

*На правах рукописи*

**Поташникова Дарья Марковна**

**СРАВНЕНИЕ НОРМАЛЬНЫХ И ОПУХОЛЕВЫХ CD5-ПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ  
В-КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА.**

**Специальность 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология**

**Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук**

**Москва 2015**

Работа выполнена на кафедре клеточной биологии и гистологии биологического факультета Московского Государственного Университета им. М.В. Ломоносова

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор  
**Воробьев Иван Андреевич**

Официальные оппоненты: доктор медицинских наук,  
заведующий лабораторией механизмов гибели опухолевых клеток  
ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» РАМН  
**Штиль Александр Альбертович**

доктор биологических наук, профессор,  
заведующий лабораторией клеточных взаимодействий  
ФГБУ «Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и  
Ю.А. Овчинникова» РАН  
**Сапожников Александр Михайлович**

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
«Научно-исследовательский институт морфологии человека» РАМН

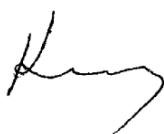
Защита диссертации состоится 20 октября 2015 г. на заседании диссертационного совета Д501.001.52 при Московском Государственном Университете им. М.В. Ломоносова по адресу: 119992, Москва, Ленинские Горы, Биологический факультет МГУ, аудитория М-1. Факс: 8(495)939-17-46; e-mail: dis\_kalsov@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке МГУ им. М.В. Ломоносова и на сайте биологического факультета МГУ:

<http://www.bio.msu.ru/dissertations/view.php?ID=704>

Автореферат разослан \_\_\_\_\_ 2015 г.

Ученый секретарь диссертационного совета  
кандидат биологических наук



**Е.Н. Калистратова**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** В-клетки – потомки общего лимфоидного предшественника, прошедшего в процессе дифференцировки и созревания ряд стадий с последовательной сменой поверхностного иммунофенотипа, эпигенетического и транскрипционного профилей. Основополагающую роль в выживании и дифференцировке В-лимфоцита играет сигнал фосфорилирования, получаемый через В-клеточный рецептор (BCR): митогенные и антиапоптотические сигналы передаются в ядро через BCR и ко-рецепторные комплексы. В зависимости от привлеченных ко-рецепторов сигнал может изменяться и приводить к разным последствиям для В-клетки. В дополнении и тонкой настройке сигнала от BCR задействован большой набор различных молекул плазматической мембраны В-лимфоцита. Вместе они обеспечивают активацию В-клеток, их миграцию в организме по сложным траекториям и, в конечном счете, выполнение их функции в составе иммунной системы.

Набор поверхностных молекул на мембране В-лимфоцита позволяет дать развернутую характеристику его происхождения и функционального состояния. Значительный объем информации о структуре, функциях и паттернах экспрессии поверхностных антигенов, накопленный на сегодняшний день, позволяет описывать многообразие В-клеточных субпопуляций в норме, а также при патологических состояниях. Так, диагностика В-клеточных лимфом базируется на развернутом описании поверхностных антигенов. Однако поиск сходств и различий между нозологическими группами зачастую ограничивается анализом поверхностных маркеров и мутационного статуса В-клеточного рецептора, и не касается экспрессии проводящих элементов сигнального BCR-каскада, расположенных в цитоплазме.

Передача сигнала от зрелого BCR обеспечивается BCR-ассоциированными тирозинкиназами и тирозинфосфатазами (SYK, LYN, SHP-1, ZAP-70), которые активируют универсальные сигнальные молекулы – PI3K, PLC, PKB и PKC (DeFranco, 1997; Geisberger et al., 2003; Harwood, Batista, 2010). Эффекторными молекулами BCR-каскада являются транскрипционные факторы, обеспечивающие размножение и выживание клеток. Так как важнейшие характерные свойства опухолевых клеток обусловлены аномальным функционированием сигнальных путей, контролирующих клеточный цикл и апоптоз (Hanahan, Weinberg, 2000; Hanahan, Weinberg, 2011), актуальным представляется изучение экспрессии сигнальных белков BCR-каскада в различных В-клеточных лимфомах.

В гетерогенной группе не-Ходжкинских лимфом выделяется значительная подгруппа В-зрелоклеточных лимфом с неканонической экспрессией маркера CD5.

Наибольшую часть случаев в Восточной Европе составляет В-клеточный хронический лимфолейкоз (В-ХЛЛ) (Sant et al., 2010), более редким и более агрессивным заболеванием является лимфома из клеток мантийной зоны (ЛКМЗ). Кроме того, выделяется ряд промежуточных форм между В-ХЛЛ и ЛКМЗ, представляющих трудность для современной диагностики (Zhao, 2009). Отправной точкой в исследовании сигналинга CD5+ В-клеточных опухолей стало разделение группы В-ХЛЛ на две подгруппы по способности запускать BCR-каскад (Lankester et al., 1995; Chiorazzi et al., 2005). На сегодняшний день для клеток В-ХЛЛ были показаны aberrантные уровни экспрессии верхних проводящих компонентов BCR сигнального каскада: CD79b (Cajiao et al., 2007), тирозинкиназ SYK и LYN, а также добавление к общему опухолевому фенотипу неканонической тирозинкиназы ZAP-70 (Chen et al., 2002, Seda, Mraz, 2015). Исследований BCR-ассоциированных сигнальных белков для других CD5+ В-клеточных лимфом проводилось сравнительно мало. На основании данных об гиперэкспрессии циклина D1 и общем высоком уровне активации клеток ЛКМЗ при общем низком уровне фосфорилирования сигнальных компонентов был сделан вывод об их неспособности проводить сигнал извне (de Boer et al., 1997). Исследования методом microarray показали значительно повышенные уровни компонентов PI3K-Akt и Wnt сигнальных путей при ЛКМЗ, но данные о BCR-ассоциированных молекулах в них отсутствовали (Rizzatti et al., 2005).

Проблема клеток-предшественников CD5-положительных лимфом также представляет значительный интерес: ведется поиск субпопуляции нормальных В-клеток, наиболее близкой к В-ХЛЛ по фенотипу (Klein, Dalla-Favera, 2005). CD5+ В-клетки миндалин человека являются важными претендентами на роль опухолевых предшественников (Dono et al., 2004), хотя степень сходства этих групп опухолевых и нормальных клеток требует дальнейшего изучения.

**Цель и задачи исследования.** Целью данной работы было **разделение В-клеточных лимфом и нормальных В-лимфоцитов по уровню экспрессии генов сигнальных BCR-ассоциированных белков.** Для выполнения этой цели были поставлены следующие **задачи:**

1. Подробно охарактеризовать и разбить на подгруппы выборку первичных CD5+ В-клеточных лимфом с использованием ключевых диагностических методов.
2. Определить уровни экспрессии мРНК генов сигнальных компонентов BCR-каскада (*CD79A*, *CD79B*, *LYN*, *SYK*, *ZAP70*, *SHPI1*) в неотсортированных пробах CD5+ В-клеточных лимфом для выявления различий между разными нозологическими формами с известным фенотипом.

3. Составить подробное иммунофенотипическое описание наиболее похожей на клетки В-ХЛЛ субпопуляции нормальных CD5+ В-лимфоцитов человека, локализующейся в миндалинах.
4. Отсортировать чистые популяции нормальных CD5- В-лимфоцитов периферической крови и CD5+ В-лимфоцитов миндалин человека, а также опухолевых лимфоцитов В-ХЛЛ.
5. Определить и сравнить уровни экспрессии мРНК генов сигнальных компонентов BCR-каскада (*CD79A*, *CD79B*, *LYN*, *SYK*, *ZAP70*, *SHPI*) в отсортированных пробах опухолевых и неопухолевых лимфоцитов человека.

#### **Новизна исследования.**

1. Впервые с помощью современных диагностических методов удалось выделить группу лимфом «серой зоны» с фенотипом, промежуточным между В-ХЛЛ и ЛКМЗ. Таким образом, выборка CD5+ лимфом человека была разделена на 3 подгруппы для последующего исследования экспрессии генов сигнальных белков.
2. Использование корректной стратегии нормализации данных ПЦР в реальном времени позволило найти различия между 3 группами CD5+ В-клеточных лимфом по уровням экспрессии РНК генов сигнальных белков BCR-каскада.
3. Получен подробный иммунофенотип малой субпопуляции CD5+ неопухолевых В-клеток миндалин человека.
4. Сравнение отсортированных опухолевых клеток В-ХЛЛ и нормальных В-лимфоцитов показало пониженный уровень экспрессии генов сигнальных белков за исключением гена *CD79A* в опухоли по сравнению со всеми нормальными контролями.
5. Сравнение чистых популяций неопухолевых В-лимфоцитов из разных источников позволило установить, что профиль экспрессии генов сигнальных белков в нормальных В-клетках универсален и достоверные различия имеются только в уровнях экспрессии мРНК гена *ZAP70*.

**Научно–практическая значимость исследования.** Полученные результаты могут быть применены в дифференциальной диагностике лимфоидных опухолей. Данные об экспрессии сигнальных белков, участвующих в проведении сигнала от В-клеточного рецептора, в субпопуляциях опухолевых и нормальных В-лимфоцитов могут быть использованы в курсах лекций по иммунологии, гематологии и клеточной биологии.

**Апробация работы.** Материалы диссертации доложены на международных конференциях: международной конференции «Experimental Hematology Association» (2010), второй Международной Школе по практической проточной цитометрии (Москва, 2011) и 18-й международной конференции «18th Leipziger Workshop on Cytomics and

Congenital Heart Disease» (Лейпциг, 2013), а также обсуждены 1 апреля 2015 года на специализированном семинаре кафедры клеточной биологии и гистологии Московского Государственного Университета имени М.В. Ломоносова. Работа поддержана 1-месячной стипендией ICRET Union for International Cancer Control (UICC).

**Публикации по теме диссертации.** По материалам диссертации опубликовано 7 научных работ, в том числе 4 статьи в журналах, рекомендованных ВАК, и 3 тезисов международных конференций.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация изложена на 117 страницах машинописи и состоит из введения, глав «Обзор литературы», «Материалы и методы исследования», «Результаты исследования», «Обсуждение результатов», заключения, выводов и приложений. Работа содержит 18 рисунков и 13 таблиц. Библиографический материал включает в себя ссылки на 251 источник литературы.

#### ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Пациенты и контроли.** Для исследования были выбраны образцы CD5+ В-клеточных опухолей 102 пациентов, проходивших стандартные диагностические процедуры в Гематологическом Научном Центре (Москва, Россия) и Диагностическом центре «Генотехнология» (Москва, Россия). Пациенты не проходили курс лечения предварительно и на момент забора образца. Подробная иммунофенотипическая характеристика опухолевых популяций методами проточной цитофлуориметрии и иммуногистохимии была составлена для 79 образцов. В 73 образцах был проанализирован уровень экспрессии гена циклина D1 при помощи ПЦР в реальном времени. Образцы клеток в суспензиях были заморожены в жидком азоте для выделения РНК. Еще 23 образца мононуклеаров периферической крови пациентов были использованы для сортировки чистых популяций опухолевых В-клеток для выделения РНК.

В качестве контролей были взяты 65 образцов неопухолевой лимфоидной ткани. Пробы включали 13 образцов ткани селезенки от пациентов с реактивными изменениями лимфоидной ткани, проходивших диагностические процедуры в Гематологическом Научном Центре (Москва, Россия), 12 образцов мононуклеаров периферической крови здоровых доноров и 40 образцов тканей миндалин с гиперплазией неопухолевой природы, полученных из детской больницы св. Владимира (Москва, Россия) после стандартных тонзилэктомий. Для исключения злокачественной В-клеточной пролиферации 15 образцов суспензий спленоцитов и периферических мононуклеаров крови были охарактеризованы методами иммуногистохимии и/или проточной цитофлуориметрии. Во всех образцах был измерен уровень экспрессии циклина D1 при помощи ПЦР в реальном времени. Образцы клеток в суспензиях были заморожены в жидком азоте для выделения РНК.

Иммунофенотипически были охарактеризованы 40 образцов миндалин человека, их неопухолевая природа была подтверждена при помощи проточной цитофлуориметрии и иммуногистохимии. Клеточные суспензии 10 образцов миндалин человека были использованы для сортировки чистых субпопуляций CD5+CD19+ нормальных В-лимфоцитов. Чистые субпопуляции нормальных В- и Т-клеток крови также были отсортированы из 10 образцов периферической крови здоровых доноров. Отсортированные клетки использовались для выделения РНК.

**Иммуногистохимия.** Иммуногистохимическая окраска парафиновых срезов толщиной 3-4 мкм проводилась по стандартной методике (Petrosyan et al., 2002).

**Проточная цитофлуориметрия и клеточная сортировка.** Пробоподготовку образцов проводили по стандартной методике, описанной ранее (Gretsov et al., 2004). Солидные ткани были предварительно превращены в суспензию при помощи медимашины (BD BioSciences, США). Анализ проводился на приборе FACSCalibur с программным обеспечением CellQuest (BD BioSciences, США). Сортировка проводилась на приборе FACSAria SORP с программным обеспечением Diva (BD BioSciences, США) и соплом диаметром 70 мкм.

**Получение РНК и кДНК.** Выделение РНК из клеток осуществлялось при помощи RNeasy Mini Kit и RNeasy Micro Kit (Qiagen, США) по протоколу производителя. Концентрация РНК измерялась на спектрофотометре (Nanodrop, Implen, Германия); кДНК синтезировали с помощью Random Primers AMV-Reverse Transcriptase Kit (Promega, США) согласно протоколу производителя.

**Подбор праймеров.** Для ПЦР в реальном времени использовались следующие последовательности праймеров: *YWHAZ*for acttttggtacattggcttcaa; *YWHAZ*rev ccgccaggacaaccagtat; *HPRT1*for tgacactggcaaaacaatgca; *HPRT1*rev ggtcctttcaccagcaagct; *UBC*for atttgggtcgcggttcttg; *UBC*rev tgcttgacattctcgatggt; *SYK*for ttcggactctccaaagcact; *SYK*rev tcacccctgatatgcttc; *LYN*for tcctgaagagcgaatgaagg; *LYN*rev ctgcctttctttccagcac; *ZAP70*for ccagaggagctcaaggaca; *ZAP70*rev ccacgtcgatctgcttct; *SHP1*for tcggactcctgcttctgtt; *SHP1*rev cctggagacttcgtgcttct; *CD79A*for agggcaacgagtcataccag; *CD79A*rev gagcttctcgttctgccatc; *CD79B*for gtcattgggattcagcacctt; *CD79B*rev gcagcgtcactatgtcctc; *CCND1*for acaaacagatcatccgcaaacac; *CCND1*rev tgttggggctcctcaggttc. Праймеры для исследуемых генов (*CD79A*, *CD79B*, *LYN*, *SYK*, *ZAP70*, *SHP1*) были написаны при помощи онлайн-инструментов Primer III и Primer Blast. Последовательности праймеров для референтных генов (*YWHAZ*, *HPRT1*, *UBC*) и гена циклина D1 (*BCL1*, *CCND1*) были взяты из литературы и использовались ранее (Vandesompele et al., 2002; Gladkikh et al., 2010). Все праймеры были синтезированы в фирме Синтол (Россия) и очищены с помощью ВЖКХ.

**ПЦР в реальном времени.** Количественные ПЦР-реакции в реальном времени проводили на приборах StepOne Plus (Applied Biosystems, США) и Quanta (Barlow Scientific, Великобритания) методом неспецифической детекции с красителем SYBRGreen I. Реакция проводилась в объеме 25 мкл с реактивами фирмы «Синтол» (Россия) по протоколу производителя. Условия реакции включали первоначальную денатурацию (при 95°C) и последующие 40 циклов амплификации (95°C 15 сек, 60°C 30сек, 72°C 60 сек). Все реакции ставились в трипликатах. Данные разных реакций на один ген объединялись в один эксперимент при помощи межреакционных калибровочных проб (inter-run calibrator, IRC).

**Нормализация и статистический анализ.** В работе была использована методика расчета относительного нормализованного количества кДНК с помощью фактора нормализации (Vandesompele et al., 2002). Для статистического анализа данных и построения графиков использовалась программа GraphPad® Prism (GraphPad Software, v.5, США). При сравнении выборок использовался непараметрический тест Манна-Уитни, анализ корреляций проводился по Спирману.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Классификация исследованных в работе опухолевых тканей и реактивных контролей методами иммуногистохимии и проточной цитофлуориметрии.**

Разделение 79 образцов первичных В-клеточных лимфом человека по нозологическим формам проводилось согласно рекомендациям ВОЗ (WHO lymphomas classification, 2001) на базе иммунофенотипа и гистологической картины (для солидных опухолей), а также относительного нормализованного количества кДНК гена циклина D1. Диагноз «В-клеточное лимфопролиферативное заболевание» устанавливался путем анализа количества В-клеток в образце и их клональности по легким цепям иммуноглобулина. Преобладание одного из двух вариантов легких цепей на поверхности или фенотип «low» со сниженным уровнем экспрессии легких цепей характерны для различных вариантов лимфопролиферативных заболеваний.

Лимфома из клеток мантийной зоны (ЛКМЗ) имеет характерный иммунофенотип CD19+/CD5+/CD20+/CD22+/CD23-/FMC7+ (Рис.1). Также В-лимфоциты ЛКМЗ отрицательны или слабо положительны по поверхностному маркеру CD43 и, как правило, положительны по маркеру активации CD38. Кроме того, отличительной чертой ЛКМЗ является наличие ведущей хромосомной транслокации t(11;14) и гиперэкспрессия гена циклина D1 (*CCND1*). В исследуемой выборке 27 случаев были классифицированы как ЛКМЗ. Возраст пациентов составлял 27-77 лет (медиана – 58 лет). Относительное

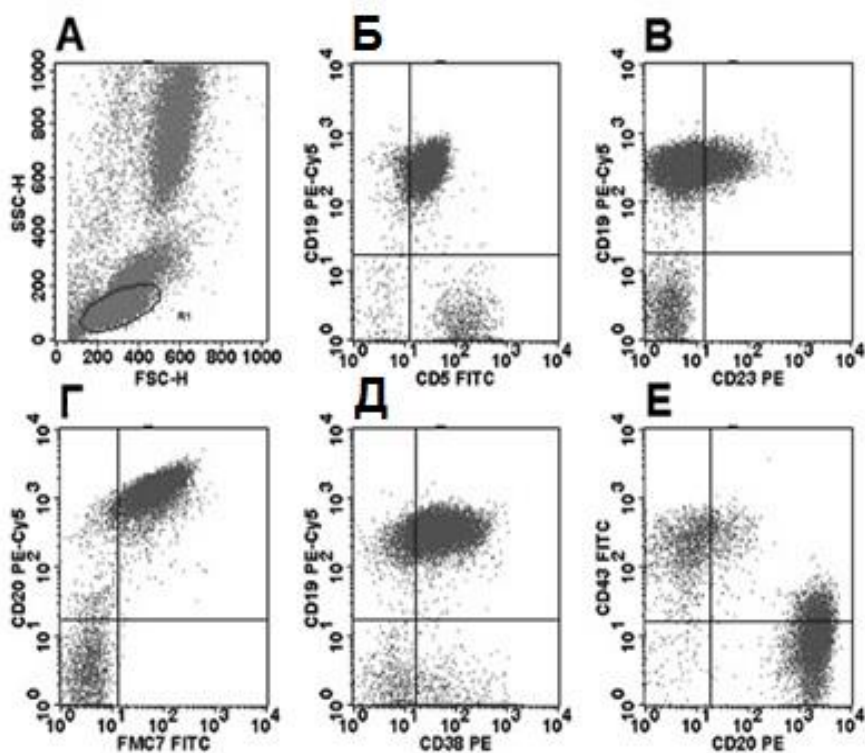


нормализованное количество кДНК гена *CCND1* в выборке ЛКМЗ составляло 107,19-0,0145 (медиана – 4,414). Для 7 пациентов из 27 дополнительно было известно о наличии хромосомной транслокации.

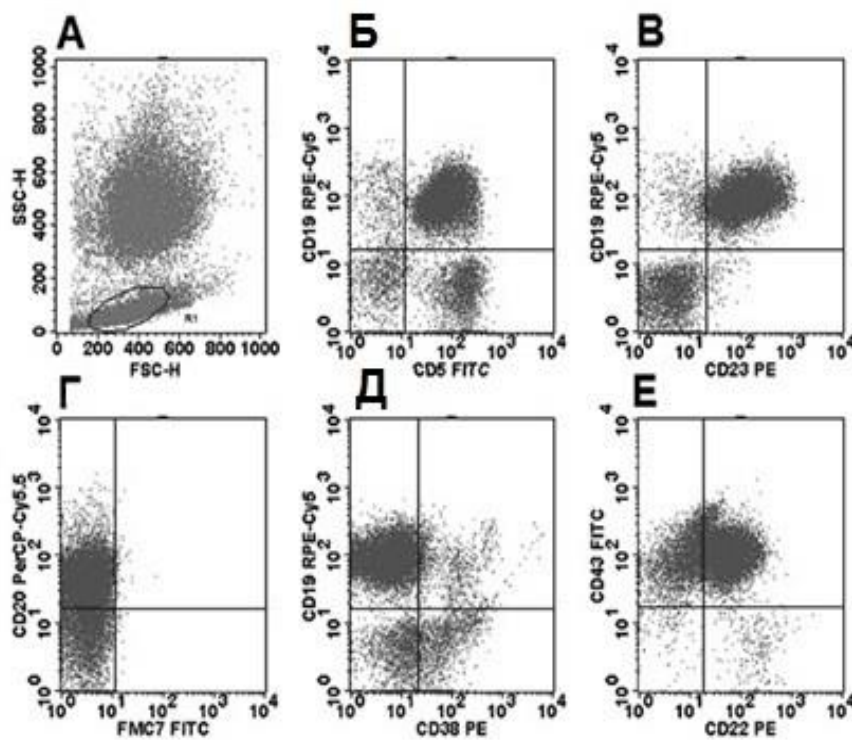
В-клеточный хронический лимфолейкоз (В-ХЛЛ) имеет характерный иммунофенотип CD19+/CD5+/CD20low+/CD22+/CD23+/FMC7- (Рис.2). На опухолевых клетках часто встречается сниженный уровень экспрессии поверхностного ко-рецептора BCR CD20, а также легких цепей иммуноглобулина. Также клетки В-ХЛЛ несут поверхностный маркер CD43. Уровень активации клеток В-ХЛЛ, определяемый по наличию поверхностного маркера CD38, варьирует в широких пределах от пациента к пациенту. В исследуемой выборке 28 случаев были классифицированы как В-ХЛЛ. Возраст пациентов составлял 39-85 лет (медиана – 60,5 лет). Относительное нормализованное количество кДНК гена *CCND1* в выборке В-ХЛЛ составляло 0,1055-0,0002 (медиана – 0,011).

В 24 случаях иммунофенотип каждого образца не соответствовал в полной мере ни В-ХЛЛ, ни ЛКМЗ (Рис.3). В 6 образцах дополнительно был снижен уровень поверхностного CD5, что требовало исключения еще одной нозологической формы – лимфомы маргинальной зоны селезенки (фенотип CD19+/CD5-/CD20+/CD22+/CD23low/FMC7+, уровень экспрессии гена *CCND1* достоверно снижен по сравнению с ЛКМЗ и В-ХЛЛ). Относительное нормализованное количество кДНК гена *CCND1* во всех образцах превышало норму, и составляло 5,64-0,0005 (медиана – 0,088). Большинство значений занимало промежуточное положение между В-ХЛЛ и ЛКМЗ, что не позволяло достоверно исключить ни одну из этих нозологий, однако позволило исключить лимфому маргинальной зоны селезенки в образцах со сниженным уровнем маркера CD5. Так в группу лимфом «серой зоны» были включены В-зрелоклеточные лимфомы с неканоническим иммунофенотипом, а также с уровнем экспрессии гена *CCND1*, не позволяющим достоверно дифференцировать нозологическую форму или не соответствующим ожидаемому при данном иммунофенотипе.

В качестве контроля для В-клеточных опухолей были взяты 15 образцов неопухолевой лимфоидной ткани – 13 образцов ткани селезенки и 2 образца мононуклеаров периферической крови с гиперлейкоцитозом неопухолевой природы. Возраст пациентов составлял 21-64 лет (медиана – 40,5 лет). Для всех образцов солидной ткани были получены гистологические данные, подтверждающие наличие реактивных процессов.

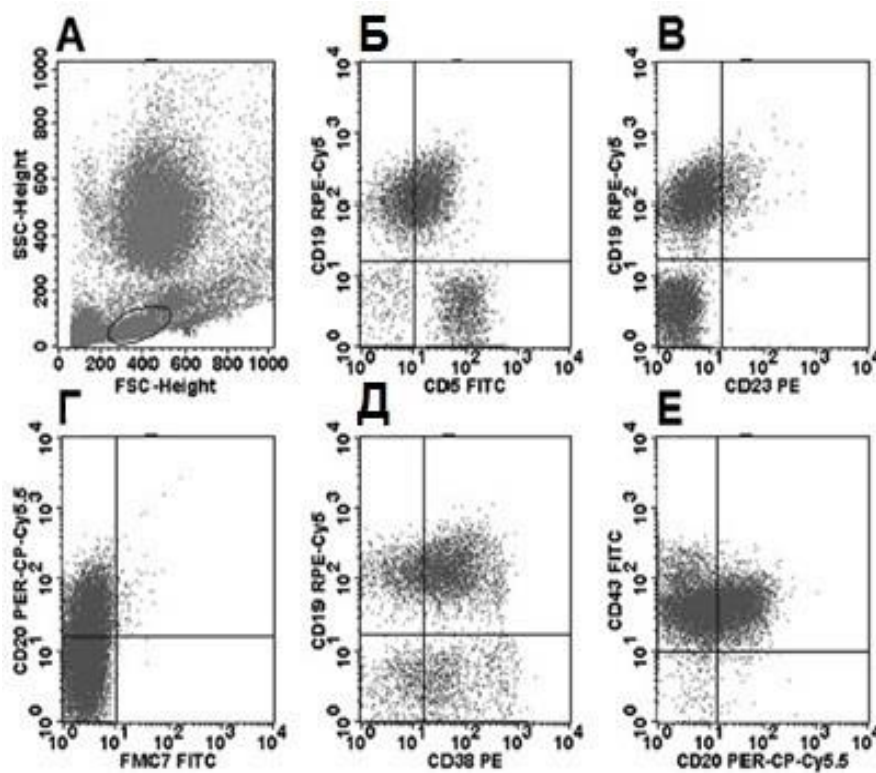


**Рис. 1.** Иммунофенотип клеток ЛКМЗ. **А** – лимфоцитарный полигон. **Б** – фенотип опухоли  $CD5+CD19+$ . **В** – фенотип лимфоцитов ЛКМЗ  $CD23low/-$ . **Г** – фенотип лимфоцитов ЛКМЗ  $CD20highFMC7+$ . **Д** – клетки имеют высокий уровень активации по  $CD38$ . **Е** – фенотип лимфоцитов ЛКМЗ  $CD43low/-$ .



**Рис. 2.** Иммунофенотип клеток В-ХЛЛ. **А** – лимфоцитарный полигон. **Б** – фенотип опухоли  $CD5+CD19+$ . **В** – фенотип лимфоцитов В-ХЛЛ  $CD23+$ . **Г** – фенотип лимфоцитов В-ХЛЛ  $CD20lowFMC7-$ . **Д** – опухолевые клетки имеют низкий уровень активации по  $CD38$ . **Е** – фенотип лимфоцитов В-ХЛЛ  $CD43+$ .

Для образцов крови и 4 образцов селезенок отсутствие лимфатических опухолей было подтверждено методом проточной цитофлуориметрии. Для всех образцов в выборке было оценено относительное нормализованное количество кДНК гена циклина D1, которое составляло 0,0046-0,0001 (медиана – 0,00033) и достоверно отличало эти образцы от  $CD5+$  В-клеточных лимфом.



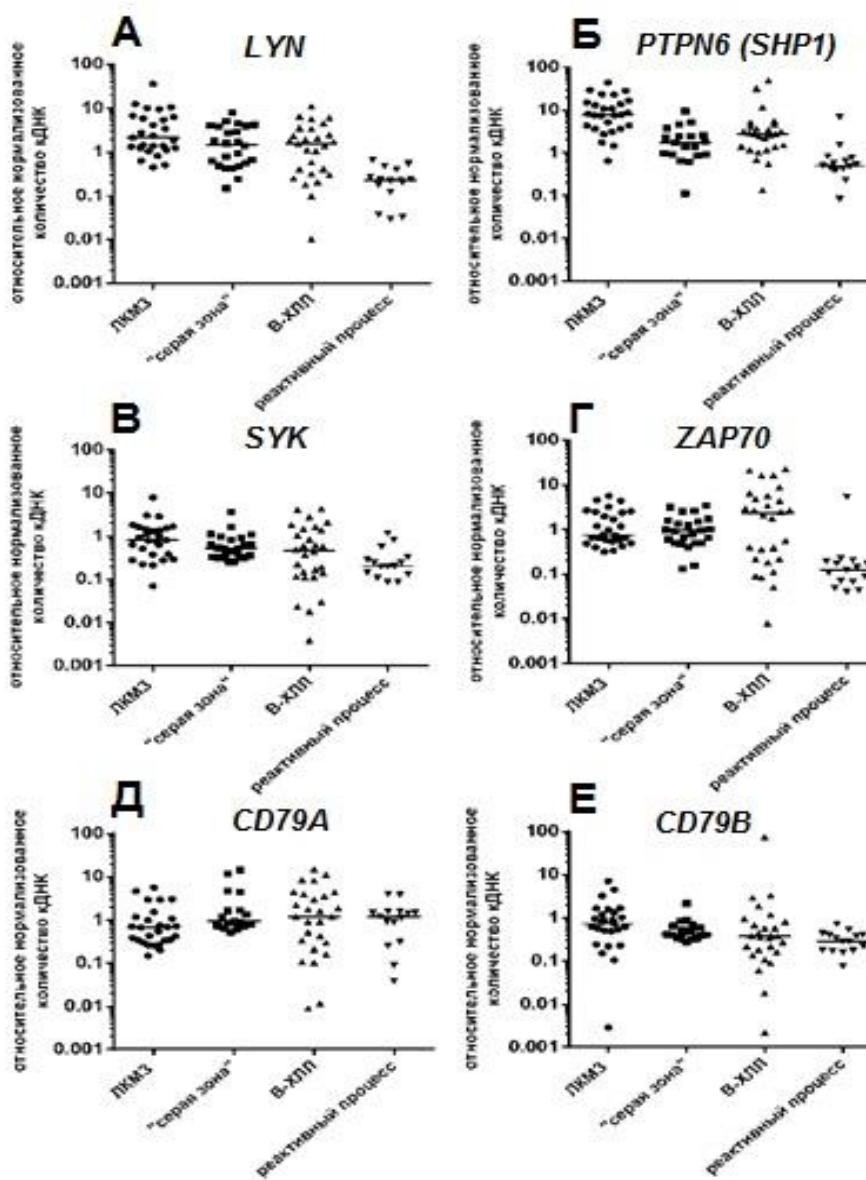
**Рис. 3.** Иммунофенотип клеток лимфомы «серой зоны». **А** – лимфоцитарный полигон. **Б** – фенотип опухоли  $CD5^{+}/lowCD19^{+}$ . **В** – фенотип лимфоцитов  $CD23^{-}$ . **Г** – фенотип лимфоцитов  $CD20^{low}FMC7^{-}$ . **Д** – опухолевые клетки имеют высокий уровень активации по  $CD38$ . **Е** – фенотип лимфоцитов  $CD43^{low}$ .

Таким образом, 94 исследованных образца лимфоидной ткани человека (79 образцов  $CD5^{+}$  В-клеточных лимфом и 15 образцов реактивной лимфоидной ткани) были разделены на четыре группы в соответствии с их иммунофенотипом, гистологической картиной (для солидных тканей) и уровнем экспрессии мРНК гена циклина D1. В группу ЛКМЗ были отнесены 27 образцов; в группу В-ХЛЛ были отнесены 28 образцов; 24 образца с промежуточным фенотипом были отнесены в группу лимфом «серой зоны»; 15 образцов реактивной лимфоидной ткани были взяты в качестве контроля.

#### **Определение уровней экспрессии мРНК генов сигнальных белков BCR-каскада в опухолевой и реактивной лимфоидной ткани.**

Из 94 образцов опухолевой и реактивной лимфоидной ткани была выделена РНК, транскрибирована кДНК и поставлена полимеразная цепная реакция в реальном времени для оценки уровней экспрессии генов сигнальных белков BCR-каскада. В группах различных В-клеточных лимфом и реактивной лимфоидной ткани анализировались уровни экспрессии генов  $CD79A$  и  $CD79B$ , BCR-ассоциированных тирозинкиназ  $LYN$ ,  $SYK$ ,  $ZAP70$ , а также тирозинфосфатазы  $SHPI$  (Рис.4). Для сравнения выборок использовался тест Манна-Уитни.

Для гена  $LYN$  (Рис.4, **А**) разброс значений относительных нормализованных уровней экспрессии составил 35,41-0,45 (медиана – 2,11) в выборке ЛКМЗ; 7,73-0,15 (медиана – 1,48) в выборке лимфом «серой зоны»; 11,11-0,01 (медиана – 1,55) в выборке В-ХЛЛ; 0,65-0,03 (медиана – 0,23) в выборке реактивной лимфоидной ткани. Достоверные



**Рис. 4.**

Относительное нормализованное количество кДНК генов сигнальных белков BCR-каскада в неотсортированных образцах лимфом. **А** – уровень экспрессии гена *LYN*. **Б** – уровень экспрессии гена *PTPN6 (SHP1)*. **В** – уровень экспрессии гена *SYK*. **Г** – уровень экспрессии гена *ZAP70*. **Д** – уровень экспрессии гена *CD79A*. **Е** – уровень экспрессии гена *CD79B*.

отличия ( $p < 0,05$ ) были получены для группы реактивной лимфоидной ткани (самый низкий уровень экспрессии *LYN*) и другими группами. Кроме того, достоверные отличия были получены для групп ЛКМЗ и В-ХЛЛ (экспрессия гена *LYN* выше при ЛКМЗ, чем при В-ХЛЛ). Группы В-ХЛЛ и лимфом «серой зоны», а также ЛКМЗ и лимфом «серой зоны» по уровню экспрессии данного гена достоверно не различались.

Для *SHP1 (PTPN6)* (Рис.4, **Б**) разброс значений относительных нормализованных уровней экспрессии составил 43,79-0,64 (медиана – 7,80) в выборке ЛКМЗ; 9,46-0,11 (медиана – 1,73) в выборке лимфом «серой зоны»; 49,45-0,13 (медиана – 2,75) в выборке В-ХЛЛ; 6,82-0,08 (медиана – 0,49) в выборке реактивной лимфоидной ткани. Уровень мРНК гена *SHP-1* достоверно ( $p < 0,05$ ) был достоверно понижен в выборке реактивной лимфоидной ткани по сравнению с другими исследуемыми группами и повышен в выборке ЛКМЗ по сравнению с другими исследуемыми группами. Группы В-ХЛЛ и лимфом «серой зоны» достоверно не различались.

Для *SYK* (Рис.4, **В**) разброс значений относительных нормализованных уровней экспрессии составил 7,91-0,07 (медиана – 0,80) в выборке ЛКМЗ, 3,56-0,26 (медиана – 0,52) в выборке лимфом «серой зоны», 4,31-0,004 (медиана – 0,47) в выборке В-ХЛЛ, 1,15-0,08 (медиана – 0,20) в выборке реактивной лимфоидной ткани. Достоверные отличия ( $p < 0,05$ ) были получены для групп ЛКМЗ и В-ХЛЛ (экспрессия гена *SYK* выше при ЛКМЗ, чем при В-ХЛЛ), для групп ЛКМЗ и реактивной лимфоидной ткани, а также для групп лимфом «серой зоны» и реактивной лимфоидной ткани. Достоверных отличий для групп В-ХЛЛ и лимфом «серой зоны», а также В-ХЛЛ и реактивной лимфоидной ткани получить не удалось из-за большого разброса значений уровня экспрессии *SYK* в выборке В-ХЛЛ.

Для *ZAP70* (Рис.4, **Г**) разброс значений относительных нормализованных уровней экспрессии составил 5,61-0,31 (медиана – 0,75) в выборке ЛКМЗ, 3,33-0,13 (медиана – 0,94) в выборке лимфом «серой зоны», 22,45-0,008 (медиана – 2,26) в выборке В-ХЛЛ, 5,32-0,04 (медиана – 0,12) в выборке реактивной лимфоидной ткани. В выборке В-ХЛЛ разброс значений экспрессии *ZAP-70* был наибольшим; внутри этой группы можно было выделить две подгруппы – с низким и высоким относительным уровнем экспрессии *ZAP-70*. Достоверные отличия ( $p < 0,05$ ) удалось получить для групп реактивной лимфоидной ткани (самый низкий уровень экспрессии *ZAP-70*) и всех других групп. Достоверных отличий для группы В-ХЛЛ и других исследуемых групп получить не удалось из-за большого разброса значений в выборке В-ХЛЛ. Группы ЛКМЗ и лимфом «серой зоны» также достоверно не различались.

Для *CD79A* (Рис.4, **Д**) разброс значений относительных нормализованных уровней экспрессии составил 5,61-0,15 (медиана – 0,67) в выборке ЛКМЗ, 14,19-0,52 (медиана – 0,93) в выборке лимфом «серой зоны», 14,84-0,009 (медиана – 1,19) в выборке В-ХЛЛ, 3,96-0,04 (медиана – 1,20) в выборке реактивной лимфоидной ткани. Уровень экспрессии *CD79A* достоверно понижен ( $p < 0,05$ ) в выборке ЛКМЗ по сравнению с группой лимфом «серой зоны». Другие группы между собой достоверно не различались.

Для *CD79B* (Рис.4, **Е**) разброс значений относительных нормализованных уровней экспрессии составил 7,06-0,0005 (медиана – 0,73) в выборке ЛКМЗ, 2,17-0,26 (медиана – 0,41) в выборке лимфом «серой зоны», 74,14-0,002 (медиана – 0,37) в выборке В-ХЛЛ, 0,72-0,07 (медиана – 0,29) в выборке реактивной лимфоидной ткани. Достоверные отличия ( $p < 0,05$ ) были получены для групп ЛКМЗ и реактивной лимфоидной ткани, а также для групп лимфом «серой зоны» и реактивной лимфоидной ткани. Кроме того, достоверные отличия были получены для групп В-ХЛЛ и ЛКМЗ (экспрессия гена *CD79B* выше при ЛКМЗ, чем при В-ХЛЛ). Другие группы между собой достоверно не различались.

Таким образом, группа В-ХЛЛ демонстрирует наибольший разброс уровней экспрессии генов сигнальных белков BCR-каскада и отличается от группы ЛКМЗ по достоверно сниженным уровням экспрессии мРНК генов *LYN*, *PTPN6 (SHP1)*, *SYK*, *CD79B*, но не по уровню экспрессии мРНК *CD79A*. По уровню экспрессии гена *ZAP70* группа В-ХЛЛ делится на две подгруппы: *ZAP70high* и *ZAP70low*, что отличает ее как от группы ЛКМЗ, так и от группы лимфом «серой зоны».

Группа лимфом «серой зоны» занимает промежуточное положение между группами В-ХЛЛ и ЛКМЗ по уровням экспрессии мРНК сигнальных белков BCR-каскада и достоверно отличается от ЛКМЗ по снижению уровню экспрессии мРНК *PTPN6 (SHP1)* и повышенному уровню экспрессии мРНК *CD79A*, а от В-ХЛЛ по отсутствию разделения на *ZAP70high* и *ZAP70low* популяции внутри выборки.

Достоверно сниженный уровень экспрессии мРНК генов *LYN*, *PTPN6 (SHP1)*, *SYK*, *ZAP70* и *CD79B* наблюдался в образцах реактивных контролей по сравнению с опухолевыми образцами, что требует дополнительной оценки их уровней экспрессии в чистых субпопуляциях В-лимфоцитов.

#### **Описание CD5+CD19+ популяции неопухолевых лимфоцитов миндалин.**

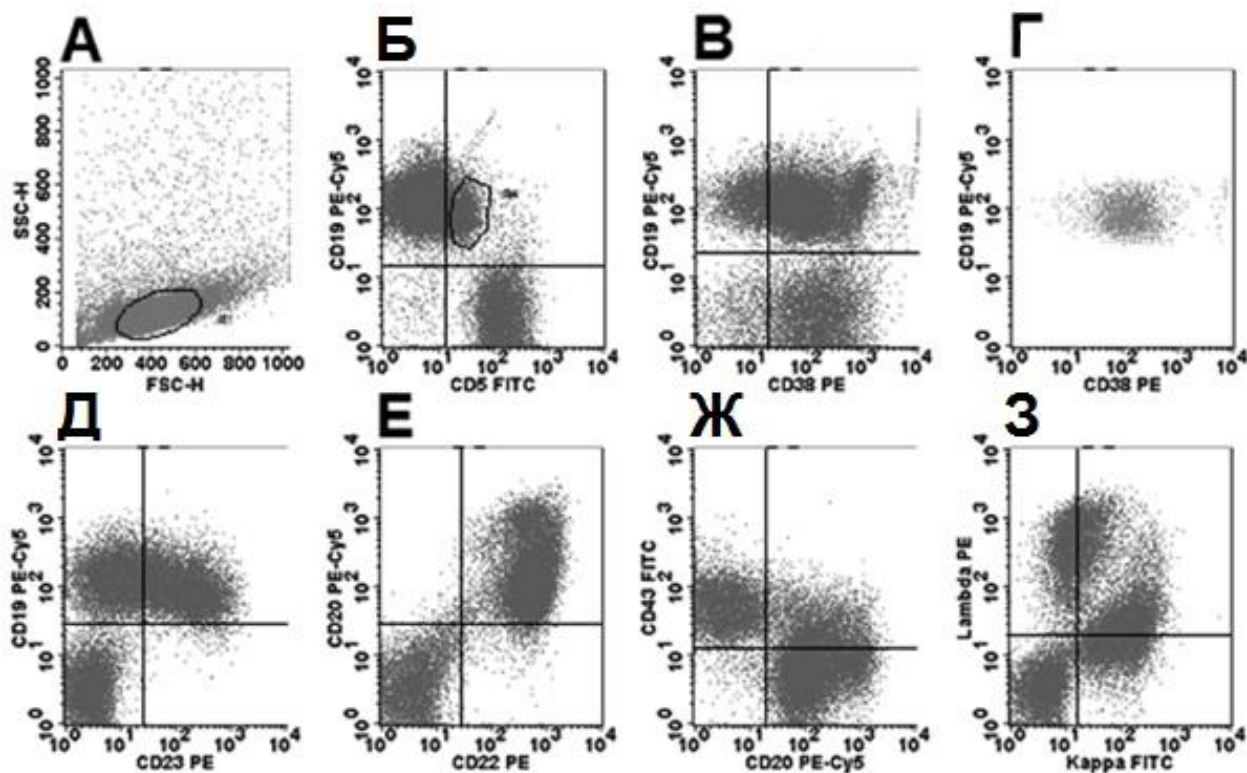
Суспензии 40 образцов миндалин детей 2-14 лет были проанализированы методом проточной цитофлуориметрии: во всех образцах детектировалась популяция неопухолевых В-клеток с фенотипом CD5+lowCD19+ (Рис.5-6), составлявшая 3-45% В-клеток в образце. Развернутое иммунофенотипирование с использованием шестицветной метки (Рис.6) показало, что все образцы CD5+ В-клеток имели схожий активированный фенотип (CD38+, CD25+) и отличались от В-ХЛЛ по уровням экспрессии CD23, CD43 и CD27. Таким образом, популяция неопухолевых CD5+ В-клеток детектируется в миндалинах человека и имеет фенотип: **CD5+low/CD19+/CD38+/CD43-/CD23-/CD27-low/CD25-**.

#### **Сортировка нормальных клеток из периферической крови и суспензий миндалин человека и опухолевых клеток В-ХЛЛ. Определение уровней экспрессии мРНК генов сигнальных молекул BCR-каскада в чистых субпопуляциях.**

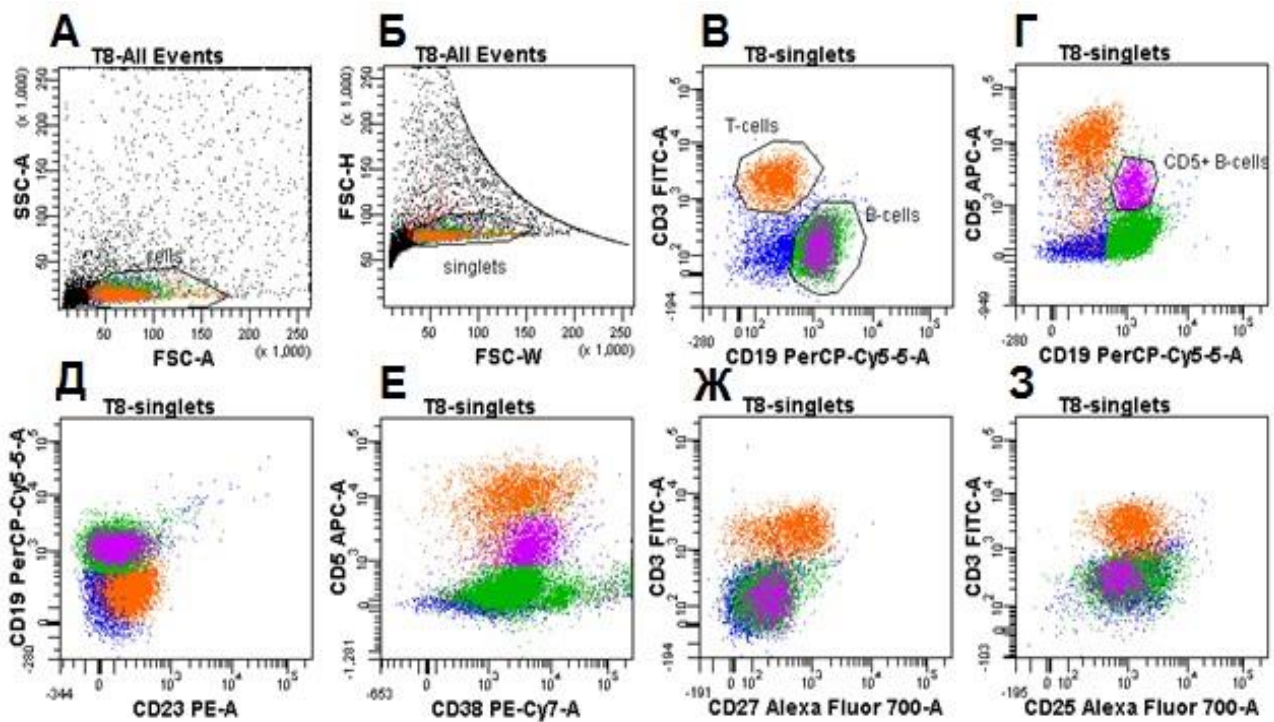
Для определения уровней экспрессии генов BCR-ассоциированных сигнальных молекул в чистых популяциях были отсортированы CD5+ В-клетки из 23 образцов В-ХЛЛ и 10 образцов CD5+ неопухолевых В-лимфоцитов человека из суспензии миндалин. Дополнительно были отсортированы Т-клетки и В-клетки из 10 образцов мононуклеаров периферической крови здоровых доноров. В норме В-клетки периферической крови имеют фенотип CD5-. Эффективность сортировки во всех случаях превысила 98%. Из отсортированных образцов опухолевых и неопухолевых клеток была выделена РНК,

транскрибирована кДНК и поставлена полимеразная цепная реакция в реальном времени для оценки уровней экспрессии генов сигнальных молекул ВСR-каскада. Значения относительных нормализованных уровней экспрессии генов в выборках не подчиняются законам нормального распределения, как и в случае с неотсортированными пробами (Рис.7). Для статистического анализа, таким образом, использовались разброс, медиана и тест Манна-Уитни для сравнения выборок.

Для *LYN* (Рис.7, А) разброс значений относительных нормализованных уровней экспрессии составил 1,84-0,05 (медиана – 0,24) в выборке отсортированных образцов В-ХЛЛ; 0,09-0 (медиана – 0,01) в выборке отсортированных Т-клеток периферической крови; 3,49-0,35 (медиана – 0,68) в выборке отсортированных В-клеток периферической крови; 17,28-0,60 (медиана – 2,62) в выборке отсортированных CD5+ В-клеток миндалин. Достоверные отличия ( $p < 0,05$ ) были получены для группы отсортированных Т-клеток (самый низкий уровень экспрессии *LYN*, в 5 случаях из 10 не детектируемый) и всех



**Рис. 5.** Иммунофенотип клеток миндалин. **А** – лимфоцитарный полигон. **Б** – популяция с фенотипом  $CD5+lowCD19+$ . **В** – В-лимфоциты имеют высокий уровень активации. **Г** – полигон ( $CD5+lowCD19+$  В-лимфоциты), отложенный в координатах  $CD19/CD38$ . Популяция  $CD5+$  В-лимфоцитов миндалин имеет фенотип  $CD38+$ , но не  $CD38high$ . **Д** – В-лимфоциты миндалин гетерогенны по уровню экспрессии  $CD23$ . **Е** – В-клетки имеют высокий уровень  $CD20$  и  $CD22$ . **Ж** – В-клетки отрицательны или слабо положительны по  $CD43$  (фенотип «-low»). **З** – В-лимфоциты суспензии миндалин поликлональны.



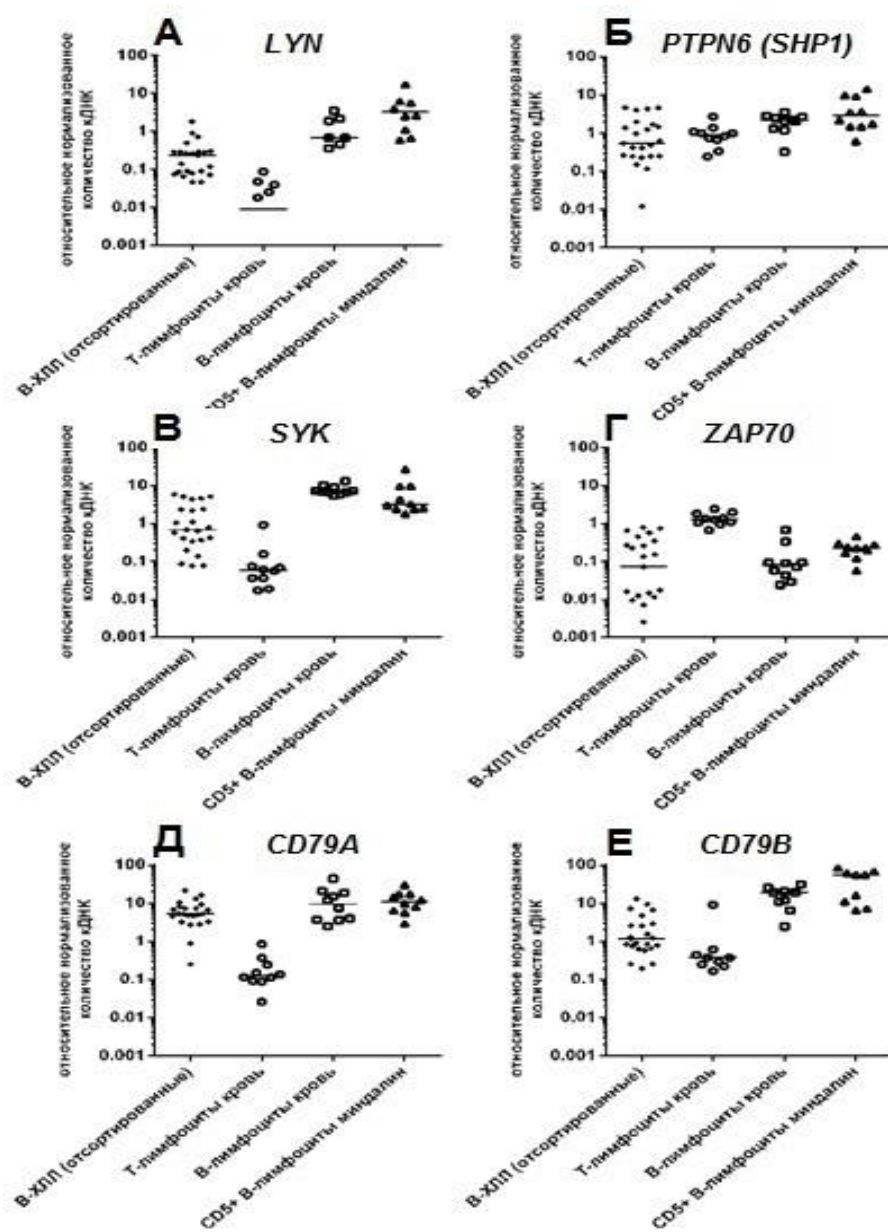
**Рис. 6.** Развернутое иммунофенотипирование нормальных  $CD5^+$  В-клеток суспензии миндалин. **А** – лимфоцитарный полигон. **Б** – синглеты. **В** – Т- и В-лимфоциты. **Г** – фиолетовым выделена популяция В-лимфоцитов с фенотипом  $CD19^+CD5^{low}$  – гейт для сортировки. **Д** – выделенные В-клетки имеют фенотип  $CD5^+CD19^+CD23^-$ . **Е** – выделенные В-клетки имеют фенотип  $CD5^+CD19^+CD38^+$ . **Ж** – выделенные В-клетки имеют фенотип  $CD5^+CD19^+CD27^{low}$ . **З** – выделенные В-клетки имеют фенотип  $CD5^+CD19^+CD25^-$ .

других групп. Кроме того, достоверные отличия были получены для отсортированных образцов В-ХЛЛ и всех других групп (экспрессия гена *LYN* при В-ХЛЛ выше, чем в Т- и ниже, чем в нормальных В-клетках). Достоверных отличий между группами неопухолевых В-лимфоцитов периферической крови и  $CD5^+$  В-лимфоцитами миндалин обнаружено не было.

Для *SHP1* (*PTPN6*) (Рис.7, **Б**) разброс значений относительных нормализованных уровней экспрессии составил 4,63-0,01 (медиана – 0,53) в выборке отсортированных образцов В-ХЛЛ; 2,70-0,24 (медиана – 0,91) в выборке отсортированных Т-клеток периферической крови; 3,56-0,33 (медиана – 2,17) в выборке отсортированных В-клеток периферической крови; 14,00-0,61 (медиана – 2,81) в выборке отсортированных  $CD5^+$  В-клеток миндалин. Достоверные отличия ( $p < 0,05$ ) были обнаружены между группами Т-клеток и группами неопухолевых В-клеток (как периферической крови, так и миндалин), но не между Т-клетками и образцами В-ХЛЛ. Группа отсортированных образцов В-ХЛЛ



также достоверно отличалась от двух групп неопухолевых В-клеток по уровню экспрессии *SHP1*. Достоверных отличий между группами неопухолевых В-лимфоцитов периферической крови и миндалин обнаружено не было.



**Рис.7.**  
Относительное нормализованное количество кДНК генов сигнальных молекул ВСР-каскада в отсортированных пробах. **А** – уровень экспрессии гена *LYN*. **В** – уровень экспрессии гена *PTPN6 (SHP1)*. **С** – уровень экспрессии гена *SYK*. **Д** – уровень экспрессии гена *ZAP70*. **Е** – уровень экспрессии гена *CD79A*. **Ф** – уровень экспрессии гена *CD79B*.

Для *SYK* (Рис.7, **В**) разброс значений относительных нормализованных уровней экспрессии со ставил 5,79-0,08 (медиана – 0,68) в выборке отсортированных образцов В-ХЛЛ; 0,91-0,02 (медиана – 0,06) в выборке отсортированных Т-клеток; 12,97-5,32 (медиана – 7,03) в выборке отсортированных В-клеток периферической крови; 26,81-1,80 (медиана – 3,12) в выборке отсортированных CD5+ В-клеток миндалин. Достоверные отличия ( $p < 0,05$ ) были получены для группы отсортированных Т-клеток и всех других групп, а также для группы В-ХЛЛ и всех других групп (экспрессия гена *SYK* при В-ХЛЛ выше, чем в образцах Т-клеток и ниже, чем в нормальных В-клетках). Достоверных отличий для групп неопухолевых В-лимфоцитов крови и неопухолевых CD5+ В-

лимфоцитов миндалин обнаружено не было.

Для *ZAP70* (Рис.7, *Г*) разброс значений относительных нормализованных уровней экспрессии составил 0,78-0 (медиана – 0,07) в выборке отсортированных образцов В-ХЛЛ. В отсортированных образцах сохранилась та же тенденция, что и в неотсортированных пробах В-ХЛЛ (Рис.4, *Г*): общая выборка В-ХЛЛ делится на подгруппы с низким и высоким уровнем экспрессии мРНК *ZAP70*. Полученные результаты позволяют утверждать, что подобный разброс является следствием разных свойств опухолевых клеток В-ХЛЛ у разных пациентов и никак не зависит от примесей Т-клеток в пробе. В выборках неопухолевых контролей разброс значений относительных нормализованных уровней экспрессии *ZAP70* составил 2,42-0,66 (медиана – 1,30) в выборке отсортированных Т-клеток; 0,68-0,02 (медиана – 0,08) в выборке отсортированных В-клеток периферической крови; 0,45-0,06 (медиана – 0,22) в выборке отсортированных CD5+ В-клеток миндалин. Достоверные отличия ( $p < 0,05$ ) были получены для группы отсортированных Т-клеток (самый высокий уровень экспрессии *ZAP70*) и всех других групп. Также достоверные отличия были обнаружены между В-клетками периферической крови и CD5+ В-клетками миндалин (в миндалинах уровень экспрессии гена *ZAP70* достоверно повышен по сравнению с периферической кровью). Достоверных отличий для отсортированных образцов В-ХЛЛ и неопухолевых В-клеток (периферической крови и миндалин) получить не удалось из-за большого разброса значений в выборке В-ХЛЛ.

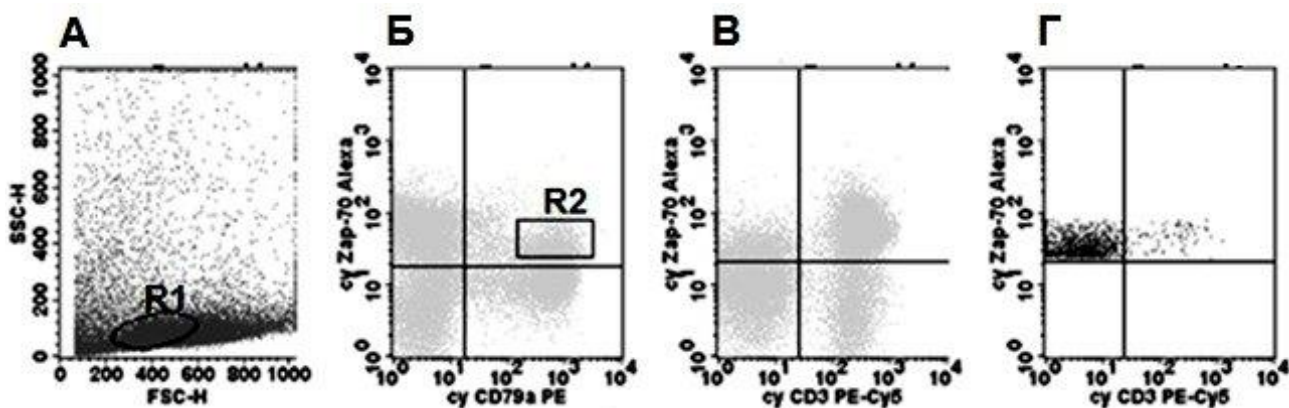
Для *CD79A* (Рис.7, *Д*) разброс значений относительных нормализованных уровней экспрессии составил 21,40-0,25 (медиана – 5,22) в выборке отсортированных образцов В-ХЛЛ; 0,85-0,03 (медиана – 0,13) в выборке отсортированных Т-клеток; 43,76-2,50 (медиана – 9,63) в выборке отсортированных В-клеток периферической крови; 30,00-2,90 (медиана – 11,04) в выборке отсортированных CD5+ В-клеток миндалин. Достоверные отличия ( $p < 0,05$ ) были получены для группы Т-клеток (самый низкий уровень экспрессии *CD79A*) и всех других групп. Также группа В-ХЛЛ достоверно отличалась от группы CD5+ В-клеток миндалин по уровню экспрессии *CD79A*. Достоверных отличий для групп В-ХЛЛ и В-клеток периферической крови, а также для В-клеток периферической крови и CD5+ В-клеток миндалин обнаружено не было.

Для *CD79B* (Рис.7, *Е*) разброс значений относительных нормализованных уровней экспрессии составил 12,97-0,19 (медиана – 1,15) в выборке отсортированных образцов В-ХЛЛ; 9,10-0,17 (медиана – 0,37) в выборке отсортированных Т-клеток; 31,57-2,47 (медиана – 19,18) в выборке отсортированных В-клеток периферической крови; 84,25-6,50 (медиана – 55,72) в выборке отсортированных CD5+ В-клеток миндалин. Достоверные отличия ( $p < 0,05$ ) были получены для группы Т-клеток (самый низкий уровень экспрессии

*CD79B*) и всех других групп, а также для отсортированных образцов В-ХЛЛ и всех других групп. Достоверных отличий для В-лимфоцитов периферической крови и CD5+ В-лимфоцитов миндалин обнаружено не было.

Таким образом, по уровням экспрессии генов сигнальных BCR-ассоциированных молекул опухолевые лимфоциты В-ХЛЛ можно отличить от субпопуляций нормальных В-лимфоцитов. Однако различные субпопуляции нормальных В-лимфоцитов не различаются между собой за исключением повышенного уровня экспрессии *ZAP70* в CD5+ В-клетках миндалин. Выборка В-ХЛЛ делится на группы *ZAP70*<sub>low</sub> и *ZAP70*<sub>high</sub> как до, так и после сортировки.

Для проверки данных об экспрессии тирозинкиназы *ZAP-70* в CD5+ В-лимфоцитах миндалин 15 образцов клеток из суспензии миндалин были внутриклеточно окрашены на *ZAP-70* для проточной цитофлуориметрии. В 8 случаях из 15 в образцах выявлялась популяция В-клеток, экспрессирующая эту тирозинкиназу (Рис. 8).



**Рис. 8.** *ZAP-70*<sup>+</sup> В-клетки в суспензии миндалин. А – R1 – лимфоцитарный полигон. В – Выделение *ZAP-70*<sup>+</sup> В-лимфоцитов – полигон R2. С – Т-лимфоциты имеют высокий уровень *ZAP-70*. D – полигон R2 (*ZAP-70*<sup>+</sup> В-лимфоциты).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данная работа показывает, что выборки В-ХЛЛ и ЛКМЗ достоверно отличаются друг от друга по уровням экспрессии мРНК большинства сигнальных BCR-ассоциированных молекул. Достоверные отличия были установлены для пяти генов из шести, что дает дополнительные возможности для дискриминации этих двух нозологий. Пониженные уровни экспрессии мРНК генов *LYN*, *SHP1*, *SYK* и *CD79B* в группе В-ХЛЛ по сравнению с ЛКМЗ согласуются с представлением о том, что клетки В-ХЛЛ экспрессируют на низком уровне конститутивно активные сигнальные молекулы (Contri et al., 2005; Gobessi et al., 2009; Duhren-von Minden et al., 2012) и имеют более агрессивный

статус в зависимости от способности воспринимать максимальное количество активирующих сигналов (Cesano et al., 2013). Клетки ЛКМЗ, очевидно, проходят иной путь малигнизации, сохраняя поверхностные элементы BCR-каскада в состоянии максимально приближенном к норме и в наибольшей степени завися от мутаций гена основного эффектора сигнального пути – циклина D1 (Raffeld, Jaffe, 1991). Достоверных различий между группами В-ХЛЛ и ЛКМЗ не наблюдалось только по уровню экспрессии мРНК гена *CD79A*: по-видимому, экспрессия этого гена не является лимитирующей для сборки BCR.

Выделенная группа лимфом «серой зоны» включала спорные с диагностической точки зрения случаи, описанные Xianfeng Zhao (Zhao, 2009). При анализе уровней экспрессии мРНК сигнальных белков BCR-каскада она оказалась весьма гомогенной: разброс значений относительных нормализованных уровней экспрессии исследуемых генов был сопоставим с разбросом в группе ЛКМЗ и ниже разброса в группе «классических» В-ХЛЛ. При этом от группы ЛКМЗ она достоверно отличалась по уровням экспрессии двух генов из шести: *SHP1* и *CD79A*. В целом, группа лимфом «серой зоны» более всего походила на *ZAP70*- В-ХЛЛ. Дальнейший интерес может представлять анализ экспрессии генов сигнальных компонентов BCR-каскада в отсортированных образцах ЛКМЗ, В-ХЛЛ и лимфом «серой зоны». Возможно, это позволит установить более тонкие различия между ними.

Полученные данные позволяют говорить об общем паттерне экспрессии сигнальных белков BCR-каскада для нормальных В-лимфоцитов независимо от их поверхностного иммунофенотипа и гистологической локализации, так как относительные нормализованные количества кДНК исследуемых генов не демонстрировали достоверных различий для выборок CD5- В-лимфоцитов периферической крови и CD5+ В-лимфоцитов миндалин человека. Исключение составляет ген *ZAP70*, относительный нормализованный уровень экспрессии которого достоверно повышен в группе CD5+ В-лимфоцитов миндалин. Возможно, тирозинкиназа *ZAP-70* дополнительно экспрессируется в нормальных CD5+ В-лимфоцитах в некоторых физиологических условиях. *ZAP-70*-положительные неопухолевые В-лимфоциты были описаны у человека как малая субпопуляция (Nolz et al., 2005; Davis, Schwartz, 2006), локализуемая, в частности, в миндалинах (Scielzo et al., 2006). Однако никаких данных о преимущественной коэкспрессии поверхностного CD5 и внутриклеточной тирозинкиназы *ZAP-70* в литературе нет.

При сравнении отсортированных опухолевых клеток В-ХЛЛ и нормальных В-лимфоцитов был подтвержден пониженный уровень экспрессии всех исследуемых генов в

опухоли по сравнению с нормальными контролями. Исключение составляет только ген *CD79A*, который не различался также по уровню относительной нормализованной экспрессии в разных лимфомах. По-видимому, его количество не является лимитирующим фактором при сборке В-клеточного рецептора, а уровень его экспрессии регулируется независимо от других компонентов BCR-каскада.

## ВЫВОДЫ

1. В-зрелоклеточные лимфомы отличаются от нормальной лимфоидной ткани по уровням экспрессии генов сигнальных белков BCR-каскада.
2. CD5+ В-лимфоциты миндалин человека не отличаются от нормальных В-лимфоцитов периферической крови по уровням экспрессии генов сигнальных белков BCR-каскада, за исключением повышенного уровня экспрессии гена *ZAP70*.
3. В-зрелоклеточные лимфомы В-ХЛЛ и ЛКМЗ различаются между собой по уровням экспрессии мРНК генов сигнальных белков BCR-каскада *LYN*, *SYK*, *SHPI1*, *CD79B*.
4. Между нозологическими группами В-ХЛЛ и ЛКМЗ выделяется группа лимфом «серой зоны», иммунофенотипически не соответствующая ни одной из них и достоверно отличающаяся от ЛКМЗ по уровню экспрессии генов *SHPI1* и *CD79A*.
5. Клетки В-ХЛЛ имеют достоверно сниженные уровни экспрессии генов *LYN*, *SYK*, *SHPI1*, *CD79B*, по сравнению с субпопуляциями нормальных CD5+ и CD5- В-лимфоцитов.
6. По уровню экспрессии гена *ZAP70* можно выделить два варианта В-ХЛЛ.

### Список работ, опубликованных по теме диссертации

- 1) **Potashnikova D.**, Gladkikh A., Vorobjev I.A. Selection of Superior Reference Genes' Combination for Quantitative Real-time PCR in B-cell Lymphomas. // *Ann Clin Lab Sci.* – 2015. –V.45. №1. –P.64-72.
- 2) Barteneva N.S., Ketman K., Fasler-Kan E., **Potashnikova D.**, Vorobjev I.A. Cell sorting in cancer research--diminishing degree of cell heterogeneity. // *Biochim Biophys Acta. Reviews on cancer.* –2013. –V.1836. №1. –P.105-122.
- 3) Гладких А.А., **Поташникова Д.М.**, Корнева Е.П., Худолеева О.А., Воробьев И.А. Сравнительный анализ экспрессии циклина D1 в клетках В-клеточных лимфом и реактивного лимфаденита. // *Гематология и трансфузиология.* –2011. –V.56. №4. – P.3-11.
- 4) Gladkikh A., **Potashnikova D.**, Korneva E., Khudoleeva O., Vorobjev I. Cyclin D1 expression in B-cell lymphomas. // *Exp Hematol.* –2010. –V.38. №11. –P.1047-1057.

### Тезисы конференций

- 1) **Potashnikova D.**, Barteneva N, Gladkikh A, Gretsov E, Vorobjev I. Expression of BCR associated molecules in normal and malignant lymphocytes. // *Abstracts of the 18<sup>th</sup> Leipziger Workshop, 2013, #P001.*
- 2) **Potashnikova D.**, Gladkikh A, Gretsov E, Barteneva N, Vorobjev I. Expresion of BCR – associated signaling components in sorted B-CLL cells. // *Abstracts of the 2<sup>nd</sup> International Workshop on Practical Cytometry, 2011. Cytometry B.* –2012. –V.82, – P.01-017.
- 3) Gladkikh A., **Potashnikova D.**, Korneva E, Khudoleeva O, Vorobjev I. Cyclin D1 expression in B-cell lymphomas: a comparative study. // *Abstracts of EHA 2010. Haematologica.* –2010. –V.95s. –P.516. #1268.