия эритропоэза путем секреции воспалительных цитокинов, таких как ИЛ-1, TNF- α и ИЛ-6 [61-63].

Поражение костного мозга является плохим прогностическим признаком у пациентов с нодальной ФЛ, поскольку приводит к увеличению стадии (до IV) по шкале Ann Arbor и соответственно высоким баллам по FLIP1, встречается, по разным оценкам, в 40–70% случаев ФЛ. В редких случаях при отсутствии других проявлений болезни именно исследование костного мозга позволяет установить диагноз ФЛ и ее стадию [64]. Интересно отметить, что установлена прямая закономерная зависимость между поражением костного мозга и селезенки при ФЛ [52].

Компьютерная микроскопия

Морфологическая диагностика на уровне гистологического исследования тканей или цитологического исследования по аспиратам костного мозга часто испытывает существенные затруднения. Они связаны с гетерогенностью лимфоидного субстрата, а также с применением разных терапевтических режимов (например использование Ритуксимаба). Также важно признать причину расхождений в интерпретации результатов исследователями особенно при количественной оценке клеток тканевых образцов. Sander B и соавт. подтвердили это непостоянство и предположили, что автоматическая микроскопия может быть более воспроизводимым и точным методом [65]. Одним из подобных подходов расширения возможностей морфологического исследования лейкоцитарных клеток является применение компьютерной микроскопии. Этот метод позволяет не только оценить особенности структуры хроматина ядер бластов, но и с высокой степенью достоверности определить В- и Т-лимфоидные типы клеток при ОЛЛ. [66]. Попытка подобного анализа проводится также и в отношении лимфом [65]. Компьютерная микроскопия позволяет охарактеризовать группы клеток по их геометрическим характеристикам, цветовым и текстурным особенностям с использованием 6-цветных пространств. Alferez S et al. [67] при помощи такой системы выделили из гетерогенного ряда лимфоидных клеток нормальные и реактивные лимфоциты, а также 5 групп патологических клеток: клетки ВКЛ, лимфоидные клетки при лимфоме зоны мантии (ЛЗМ), ФЛ, лимфоциты и пролимфоциты при ХЛЛ. Точность разделения клеток на три группы (нормальные, реактивные и патологические клетки) составила 97,67%. Точность деления патологических лимфоидных клеток на 5 групп составила 91,23%. Этим методом было проанализировано 340 изображений лимфоидных клеток: 150 при ХЛЛ, 100 клеток ВКЛ и 90 нормальных лимфоцитов. Alferez S и соавт. и Puigvi L и соавт. проанализировали 20 наиболее важных параметров для морфологической дифференцировки 12 типов лимфоидных клеток. Был проведен анализ сравнительных результатов при В-ЛПЗ, Т-НХЛ, в норме и реактивных состояниях. В большинстве случаев обнаруживались значимые различия: 19 —

при сравнении клеток ФЛ и ЛЗМ, 18 — для бластов и реактивных клеток, 17 — для клеток Сезари и Т-пролимфоцитов и 16 — для В- и Т-пролимфоцитов и 16 — для вилезных клеток. В результате были выделены 5 количественных параметров значимых для установления различия между реактивными элементами и отдельными типами патологических лимфоидных клеток [68,69]. Однако до настоящего времени не разработаны подходы для детального и четкого диагностирования такой сложной патологии как ЛПЗ. Полиморфизм опухолевого субстрата делает эту проблему сложной для разрешения.

Периферическая кровь

В настоящее время общепринятым является положение, что увеличение числа лимфоцитов в периферической крови более 4×10^9 /л свидетельствует о лейкемической фазе ФЛ. Лейкемизация ФЛ (наличие лейкемического компонента в крови) наблюдается у 7–11% больных [70,71], ассоциируется с плохим прогнозом [72], снижением бессобытийной выживаемости (БСВ) и общей выживаемости (ОВ) [71]. Лимфоцитоз оказался более значимым в прогностическом отношении, нежели остальные признаки, например FLIPI [73,74]. Авторы связывают ухудшение прогноза при лейкемизации ФЛ с экспрессией межклеточной молекулы адгезии CD54 на лимфоцитах и соответственно с повышением ее уровня в сыворотке. Такая же неблагоприятная зависимость была установлена и по отношению к экспрессии CD44. Таким образом, значение имеет не только число лимфоцитов, но и их иммунологический профиль. Именно, наличие ряда молекул на лимфоцитах играет существенную роль в плохом прогнозе заболевания [75].

Отдельную проблему в анализе крови составили данные соотношения абсолютных показателей лимфоцитов к моноцитам (ALC/AMC). По результатам ряда работ была установлена независимая прогностическая роль этого индекса. Значение более 4,7 достоверно ассоциировалось с более высокой БСВ и ОВ. Оно имело большую достоверность, нежели показатели FLIPI [76]. Авторы рекомендуют этот метод в качестве дополнительного простого и надежного

критерия прогноза длительности жизни больных и выделения группы пациентов с неблагоприятными прогнозом. Подобный критерий находит себе место также при прогнозе больным с ДБККЛ и негематологическими опухолями [77-82].

Иммунофенотип

Иммунофенотипическое исследование лимфоидной опухолевой ткани включает использование комплекса антител, позволяющих установить направленность дифференцировки и этап созревания опухолевого клона. Опухолевые клетки ФЛ характеризуются экспрессией обще-В-клеточных маркеров: CD19, CD20, CD22, CD79а и дополнительных маркеров CD10, CD23, CD38.

CD19 – гликопротеин, полипептидная цепь которого состоит из 537 аминокислот. Внеклеточная область представлена двумя Ig- подобными доменами. Цитоплазматическая часть имеет несколько участков N-гликозилирования и фосфолирования. Экспрессируется на В-лимфоцитах со стадии клетки-предшественницы В-лимфопоэза, исчезает на плазматических клетках. Также присутствует на ФДК и незрелых клетках миеломоноцитарного ряда. Функция CD19 – участие в В-клеточном развитии, активации и дифференцировке [83].

В последнее время в онкогематологии применяется новый иммунотерапевтический метод – адоптивная клеточная терапия генетически модифицированными Т-лимфоцитами. Этот вид лечения совмещает в себе технологии клеточной терапии и генной инженерии [84]. Адоптивная клеточная терапия основана на введении в организм пациента аутологичных или аллогенных Т-лимфоцитов, которые подверглись *ex vivo* генетической модификации и экспрессируют на своей поверхности химерный антигенный рецептор (Chimeric Antigen Receptor, CAR) [85,86], способный узнавать опухолевые антигены и связываться с ними. При В-клеточных лимфопролиферативных новообразованиях CAR могут быть нацелены на связывание с поверхностным антигеном CD19 [87].

В клинических исследованиях, при неходжкинских лимфомах CD19-CAR-T-терапия показывает высокую эффективность (53–93 % полных ремиссий). [88-91]

CD20 экспрессируется на всех стадиях развития В-лимфоцита, кроме пре-В предшественников и плазматических клеток. В связи с этим он был выбран в качестве цели для таргентной терапии лимфом.

CD10 антиген — важный маркер ФЛ. Низкая экспрессия CD10 ассоциируется с плохим прогнозом, высокой цитологической степенью лимфомы и агрессивным течением [92,93]. Снижение или отсутствие экспрессии наблюдается при гастроинтестинальном варианте ФЛ [94]. Maeshima AM. с соавт. описали снижение экспрессии у больных ФЛ в периферической крови и костном мозге по сравнению с первичным очагом поражения [95]. При III цитологическом типе ФЛ и интерфолликулярном компоненте экспрессия CD10 может быть слабой или отсутствовать [96].

CD23 способствует выживаемости В-лимфоцитов в зародышевом центре [97,98]. При ФЛ 3 цитологического типа экспрессия CD23 чаще отсутствует в сравнении с 1 и 2 цитологическим типом. Общая и безрецидивная выживаемость выше в группе CD23+, чем CD23– [99]. Katzenberger T. с соавт. описали высокую частоту CD23+ в группе больных ФЛ с диффузным характером роста опухоли и имеющих специфическую хромосомную поломку del (1p36) [100].

CD38 — трансмембранный гликопротеин II типа. Антиген CD38 экспрессирован на 99% CD34+ клеток костного мозга. Популяция CD34+, CD38+ клеток может не содержать других дифференцировочных антигенов. Предполагается, что CD34+, CD38+ клетки являются примитивными стволовыми клетками, по мере снижения интенсивности экспрессии антигена CD34 возрастает экспрессия антигена CD38. Этот антиген экспрессируется также на активированных Т- и В-лимфоцитах, НК-клетках, моноцитах, плазматических клетках и медуллярных тимоцитах. Появление антигена CD38 зависит от дифференцировки и активации клеток. Так CD38 присутствует на ранних стадиях В-клеточного онтогенеза, исчезает в процессе созревания В-лимфоцитов и снова появляется на последней стадии дифференцировки плазматических клеток.

Большинство покоящихся зрелых лимфоцитов обеих линий этот антиген не содержат [83].

Расхождение

Существенную проблему в диагностике вариантов ФЛ и ее цитологических типов составляет расхождение в результатах исследования разных патологических очагов. В этих случаях иногда используют термин дискордантность. Расхождение при ФЛ подразумевает сосуществование двух различных гистологических типов лимфомы как минимум в двух различных анатомических областях, чаще встречается при сравнении костного мозга и лимфоузлов, когда более агрессивный тип лимфомы обнаруживается в биоптате лимфоузлов и индолентный тип — в костном мозге [101]. Гистологическое расхождение наблюдается в 16–40% случаев поражения костного мозга при ФЛ [102-104].

Ранее диагностика расхождения базировалась на данных гистологических исследований, применение проточной цитометрии и молекулярных исследований помогло более подробно исследовать этот феномен [101]. Так, различия между данными гистологического и иммунофенотипического исследованиями были выявлены у 15% пациентов. Merli M с соавт. и Maeshima AM с соавт. наблюдали расхождение экспрессии CD10: частота CD10 положительных клеток была ниже в костном мозге и периферической крови, чем в первичном очаге поражения [95,104].

Учитывая полиморфизм клеточного субстрата, возможность различной картины неоплазии в разных областях, А.И. Воробьев рекомендует сопровождать диагноз подробным словесным описанием цитологической и гистологической картины. Оно включает описание структуры лимфатического узла, характер лимфоидной пролиферации, подробное описание клеток опухоли, особенности роста атипичных клеток [49].

Микроокружение

Неопухолевые иммунные и стромальные клетки играют важную роль в патогенезе ФЛ. Элементы микроокружения в лимфоузле: Т-лимфоциты, антигенпрезентирующие клетки и макрофаги, активно взаимодействуют с опухолевыми клетками. Они обеспечивают опухолевым клеткам привилегии в выживании. Результатом этого взаимодействия является неуклонная пролиферация неопластических лимфоидных элементов, рост лейкомического клона, в котором клетки последовательно накапливают генетические поломки. Свидетельством этого влияния является факт ассоциации повторяющихся генетических поломок и состава опухолевого микроокружения [105-107], а также зависимость между экспрессией генов и общей выживаемостью [108].

Нодулярные сети, состоящие из ФДК, присутствуют в опухолевых фолликулах, а также в экстранодальных очагах и костном мозге. Они экспрессируют CD21 и CD23. В зонах диффузного роста ФДК отсутствуют, что может быть связано либо с потерей зависимости опухолевых клеток от ФДК, либо с утратой способности привлекать ФДК. Прогностическое значение роли макрофагов при ФЛ остается дискуссионным. В соответствии с данными ряда исследователей [109,110] увеличение числа макрофагов при ФЛ ассоциировалось со снижением ОВ у пациентов, получавших химиотерапию, но с другой стороны являлось хорошим прогностическим признаком у больных ФЛ, которые получали терапию ритуксимабом [110,111]. В отдельных исследованиях показано, что число макрофагов не является прогностически значимым [112,113].

В состав клеток микроокружения входят Т – клетки с различным иммунологическим профилем. В опухолевых фолликулах они распределены беспорядочно и они менее многочисленны по сравнению с реактивными фолликулами.

Среди Т-клеток опухолевых фолликулов преобладают CD4+ Т-клетки. Высокое соотношение CD4:CD8 определяется чаще при ФЛ 1–2 цитологического типа по сравнению с 3 типом. CD4+ Т-клетки располагаются преимущественно в фолликулярных, а не в диффузных зонах и снижаются в зонах трансформации в

ДВККЛ [114]. Среди CD4⁺ Т-клеток в опухоли выделяют две субпопуляции с высокой и низкой экспрессией антигена PD-1. Показано, что высокий уровень CD4⁺PD1⁺ Т-клеток, Foxp3⁺ CD4⁺Т клеток и CD8⁺ Т-клеток коррелирует с хорошим прогнозом, с высокими показателями ОБ пациентов [115]. С другой стороны повышение содержания CD4⁺ Т-клеток-хелперов и макрофагов CD 68⁺ в опухоли ухудшает прогноз [116-118]. Прогностическое значение и распределение Foxp3⁺ Т клеток остается спорным. По некоторым данным высокое число PD1⁺ клеток ассоциируется с уменьшением риска трансформации в ДВККЛ [119]. Охарактеризован состав регуляторных Т-клеток при ФЛ. Авторы предполагают, что микроокружение изменяется в течение опухолевой диссеминации [120].

Исследование антигенных параметров клеток крови позволило установить, что высокий уровень CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ клеток крови коррелирует с высоким ответом на лечение. Снижение уровня антигенов CD3, CD4, CD8 клеток крови ассоциировалось с неблагоприятным прогностическим индексом FLIPI 1, но не ассоциировались с длительностью болезни и возрастом. Высокая ОБ коррелировала с показателем CD3 более 55,7%. Значение CD8⁺ более 23,2% обеспечивало большую длительность перерыва до следующего лечения. При абсолютном числе CD4⁺клеток $> 0,16 \times 10^9/\text{л}$ определялись достоверно более длительные медианы БРВ и ОБ. Низкий показатель CD4⁺ ($< 0,16 \times 10^9$) коррелировал с моноцитозом в крови и приводил к укорочению БРВ. Этот уровень CD4 был независимым неблагоприятным фактором прогноза [121]. Взаимосвязь абсолютного содержания CD4⁺ и абсолютного числа моноцитов в крови исследовались у 127 больных ФЛ при диагностике [122]. В группе с низким абсолютным числом CD4⁺ клеток и моноцитозом при однофакторном анализе определялась низкая БСВ и ОБ. При многофакторном — только CD4⁺ имело значимое негативное влияние на прогноз БСВ и ОБ, независимые от FLIPI-2. При многофакторном анализе уровень CD3⁺ и CD4⁺клеток крови оказывал прогностически значимое влияние. CD4⁺клетки крови оказывали благоприятное влияние при терапии Ритуксимабом. Показано, что терапевтический эффект

Ритуксимаба повышается опухолево-ассоциированными Т-клетками и ответ поддерживается системными Т-клетками

Прогноз

Для определения прогноза при неходжкинских лимфомах был разработан международный прогностический индекс (МПИ). Он учитывает 5 независимых прогностических факторов: возраст старше 60 лет, повышение ЛДГ, общее состояние больного ≥ 2 ECOG, III – IV стадии заболевания в соответствии с классификацией Ann Arbor [123]. На основании этих показателей определяются группы с низкой, низкой/промежуточной, высокой/промежуточной и высокой степенями риска раннего прогрессирования. Однако разнообразие клинических проявлений опухоли, наличие индолентной и агрессивной форм, недостаточно высокая эффективность современной терапии вызвала необходимость пересмотра комплекса факторов прогноза и введение сначала индекса FLIPI-1, а затем и FLIPI-2 для оценки течения ФЛ. Анализ результативности терапии больших групп пациентов дал возможность установить независимое прогностическое значение показателей Hb и поражения костного мозга больных ФЛ. В настоящее время для определения групп риска пациентов учитываются анемия и инфильтрация костного мозга. Но данные литературы свидетельствуют о том, что вопросы состояния гемопоэза больных ФЛ при разных стадиях заболевания, роль клеточных элементов опухолевого субстрата и клеток микроокружения исследованы недостаточно и требуют своего уточнения.

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование были включены 152 первичных пациента ФЛ, которые наблюдались, проходили обследование, получали лечение или рекомендации по его проведению в отделении химиотерапии гемобластозов отдела гематологии и трансплантации костного мозга (заведующий отделом д.м.н. П.А. Зейналова) и/или в научно-консультативном отделении амбулаторных методов диагностики и лечения (главный врач д.м.н. В.Ш. Рамишвили) ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России с января 2006 по декабрь 2016г. Диагноз ФЛ устанавливался на основании классификации ВОЗ с учетом морфологических, гистологических, иммуногистохимических и иммунофенотипических критериев.

В зависимости от наличия или отсутствия поражения костного мозга все пациенты были разделены на три группы:

I группа: без поражения костного мозга – 93 пациента (61,2%)

II группа: поражение костного мозга только по трепанобиоптату – 26 пациентов (17,1%)

III группа: поражение костного мозга по трепанобиоптату и аспирату – 33 пациента (21,7%)

Характеристика трех групп пациентов по полу, возрасту и стадиям опухолевого процесса представлена в табл. 4

Таблица 4 — Клинические характеристики больных ФЛ в зависимости от наличия поражения костного мозга

Группы	пол	Средний возраст M±m (min-max)	Старше 60лет (%)	Распределение пациентов по стадиям опухолевого процесса (%)
I группа	Муж 30 (32,3%) Жен 63 (67,7%)	56,8±1,1 (27–82)	35 (37,6)	1 — 15(16,1) 2 — 29(31,2) 3 — 23 (24,7) 4 — 26(28)
II группа	Муж 8(30,8%) Жен 18 (69,2%)	56,1±2,8 (26–84)	8(30,8)	4 — 26 (100)
III группа	Муж 12 (36,4%) Жен 21 (63,6%)	55,4±2,2 (30–78)	13 (39,4)	4 — 26 (100)

Всем 152 пациентам было проведено морфологическое исследование аспирата костного мозга. В большинстве случаев — гистологические исследования лимфоузлов (92,7%), трепанобиоптата (96,7%), ИГХ лимфоузлов и/или трепанобиоптата. При наличии опухолевого клона в аспирате проводилось иммунофенотипическое исследование костного мозга (21,7%), при бластоидном типе опухолевых клеток проводилось цитохимическое исследование (2%). Оно включало определение пероксидазы, липидов, неспецифической эстеразы, ингибируемой фторидом натрия и PAS-реакцию. (табл.5)

Таблица 5 — Число проведенных исследований в трех группах больных ФЛ.

	I группа (%)	II группа (%)	III группа (%)	Количество исследований (%)
Число больных в группе	93 (61,2)	26 (17,1)	33 (21,7)	152
Гистологическое исследование лимфоузлов и ИГХ	93 (61,2)	26 (17,1)	22 (14,5)	141 (92,7)
трепанобиопсия	93 (61,2)	26 (17,1)	28 (18,4)	147 (96,7)
Морфологическое исследование аспирата костного мозга	93 (61,2)	26 (17,1)	33 (21,7)	152
Иммунофенотипическое исследование аспирата	0	0	33 (21,7)	33 (21,7)
Цитохимическое исследование аспирата костного мозга	0	0	3 (2)	3 (2)

Гистологическое и иммуногистохимическое исследование лимфоузлов и трепанобиоптатов костного мозга проводилось в патологоанатомическом отделении отдела морфологической и молекулярно-генетической диагностики

опухолей НИИ клинической онкологии им. акад. РАН и РАМН Н.Н. Трапезникова ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (заведующий отделением к.м.н. Н.А. Козлов). Материал биопсии фиксировали в нейтральном забуференном формалине, заливали в парафин, окрашивали гематоксилином и эозином, пикрофуксином, метиленовым зеленым – пиронином (по Браше). Окраска цитологических препаратов экстрамедуллярной опухолевой ткани проводилась по методу Лейшмана, а костного мозга — по методике Романовского-Гимза.

Морфологическое исследование аспириатов костного мозга у всех 152 пациентов и иммунофенотипическое исследование аспириатов костного мозга у 33 пациентов было проведено в лаборатории иммунологии гемопоэза централизованного клиничко-лабораторного отдела НИИ клинической онкологии им. акад. РАН и РАМН Н.Н. Трапезникова ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (руководитель д.м.н. профессор Н.Н. Тупицын).

Взятие аспириата костного мозга (в объеме 0,5–1 мл.) проводилось в пробирки Vacutainer с сухим ЭДТА. В полученном материале было подсчитано число миелокариоцитов, приготавливались мазки костного мозга и проводилось исследование иммунофенотипа лимфоидных клеток.

Препараты костного мозга были окрашены по методу Паппенгейма. Подсчет миелограммы проводился двумя врачами, по 250 клеток каждым (в каждом случае исследовалось 500 миелокариоцитов).

Количество миелокариоцитов оценивали при подсчете на гематологическом анализаторе Micros 60 (норма 41,6 – 195 клеток $\times 10^9/\text{л}$).

Для оценки функционального состояния нейтрофилов и нормобластов костного мозга были рассчитаны и проанализированы их индексы созревания.

Индекс созревания нейтрофилов определяется путем деления суммы молодых форм (промиелоцитов, миелоцитов и метамиелоцитов) на сумму зрелых (палочкоядерные и сегментоядерные) нейтрофилов. В норме показатель индекса колеблется от 0,5 до 0,9 [124]. При нормальной клеточности костного мозга (в нашем наблюдении у подавляющего большинства пациентов) повышение индекса

свидетельствует о задержке созревания нейтрофилов, снижение – об увеличении элиминации зрелых нейтрофилов в кровь.

Индекс созревания нормобластов (эритрокариоцитов) показывает соотношение гемоглобинизированных нормобластов (полихроматофильных и оксифильных) ко всем клеткам красного ряда. Нормальное значение 0,8-0,9. Снижение индекса отражает задержку гемоглобинизации вследствие дефицита железа или увеличение числа молодых форм. Повышение индекса коррелирует с увеличением доли полихроматофильных и оксифильных нормобластов и свидетельствует об ускорении гемоглобинизации [124].

У 33 пациентов с наличием опухолевого поражения в аспирате костного мозга проводился подсчет лимфоцитограммы двумя независимыми экспертами по 100 клеток каждым. Было выделено три типа лимфоидных клеток:

1. Типичные лимфоциты. К ним были отнесены клетки округлой формы, небольшого размера (менее 2 эритроцитов). Форма ядер в большинстве клеток была округлой. Структура хроматина неравномерная, глыбчатая. Цитоплазма светло-базофильная с перинуклеарной зоной.

2. Центроциты. К ним относили клетки мелких и средних размеров с угловатыми, вытянутыми, искривленными ядрами. В части ядер определялась расщелина (cleaved).

3. Центробласты. Крупные округлые или овальные клетки, иногда с вогнутым или многодольчатым ядром, везикулярным хроматином, 1 или 3 периферическими нуклеолами и узким ободком цитоплазмы.

Наличие в костном мозге клеток с морфологической характеристикой бластов требовало проведение дифференциального диагноза агрессивной НХЛ и острого лейкоза. С этой целью в палитру диагностических подходов были включены цитохимические методы анализа. Они включали исследование маркеров гранулоцитарной направленности обмена: миелопероксидазы и липидов, или моноцитарной – неспецифической эстеразы с ингибированием фторидом натрия. Отрицательный результат реакции свидетельствовал об отсутствии миелоидных признаков генеза клеток. Кроме того, проводилась PAS-

реакция для определения расположения в цитоплазме бластов PAS-положительного вещества. Выявление PAS-положительного вещества в диффузной форме свидетельствует о миелоидной принадлежности бластов, в гранулярной — лимфоидной. Проведенное изучение бластов в трех случаях ФЛ показало отсутствие признаков миелоидной дифференцировки клеток: реакции на пероксидазу, липиды и неспецифическую эстеразу были негативны. PAS-положительное вещество в диффузной форме не выявлялось. Проведенное в дальнейшем иммунофенотипическое исследование позволило диагностировать в этих 3 случаях ФЛ.

Морфологические исследования элементов опухолевого клона в костном мозге были дополнены изучением особенностей структуры хроматина ядер лимфоидных клеток с помощью компьютерной микроскопии. Исследование проводилось на обычных мазках аспиратов костного мозга, окрашенных по методу Паппенгейма. Всего были проанализированы препараты аспиратов 13 пациентов с ФЛ и в качестве контроля 14 мазков периферической крови доноров. Изображения клеток формировались с использованием цветовой модели RGB (Red, Green, Blue) на автоматизированном микроскопе Olympus BX43 со спектральной камерой Impers IPX-4MIST-GCFB.

Характеристика лимфоидных элементов с помощью компьютерной микроскопии заключается в определении комплекса специфических морфологических признаков клеток, определяемых автоматически специальной программой. В число признаков клеток входят геометрические параметры (размер ядер, цитоплазмы, ядрышек), цветовые (цвет ядер и цитоплазмы), контрастные (относительная интенсивность окраски ядер и цитоплазмы), текстурные (статистические характеристики пространственного распределения яркости цветовых компонентов в области ядра и цитоплазмы). Совокупность качественных и количественных признаков лимфоидных клеток включает комбинацию различных категорий признаков, в частности, морфологические, текстурные, цветовые. Важным параметром анализа типов клеток является

цветовая характеристика структуры хроматина ядер с цифровой обработкой этого показателя.

Используемая камера фиксирует изображения ядер световым потоком, проходящим через 3 фильтра: красный, зеленый и синий (RGB). В результате получается 3 полутоновых изображения ядра клетки. При взаимодействии светового потока со светочувствительным элементом матрицы камеры фотон света выбивает электрон, вследствие чего возникает заряд, соответствующий пикселю изображения. Пиксель линейно пропорционален интенсивности света, характеризуется одной цветовой компонентой (красной, зеленой или синей) и является минимально возможным элементом изображения. Изображения сохранялись в формате BMP с цветовой кодировкой RGB24 (свыше 16 млн цветов). Получено 2764 изображений, из них 941 — лимфоциты крови, 1823 — лейкоэмические лимфоидные клетки костного мозга. На этих изображениях исследовалась пространственно-цветовая регулярность в структуре хроматина лимфоцитов и лимфоидных клеток. Характеристика структуры хроматина ядер рассчитывалась с помощью программного обеспечения, разработанного на кафедре “Компьютерные медицинские системы” Национального исследовательского ядерного университета МИФИ. При этом учитывались 2400 показателей, из которых была установлена пара признаков, которая характеризовала все события с минимальной ошибкой: P_{Disp} и P_{Max} .

P_{Max} — это «максимальный вейвлет-коэффициент», рассчитанный для вейвлет-разложения Хаара с цветоразностным компонентом V цветового пространства YUV . Т.е. это граница, за которую значения вейвлет-коэффициентов не переходят.

P_{Disp} — это значение вейвлет-признака «дисперсия», рассчитанного для вейвлет-разложения Хаара с цветоразностным компонентом Q цветового пространства YIQ . Т.е. это наиболее вероятный предел колебаний вейвлет-коэффициентов вокруг его среднего значения.

Вейвлет это математическая функция, позволяющая анализировать различные частотные компоненты данных.

Иммунофенотипическое исследование лимфоцитов костного мозга в аспирате проводилось при наличии опухолевого поражения в аспирате (число клеток лимфоидного пула более 30% и/или присутствие атипичных лимфоидных клеток). Исследование проводилось на проточном цитометре FACScan (Becton Dickinson США) методом прямой иммунофлуоресценции с использованием тройной метки для оценки коэкспрессии двух-трех антигенов на мембране одной клетки. Анализ данных проведен с помощью программы WinMDI. Панель моноклональных антител включала антитела к В-линейным антигенам (CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, иммуноглобулины), Т-линейным антигенам (CD3, CD4, CD5, CD7, CD8), нелинейным антигенам CD10, CD38, HLA-DR, общелейкоцитарному антигену CD45.

Экспрессия всех маркеров кроме CD10 считалась положительной в случае обнаружения экспрессии более 20% клеток. Экспрессия маркера CD10 учитывалась в случае обнаружения его более чем на 10% клеток. Экспрессия В-линейно-ассоциированных антигенов оценивалась в гейте CD19-позитивных клеток. Количество клеток аспирата костного мозга экспрессирующих маркеры, определялось в процентах.

Был проведен анализ данных периферической крови: содержание гемоглобина, число эритроцитов, тромбоцитов, лейкоцитов с подсчетом гемограммы, абсолютное количество нейтрофилов. Абсолютное количество лимфоцитов и моноцитов периферической крови вычислялось исходя из результатов подсчета гемограммы под микроскопом и общего количества лейкоцитов. Отношение лимфоциты/моноциты (Л/М) рассчитывалось путем деления абсолютного количества лимфоцитов на абсолютное количество моноцитов. Авторы ряда работ указывают на значение для прогноза лимфом определения индекса отношения лимфоцитов к моноцитам в крови — Л/М. В качестве неблагоприятного фактора при ФЛ рассматривается его уменьшение ниже 4,7.

Статистическая обработка материала и расчеты показателей проведены с использованием компьютерной программы электронных таблиц Microsoft Excel и SPSS 17.0 for Windows.

Достоверность различий значений средних показателей оценивали с помощью t-критерия Стьюдента. Для параметров качественной оценки применялся точный критерий Фишера. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. Характеристика кроветворения больных фолликулярной лимфомой на разных стадиях заболевания

Всего было обследовано 152 пациента, из них 1 стадия заболевания была установлена в 15 (9,9%) случаях, 2 — в 29 (19,1%), 3 — в 24 (15,8%), 4 в 84 (55,3%).

При сравнительном анализе показателей периферической крови 152 больных ФЛ на разных стадиях заболевания было установлено что снижение уровня Hb определялось в 47 (30,9%) случаях, количества эритроцитов в 10 (6,6%) ниже нормальных значений принятых для мужчин и женщин. Число тромбоцитов менее $150 \times 10^9/\text{л}$ было выявлено у 27 (17,8%) пациентов. Нейтропения наблюдалась редко, у 5 (3,3%) пациентов. У 4 (2,6%) пациентов наблюдалась нейтропения легкой (число нейтрофилов $1,0 - 1,5 \times 10^9/\text{л}$) степени. Среднее число нейтрофилов у этих пациентов составило $1,85 \pm 0,06$. У одного из пациентов отмечалась I стадия заболевания, у остальных троих III – IV стадии. У одного пациента с III стадией заболевания выявлялась нейтропения тяжелой степени. Анализ частоты снижения показателей периферической крови у больных ФЛ на разных стадиях заболевания представлен в таблице 6. Для удобства анализа больные с I и II стадиями объединили в одну группу, с III и IV стадиями — в другую.

Как видно из данных табл. 6, частота снижения Hb была достоверно выше у пациентов с продвинутой III и IV стадиями по сравнению с I и II. Тромбоцитопения обнаруживалась только в III и IV стадиях. Сочетание анемии и тромбоцитопении обнаруживалось соответственно только у больных с продвинутыми стадиями. Результаты анализа свидетельствуют, что анемия и тромбоцитопения констатируются при всех стадиях лимфомы.

Таблица 6 — Сравнение частоты снижения Hb и тромбоцитов в зависимости от стадии ФЛ

Стадии	Число больных со сниженным Hb/ общее число больных (%)	Число больных с тромбоцитопенией/ общее число больных (%)	Число больных с сочетанной анемией и тромбоцитопенией/ Общее число больных (%)
I и II	7/45 (15,5)	0/45	0/45
III и IV	40/107 (37,4)	25/107 (23,5)	12/107(11,2)
	p =0,004		

Для определения взаимосвязи между степенью угнетения миелопоэза и особенностями опухолевого роста было проведено исследование кроветворения больных в зависимости от лимфомной инфильтрации костного мозга, а также от морфофункциональных особенностей лейкомиического пула.

3.2 Характеристика кроветворения больных ФЛ в зависимости от наличия или отсутствия поражения костного мозга

На следующем этапе было проведено исследование показателей крови больных ФЛ в зависимости от наличия или отсутствия поражения костного мозга. Все больные были разделены на три группы:

I группа: без поражения костного мозга — 93 пациента (61,2%)

II группа: поражение костного мозга только по трепанобиоптату и отсутствие поражения по аспирату — 26 (17,1%) пациентов

III группа: поражение костного мозга по трепанобиоптату и аспирату — 33 (21,7%) пациента.

Сопоставление содержания гемоглобина, числа эритроцитов, тромбоцитов, а также абсолютных показателей нейтрофилов в среднем по трем группам в зависимости от поражения костного мозга представлено в табл. 7.

Таблица 7 — Показатели крови у больных ФЛ с/без поражения костного мозга

Группа	Число больных	Нв г/л M±m (min-max)	Эритроциты 10 ¹² /л M±m (min-max)	Тромбоциты 10 ⁹ /л M±m (min-max)	Нейтрофилы 10 ⁹ /л M±m (min-max)
I	93	133,7±1,8 (82-176)	4,6±0,6 (2,8-5,7)	242,9±8,6 (95-485)	4,6±0,3 (0,4-18,9)
II	26	130,8±3,3 (97-163)	4,5±0,1 (3,5-5,5)	191,9±12,5 (99-295)	3,9±0,3 (1,8-8,7)
III	33	125,3±4,1 (68-170)	4,4±0,13 (1,9-5,4)	187,9±17,5 (81-561)	4,6±0,3 (2,2-10,8)
p* (I и II группы)		0,451	0,312	0,005	0,285
p**(I и III группы)		0,034	0,075	0,003	0,958
p***(II и III группы)		0,325	0,611	0,859	0,218

Как видно, у больных ФЛ с лимфоидной инфильтрацией костного мозга (III группа) уровень Нв и число тромбоцитов были достоверно ниже, чем у остальных пациентов.

В III группе больных было выделено 2 подгруппы: IIIа — число лимфоидных элементов в периферической крови более 4×10^9 /л и IIIв — число лимфоидных элементов в периферической крови менее 4×10^9 /л. Содержание гемоглобина, число эритроцитов, тромбоцитов, а также абсолютные показатели нейтрофилов в этих двух группах не различались. (табл. 8)

Таблица 8 — Показатели крови у больных с поражением костного мозга по трепанобиоптату и аспирату с лейкоемизацией и без лейкоемизации.

Подгруппа	Число больных	Нв г/л M±m (min-max)	Эритроциты 10 ¹² /л M±m (min-max)	Тромбоциты 10 ⁹ /л M±m (min-max)	Нейтрофилы 10 ⁹ /л M±m (min-max)
Ша	15	129±5,8 (83-159)	4,5±0,2 (3,2-5,35)	188,7±31,8 (88-561)	5,2±0,6 (2,89-10,8)
Шв	13	127,5±7,1 (68-170)	4,25±0,26 (1,93-5,4)	176,9±15 (81-281)	3,96±0,36 (2,22-6,7)
p		0,844	0,488	0,759	0,114

Такая же зависимость была обнаружена при анализе частоты анемии и тромбоцитопении больных трех групп (табл. 9).

Таблица 9 — Частота снижения Нв, эритроцитов и тромбоцитов у больных ФЛ с/без поражения костного мозга

Группа	Число больных	Число больных со сниженным Нв (%)	Число больных со сниженными эритроцитами (%)	Число больных со сниженными тромбоцитами (%)
I	93	18 (19,3)	3 (3,2)	7 (7,5)
II	26	7 (26,9)	3 (11,5)	7(26,9)
III	33	9 (27,2)	4 (12)	13 (39,4)
p*(I и II группы)		0,768	0,455	0,015
P**(I и III группы)		0,032	0,332	0,000
P***(II и III группы)		0,325	0,919	0,373

Сравнение частоты снижения гемоглобина, эритроцитов и тромбоцитов выявило значимые различия только в показателях гемоглобина и тромбоцитов.

В III группе с поражением костного мозга по аспирату и трепанобиоптату число пациентов со сниженными показателями Hb и тромбоцитов было достоверно больше, чем в I группе без поражения. Следовательно, лейкемическая инфильтрация костного мозга существенно влияет на угнетение красного и тромбоцитарного ростков гемопоэза.

Затем были проанализированы показатели крови в зависимости от наличия лейкемических клеток в периферической крови. Для этого пациентов III группы подразделили на подгруппы IIIa и IIIb. (табл.10)

Таблица 10 — Частота снижения Hb, эритроцитов и тромбоцитов у больных III группы с лейкемизацией и без лейкемизации

Подгруппа	Число больных	Число больных со сниженным Hb (%)	Число больных со сниженными эритроцитами (%)	Число больных со сниженными тромбоцитами (%)
IIIa	15	7 (46,7)	2 (14,3)	8 (53)
IIIb	13	5 (38,5)	2 (15,4)	3 (25)
p		0,662	0,936	0,167

Как видно из табл.10, частота случаев со снижением показателей гемоглобина, эритроцитов и тромбоцитов не различалась в обеих группах.

Показатели объема эритроцитов MCV, MCH у пациентов были в большинстве случаев в пределах нормы независимо от уровня Hb. (рис. 1 и 2).

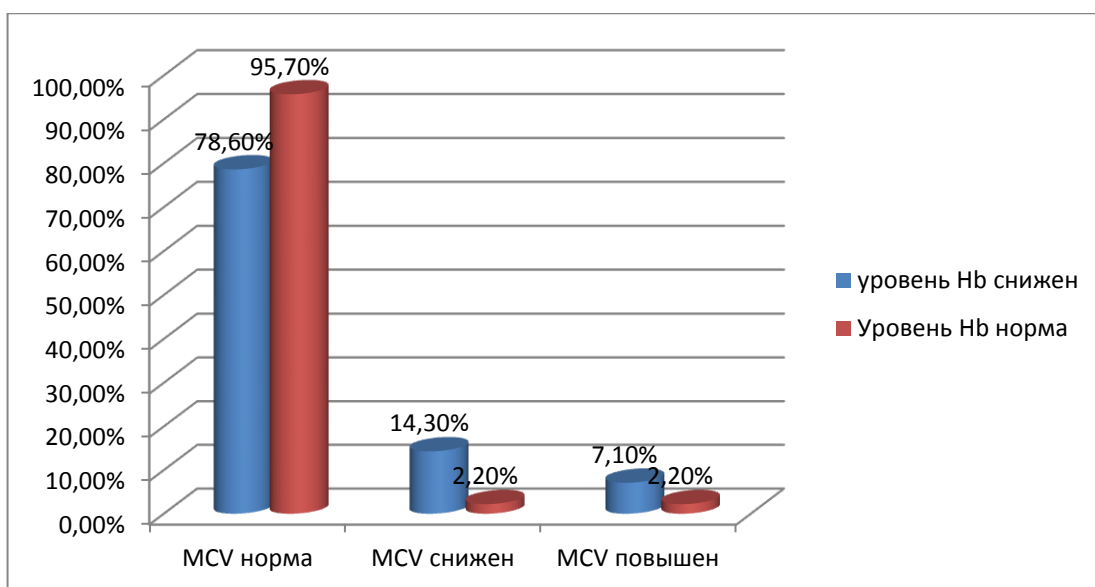


Рисунок 1 — Распределение пациентов с наличием и отсутствием анемии в зависимости от показателя МСV (норма, снижен и повышен).

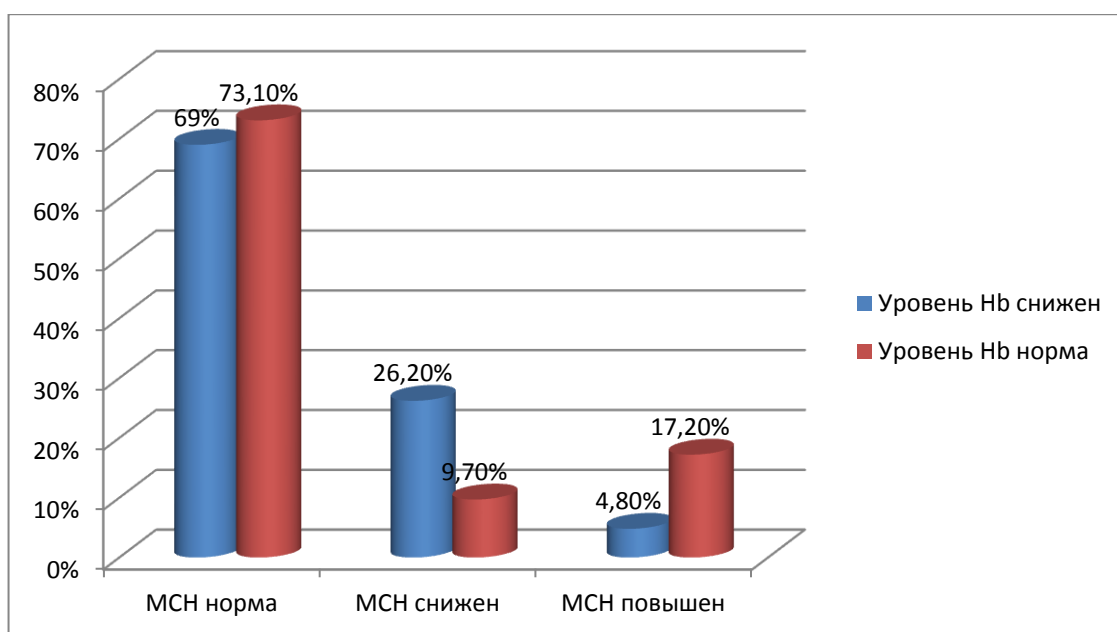


Рисунок 2 — Распределение пациентов с наличием и отсутствием анемии в зависимости от показателя МСН (норма, снижен и повышен).

Полученные данные позволяют заключить, что нормохромная нормоцитарная анемия может обнаруживаться у больных ФЛ как с наличием, так и с отсутствием поражения костного мозга. Уровень и частота снижения Hb достоверно выше при опухолевой инфильтрации костного мозга, но в тоже время

не ассоциируется с лейкопенией периферической крови. Тромбоцитопения была достоверно чаще у больных при поражении костного мозга (II и III группы). Показатели снижения тромбоцитов коррелировали со снижением уровня Hb. Сочетанная цитопения (анемия и тромбоцитопения) определялась у 13 (8,5%) пациентов, из них в I группе у 4, во II — у 2 и в III — у 7. Частота сочетанного снижения показателей красной крови и тромбоцитов была достоверно выше в III группе по сравнению с I.

Абсолютное количество нейтрофилов в периферической крови было, как правило, в пределах нормы. Усредненные данные достоверно не различались у больных с наличием и отсутствием поражения костного мозга (табл. 7,8). Нейтропения отмечалась в единичных 5 (3,3%) наблюдениях: в 3-х — в I группе и в 2-х — во II. Как правило, определялась нейтропения 1 степени ($1,77-1,99 \times 10^9/\text{л}$), в одном случае — 4 степени ($0,44 \times 10^9/\text{л}$).

Анализ количества моноцитов в крови проводился по результатам подсчета гемограммы под микроскопом. Было проведено сравнение числа моноцитов в процентном и абсолютном выражении и сопоставлены результаты в разных группах. (табл.11)

Таблица 11 — Число моноцитов (абсолютное и процентное) в крови у больных ФЛ с/без поражения костного мозга.

Группа	Число больных	% моноцитов в ПК M±m (min-max)	Абсолютное значение моноцитов в ПК M±m (min-max)	Количество больных с моноцитозом более $0,8 \times 10^9/\text{л}$ /общее число больных (%)
I	55	7.9±0.7 (1–32)	0,54±0,09 (0,05–4,8)	5/55 (9,1)
II	15	7,8±1,1 (2–17)	0,44±0,06 (0,08–0,87)	2/15 (13,3)
III	27	6±0,8 (1–17)	0,7±0,08 (0,19–2,07)	7/27 (25,9)
p* I и II		p* 0,924	p* 0,545	p* 0,627
p** I и III		p** 0,103	p** 0,236	p** 0,043
p*** II и III		p*** 0,176	p*** 0,03	p*** 0,341

ПК — периферическая кровь

Как следует из данных таблицы, процентная доля моноцитов в гемограмме периферической крови не различалась достоверно между тремя группами, однако показатели абсолютного числа моноцитов и его частоты были достоверно выше в III группе.

Нельзя исключить возможности связи этих данных с общим увеличением числа лейкоцитов за счет лимфоцитоза в III группе. Однако при сравнении в III группе 14 случаев с лейкоцитозом (А) и 13 без него (В) абсолютное число моноцитов и частота пациентов с абсолютным моноцитозом достоверно не различались (табл. 12).

Таблица 12 — Сравнение количества моноцитов больных с лейкоцитозом и с нормальным числом лейкоцитов.

Группы	Число пациентов	Число пациентов с абсолютным моноцитозом (%)	Число моноцитов в периферической крови $\times 10^9/\text{л}$ M \pm m (min-max)
А	14	5 (35,7)	0,8 \pm 0,14 (0,19-2,07)
В	13	2 (15,4)	0,59 \pm 0,07 (0,29-1,1)
р		0,228	0,177

Полученные данные позволяют сделать вывод, несмотря на малую выборку, что при поражении костного мозга (по аспирату и трепанобиоптату) моноцитоз в крови определяется чаще, чем у остальных пациентов.

Лейкемизация — превышение количества лимфоцитов более 20% в гемограмме отсутствовало в I и II группах, и было обнаружено в III группе у трети (36,4%) больных. Увеличение числа лимфоидных элементов было обусловлено циркуляцией в крови неопластических лимфоидных клеток: centroцитов и центробластов. Морфологическое сходство части опухолевых лимфоидных элементов с нормальными лимфоцитами затрудняет их

идентификацию при нормальном числе лейкоцитов. Вполне вероятно, что иммунофенотическое исследование лимфоидного пула позволило бы чаще выявлять неопластические циркулирующие клетки, чем морфологическое.

Авторы ряда работ указывают на значение для прогноза лимфом определения отношения лимфоцитов к моноцитам в крови — индекс Л/М. В качестве неблагоприятного фактора рассматривается его уменьшение ниже 4,7 при ФЛ. Было проведено определение этого индекса у всех пациентов за исключением 15 случаев III группы с лимфоцитозом в крови более $4000 \times 10^9/\text{л.}$, обусловленным опухолевыми лимфоидными клетками. (табл.13)

Таблица 13 — Сравнение индекса Л/М у больных с/без поражения костного мозга.

Группа	Число больных	Индекс Л/М M±m (min-max)	Число больных с индексом Л/М < 4,7 (%)
I	55	4,8±0,5 (0,6-23)	33 (60)
II	15	3,9±0,6 (0,8-10)	11 (73,3)
III	13	3,8±0,4 (0,6-6)	11 (84,6)
		p (I и II) 0,375 p (I и III) 0,000 p (II и III) 0,034	p (I и II) 0,343 p (I и III) 0,100 p (II и III) 0,043

Как видно из данных таблицы 13, средние показатели индекса Л/М были сниженными во всех группах у большинства пациентов 55/83 (66%). Частота снижения индекса Л/М нарастала от I группы к III, причем в III она была достоверно выше, чем в двух остальных. Можно согласиться с авторами ранее упомянутых исследований, что использование такого простого показателя может дать дополнительную информацию для определения группы риска пациентов.

Таким образом, результаты анализа показателей периферической крови больных ФЛ позволяют заключить, что анемия и тромбоцитопения выявляются на всех, в том числе и на ранних стадиях заболевания. Глубина и частота снижения показателей нарастает со стадией заболевания и взаимосвязана с опухолевой инфильтрацией костного мозга. Снижение числа нейтрофилов обнаруживается редко и не ассоциируется со стадией заболевания и поражением костного мозга. Число случаев с моноцитозом и со снижением индекса Л/М достоверно нарастает от I к III группе.

На следующем этапе анализа проводилось сопоставление данных исследования аспиратов костного мозга у больных анализируемых трех групп. Были рассчитаны в среднем по группе показатели количества миелокариоцитов, сумма клеток гранулоцитарного ряда и индекс их созревания, сумма клеток красного ряда и их индекс созревания, доля лимфоидного пула, а также лейкоэритробластическое отношение. (табл.14)

Таблица 14 — Показатели миелограмм больных ФЛ без поражения костного мозга (I группа), с поражением по трепанобиоптату (II группа) и с поражением по трепанобиоптату и аспирату (III группа).

	Группа I (93 б-х) M±m (min-max)	Группа II (26 б-х) M±m (min-max)	Группа III (33 б-х) M±m (min-max)	p	Нормы min-max
Миелокариоциты ×10 ⁹ /л	79,7±6,2 (25–394)	96,9±10,8 (24–225)	133,2±20,4 (14–462)	p* 0,184 p** 0,058 p*** 0,516	41,6–195,0
Сумма клеток гранулоцитарного ряда %	61,2±0,7 (42–76,6)	61,3±2,01 (35–75,2)	36,9±2,7 (4,6–65)	p* 0,508 p** 0,000 p*** 0,000	52,7–68,9
Индекс созревания гранулоцитов	0,45±0,02 (0,1-1,8)	0,6±0,1 (0,2-3,2)	0,46±0,05 (0,1-1,4)	p* 0,128 p** 0,119 p*** 0,029	0,5–0,9

Сумма клеток эритроидного ряда %	21,8±0,8 (8,2–41)	24,6±2,1 (9,8–55,4)	10,4±0,9 (0,3–24)	p* 0,308 p** 0,000 p*** 0,000	14,5–26,5
Индекс созревания нормобластов	0,93±0,004 (0,7-1)	0,94±0,01 (0,85-1)	0,96±0,01 (0,82-1)	p*0,513 p**0,129 p***0,082	0,8–0,9
Лимфоидный пул %	12,1±0,45 (2,2–29,2)	9,7±0,58 (5–16,8)	47,7±3,3 (19,4–92,2)	p* 0,01 p** 0,000 p*** 0,000	4,3–13,7
Лейко-эритронормобластическое отношение	3,3±0,16 (1-8,9)	3,1±0,32 (0,6-7,7)	5,7±1,1 (1,6-31,7)	p* 0,611 p** 0,022 p*** 0,032	2,1–4,5

p* I и II группы

p** I и III группы

p*** II и III группы

Сравнение результатов анализа пациентов I и II групп показало, что количество миелокариоцитов определялось в пределах нормальных колебаний и существенно не различалось между собой. Количество клеток гранулоцитарного ряда, также как и индекс созревания гранулоцитов был в пределах нормы. Среднее содержание клеток красного ряда было нормальным в обеих группах. Однако наблюдалось увеличение индекса созревания нормобластов в обеих группах. Увеличение индекса нормобластов определялось в большинстве случаев в I и II групп (86% и 77% пациентов соответственно). Доля лимфоидных элементов практически у всех больных I и II групп была нормальной.

Следует заключить, что проведенный анализ не выявил каких-либо особых изменений в составе аспирата костного мозга пациентов II группы по сравнению с I, несмотря на то, что по данным трепанобиопсии у них было выявлено лимфомное поражение костного мозга.

У больных III группы была установлена более высокая клеточность, чем в предыдущих двух группах, а по сравнению с I эти различия были близки к

достоверным. Значительные отличия определялись в составе миелограммы. Повышение количества миелокариоцитов было обусловлено значительным увеличением числа клеток лимфоидного ряда в аспирате за счет пролиферации неопластических лимфоидных форм: центроцитов и центробластов.

Содержание гранулоцитов и нормобластов в миелограмме в этой группе было достоверно ниже, чем в двух других. Однако снижение доли гранулоцитов и нормобластов в аспиратах было относительным, так как клеточность аспиратов была увеличена.

Лейкоэритробластический индекс у большинства пациентов был в пределах нормы (2,1–5,5).

Индекс созревания нормобластов в среднем у больных III группы был повышен и не отличался от данных других групп. Частота повышения индекса составила 87,9% и была близка к показателям других групп. Повышение индекса созревания клеток красного ряда в костном мозге коррелирует со снижением показателя уровня Hb в крови. Патогенез этих процессов связан с нарушением синтеза Hb в клетках предшественниках красного ряда. Снижение гемоглобина вызывает снижение насыщенности кислородом тканей, что в свою очередь приводит к компенсаторному увеличению секреции эритропоэтина в почках и усилению пролиферации нормобластов в костном мозге. В результате наблюдается повышение индекса созревания нормобластов.

Состав миелограммы пациентов III группы с лейкемизацией и без не различался существенно (табл. 15)

Таблица 15 — Показатели миелограмм больных III группы с наличием и отсутствием лейкемизации.

	Подгруппа IIIa M±m (min-max)	Подгруппа IIIb M±m (min-max)	p	Нормы min-max
Миелокариоциты x10 ⁹ /л	171,8±33,6 (25-462)	97,5±27,6 (15-325)	0,103	41,6-195,0
Сумма клеток гранулоцитарного ряда %	35,2±3,2 (16-55)	39,4±5,2 (4,6-65)	0,485	52,7-68,9
Индекс созревания гранулоцитов	0,56±0,09 (0,26-1,40)	0,33±0,02 (0,2-0,45)	0,015	0,5-0,9
Сумма клеток эритроидного ряда%	10±1,2 (2,6-17)	11,03±1,6 (2,8-24)	0,819	14,5-26,5
Индекс созревания нормобластов	0,95±0,01 (0,86-1)	0,95±0,01 (0,86-1)	0,372	0,8-0,9
Лимфоидный пул %	52,1±4,1 (25,8-78)	46,1±6,1 (20-92,2)	0,408	4,3-13,7
Лейко-эритронормобластическое отношение	5±1,1 (2,1-18,9)	5,4±1,2 (1,9-16,7)	0,633	2,1-4,5

Подводя итоги анализа данных периферической крови и аспиратов костного мозга можно заключить, что нарушения миелоидного ростка гемопоэза (анемия и тромбоцитопения) у больных ФЛ могут быть обнаружены уже на ранних этапах болезни при отсутствии лейкемической инфильтрации костного мозга. Степень снижения показателей и частота анемии и тромбоцитопении увеличиваются по мере прогрессирования неопластического процесса и коррелируют с объемом опухолевой ткани. Нарушения гемопоэза достоверно чаще обнаруживаются у больных с поражением костного мозга (II и III группы) по сравнению с I. Сочетанные изменения двух ростков миелопоэза (красного и тромбоцитарного) свидетельствует о том, что нарушение кроветворения является следствием функциональных изменений ранних миелоидных предшественников эритроидного и тромбоцитарного ростков и обусловлено реакцией на опухолевую лимфоидную пролиферацию. Нейтрофильный росток миелопоэза остается интактным при ФЛ.

3.3. Характеристика кроветворения больных ФЛ в зависимости от варианта лейкомического пула в аспирате костного мозга

3.3.1. Морфоиммунологическая характеристика вариантов лейкомического пула

Лейкемическая инфильтрация костного мозга по данным аспирата была установлена в 33 наблюдениях. Лимфоидный клон костного мозга характеризовался гетерогенностью, в него входили центробласты, центроциты и клетки с морфологической характеристикой лимфоцитов. Соотношение морфологических типов клеток у разных больных различался. Было выделено три морфологических варианта лейкомического пула на основании количества центробластов. Один из них был обозначен А — с числом центробластов более 30%. В него вошли 5 пациентов. Другой вариант В — с числом центробластов от 1 до 29%, 19 больных. Третий С — только с центроцитами, включал 9 наблюдений. (рис 3)

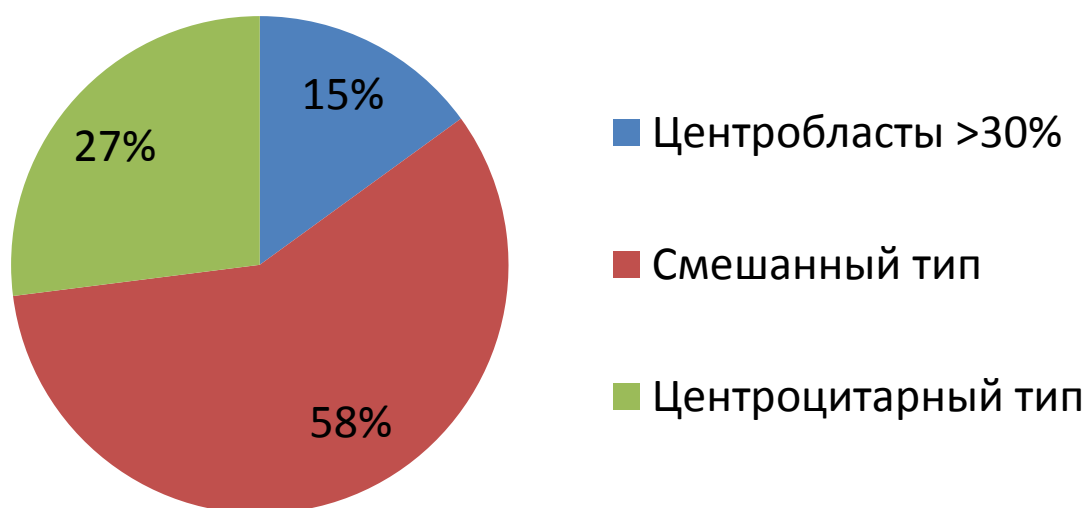


Рисунок 3 — Соотношение пациентов с разным цитологическим типом ФЛ

На рисунках 4–6 представлены разные цитологические типы лимфоидных клеток костного мозга пациентов ФЛ

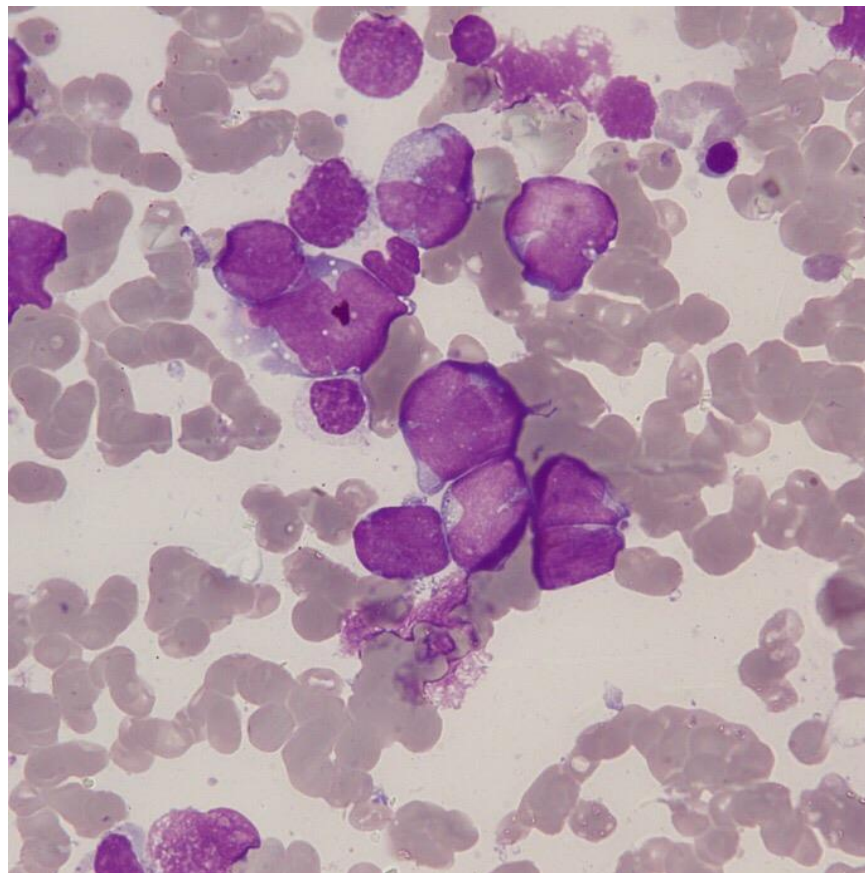
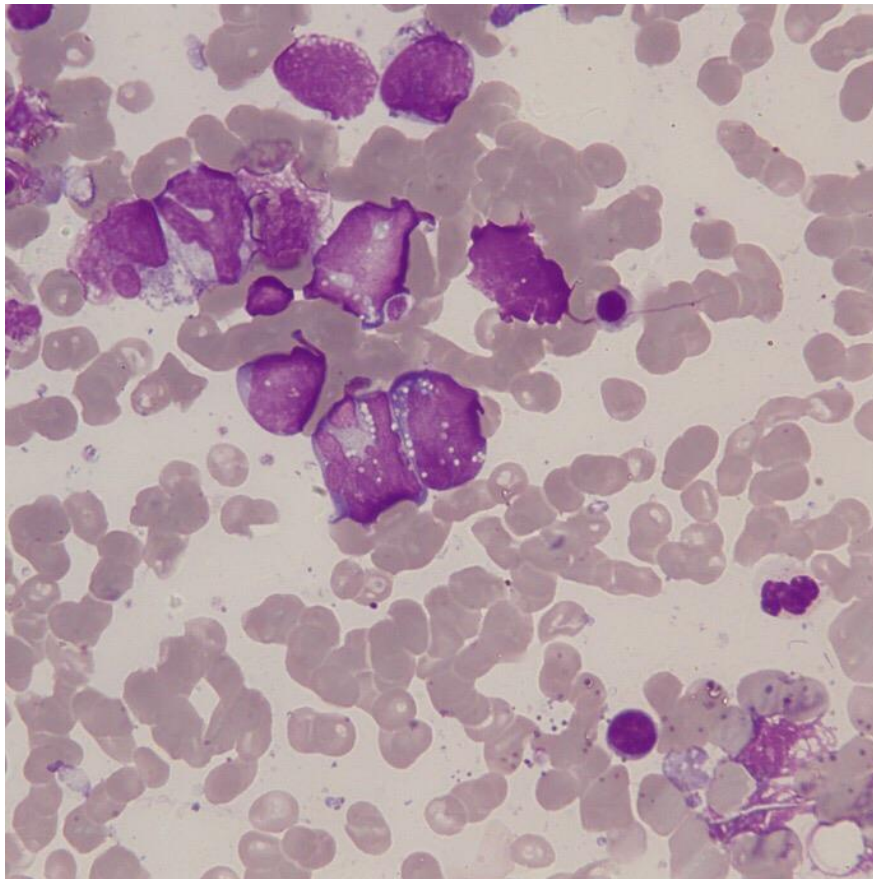


Рисунок 4 — Костный мозг 2-х больных ФЛ. Увеличение $\times 1000$.
Центробластный тип.

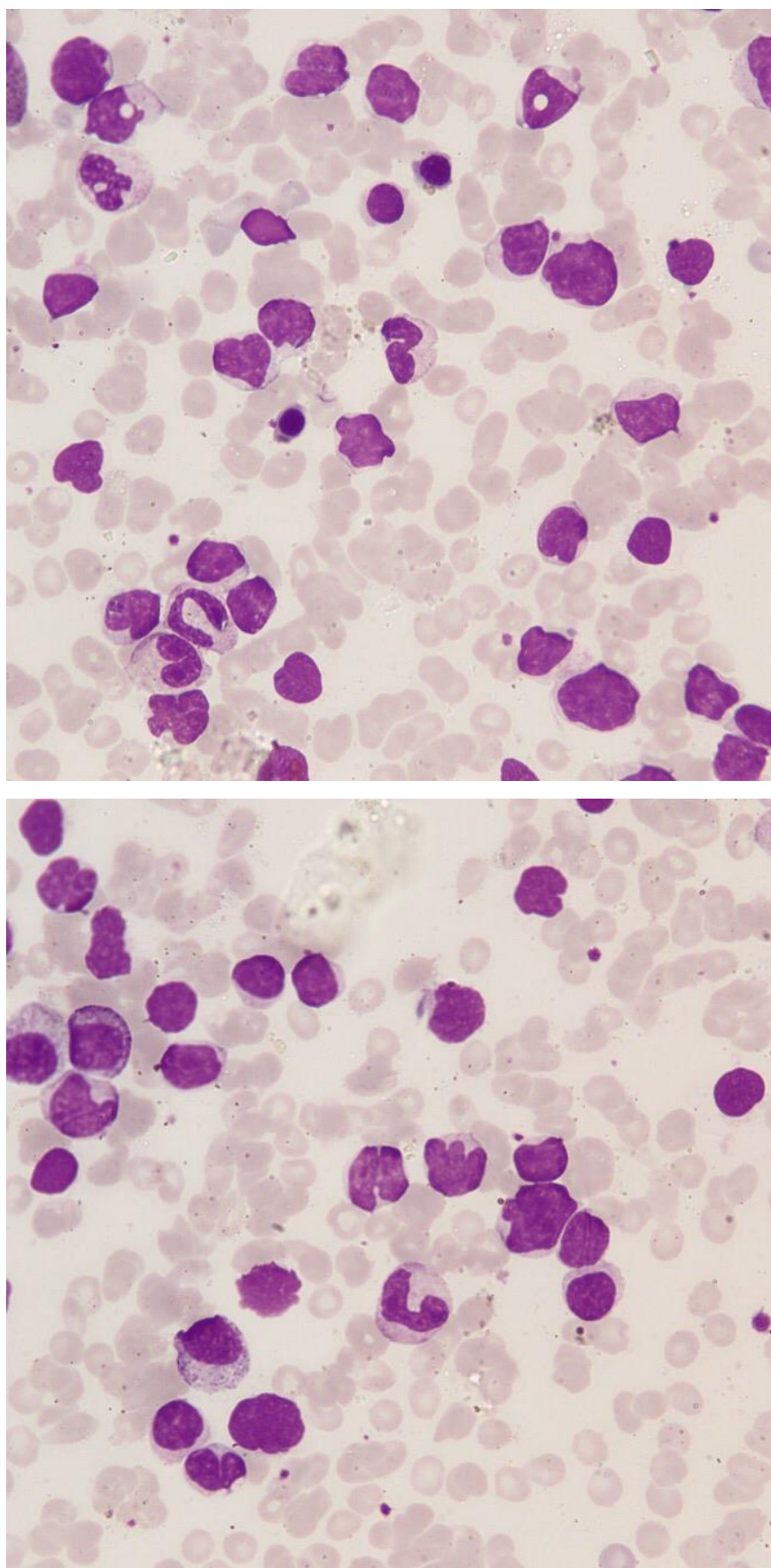


Рисунок 5 — Костный мозг больных ФЛ. Увеличение $\times 1000$. Смешанный тип

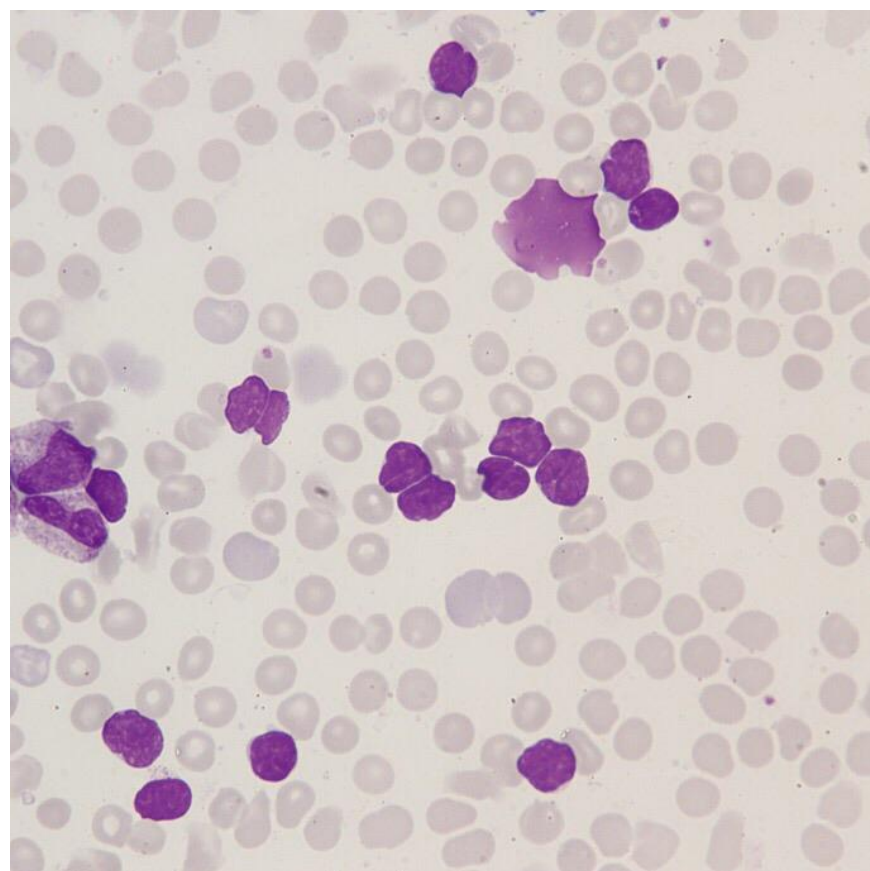
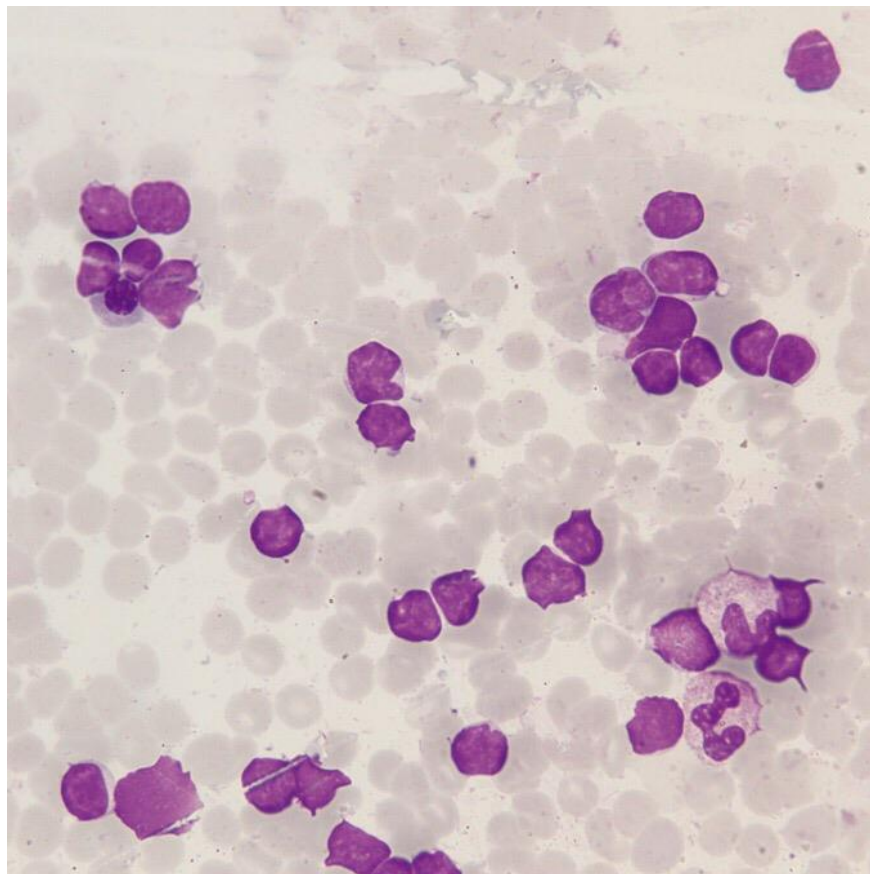


Рисунок 6 — Костный мозг больных ФЛ. Увеличение $\times 1000$.
Центроцитарный тип.

Показатели антигенов в среднем по группе на лимфоидных клетках у больных с разным соотношением центробластов и centroцитов представлено в табл.16.

Таблица 16 — Иммунный профиль опухолевых клеток у больных с разным составом лейкоцитарного пула.

Группы	CD10 M±m (min-max)	CD19+CD23+ M±m (min-max)	CD38 M±m (min-max)	HLA-DR M±m (min-max)
A n=5	29,9±18,7 (0,2-99)	46,3±19,9 (0,2-94,1)	62,1±19,1 (8,5-99)	72,7±8,4 (53,6-91,9)
B n=17	32,2±7,9 (0-87,8)	50,7±7,9 (1,6-99,8)	24,2±6,4 (0,5-91,2)	69,6±6,9 (21,4-95,8)
C n=9	33,1±12,3 (1,4-90)	36,4±9,2 (3,8-91,7)	15,5±3,8 (3,3-34,5)	74,3±6,2 (40,3-96,8)
	p (A:B)=0,9 p (A:C)=0,883 p (B:C)=0,946	p (A:B)=0,809 p (A:C)=0,614 p (B:C)=0,274	p (A:B)= 0,024 p (A:C)= 0,053 p (B:C)=0,371	p (A:B)=0,805 p (A:C)=0,878 p (B:C)=0,634

Средние показатели экспрессии антигенов CD10, CD23 и HLA-DR не различались при разном составе лейкоцитарного пула. Значение CD38 в группе А было достоверно выше, чем в В и С.

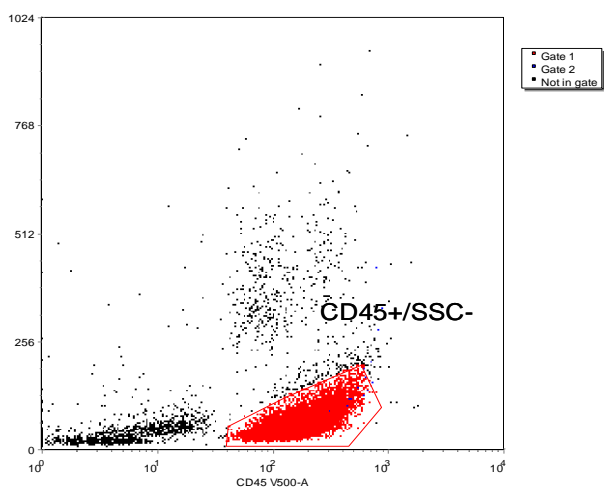
Частота экспрессии антигенов в исследуемых группах представлена в табл.17.

Таблица 17 — Сравнение больных с разными вариантами опухолевого пула в костном мозге по частоте антиген позитивных случаев.

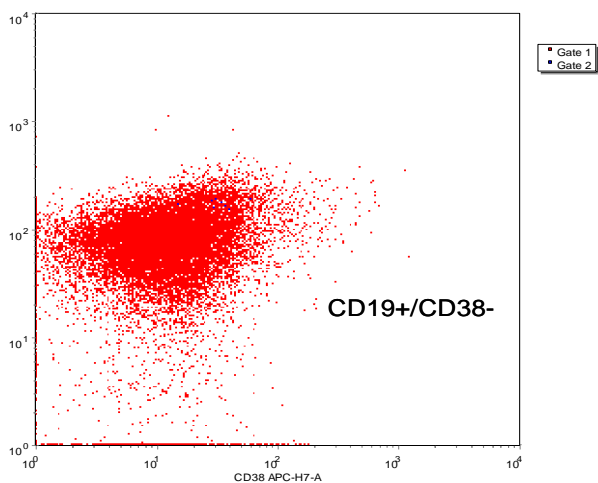
Группа	Число CD20+ случаев/ общее количество пациентов (%)	Число CD19+CD23+ случаев/ общее количество пациентов (%)	Число HLA-DR+ случаев/ общее количество пациентов (%)	Число CD38+ случаев/ общее количество пациентов (%)	Число CD10+ случаев/ общее количество пациентов (%)
A	4/5 (80)	3/5(60)	5/5(100)	4/5(80)	2/5(40)
B	17/18(94,4)	13/17(76,5)	12/12(100)	8/18(44,4)	9/17(52,9)
C	9/9(100)	6/9(66,7)	9/9(100)	2/9(22,2)	4/9(44,4)

Частота CD38+ случаев в группе А(80%) была несколько выше, чем в В (44,4%) и достоверно выше, чем в С (22,2%) ($p = 0,036$). Частота остальных маркеров была одинаковой.

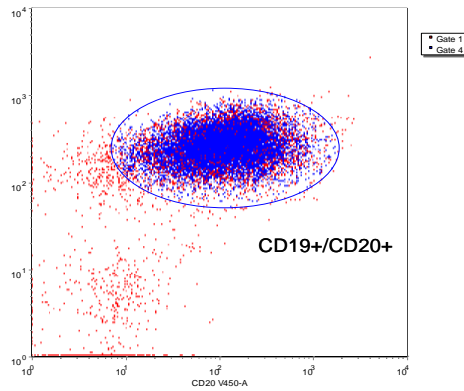
На рис.7 и 8 представлен иммунофенотип центробластов CD38+и центроцитов CD38– у больных ФЛ



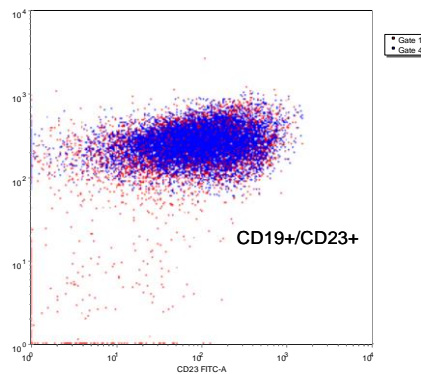
7а На цитограмме — гейт центроцитов (красный цвет) выделен по экспрессии CD45 (ось x) и низким параметрам бокового светорассеяния (SSC ось y).



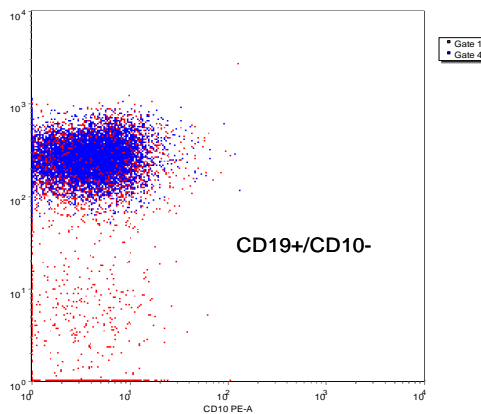
7б На цитограмме — центроциты ярко экспрессируют пан-В-клеточный антиген CD19 (ось y) , экспрессия CD38 (ось x) отсутствует.



7в На цитограмме — центроциты ярко экспрессируют пан-В-клеточный антиген CD19 (ось y) в сочетании с яркой экспрессией CD20 (ось x).

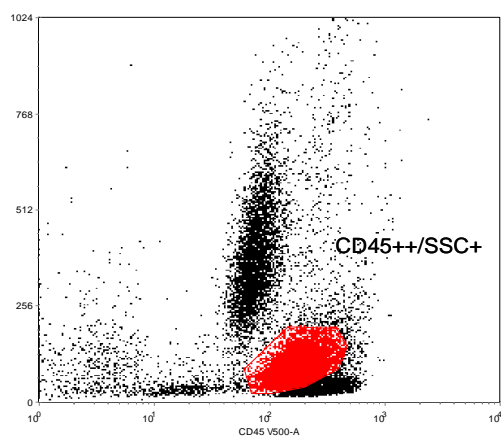


7г На цитограмме — центроциты ярко экспрессируют пан-В-клеточный антиген CD19 (ось y) в сочетании с яркой экспрессией CD23 (ось x).

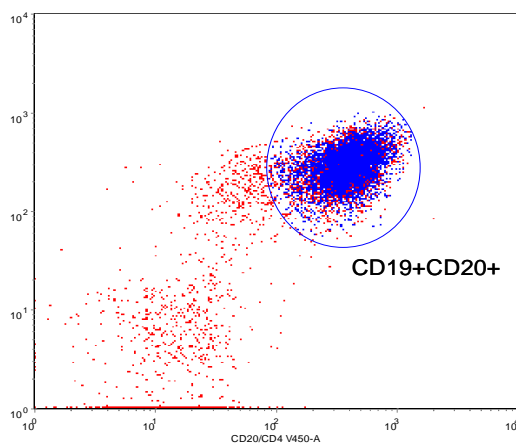


7д На цитограмме — центроциты ярко экспрессируют пан-В-клеточный антиген CD19 (ось y), экспрессия CD10 (ось x) отсутствует.

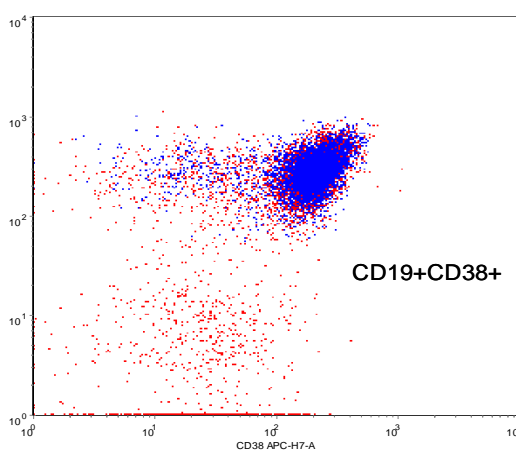
Рисунок 7— Результаты иммунофенотипирования костного мозга больного ФЛ с центроцитарным типом. Выделение гейта лимфоидных клеток по показателям экспрессии CD45 и бокового светорассеяния (а). Точечные графики экспрессии анализируемых маркеров (б-г)



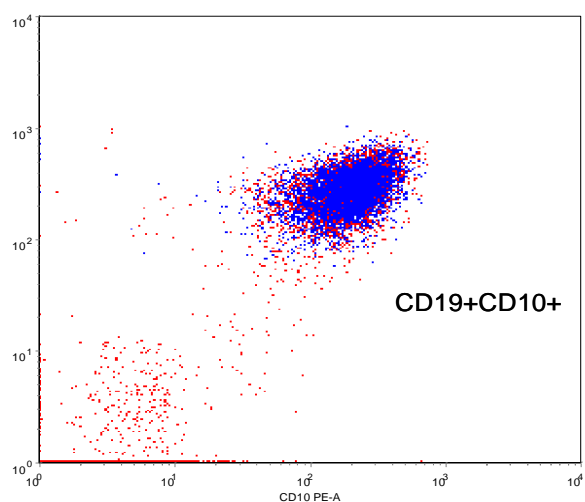
8а На цитограмме — гейт центробластов (красный цвет) выделен по экспрессии CD45 (ось x) и параметрам бокового светорассеяния (SSC ось y).



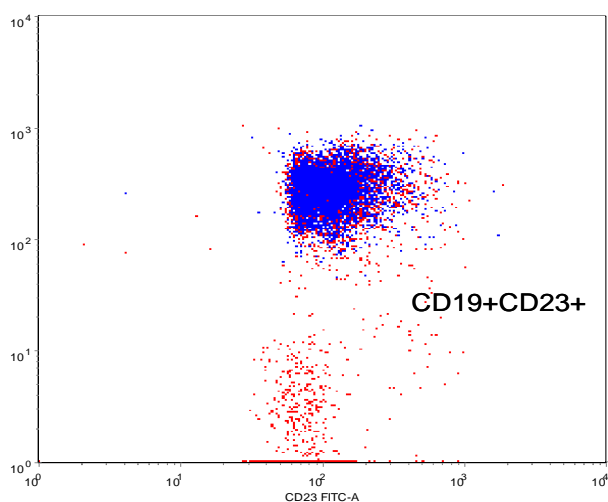
8б На цитограмме — центробласты ярко экспрессируют пан-В-клеточный антиген CD19 (ось y) в сочетании с яркой экспрессией CD20 (ось x).



8в На цитограмме — центробласты ярко экспрессируют пан-В-клеточный антиген CD19 (ось y) в сочетании с яркой экспрессией CD38 (ось x).



8г На цитограмме — центробласты ярко экспрессируют пан-В-клеточный антиген CD19 (ось y) в сочетании с яркой экспрессией CD10 (ось x).



8д На цитограмме — центробласты ярко экспрессируют пан-В-клеточный антиген CD19 (ось y) в сочетании с яркой экспрессией CD23 (ось x).

Рисунок 8 — Результаты иммунофенотипирования костного мозга больного ФЛ с центробластным типом. Выделение гейта лимфоидных клеток по показателям экспрессии CD45 и бокового светорассеяния (а). Точечные графики экспрессии анализируемых маркеров (б-д)

Таким образом, центробласты и центроциты в целом имеют сходный иммунофенотипический профиль, отличие отмечается только в более высокой и частой экспрессии CD38 на центробластах.

3.3.2. Характеристика кроветворения больных ФЛ с разными вариантами лейкоемического пула

Ранее было установлено, что угнетение гемопоэза достоверно было самым значительным в группе с поражением костного мозга по данным аспирата и трепанобиоптата. Нам представилось интересным выявить связь морфоиммунофенотипических особенностей лимфоидного пула и степенью цитопении нормальных ростков гемопоэза. В табл.18 представлены показатели периферической крови больных в зависимости от варианта лейкоемического пула.

Таблица 18 — Показатели периферической крови у больных ФЛ с разными вариантами лимфоидного пула в костном мозге.

Группы	n	Уровень Hb г/л M±m (min-max)	Число пациентов со ↓Hb (%)	Число эритроцитов ×10 ¹² /л M±m (min-max)	Число пациентов со ↓ эритро- цитов (%)	Число тромбо- цитов ×10 ⁹ /л M±m (min-max)	Число пациентов со ↓ тромбо- цитов (%)
A	5	131,8±11 (93-159)	2 (40)	4,5±0,2 (4,1-5)	0	195,4±39 (88-332)	1(20)
B	19	127,3±5,6 83-170	8 (42,1)	4,49±0,2 (2,8-5,4)	2(11.8)	181,2±26 (81-561)	8 (44.4)
C	9	117±7,1 (68-136)	6 (66,7)	4±0,3 (1,9-4,8)	2 (22,2)	197,2±29 (108-351)	4 (44,4)
p (A:B)		0,720	0,932	0,910	0,421	0,796	0,473
p (A:C)		0,280	0,334	0,257	0,255	0,971	0,360
p (B:C)		0.316	0,225	0.142	0,482	0,709	0,765

↓ — сниженное количество

Сравнение показателей периферической крови не выявило существенных различий в уровне Hb, количестве эритроцитов и тромбоцитов, что может быть связано с малой выборкой. При анализе количества лимфоцитов в периферической крови было выявлено существенное различие в числе клеток лимфоидного пула (лимфоцитов, centroцитов и центробластов) в абсолютных показателях (табл.19).

Таблица19 — Сравнение числа лимфоидных клеток в крови у больных с разными вариантами лимфоидного пула в костном мозге.

Группа	Число больных	Число лимфоидных клеток в крови (абсолютное значение) M±m (min-max)	Число лимфоидных клеток в крови (%) M±m (min-max)
A	5	1,85±0,2 (1,5-2,40)	30,5±5,5 (16-43)
B	19	10,3±3,3 (0,52-41,6)	50,8±5,4 (27-88)
C	9	29,2±12 (1,5-85,1)	68,2±11,6 (8-96)
p (A:B)		0,255	0,089
p (A:C)		0,052	0,053
p (B:C)		0.218	0.131

У больных в группе А число лимфоцитов в крови не превышает нормальных показателей, в то время как в остальных двух группах количество лимфоидных элементов повышено за счет наличия лейкемических лимфоидных форм. Различия показателей группы С по сравнению с А были близки к достоверным в абсолютных и относительных показателях ($p=0,052$ и $p=0,053$).

Лимфоцитоз в группе В был констатирован у трети (31,6%) больных, в группе С у большинства (66,6%). Таким образом, наличие лейкемизации было констатировано в группах В и С и отсутствовала во всех 5 случаях группы А с центробластным составом лимфоидного пула.

Сопоставление миелограмм больных в трех анализируемых группах представлено в табл.20.

Таблица 20 — Сравнение показателей миелограмм у больных с разными вариантами опухолевого пула.

Группа	n	Клеточность $\times 10^9/\text{л}$ $M\pm m$ (min-max)	Гранулоциты (%). $M\pm m$ (min-max)	Лимфоидные клетки (%) $M\pm m$ (min-max)	Нормобласты (%) $M\pm m$ (min-max)
A	5	96,4 \pm 33,2 (30–212)	28,3 \pm 7,6 (4,6–47,4)	48,4 \pm 13,2 (19,4–92,2)	10,9 \pm 3,2 (0,3–17,)
B	19	117 \pm 20,5 (15–325)	38,2 \pm 2,9 (21,4–62,2)	46,3 \pm 3,4 (24,6–71,2)	11,4 \pm 1,2 (2,6–24)
C	9	192,7 \pm 59,1 (14–462)	39,1 \pm 6,7 (16–65)	50,4 \pm 7,2 (20–78)	7,9 \pm 1,5 (2–15,8)
p (A:B)		0,635	0,162	0,819	0,736
p (A:C)		0,255	0,330	0,890	0,238
p (B:C)		0,138	0,894	0,564	0,259

Анализ показателей гранулоцитарного, нормобластного и лимфоидного ростков по данным аспирата костного мозга не выявил достоверных различий между больными трех анализируемых групп. Частота случаев снижения гранулоцитов и нормобластов также не различалась существенно.

Результаты анализа гематологических данных больных ФЛ с поражением костного мозга позволяют заключить, что степень выраженности и частота анемии и тромбоцитопении не взаимосвязаны с типом опухолевых клеток. Они могут быть в равной степени констатированы как при centroцитарном преобладании, так и смешанной centroцитарно/центробластной популяции опухоли. Лейкемизация отсутствовала у пациентов с центробластной характеристикой опухолевых клеток. Можно предположить, что по своим функциональными особенностями опухолевые клетки неоднородны, а центробласты обладают меньшей способностью к лейкемизации.

3.3.3. Сравнение морфологических показателей лейкемического пула в аспирате костного мозга, в трепанобиоптате и в пунктате лимфоузла

Было проведено сравнение морфологической характеристики клеток лимфоидного пула в аспирате костного мозга с данными исследования пунктатов

лимфатических узлов и результатам трепанобиоптатов. С этой целью была проанализирована частота случаев с продвинутой 2 и 3 цитологической степенью ФЛ по данным пунктатов и трепанобиоптатов (табл.21) в группах А, В и С.

Таблица 21 — Частота 3 и 2–3 цитологической степени ФЛ в трепанобиоптатах и пунктатах лимфоузлов при разных вариантах опухолевого пула в аспирате.

Группа	Трепанобиоптат		Пунктат лимфоузла	
	Число исследований	Число положительных случаев	Число исследований	Число положительных случаев
А	5	2	3	1
В	14	0	12	0
С	6	1	7	1

В группе А (центробласты в аспирате > 30%) 3 цитологическая степень была выявлена в трепанобиоптате и аспирате лимфоузла только у двух из пяти обследованных пациентов (у одного — только в трепанобиоптате, лимфоузел не исследовался). У остальных 3 пациентов в пунктатах лимфоузлов и в трепанобиоптатах была установлена 1 и 1 – 2 цитологические степени.

В группе В (центробласты 1 – 29%) характеристика лимфоидных элементов была близкой при всех методах исследования, практически расхождений не было выявлено. У большинства пациентов и в трепанобиоптатах (13 из 14 исследований) и в аспиратах лимфоузлов (11 из 12 исследований) была установлена 1 или 1–2 цитологическая степени. Лишь в одном случае и в трепанобиоптате, и в пунктате лимфоузла была установлена 1–2–3 цитологическая степень.

В группе С в большинстве случаев (6 из 7), и в трепанобиоптатах и в пунктатах лимфоузлов, как в аспирате костного мозга, была констатирована centroцитарная пролиферация. Но в одном наблюдении была выявлена

значительная разница в морфологической характеристике лимфоидного пула. В аспирате популяция была представлена только центроцитами, в трепанобиоптате и в пунктате лимфоузла преобладали центробласты и определялась 3 цитологическая степень лейкемической инфильтрации.

Таким образом, характеристика лимфомы в аспирате костного мозга в ряде случаев существенно отличалась от данных гистологического исследования. Расхождения составили три случая центробластной пролиферации в аспирате костного мозга и центроцитарной в трепанобиоптате и в пунктате лимфоузла, а также в одном случае с центроцитами в аспирате и центробластами в трепанобиоптате и пунктате лимфоузла. Объяснение этого дискорданса может заключаться в методических особенностях получения материала для исследования. В аспирате костного мозга по сравнению с трепанобиоптатом, чаще определяются центроциты, поскольку они локализируются интерстициально. Центробласты из трабекулярных зон в аспиратах обнаруживаются реже и более четко выявляются в трепанобиоптатах. В то же время, несомненно, что опухолевые очаги, локализованные в костном мозге и экстремедуллярно, могут иметь различный состав опухолевого клона.

Полученные результаты дают возможность заключить, что при ФЛ клеточный состав опухолевой популяции характеризуется выраженным полиморфизмом и может значительно различаться в зависимости от метода исследования и локализации опухолевого очага. Различные подходы к диагностике ФЛ расширяют информацию о составе опухоли и позволяют получить дополнительно более точную характеристику опухолевого пула. Морфологическая гетерогенность лимфоидных опухолевых элементов ассоциируется с различиями функциональных особенностей клеток. Так центробласты отличаются от центроцитов более частой экспрессией антигена CD38, а также меньшей способностью к лейкемизации.

3.3.4. Характеристика лимфоидных клеток лейкемического пула с помощью метода компьютерной микроскопии

Было проведено сравнительное исследование особенностей пространственно-яркостной характеристики структуры хроматина ядер нормальных лимфоцитов крови (14 доноров) и лейкемических лимфоидных элементов костного мозга (13 больных ФЛ) с помощью спектрозональной камеры. Число измеренных клеток у доноров колебалось от 22 до 140. Были рассчитаны для каждого случая средние показатели индексов P_{Max} и P_{Disp} . Результаты измерений представлены в табл.22.

Таблица 22 — Показатели индексов структуры хроматина лимфоцитов крови доноров.

Доноры	Число клеток	P_{Max}			P_{Disp}		
		M	σ	m	M	σ	m
Д1	78	27,3	3,3	0,3	12,8	2,1	0,2
Д2	140	25,9	3,1	0,3	11,6	1,8	0,2
Д3	70	29,8	2,9	0,3	11,7	2,2	0,3
Д4	111	32,6	2,8	0,3	13,8	2,5	0,2
Д5	73	32,8	6,1	0,7	13,9	2,7	0,3
Д6	98	26,4	2,5	0,2	12,6	2,1	0,2
Д7	26	32,5	4,1	0,8	16,6	3,5	0,7
Д8	31	26,6	4,0	0,7	13,1	2,5	0,4
Д9	116	27,6	3,1	0,3	13,8	1,9	0,2
Д10	39	27,6	2,7	0,4	13,1	2,2	0,3
Д11	71	31,2	2,5	0,3	14,6	2,2	0,3
Д12	22	31,5	6,2	1,3	16,1	4,7	1,1
Д13	22	32,4	3,4	0,5	14,8	2,1	0,3
Д14	44	36,6	3,9	0,6	16,8	3,1	0,5
Среднее значение		30,1	3,2	0,9	14,1	1,7	0,4

Как видно из табл. 22, средние значения индекса P_{\max} колебались от 25,9 до 36,6, а P_{disp} от 11,6 до 16,8. Средние значения индексов по группе составили $30,1 \pm 0,9$ и $14,1 \pm 0,4$ соответственно.

Показатели индексов структуры хроматина ядер лимфоидных клеток костного мозга 13 больных ФЛ представлены в табл. 23. Число исследованных лимфоидных клеток у разных больных колебалось от 39 до 376. Разброс значения индекса P_{\max} составил от 23,6 до 38,4, P_{disp} — от 15,1 до 22,8. В среднем по группе значения индекса P_{\max} составили $28,2 \pm 1,1$, а P_{disp} — $19,3 \pm 0,8$.

Таблица 23 — Показатели индексов структуры хроматина лимфоидных клеток костного мозга больных ФЛ.

Больные ФЛ	Число клеток	P_{\max}			P_{Disp}		
		М	σ	m	М	σ	m
ФЛ 1	98	31,6	3,1	0,3	17,1	3,7	0,4
ФЛ 2	146	30,2	3,2	0,2	16,8	2,8	0,3
ФЛ 3	124	27,9	2,3	0,2	22,2	5,1	0,4
ФЛ 4	176	30,9	2,9	0,2	22,7	4,5	0,3
ФЛ 5	61	25,8	3,2	0,4	22,8	6,1	0,8
ФЛ 6	46	27,3	2,8	0,4	16,5	3,1	0,4
ФЛ 7	145	27,4	1,7	0,1	20,9	3,7	0,3
ФЛ 8	39	38,4	2,0	0,3	20,6	5,6	0,9
ФЛ 9	175	29,1	5,3	0,4	18,6	3,8	0,3
ФЛ10	376	26,4	3,9	0,2	21,5	5,9	0,3
ФЛ11	215	23,6	4,2	0,3	20,9	5,7	0,4
ФЛ12	95	24,5	3,1	0,3	15,1	2,5	0,3
ФЛ13	127	24,1	2,9	0,3	15,2	2,9	0,2
среднее значение		28,2	4,1	1,1	19,3	2,9	0,8

При сравнении показателей P_{\max} и P_{disp} нормальных лимфоцитов и лимфоидных клеток больных ФЛ были установлены определенные различия. Как

видно из представленных данных в табл. 24 средние значения индекса P_{Max} близки в обеих группах, в то время как показатели P_{Disp} различаются достоверно ($p = 0,05$).

Таблица 24 — Сравнение средних показателей характеристики P_{Disp} и P_{Max} лимфоцитов и лимфоидных клеток.

Группа	Число наблюдений	P_{Max}	P_{Disp}
Доноры	14	$30,1 \pm 0,9$	$14,1 \pm 0,4$
Больные ФЛ	13	$28,2 \pm 1,1$	$19,3 \pm 0,8$
p		0,2	0,05

Графическое изображение распределения клеток в зависимости от индексов P_{Disp} и P_{Max} представлено на рис 9.

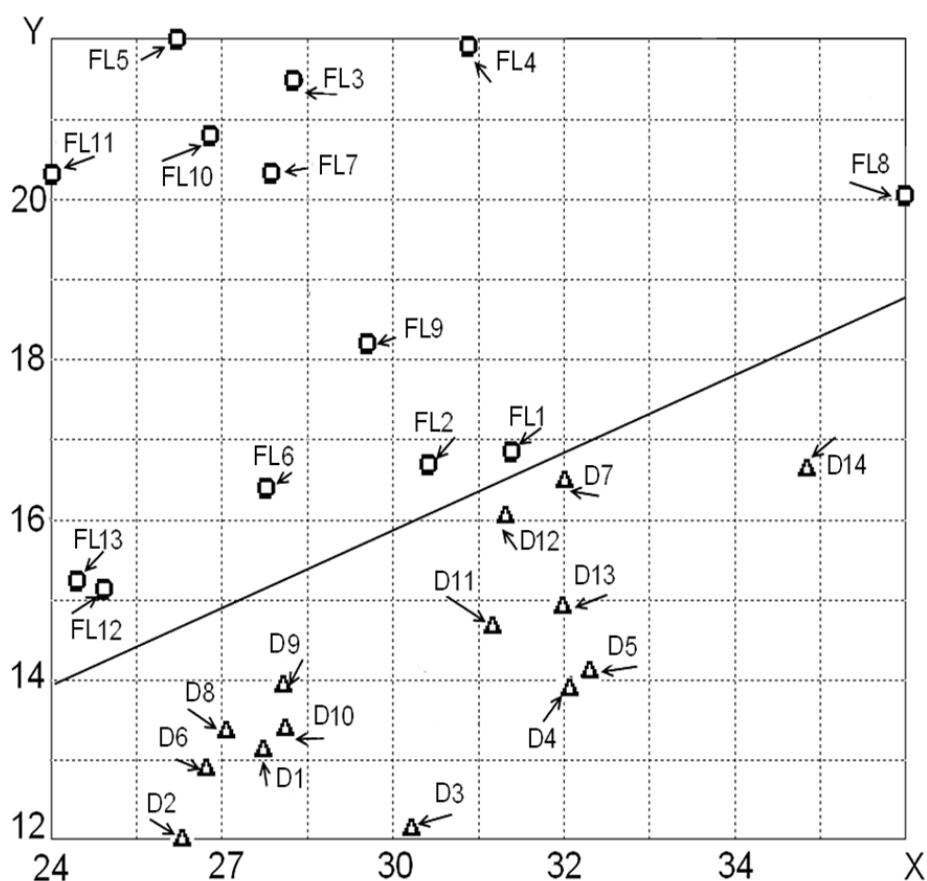


Рисунок 9 — Распределение лимфоидных клеток и лимфоцитов в двумерном пространстве признаков. По координатным осям отложены признаки: по оси абсцисс характеристика $X = P_{Max}$, по оси ординат $Y = P_{Disp}$.

Как видно на рис. 9, клетки ФЛ (FL) и лимфоциты доноров (D) располагаются в разных зонах.

Таким образом, использование компьютерной микроскопии дало возможность установить численные критерии, с помощью которых выявляются различия в структуре хроматина ядер нормальных и лейкемических лимфоцитов. Полученные данные свидетельствуют о применимости метода оценки изображений клеток с помощью оптической микроскопии и спектрозональной камеры для дифференциальной диагностики типов лимфоидных клеток. Использование компьютерной микроскопии расширяет возможности морфологического исследования неопластических клеток на мазках крови и аспиратов костного мозга.

3.4. Влияние микроокружения на кроветворение

Микроокружение опухоли в костном мозге представляет собой комплекс различных клеточных элементов, в том числе Т-клеток с различным иммунофенотипическим профилем и моноцитов. Моноцитоз в периферической крови определяется у 14 из 87 (16%) пациентов ФЛ. Усиление опухолевой нагрузки у больных ФЛ сопровождается снижением числа Т-лимфоцитов и нарастанием моноцитоза, поэтому представляет интерес исследование влияния микроокружения на кроветворение. Оно включает характеристику Т-клеток при разных типах опухолевого пула и оценку гемопоэза в зависимости от количественных показателей Т-лимфоцитов.

Снижение Т-клеток в аспирате костного мозга наблюдалось у большинства больных ФЛ: CD3⁺ отмечалось в 23 (69,7%) случаях, CD7⁺ — в 18 (54,5%), CD4⁺ — в 20 (60,9%), CD8⁺ — в 20 (60,6%).

Было проведено исследование количества Т-клеток, экспрессирующих антигены CD3, CD7, CD4 и CD8 у больных в группах А, В и С. Как видно из данных табл. 25, число Т-лимфоцитов с разным фенотипом в анализируемых группах было сходным, т.е. не зависело от морфологического состава лейкемического пула.

Таблица 25 — Показатели экспрессии Т-клеточных антигенов у больных ФЛ с различным составом лейкомиического пула

Антиген	Пределы колебаний в норме	Группа А n=5 M±m (min-max)	Группа В n=19 M±m (min-max)	Группа С n=9 M±m (min-max)	
CD3	21–51	16,1±6,4 (3,1-36,2)	19,4±3,4 (3,7-56,9)	11,03±2,3 (2-22.10)	p (A:B)=0.659 p (A:C)=0.381 p (B:C)=0.113
CD7	17–31	13,9±4,1 (2,2-21,3)	19,1±4,3 (2,3-56,8)	12.6±2 (6.1-22)	p (A:B)=0.542 p (A:C)=0.754 p (B:C)=0.281
CD4	14–30	10,4±4,1 (1,3-19)	11,8±2,9 (1,5-37,6)	5.7±0.9 (2.9-10.2)	p (A:B)=0.813 p (A:C)=0.155 p (B:C)=0.154
CD8	11–28	9,2±4,3 (1,7-21,6)	9,7±2,1 (1,6-29,4)	7.4±1.6 (0.7-13.9)	p (A:B)=0.912 p (A:C)=0.639 p (B:C)=0.468

Из литературных данных известно, что уменьшение числа Т-лимфоцитов и, в частности, CD4⁺, является неблагоприятным прогностическим фактором. В связи с этим было проведено сопоставление частоты снижения числа Т-лимфоцитов у больных исследуемых групп. (табл.26)

Таблица 26 — Число больных со снижением CD3⁺, CD7⁺, CD4⁺ и CD8⁺лимфоцитов.

Антиген	Группа А число случаев со ↓ экспрессией антигена/общее число пациентов (%)	Группа В число случаев со ↓ экспрессией антигена/общее число пациентов (%)	Группа С число случаев со ↓ экспрессией антигена/общее число пациентов (%)	
CD3 <21	3/5(60)	12/18(66,7)	8/9(89)	p (A:B)=0.782 p (A:C)=0.207 p (B:C)=0.214
CD7 <17	3/4 (75)	9/14 (64,3)	6/8(75)	p (A:B)=0.688 p (A:C)=1.000 p (B:C)=0.604
CD4 <14	2/4(50)	10/15(66,7)	8/9(89)	p (A:B)=0.539 p (A:C)=0.028 p (B:C)=0.065
CD8 <11	3/4 (75)	11/15(73,3)	6/8(75)	p (A:B)=0.946 p (A:C)=1.000 p (B:C)=0.931

Снижение Т- клеток всех типов наблюдалось у большинства больных во всех группах. У больных с центробластным составом лейкоцитарного пула (А) снижение CD4+ наблюдалось существенно реже, чем при centroцитарном (С). Однако небольшое число наблюдений делает этот вывод недостаточно убедительным.

Анемия, тромбоцитопения и моноцитоз определялись у больных ФЛ на всех стадиях процесса. Для того, чтобы выяснить вопрос о возможном влиянии клеток микроокружения на кроветворение пациентов было проведено изучение показателей периферической крови больных с нормальным и сниженным количеством Т-лимфоцитов. (табл.27)

Таблица 27 — Сравнение показателей периферической крови у больных с нормальной и сниженной экспрессией T-клеточных антигенов.

Антиген	n	уровень Hb г/л M±m (min-max)	Эритроциты ×10 ¹² /л M±m (min-max)	Тромбоциты × 10 ⁹ /л M±m (min-max)	Нейтрофилы ×10 ⁹ /л M±m (min-max)	Лимфоциты % M±m (min-max)	Лимфоциты ×10 ⁹ /л M±m (min-max)	Моноциты % M±m (min-max)	Моноциты ×10 ⁹ /л M±m (min-max)
CD3 >21%	9	119±8 (93-154)	4.3±0.2 (2,8-5,4)	224.7±51 (81-561)	3.7±0.3 (2,2-4,3)	47±8.1 (27-81)	5,6±1,7 (1,7-12)	8,3±1,9 (3-17)	0,7±0,2 (0,4-1,2)
<21%	23	129.5±5 (68-170)	4.4±0.8 (1,9-5,4)	174±14.6 (88-351)	4.9±0.4 (2,9-10,8)	55.1±6 (8-96)	18,3±6 (0,6-99)	5,3±0,8 (1-14)	0,7±0,1 (0,2-2,1)
	P	0,259	0,866	0,210	0.142	0.511	0.219	0.113	0.929
CD7 >17%	8	107,8±9 (68-154)	3,9±0,4 (1,9-5,4)	224,7±57 (81-561)	3,6±0,4 (2,2-4,3)	40,7±7 (26-74)	4,3±1,5 (1,7-10)	8,5±1,9 (3-17)	0,7±0,14 (0,4-1,2)
<17%	18	129,8±5 (83-170)	4,4±0,1 (3,3-5,4)	180,8±15 (88-351)	5,1±0,6 (2,9-10,8)	52±7,4 (8-96)	29,5±4 (0,6-99)	5,6±0,9 (1-14)	0,8±0,13 (0,2-2,1)
	P	0,027	0,161	0,332	0,145	0,380	0,262	0,143	0,814
CD4 >14%	7	112±7 (93-139)	4,1±0,2 (2,8-4,8)	161,3±32 (81-332)	3,6±0,4 (2,2-4,1)	40,4±7 (27-67)	3,3±1,3 (1,7-8,5)	8,8±2,3 (3-17)	0,59±0,1 (0,4-1,1)
<14%	20	131,10±5 (68-170)	4,4±0,2 (1,9-5,4)	205,6±25 (88-561)	4,9±0,5 (2,9-10,8)	53,9±7 (8-96)	18,4±7 (0,6-99)	5,3±0,9 (1-14)	0,8±0,1 (0,2-2,1)
	p	0,055	0,392	0,341	0,148	0,323	0,247	0,096	0,454
CD8 >11%	7	117,9±8 (93-154)	4,2±0,3 (2,8-5,4)	224±66 (81-561)	3,7±0,3 (2,2-4,3)	41,6±8 (27-74)	4,7±1,8 (1,7-10)	8,2±2,4 (3-17)	0,7±0,2 (0,4-1,2)
<11%	20	129±5,2 (68-170)	4,4±0,2 (1,9-5,4)	183±15 (88-332)	5±0,5 (2,9-10,8)	53,6±7 (8-96)	17,9±7 (0,6-99)	5,5±0,9 (1-14)	0,7±0,1 (0,2-2,1)
	p	0,272	0,523	0,377	0,148	0,383	0,311	0,201	0,944

Как видно из данных таблицы, в большинстве случаев отсутствует зависимость показателей крови от наличия или отсутствия снижения Т-лимфоцитов. Исключение составляет показатель Hb. Его значение было достоверно ниже при нормальном числе CD7+, в частности CD4+ Т-лимфоцитов по сравнению со сниженными. Отсутствовала также взаимосвязь между числом моноцитов в крови и параметрами Т-лимфоцитов. Полученные данные позволяют заключить, что уменьшение числа Т-лимфоцитов не ассоциируется с угнетением костномозгового кроветворения (анемией и тромбоцитопенией) и моноцитарной реакцией на опухоль. На основании полученных данных можно предположить, что Т-лимфоциты микроокружения при ФЛ не взаимодействуют с ранними миелоидными предшественниками костного мозга.

ГЛАВА 4 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Фолликулярная лимфома является злокачественным лимфопролиферативным заболеванием. Она характеризуется выраженной морфологической, иммунофенотипической и цитогенетической гетерогенностью. Морфологическая классификация неходжкинских лимфом впервые была предложена Раппапортом в 1966 году, а затем с внедрением иммунофенотипических методов уточнена и расширена. По мере накопления сведений менялась терминология определения варианта лимфом (табл. 28).

Таблица 28 — Изменения терминологии фолликулярной лимфомы

Раппапорт 1966	Нодулярная злокачественная лимфома
Британская 1970	Фолликулярная злокачественная лимфома
Lukes, Collins 1970	Из клеток фолликулярных центров
Кильская 1970	Центробластно-центроцитарная, фолликулярная
ВОЗ 1970	Лимфосаркома нодулярная
REAL 1994	Лимфома из клеток центра фолликула
ВОЗ 2007	Фолликулярная лимфома
ВОЗ 2017	Фолликулярная лимфома

В соответствии с последней редакцией классификации ВОЗ 2017 ФЛ подразделена на 1–2 и 3 цитологические типы, 3 тип составляют 3А и 3В подтипы.

Диагностика ФЛ базируется на данных морфологического и иммуногистохимического исследования лимфатического узла. Опухолевый субстрат состоит из В-клеток фолликулов двух типов: центробластов и центроцитов. В зависимости от их соотношения в лимфоидном пуле диагностируется три цитологических типа ФЛ, первый и второй с индолентным течением, третий с агрессивным. Кроме того, при гистологическом исследовании

учитывается характер роста опухоли — фолликулярный или диффузный. В число экстранодальных областей поражения при ФЛ входят селезенка, костный мозг, желудочно-кишечный тракт, наиболее часто 12-перстная кишка. Наши данные подтверждают литературные сведения о том, что частота поражения костного мозга достоверно чаще определяется при 1–2 цитологическом типе ФЛ (54,1%), чем при 3 (35,7%). Углубленное изучение биологических особенностей ФЛ с использованием комплекса методических подходов, включающих морфоиммунологические и молекулярно-генетические, позволяет уточнить параметры отдельных клинических вариантов и охарактеризовать новые. Так, в Классификации ВОЗ 2017г представлены новые варианты опухоли — диффузная фолликулярная лимфома, фолликулярная опухоль *in situ*, фолликулярная лимфома 12-перстной кишки и фолликулярная лимфома яичек. Морфологическая характеристика клеточного субстрата может существенно различаться в нодальной и экстранодальной локализациях опухоли. В таких случаях констатируют клеточный дискорданс.

Клетки ФЛ обычно экспрессируют В-клеточные антигены (CD19, CD20, CD22 и CD79a) и BCL2, BCL6, CD10 позитивны. Однако иммунофенотипический профиль опухолевых клеток варьирует в зависимости от их морфологической характеристики [125-130], а также локализации лимфомы [131]. На основании результатов наших исследований можно констатировать, что морфологические особенности ассоциируются с различиями в иммунологическом профиле опухолевых клеток. При центробластном преобладании в опухолевом пуле экспрессия антигена CD38 достоверно выше, чем при центроцитарном. Иммунофенотипическая характеристика первичной опухолевой ткани у больных ФЛ была одинаковой при наличии и отсутствии поражения костного мозга. Однако показано, что при лейкемической инфильтрации число CD21 и CD23 позитивных случаев в аспиратах было достоверно меньше, чем в трепанобиоптатах. [132]. Разнообразие антигенных признаков опухолевых клеток коррелирует с вариабельностью молекулярно-генетических нарушений. Специфический цитогенетический маркер t(14;18)(q32;q21) определяется не у

всех пациентов, в 90% случаев с индолентной ФЛ и реже при агрессивном варианте [129]. Частота нарушений различных генов также варьирует значительно и колеблется от единичных случаев до 85%.

Гетерогенность морфофункциональных особенностей опухолевых клеток при ФЛ влечет за собой значительное разнообразие клинических проявлений, трудности в разработке эффективных подходов к терапии больных ФЛ низкой и высокой степени злокачественности. Комплекс факторов прогноза постоянно уточняется и расширяется. Изучение кроветворения пациентов с ФЛ выявило важную роль гематологических показателей: анемии и опухолевой инфильтрации костного мозга для прогноза заболевания. Был разработан новый прогностический индекс FLIPI-2, учитывающий уровень Hb и поражение костного мозга для определения групп риска пациентов.

В связи с этим в настоящее время возрос интерес к характеристике кроветворения больных ФЛ на разных стадиях заболевания и с различным составом лейкоцитарного пула. Изучение взаимосвязей между опухолевыми клетками, элементами микроокружения и показателями остаточного нормального гемопоэза может дать ответы на ряд клинических и общебиологических вопросов, а также способствовать решению прогностических задач.

Было проведено изучение кроветворения 152 пациентов на различных стадиях заболевания. Данные анализа позволили установить, что снижение показателей крови наблюдалось как в дебюте заболевания (I и II стадия) так и на развернутом (III и IV) стадии.

Анемия определялась в 47 (30,9%) случаях, тромбоцитопения — в 27 (17,8%). Нейтропения наблюдалась редко на разных стадиях, всего в 5 (3,3%) случаях. Частота снижения Hb была достоверно выше у пациентов с III и IV стадиями по сравнению с I и II. Сочетание анемии и тромбоцитопении обнаруживалось только у больных с продвинутыми стадиями.

Исследование гемопоэза при ФЛ включало сравнительный анализ данных периферической крови и костного мозга пациентов в зависимости от наличия или отсутствия опухоли: 93 пациента без поражения костного мозга (I группа), 26

пациентов с поражением костного мозга, констатированным только по трепанобиоптату (II группа), 33 пациента с поражением костного мозга по данным трепанобиоптата и аспирата (III группа). Полученные результаты показали, что случаи нормохромной анемии и тромбоцитопении выявляются во всех трех группах. Степень и частота снижения Hb и тромбоцитов была достоверно выше у пациентов с поражением костного мозга, выявленном в трепанобиоптате и в аспирате. Сочетанная анемия и тромбоцитопения определялись у 13 (8,5%) пациентов, из них в I группе у 4, во II – у 2 и в III — у 7, что было достоверно чаще ($p=0,011$). Абсолютное количество нейтрофилов в периферической крови у большинства пациентов (96,7%) было в пределах нормы.

Моноцитоз в крови более $0,8 \times 10^9$ /л определялся у 9,1% пациентов I группы, у 13,3% пациентов II группы и достоверно чаще ($p = 0,043$) у 25,9% больных ФЛ с опухолевым поражением в аспирате и трепанобиоптате (III группа). В этой же группе у трети (36,4%) пациентов был констатирован лимфоцитоз в периферической крови.

Неблагоприятное снижение прогностического индекса Л/М (отношения абсолютного числа лимфоцитов к абсолютному числу моноцитов) менее 4,7 наблюдалось у большинства (65,4%) больных ФЛ, достоверно чаще снижение индекса отмечалось в III группе пациентов с поражением костного мозга в аспирате и трепанобиоптате ($p < 0,034$).

Таким образом, результаты анализа показателей периферической крови больных ФЛ позволяют заключить, что анемия и тромбоцитопения выявляются на всех, в том числе и на ранних стадиях заболевания. Глубина и частота снижения показателей нарастает со стадией заболевания, что объясняется увеличением опухолевой нагрузки и взаимосвязано с опухолевой инфильтрацией костного мозга. Снижение числа нейтрофилов обнаруживается редко и не ассоциируется со стадией заболевания и поражением костного мозга. Число случаев с моноцитозом и со снижением индекса Л/М достоверно более выражено в случаях поражения костного мозга в аспирате. Лимфоцитоз в периферической крови наблюдается только у больных с поражением костного мозга по аспирату и трепанобиоптату.

Сравнение показателей гемограмм 93 пациентов без поражения костного мозга и 26 с поражением только в трепанобиоптате выявило большую частоту случаев с анемией у последних. Большинство показателей миелограммы: клеточность, число клеток гранулоцитарного, красного, лимфоидного рядов и индекс созревания гранулоцитов были нормальными. У большинства пациентов (86% и 77% соответственно) наблюдалось увеличение индекса созревания нормобластов. Повышение числа оксифильных нормобластов ассоциировалось с наличием нормохромной анемии в крови у этих больных. Таким образом, проведенный анализ не выявил каких-либо различий в составе аспирата костного мозга у пациентов с наличием или отсутствием опухолевой инфильтрации в трепанобиоптате. При гистологическом исследовании было установлено, что наряду с лимфоидной инфильтрацией в трепанобиоптате определяются выраженные признаки склеротических изменений, а также специфичный профиль экспрессии молекул адгезии [51]. Эти обстоятельства, вероятно, являются причиной более редкого выявления поражения костного мозга в аспирате по сравнению с трепанобиопсией и соответственно недостаточной информативности аспириатов. В наших исследованиях лимфоидная инфильтрация костного мозга в трепанобиоптатах была выявлена в 38,8% случаев, а в аспириатах только в 21,7% случаев. Это позволяет заключить, что для получения точной информации о стадии ФЛ у пациента, несмотря на нормальные показатели гемограммы и миелограммы, трепанобиопсия является необходимым методом обследования пациентов.

У больных с лейкемической инфильтрацией костного мозга в аспириате (33 случая) была установлена более высокая клеточность, чем у предыдущих пациентов. Значительные отличия определялись в составе миелограммы. Повышение количества миелокариоцитов было обусловлено расширением лимфоидного ростка в миелограмме за счет пролиферации неопластических лимфоидных форм: центроцитов и центробластов.

Содержание гранулоцитов и нормобластов в миелограмме в этой группе было достоверно ниже, чем в двух других. Однако снижение доли гранулоцитов и

нормобластов в аспиратах было относительным, так как клеточность аспиратов была увеличена. Индекс созревания нормобластов у больных ФЛ и число моноцитов были также повышены.

Подводя итоги анализа данных периферической крови и аспиратов костного мозга можно заключить, что угнетение миелоидного ростка гемопоэза (анемия и тромбоцитопения) у больных ФЛ могут быть обнаружены уже на ранних этапах болезни при отсутствии лейкоемической инфильтрации костного мозга. Степень снижения показателей и частота анемии и тромбоцитопении увеличиваются по мере прогрессирования неопластического процесса и коррелируют с объемом опухолевой ткани. Нарушения гемопоэза достоверно чаще обнаруживаются у больных с поражением костного мозга по сравнению с остальными. Сочетанная цитопения двух ростков миелопоэза (красного и тромбоцитарного) позволяет предположить, что угнетение гемопоэза является следствием функциональных изменений ранних костномозговых миелоидных предшественников под влиянием лимфоидной опухоли. Увеличение опухолевой нагрузки влечет за собой более значительное подавление кроветворения. Нейтрофильный росток миелопоэза, как правило, остается интактным при ФЛ.

Для решения вопроса о связи типа лимфоидной опухоли, характеристики клеток микроокружения с изменениями показателей кроветворной системы были проанализированы данные морфоиммунологического исследования лейкоемических элементов. Лейкемическая инфильтрация костного мозга по данным аспирата была установлена в 33 наблюдениях. Лимфоидный клон костного мозга характеризовался гетерогенностью, в него входили центробласты, центроциты и клетки с морфологической характеристикой лимфоцитов. Соотношение морфологических типов клеток было неодинаковым у разных больных. Выделялись три цитологических варианта лейкоемического пула. Один из них (5 случаев) с числом центробластов более 30%, другой вариант с числом центробластов от 1 до 29% (19), третий — центроцитарный включал 9 наблюдений.

Число CD23, HLA-DR и CD10 антиген позитивных случаев было сходным во всех группах. Однако экспрессия антигена CD38 при центробластном типе пула обнаруживалась чаще по сравнению с остальными ($p = 0,036$).

Таким образом, можно заключить, что центробласты и центроциты имеют сходный В-клеточный иммунофенотипический профиль, за исключением увеличения экспрессии антигена CD38. Наши данные подтверждают точку зрения Л.В. Пластининой об иммунологической гетерогенности ФЛ третьего цитологического типа [133].

Результаты анализа гемограмм и миелограмм показали, что уровень Hb, количество эритроцитов и тромбоцитов, частота цитопении, а также показатели костного мозга не различаются у больных с центробластным или центроцитарным составом лейкоемического пула. Существенное различие было обнаружено в количестве случаев лейкоемизации. При центробластно-центроцитарном и центроцитарном составе пула лимфоцитоз в крови определялся в половине наблюдений (42,8%), при центробластном ни в одном из пяти случаев. Результаты анализа позволяют заключить, что угнетение гемопоэза не взаимосвязаны с типом опухолевых клеток. Они могут быть в равной степени констатированы при всех типах лимфоидной опухоли. В тоже время по своим функциональным особенностям опухолевые клетки неоднородны, лейкоемизация чаще определялась при центроцитарном типе опухоли.

Трудности морфологической идентификации клеток при ФЛ вызывает необходимость расширения методических подходов к характеристике опухолевого клона. С этой целью было проведено исследование с помощью компьютерной микроскопии со спектрозональной камерой морфологических особенностей пространственно-яркостной структуры хроматина ядер нормальных лимфоцитов крови (14 доноров) и лейкоемических лимфоидных элементов костного мозга (13 больных ФЛ). Число измеренных клеток у доноров колебалось от 22 до 140, у больных от 39 до 376. Были рассчитаны для каждого случая средние показатели специальных индексов P_{max} (30,1) и P_{disp} (14,1). Установлено, что на основании расчета индекса P_{max} можно охарактеризовать

различия в структуре хроматина ядер нормальных и лейкоэмических лимфоцитов. Полученные данные позволили объективизировать результаты обычного морфологического анализа. Они свидетельствуют о применимости метода оценки изображений клеток с помощью оптической микроскопии и спектральной камеры для дифференциальной диагностики типов лимфоидных клеток. Этот метод морфологического исследования может быть реализован в дальнейшем при исследовании различных лимфопролиферативных заболеваний.

В костном мозге наряду с лимфоидными опухолевыми клетками, определяются элементы нормального остаточного гемопоэза и клетки микроокружения. В число последних входят Т-клетки и моноциты [119,120]. Известно, что клетки микроокружения реагируют на инфильтрацию костного мозга, наблюдается увеличение числа моноцитов и снижение Т-клеток [114,121,122]. В наших исследованиях моноцитоз в периферической крови определялся у 14 из 87 (16%) пациентов ФЛ. Частота моноцитоза была одинаковой у больных с разным составом лейкоэмического пула. Сравнение показателей экспрессии антигенов CD3, CD7, CD4 и CD8 Т-лимфоцитов также было сходным, т.е. не зависело от морфологического состава лейкоэмического пула.

Для того, чтобы выяснить вопрос о возможном влиянии клеток микроокружения на кроветворение пациентов было проведено изучение показателей периферической крови больных с нормальным и сниженным количеством Т-лимфоцитов. Зависимость показателей крови от наличия или отсутствия снижения Т-лимфоцитов в большинстве случаев отсутствует. Исключение составляет показатель Hb. Его значение было достоверно выше при уменьшении числа CD7+ и, в частности CD4+, Т-лимфоцитов. Отсутствовала взаимосвязь между числом моноцитов в крови и параметрами Т-лимфоцитов. Полученные данные позволяют заключить, что уменьшение числа Т-лимфоцитов не ассоциируется с угнетением костномозгового кроветворения (анемией и тромбоцитопенией) и моноцитарной реакцией на опухоль. На основании полученных данных можно предположить, что Т-лимфоциты микроокружения

при ФЛ не взаимодействуют с ранними миелоидными предшественниками костного мозга.

Проведенное исследование дает возможность установить, что цитопения (анемия и тромбоцитопения) периферической крови является следствием воздействия опухолевого субстрата на гемопоэз больных ФЛ. Сочетанное угнетение одновременно двух ростков гемопоэза дает основание предположить возможность механизма подавления опухолью общего раннего предшественника красного и тромбоцитарного ростка, при том, что гранулоцитарный ряд остается интактным. Интересно отметить ассоциацию между цитопенией крови, наличием опухолевой инфильтрации костного мозга и реактивным моноцитозом, что свидетельствует о наличии закономерных взаимоотношений между неоплазией и нормальным гемопоэзом. С другой стороны отсутствует взаимосвязь кроветворения с типами опухолевых клеток и Т-клетками микроокружения.

Одним из важнейших вопросов исследования ФЛ является проблема дифференциальной диагностики этой лимфомы с остальными лимфопролиферативными заболеваниями. Для решения этой задачи используется сложный комплекс исследований, включающий гистологические исследования с иммуногистохимией, а также молекулярно-генетические данные. Исследование особенностей лимфоидного пула в аспирате костного мозга является составной частью диагностического процесса и позволяет определить стадийность заболевания, цитологическую степень опухоли в костном мозге, использовать современные прогностические подходы (FLIPI-2) и применить данные иммунологического профиля ФЛ при мониторинге пациентов для определения минимальной остаточной болезни.

Дифференциальный диагноз ФЛ является существенным моментом в клинической практике, так как он определяет всю последующую терапевтическую стратегию. Морфо-иммунологическое разнообразие ФЛ вызывает необходимость дифференцировать ее с различными ЛПЗ как с индолентным, так и агрессивным течением. ФЛ 1 и 2 цитологической степени представлена зрелыми лимфоидными клетками небольшого размера. Сравнение

гематологической картины ФЛ и ХЛЛ показывает, что гемограммы и миелограммы пациентов не позволяют различить эти заболевания. Высокий лейкоцитоз, характерный для ХЛЛ, также наблюдался и в наших исследованиях ФЛ у 15 (10%) пациентов. Для ФЛ характерно наличие в лимфоидных клетках “трещины” или складки. Однако подобные клетки могут быть обнаружены при ХЛЛ, а также при мантийноклеточной лимфоме. Поэтому морфологическая характеристика опухолевого пула в костном мозге не всегда может быть диагностически достоверной и требует в обязательном порядке проведения цитометрического исследования иммунофенотипа.

В тех случаях, когда элементы опухолевого пула в костном мозге имеют характеристику крупных молодых клеток с нежным хроматином и 1–2 нуклеолами в ядре возникает необходимость трактовать эти клетки как бластоидные и проводить дифференциальный диагноз с агрессивными лимфомами и с острыми лейкозами. Морфологические исследования дополняются цитохимическими: реакциями на пероксидазу, липиды, неспецифическую эстеразу с ингибированием для того, чтобы исключить миелоидную природу клеток. В наших исследованиях подобные наблюдения составили 3 случая. Параллельно проводится определение иммунофенотипа лимфоидных клеток. При установлении характеристики иммунологического профиля, характерного для ФЛ, делается заключение о центробластном составе опухоли и о бластоидной форме ФЛ.

Таким образом, морфо-иммунологический алгоритм диагностики ФЛ по аспирату состоит из ряда этапов.

1. Оценка количественного состава гемограммы и миелограммы и определение необходимости исследования иммунофенотипа лимфоидного пула.

2. В случаях обнаружения лимфоидной инфильтрации костного мозга проводится комплексное изучение опухолевого компонента: морфологическое, цитохимическое, иммунофенотипическое и молекулярно-генетическое.

3. Морфологическая характеристика лимфоидных элементов при поражении костного мозга базируется на определении типа клеток: центроцитов,

центробластов и определении цитологической степени опухоли: центроцитарной, смешанной и центробластной. В зависимости от этого планируется проведение цитохимического исследования и алгоритма определения иммунофенотипического профиля клеток.

4. Обычно цитофлуориметрия проводится при лимфоцитозе в крови более $10 \times 10^9/\text{л}$ и увеличении числа клеток лимфоидного ряда более 20% в костном мозге. При этом следует учитывать, что в настоящее время, как мы говорили ранее, норма числа лимфоцитов в костном мозге в различных исследованиях различается. Вполне вероятно, что расширение спектра обследования пациентов за счет иммунофенотипирования аспиратов при числе лимфоцитов от 10 – 20% и периферической крови при лейкоцитозе $5-10 \times 10^9/\text{л}$ даст возможность выявить лимфоидную инфильтрацию и при небольшом числе лимфоидных клеток.

5. Полученные результаты позволят установить стадию и цитологический вариант ФЛ, определить прогноз заболевания.

Подводя итог полученным результатам, следует заключить, что диагностика ФЛ требует проведения современного комплексного исследование лимфоидного субстрата, как в начале заболевания, так и в процессе наблюдения за пациентом.

ВЫВОДЫ

1. Анемия при ФЛ (30,9% пациентов) наблюдается при всех стадиях заболевания. Частота анемии закономерно повышается с увеличением опухолевой нагрузки, достоверно ассоциируется ($p = 0,032$) с лимфомным поражением костного мозга.
2. Тромбоцитопения (17,8% пациентов) выявляется при продвинутых (III и IV) стадиях, ее частота достоверно ($p = 0,000$) увеличивается при лимфомном поражении костного мозга.
3. Показатели нейтрофилов периферической крови у большинства пациентов (93%) колеблются в пределах нормы.
4. Моноцитоз в периферической крови (16% случаев) обнаруживается при всех стадиях ФЛ, при поражении костного мозга достоверно чаще ($p = 0,043$). Снижение индекса соотношения лимфоциты/моноциты ниже 4,7 констатировано у большинства (66%) больных ФЛ.
5. Лейкемические лимфоидные клетки в периферической крови наблюдаются при поражении костного мозга (9,3% пациентов).
6. На основании состава лимфоцитограмм лейкемического клона костного мозга больные ФЛ делятся на 3 группы: центробластную (15 %), смешанную (58 %) и центроцитарную (27 %).
7. Иммунологический профиль центробластов отличается от центроцитов достоверно более частой ($p = 0,036$) экспрессией антигена CD38. Частота экспрессии CD19, CD20, CD10 и HLA-DR антигенов в разных группах не различалась.
8. Показатели периферической крови: Hb, эритроциты, тромбоциты, нейтрофилы и моноциты, а также данные миелограмм не были взаимосвязаны с типом опухолевых элементов, с числом клеток микроокружения. Лимфоцитоз крови ассоциировался с центроцитарным характером опухоли.
9. Применение методов математического анализа структуры хроматина ядер лимфоидных клеток при ФЛ с помощью компьютерной микроскопии

объективизирует результаты морфологического исследования и расширяет современные диагностические возможности.

10. Сопоставление результатов исследования аспиратов костного мозга, трепанобиоптатов и пунктатов лимфоузла позволяет выявить различия в составе опухоли в разных областях поражения.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

На основании проведенного исследования выработаны следующие практические рекомендации:

1. Результаты анализа периферической крови: уровень Hb, число моноцитов и тромбоцитов, индекс соотношения лимфоцитов/моноцитов необходимо использовать для уточнения степени опухолевой нагрузки у больного ФЛ.
2. Обследование больных ФЛ в обязательном порядке должно включать аспират и трепанобиопсию костного мозга. При лимфомном поражении костного мозга в аспирате наряду с морфологическим необходимо проведение иммунофенотипического исследования лимфоидных клеток.
3. Анализ особенностей лейкомиического пула в костном мозге должен включать количественную оценку соотношения цитологических типов лимфоидных клеток: центробластов и центроцитов.
4. При исследовании иммунофенотипического профиля опухолевых клеток костного мозга наряду со специфическими В-антигенами требуется определение прогностически значимого антигена CD38
5. При диагностике ФЛ необходимо использовать комплекс морфоиммунологических данных пунктатов и трепанобиоптатов костного мозга и пунктатов лимфоузла.
6. Требуется внедрение высокотехнологичных методов компьютерной микроскопии изучения структуры хроматина ядер лимфоидных клеток для объективизации диагностики и дифференциальной диагностики ФЛ.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- ВБП — выживаемость без прогрессирования
- ВКЛ — волосатоклеточный лейкоз
- ВОЗ — Всемирная Организация Здравоохранения
- ДВККЛ — Диффузная В-крупноклеточная лимфома
- ДВККЛ GCB — germinal centre B-cell-like
- ИЛ-1 — интерлейкин 1
- Индекс Л/М — индекс лимфоциты/моноциты
- ЛБ — лимфома Беркитта
- ЛДГ — лактатдегидрогеназа
- ЛЗМ — лимфома зоны мантии
- ЛПЗ — лимфопролиферативное заболевание
- МКА — моноклональные антитела
- МПИ (IPi) — международный прогностический индекс
- НХЛ — неходжкинские лимфомы
- ОВ — общая выживаемость
- ОЛЛ — острый лимфобластный лейкоз
- T_{FH} — фолликулярные Т-хелперы
- ФДК — фолликулярные дендритические клетки
- ФЛ — фолликулярная лимфома
- ФЦ — фолликулярный центр
- ХЛЛ — хронический лимфоцитарный лейкоз
- АВС-ДВККЛ — activated B-cell-like
- ALC — absolute lymphocyte count
- AMC — absolute monocyte count
- BCL2 — B-cell lymphoma 2, регулятор апоптоза, внутриклеточный белковый фактор
- BCL6 — B-cell lymphoma 6, фактор транскрипции, протоонкоген.

BCR — B-cell antigen receptor

Blimp 1 — B-lymphocyte maturation-induced protein 1. Является репрессором транскрипции.

ECOG — шкала ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group — Многоцентровой онкологической исследовательской группы Востока США) для оценки общего состояния больных при тяжелых хронических заболеваниях, в том числе онкологических

FLIPI (ФЛИПИ) и FLIPI2 — Международные прогностические индексы фолликулярной лимфомы (Follicular Lymphoma International Prognostic Index)

Hb — гемоглобин

Ig — иммуноглобулин

IL-7 — интерлейкин-7

MALT — mucosa-associated lymphoid tissue, мукозоассоциированная лимфоидная ткань

MCV — средний объем эритроцита

RAG1/2 — recombination-activating genes 1/2

TdT — терминальная дезоксирибонуклеотидилтрансфераза

TNF- α — tumor necrosis factor, фактор некроза опухоли-альфа, внеклеточный белок, многофункциональный провоспалительный цитокин, синтезирующийся в основном моноцитами и макрофагами.

Treg — regulatory T cells, регуляторные T-клетки

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Воробьев, А.И. Руководство по гематологии / А.И. Воробьев Ю.И. Лорие. – М.: Медицина, 1979. – С. 270.
2. Кассирский, И.А. Клиническая гематология / И.А. Кассирский, Г.А. Алексеев. – 4-е изд. испр. и доп. – М.: Медицина, 1970. – С. 589.
3. Warnke, R. Immunopathology of follicular lymphomas. A model of B-lymphocyte homing / R. Warnke, R. Levy // N. Engl. J. Med. – 1978. – Vol. 298. – P. 481.
4. WHO Classification of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues Revised // International Agency for Research on Cancer. – 4th edition. – Lyon. – 2017.
5. Поддубная, И.В. Российские клинические рекомендации по диагностике и лечению лимфопролиферативных заболеваний / И.В. Поддубная, В.Г. Савченко. – М., 2016. – С.34.
6. Anderson, J.R. Epidemiology of the non-hodgkin's lymphomas: distributions of the major subtypes differ by geographic locations. Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project / J.R. Anderson, J.O. Armitage, D.D. Weisenburger // Ann. Oncol. – 1998. – Vol. 9. – P. 717-720.
7. Freedman, A. Follicular lymphoma: 2015 update on diagnosis and management / A. Freedman // Am. J. Hematol. – 2015. – Vol. 90(12). – P. 1171-1178. doi: 10.1002/ajh.24200.
8. Duarte, I.X. Follicular lymphoma in young adults: a clinicopathological and molecular study of 200 patients / I. X. Duarte, P. Domeney-Duarte, S. C.L. Wludarski et al. // Mod. Pathol. – 2013. – Vol. 26, N 9. – P. 1183-1196. doi: 10.1038/modpathol.2013.50.
9. Casulo, C. Disease characteristics, treatment patterns and outcomes of follicular lymphoma in patients 40 years of age and younger: an analysis from the national Lymphocare Studyt / C. Casulo, B. Day, K.L. Dawson et al. // Ann. Oncol. – 2015. – Vol. 26(11). – P. 2311-2317. doi: 10.1093/annonc/mdv375.

10. Ribeiro, R.C. Childhood malignant non-Hodgkin lymphomas of uncommon histology / R.C. Ribeiro, C.H. Pui, S.B. Murphy et al. // *Leukemia*. – 1992. – Vol. 6. – P. 761-765.
11. Liu, Q. Follicular Lymphomas in children and young adults: A comparison of the pediatric variant with usual follicular lymphoma / Q. Liu, I. Salaverria, S. Pittaluga et al. // *Am. J. Surg. Pathol.* – 2013. – Vol. 37(3). – P. 333-343.
12. Lorsbach, R.B. Clinicopathologic analysis of follicular lymphoma occurring in children / R.B. Lorsbach, D. Shay-Seymore, J. Moore et al. // *Blood*. – 2002. – Vol. 99. – P. 1959-1964.
13. Bakhshi, A. Cloning the chromosomal breakpoint of t(14;18) human lymphomas: clustering around JH on chromosome 14 and near a transcriptional unit on 18 / A. Bakhshi, J.P. Jensen, P. Goldman et al. // *Cell*. – 1985. – Vol. 41(3). – P. 899-906.
14. Cleary, M.L. Nucleotide sequence of a t(14;18) chromosomal breakpoint in follicular lymphoma and demonstration of a breakpoint-cluster region near a transcriptionally active locus on chromosome 18 / M.L. Cleary, J. Sklar // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. – 1985. – Vol. 82(21). – P. 7439-7443.
15. Cleary, M.L. Cloning and structural analysis of cDNAs for bcl-2 and a hybrid bcl-2/immunoglobulin transcript resulting from the t(14;18) translocation / M.L. Cleary, S.D. Smith, J. Sklar // *Cell*. 1986. – Vol. 47(1). – P.19-28.
16. Galili, N. Human follicular lymphomas: identification of a second t(14;18) breakpoint cluster region / N. Galili, M.L. Cleary, J. Sklar // *Haematol. Blood Transfus.* – 1987. – Vol. 31. – P. 167-171.
17. Troussard, X. Genetic analysis of splenic lymphoma with villous lymphocytes: a Groupe Français d'Hématologie Cellulaire (GFHC) study / X. Troussard, L. Mauvieux, I. Radford-Weiss et al. // *Br. J. Haematol.* – 1998. – Vol. 101(4). – P. 712-721.
18. Jegalian, A.G. Follicular lymphoma in situ: clinical implications and comparisons with partial involvement by follicular lymphoma / A.G. Jegalian, F.C.

Eberle, S.D. Pack et al. // *Blood*. – 2011. – Vol. 118(11). – P. 2976-2984. doi: 10.1182/blood-2011-05-355255.

19. Limpens, J. Bcl-2/JH rearrangements in benign lymphoid tissues with follicular hyperplasia / J. Limpens, D. de Jong, J.H. van Krieken, et al. // *Oncogene*. – 1991. – Vol. 6(12). – P. 2271-2276.

20. Liu, Y. BCL2 translocation frequency rises with age in humans / Y. Liu, A.M. Hernandez, D. Shibata et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1994. – Vol. 91(19). – P. 8910-8914.

21. Limpens, J. Lymphoma-associated translocation t(14;18) in blood B cells of normal individuals / J. Limpens, R. Stad, C. Vos et al. // *Blood*. – 1995. – Vol. 85(9). – P. 2528-2536.

22. Ji, W. Frequent detection of bcl-2/JH translocations in human blood and organ samples by a quantitative polymerase chain reaction assay / W. Ji, G.Z. Qu, P. Ye et al. // *Cancer Res*. – 1995. – Vol. 55(13). – P. 2876-2882.

23. Summers, K.E. Frequency of the Bcl-2/IgH rearrangement in normal individuals: implications for the monitoring of disease in patients with follicular lymphoma / K.E. Summers, L.K. Goff, A.G. Wilson et al. // *J. Clin. Oncol*. – 2001. – Vol. 19(2). – P. 420-424.

24. Ladetto, M. PCR-detectable nonneoplastic Bcl-2/IgH rearrangements are common in normal subjects and cancer patients at diagnosis but rare in subjects treated with chemotherapy / M. Ladetto, D. Drandi, M. Compagno et al. // *J. Clin. Oncol*. – 2003. – Vol. 21(7). – P. 1398-1403.

25. Schmitt, C. The bcl-2/IgH rearrangement in a population of 204 healthy individuals: occurrence, age and gender distribution, breakpoints, and detection method validity / C. Schmitt, B. Balogh, A. Grundt, et al. // *Leuk. Res*. – 2006. – Vol. 30(6). – P. 745-750.

26. Dolken, G. Age-dependent prevalence and frequency of circulating t(14;18)-positive cells in the peripheral blood of healthy individuals / G. Dolken, L. Dolken, C. Hirt et al. // *J. Natl. Cancer Inst. Monogr*. – 2008. – Vol. 39. – P. 44-47.

27. Igarashi, H. Transcription from the RAG1 Locus Marks the Earliest Lymphocyte Progenitors in Bone Marrow / H. Igarashi, S.C. Gregory, T. Yokota et al. // *Immunity*. – 2002. – Vol.17 (2). – P. 117-130.
28. Allman, D. Commitment to the B lymphoid lineage occurs before DH-JH recombination / D. Allman, J. Li, R.R. Hardy // *J. Exp. Med.* – 1999. – Vol. 189(4). – P. 735-740.
29. Ogawa, M. Identification of CD19(-)B220(+)c-Kit(+)Flt3/Flk-2(+) cells as early B lymphoid precursors before pre-B-I cells in juvenile mouse bone marrow / M. Ogawa, E. ten Boekel, F.Melchers // *Int. Immunol.* – 2000. – Vol.12(3). – P. 313-324.
30. Ochiai, K. A self-reinforcing regulatory network triggered by limiting IL-7 activates pre-BCR signaling and differentiation / K. Ochiai, M. Maienschein-Cline, M. Mandal et al. // *Nat. Immunol.* 2012. – Vol. 13(3). – P. 300-307. doi: 10.1038/ni.2210.
31. Hardy, R.R. B cell development pathways / R.R. Hardy, K. Hayakawa // *Annu. Rev. Immunol.* – 2001. – Vol. 19. – P. 595-621.
32. Adam, P. Presence of preserved reactive germinal centers in follicular lymphoma is strong histopathologic indicator of limited disease stage / P. Adam, T. Katzenberg, M. Eifert et al. // *Am. J. Surg. Pathol.* – 2005. – Vol. 29(12). – P. 1661-1664.
33. Adelaide, J. A t(8;9) translocation with PCM1-JAK2 fusion in a patient with T-cell lymphoma / J. Adelaide, C. Perot, V. Gelsi-Boyer, et al. // *Leukemia*. – 2006. – Vol. 20(3). – P. 536-537.
34. Liu, Y.-J. Sites of specific B cell activation in primary and secondary responses to T cell-dependent and T cell-independent antigens / Y.-J. Liu, J. Zhang, P.J.L. Lane, et al. // *Eur. J. Immunol.* 1991. – Vol. 21(12). – P. 2951-2962.
35. Kuppers, R. Tracing B cell development in human germinal centres by molecular analysis of single cells picked from histological sections / R. Kuppers, M. Zhao, M.L. Hansmann et al. // *EMBO J.* – 1993. – Vol. 12(13). – P. 4955-4967.
36. Batista, F.D. The who, how and where of antigen presentation to B cells / F.D. Batista, N.E. Harwood // *Nat. Rev. Immunol.* – 2009. – Vol. 9. – P. 15-27.

37. Qi, H. SAP-controlled T-B cell interactions underlie germinal centre formation / H. Qi, J.L. Cannons, F. Klauschen et al. // *Nature*. – 2008. – Vol. 455. – P. 764-769.
38. Пробатова, Н.А. Морфология неходжкинских лимфом и лимфомы Ходжкина / Н.А. Пробатова, А.М. Ковригина // *Клиническая онкогематология: Руководство для врачей / Под ред. проф. М.А. Волковой*. – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: ОАО Изд-во: Медицина. – 2007. – 1120 с.
39. Тупицын, Н.Н. Низкоаффинный Fcε рецептор II(CD23) в норме и при гемобластозах человека / Н.Н. Тупицын, Р.М. Рамазанова, Е.Н. Шолохова и др. – Алматы. – 2003. – С. 37.
40. Nera, K.-P. Regulation of B Cell to Plasma Cell Transition within the Follicular B Cell Response / K.-P. Nera, M.K. Kylaniemi, O. Lassila // *Scand. J. Immunol.* – 2015. – Vol. 82(3). – P. 225-234. doi: 10.1111/sji.12336.
41. Shankland, K.R. Non-Hodgkin lymphoma / K.R. Shankland, J.O. Armitage, B.W. Hancock // *Lancet*. – 2012. – Vol. 380, N 9844. – P. 848-857. doi: 10.1016/S0140-6736(12)60605-9.
42. Hiddemann, W. How we manage follicular lymphoma / W. Hiddemann, B.D. Cheson // *Leukemia*. – 2014. – Vol. 28. – P. 1388-1395.
43. Prasad, G.L. Primary orbital follicular Lymphoma: a case report and review / G.L. Prasad, A. Hegde, G. Menon, et al. // *J. Clin. Diagn. Res.* – 2017. – Vol. 11(3). – P. 01-03.
44. Maeshima, A.M. Comparison of clinicopathologic characteristics of gastric follicular lymphomas and duodenal follicular lymphomas / A.M. Maeshima, H. Taniguchi, T. Suzuki et al. // *Hum. Pathol.* – 2017. – Vol. 65. – P. 201-208.
45. Pyeon, S.I. Primary follicular lymphoma in the rectum incidentally found on screening colonoscopy / S.I. Pyeon, G.A. Song, D.H. Baek et al. // *Korean J. Gastroenterol.* – 2017. – Vol. 69 (2). – P. 139-142.
46. Kitabatake, H. Development of diffuse large B-cell lymphoma from follicular lymphoma of the duodenum: changes in endoscopic findings during a 6-year

follow-up / H. Kitabatake, T. Nagaya, N. Tanaka et al. // Clin. J. Gastroenterol. – 2017. – Vol. 10(1). – P. 79-85. doi: 10.1007/s12328-016-0697-9.

47. Chouhan, J. Gastrointestinal follicular lymphoma: using primary site as a predictor of survival / J. Chouhan, S. Batra, R. Gupta et al. // Cancer Med. – 2016. – Vol. 5(10). – P. 2669-2677. doi: 10.1002/cam4.763.

48. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and lymphoid tissues. – 2008.

49. Руководство по гематологии: в 3-х томах / под ред. акад. А.И. Воробьева. – 3-е изд., перераб. и доп. – М.: Ньюдиамед, 2003. – Т. 2. – С. 40.

50. Wamke, R. Atlas of tumor pathology. Tumours of the Lymph nodes and Spleen / R. Wamke, L. Weiss, Y. Chan et al. – Washington: D.C. AFIP, 1994. – 544 p.

51. Френкель, М.А. Диагностическое значение исследования отпечатков трепанобиоптатов костного мозга при периферических неходжкинских лимфомах / М.А. Френкель, Е.В.Чигринова, Н.А. Купрышина и др. // Клин. лабораторная диагностика. – 2007. – № 11. – С. 44-48.

52. Фалалеева, Н.А. Фолликулярная лимфома: клиническое и иммунопатогенетическое обоснование рациональной терапии: дис. ... д-ра мед. наук: 14.01.21 / Фалалеева Наталья Александровна. – М., 2017. – 256 с.

53. Gomyo, H. Morphologic, flow cytometric and cytogenetic evaluation of bone marrow involvement in B-cell lymphoma / H. Gomyo, M. Shimoyama, K. Minagawa et al. // Haematologica. – 2003. – Vol. 88(12). – P. 1358-1365.

54. Френкель, М.А. Исследование костного мозга в онкологии / М.А. Френкель // Иммунология гемопоза. – 2014. – №1-2. – С.18-42.

55. Rutherford, S.C. Bone marrow biopsies do not impact response assessment for follicular lymphoma patients treated on clinical trials / S.C. Rutherford, V. Li, P. Ghione et al. // Br. J. Haematol. – 2017. – Vol. 179(2). – P. 242-245. doi: 10.1111/bjh.14839.

56. Шибинская, А.В. Иммунологическая характеристика морфологических вариантов В-клеточного хронического лимфолейкоза: автореф.

дис. ... канд. мед. наук: 14.01.12 / Шибинская Анна Владимировна. – М., 2010. – 27с.

57. Park, J. Follicular lymphoma in leukemic phase with unusual morphology at diagnosis / J. Park // *Blood Res.* – 2015. – Vol. 50(4). – P. 193.

58. Federico, M. Rituximab and the risk of transformation of follicular lymphoma: a retrospective pooled analysis / M. Federico, M.D. Caballero Barrigón, L. Marcheselli et al. // *Lancet Haematol.* – 2018. – Vol. 5(8). – e359-e367. doi: 10.1016/S2352-3026(18)30090-5.

59. Vitolo, U. Follicular lymphomas / U. Vitolo, A.J. Ferreri, S. Montoto // *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* – 2008. – Vol. 66(3). – P. 248-261. doi: 10.1016/j.critrevonc.2008.01.014.

60. Moullet, I. Frequency and significance of anemia in non-Hodgkin's lymphoma patients / I. Moullet, G. Salles, N. Ketterer et al. // *Ann. Oncol.* – 1998. – Vol. 9(10). – P. 1109-1115.

61. Denz, H. Correlation between neopterin, interferon-gamma and haemoglobin in patients with haematological disorders / H. Denz, D. Fuchs, H. Huber et al. // *Eur. J. Haematol.* – 1990. – Vol. 44(3). – P. 186-189.

62. Means, R.T. Erythropoietin in the treatment of anemia in chronic infectious, inflammatory, and malignant diseases / R.T. Means // *Curr. Opin. Hematol.* – 1995. – Vol. 2(3). – P. 210-213.

63. Macciò, A. Hemoglobin levels correlate with interleukin-6 levels in patients with advanced untreated epithelial ovarian cancer: role of inflammation in cancer-related anemia / A. Macciò, C. Madeddu, D. Massa et al. // *Blood.* – 2005. – Vol. 106(1). – P. 362-367.

64. Alobeid, B. Follicular lymphoma (in situ) pattern in the bone marrow: does it indicate an early stage in disease evolution / B. Alobeid, J.G. Mears, G. Bhagat // *Clin. Case Rep.* – 2015. – Vol. 3(6). – P. 442-443.

65. Sander, B. The reliability of immunohistochemical analysis of the tumor microenvironment in follicular lymphoma: a validation study from the Lunenburg Lymphoma Biomarker Consortium / B. Sander, D. de Jong, A. Rosenwald et al. //

Haematologica. – 2014. – Vol. 99(4). – P. 715-725. doi: 10.3324/haematol.2013.095257.

66. Данилов, А.В. Экспериментальное исследование вариабельности текстурных характеристик клеток крови в системе компьютерной микроскопии / А.В. Данилов, В.Г. Никитаев, Ю.Р. Нагуманова и др. // Спецтехника и связь. – 2011. – № 4-5. – С. 78-80.

67. Alférez, S. Characterization and automatic screening of reactive and abnormal neoplastic B lymphoid cells from peripheral blood / Alférez S, Merino A, Bigorra L et al. // Int. J. Lab. Hematol. – 2016. – Vol. 38(2). – P. 209-219. doi: 10.1111/ijlh.12473.

68. Alférez, S. Automatic classification of atypical lymphoid B cells using digital blood image processing / S. Alférez, A. Merino, L.E. Mujica et al. // Int. J. Lab. Hematol. – 2014. – Vol. 36(4). – P. 472-480. doi: 10.1111/ijlh.12175.

69. Puigví, L. New quantitative features for the morphological differentiation of abnormal lymphoid cell images from peripheral blood / L. Puigví, A. Merino, S. Alférez et al. // J. Clin. Pathol. – 2017. – Vol. 70(12). – P. 1038-1048. doi: 10.1136/jclinpath-2017-204389.

70. Maeshima, A.M. Clinicopathological characteristics of follicular lymphoma with peripheral blood involvement / A.M. Maeshima, H. Taniguchi, K. Tanioka et al. // Leuk. Lymphoma. – 2015. – Vol. 56(7). – P. 2000-2004. doi: 10.3109/10428194.2014.963578.

71. Sarkozy, C. Peripheral blood involvement in patients with follicular lymphoma: a rare disease manifestation associated with poor prognosis / C. Sarkozy, L. Baseggio, P. Feugier et al. // Br. J. Haematol. – 2014. – Vol. 164(5). – P. 659-67. doi: 10.1111/bjh.12675.

72. Beltran, B.E. Follicular lymphoma with leukemic phase at diagnosis: a series of seven cases and review of the literature / B.E. Beltran, P. Quiñones, D. Morales et al. // Leuk. Res. – 2013. – Vol. 37(9). – P. 1116-1119. doi: 10.1016/j.leukres.2013.05.016.

73. Al-Nawakil, C. Leukemic phase of follicular lymphomas: an atypical presentation / C. Al-Nawakil, O. Kosmider, M.H. Stern et al. // *Leuk. Lymphoma*. – 2011. – Vol. 52(8). – P.1504-1508. doi: 10.3109/10428194.2011.574753.
74. Sarkozy, C. Risk Factors and Outcomes for Patients With Follicular Lymphoma Who Had Histologic Transformation After Response to First-Line Immunochemotherapy in the PRIMA Trial / Sarkozy C, Trneny M, Xerri L et al. // *J. Clin. Oncol.* – 2016. – Vol. 34(22). – P. 2575-2582. doi: 10.1200/JCO.2015.65.7163.
75. Angelopoulou, M.K. Adhesion molecules in B-chronic lymphoproliferative disorders / M.K. Angelopoulou, F.N. Kontopidou, G.A. Pangalis // *Semin. Hematol.* – 1999. – Vol. 36(2). – P. 178-197.
76. Jelici, J. The Role of Lymphocyte to Monocyte Ratio, Microvessel Density and HiGH CD44 Tumor Cell Expression in Non Hodgkin Lymphomas / J. Jelici, M.T. Balint, M.P. Jovanovic et al. // *Pathol. Oncol. Res.* – 2016. – Vol. 22(3). – P. 567-577. doi: 10.1007/s12253-015-0032-7.
77. Lin, G.N. Increased lymphocyte to monocyte ratio is associated with better prognosis in patients with newly diagnosed metastatic nasopharyngeal carcinoma receiving chemotherapy / G.N. Lin, J.W. Peng, D.Y. Liu et al. // *Tumour Biol.* – 2014. – Vol. 35(11). – P. 10849-10854. doi: 10.1007/s13277-014-2362-6.
78. Ho, CL. Neutrophil/Lymphocyte Ratio, Lymphocyte/Monocyte Ratio, and Absolute Lymphocyte Count/Absolute Monocyte Count Prognostic Score in Diffuse Large B-Cell Lymphoma: Useful Prognostic Tools in the Rituximab Era / C.L. Ho, C.S. Lu, J.H. Chen et al. // *Medicine (Baltimore)*. – 2015. – Vol. 94 (24). – e993. doi: 10.1097/MD.0000000000000993.
79. Aoki, K. The prognostic impact of absolute lymphocyte and monocyte counts at diagnosis of diffuse large B-cell lymphoma in the rituximab era / K. Aoki, S. Tabata, N. Yonetani et al. // *Acta Haematol.* – 2013. – Vol. 130(4). – P. 242-246. doi: 10.1159/000350484.
80. Li, Y.L. Peripheral blood lymphocyte/monocyte ratio at the time of first relapse predicts outcome for patients with relapsed or primary refractory diffuse large

B-cell lymphoma / Y.L. Li, K.S. Gu, Y.Y. Pan et al. // BMC Cancer. – 2014. – Vol. 14. – P. 341. doi: 10.1186/1471-2407-14-341.

81. Li, Y.L. Peripheral blood lymphocyte/monocyte ratio predicts outcome for patients with diffuse large B cell lymphoma after standard first-line regimens / Y.L. Li, Y.Y. Pan, Y. Jiao et al. // Ann. Hematol. – 2014. – Vol. 93(4). – P. 617-626. doi: 10.1007/s00277-013-1916-9.

82. Nishijima, T.F. Prognostic value of lymphocyte-to-monocyte ratio in patients with solid tumors: A systematic review and meta-analysis / T.F. Nishijima, H.B. Muss, S.S. Shachar et al. // Cancer Treat. Rev. – 2015. – Vol. 41(10). – P. 971-978. doi: 10.1016/j.ctrv.2015.10.003.

83. Луговская, С.А. Иммунофенотипирование в диагностике гемобластозов / С.А. Луговская, М.Е. Почтарь, Н.Н. Тупицын. – М., 2005. – С. 25-26.

84. Luskin, M.R. Chimeric Antigen Receptor Therapy in Acute Lymphoblastic Leukemia Clinical Practice. Curr Hematol. / M.R. Luskin, D.J. DeAngelo // Malig. Rep. – 2017. – Vol. 12(4). – P. 370-379. doi: 10.1007/s11899-017-0394-x.

85. Fesnak, A. Engineered T cells: the promise and challenges of cancer immunotherapy / A. Fesnak, C.H. June, B.L. Levine // Nat. Rev. Cancer. – 2016. – Vol. 16(9). – P. 566-581. doi: 10.1038/nrc.2016.97.

86. Lim, W. The Principles of Engineering Immune Cells to Treat Cancer / W. Lim, C. June // Cell. – 2017. – Vol. 168(4). – P. 724-740. doi: 10.1016/j.cell.2017.01.016.

87. Sadelain, M. The basic principles of chimeric antigen receptor design / M. Sadelain, R. Brentjens, I. Riviere // Cancer Discov. – 2013. – Vol. 3(4). – P. 388-398. doi: 10.1158/2159-8290.CD-12-0548.

88. Onea, A.S. CD19 chimeric antigen receptor (CD19 CAR)-redirected adoptive T-cell immunotherapy for the treatment of relapsed or refractory B-cell Non-Hodgkin's Lymphomas / A.S. Onea, A.R. Jazirehi // Am. J. Cancer Res. – 2016. – Vol. 6(2). – P. 403-424.

89. Kebriaei, P. Phase I trials using Sleeping Beauty to generate CD19-specific CAR T cells / P. Kebriaei, H. Singh, M.H. Huls et al. // *J. Clin. Invest.* – 2016. – Vol. 126(9). – P. 3363-3376. doi:10.1172/JCI86721.
90. ICML 2017: Data From the TRANSCEND Trial of JCAR017 in Relapsed and Refractory Aggressive B-Cell Non-Hodgkin Lymphoma — The ASCO Post. Available from: [Электронный ресурс] <http://www.ascopost.com/News/57764> (accessed 7.10.2017).
91. Locke, F.L. Abstract CT019: Primary results from ZUMA-1: a pivotal trial of axicabtagene ciloleucel (axicel; KTE-C19) in patients with refractory aggressive non-Hodgkin lymphoma (NHL) / F.L. Locke, S.S. Neelapu, N.L. Bartlett et al. // *Cancer Res.* – 2017. – Vol. 77, Suppl.13:CT019. doi: 10.1158/1538-7445.AM2017-CT019.
92. Camacho, F.I. Improved demonstration of immunohistochemical prognostic markers for survival in follicular lymphoma cells / F.I. Camacho, C. Bellas, C. Corbacho et al. // *Mod. Pathol.* – 2011. – Vol. 24(5). – P. 698-707. doi: 10.1038/modpathol.2010.237.
93. Пластинина, Л.В. Клиническая и патоморфологическая характеристика фолликулярной лимфомы 3-го цитологического типа: дис. ... канд. мед. наук: 14.01.12 / Пластинина Любовь Васильевна. – М., 2017. – 275 с.
94. Ohnishi, N. CD10 down expression in follicular lymphoma correlates with gastrointestinal lesion involving the stomach and large intestine / N. Ohnishi, K. Takata, T. Miyata-Takata et al. // *Cancer Sci.* – 2016. – Vol. 107(11). – P. 1687-1695. doi: 10.1111/cas.13031.
95. Maeshima, A.M. Clinicopathological characteristics of follicular lymphoma with peripheral blood involvement / A.M. Maeshima, H. Taniguchi, K. Tanioka et al. // *Leuk. Lymphoma.* – 2015. – Vol. 56(7). – P. 2000-2004.
96. Eshoa, C. Decreased CD10 Expression in Grade III and in Interfollicular Infiltrates of Follicular Lymphomas / C. Eshoa, S. Perkins, B. Kampalath et al. // *Am. J. Clin. Pathol.* – 2001. – Vol. 115(6). – P. 862-867.

97. Bonnefoy, J.Y. Structure and functions of CD23 / J.Y. Bonnefoy, S. Lecoanet-Henchoz, J.F. Gauchat et al. // *Int. Rev. Immunol.* – 1997. – Vol.16. – P. 113-128.
98. Liu, Y.J. Recombinant 25-kDa CD23 and interleukin 1 alpha promote the survival of germinal center B cells: evidence for bifurcation in the development of centrocytes rescued from apoptosis / Y.J. Liu, J.A. Cairns, M.J. Holder et al. // *Eur. J. Immunol.* – 1991. – Vol. 21. – P.1107-1114.
99. Olteanu, H. CD23 Expression in Follicular Lymphoma / H. Olteanu, T.S. Fenske, A.M. Harrington et al. // *Am. J. Clin. Pathol.* – 2011. – Vol.135(1). – P. 46-53. doi: 10.1309/AJCP27YWLIQRAJPW
100. Katzenberg, T. A distinctive subtype of t(14;18)-negative nodal follicular non-Hodgkin Lymphoma characterized by a predominantly diffuse growth pattern and deletions in the chromosomal region 1p36 / T. Katzenberg, J. Kalla, E. Leich et al. // *Blood.* – 2009. – Vol. 113(5). – P. 1053-1061. doi: 10.1182/blood-2008-07-168682.
101. Brudno, J. Discoradant bone marrow involvement in non-Hodgkin lymphoma / J. Brudno, T. Tadmor, S. Pittaluga et al. // *Blood.* – 2016. – Vol. 127(8). – P. 965-970. doi: 10.1182/blood-2015-06-651968.
102. Foucar, K. Bone marrow and blood involvement by lymphoma in relationship to the Luke-Collins classification / K. Foucar, R.W. McKenna, G. Frizzera et al. // *Cancer.* – 1982. – Vol. 49. – P. 888-897.
103. Arber, D.A. Bone marrow biopsy involvement by non- Hodgkin's lymphoma: f0 requency of lymphoma types, patterns, blood involvement, and discordance with other sites in 450 specimens / D.A. Arber, T.I. George // *Am. J. Surg. Pathol.* – 2005. – Vol. 29. – P. 1549-1557.
104. Merli, M. Assessment of bone marrow involvement in non-Hodgkins lymphomas: comparison between histology and flow cytometry / M. Merli, L. Arcaini, E. Boveri et al. // *Eur. J. Haematol.* – 2010. – Vol. 85(5). – P. 405-415.
105. Peng, H.Z. Nonimmunoglobulin gene hypermutation in germinal center B cells / H.Z. Peng, M.Q. Du, A. Koulis et al. // *Blood.* –1999. – Vol. 93(7). – P. 2167-2172.

106. Alvaro, T. Immunohistochemical patterns of reactive microenvironment are associated with clinicobiologic behavior in follicular lymphoma patients / T. Alvaro, M. Lejeune, M.T. Salvado et al. // *J. Clin. Oncol.* – 2006. – Vol. 24(34). – P. 5350-5357.

107. Glas, A.M. Gene-expression and immunohistochemical study of specific T-cell subsets and accessory cell types in the transformation and prognosis of follicular lymphoma / A.M. Glas, L. Knoop, L. Delahaye et al. // *J. Clin. Oncol.* – 2007. – Vol. 25(4). – P. 390-398.

108. Alvaro, T. The presence of STAT1-positive tumor-associated macrophages and their relation to outcome in patients with follicular lymphoma / T. Alvaro, M. Lejeune, F.I. Camacho et al. // *Haematologica.* – 2006. – Vol. 91(12). – P. 1605-1612.

109. Farinha, P. Analysis of multiple biomarkers shows that lymphoma-associated macrophage (LAM) content is an independent predictor of survival in follicular lymphoma (FL) / P. Farinha, H. Masoudi, B.F. Skinnider et al. // *Blood.* – 2005. – Vol. 106(6). – P.2169-2174.

110. Taskinen, M. A high tumor-associated macrophage content predicts favorable outcome in follicular lymphoma patients treated with rituximab and cyclophosphamide-doxorubicin-vincristine-prednisone / M. Taskinen, M.L. Karjalainen-Lindsberg, H. Nyman et al. // *Clin. Cancer Res.* – 2007. – Vol. 13(19). – P. 5784-5789.

111. Canioni, D. High numbers of tumor-associated macrophages have an adverse prognostic value that can be circumvented by rituximab in patients with follicular lymphoma enrolled onto the GELA-GOELAMS FL-2000 trial / D. Canioni, G. Salles, N. Mounier et al. // *J. Clin. Oncol.* – 2008. – Vol. 26(3). – P. 440-446.

112. Lee, A.M. Number of CD4+ cells and location of forkhead box protein P3-positive cells in diagnostic follicular lymphoma tissue microarrays correlates with outcome / A.M. Lee, A.J. Clear, M. Calaminici et al. // *J. Clin. Oncol.* – 2006. – Vol. 24(31). – P. 5052-5059.

113. Klapper, W. Tumor sclerosis but not cell proliferation or malignancy grade is a prognostic marker in advancedstage follicular lymphoma: the German Low Grade

Lymphoma Study Group / W. Klapper, E. Hoster, L. Rolver et al. // *J. Clin. Oncol.* – 2007. – Vol. 25(22). – P. 3330-3336.

114. Harris, N.L. Indolent lymphoma: follicular lymphoma and the microenvironment-insights from the microscope / N.L. Harris // *Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Program.* – 2014. – Vol. 5 (1). – P. 158-162. doi: 10.1182/asheducation-2014.1.158.

115. Yang, Z.Z. PD-1 expression defines two distinct T-cell sub-populations in follicular lymphoma that differentially impact patient survival / Z.Z. Yang, D.M. Grote, S.C. Ziesmer et al. // *Blood Cancer J.* – 2015. – Vol. 5. – e281. doi: 10.1038/bcj.2015.1.

116. Lee, A.M. Number of CD4⁺ cells and location of forkhead box protein P3-positive cells in diagnostic follicular lymphoma tissue microarrays correlates with outcome / A.M. Lee, A.J. Clear, M. Calaminici et al. // *J. Clin. Oncol.* – 2006. – Vol. 24. – P. 5052-5059.

117. Wahlin, B.E. A unifying microenvironment model in follicular lymphoma: outcome is predicted by programmed death-1–positive, regulatory, cytotoxic, and helper T cells and macrophages / B.E. Wahlin, M. Aggarwal, S. Montes-Moreno et al. // *Clin. Cancer Res.* – 2010. – Vol.16. – P. 637-650.

118. Byers, R.J. Clinical quantitation of immune signature in follicular lymphoma by RT-PCR-based gene expression profiling / R.J. Byers, E. Sakhinia, P. Joseph et al. // *Blood.* – 2008. – Vol. 111. – P. 4764-4770.

119. Wahlin, B.E. T cells in tumors and blood predict outcome in follicular lymphoma treated with rituximab / B.E. Wahlin, C. Sundström, H. Holte et al. // *Clin. Cancer Res.* – 2011. – Vol. 17(12). – P. 4136-4144. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-0264.

120. Koch, K. The composition of the microenvironment in follicular lymphoma is associated with the stage of the disease / K. Koch, E. Hoster, M. Unterhalt et al. // *Hum. Pathol.* – 2012. – Vol. 43(12). – P. 2274-2281.

121. Liu, W. Clinical Significance of detecting CD4⁺ T Cells in Peripheral Blood of Patients with Follicular lymphoma / W. Liu, G.X. Zhagn, W.Z. Shi et al. // *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi.* – 2017. – Vol. 25(2). – P. 449-454.

122. He, L. Low absolute CD4+ T cell counts in peripheral blood are associated with inferior survival in follicular lymphoma / L. He, J.H. Liang, J.Z. Wu et al. // *Tumour Biol.* – 2016. – Vol. 37(9). – P. 12589-12595.

123. A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group classification of non-Hodgkin's lymphoma; the Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. // *Blood.* – 1997. – Vol. 89. – P. 3909-3918.

124. Луговская, С.А. Лабораторная гематология / С.А. Луговская, В.Т. Морозова, М.Е. Почтарь и др. – 3-е изд., испр. и доп. – М., 2014. – С. 186.

125. Bosga-Bouwer, AG. Molecular, cytogenetic, and immunophenotypic characterization of follicular lymphoma grade 3B; a separate entity or part of the spectrum of diffuse large B-cell lymphoma or follicular lymphoma? / A.G. Bosga-Bouwer, A. van den Berg, E. Haralambieva et al. // *Hum. Pathol.* – 2006. – Vol. 37. – P. 528-533.

126. Catoretti, G. BCL-6 protein is expressed in germinal center B-cells / G. Catoretti, C.C. Chang, K. Cechova et al. // *Blood.* – 1995. – Vol. 86. – P. 45-53.

127. Karube, K. CD10-MUM1+ follicular lymphoma lacks BCL2 gene translocation and shows characteristic biologic and clinical features / K. Karube, Y. Guo, J. Suzumiya et al. // *Blood.* – 2007. – 109. – P. 3076-3079.

128. Lai, R. Frequency of CD 43 expression in Non-Hodgkin lymphoma. A survey of 742 cases and further characterization of rare CD43+ follicular lymphomas / R. Lai, L.M. Weiss, K.L. Chang et al. // *Am. J. Clin. Pathol.* – 1999. – Vol. 111. – P. 488-494.

129. Ott, G. Cytomorphologic, immunohistochemical, and cytogenetic profiles of follicular lymphoma: 2 types of follicular lymphoma grade 3 / G. Ott, T. Katzenberger, A. Lohr, et al. // *Blood.* – 2002. – Vol. 99. – P. 3806-3812.

130. Pittaluga, S. BCL-6 expression in reactive lymphoid tissue and in B-cell non-Hodgkin's lymphomas / S. Pittaluga, T.A. Ayoubi, I. Wlodarska et al. // *J. Pathol.* – 1996. – Vol. 179. – P. 145-150.

131. Finn, L.S. Primary follicular lymphoma of the testis in childhood / L.S. Finn, D.S. Viswanatha, J.B. Belasco et al. // *Cancer.* – 1999. – Vol. 85. – P. 1626-1635.

132. Фалалеева, Н.А. Особенности эритропоза больных фолликулярной лимфомой / Н.А. Фалалеева, А.В. Моженкова, Е.А. Османов и др. // Вестник РОНЦ им. Н.Н.Блохина РАМН. – 2016. – № 3. – С. 35-38.

133. Пластинина, Л.В. Фолликулярная лимфома 3-го цитологического типа: de novo и трансформированный варианты заболевания / Л.В. Пластинина, А.М. Ковригина, Т.Н. Обухова и др. // Клиническая онкогематология. – 2017. – Vol. 10(4). – P. 453-463.