

ИММУНОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2015

УДК 616-006.44-078.33

Чибисова О. Н., Бурцев Д. В., Галстян К. М., Луговская Г. И.

СОЧЕТАНИЕ ЭКСПРЕССИИ МАРКЕРОВ CR1 И CR2 (CD35/CD21) В ДИАГНОСТИКЕ В-КЛЕТОЧНЫХ ЛИМФОПРОЛИФЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

МЗРО ГАУ «Областной консультативно-диагностический центр», 344010, г. Ростов-на-Дону

Проведено исследование частоты экспрессии антигенов CD35 и CD21 в норме и при различных формах В-клеточных лимфопролиферативных заболеваний (В-ЛПЗ). Сопоставлен уровень средней интенсивности флюоресценции антигенов CD35, CD21 и CD200 для разных групп больных В-клеточными В-ЛПЗ. Выявленные закономерности экспрессии антигенов CD35 и CD21 при В-ЛПЗ позволяют рассматривать экспрессию данных маркеров как дифференциально-диагностический признак.

Ключевые слова: В-клеточные лимфопролиферативные заболевания; экспрессия антигенов CD35 и CD21; дифференциальная диагностика.

Chibisova O.N., Burtsev D.V., Galstian K.M., Lugovskaia G.I.

THE COMBINATION OF EXPRESSION OF MARKERS CR1 AND CR2 (CD35/CD21) IN DIAGNOSTIC OF B-CELL LYMPHOPROLIFERATIVE DISEASES

The oblast counseling diagnostic center, 344010 Rostov-on-Don, Russia

The study was carried out to analyze rate of expression of antigens CD35 and CD21 in norm and under different forms of B-cell lymphoproliferative diseases. The level of average intensity of fluorescence of antigens CD35, CD21 and CD200 is compared for different groups of patients with B-cell lymphoproliferative diseases. The established patterns of expression of antigens CD35 and CD21 under B-cell lymphoproliferative diseases permit considering expression of the given markers as a characteristic of differential diagnostic.

Key words: B-cell lymphoproliferative disease; expression; gene CD35 and CD21; differential diagnostic.

В настоящее время установлены основные иммунофенотипические характеристики опухолевых клеток при различных вариантах В-клеточных лимфопролиферативных заболеваниях (В-ЛПЗ). Однако нередко иммунологический фенотип опухолевых В-лимфоцитов не соответствует его классической характеристике, что затрудняет интерпретацию полученных результатов. Все это указывает на необходимость поиска новых маркеров в дифференциальной диагностике В-ЛПЗ. В последние годы появились данные об использовании антигенов CD35 и CD21 как дополнительных маркеров в дифференциально-диагностической панели типирования В-ЛПЗ [1, 2, 5].

CD35 (35–250 кД) – одноцепочечный гликопротеин клеточной поверхности, для которого известны четыре аллотипа (А, В, С, D); рецептор комплемента C3b/C4b (CR1). В норме экспрессируется эритроидными клетками, нейтрофилами, эозинофилами, базофилами, моноцитами, В-клетками и 10–15% Т-лимфоцитов. CD35 часто экспрессируется при остром миелоидном лейкозе, может экспрессироваться на опухолевых тучных клетках, экспрессируется при неходжкинской лимфоме, но обычно не экспрессируется опухолевыми клетками при хроническом лимфоцитарном лейкозе [5].

CD21 (145 кД) – гликопротеин клеточной поверхности; часть большого комплекса передачи сигнала, также содержащего CD19 и CD81; рецептор комплемента CR2 или C3dR,

связывающий C3d, C3dg и iC3b; рецептор вируса Эпштейна–Барр (EBV); экспрессируется на субпопуляции нормальных В-клеток, в том числе лимфоцитах мантийной и маргинальной зоны фолликула. CD21 экспрессируется на опухолевых клетках в большинстве случаев хронического лимфоцитарного лейкоза и 50% случаев неходжкинской В-клеточной лимфомы, однако экспрессия при хроническом лимфоцитарном лейкозе слабее, чем на нормальных В-клетках; слабо экспрессируется на ворсинчатых клетках [5].

Однако в связи с малочисленными исследованиями экспрессия опухолевыми клетками антигенов CD35 и CD21 при различных формах В-ЛПЗ остается недостаточно хорошо изученной.

Целью настоящего исследования стало изучение диагностического значения сочетания экспрессии антигенов CD35 и CD21 при В-ЛПЗ.

Материалы и методы. Провели иммунофенотипирование лимфоцитов крови у 54 пациентов в возрасте от 40 до 82 лет с В-ЛПЗ, в том числе у 17 с В-ХЛЛ, у 8 с волосатоклеточным лейкозом (ВКЛ), у 10 лимфомой из клеток зоны мантии (ЛКЗМ). Контрольную группу составили 10 практически здоровых лиц. Опухолевые клетки пациентов с В-ХЛЛ имели классический иммунофенотип: CD19⁺, CD20⁺dim, CD22⁺dim, CD5⁺, CD23⁺, CD43⁺, CD10⁻ с рестрикцией по легким цепям κ- или λ-типа. Иммунологический фенотип опухолевых клеток ВКЛ характеризовался экспрессией CD19⁺, CD20⁺⁺high, CD22⁺⁺high, CD5⁺, CD103⁺, CD11c⁺⁺, CD25⁺, CD43⁻, κ- или λ-тип. Диагноз лимфомы из клеток зоны мантии подтвержден наличием экспрессии циклина D1, у 2 пациентов – наличием транслокации t(11; 14). Фенотип опухолевых клеток ЛКЗМ соответствовал CD19⁺, CD20⁺high, CD22⁺high, CD5⁺,

Для корреспонденции:

Чибисова Ольга Николаевна, науч. сотр.

Адрес: 344010, Ростов-на-Дону, ул. Пушкинская, 127

E-mail: chibisova.okds@gmail.ru

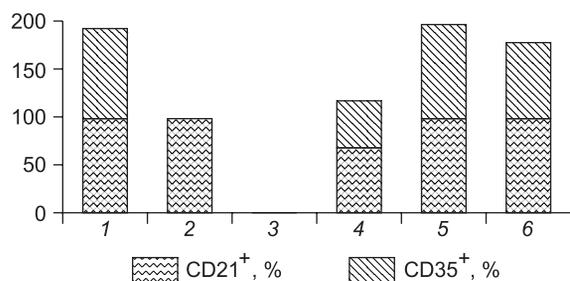


Рис. 1. Частота (в %) экспрессии антигенов CD35 и CD21 в норме и у больных В-ЛПЗ.

1 – норма; 2 – В-ХЛА; 3 – ВКЛ; 4 – АМЗС; 5 – CD23-отрицательная ЛКЗМ; 6 – CD23-положительная ЛКЗМ.

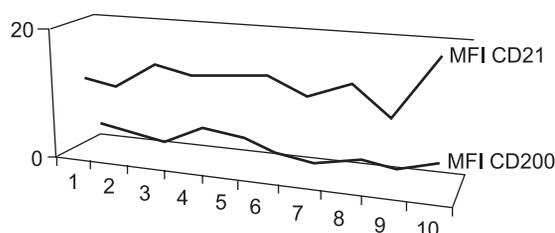


Рис. 2. Зависимость MFI антигенов CD21 и CD200 в контрольной группе.

Здесь и на рис. 3, 4: по оси абсцисс – число обследованных лиц; по оси ординат – уровень MFI (в усл. ед).

CD23⁺-, CD10⁻, κ- или λ-тип. Иммунофенотип опухолевых В-клеток ЛМЗС характеризовался CD19⁺, CD5⁺, CD20⁺high, CD22⁺high, CD43⁺, CD23⁺-, CD10⁻, κ- или λ-тип.

Основная панель для диагностики и дифференциальной диагностики вышеперечисленных В-ЛПЗ включала следующие моноклональные антитела (МКА): Anti-CD45-PerCP (Clone 2D1; BD Pharmingen), Anti-CD5-APC (Clone L17F12; BD Pharmingen), Anti-CD43-FITC (Clone IG10; BD Pharmingen), Anti-CD22-PE (Clone S-HCL-1; BD Pharmingen), Anti-CD23-PE (Clone EBVCS-5; BD Pharmingen), Anti-CD19-FITC (Clone SJ25C1; BD Pharmingen), Anti-CD38-PE (Clone HB7; BD Pharmingen), Anti-CD103-PE (Clone Ber-ACT8; BD Pharmingen), Anti-CD11c-APC (Clone S-HCL-3; BD Pharmingen), Anti-CD25-PE (Clone 2A3; BD Pharmingen), Anti-CD10-PE (Clone H110a; BD Pharmingen), Anti-κ-FITC/λ-PE/CD 19-PerCP (BD Pharmingen).

В качестве дополнительных маркеров в панель включили МКА: Anti-CD35-FITC (Clone E11; BD Pharmingen), Anti-CD21-PE (Clone B-1y4; BD Pharmingen), Anti-CD200-PE (Clone MCR OX-104; BD Pharmingen).

Исследование проводили на проточном цитофлуориметре FACSCanto (Becton Dickinson – BD, США) с использованием программного обеспечения FACSDiva (BD). Первичное иммунофенотипирование осуществляли с применением стандартной методики пробоподготовки. Критерием пози-

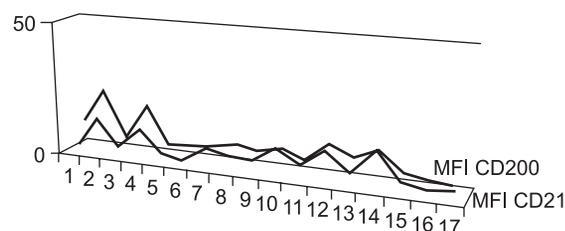


Рис. 3. Зависимость MFI антигенов CD21 и CD200 у больных В-ХЛЛ.

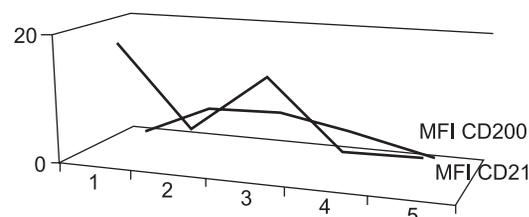


Рис. 4. Зависимость MFI антигенов CD21 и CD200 у больных CD23-положительной ЛКЗМ.

тивности считали наличие экспрессии маркера на поверхности более чем 20% опухолевых клеток.

Результаты и обсуждение. В результате анализа установили экспрессию антигенов CD21 и CD35 практически на всех В-лимфоцитах у здоровых лиц контрольной группы (рис. 1).

Среди больных В-ХЛЛ экспрессию антигена CD21 выявили у 100%, а экспрессия антигена CD35 отсутствовала. У 100% пациентов экспрессию маркеров CD35/CD21 наблюдали при ЛКМЗ с типичным иммунофенотипом, при этом опухолевые клетки атипичной CD23-положительной лимфомы мантийной зоны экспрессировали антиген CD35 слабее (80%). Наиболее низкую и гетерогенную экспрессию маркеров CD35/CD21 по сравнению с таковой в контрольной группе и у больных ЛКМЗ наблюдали при ЛМЗС (CD35 экспрессировался в 50%, а CD21 – в 70%). У пациентов с ВКЛ экспрессия данных антигенов полностью отсутствовала.

Результаты сравнительного анализа значений средней интенсивности флуоресценции (MFI) маркеров CD35/CD21 при различных формах В-ЛПЗ показали, что плотность экспрессии антигена CD21 во всех группах больных оказалась достоверно ниже, чем в контрольной группе практически здоровых лиц ($p < 0,05$) (см. таблицу), что согласуется с данными литературы [1, 2, 5].

При ЛКЗМ и ЛМЗС также выявляли более низкий уровень MFI антигена CD35 по сравнению с таковым в контрольной группе, но не достоверно ($p > 0,05$).

Следует отметить, что при сопоставлении уровня MFI антигена CD21 и антигена CD200 (недавно описанного как ХЛЛ-рестриктированная молекула [6]) в разных группах больных В-ЛПЗ выявляли прямую корреляционную зависимость экспрессии данных антигенов у пациентов с В-ХЛЛ

Сравнительный анализ значений MFI антигенов CD21, CD35 и CD200 в разных группах больных В-ЛПЗ

MFI антигенов, усл. ед.	Контроль (n = 10)	Больные В-ЛПЗ				
		В-ХЛЛ (n = 17)	ВКЛ (n = 8)	ЛМЗС (n = 10)	CD23 ⁺ ЛКЗМ (n = 4)	CD23 ⁺ ЛКЗМ (n = 5)
CD21	13,55 ± 2,03	5,67 ± 2,52*	–	5,30 ± 2,91*	6,15 ± 0,67*	8,98 ± 0,65*
CD35	4,10 ± 0,78	–	–	2,37 ± 0,47	2,54 ± 0,47	2,95 ± 1,91
CD200	2,62 ± 0,93	7,97 ± 2,04*	9,45 ± 2,35*	1,92 ± 1,1	–	4,23 ± 2,02

Примечание. * $p < 0,05$ – по сравнению с показателями в контрольной группе.

(рис. 2–4). В контрольной группе практически здоровых лиц и у больных CD23-позитивной лимфомой мантийной зоны данная зависимость отсутствовала.

Выводы. 1. Использование сочетания маркеров CD35/CD21 в диагностической панели цитофлуориметрического анализа В-ЛПЗ позволяет не только получить дополнительную информацию об иммунологической характеристике опухолевых клеток, но и рассматривать экспрессию данных антигенов как дифференциально-диагностический признак.

2. Установлена прямая корреляционная зависимость плотности экспрессии антигенов CD21 и CD200 у больных В-ХЛЛ.

3. Более низкая частота экспрессии маркера CD35 и наличие экспрессии антигена CD200 при атипичной CD23-позитивной ЛКЗМ по сравнению с таковыми у больных CD23-отрицательной ЛКЗМ указывают на необходимость дальнейшего изучения патогенеза данной лимфомы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Асатуров И. А. Иммунофенотипирование в диагностике хронических лимфопролиферативных заболеваний: Дис. ... канд. мед. наук. М.; 1997.
2. Волкова М. А., ред. Клиническая онкогематология: Руководство для врачей. 2-е изд. М.: ОАО «Издательство «Медицина»; 2007.
3. Луговская С. А., Морозова В. Т., Почтарь М. Е., Долгов В. В. Лабораторная гематология. Тверь: «Триада»; 2006.
4. Волкова М. А., ред. Редкие гематологические болезни и синдромы. М.: Практическая медицина; 2011.
5. Бэйн Б. Дж., Гупта Р. Справочник гематолога. А–Z: под ред. О. А. Рукавицына. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний; 2010.
6. Gambell P., Cargo C., Nguyen V et al. CD200 expression using flow cytometry in B-cell lymphoproliferative diseases. *Int. J. Lab. Hematol.* 2011; 33(Suppl. 1): 51–2.

REFERENCES

1. Astsaturov I. A. Immunophenotyping in the Diagnosis of Chronic Lymphoproliferative Diseases: Diss. Moscow; 1991. (in Russian)
2. Volkova M. A., ed. Clinical Oncohaematology: Guide for Doctors. 2-nd ed. Moscow: "Izdatel'stvo "Meditsina""; 2007. (in Russian)
3. Lugovskaya S. A., Morozova V. T., Pochtar' M. E., Dolgov V. V. Laboratory Hematology [Laboratornaya gematologiya]. Tver': Triada; 2006. (in Russian)
4. Volkova M. A., ed. Rare Hematologic Diseases and Syndromes. Moscow: Prakticheskaya meditsina. 2011. (in Russian)
5. Beyn B. Dzh., Gupta R. Handbook of Hematologist. A-Z: ed. O. A. Rukavitsyn. Moscow: BINOM. Laboratoriya znaniy; 2010. (in Russian)
6. Gambell P., Cargo C., Nguyen V et al. CD200 expression using flow cytometry in B-cell lymphoproliferative diseases. *Int. J. Lab. Hematol.* 2011; 33(Suppl. 1): 51–2.

Поступила 11.08.14

Received 11.08.14

ОБЩЕКЛИНИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2015

УДК 612.616.08

Татару Д. А.^{1,2}, Маркова Е. В.¹, Осадчук Л. В.², Шеина Ю. И.³, Светлаков А. В.¹

ОПТИМАЛЬНЫЕ УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ СПЕРМАТОЗОИДОВ ДЛЯ АНАЛИЗА ФРАГМЕНТАЦИИ ДНК

¹ООО «Красноярский центр репродуктивной медицины», Россия, 660037, г. Красноярск; ²ФГБУН Институт цитологии и генетики СО РАН, Россия, 630090, г. Новосибирск; ³ООО «Новосибирский центр репродуктивной медицины», Россия, 630037, г. Новосибирск

Исследование уровня фрагментации ДНК сперматозоидов методом проточной цитометрии для оценки мужской фертильности все чаще начинает применяться в клинической диагностике, однако создание оптимального протокола хранения и подготовки сперматозоидов для анализа до сих пор находится на стадии экспериментальной разработки. Цель исследования – изучить влияние различных условий подготовки эякулята для адекватной оценки индекса фрагментации ДНК (ИФД) сперматозоидов методом SCSA (sperm chromatin structure assay). У 20 пациентов Красноярского центра репродуктивной медицины оценивали ИФД методом SCSA в свежем нативном эякуляте и после хранения сперматозоидов при различной температуре (37, 25, 4 °С) и длительности (1–2 и 1–3 сут) и условий хранения (при -20 или -70 °С) замороженных сперматозоидов (в виде нативного эякулята или в TNE-буфере). Показано, что ИФД существенно не меняется в эякуляте, хранившемся при 4 °С в течение 48 ч. При хранении эякулята при (25 или 37 °С ИФД значительно увеличивается уже после 1-х суток, а инкубация эякулята при 37 °С приводит к повышению ИФД уже после 1-го часа. Выявлены индивидуальные различия по степени увеличения ИФД под воздействием изучаемых температур инкубации эякулята. Хранение сперматозоидов при температуре 20 или 70 °С в нативном эякуляте либо в TNE-буфере не влияло на ИФД при измерении в течение 1–2 ч. Таким образом, хранение и транспортировка нативного эякулята при 4 °С в течение от 1 до 2 сут или в замороженном виде при температуре -20 или -70 °С могут быть рекомендованы для адекватной оценки уровня фрагментации ДНК сперматозоидов.

Ключевые слова: фрагментация ДНК сперматозоидов; мужская фертильность; хранения эякулята.

Для корреспонденции:

Татару Дарья Анатольевна, биолог-генетик, аспирант
Адрес: 660037, Красноярск, ул. Взлетная, 1/138
E-mail: tataru_dasha@inbox.ru