



Оригинальная статья

# Критерии диагностики лимфопролиферативных заболеваний по периферической крови пациентов при помощи клеточного биочипа

Федянина О.С.<sup>1,2</sup> • Чуксина Ю.Ю.<sup>3</sup> • Хмелевская А.Н.<sup>3</sup> • Хвастунова А.Н.<sup>2</sup> • Матвеев Ю.Н.<sup>3</sup> • Катаева Е.В.<sup>3</sup> • Филатов А.В.<sup>4</sup> • Кузнецова С.А.<sup>1,2</sup>

**Актуальность.** В настоящее время диагностика лимфопролиферативных заболеваний базируется на сочетании морфологического исследования мазков крови или костного мозга с иммунофенотипированием методом проточной цитометрии. Проведение иммунофенотипического исследования методом проточной цитометрии возможно только в крупных медицинских центрах, что не всегда удобно для пациента. В этой связи создание доступного метода предварительной диагностики лимфо-пролиферативных заболеваний, который не требует специального оборудования, представляется актуальной задачей.

**Материал и методы.** Мононуклеары периферической крови 17 пациентов, поступивших в стационар с подозрением на лимфо-пролиферативное заболевание, и 17 здоровых доноров исследовались на клеточном биочипе для определения доли клеток, положительных по различным поверхностным CD-антигенам. Для верификации диагноза использовали проточную цитометрию.

**Результаты.** Пациенты с В-клеточными лимфо-пролиферативными заболеваниями (В-ЛПЗ)

статистически значимо отличались от здоровых доноров более низкой долей CD7<sup>+</sup> (медианы 7 и 73% при сравнении В-ЛПЗ и контроля,  $p=2 \times 10^{-6}$ ; медианы 93 и 7% при сравнении пациентов с Т-клеточными лимфо-пролиферативными заболеваниями (Т-ЛПЗ) и В-ЛПЗ,  $p=0,032$ ) и более высокой долей CD19<sup>+</sup> мононуклеарных клеток периферической крови по сравнению с пациентами с Т-ЛПЗ и здоровыми донорами (медианы 84 и 13% при сравнении пациентов с В-ЛПЗ и контроля,  $p=2 \times 10^{-5}$ ; 84 и 3% при сравнении пациентов с В-ЛПЗ и Т-ЛПЗ,  $p=0,033$ ). Пациенты с В-клеточным хроническим лимфо-лейкозом (В-ХЛЛ) статистически значимо отличались от пациентов с другими В-ЛПЗ более высокой долей CD5<sup>+</sup> клеток на клеточном биочипе (медианы 72 и 9% при сравнении пациентов с В-ХЛЛ и В-ЛПЗ,  $p=0,024$ ). Пациенты с Т-ЛПЗ статистически значимо отличались от здоровых доноров более низкой долей CD19<sup>+</sup> клеток (медианы 3 и 13% при сравнении пациентов с Т-ЛПЗ и контроля,  $p=0,042$ ).

**Заключение.** Показана возможность диагностики лимфо-пролиферативных заболеваний с использованием разработанного ранее

клеточного биочипа. С его помощью можно рассортировать лейкоциты в пространстве по их поверхностным дифференцировочным антигенам для дальнейшего морфологического анализа. Клеточный биочип позволяет проводить дифференциальную диагностику между В- и Т-ЛПЗ и определять клональность В-лимфоцитов на основе экспрессии легких цепей иммуноглобулинов.

**Ключевые слова:** лимфо-пролиферативные заболевания, лейкоз, лимфома, В-клеточный хронический лимфолейкоз, клеточный биочип

**Для цитирования:** Федянина ОС, Чуксина ЮЮ, Хмелевская АН, Хвастунова АН, Матвеев ЮН, Катаева ЕВ, Филатов АВ, Кузнецова СА. Критерии диагностики лимфо-пролиферативных заболеваний по периферической крови пациентов при помощи клеточного биочипа. Альманах клинической медицины. 2021;49(6):405–411. doi: 10.18786/2072-0505-2021-49-053.

Поступила 21.05.2021; доработана 15.11.2021; принята к публикации 17.11.2021; опубликована онлайн 24.11.2021

**Л**имфо-пролиферативные заболевания (ЛПЗ) – самый распространенный вид гемобластозов [1, 2]. Диагностика ЛПЗ возможна только в крупных медицинских центрах с использованием дорогостоящего оборудования. В этой связи создание доступных диагностических методов, позволяющих выявить или исключить ЛПЗ, остается актуальной задачей. Одним из таких методов может стать клеточный биочип, разработанный ранее на базе НМИЦ ДГОИ им. Дм. Рогачева [3, 4]. Анализ крови при помощи клеточного биочипа может быть использован в медицинских учреждениях любого уровня как метод предварительной диагностики, позволяющий предположить наличие ЛПЗ, или как альтернатива проточной цитометрии

в том случае, когда проведение цитометрического анализа по каким-либо причинам невозможно.

Клеточный биочип представляет собой прозрачную пластиковую подложку размером 22×22 мм, на которую в определенном порядке нанесены антитела к поверхностным кластерам дифференцировки (CD-антигенам) лейкоцитов. На биочип наносят суспензию мононуклеарных клеток, выделенную из периферической крови или костного мозга человека, и инкубируют без перемешивания. В процессе инкубации клетки равномерно оседают на поверхность биочипа. Если клетка попадает в область, где иммобилизовано антитело к одному из CD-антигенов, присутствующих на ее поверхности, она связывается с иммобилизованными на биочипе антителами.



Все не связавшиеся с антителами клетки удаляются в процессе отмывки. Таким образом, после отмывки, сушки и окраски по Романовскому – Гимзе на биочипе останутся области со связавшимися клетками, при этом в каждой из областей локализованы клетки, положительные по определенному кластеру дифференцировки. Ранее было показано, что морфология связавшихся на биочипе клеток идентична морфологии аналогичных клеток в мазках как для нормальных лейкоцитов, так и для опухолевых клеток при широком спектре гемобластозов [3, 4]. Кроме того, плотность связывания клеток с антителами к каждому CD-антигену на биочипе, нормированная на плотность связывания клеток с антителами к панлейкоцитарному антигену CD45 или CD45RA, равна доле в исследуемой суспензии клеток, положительных по соответствующему CD-антигену [3]. Следовательно, биочип позволяет определить долю в исследуемой суспензии клеток, положительных по всем CD-антигенам, входящим в его панель, и исследовать отдельно морфологию клеток, несущих на поверхности каждый из этих CD-антигенов.

Цель настоящего исследования – сформулировать критерии определения наличия В-клеточных (В-ЛПЗ) и Т-клеточных лимфопрлиферативных заболеваний (Т-ЛПЗ) на основе данных, полученных с помощью клеточного биочипа при обследовании пациентов с подозрением на ЛПЗ, поступивших для первичной диагностики.

## Материал и методы

**Пациенты и здоровые доноры.** В исследование была включена группа из 17 пациентов, поступивших в стационар с подозрением на ЛПЗ, в возрасте от 42 до 83 лет (соотношение мужчин и женщин составило 10:7), и группа из 17 здоровых добровольцев в возрасте от 20 до 43 лет (соотношение мужчин и женщин – 5:12). Критерием включения здоровых добровольцев было отсутствие в момент взятия крови острой инфекции и/или обострения хронической. Критерием включения пациентов в данную работу было обнаружение у них ЛПЗ методом проточной цитометрии. Стандартными диагностическими методами у 15 пациентов выявлены В-ЛПЗ (11 пациентов

**Федянина Ольга Сергеевна** – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. отдела разработок<sup>1</sup>, вед. науч. сотр. лаборатории биофизики<sup>2</sup>; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7131-8006>

**Чуксина Юлия Юрьевна** – канд. мед. наук, ст. науч. сотр. лаборатории биомедицинских методов исследования<sup>3</sup>; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4744-347X>

**Хмелевская Анна Николаевна** – мл. науч. сотр. лаборатории биомедицинских методов исследования<sup>3</sup>

**Хвастунова Алина Николаевна** – канд. биол. наук, науч. сотр. лаборатории биофизики<sup>2</sup>; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7117-0168>

**Матвеев Юрий Николаевич** – старший лаборант лаборатории биомедицинских методов исследования<sup>3</sup>

**Катаева Елена Васильевна** – канд. мед. наук, ст. науч. сотр. отделения клинической гематологии и иммунотерапии<sup>4</sup>; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2650-7646>

**Филатов Александр Васильевич** – д-р биол. наук, профессор, заведующий лабораторией иммунохимии<sup>4</sup>; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6460-9427>

**Кузнецова Софья Алексеевна** – канд. физ.-мат. наук, заведующая отделом разработок<sup>1</sup>, вед. науч. сотр. лаборатории биофизики<sup>2</sup>; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5946-0026>  
✉ 117198, г. Москва, ул. Саморы Машела, 1, Российская Федерация. Тел.: +7 (917) 508 45 50. E-mail: kuznetsova.sonya@gmail.com

с В-клеточным хроническим лимфолейкозом (В-ХЛЛ), 3 – с лейкоемизацией лимфомы из клеток маргинальной зоны селезенки (ЛКМЗС) и 1 – с лейкоемизацией лимфомы из клеток мантийной зоны (ЛКМЗ)), у 2 пациентов – Т-ЛПЗ.

Медиана возраста больных составила 64 года (42–83). Стадию болезни при ХЛЛ оценивали согласно классификации Rai на основании физикального осмотра и дополнительного обследования (компьютерная томография органов грудной клетки, брюшной полости и забрюшинного пространства или ультразвуковое исследование брюшной полости и забрюшинного пространства с рентгенографией органов грудной клетки). II стадия ХЛЛ была установлена у 9 пациентов, IV стадия – у 2, все больные были с показаниями для проведения терапии, у 7 пациентов ХЛЛ был выявлен впервые; 2 пациентам было проведено 2 курса RFC (ритуксимаб, флударабин, циклофосфамид); 3 пациента исследованы во время рецидива ХЛЛ. Лимфома из клеток маргинальной зоны выявлена у 3 пациентов, все имели IV стадию. У 1 больного диагностирована ЛКМЗ IV стадии. У 1 пациентки установлена лимфома из периферических Т-лимфоцитов, неутонченная, IV стадии, еще у 1 – Т-клеточный лейкоз из больших гранулярных лимфоцитов.

**Характеристика исследования.** Пилотное, observational, одномоментное, нерандомизированное исследование.

**Этическая экспертиза.** Протокол исследования одобрен независимым этическим комитетом при ЦТП ФХФ РАН, выписка из протокола от 25.01.2021 №1/1-21(НЭК). Работа выполнена в соответствии с этическими принципами проведения биомедицинских исследований, отраженными в Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации. От всех людей, ставших объектами исследования, было получено добровольное информированное согласие на участие в исследовании и публикацию его результатов.

**Изготовление биочипов.** Биочипы изготавливали в соответствии с ранее опубликованным протоколом [3, 4] с небольшими модификациями. В панель биочипа входили антитела к CD2, CD3, CD5, CD7, CD10, CD16, CD19, CD20, CD22, CD23, CD45, CD56, иммуноглобулинам класса М (IgM)

<sup>1</sup> ФГБУН Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии Российской академии наук; 109029, г. Москва, ул. Средняя Калитниковская, 30, Российская Федерация

<sup>2</sup> ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Минздрава России; 117198, г. Москва, ул. Саморы Машела, 1, Российская Федерация

<sup>3</sup> ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского»; 129110, г. Москва, ул. Щепкина, 61/2, Российская Федерация

<sup>4</sup> ФГБУ «Государственный научный центр «Институт иммунологии» ФМБА России; 115522, г. Москва, Каширское шоссе, 24, Российская Федерация



(ООО «Сорбент», Москва, Россия) и CD4, CD8, CD11b, CD11c, CD13, CD14, CD15, CD25, CD33, CD38, CD41a, CD61, CD45RA, CD45RO, CD64, CD117, CD123, CD200, HLA-DR, легким цепям иммуноглобулинов (каппа/лямбда) и смеси мышиных IgG (изотипический отрицательный контроль) (eBioscience, Уолтем, Массачусетс, США).

**Выделение лейкоцитов и их анализ.** Лейкоциты были выделены из венозной крови, взятой самоотемом в S-Monovette 1,3 мл 106 mM цитрата натрия (рН 5,5) (соотношение крови и цитрата 9:1) или S-Monovette 9 мл 1,6 мг EDTA/мл крови путем центрифугирования в градиенте плотности Histopaque-1077 с последующей отмывкой и инкубацией с биочипом при 4 °С в течение 1 часа, процедура описана в [3, 4] с небольшими модификациями (выделенные мононуклеары инкубировались с биочипом в 100% эмбриональной телячьей сыворотке (Sigma, Сент-Луис, Миссури, США). Для анализа плотности связывания клеток на биочипе использовали микроскоп Nikon Eclipse Ni, объектив 20× и камеру Nikon DS-Ri1. Плотность связывания на разных анти-CDx была нормирована на плотность связывания в пятне анти-CD45RA.

**Проточная цитометрия.** Иммунофенотипическое исследование лимфоцитов периферической крови и костного мозга проводили с диагностической целью методом 4-/6-цветной лазерной проточной цитофлуориметрии (проточный цитофлуориметр FACSCalibur Becton Dickinson, проточный цитометр Navios, Becton Coulter, США). Использовали моноклональные антитела (МАТ), конъюгированные с флюоресцентными красителями производства BD Biosciences (США). Определяли экспрессию CD45, CD19, CD20, CD22, CD79b, CD23, CD43, CD200, CD25, CD38, CD2, CD4, CD5, CD8, CD7, CD11c, CD103, CD305, CD16, CD56, CD57, CD10, CD45RA, CD45RO, CD123, тип Т-клеточного рецептора (TCR  $\alpha\beta/\gamma\delta$ ), поверхностную экспрессию легких цепей иммуноглобулинов (Каппа/Lambda). Иммунофенотипическое исследование проводилось с применением стандартной методики пробоподготовки. Критерием позитивности считали наличие экспрессии антигена на поверхности или в цитоплазме более чем 20% опухолевых клеток. Оценку интенсивности экспрессии антигенов проводили по параметру средней интенсивности флюоресценции (англ. mean fluorescence intensity, MFI), выраженной в условных единицах (у.е.).

**Статистическую обработку данных** и сравнение плотностей связывания клеток по критерию Манна – Уитни выполняли при помощи OriginPro 9 (OriginLab Corp., США). Значимо различающимися считались выборки с  $p < 0,05$ .

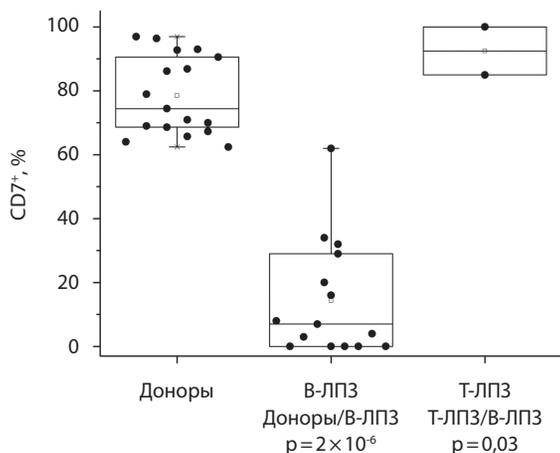
## Результаты и обсуждение

Определение порогов доли В-лимфоцитов и Т-лимфоцитов среди всех мононуклеаров периферической крови для выделения В-клеточных и Т-клеточных лимфопролиферативных заболеваний. Основной задачей исследования была разработка критериев наличия В-ЛПЗ или Т-ЛПЗ на основе анализа мононуклеаров периферической крови пациента с помощью клеточного биочипа. Было высказано предположение, что у пациентов с В-ЛПЗ доля клеток, положительных по Т-клеточным маркерам пролиферации, будет значимо снижена, а клеток, положительных по В-клеточным маркерам пролиферации, – значимо повышена по сравнению с нормой за счет размера опухолевой популяции [5], и эти признаки могут быть использованы в качестве первого критерия наличия В-клеточного пролиферативного заболевания. Для проверки этой гипотезы с помощью клеточного биочипа были определены доли мононуклеаров периферической крови, положительных по CD7 для выделения фракции Т-лимфоцитов и CD19 для выделения В-клеток, у 15 пациентов с подтвержденными В-ЛПЗ, 2 пациентов с подтвержденными Т-ЛПЗ и проведено сравнение полученных результатов с аналогичными данными для 17 здоровых доноров. Маркер CD7 был выбран для выделения Т-лимфоцитов потому, что по данным литературы из всех поверхностных CD, характерных для Т-клеток, его низкая или отсутствующая экспрессия при Т-ЛПЗ и аберрантная экспрессия при В-ЛПЗ встречаются реже всего [6, 7].

Доля CD7<sup>+</sup> клеток среди мононуклеаров периферической крови пациентов с В-ЛПЗ значимо ниже, чем у пациентов с Т-ЛПЗ и здоровых доноров (рис. 1), что может быть использовано в качестве одного из критериев присутствия В-ЛПЗ. И хотя данных для точного определения порогового значения для доли CD7<sup>+</sup> клеток с целью выделения группы пациентов с В-ЛПЗ методом ROC-анализа недостаточно, из рис. 1 видно, что этот порог будет лежать между 40 и 60%.

Доля мононуклеаров, положительных по CD2 и CD3, также была снижена у пациентов с В-ЛПЗ по сравнению с контролем и пациентами, имеющими Т-ЛПЗ, что хорошо соотносится с результатами проточной цитометрии (данные не показаны). В литературе описана экспрессия CD2 на опухолевых клетках при различных В-ЛПЗ [7, 8], однако среди исследованных пациентов таких случаев не обнаружено.

Доля CD19<sup>+</sup> клеток среди мононуклеаров периферической крови у пациентов с В-ЛПЗ была статистически значимо выше, чем у пациентов с Т-ЛПЗ и здоровых доноров (рис. 2). Порог по плотности

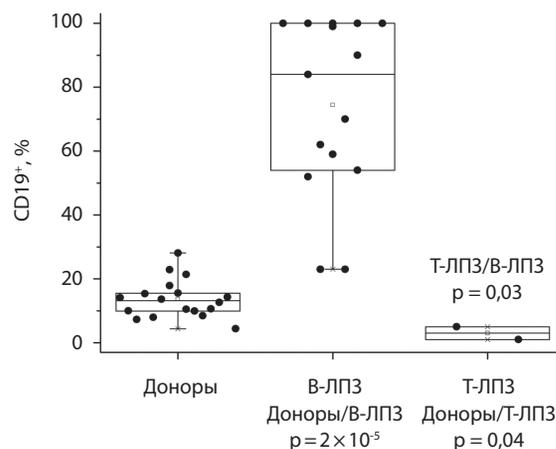


**Рис. 1.** Плотность клеток на клеточном биочипе на анти-CD7 у здоровых доноров, пациентов с В-клеточными (В-ЛПЗ) и Т-клеточными лимфопролиферативными заболеваниями (Т-ЛПЗ), нормированная на плотность клеток на анти-CD45RA. Под диаграммами указаны все значения  $p < 0,05$ , посчитанные по критерию Манна – Уитни. Боксы – 25–75-й процентиля, (L) – минимальное и максимальное значения, линия – медиана, (●) – среднее значение

заполнения клетками анти-CD19 на клеточном биочипе может быть выбран около 40%. Два наименьших значения доли CD19<sup>+</sup> клеток среди пациентов с В-ЛПЗ имеют пациенты с ЛКЗМС, но у них доля клеток, положительных по CD20 и CD22, составляла 61–74 и 54–64% соответственно, что значительно превышает долю мононуклеаров, несущих эти поверхностные антигены, у здоровых доноров (4–21 и 4–22% соответственно) [9]. Данный факт уверенно свидетельствует о В-клеточной природе опухолевых клеток и хорошо согласуется с данными проточной цитометрии и данными литературы [10]. Вместе с тем у пациентов с Т-ЛПЗ доля CD19<sup>+</sup> мононуклеаров была статистически значимо ниже, чем в контроле и у пациентов с В-ЛПЗ (см. рис. 2) с пороговым значением 5%.

На основании полученных результатов в качестве предварительного критерия наличия Т-ЛПЗ по данным анализа мононуклеаров периферической крови с помощью клеточного биочипа может быть предложено значение доли CD19<sup>+</sup> ниже 5%, а в качестве критерия наличия В-ЛПЗ – значение доли CD7<sup>+</sup> ниже 40% и максимальное значение из долей CD19<sup>+</sup>, CD20<sup>+</sup> и CD22<sup>+</sup> клеток выше 40%.

Определение клональности опухолевых клеток на клеточном биочипе у пациентов с В-клеточными лимфопролиферативными заболеваниями. Основным признаком ЛПЗ считается клональность опухолевых клеток, определяемая в случае Т-лимфоцитов генетическими методами [11],

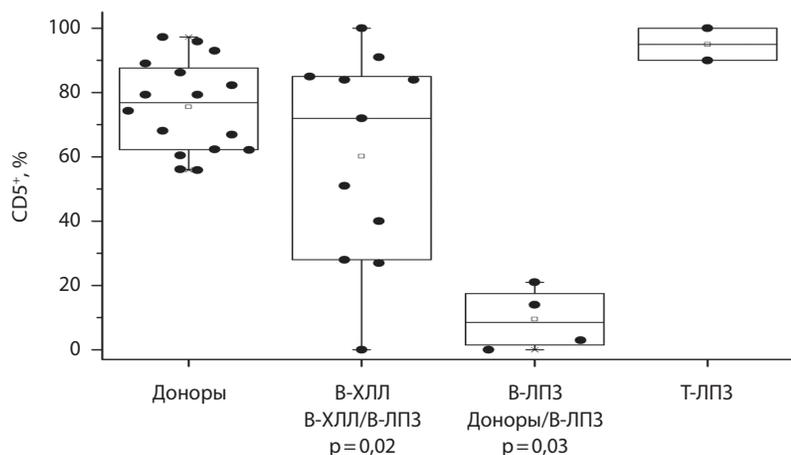


**Рис. 2.** Плотность клеток на клеточном биочипе на анти-CD19 у здоровых доноров, пациентов с В-клеточными (В-ЛПЗ) и Т-клеточными лимфопролиферативными заболеваниями (Т-ЛПЗ), нормированная на плотность клеток на анти-CD45RA. Под диаграммами указаны все значения  $p < 0,05$ , посчитанные по критерию Манна – Уитни. Боксы – 25–75-й процентиля, (L) – минимальное и максимальное значения, линия – медиана, (●) – среднее значение

а в случае В-лимфоцитов – на основании выявления рестрикции одного из двух вариантов легких цепей иммуноглобулинов (каппа или лямбда) при детекции их мембранной или внутрицитоплазматической экспрессии с помощью анти-каппа и анти-лямбда антител методом проточной цитометрии. Методом клеточного биочипа клональность опухолевых клеток пациентов с В-ЛПЗ определяли на основании долей каппа<sup>+</sup> и лямбда<sup>+</sup> клеток среди всех мононуклеаров периферической крови. У 13 из 15 пациентов с В-ЛПЗ доля каппа<sup>+</sup> или лямбда<sup>+</sup> клеток превышала другую в 3 и более раз, и преобладающая легкая цепь определяла клональность опухолевых клеток. У 2 из 15 пациентов (пациент с В-ХЛЛ и пациент с ЛКМЗС) доля каппа<sup>+</sup> клеток превышала долю лямбда<sup>+</sup> клеток незначительно, в 1,2 и 2 раза соответственно, в этом случае клональность определяли при помощи морфологического исследования клеток, связавшихся с антителами к каппа и лямбда легким цепям иммуноглобулинов, по тому, с каким из антител связалось больше клеток с патологической морфологией. Клональность опухолевых В-клеток, определенная с помощью клеточного биочипа описанным способом, для всех пациентов совпала с клональностью, определенной цитометрически.

Дифференциальная диагностика В-клеточных лимфопролиферативных заболеваний с помощью клеточного биочипа

Следующей задачей работы была выработка критериев дифференциальной диагностики пациентов,



**Рис. 3.** Плотность клеток на клеточном биочипе на анти-CD5 у здоровых доноров, пациентов с хроническим В-клеточным лимфолейкозом (В-ХЛЛ), другими В-клеточными лимфопролиферативными заболеваниями (В-ЛПЗ) и Т-клеточными лимфопролиферативными заболеваниями (Т-ЛПЗ), нормированная на плотность клеток на анти-CD45RA. Под диаграммами указаны все значения  $p < 0,05$ , посчитанные по критерию Манна – Уитни. Боксы – 25–75-й процентиля, (└) – минимальное и максимальные значения, линия – медиана, (●) – среднее значение

выделенных на основании предложенных выше критериев наличия В-ЛПЗ. Как было показано ранее [3], в тех случаях когда опухолевые клетки могут быть выявлены морфологически, диагностика может быть проведена на основе морфологической картины опухолевых клеток и набора CD на их поверхности, определяемого как набор тех антител на биочипе, с которыми наблюдается связывание клеток патологической морфологии. Исключение – ХЛЛ, клетки которого морфологически неотличимы от зрелых лимфоцитов, и поэтому его диагностика с помощью биочипа должна проводиться на основе распределения доли мононуклеарных клеток, положительных по различным поверхностным антигенам.

Хронический В-клеточный лимфолейкоз – самое распространенное онкогематологическое заболевание у людей европеоидной расы [12]. Для

В-ХЛЛ типично накопление зрелых клональных В-лимфоцитов, экспрессирующих поверхностные CD5, CD19 и CD23 антигены [13]. В наше исследование было включено 11 пациентов с диагнозом В-ХЛЛ. Поскольку опухолевая популяция при В-ХЛЛ характеризуется коэкспрессией CD5 и CD19, мы проанализировали долю CD5<sup>+</sup> мононуклеаров периферической крови у пациентов с В-ХЛЛ и другими В-ЛПЗ.

Как видно из рис. 3, доля CD5<sup>+</sup> мононуклеаров периферической крови, определенная с помощью клеточного биочипа, статистически значимо выше у пациентов с В-ХЛЛ, чем с другими В-ЛПЗ. Коэкспрессия CD5 и CD19 характерна также для пациентов с ЛКМЗ. В нашей выборке был 1 пациент с данным диагнозом, однако при исследовании его крови на клеточном биочипе на анти-CD5 не было обнаружено ни связывания значимого количества мононуклеаров, ни клеток с характерной для ЛКМЗ морфологией. Предварительные данные, опубликованные ранее [3], позволяют предположить, что для дифференциальной диагностики двух CD5<sup>+</sup> В-ЛПЗ на клеточном биочипе могут быть использованы данные о доле CD23<sup>+</sup> и CD200<sup>+</sup> клеток и наличии среди них клеток с морфологией опухолевых клеток при ЛКМЗ [14], однако для выработки соответствующих критериев необходимо проведение дополнительных исследований.

Для пациентов с ЛКМЗ и ЛКМЗС с помощью клеточного биочипа было проведено определение иммунофенотипа и клональности (каппа/лямбда) опухолевых клеток как набора поверхностных антигенов, с антителами которых связываются клетки соответствующих лимфом. Полученные результаты в сравнении с данными проточной цитометрии представлены в таблице. Данные, полученные на клеточном биочипе, совпадали с данными цитометра в 100% случаев для маркеров CD19, CD20, CD22, CD23 и экспрессии легких цепей иммуноглобулинов; не совпали в 1 случае для маркеров CD5 и CD25; данные для CD11c и CD200 не совпали ни у одного из 3 пациентов. Несовпадение экспрессии маркеров может быть объяснено, во-первых, пониженной экспрессией этого маркера на поверхности опухолевых клеток, что приводит к недостаточно прочному связыванию данных клеток с соответствующим анти-CDx на клеточном биочипе и удалению клеток при отмывке. Второй причиной может быть использование различных клонов антител на биочипе и на цитометре.

## Заключение

Определены критерии для дифференциальной диагностики В-ЛПЗ и Т-ЛПЗ при помощи

Сравнение экспрессии специфических антигенов и клональности опухолевых клеток у пациентов с лимфомой из клеток мантийной зоны и лимфомой из клеток маргинальной зоны селезенки, определенной на биочипе и цитометрически

Антиген	CD5	CD11c	CD19	CD20	CD22	CD23	CD25	CD200	κ/λ
Биочип	1(3)	0(3)	4(4)	4(4)	4(4)	4(4)	1(3)	0(3)	2(4)
Цитометр	2(3)	3(3)	4(4)	4(4)	4(4)	4(4)	2(3)	3(3)	2(4)
Соответствие, %	67	0	100	100	100	100	67	0	100

Данные приведены в формате А(Б), где А – число пациентов, у которых была обнаружена экспрессия данного антигена на опухолевых клетках при помощи цитометра (в строчке «цитометр») или опухолевая клетка в соответствующем анти-CDx пятне биочипа (в строчке «биочип»), Б – общее количество пациентов, у которых определяли экспрессию данного антигена обоими методами



клеточного биочипа. Показано, что пациенты с В-ЛПЗ статистически значимо отличаются низкой долей CD7<sup>+</sup> и высокой долей CD19<sup>+</sup> мононуклеаров периферической крови по сравнению с пациентами с Т-ЛПЗ и здоровыми донорами. Пациентов с В-ХЛЛ можно достоверно отличить

на клеточном биочипе от пациентов с другими В-ЛПЗ по большей доле CD5<sup>+</sup> клеток. Пациенты с Т-ЛПЗ статистически значимо отличаются на клеточном биочипе от здоровых доноров более низкой долей CD19<sup>+</sup> мононуклеарных клеток в периферической крови. 

## Дополнительная информация

### Финансирование

Исследование выполнено при финансовом обеспечении ФГБУ «НИИЦ центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева», ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского и ЦТП ФХФ РАН.

### Конфликт интересов

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

### Участие авторов

О.С. Федянина – выполнение анализов венозной крови здоровых доноров на клеточном биочипе, анализ результатов, статистическая обработка данных, написание текста; Ю.Ю. Чуксина – концепция и дизайн исследования, анализ полученных данных, выполнение иммунофенотипического исследования пациентов при помощи проточной цитометрии, написание текста; А.Н. Хмелевская – выполнение анализов

венозной крови пациентов на клеточном биочипе, редактирование рукописи; А.Н. Хвастунова – анализ результатов, подсчет плотности связывания клеток по клеточному биочипу здоровых доноров и пациентов при помощи программы ImageJ, редактирование рукописи; Ю.Н. Матвеев – выполнение анализов венозной крови пациентов на клеточном биочипе, редактирование рукописи; Е.В. Катаева – предоставление материала для исследований, редактирование рукописи; А.В. Филатов – разработка панели антител, редактирование рукописи; С.А. Кузнецова – концепция и дизайн исследования, выполнение анализов венозной крови пациентов на клеточном биочипе, анализ полученных данных, написание текста. Все авторы прочли и одобрили финальную версию статьи перед публикацией, согласны нести ответственность за все аспекты работы и гарантируют, что ими надлежащим образом были рассмотрены и решены вопросы, связанные с точностью и добросовестностью всех частей работы.

## Литература / References

1. Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer Statistics, 2021. *CA Cancer J Clin.* 2021;71(1): 7–33. doi: 10.3322/caac.21654.
2. Самойлова ОС. Современное лечение хронического лимфолейкоза в реальной клинической практике. Новые возможности и новые сложности. Современная онкология. 2016; 18 (5): 16–19. [Samoylova OS. [Current treatment of chronic lymphocytic leukemia. New opportunities and new difficulties]. *Journal of Modern Oncology.* 2016;18(5):16–19.]
3. Khvastunova AN, Kuznetsova SA, Al-Radi LS, Vylegzhanina AV, Zakirova AO, Fedyanina OS, Filatov AV, Vorobjev IA, Ataullakhanov F. Anti-CD antibody microarray for human leukocyte morphology examination allows analyzing rare cell populations and suggesting preliminary diagnosis in leukemia. *Sci Rep.* 2015;5:12573. doi: 10.1038/srep12573.
4. Хвастунова АН, Аль-Ради ЛС, Капранов НМ, Федянина ОС, Горгидзе ЛА, Луговская СА, Наумова ЕВ, Джулакян УЛ, Филатов АВ, Атауллаханов ФИ, Кузнецова СА. Использование клеточного биочипа в диагностике волосатоклеточного лейкоза. *Онкогематология.* 2015;10(1):37–45. doi: 10.17650/1818-8346-2015-1-37-45. [Khvastunova AN, Al-Radi LS, Kapranov NM, Fedyanina OS, Gorgidze LA, Lugovskaya SA, Naumova EV, Dzhulakyan UL, Filatov AV, Ataullakhanov FI, Kuznetsova SA. [Cell-binding microarray application in diagnosis of hairy cell leukemia]. *Oncohematology.* 2015;10(1):37–45. Russian. doi: 10.17650/1818-8346-2015-1-37-45.]
5. de Weerd Iris, Hofland T, de Boer R, Dobber JA, Dubois J, van Nieuwenhuize D, Mobasher M, de Boer F, Hoogendoorn M, Velders GA, van der Klift M, Remmerswaal EBM, Bemelman FJ, Niemann CU, Kersting S, Levin MD, Eldering E, Tonino SH, Kater AP. Distinct immune composition in lymph node and peripheral blood of CLL patients is reshaped during venetoclax treatment. *Blood Adv.* 2019;3(17):2642–2652. doi: 10.1182/bloodadvances.2019000360.
6. Gorczyca W, Weisberger J, Liu Z, Tsang P, Hussein M, Wu CD, Dong H, Wong JYL, Tugulea S, Dee S, Melamed MR, Darzynkiewicz Z. An approach to diagnosis of T-cell lymphoproliferative disorders by flow cytometry. *Cytometry.* 2002;50(3):177–190. doi: 10.1002/cyto.10003.
7. Kaleem Z, White G, Zutter MM. Aberrant expression of T-cell-associated antigens on B-cell non-Hodgkin lymphomas. *Am J Clin Pathol.* 2001;115(3):396–403. doi: 10.1309/v8y9-8pp4-b4te-9x6j.
8. Kingma DW, Imus P, Xie XY, Jasper G, Sorbara L, Stewart C, Stetler-Stevenson M. CD2 is expressed by a subpopulation of normal B cells and is frequently present in mature B-cell neoplasms. *Cytometry.* 2002;50(5):243–248. doi: 10.1002/cyto.10131.
9. Федянина ОС, Задорожная АЕ, Хвастунова АН, Кольцова ЕМ, Балашова ЕН, Тимофеева ЛА, Караваева АЛ, Шаманова МБ, Волков СН, Бузова ОС, Дашкевич НМ, Филатов АВ, Кузнецова СА. Исследование клеточного состава и морфологии лейкоцитов доношенных и недоношенных новорожденных при помощи клеточного биочипа. *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии.* 2018;17(4):11–16. doi: 10.24287/1726-1708-2018-17-4-11-16.
10. Fedyanina OS, Zadorozhnaya AE, Khvastunova AN, Koltsova EM, Balashova EN, Timofeeva LA, Karavaeva AL, Shamanova MB, Volkov SN, Burova OS, Dashkevich NM, Filatov AV, Kuznetsova SA. [Leukocyte subgroup distribution and morphology in blood of premature and full-term newborn babies studied by the cell microarray]. *Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology.* 2018;17(4):11–16. Russian. doi: 10.24287/1726-1708-2018-17-4-11-16.]
10. D'Areola G, Musto P, Cascavilla N, Dell'Olio M, Di Renzo N, Carotenuto M. Quantitative flow cytometry for the differential diagnosis of leukemic B-cell chronic lymphoproliferative disorders. *Am J Hematol.* 2000;64(4):275–281. doi: 10.1002/1096-8652(200008)64:4<275::aid-ajh7>3.0.co;2-y.
11. Mahe E, Pugh T, Kamel-Reid S. T cell clonality assessment: past, present and future. *J Clin Pathol.* 2018;71(3):195–200. doi: 10.1136/jclinpath-2017-204761.
12. Kipps TJ, Stevenson FK, Wu CJ, Croce CM, Packham G, Wierda WG, O'Brien S, Gribben J, Rai K. Chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Rev Dis Primers.* 2017;3:16096. doi: 10.1038/nrdp.2016.96.
13. Chiorazzi N, Chen SS, Rai KR. Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2021;11(2):a035220. doi: 10.1101/cshperspect.a035220.
14. Debord C, Wuillème S, Eveillard M, Theisen O, Godon C, Le Bris Y, Béné MC. Flow cytometry in the diagnosis of mature B-cell lymphoproliferative disorders. *Int J Lab Hematol.* 2020;42(S1): 113–120. doi: 10.1111/ijlh.13170.



## Diagnostic criteria of lymphoproliferative diseases from the peripheral blood samples using a cell biochip

O.S. Fedyanina<sup>1,2</sup> • Yu.Yu. Chuksina<sup>3</sup> • A.N. Khmelevskaya<sup>3</sup> • A.N. Khvastunova<sup>2</sup> • Yu.N. Matveev<sup>3</sup> • E.V. Kataeva<sup>3</sup> • A.V. Filatov<sup>4</sup> • S.A. Kuznetsova<sup>1,2</sup>

**Background:** At present, the diagnosis of lymphoproliferative disorders is based on the combination of blood or bone marrow smear morphology and immunophenotyping by flow cytometry. Immunophenotypic testing by flow cytometry technique is available only in big medical centers, which is not always convenient for a patient. Therefore, development of an available method for preliminary diagnosis of lymphoproliferative diseases not requiring special equipment seems relevant.

**Materials and methods:** Peripheral blood mononuclear cells from 17 patients admitted to the hospital with suspicion of a lymphoproliferative disorder, and 17 healthy donors were studied on a cell biochip for determination of proportions of cells positive for various surface CD antigens. The diagnosis was verified by flow cytometry.

**Results:** Compared to healthy controls and patients with T-cell lymphoproliferative disorders (TCLPD), the patients with B-cell lymphoproliferative disorders (BCLPD) had significantly lower proportion of CD7<sup>+</sup> cells (medians, 7% and 73% respectively,  $p=2 \times 10^{-6}$  for comparison with healthy controls; median 7% and 93% for comparison with TCLPD,  $p=0.032$ ). In addition, the patients with BCLPD had higher proportion of peripheral CD19<sup>+</sup> mononuclear cells, compared to that in the patients with TCLPD and healthy donors (medians 84% and 13% for comparison between BCLPD and healthy control,  $p=2 \times 10^{-5}$ ; 84% and 3% for comparison of BCLPD and TCLPD,  $p=0.033$ ). The

patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia had significantly higher CD5<sup>+</sup> cells in the cell biochip compared to the patients with other BCLPD (medians 72% and 9%,  $p=0.024$ ). The patients with TCLPD had significantly lower proportion of CD19<sup>+</sup> cells than the healthy controls (medians, 3% and 13%, respectively,  $p=0.042$ ).

**Conclusion:** The study has demonstrated the potential to use the previously developed cell biochip for diagnosis of lymphoproliferative diseases. The biochip makes it possible to sort out white blood cells according to their surface differentiation antigen for their further morphological analysis. The cell biochip allows for the differential diagnosis between BCLPD and TCLPD and determination the lymphocyte clones based on the expression of immunoglobulin light chains.

**Key words:** lymphoproliferative diseases, leukemia, lymphoma, B-cell chronic lymphocytic leukemia, cell biochip

**For citation:** Fedyanina OS, Chuksina YuYu, Khmelevskaya AN, Khvastunova AN, Matveev YuN, Kataeva EV, Filatov AV, Kuznetsova SA. Diagnostic criteria of lymphoproliferative diseases from the peripheral blood samples using a cell biochip. *Almanac of Clinical Medicine*. 2021;49(6):405–411. doi: 10.18786/2072-0505-2021-49-053.

Received 21 May 2021; revised 15 November 2021; accepted 17 November 2021; published online 24 November 2021

### Funding

The study was performed with financial support from Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Moscow Regional Research and Clinical Institute (MONIKI) and Center for Theoretical Problems of Physical and Chemical Pharmacology.

### Conflict of interests

The authors declare no obvious and potential conflicts of interests associated with the manuscript.

### Authors' contributions

O.S. Fedyanina, analysis of venous blood samples from the healthy control with the cell biochip, analysis of the results, statistical analysis, text writing; Yu.Yu. Chuksina, the study concept and design, analysis of the study data, immunophenotypic testing by flow cytometry, text writing; A.N. Khmelevskaya, analysis of venous blood samples from the patients with the cell biochip, editing of the manuscript; A.N. Khvastunova, analysis of the results, calculation of the cell binding density within the cell biochip for the healthy donors and patients with the ImageJ software, editing of the manuscript; Yu.N. Matveev, analysis of venous blood samples from the patients with the cell biochip, editing of the manuscript; E.V. Kataeva, data collection, text editing; A.V. Filatov, preparation of the antibody panel, editing of the manuscript; S.A. Kuznetsova, the study concept and design, analysis of venous blood samples from the patients with the cell biochip, data analysis, text writing. All the authors have read and approved the final version of the manuscript before submission, agreed to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work have been appropriately investigated and resolved.

**Olga S. Fedyanina** – PhD (in Biol.), Senior Research Fellow, Engineering Department<sup>1</sup>; Leading Research Fellow, Laboratory of Biophysics<sup>2</sup>; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7131-8006>

**Yuliya Yu. Chuksina** – MD, PhD, Senior Research Fellow, Laboratory of Biomedical Research Methods<sup>2</sup>; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4744-347X>

**Anna N. Khmelevskaya** – Junior Research Fellow, Laboratory of Biomedical Research Methods<sup>3</sup>

**Alina N. Khvastunova** – PhD (in Biol.), Research Fellow, Laboratory of Biophysics<sup>2</sup>; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7117-0168>

**Yuriy N. Matveev** – Senior Technician, Laboratory of Biomedical Research Methods<sup>3</sup>

**Elena V. Kataeva** – MD, PhD, Senior Research Fellow, Department of Clinical Hematology and Immunotherapy<sup>3</sup>; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2650-7646>

**Alexandr V. Filatov** – Doctor of Biol. Sci., Professor, Head of Laboratory of Immunochemistry<sup>4</sup>; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6460-9427>

**Sofya A. Kuznetsova** – PhD (in Phys. and Math.), Head of Engineering Department<sup>1</sup>; Leading Research Fellow, Laboratory of Biophysics<sup>2</sup>; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5946-0026>

✉ 1 Samory Mashela ul., Moscow, 117198, Russian Federation. Tel.: +7 (917) 508 45 50. E-mail: [kuznetsova.sonya@gmail.com](mailto:kuznetsova.sonya@gmail.com)

<sup>1</sup>Center for Theoretical Problems of Physical and Chemical Pharmacology, Russian Academy of Sciences; 30 Srednyaya Kalitnikovskaya ul., Moscow, 109029, Russian Federation

<sup>2</sup>Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology; 1 Samory Mashela ul., Moscow, 117198, Russian Federation

<sup>3</sup>Moscow Regional Research and Clinical Institute (MONIKI); 61/2 Shchepkina ul., Moscow, 129110, Russian Federation

<sup>4</sup>National Research Center Institute of Immunology of the Federal Medical-Biological Agency of Russia; 24 Kashirskoe shosse, Moscow, 115522, Russian Federation