

## ЭКСПРЕССИЯ ЛЕГКИХ ЦЕПЕЙ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ В НОРМАЛЬНЫХ (РЕАКТИВНЫХ) И ОПУХОЛЕВЫХ В-КЛЕТКАХ

© О. А. Худолева,<sup>1</sup> И. А. Воробьев<sup>1, 2, \*</sup>

<sup>1</sup> Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского

<sup>2</sup> Биологический факультет Московского государственного университета  
им. М. В. Ломоносова, 119991;

\* электронный адрес: [ivorobjev@mail.ru](mailto:ivorobjev@mail.ru)

Предложен количественный метод определения уровня экспрессии легких цепей иммуноглобулинов (ЛЦ ИГ) с помощью проточной цитометрии и исследованы нарушения экспрессии легких цепей при различных В-клеточных опухолях. Средний уровень экспрессии лямбда-ЛЦ ИГ в 4 раза выше, чем уровень экспрессии каппа-ЛЦ ИГ. Уровень экспрессии поверхностных и цитоплазматических ЛЦ ИГ у разных людей варьирует в довольно широких пределах, но при этом существует положительная корреляция с высоким уровнем значимости между экспрессией каппа- и лямбда-изотипов ЛЦ ИГ, а также между экспрессией поверхностных и цитоплазматических форм каждого изотипа у одного и того же человека. В случае большинства В-клеточных неходжкинских лимфом корреляционные связи между уровнями поверхностных и цитоплазматических ЛЦ ИГ нарушаются. При хроническом лимфолейкозе (ХЛЛ) уровень ЛЦ ИГ резко снижен на поверхности клеток и в меньшей степени — в цитоплазме. При лимфоме из клеток маргинальной зоны уровень ЛЦ ИГ снижен на поверхности циркулирующих в крови клеток и в меньшей степени — в цитоплазме. При лимфоме из клеток мантийной зоны и диффузной В-крупноклеточной лимфоме (ДБККЛ) уровень ЛЦ ИГ на поверхности клеток и в цитоплазме соответствует норме, но в некоторых случаях ДБККЛ ЛЦ ИГ отсутствуют как на поверхности, так и в цитоплазме.

**Ключевые слова:** В-клетки, лимфомы, легкие цепи иммуноглобулинов, проточная цитометрия, экспрессия антигенов.

**Принятые сокращения:** ДБККЛ — диффузная В-крупноклеточная лимфома, ЛЦ ИГ — легкие цепи иммуноглобулинов, ХЛЛ — хронический В-клеточный лимфолейкоз, CD — кластеры дифференцировки (поверхностные маркеры лимфоцитов), PE — фикоэритрин, PE-Cy5 — конъюгат фикоэритрина с цианиновым 5.

Имунофенотипическая диагностика лимфом человека является важным элементом лабораторной диагностики. Во многих случаях благодаря способности лимфоцитов к рециркуляции через периферическую кровь она может производиться на образцах крови, что значительно упрощает процедуру взятия материала. Особенностью лимфом, затрудняющей диагностику, является тот факт, что в большинстве случаев опухолевые клетки не несут специфических опухолевых маркеров. Поэтому дифференциальная диагностика лимфом гистологическими и иммуногистохимическими методами может представлять значительные трудности, а диагностика методом проточной цитометрии проводится по aberrантному сочетанию нормальных маркеров, а также по наличию опухолевого клона, который может быть выделен из нормального поликлонального окружения. Поскольку В-клеточные лимфомы составляют большинство лимфатических опухолей (Muller-Hermelink et al., 2008), наибольший практический интерес представляет исследование особенностей опухолевых В-клеток. В-клетки, циркулирующие в нормальной крови, происходят из лимфоузлов и костного мозга. Они относятся к различным субпопуляциям, включающим в

себя незрелые промежуточные формы, «наивные» клетки, клетки памяти и плазмабласты (LeBien, Tedder, 2008; Perez-Andres et al., 2010). На поверхности всех В-клеток находятся иммуноглобулины класса G, которые входят в состав В-клеточного рецептора. Для В-клеток возможность идентификации опухоли по признаку «клональности» состоит в том, что в норме каждый клон зрелых В-клеток (а именно зрелые В-клетки являются предшественниками большинства лимфом) экспрессирует иммуноглобулины только одного класса и только с одним типом легких цепей иммуноглобулинов — каппа или лямбда. Поскольку в крови и лимфоидных органах присутствует множество клонов, для В-лимфоцитов человека, циркулирующих в крови, характерно определенное соотношение изотипов каппа- и лямбда-типов легких цепей, равное примерно 3 : 2 (Braylan et al., 1993; Maiese et al., 1995; Marti et al., 2005). Соответственно для возможности утверждения о наличии опухолевого клона необходимо, чтобы данное соотношение существенно отличалось от нормы. Принятым для целей диагностики критерием клональности, т. е. закономерного преобладания одного из вариантов легких цепей над другим в популя-

ции клеток, является сдвиг указанного соотношения свыше 3 : 1 в сторону каппа-варианта или менее 1 : 2 в сторону лямбда-варианта ЛЦ ИГ (Chizuka et al., 2002; Wayne, 2007).

Определение клональности, проводимое по экспрессии ЛЦ ИГ, используется в диагностике хронического лимфолейкоза (ХЛЛ), миеломной болезни и ряда неходжкинских В-клеточных лимфом (Picker et al., 1987; Filippi et al., 1991; Geary et al., 1993; Воробьев и др., 2005; Grier et al., 2012). Для выявления клональности методом проточной цитометрии используются флуоресцентно меченные антитела против каппа- и лямбда-изотипов легких цепей иммуноглобулинов. Наиболее распространенным сочетанием являются антитела, конъюгированные с ФИТЦ (FITC) для одного варианта ЛЦ ИГ и с фикоэритрином (PE) для другого варианта. Применяются как моноклональные, так и поликлональные антитела. Показано, что при исследовании опухолевых В-клеток лучшие результаты дает использование поликлональных кроличьих антител, так как моноклональные мышьиные антитела не всегда эффективно взаимодействуют с ЛЦ ИГ опухолевых клеток (Oertel et al., 1991; Agrawal et al., 1992; Fukushima et al., 1996).

Определение экспрессии ЛЦ ИГ В-клеток сопряжено с рядом проблем. Первая из них связана с использованием для стандартного подсчета популяций метода квадрантов (рис. 1), что требует наличия «компенсированных» данных для красителей с близкими спектрами флуоресценции, которыми являются ФИТЦ и фикоэритрин. Расчет компенсации флуоресцентных сигналов в проточной цитометрии осуществляют с помощью специальных частей (Shapiro, 2003), что в случае ЛЦ ИГ не всегда дает адекватные результаты.

Вторая проблема касается возможностей определения ЛЦ ИГ на поверхности опухолевых клеток. Дело в том, что в нормальных В-лимфоцитах молекулы иммуноглобулинов постоянно рециркулируют, при этом около 60 % их пула находится в цитоплазме в составе эндотозных везикул и лизосом, а 40 % — на поверхности клеток (Metzeau et al., 1984; Davidson et al., 1990). Поскольку интенсивностью контактов клеток с антигенами, возникает вопрос о том, каким будет соотношение уровня ЛЦ ИГ на поверхности и в цитоплазме опухолевых клеток с учетом того, что их взаимодействие с антигеном предполагается маловероятным. В частности, при ХЛЛ уровень поверхностной экспрессии ЛЦ ИГ часто бывает снижен (Muller-Hermelink et al., 2008), и определение клональности возможно только по наличию ЛЦ ИГ в цитоплазме опухолевых В-клеток.

В настоящей работе для оценки возможностей метода проточной цитометрии при определении клональности В-клеток с использованием стандартных проб мы провели комплексный сравнительный анализ экспрессии ЛЦ ИГ В-лимфоцитами больных с реактивными (неопухолевыми) лимфаденитами и различными В-клеточными лимфомами.

## Материал и методика

В работе использовали образцы крови и биопсийный материал из лимфоузлов, селезенки и костного мозга, полученный в 2004—2009 гг. от пациентов Гематологического научного центра со следующими диагнозами: хро-

нический лимфолейкоз (В-ХЛЛ), лимфома из клеток мантийной зоны, лимфома из клеток маргинальной зоны, диффузная В-крупноклеточная лимфома (ДБККЛ), реактивный лимфаденит. Все диагнозы подтверждали морфологическими, гистологическими и иммуногистохимическими исследованиями. Неопухолевую природу реактивного лимфаденита подтверждали наблюдениями за каждым пациентом не менее 6 мес после взятия пробы. Всего было исследовано 216 образцов, в том числе 15 неопухолевых образцов периферической крови и 25 неопухолевых образцов клеток из лимфоидных тканей; 28 образцов периферической крови и 25 образцов клеток из лимфоидных тканей у пациентов с диагнозом В-ХЛЛ; 25 образцов периферической крови и 21 образец клеток из лимфоидных тканей с диагнозом лимфома из клеток маргинальной зоны; 22 образца периферической крови и 18 образцов клеток из лимфоидных тканей с диагнозом лимфома из клеток мантийной зоны; 37 образцов клеток из лимфоидных тканей с диагнозом ДБККЛ.

**Подготовка проб.** Образцы периферической крови, собранные в пробирки с ЭДТА, обрабатывали в лизирующем растворе с ионами аммония согласно протоколу BD Biosciences, моноклеары из биопсийного материала получали с использованием специального гомогенизатора (Medimashine, BD Biosciences, США) и ресуспендировали в растворе Хенкса. Суспензии клеток окрашивали антителами и анализировали с использованием проточного цитометра FACSCalibur (BD Biosciences, США).

Для окраски поверхностных маркеров использовали прямые конъюгаты моноклональных антител с флуоресцентными красителями (BD Bioscience, США) в виде следующих трехцветных сочетаний (первая метка — FITC, вторая — PE и третья PE-Cy5): CD3-CD19-CD45, CD5-CD38-CD19, FMC7-CD25-CD20, CD10-CD23-CD19 и CD43-CD20-CD22. Для цитоплазматического окрашивания использовали следующие сочетания маркеров: Ki-67-CD79-CD3 и поликлональные антитела Каппа/Lambda. Для определения клональности использовали поликлональные антитела против Каппа (FITC)/Lambda (PE) и моноклональные антитела против CD19(PE-Cy5) (Dako, Дания). Трехцветную окраску на поверхностные и цитоплазматические маркеры производили согласно инструкции фирмы-производителя. Анализ данных проводили с помощью программ CellQuest (BD Bioscience, США) и FlowJo (TreeStar, Австралия).

Статистический анализ данных проводили с помощью программ MSEXcel, GraphPad (GraphPad Software Inc., США).

**Использованные реактивы:** моноклональные антитела против кластеров дифференцировки человека, конъюгированные с красителями, CD3-FITC, CD19-PE и CD45-PE-Cy5; CD5-FITC; CD38-PE; CD19-PE-Cy5; FMC-7-PE; CD25-FITC; CD20-PE-Cy5; CD10-FITC; CD23-PE; CD43-FITC; CD22-PE-Cy5; Ki-67-FITC; CD79a-PE; CD3-PE-Cy5 (Beckton-Dickenson, США); поликлональные антитела, конъюгированные с красителями Каппа-FITC/Lambda-PE (Dako, Дания).

## Результаты

Сравнение экспрессии поверхностных и цитоплазматических антигенов методом проточной цитометрии. Чтобы исключить ошибки в определении уровня цитоплазматических антигенов за

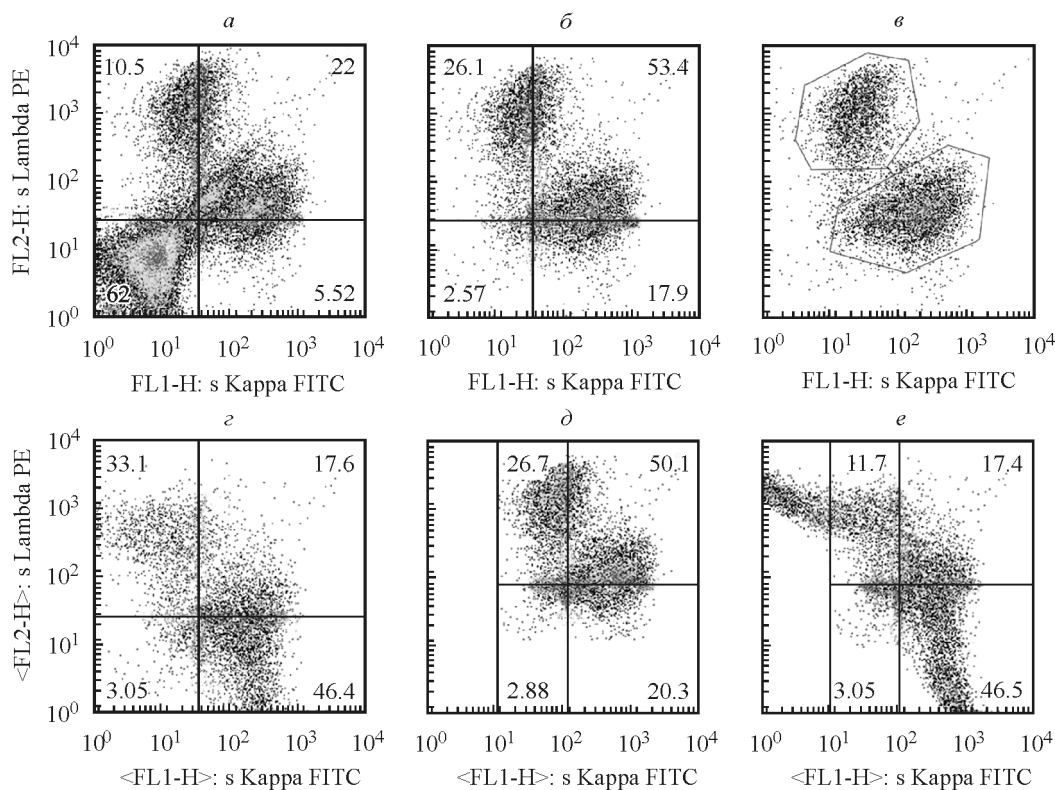


Рис. 1. Анализ данных об уровне экспрессии изотипов ЛЦ ИГ, выявляемых с помощью поликлональных антител.

*a* — исходная поточечная диаграмма; *b* — поточечная диаграмма, где предварительно выделены только клетки, положительные по CD19; *v* — выделение клеток, положительных по экспрессии каппа и лямбда ЛЦ ИГ с помощью полигонов; *z*–*e* — компенсация данных в биэкспоненциальной шкале, где *z* — исходные (некомпенсированные) данные, *d* — компенсированные данные, *e* — «перекомпенсированные» данные. Здесь и далее на всех двух-параметрических поточечных диаграммах по горизонтали и по вертикали отложена относительная интенсивность флуоресценции в соответствующем канале (Зурочка и др., 2014) (наименование канала и использованный маркер указаны в подписи к оси).

счет возможного вклада флуоресцентного сигнала от молекул антигена, расположенных на поверхности клетки, мы провели специальное исследование. Для идентификации антигенов в цитоплазме клетки предварительно фиксируют и пермеабелизируют наружную мембрану. При этом происходит потеря части антигенов, находящихся на поверхности клеток, однако этот процесс зависит от особенностей конкретного протокола, который может различаться в разных лабораториях.

Для сравнения были выбраны два антигена — антиген CD45, который обнаруживается почти исключительно на поверхности клеток, что доказывают результаты иммунохимического мечения (Рафаловская-Орловская и др., 2012), и антиген CD3, который встречается как на поверхности, так и в относительно большом количестве в цитоплазме (Воробьев и др., 2005). Окраску проводили одновременно по стандартному протоколу и после пермеабелизации клеток. Сравнительная интенсивность сигнала, определяемая при постоянных настройках прибора, составила  $0.113 \pm 0.064$  для CD45 и  $0.771 \pm 0.071$  для CD3 (указано среднее значение для 5 экспериментов). Та-

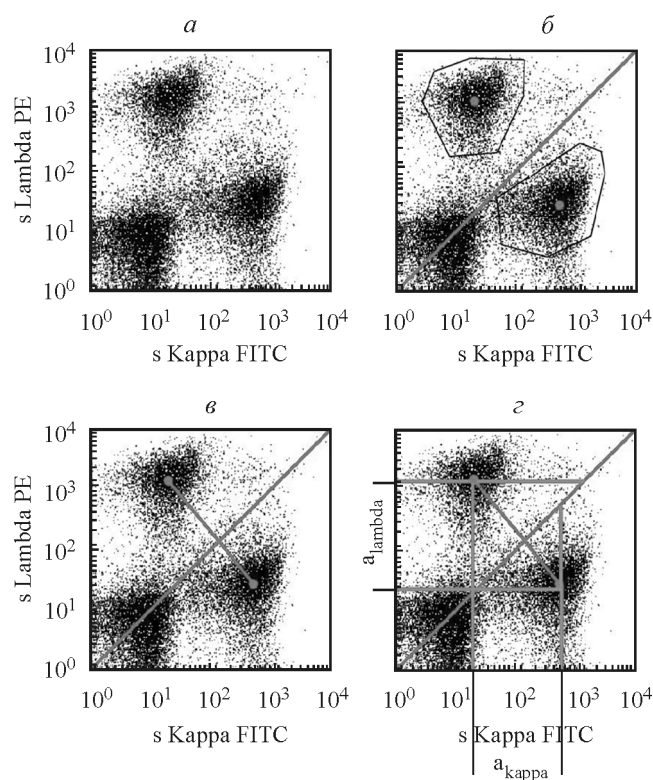


Рис. 2. Расчет уровней экспрессии изотипов ЛЦ ИГ.

*a* — исходная поточечная диаграмма (здесь и далее результаты представлены в логарифмической шкале); *b* — диагональ (серая линия) и серые точки — центры распределений для клеток, положительных по отдельным изотипам ЛЦ ИГ, которые находятся в соответствующих полигонах; *v* — перпендикуляры, опущенные из центров распределений на диагональ; *z* — проекции смещений на горизонтальную ось для каппа ( $a_{\text{каппа}}$ ), на вертикальную — для лямбда ( $a_{\text{лямбда}}$ ).

Таблица 1

**Коэффициенты корреляции между уровнями экспрессии каппа- и лямбда-изотипов ЛЦ ИГ**

Кровь		Лимфоидные органы	
поверхностное мечение	цитоплазматическое мечение	поверхностное мечение	цитоплазматическое мечение
0.96	0.90	0.89	0.91

Примечание. Коэффициенты корреляции рассчитывали по методу Пирсона.

ким образом, можно заключить, что уровень «цитоплазматической окраски» маркеров, накапливающихся в цитоплазме, на 85—90 % соответствует действительному.

Расчет уровней экспрессии легких цепей и иммуноглобулинов. При анализе уровня экспрессии

ЛЦ ИГ в В-клетках выяснилось, что данные, представленные в виде поточечных диаграмм, часто существенно отличаются от данных, полученных при окраске этих же клеток другими антителами. На графиках (рис. 1) результаты, полученные для легких цепей, выглядят недокомпенсированными по сравнению с данными об экспрессии других маркеров (например, CD3/CD19), полученными при тех же настройках прибора. Оказалось, что почти в половине случаев (17 из 40 исследованных проб) полная компенсация данных по ЛЦ ИГ невозможна даже с использованием биэкспоненциальной шкалы (Tung et al., 2004). При избыточной компенсации, когда часть значений оказывалась далеко в отрицательной области, другая их значительная часть все еще попадала во второй квадрант, т. е. соответствовала двойным позитивам (рис. 1, *з—е*). Достоверно отделить популяции каппа+ и лямбда+ клеток можно было, только выделяя их с помощью полигонов (рис. 1, *в*).

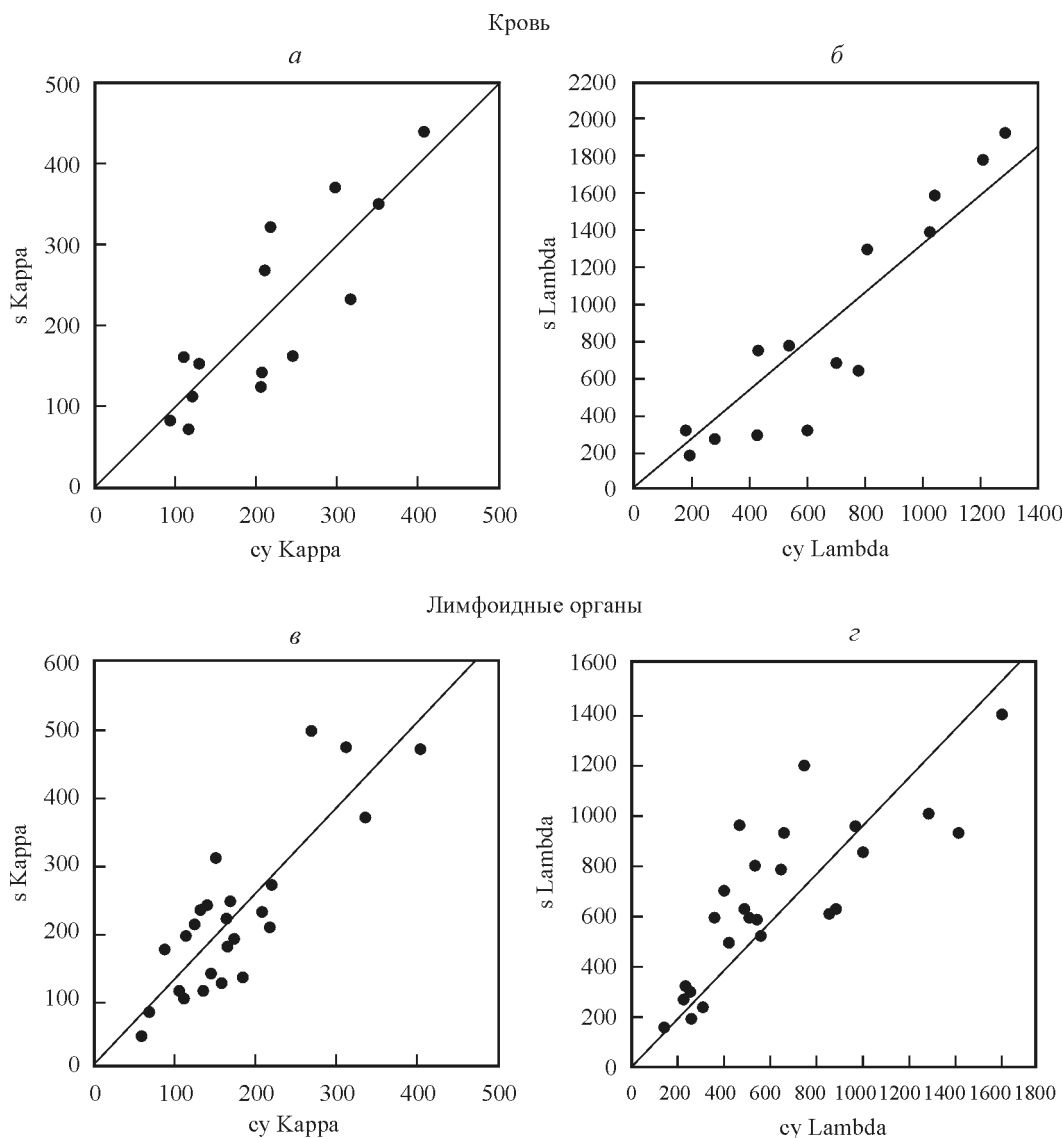


Рис. 3. Корреляционные связи между уровнями экспрессии изотипов ЛЦ ИГ на поверхности и в цитоплазме В-лимфоцитов периферической крови (*а, б*) и лимфоидных органов (*в, г*).

По горизонтали и по вертикали — интенсивность флуоресценции для соответствующего канала (в линейной шкале). Точки на графиках соответствуют средним значениям флуоресценции (mean fluorescent intensity, MFI) для каждого пациента. Соответствующие числовые данные приведены в табл. 2.

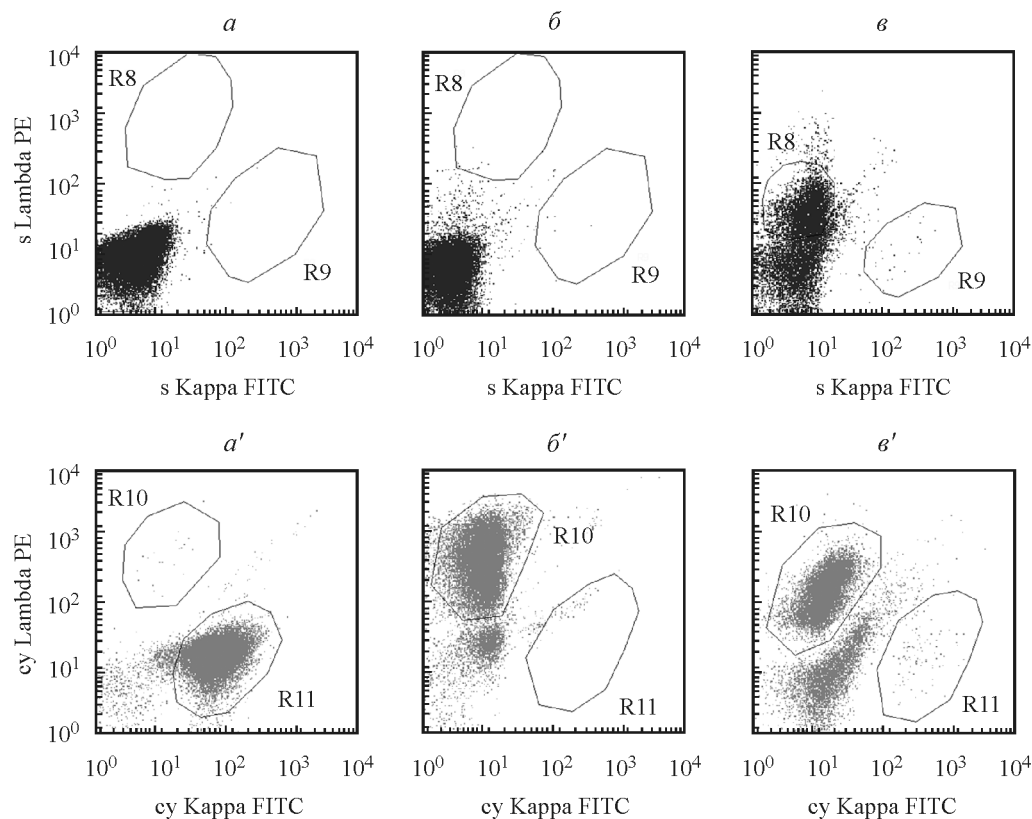


Рис. 4. Различные варианты соотношения экспрессии поверхностных (*a—в*) и цитоплазматических (*a'—в'*) ЛЦ ИГ у больших В-ХЛЛ (*a—в* — три разных пациента).

*a, б* — экспрессия поверхностных ЛЦ ИГ полностью отсутствует; *в, в'* — экспрессия поверхностных ЛЦ ИГ есть, но уровень экспрессии ЛЦ ИГ в цитоплазме выше.

Поэтому для оценки среднего уровня экспрессии ЛЦ ИГ нами предложена формула, не зависящая от компенсации. Поскольку иммуноглобулины могут неспецифически связываться с поверхностью клетки и степень этого связывания не зависит от типа легкой цепи, мы принимаем за нулевой уровень экспрессии случай, когда сигналы по двум осям (соответствующим каппа- и лямбда-легким цепям) примерно равны друг другу. Такая ситуация наблюдается, например, для моноцитов. Специфическая экспрессия одного из видов ЛЦ ИГ клеткой определяется по величине отклонения уровней экспрессии ЛЦ ИГ для данной клетки от диагонали, исходящей из начала графика ( $10^0$ ) и проходящей из его левого нижнего в правый верхний угол (рис. 2, *a, б*). Для популяций В-клеток определяли средний уровень этого отклонения в полигоне, соответствующем каждому типу ЛЦ ИГ (рис. 2, *в*). Поскольку рассматривали некомпенсированные данные, уровень экспрессии рассчитывали по формуле

$$a = \frac{|x - y|}{\sqrt{2}},$$

где *x* и *y* — средние значения уровней экспрессии каппа- и лямбда-вариантов ЛЦ ИГ для популяций В-клеток, выделяемых с помощью полигонов (рис. 2, *з*).

Экспрессия легких цепей иммуноглобулинов в неопухолевых (реактивных) В-клетках. В В-лимфоцитах уровни экспрессии поверхностных и цитоплазматических ЛЦ ИГ варьируют в широких пре-

делах, различаясь между отдельными пациентами в 5 раз. При этом у отдельного пациента поверхностные и цитоплазматические ЛЦ иммуноглобулина представлены в эквимоларных соотношениях в крови и в лимфоидных органах, хотя уровень экспрессии в лимфоидных органах немного выше (табл. 1). Уровни экспрессии каппа- и лямбда-изотипов ЛЦ ИГ у разных пациентов коррелируют между собой с очень высоким уровнем как в крови, так и в лимфоидных органах (рис. 3; табл. 1). Таким образом, данные по экспрессии ЛЦ ИГ позволяют предположить наличие на уровне организма системы регуляции как экспонирования ЛЦ ИГ на поверхности В-лимфоцитов, так и их рециклирования в этих клетках.

При использовании стандартных пар антител каппа-FITC/лямбда-PE средняя интенсивность флуоресценции лямбда-ЛЦ ИГ превышает средний уровень каппа-ЛЦ ИГ примерно в 4 раза. Чтобы проверить, действительно ли уровень экспрессии лямбда-ЛЦ ИГ превышает уровень экспрессии каппа ЛЦ в 2.5 раза для поверхностных антигенов и в 1.9 раза для цитоплазматических ЛЦ ИГ (*n* = 4, из них 2 образца крови и 2 образца лимфоузлов). При окраске лямбда-PE/каппа-APC соотношение уровней экспрессии составило  $1.36 \pm 0.24$  (*n* = 10, из них 8 образцов крови и 2 образца лимфоузлов). Таким образом, уровень экспрессии лямбда-изотипа ЛЦ ИГ в нормальных В-клетках действительно превышает уровень экспрессии каппа-изотипа ЛЦ ИГ (*P* < 0.05).

Таблица 2

## Уровни экспрессии ЛЦ ИГ в реактивных и опухолевых В-лимфоцитах

Нозологические единицы	Уровень экспрессии поверхностных ЛЦ ИГ, отн. ед.				Уровень экспрессии цитоплазматических ЛЦ ИГ, отн. ед.			
	кровь		лимфоидные органы (селезенка и лимфоузлы)		кровь		лимфоидные органы (селезенка и лимфоузлы)	
	каппа	лямбда	каппа	лямбда	каппа	лямбда	каппа	лямбда
Реактивные В-лимфоциты	164.8 ± 33.1	659.88 ± 141.9	178.4 ± 15.8	752.24 ± 63.9	161.8 ± 26.7	622.4 ± 85.8	162.3 ± 15.2	732.9 ± 79.0
ХЛЛ	38.7 ± 26.9 (28) <sup>a</sup>	26.4 ± 3.6 (15) <sup>a</sup>	23.8 ± 8.0 (20) <sup>a</sup>	100.19 ± 22.4 (13) <sup>a</sup>	60.8 ± 18.1 (28) <sup>a</sup>	96.9 ± 11.1 (19) <sup>a</sup>	71.8 ± 8.79 (19) <sup>a</sup>	203.31 ± 45.3 (14) <sup>a</sup>
Лимфома из клеток маргинальной зоны	74.0 ± 23.6 (25) <sup>a</sup>	99.9 ± 37.9 (7) <sup>a</sup>	106.6 ± 20.2 (21) <sup>b</sup>	610.08 ± 133.1 (16)	126.0 ± 20.8 (26)	521.4 ± 111.3 (8)	171.3 ± 35.7 (21)	595.6 ± 67.9 (18)
Лимфома из клеток маргинальной зоны	157.2 ± 72.9 (9)	584.7 ± 56.3 (13)	146.8 ± 9.39 (7)	736.5 ± 119.8 (11)	159.1 ± 38.7 (9)	438.6 ± 120.1 (13)	135.9 ± 19.4 (8)	561.4 ± 90.9 (12)
ДБККЛ	НД	НД	113.8 ± 23.2 (19) <sup>b</sup>	645.9 ± 222.1 (11)	НД	НД	143.9 ± 27.1 (19)	618.5 ± 144.2 (10)

Примечание. В скобках указано количество изученных образцов. <sup>a</sup> Отличия от контроля достоверны для  $P < 0.001$ , <sup>b</sup> для  $P < 0.05$ . НД — нет данных.

Экспрессия легких цепей иммуноглобулинов в опухолевых В-клетках. По сравнению с образцами реактивной ткани в опухолевых В-клетках происходят нарушения в экспрессии ЛЦ ИГ, характер которых зависит от нозологической формы. При В-ХЛЛ существенно снижен уровень экспрессии поверхностных и цитоплазматических ЛЦ ИГ, причем для поверхностных ЛЦ ИГ относительное снижение более существенно (табл. 2). Во многих случаях экспрессия ЛЦ ИГ детектируется только в цитоплазме (рис. 4, а, б).

При лимфоме из клеток маргинальной зоны в клетках периферической крови средний уровень поверхностных каппа- и лямбда-изотипов ЛЦ ИГ снижен по сравнению с контролем. Данное снижение особенно выражено для лямбда-изотипа ЛЦ ИГ. В клетках лимфоидных органов при данной нозологии существенных отличий от контроля нет. Уровень экспрессии цитоплазматических ЛЦ ИГ в опухолевых клетках лимфоузлов при лимфоме из клеток маргинальной зоны соответствует показателям реактивных клеток (табл. 2).

При лимфоме из клеток мантийной зоны уровни поверхностных и цитоплазматических ЛЦ ИГ в опухолевых клетках соответствуют показателям нормальных В-клеток как по величине, так и по соотношению экспрессии поверхностных и цитоплазматических антигенов (табл. 3), что резко отличает данную нозологическую форму от В-ХЛЛ.

При ДБККЛ в крови опухолевые клетки, как правило, не представлены, поэтому приводятся данные только по лимфоидным органам. В большинстве случаев ДБККЛ в клетках лимфоидных органов по сравнению с контролем существенных различий между уровнями экспрессии поверхностных и цитоплазматических ЛЦ ИГ не обнаружено (табл. 3). Однако среди исследованных больных было обнаружено 5 случаев (из 37) опухолей без экспрессии ЛЦ ИГ, причем отсутствовала экспрессия как поверхностных, так и цитоплазматических антигенов (рис. 5).

Для всех нозологических форм при сравнении поверхностных и цитоплазматических ЛЦ обнаруживается значительный разброс между пациентами, а уровень корреляции (определяемый с помощью коэффициента корреляции Спирмена, R) между поверхностными и цитоплазматическими ЛЦ ИГ для опухолевого клона снижается и в некоторых случаях является недостоверным (табл. 3). Обращает на себя внимание отсутствие корреляции для клеток ХЛЛ в лимфатических органах и, наоборот, для клеток лимфомы маргинальной зоны и лимфомы мантийной зоны в крови.

Сравнение коэффициентов корреляции между уровнем экспрессии разных изотипов ЛЦ ИГ в реактивных и опухолевых клетках. Практически во всех исследованных образцах от больных с лимфатическими опухолями кроме клональных клеток опухоли присутствовали также нормальные (реактивные) В-клетки. Эти клетки могут быть выделены как клетки, экспрессирующие противоположный опухолевому клону вариант легкой цепи иммуноглобулина. Соответственно для опухолей, клональных по каппа-ЛЦ ИГ, — это лямбда-ЛЦ ИГ, а для опухолей, клональных по лямбда-изотипу ЛЦ ИГ, это каппа-изотип ЛЦ ИГ. Таким образом, по соотношению противоположных изотипов ЛЦ ИГ был вычислен средний уровень экспрессии поверхностных и цитоплазматических ЛЦ ИГ для опухолевого клона и для реактивных клеток из того же образца и вычислен коэффициент корреляции между ними.

Таблица 3

**Сравнение коэффициентов корреляции между уровнями экспрессии одноименных поверхностных и цитоплазматических изотипов ЛЦ ИГ в реактивных и опухолевых В-лимфоцитах**

Нозологические единицы	Сравниваемые пары антигенов			
	поверхностные — цитоплазматические каппа-ЛЦ ИГ		поверхностные — цитоплазматические лямбда-ЛЦ ИГ	
	кровь	лимфоидные органы	кровь	лимфоидные органы
Реактивные В-лимфоциты	0.85 <sup>a</sup>	0.86 <sup>a</sup>	0.93 <sup>a</sup>	0.80 <sup>a</sup>
ХЛЛ	0.93 <sup>a</sup>	0.37	0.24	0.29
Лимфома из клеток маргинальной зоны	0.098	0.55 <sup>a</sup>	0.056	0.79 <sup>a</sup>
Лимфома из клеток мантийной зоны	0.20	0.78 <sup>a</sup>	0.31	0.55 <sup>a</sup>
ДБККЛ	НД	0.76 <sup>a</sup>	НД	0.75 <sup>a</sup>

Примечание. <sup>a</sup> Уровень корреляции статистически достоверен для данного объема выборки. НД — нет данных.

В реактивных клетках коэффициент корреляции между двумя изотипами ЛЦ ИГ всегда близок к 1 как для поверхностных, так и для цитоплазматических маркеров ЛЦ ИГ в крови и в лимфоидных органах. В опухолевых образцах выявляется снижение уровня корреляции по сравнению с реактивными и клетками во всех исследованных группах (табл. 4), однако для некоторых вариантов уровень корреляции остается значимым (табл. 4,<sup>a</sup>).

**Обсуждение**

Экспрессия легких цепей иммуноглобулина в В-клетках имеет ряд особенностей, нехарактерных для экспрессии большинства других маркеров. В первую очередь это наличие неспецифического связывания ИГ В-лимфоцитами с помощью Fc-рецепторов (Walia et al., 1980; Mellman 1988; Stuart et al., 1989), которое объясняет невозможность компенсации данных цитометрии. Степень этого

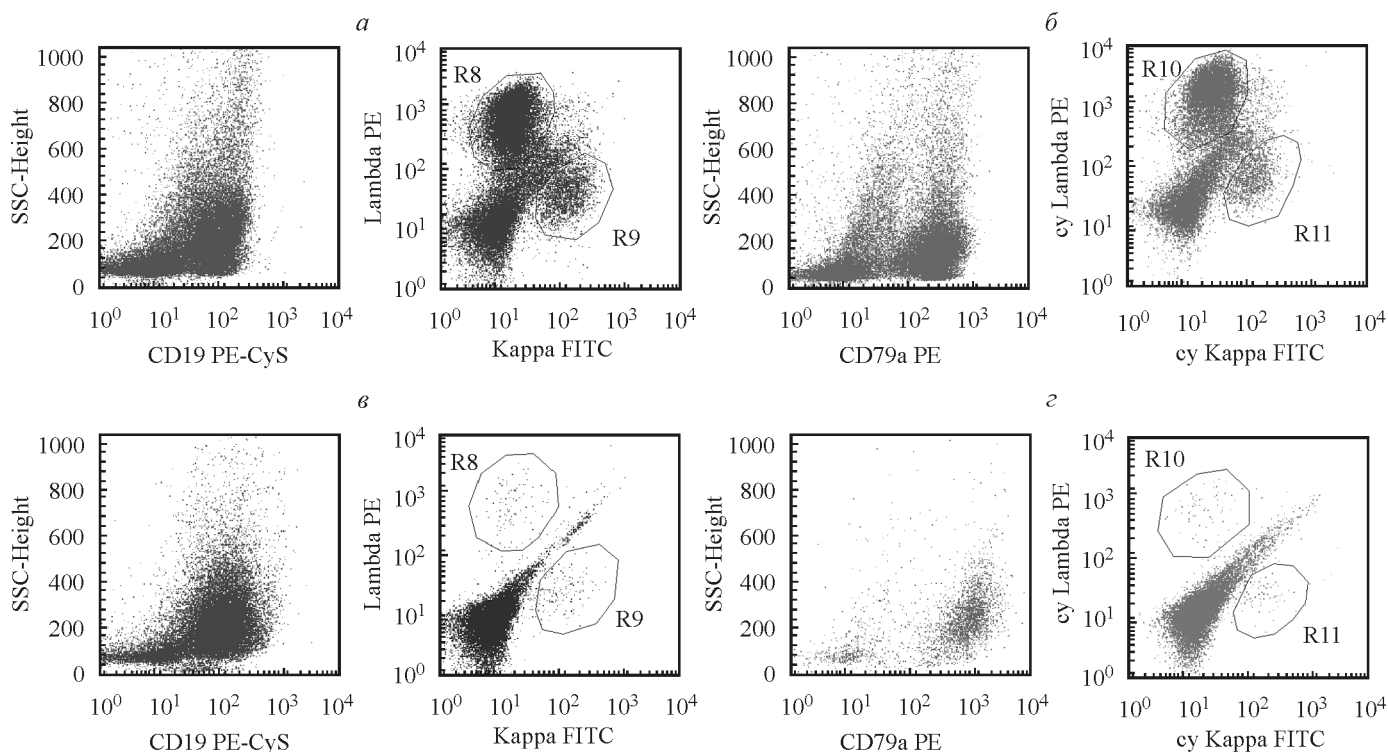


Рис. 5. Наличие (а, б) и отсутствие (в, з) экспрессии ЛЦ ИГ в В-лимфоцитах больных ДБККЛ.

Слева в каждой паре точечных диаграмм (а—з) показаны результаты выявления CD79а, подтверждающие наличие массивного клона В-клеток, справа — результаты выявления ЛЦ ИГ.

**Коэффициенты корреляции между экспрессией двух разных типов легких цепей (каппа и лямбда) в нормальных и опухолевых клетках**

Нозологическая форма	Кровь		Лимфоидные органы (лимфоузлы и селезенка)	
	поверхностные ЛЦ ИГ	цитоплазматические ЛЦ ИГ	поверхностные ЛЦ ИГ	цитоплазматические ЛЦ ИГ
Реактивные В-лимфоциты	0.957 <sup>a</sup>	0.982 <sup>a</sup>	0.898 <sup>a</sup>	0.906 <sup>a</sup>
ХЛЛ	Каппа-клон опухоли	0.496	0.193	0.311
	Лямбда-клон опухоли	0.597 <sup>a</sup>	0.261	0.148
Лимфома из клеток маргинальной зоны	Каппа-клон опухоли	0.157	0.482	0.064
	Лямбда-клон опухоли	0.544 <sup>a</sup>	0.201	0.614 <sup>a</sup>
Лимфома из клеток мантийной зоны	Каппа-клон опухоли	0.638 <sup>a</sup>	0.575 <sup>a</sup>	0.631 <sup>a</sup>
	Лямбда-клон опухоли	0.704 <sup>a</sup>	0.260	0.343
ДБККЛ	Каппа-клон опухоли	НД	0.638 <sup>a</sup>	0.214
	Лямбда-клон опухоли	НД	0.452	0.205

Примечание. Для реактивных случаев указана корреляция между двумя типами ЛЦ ИГ. Для опухолей указана корреляция между уровнем экспрессии одного типа ЛЦ ИГ в опухолевом клоне и экспрессией противоположного типа ЛЦ ИГ в нормальных (реактивных) клетках того же пациента.  
<sup>a</sup> Уровень корреляции статистически достоверен для данного объема выборки. НД — нет данных.

связывания, как показывают наши данные, сильно варьирует у различных людей.

Вторая особенность — примерно равное соотношение между экспрессией поверхностных и цитоплазматических ЛЦ ИГ в В-клетках (Goud, Antoine, 1984; Metezeau et al., 1984; Davidson et al., 1990), которое подтверждается теперь и прямыми цитометрическими данными.

Третья особенность, выявленная в настоящей работе, — высокий уровень корреляции между уровнями экспрессии как разных изоформ ЛЦ ИГ, так и между экспрессией поверхностных и цитоплазматических ЛЦ ИГ у одного человека. Эти данные дают основание предполагать наличие системы глобального контроля не только уровня синтеза ИГ, но и их динамического распределения в В-клетках.

В случае лимфатических опухолей все вышеуказанные закономерности могут нарушаться, поскольку опухолевые В-клетки не выполняют функций поддержания иммунитета, а подвержены отбору на автономности. Вопрос состоит в том, насколько далеко этот процесс зашел в случае разных В-клеточных опухолей. Наши данные показывают, что в наибольшей степени локализация и динамика ИГ нарушены при ХЛЛ: в случае данного заболевания не только снижен общий уровень иммуноглобулинов (Lewis et al., 2005a, 2005b), но, кроме того, большая часть иммуноглобулинов находится в цитоплазме. Это может указывать на их неэффективную рециркуляцию. Необходимо отметить, что мы не встретили случаев ХЛЛ, негативных по цитоплазматической экспрессии ЛЦ ИГ, которые описывались ранее (Muller-Hermelink et al., 2001), что, вероятно, объясняется использованием в настоящем исследовании более чувствительных поликлональных кроличьих антител.

Наши данные об отсутствии экспрессии ИГ в клетках некоторых лимфом (преимущественно в случаях ДБККЛ) соответствуют данным литературы (Liendo et al., 1985; Kaleem et al., 2000; Li et al., 2002), однако мы не встретили случаев В-клеточных лимфом, негативных по экспрессии ЛЦ ИГ, за пределами группы ДБККЛ.

Интересно отметить, что, по нашим данным, в лимфоме из клеток мантийной зоны и ДБККЛ общий уровень экспрессии и поверхностно-цитоплазматическое отношение ЛЦ ИГ на опухолевых клетках не отличаются от нормы. С учетом снижения уровня корреляции между показателями экспрессии поверхностных и цитоплазматических ЛЦ ИГ это позволяет предположить, что в случае данных нозологических форм опухолевая трансформация затронула В-клеточный рецептор лишь в небольшой степени. Однако корреляционная связь между уровнем экспрессии поверхностных и цитоплазматических ЛЦ ИГ ослабевает в случае всех изученных опухолей и во многих случаях становится незначимой. Отсутствие корреляции между экспрессией поверхностных и цитоплазматических ЛЦ ИГ может объясняться тем, что жизнеспособность опухолевых В-клеток не регулируется или слабо регулируется механизмами, опосредованными их В-клеточным рецептором.

Тем не менее достоверно значимая ( $r < 0.5$ ), хотя и меньшая, чем в норме, корреляция между уровнями поверхностных и цитоплазматических ЛЦ ИГ сохраняется для каппа-изотипа в клетках лимфатических органов при всех опухолях, кроме ХЛЛ, и для лямбда-изотипа — в лимфоме из клеток маргинальной зоны. Данный факт может указывать на сохранение частичной регуляции экспрессии В-клеточного рецептора опухолевых В-клеток, находящихся в лимфоузлах, а также на избирательный характер нарушения рециркуляции изотипов ЛЦ ИГ при возникновении опухоли.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов правительства Москвы и Российского фонда фундаментальных исследований (проект 13-04-40189-Н). Работа была частично выполнена с использованием оборудования, приобретенного за счет средств программы развития Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова.



## Список литературы

- Воробьев И. А., Худолева О. А., Рошупкина Т. Д., Грецов Е. М. 2005. Иммунофенотипирование опухолей системы крови и лимфатических опухолей. Часть I. Зрелоклеточные лимфомы и лимфосаркомы. Гематология и трансфузиология. 50 (1) : 7—13. (Vorobjev I. A., Khodoleeva O. A., Roschupkina T. D., Gretsov E. M. 2005. Immunophenotyping of hemablastoses and lymphomas. Part I. Mature cell lymphomas. Hematology and Transphusiology. 50 (1) : 7—13.)
- Зурочка А. В., Хайдуков С. В., Кудрявцев И. В., Черешнев В. А. 2014. Проточная цитометрия в медицине и биологии. Екатеринбург: РИО УрО РАН. 576 с. (Zurochka A. V., Khaidukov S. V., Kudryavtsev I. V., Chereshev V. A. 2014. Flow cytometry in medicine and biology. Yekaterinburg: RIO Urals Division of RAS. 576 p.)
- Рафаловская-Орловская Е. П., Горгидзе Л. А., Гладких А. А., Таугер С. М., Воробьев И. А. 2012. Визуализация поверхностных клеточных маркеров на срезах опухолевой ткани лимфоузлов с помощью флуоресцирующих квантовых точек. Цитология. 54 (2) : 149—157. (Raphalovskaya-Orlovskaya E. P., Gorgidze L. A., Gladkih A. A., Tauger S. M., Vorobjev I. A. 2012. Imaging of cell surface antigens on tumor lymph-node sections using fluorescence quantum dots. Cell Tissue Biol. 6 (3) : 211—218.)
- Agrawal Y. P., Hämäläinen E., Mahlamäki E. K., Aho H., Nousianinen T., Lahtinen R., Penttilä I. M. 1992. Comparison of polyclonal and monoclonal antibodies for determination of B-cell clonal excess in a routine clinical laboratory. Eur. J. Haematol. 48 : 49—55.
- Braylan R. C., Benson N. A., Iturraspe J. 1993. Analysis of lymphomas by flow cytometry. Ann. N. Y. Acad. Sci. 677 : 364—378.
- Chizuka A., Kanda Y., Nannya Y., Oshima K., Kaneko M., Yamamoto R., Suguro M., Hamaki T., Matsuyama T., Takezako N., Miwa A., Togawa A. 2002. The diagnostic value of kappa/lambda ratios determined by flow cytometric analysis of biopsy specimens in B-cell lymphoma. Clin. Lab. Haematol. 24 : 33—36.
- Davidson H. W., West M. A., Watts C. 1990. Endocytosis, intracellular trafficking, and processing of membrane IgG and monovalent antigen/membrane IgG complexes in B lymphocytes. J. Immunol. 144 : 4101—4109.
- Filippi J. F., Nicolino-Brunet C., Tubiana N., Carcassonne Y., Sampol J. 1991. Cytoplasmic immunoglobulins in chronic B-lymphoid leukemia. Pathol. Biol. (Paris). 39 : 47—49.
- Fukushima P. I., Nguyen P. K., O'Grady P., Stetler-Stevenson M. 1996. Flow cytometric analysis of kappa and lambda light chain expression. Clinical Comm. Cytometry. 26 : 243—252.
- Geary W. A., Frierson H. F., Innes D. J., Normansell D. E. 1993. Quantitative criteria for clonality in the diagnosis of B-cell non-Hodgkin's lymphoma by flow cytometry. Mod. Pathol. 6 : 155—161.
- Goud B., Antoine J.-C. 1984. Emergence of a surface immunoglobulin recycling process during B lymphocyte differentiation. J. Cell Biol. 98 : 1238.
- Grier D. D., Al-Quran S. Z., Cardona D. M., Li Y., Braylan R. C. 2012. Flow cytometric analysis of immunoglobulin heavy chain expression in B-cell lymphoma and reactive lymphoid hyperplasia. Int. J. Clin. Exp. Pathol. 5 : 110—118.
- Kaleem Z., Zehnbauser B. A., White G., Zutter M. M. 2000. Lack of expression of surface immunoglobulin light chains in B-cell non-Hodgkin lymphomas. Amer. J. Clin. Pathol. 113 : 399—405.
- LeBien T. W., Tedder T. F. 2008. B lymphocytes: how they develop and function. Blood. 112 : 1570—1580.
- Lewis R. E., Cruse J. M., Pierce S. 2005a. Surface and cytoplasmic immunoglobulin expression in chronic lymphocytic leukemia (CLL). FASEB J. 19 : A507.
- Lewis R. E., Cruse J. M., Pierce S., Lam J., Tadros Y. 2005b. Surface and cytoplasmic immunoglobulin expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia (CLL). Exp. Mol. Pathol. 79 : 146—150.
- Li S., Eshleman J. R., Borowitz M. J. 2002. Lack of surface immunoglobulin light chain expression by flow cytometric immunophenotyping can help diagnose peripheral B-cell lymphoma. Amer. J. Clin. Pathol. 118 : 229—234.
- Liendo C., Danieu L., Al-Katib A., Koziner B. 1985. Phenotypic analysis by flow cytometry of surface immunoglobulin light chains and B and T cell antigens in lymph nodes involved with non-Hodgkin's lymphoma. Amer. J. Med. 79 : 445—454.
- Maiese R. L., Segal G. H., Iturraspe J. A., Braylan R. C. 1995. The cell surface antigen and DNA content distribution of lymph nodes with reactive hyperplasia. Modern Pathol. 8 : 536—543.
- Marti G., Rawstron A. C., Ghia P., Hillmen P., Houlston R. S., Kay N., Schleinitz T. A., Caporaso N. 2005. Diagnostic criteria for monoclonal B-cell lymphocytosis. Br. J. Haematol. 130 : 325—332.
- Mellman I. 1988. Relationships between structure and function in the Fc receptor family. Curr. Opin. Immunol. 1 : 16—25.
- Metzeau P., Elguindi I., Goldberg M. E. 1984. Endocytosis of the membrane immunoglobulins of mouse spleen B-cells: a quantitative study of its rate, amount, and sensitivity to physiological, physical and cross-linking agents. EMBO J. 3 : 2235—2242.
- Muller-Hermelink H. K., Montserrat E., Catovsky D., Campo E., Harris N. L., Stein H. 2008. Chronic lymphocytic leukaemia/small lymphocytic lymphoma. In: Swerdlow S. H., Campo E., Harris N. L., Jaffe E. S., Pileri S. A., Stein H., Tiele J., Vardiman J. W. (eds). WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 4th edition. Lyon: IARC Press. 180—183.
- Oertel J., Lipski H., Huhn D. 1991. Detection of light chain restriction in chronic B-lymphoid leukemia and B-non-Hodgkin's lymphoma. Clin. Lab. Haematol. 13 : 33—40.
- Perez-Andres M., Paiva B., Nieto W. G., Caraux A., Schmitz A., Almeida J., Vogt R. F., Marti G. E., Rawstron A. C., Van Zelm M. C., Van Dongen J. J. M., Johnsen H. E., Klein B., Orfao A. 2010. Human peripheral blood B-cell compartments: a crossroad in B-cell traffic. Cytometry. Part B. 78B (Suppl. 1) : S47—S60.
- Picker L. J., Weiss L. M., Medeiros L. J., Wood G. S., Warnke R. A. 1987. Immunophenotypic criteria for the diagnosis of non-Hodgkin's lymphoma. Amer. J. Pathol. 128 : 181—201.
- Shapiro H. M. 2003. Practical flow cytometry. 4th edition. New York; London; Toronto: Wiley-Liss. 736 p.
- Stuart S. G., Simister N. E., Clarkson S. B., Kacinski B. M., Shapiro M., Mellman I. 1989. Human IgG Fc receptor (hFcRII; CD32) exists as multiple isoforms in macrophages, lymphocytes and IgG-transporting placental epithelium. EMBO J. 8 : 3657—3666.
- Tung J. W., Parks D. R., Moore W. A., Herzenberg L. A. 2004. New approaches to fluorescence compensation and visualization of FACS data. Clin. Immunol. 110 : 277—283.
- Walia A. S., Shaw D. R., Fusin E. W., Anderson B., Lamon E. W. 1980. Different divalent cation requirements for binding IgM complexes to lymphocytes and macrophages. J. Exp. Med. 151 : 1528—1533.
- Wayne P. A. 2007. Clinical applications of flow cytometry: quality assurance and immunophenotyping of lymphocytes: approved guideline. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2007: H42—A2.

EXPRESSION OF THE LIGHT CHAINS OF IMMUNOGLOBULINS IN NORMAL B-CELLS  
AND SOME B-CELL LYMPHOMAS*O. A. Khudoleeva,<sup>1</sup> I. A. Vorobjev<sup>1, 2, \*</sup>*<sup>1</sup> A. N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology  
and <sup>2</sup> Biological Faculty M. V. Lomonosov Moscow State University, 119991;  
\* e-mail: ivorobjev@mail.ru

The quantitative method of determining the level of expression of immunoglobulin light chains on uncompensated data was suggested and used to examine disorders in light chain expression in various B-cell tumors. The average level of expression of the lambda isotype was 4 times higher than the level of expression of kappa isotype. The level of surface and cytoplasmic expression of LC IG varied within wide limits for different people, but there was a high degree of correlation between the levels of expression of kappa and lambda isotypes LC IG as well as between expression of the surface and cytoplasmic forms of each in isotype the same individual. In the majority of B-cell non-Hodgkin's lymphomas correlation between the expression of LC IG on the surface and in the cytoplasm of the cells was diminished. Expression of LC IG in CLL was significantly reduced on the surface of the cells and to a lesser extent — in the cytoplasm. In the case of marginal zone cell lymphoma, LC IG expression level was reduced on the surface of circulating cells and to a lesser extent — in the cytoplasm. In the case of mantle cell lymphoma and DLBCL, expression level of LC IG on the cell surface and in the cytoplasm was the same as in normal B-cells. However, in some cases DLBCL, no LC IG was expressed both on the surface and in the cytoplasm.

**Key words:** B-cells, lymphoma, immunoglobulin light chains, flow cytometry, antigen expression.

---