

## DIFERENȚIEREA FENOTIPICĂ A LINIEI CELULARE A LIMFOAMELOR NON-HODGKIN

**Valentina Stratan – conf. cercet., dr. în șt. biol.,  
Aliona Nicorici – doctorandă, Laboratorul Imunogenetic;  
Ion Corcimaru – membr. cor. AȘM, prof. univ., clinica Hematologie  
IMSP Institutul Oncologic din Republica Moldova**  
*anicorici@rambler.ru; tel. mob.: 068810055*

### Rezumat

Imunofenotiparea de celule sanguine ne permite difinitivarea liniei celulare a limfomului malign, precum și a zonei de afectare. Diagnosticul limfoamelor maligne B-celulare poate fi stabilit cu certitudine prin imunofenotipare și imunohistochimie. Investigații suplimentare de citogenetică și biologie moleculară sunt imperative pentru un diagnostic complet. Imunofenotiparea este absolut indispensabilă în diagnosticul actual al limfoamelor, deoarece clasificarea modernă a acestora se bazează pe determinarea liniei B sau T/NK și etapei de diferențiere a limfoamelor maligne, precum și a zonei de afectare. Grupul nostru de studiu este constituit din 32 de pacienți cu limfom malign non-Hodgkin nedeterminat, 32 din cazuri cu limfoame maligne B-celulare (100%), 24 din cazuri de limfom limfoblastic cu celulă mică (75%), 6 cazuri de limfom cu celulă B precursoră (18,75%), 2 cazuri cu limfom malign non-Hodgkin folicular (6,25%). Caracteristica cercetării s-a suprapus, în linii mari, cu datele din literatură precum că în 85% din cazuri de limfom malign sunt limfoamele B-celulare limfoblastice. Concluzii finale sunt premature de apreciat, lotul fiind incomplet, iar corelarea fiecărui factor cu supraviețuirea și răspunsul la tratament este absolut necesar pentru niște constatări pertinente.

**Cuvinte-cheie:** Limfom malign; Imunofenotipare; Imunohistochimie; B-, T/ NK – celule; Limfom non-Hodgkin

### Summary. Phenotypic differentiation of malignant lymphoma cell line.

Immunophenotyping of blood cells allows the completion of the malignant lymphoma cell line and the area of damage. Diagnosis of malignant B-cell lymphomas can be established with certainty by immunophenotyping and immunohistochemistry. Further investigation of cytogenetic and molecular biology are mandatory for a complete diagnosis. Immunophenotyping is absolutely essential in the current diagnosis of lymphoma as their new classification is based on the determination of line B or T / NK on the phase of differentiating malignant lymphomas and the area of damage. Our study group consists of 32 patients with undetermined non-Hodgkin malignant lymphoma, 32 cases of lymphoma, B-cell malignancies (100%), 24 cases of small cell lymphoblastic lymphoma (75%), 6 cases of B-cell lymphoma precursory (18,75%), 2 cases with follicular non-Hodgkin's malignant lymphoma (6,25%). The peculiarities of the investigation

coincided broadly with literature data and that there are B cell lymphoblastic lymphoma in 85% of malignant lymphoma cases. A final conclusion is premature to estimate, the lot being incomplete and the correlation of each factor with the survival and response to the treatment is absolutely necessary for some substantial observations.

**Key words:** Malignant lymphoma; Immunophenotyping; Immunohistochemistry; B- T/NK – cells; Lymphoma non-Hodgkin

**Резюме. Фенотипическая дифференциация клеточной линии злокачественной лимфомы.**

Имунофенотипирование клеток крови позволяет дифференцировать клеточные линии злокачественной лимфомы и области повреждения. Диагностика злокачественных В-клеточных лимфом может быть установлена при помощи имунофенотипирования и иммуногистохимии. Дальнейшие исследования цитогенетические и молекулярные будут необходимы для завершения диагностики. Имунофенотипирование является абсолютно необходимым для диагностики лимфом, потому что сегодня их классификация основана на определении линии В- или Т/ НК и их стадий дифференцировки злокачественных лимфом и площадь повреждения. Было проанализировано 32 больных со злокачественными неопределенными лимфомами, 32 случаев злокачественных В-клеточных лимфом (100%), 24 случая мелкоклеточный лимфобластной лимфомы, которые представляли 75%, 6 случаев предшественника В- клеточный лимфом – это 18,75%, 2-х случаях (6,25%) – фолликулярной злокачественной лимфомы не-Ходжкина. Характеристики исследования совпали примерно с литературными данными, что в 85% случаев злокачественной В-клеточные лимфомы являются лимфобластными лимфомами. Окончательный вывод преждевременно оценивать, так как испытуемых было мало, и соотношение каждого фактора выживания и ответа на лечение является абсолютно необходимыми для заключения каких-либо выводов.

**Ключевые слова:** Злокачественная лимфома; Имунофенотипирования; В- Т/НК– клетки; Иммуногистохимии; Лимфомы не-Ходжкина

**Actualităţi**

Limfoamele maligne sunt tumori care se dezvoltă din celule limfoide situate extramedular. Termenul de limfom malign a fost propus de Billroth în anul 1871. Limfoamele maligne ocupă un loc semnificativ în cadrul hemoblastozelor, constituind în majoritatea ţărilor 40% din toată grupa de hemoblastoze. În Republica Moldova limfoamelor maligne le revine 50% din toate formele de hemoblastoze. Ultimii ani au fost marcaţi de dezvoltarea unor noi metode de hematologie de cercetare: imunofenotipare, imunohistochimie, genetica moleculară, care, împreună cu studiile morfologice au contribuit la o înţelegere mai bună a mecanismelor patogene ale NHL. Acest lucru se reflectă în clasificarea actuală a limfoamelor (clasificarea Limfomul Grupul de studiu european-american, 1994, clasificarea tumorilor de ţesuturi hematopoietice şi limfoide, OMS, 2001, 2008).

O importanţă deosebită în acest aspect o are teoria nouă de patogenie a limfoamelor maligne, conform căreia ele se dezvoltă unifocal. Focarul primar tumoral apare în ganglionii limfatici sau extranodali (inelul limfatic Waldeyer, tractul gastrointestinal, oase, splină etc.), din cauza căruia procesul patologic se răspândeşte în organism în anumită consecutivitate. Aceste date au fost folosite în elaborarea unor principii noi de tratament, care în stadiile incipiente asigură vindecarea pacienţilor.

Limfoamele maligne determinate histologic pot avea aspecte diferite cu exprimare simptomatică clinică, iar o agresivitate de manifestare a lor face clasificarea tumorilor limfoide imposibilă prin folosirea unui sistem de gradare generic bazat doar pe morfologie.

Imunofenotiparea prezintă detectarea receptorilor de membrană şi intracelulari. Aceşti receptori se pot identifica prin anticorpi monoclonali specifici împotriva lor, care se ataşează prin fragmentul Fab. Anticorpii monoclonali sunt conjugaţi cu un fluorocrom, care permite identificarea acestor anticorpi.

Imunofenotiparea este absolut indispensabilă în diagnosticul actual al limfoamelor, deoarece clasificarea de azi a acestora se bazează pe determinarea liniei B sau T/NK şi etapei de diferenţiere a limfoamelor maligne.

Determinarea imunofenotipului atipic permite identificarea celulelor maligne chiar şi în proporţie mică în proba analizată. Menţionăm că imunofenotiparea prin anticorpi monoclonali reprezintă o metodă obligatorie în diagnosticul limfoamelor maligne prin prisma clasificărilor moderne cu bază imunologică, fiind unica metodă care permite identificarea clară a liniei celulare, extrem de utilă în aprecierea prognostică a bolii şi a corectitudinii aplicării tratamentului pentru fiecare pacient în parte sau tratamentul personalizat.

### Scopul lucrării

Identificarea parametrilor imunofenotipici ai pacienților cu limfom malign, limfom malign non-Hodgkin și determinarea liniei celulare, marcarea realizându-se cu anticorpi monoclonali din grupa B – limfocite.

Se vor analiza în dinamică expresia unor antigene de diferențiere limfoidă, care și-au exprimat, mai mult sau mai puțin, acei anticorpi monoclonali în determinarea liniei celulare care prezintă limfomul malign non-Hodgkin și identificarea schemelor de tratament cu efect optim de supraviețuire și reducerea procentului de malignizare (leucemizare) a limfoamelor maligne.

### Material și metode

Studiul se efectuează pe baza pacienților internați și tratați în secția de hematologie oncologică a Institutului Oncologic din Republica Moldova cu diagnosticul de trimitere.

Metodele imunologice de diagnostic aplicate au dus la izolarea T-, B-celule și celulelor NK (kileri naturali), în fiecare grup – mai multe variante (de celule imunologic imature și mature). Mai târziu, cu expresia unor grupuri de diferențiere celulară, unele opțiuni au fost transformate în mai multe entități de boli distincte: mediastinale (timusului), limfom primar din celule-mari, limfom anaplastic cu celule mari ALK-pozitiv și ALK-negativ. Doar o abordare cuprinzătoare care se adresează special modelului morfologic și folosește panoul avansat imunologic de diagnostic de anticorpi, care își propune să identifice markerii de natură T- și B-celulare, dar și antigenele pro-celulare, ne va permite un diagnostic corect.

Imunofenotiparea indirectă va fi realizată prin marcarea celulelor cu ajutorul anticorpilor monoclonali, conjugați cu marcatori fluorescenți. Acest panou include anticorpi monoclonali: CD19 (B-limfocite); CD20 (B-celule); CD22 (B-celule); CD23 (Celulele B-activate); CD5 (T-limfocite mature); CD10 (ProB-limfocite); HLA-DR (B-limfocite, T-activate); CD38 (B-celule, limfocitele activate); CD21 (B-celule); CD15 (neutrofile).

Prin metoda imunologică se va stabili diagnosticul final și se vor folosi criteriile cantitative de reprezentare a antigenelor asupra celulelor linii mieloide și / sau limfoide care au fost elaborate în anul 2008 WHO, așa-numita clasificare Appendix.

### Rezultate

Au fost examinați 32 de pacienți, cu un diagnostic primar de limfom malign non-Hodgkin. Aplicarea metodei de cercetare, imunofenotiparea indirectă, va permite de a determina linia celulară a limfomului

malign: CD19 (B-limfocite); CD20 (B-celule); CD22 (B-celule); CD23 (Celulele B-activate); CD5 (T-limfocite mature); CD10 (ProB-limfocite); HLA-DR (B-limfocite, T-activate); CD38 (B-celule, limfocitele activate); CD21 (B-celule); CD15 (neutrofile); CD 25 (limfocitele activate). Din markerii aplicați cele mai multe antigene de diferențiere limfoidă și-au exprimat CD20, CD23, CD38, CD19, precum și CD10, însă mai rar CD25, CD15. La 16 din cei 22 de pacienți a fost marcată expresia ridicată a antigenului CD20. În 4 din cazuri CD19 a avut expresia antigenului moderat sau ridicat, 2 dintre pacienți cu expresii combinate moderat sau ridicat de antigene CD10 și CD38.

### Discuții

Ca urmare, din cele 32 de cazuri de limfoame maligne non-Hodgkin analizate, în 24 de cazuri a fost marcată expresia pronunțat ridicată a antigenului CD20, cu diagnosticul de limfom malign non-Hodgkin limfoblastic cu celulă mică, în 6 cazuri expresia antigenului CD19 a fost moderată sau ridicată, ceea ce ne sugerează diagnosticul de limfom malign non-Hodgkin cu celulă B precursoră, 2 cazuri sau marcat cu expresii combinate sau ridicate moderat a antigenelor CD10, CD38, cu diagnosticul de limfom malign non-Hodgkin folicular.

### Concluzii

- Imunofenotiparea de celule sanguine ne permite difinitivarea liniei celulare a limfomului malign precum și a zonei de afectare.

- Diagnosticul limfoamelor maligne B-celulare nu poate fi stabilit cu certitudine decât prin imunofenotipare și imunohistochimie. Investigații suplimentare de citogenetică și biologie moleculară sunt necesare pentru un diagnostic complet. În prezent, în țară, există puține centre unde se face fenotipare. Nu există un registru al pacienților cu LMNH B-celular și considerăm necesar realizarea acestuia pentru o evidență clară a pacienților (de la diagnostic până la sfârșitul evoluției bolii), pentru o încadrare mai corectă a cazurilor în funcție de factorii de prognostic și o abordare mai ținută terapeutică axată pe o supraviețuire mai mare. Am studiat 32 de pacienți cu limfom malign non-Hodgkin: 32 de cazuri de limfoame maligne B-celulare dintre care 24 de cazuri limfom limfoblastic cu celulă mică, în 6 cazuri limfom cu celulă B precursoră, iar caracteristica cercetării s-a suprapus în linii mari cu datele din literatură, încât în 85% de cazuri de limfom malign există limfoamele B-celulare limfoblastice.

- Concluziile finale sunt premature de apreciat, lotul fiind incomplet, iar corelarea fiecărui factor cu supraviețuire și răspunsul la tratament este absolut necesar pentru constatări pertinente.

**Bibliografie:**

1. Protocol clinic național ”*Limfoamele non-Hodgkin*”, Chișinău 2009.

2. Alina Cătană, Claudia Podia Inga, M. Deac: ”*Aspecte clinice și histofenotipice în limfoamele maligne T periferice pe un lot de 197 de pacienți din București*”, „ACTA MEDICA TRANSILVANICA”, Septembrie 2011; 2(3) 97- 100.

3. Dr. Horia Bumbea, Clinica de Hematologie Spitalul Universitar De Urgență București, Universitatea de Medicină și Farmacie „Carol Davila” București”: „*Rolul imunofenotipării în diagnosticul bolilor hematologice*”, Secțiunea hematologie clinică.

4. „Non-Hodgkin's Lymphoma”, *A histopatologic and prognostic evaluation*. Tradusă în limba rusă de Crivalapov Iu. A., Leenman E. E.