На правах рукописи

Почтарь Евгений Владимирович

ЭКСПРЕССИЯ В-КЛЕТОЧНЫХ МАРКЕРОВ ROR-1, CD180 И ЗНАЧЕНИЕ СУБПОПУЛЯЦИЙ Т-ЛИМФОЦИТОВ И НАТУРАЛЬНЫХ КИЛЛЕРОВ В ОЦЕНКЕ ТЕЧЕНИЯ ХРОНИЧЕСКОГО ЛИМФОЛЕЙКОЗА

3.3.8. – Клиническая лабораторная диагностика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва – 2023

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении дополнительного профессионального образования «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

Луговская Светлана Алексеевна - доктор медицинских наук, профессор, профессор кафедры клинической лабораторной диагностики с курсом лабораторной иммунологии ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России

Официальные оппоненты:

Цаур Григорий Анатольевич, доктор медицинских наук, заведующий лабораторией молекулярной биологии, иммунофенотипирования и патоморфологии ГАУЗ СО «Областная детская клиническая больница», заведующий лабораторией клеточной терапии онкогематологических заболеваний ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий», г. Екатеринбург

Вавилова Татьяна Владимировна – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой лабораторной медицины с клиникой института медицинского образования ФГБУ НМИЦ имени В.А. Алмазова Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Санкт-Петербург

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «21» февраля 2024 года в 12:00 часов на заседании диссертационного совета 21.3.054.05 на базе Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения дополнительного профессионального образования «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 125993, г. Москва, ул. Баррикадная, д.2, стр.1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России по адресу: 125445, г. Москва, ул. Беломорская, д. 19/38 и на сайте https://www.rmapo.ru.

Автореферат разослан «____» _____ 2023 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор медицинских наук,
профессор Меньшикова Лариса Ивановна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы диссертационного исследования

Хронический лимфолейкоз (ХЛЛ) – опухоль лимфоидной ткани, характеризующаяся поражением костного мозга, периферической крови и вторичных лимфоидных органов. В соответствии с критериями ВОЗ 2022 г. диагноз ХЛЛ устанавливается при наличии в периферической крови более 5000/мкл моноклональных В-лимфоцитов с фенотипом CD19+CD5+CD23+CD79b^{dim}CD20^{dim}CD22^{dim}sIg^{dim}CD81^{dim}CD160^{dim} (E.S. Jaffe, et al., 2016; И.В. Поддубная, 2018; R. Alaggio et al., 2022).

Некоторые В-клеточные лимфопролиферативные новообразования, такие как, лимфома из клеток мантии, лимфома маргинальной зоны, лимфоплазмоцитарная лимфома имеют сходные клинико-морфологические и фенотипические характеристики, что диктует необходимость поиска новых дифференциально-диагностических маркеров.

Современные варианты противоопухолевой терапии способствуют увеличению продолжительности и улучшению качества жизни пациентов, но не приводят к полной эрадикации лейкемических клеток. Использование различных таргетных и химиотерапевтических режимов может формировать химиорефрактерный фенотип опухолевых клеток. Кроме того, мембранная экспрессия диагностических маркеров может снижаться или исчезать в зависимости от применяемых схем лечения. Так, использование ритуксимаба или обинутузумаба (антиCD20 моноклональные антитела) приводит к потере на мембране В-лимфоцитов CD20, а применение ибрутиниба снижает экспрессию таких маркеров, как CD200, CD20, CD38, CD43 и др. (A.C. Rawstron et al., 2016,2018). В связи с этим, актуальным является поиск новых диагностических маркеров, экспрессия которых остается стабильной на фоне терапии и в дальнейшем может быть использована в оценке остаточной опухолевой популяции. Одними из таких маркеров рассматриваются ROR1 и CD180.

Несмотря на успехи в лечении ХЛЛ с достижением молекулярной ремиссии, инфекционные заболевания являются частым осложнением течения хронического лимфолейкоза, а у 10-20% пациентов – основной причиной смерти (da Cunha-Bang et al., 2016). Они развиваются вследствие снижения клеточного и гуморального иммунитета в результате опухолевой прогрессии, а также иммуносупрессии, связанной с терапией. В связи с вышеизложенным, изучение субпопуляционного состава Т-, НК-клеток и моноцитов имеет важное значение в оценке клеточного и неспецифического звена иммунитета до начала терапии и в период иммунохимиотерапии.

Степень разработанности темы исследования

ROR-1 (receptor tyrosine kinase like orphan receptor-1) синтезируется во многих эмбриональных тканях (преобладает в нервной), в течение короткого периода времени экспрессируется на клетках предшественницах В-лимфоцитов. Аномальный синтез ROR1 обнаруживается в В-клетках различных злокачественных лимфом, клетках солидный опухолей и др. (Choudhury A. et al., 2010; Daneshmanesh A.H. et al., 2008; Zhang S. et al., 2012). Согласно немногочисленным исследованиям, экспрессия ROR1 регистрируется на опухолевых В-клетках при ХЛЛ, в то время как на нормальных зрелых В-лимфоцитах данный антиген практически не обнаруживается (Cui B. et al., 2016; Barna G. et al., 2011; Shabani M. et al., 2007; Hojjat-Farsangi M. et al., 2014).

Согласно литературным данным ROR-1 может стимулировать различные сигнальные пути, что приводит к повышению выживаемости, пролиферации и метастазированию опухолевых клеток (Каприна А.Д. и др., 2018). Однако исследования частоты и стабильности экспрессии ROR-1 на В-лимфоцитах при ХЛЛ в дебюте заболевания и на фоне проводимой терапии немногочисленны и требуют дальнейшего изучения.

CD180 – принадлежит к семейству Toll-подобных рецепторов, участвует в активации и пролиферации нормальных В-клеток. В норме он экспрессируется на В-клетках зоны мантии и маргинальной зоны, В-клетках зародышевых центров (слабо), моноцитах, дендритных клетках. В работах Porakishvili N с соавторами 2005 и 2011 гг. анализировалась экспрессии CD180 в зависимости от мутированного статуса генов IGVH), а в работах Gordiienko I. с соавторами, 2017 анализировалась коэкспрессия данного маркера с CD150 в качестве предполагаемых суррогатных маркеров благоприятного прогноза ХЛЛ. Однако оценка стабильности экспрессии CD180 как в дебюте, так и в динамике лечения ХЛЛ не проводилась.

Минимальной остаточной болезнью (МОБ) называют популяцию опухолевых клеток, не выявляемую цитологическими методами, которая может быть обнаружена в костном мозге и периферической крови высокочувствительными методами, такими как полимеразная цепная реакция (ПЦР) и многоцветная проточная цитометрия (МПЦ). Появление новых схем терапии ХЛЛ способствует увеличению продолжительности и улучшению качества жизни пациентов, но не приводит к полной эрадикации лейкемических клеток, а остаточная опухолевая популяция является источником рецидива заболевания (Кувшинов А.Ю. и др., 2016; Никитин Е.А., 2021; Миролюбова Ю.В. и др., 2020). Внедрение таргетной терапии ХЛЛ приводит к изменению экспрессии отдельных антигенов на поверхности В-лимфоцитов и требует поиска новых маркеров, сохраняющих стабильную экспрессию на фоне проводимой терапии для оценки МОБ, одним из которых может явиться ROR-1.

Оценка субпопуляционного состава лимфоцитов при ХЛЛ изучена достаточно хорошо. В большинстве проведенных исследований оценивались отдельные субпопуляции лимфоцитов, такие как НК- и Т-НК-клетки (Акинфеева О.В., 2011; Зотина Е.Н. и др., 2012) либо CD4+ и CD8+ лимфоциты (Hofland T. et al., 2019; Pourgheysari B. et al., 2010). Однако работ по комплексной оценке субпопуляционного состава лимфоцитов, изменений абсолютного числа отдельных субпопуляций Т-лимфоцитов и НК-клеток у пациентов с ХЛЛ в дебюте заболевания и на фоне различных схем терапии не проводилось.

Несмотря на успехи современной терапии ХЛЛ, возможности которой позволяют достичь глубокого молекулярного ответа, иммунологическая дисфункция по-прежнему является ключевым фактором, определяющим развитие инфекционных осложнений, которые становятся основной причиной в структуре смертности этих пациентов. Оценка субпопуляционного состава лимфоцитов дает возможность определить состояние клеточного и неспецифического звена иммунитета и оценить вероятность развития инфекционных осложнений.

В последние годы возник интерес к оценке моноцитов, как одних из основных компонентов клеточного микроокружения опухоли. Исследования по анализу количества и субпопуляционного состава моноцитов при ХЛЛ малочисленны и противоречивы. Так, в работе Maffei R et al., (2013) и Kowalska W. et al., (2022) отмечалось увеличение относительного содержания неклассических моноцитов, в то время как Damasceno D. et al., (2016) показали повышение промежуточных моноцитов.

При этом данные представлены в виде соотношения субпопуляций, без анализа их абсолютного количества.

Цель исследования: оценить экспрессию В-клеточных маркеров ROR-1, CD180, субпопуляционный состав Т-лимфоцитов, натуральных киллеров и моноцитов у пациентов с хроническим лимфолейкозом в дебюте заболевания и на фоне проводимой терапии

Задачи исследования

1. Определить диагностическое значение экспрессии маркеров ROR-1 и CD180 при хроническом лимфолейкозе.
2. Сопоставить результаты двух иммунофенотипических подходов в оценке минимальной остаточной болезни при ХЛЛ: стандартизированного ERIC (European Research Initiative on CLL) и с помощью набора Dura Clone (BC), включающего маркер ROR-1.
3. Оценить особенности субпопуляционного состава Т-лимфоцитов (Th, Tcyt, Treg, T-NK, наивные Т-лимфоциты, Т- клетки памяти, активированные Т-лимфоциты), НК-клеток в периферической крови у пациентов с ХЛЛ до лечения и в процессе терапии.
4. Проанализировать субпопуляционный состав моноцитов в периферической крови больных ХЛЛ.

Научная новизна результатов диссертационной работы

Полученные соискателем ученой степени научные данные позволили утверждать, что экспрессия ROR-1 определяется на всех опухолевых В-лимфоцитах, в то время как экспрессия CD180 вариабельна и выявлялась в 76% случаев пациентов ХЛЛ в дебюте заболевания и у 65% пациентов на различных схемах терапии. Стабильность экспрессии ROR-1 на опухолевых клетках, независимо от применяемых схем лечения, может использоваться в оценке минимальной остаточной болезни (МОБ) при ХЛЛ.

Изложены новые положения об особенностях изменения субпопуляционного состава Т-лимфоцитов и НК-клеток периферической крови в дебюте ХЛЛ и в ходе лечения различными схемами терапии. Впервые установлено восстановление нарушенного иммунологического баланса, а также снижение абсолютного числа регуляторных Т- клеток, что свидетельствует о повышении противоопухолевого ответа при использовании ибрутиниба в лечении ХЛЛ.

Расширены представления о субпопуляционном составе моноцитов периферической крови у пациентов ХЛЛ и доказано значение использования абсолютных показателей в интерпретации результатов.

Теоретическая и практическая значимость работы

Оценена диагностическая информативность исследования экспрессии маркеров ROR-1 и CD180 для первичной диагностики ХЛЛ и мониторинга минимальной остаточной болезни на фоне проводимой терапии.

На основании результатов исследования выявлена высокая корреляция двух методов оценки МОБ – международного стандартизированного 8-цветного метода и набора Dura Clone (BC), включающего ROR-1. Использование маркера ROR-1 в панели оценки МОБ ХЛЛ упрощает иммунофенотипическое исследование, а также заменяет оценку клональности В-лимфоцитов по рестрикции легких цепей, что

позволяет рекомендовать данный метод в практике клинико-диагностических лабораторий медицинских организаций.

Выявлены изменения субпопуляционного состава Т-лимфоцитов, НК-клеток и моноцитов, что позволяет оценить состояние клеточного и неспецифического звена иммунитета в динамике терапии ХЛЛ и качество его восстановления после терапии.

Положения, выносимые на защиту

1. Экспрессия ROR-1 не выявляется на В-лимфоцитах доноров и пациентов с реактивным лимфоцитозом и определяется во всех случаях ХЛЛ на опухолевых В-лимфоцитах. Экспрессия ROR-1 остается стабильной при лечении ХЛЛ, поэтому этот маркер может быть рекомендован для мониторинга МОБ. Определена высокая корреляция двух подходов в иммунофенотипической оценке МОБ с включением 8-цветной панели ROR-1. Экспрессия CD180 на клетках ХЛЛ непостоянна и встречалась у 76% пациентов в дебюте заболевания и у 65% пациентов на различных схемах лечения.
2. У нелеченых пациентов с ХЛЛ по сравнению с контролем в периферической крови регистрируются изменения как в субпопуляционном составе Т-лимфоцитов и НК-клеток, так и их функциональной активности. Использование препаратов с разным механизмом действия в лечении ХЛЛ показало восстановление иммунологического дисбаланса.
3. Во всех анализируемых группах пациентов ХЛЛ по отношению к донорам выявлены изменения в субпопуляционном составе моноцитов крови. У пациентов с ХЛЛ на терапии, не содержащей ибрутиниб, наблюдалась тенденция к снижению относительного числа классических моноцитов (МО1) и повышению субпопуляции неклассических моноцитов (МО3). Однако анализ абсолютных значений анализируемых субпопуляций моноцитов достоверных различий не выявил.

Методология и методы исследования

Методологической основой диссертационной работы является использование высокотехнологичного метода многоцветной многопараметрической проточной цитометрии с целью изучения экспрессии новых маркеров на опухолевых клетках при ХЛЛ с последующей их оценкой при исследовании МОБ. В работе использовались стандартизированные панели МКА с учетом международных и отечественных рекомендаций.

Иммунофенотипический метод применялся для оценки иммунологических нарушений в клеточном и неспецифическом звене иммунитета при ХЛЛ. Исследования проводились на проточных цитометрах BD FACSCanto II (BD Biosciences) и Navious (Beckman Coulter). Обработка результатов, полученных в ходе диссертационного исследования, осуществлялась с помощью компьютерных программ и статистического анализа по общепринятым методикам.

Статистическую обработку результатов исследования проводили по общепринятым методикам с использованием пакета GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., США). Для каждого массива данных проводилась оценка нормальности распределения с использованием критериев Колмогорова-Смирнова и Шапиро-Уилка. При нормальном распределении данных использовались параметрические методы. При ненормальном распределении данные представлялись в виде медианы, 10% и 90% процентиль и для анализа значимости различий использовались непараметрические методы. Критический уровень достоверности нулевой гипотезы принимался равным

0,05. Для расчета показателей чувствительности, специфичности, положительной прогностической ценности, отрицательной прогностической ценности и диагностической точности использовали стандартную четырехпольную таблицу сопряженности.

Степень достоверности и апробации результатов

Достоверность полученных результатов, научных положений, выводов и практических рекомендаций научного исследования обоснована изучением достаточного объема научной литературы, примененной методологией исследования, использованием адекватных поставленным задачам методов исследования. Достоверность результатов исследования также подтверждается достаточным объемом проведенных исследований и применением современных методов обработки и анализа материала с использованием корректного статистического инструментария. Результаты работы представлены на отечественных и зарубежных конгрессах и конференциях в формате докладов, тезисных и постерных сообщений.

Внедрение результатов исследования в практику

Практические рекомендации на основе выводов диссертации внедрены в практическую деятельность Московского городского гематологического центра ГБУЗ ГКБ им. С.П.Боткина Департамента здравоохранения г.Москвы (акт внедрения от 03.02.2023г.). Главные положения диссертации используются в учебном процессе по программам подготовки специалистов в ординатуре по специальности клиническая лабораторная диагностика, а также включены в учебный план циклов профессиональной переподготовки специалистов и повышения квалификации врачей на кафедре клинической лабораторной диагностики с курсом лабораторной иммунологии ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России (акт внедрения от 03.02.2023г.).

Личный вклад автора

Автором самостоятельно проведен анализ современной отечественной и зарубежной литературы по теме диссертационной работы, сформулирована задача, требующая разрешения, обоснована степень ее разработанности, в связи с чем определен методологический подход, выполнен сбор и анализ клинических и лабораторных данных. Автором проведены лабораторные исследования по анализу экспрессии ROR-1 и CD180 на опухолевых лимфоцитах, сравнению двух подходов определения МОБ ХЛЛ, изучена оценка субпопуляционного состава лимфоцитов и моноцитов у пациентов ХЛЛ до и в процессе терапии, оценены и интерпретированы полученные результаты. Соискателем лично сформирована база данных и проведена статистическая обработка материала, сформулированы положения, выносимые на защиту, выводы и практические рекомендации, подготовлены публикации по теме выполненной работы.

Публикации результатов исследования

По теме диссертации опубликовано 10 печатных работ, включая 3 статьи в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Министерства науки и высшего образования Российской Федерации для опубликования основных результатов диссертационных исследований.

Апробация работы

Проведение диссертационного исследования одобрено Комитетом по этике научных исследований, протокол №12 от 11 декабря 2018 года.

Апробация работы состоялась 14 июня 2023 года на совместной научной

конференции кафедр: клинической лабораторной диагностики с курсом лабораторной иммунологии, акушерства и гинекологии ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России и сотрудников ГБУЗ «НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского ДЗМ», ГБУЗ «ГКБ им. С.П. Боткина» ДЗМ, ГБУЗ «КДЦ №2 ДЗМ», ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова, ООО «Инвитро», МНИОИ им. П.А. Герцена, ГБУЗ «ГКБ им. С.С. Юдина ДЗМ" (Протокол № 06/23 от 14.06.2023 г.)

Основные результаты диссертации доложены на следующих научно-практических конференциях: V Российский конгресс лабораторной медицины, 11-13 сентября 2019г., Москва; VI Российский конгресс лабораторной медицины, Online, 17 декабря 2020г.; XII Конференция молодых ученых с международным участием «Трансляционная медицина: возможное и реальное», Москва, 13 апреля 2021г.; XXIV International Symposium on Technical Innovations in Laboratory Hematology Virtual Meeting, Online, May 4 - May 7, 2021г.; XXVII Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Лабораторная медицина: вклад в борьбу с пандемией». Москва, 4-6 апреля 2022 г.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертационное исследование соответствует паспорту специальности 3.3.8. - Клиническая лабораторная диагностика (медицинские науки), п.1. «Основы теории клинической лабораторной диагностики. Определение качественных и количественных характеристик морфологических, химических и других параметров биологических материалов», п. 9. «Разработка методов иммунологических исследований. Антигены эритроцитов, лейкоцитов, тромбоцитов, белков плазмы, HLA-системы. Оценка функциональной активности клеток иммунной системы. Антитела естественные, иммунные и аутоиммунные, иммунные комплексы. Медиаторы иммунитета. Оценка иммунного статуса организма. Мониторинг иммунокоррегирующей терапии. Иммунофенотипическая характеристика клеток при заболеваниях крови. Онкоиммунология».

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 141 страницах машинописного текста, иллюстрирована 17 таблицами и 38 рисунками. Работа состоит из введения, пяти глав, выводов, практических рекомендаций и указателя литературы. Библиографический указатель включает 196 источников, из которых 41 отечественных и 155 зарубежных авторов.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении подтверждена актуальность, установлены цели и задачи исследования, научная новизна и практическая значимость, сформулированы основные положения, выносимые на защиту.

В первой главе проведен анализ отечественной и зарубежной литературы по теме диссертационного исследования. Анализ данных литературы свидетельствует о необходимости поиска новых маркеров для диагностики хронического лимфолейкоза и оценки минимальной остаточной болезни, которые оставались бы стабильными на фоне применения современных схем терапии. Маркер ROR-1 является весьма перспективным, так как по данным литературы присутствует на всех опухолевых клетках и не регистрируется за здоровых В-лимфоцитах. Использование данного маркера позволит отказаться от использования определения клональности по рестрикции легких путей и, соответственно, уменьшить вероятность ошибок при диагностике.

Оценка субпопуляций Т-лимфоцитов, НК-клеток и моноцитов в большинстве источников проводилась в относительных величинах. Оценка данных показателей в абсолютных значениях позволит более ясно определить степень изменения иммунной системы пациентов с хроническим лимфолейкозом как в дебюте заболевания, так и на фоне различных схем проводимой терапии, что в свою очередь даст возможность спрогнозировать развитие инфекционных осложнений.

Во второй главе представлены материалы и методы исследования. В исследование включено 30 практически здоровых доноров, 296 пациентов ХЛЛ, из них 50 с первично выявленным, нелеченым ХЛЛ и 246 - находящихся на терапии, 20 пациентов с реактивным лимфоцитозом (инфекционный мононуклеоз и другие вирусные инфекции, ревматоидный артрит). Клинико-лабораторная характеристика пациентов ХЛЛ представлена в таблице 1.

Таблица 1. Характеристика пациентов, включенных в исследование

Параметры	Пациенты ХЛЛ			
	первичные, без терапии (n=50)	терапия ибрутинибом (n=116)	схемы терапии, не содержащие ибрутиниб (n=60)	Реактивный лимфоцитоз (n=20)
Соотношение м:ж	23/27	66/50	36/24	8/12
Возраст (Me, min-max)	64 (48-84)	66 (36-92)	65,5 (50-87)	50,5 (39-65)
Стадия заболевания по Binet:				-
A B C	17 32 1	- 108 40	- 28 32	
Мутационный статус IGHV-генов:				-
Мутированный вариант (M-cLL)	1	4	-	
Немутированный вариант (U-CLL)	1	57	12	
Нет данных	48	55	48	
Цитогенетический риск:				-
Наличие del17p	1	31	13	
Отсутствие del17p	2	52	4	
Нет данных	47	32	43	
Общий анализ крови				
RBC ($*10^{12}$/л) M±SD	4,44±0,66	4,58±0,07	3,72±0,20	4,31±0,1
Hb (г/л) M± SD	134,47±18,97	136,6±2,18	118,7±6,03	125,3±4,1
PLT ($*10^9$/л) Me (P_{10} – P_{90})	213,5 (125,2-359,2)	159,5 (112,0-229,3)	132,0 (40,0-217,5)	321,0 (210,0-450,0)
WBC ($*10^9$/л) Me (P_{10} – P_{90})	35,08 (11,19-153,0)	8,1 (2,3 - 87,2)	53,6 (11,8– 45,6)	6,2 (4,08-11,9)
% лимфоцитов M± SD	79,95±13,09	52,9±2,07	87,7±2,16	47,9±3,25
# лимфоцитов Me (P_{10} – P_{90})	21,76 (7,18-130,8)	3,9 (0,8 - 81,2)	41,9 (7,17-218,4)	3,0 (1,64 – 6,24)
% нейтрофилов M± SD	16,46±11,49	39,53±20,43	10,02±9,82	43,22±22
# нейтрофилов M± SD	4,57±1,68	3,72±1,81	4,38±2,45	2,49±1,65
% моноцитов M± SD	2,02±1,73	5,62±3,13	0,98±1,8	-
# моноцитов M± SD	0,55±0,46	0,59±0,7	0,64±0,7	-

Материалом исследования служила цельная венозная кровь, стабилизированная антикоагулянтом K_2-ЭДТА. Все образцы крови исследовались в тот же день, в течение двух часов после взятия. Для оценки экспрессии маркеров ROR-1 и CD180 на В-лимфоцитах исследовано 160 образцов крови, из них 50 с первично выявленным или нелеченым ХЛЛ, 60 пациентов, получавших различные схемы терапии (лейкеран, FCR, FCR-lite, RB, RCVP, RClb, BR, R-CHOP, преднизолон-R, GB/G, CVP/RCVP и др), 20 - с реактивным лимфоцитозом и 30 доноров.

Для сравнительного исследования двух иммунофенотипических подходов в оценке МОБ проанализировано 64 образца костного мозга (КМ) и 6 - периферической крови пациентов с ХЛЛ.

Оценка экспрессии маркеров ROR-1 и CD180 на В-лимфоцитах, определение МОБ по протоколу ERIC, субпопуляционного состава Т-лимфоцитов, НК-клеток, моноцитов и В-лимфоцитов осуществлялась на проточном цитометре (FACSCanto II (BD)). Оценка МОБ при ХЛЛ с использованием DuraClone RE CLB Tube (Beckman Coulter) выполнялась на проточном цитометре (Navious (BC)). Иммунофенотипирование лимфоцитов периферической крови выполнялось с использованием 8-цветной панели моноклональных антител, включающей: CD19 PE, CD3 FITC, CD4 PerCP-Cy5-5, CD8 PerCP-Cy5-5, TCRγδ FITC, CD127 APC, CD16 PE-Cy7, CD56 PE, CD57 Pacific Blue, CD45RA PE-Cy7, CD45R0 APC, HLA-DR PE, CD25 PE-Cy7, CD45 APC производства BD Biosciences и Beckman Coulter.

В ходе данного исследования определяли 16 субпопуляций лимфоцитов (табл. 2). Пересчет абсолютного числа субпопуляций лимфоцитов осуществлялся двухплатформенным методом, исходя из абсолютного количества лимфоцитов в гемограмме и относительного числа субпопуляций лимфоцитов, определяемого методом многоцветной проточной цитометрии.

Таблица 2. Анализируемые субпопуляции Т-лимфоцитов и НК-клеток

Субпопуляции лимфоцитов	**CD-маркеры**
Т-лимфоциты	CD3+
Т-НК-клетки	CD3+CD16+CD56+
Т-хелперы/индукторы	CD3+CD4+
Цитотоксические Т-лимфоциты	CD3+CD8+
Иммунорегуляторный индекс	CD3+CD4+/CD3+CD8+
Наивные Т-хелперы	CD3+CD4+CD45RA+
Т-хелперы памяти	CD3+CD4+CD45R0+
Регуляторные Т-лимфоциты	CD4+CD25+CD127$^{dim\text{-}to\text{-}neg}$
Активированные Т-лимфоциты (поздняя активация)	CD3+HLA-DR+
Активированные Т-лимфоциты (ранняя активация)	CD3+CD25+
TCRγδ Т-клетки	CD3+TCRγδ+
Цитотоксический потенциал (ЦТП) CD8+ клеток	CD3-CD8+CD57+
НК-клетки:	CD3-CD16+CD56+
НК-клетки цитолитические НК-клетки цитокинпродуцирующие	CD3-CD16+CD56- CD3-CD56+CD16-
Цитотоксический потенциал (ЦТП) CD16+ клеток	CD3-CD16+CD57+

Статистический анализ результатов исследования

Статистический анализ результатов исследования осуществлялся с помощью программы GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., США). Для каждого массива данных проводилась оценка нормальности распределения с использованием критериев Колмогорова-Смирнова и Шапиро-Уилки. При нормальном распределении данных использовались параметрические методы (среднего значения, стандартного отклонения и 95% доверительного интервала). В группах непрерывных данных с парными выборками при числе сравниваемых групп 3 и более – статистический критерий ANOVA повторных измерений.

При ненормальном распределении данные представлялись в виде медианы, 10% и 90% процентиль и для анализа значимости различий использовались непараметрические методы. В группах непрерывных данных с парными выборками при числе сравниваемых групп 3 и более – однофакторный дисперсионный анализ Фридмана. Критический уровень достоверности нулевой гипотезы принимался равным 0,05.

В третьей главе представлена оценка экспрессии маркеров ROR-1 и CD180 на В-лимфоцитах.

Для оценки экспрессии ROR-1 и CD180 на В-лимфоцитах использовалась панель МКА, включающая в себя CD19, CD180, ROR-1, CD20 и CD45. Результаты проведенных исследований приведены в таблице 3.

Таблица 3. Экспрессия ROR-1 и CD180 на В-лимфоцитах в исследуемых группах

	ХЛЛ первич. (n=50)	**ХЛЛ терапия** (n=60)	**Реакт. лимф.** (n=20)	**Доноры** (n=30)
CD19+ (%)* M± SD	80,7±15,4	90,2±9,6	10,7±7,09	16,68±6,25
CD19+CD180+ (%)**Me (P_{10} – P_{90})	71,2 (2,12-88,18)	55,2 (0,19-92,86)	9,0 (3,3-26,2)	11,9 (6,42-20,49)
CD19+ROR-1+ (%)* M± SD	80,1±15,8	89,0±9,1	0,04±0,07	0,05±0,07

Примечание. Данные представлены в виде: Mean-среднее значение, SD- стандартное отклонение, n- объем выборки.

** Выборка результатов при анализе показала нормальное распределение, поэтому оценка осуществлялась с применением параметрических методов статистики.*

*** Выборка результатов при анализе показала логонормальное распределение, поэтому оценка осуществлялась с применением непараметрических методов статистики.*

Проведенное исследование показало, что у доноров и пациентов с реактивным лимфоцитозом практически все В-лимфоциты экспрессировали CD180, в то время как экспрессия ROR-1 выявлялась только у 10 доноров, при этом процент CD19+ROR-1+ клеток не превышал 0,2%. Среди пациентов с реактивным лимфоцитозом экспрессия ROR-1 на В-лимфоцитах обнаружена у 6 (30,0% случаев) и колебалась в интервале от 0,05% до 0,2% (таблица 3).

Среди пациентов с ХЛЛ экспрессия CD180 была выявлена у 38 человек (в 76,0%) в дебюте заболевания и у 39 человек (65,0%) на терапии. Процент В-лимфоцитов, экспрессирующих CD180, не всегда совпадал с общим их числом, у 1/3 пациентов он

был ниже на 30,0% - 60,0% (табл. 3). В то же время при ХЛЛ экспрессия ROR-1 определялась на мембране опухолевых В-лимфоцитов как в дебюте заболевания (77,7±2,7%), так и на фоне лечения (87,0±1,8%). Использование таргетной анти-CD20 терапии у пациентов ХЛЛ приводило к исчезновению экспрессии CD20 на опухолевых В-лимфоцитах, а, следовательно, не позволяло использовать комбинацию CD20/ROR-1 в оценке экспрессии этого маркера. В дальнейшем в работе анализировались значения только CD19/ROR-1+ клеток.

Экспрессия ROR1 на опухолевых (CD19+CD5+) В-лимфоцитах выявлена у всех пациентов ХЛЛ, в то время как экспрессия CD180 выявлялась в 52% случаев (Рис.1).

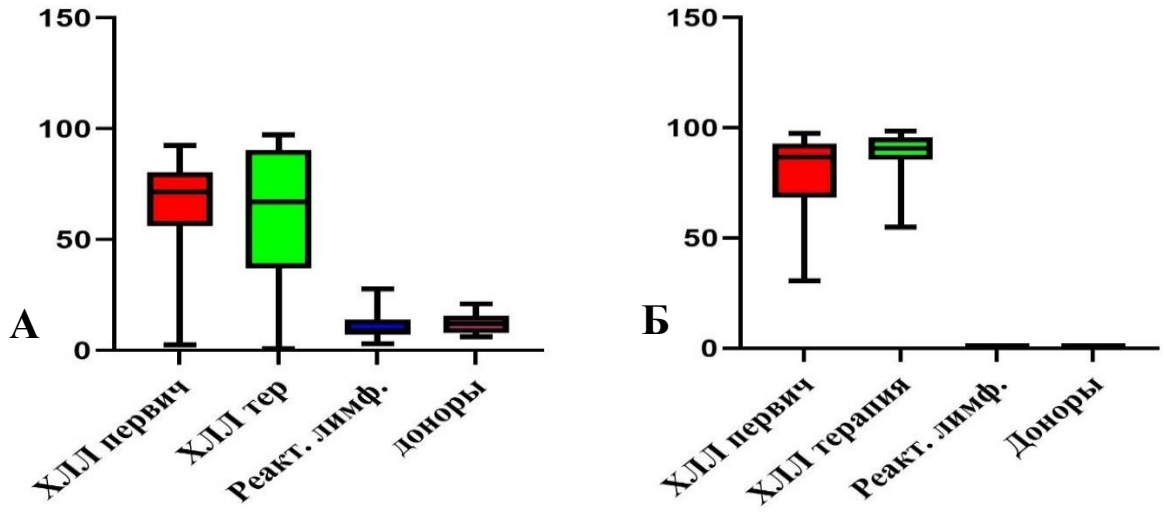

Рис. 1. Сравнение экспрессии CD180(А) и ROR-1(Б) на В-лимфоцитах доноров, пациентов с реактивным лимфоцитозом и ХЛЛ.

Показана высокая корреляция (r=0,9855) маркера ROR-I с числом опухолевых CD19+CD5+ В-клеток (Рис.3), в отличие от экспрессии CD180 (Рис.2).

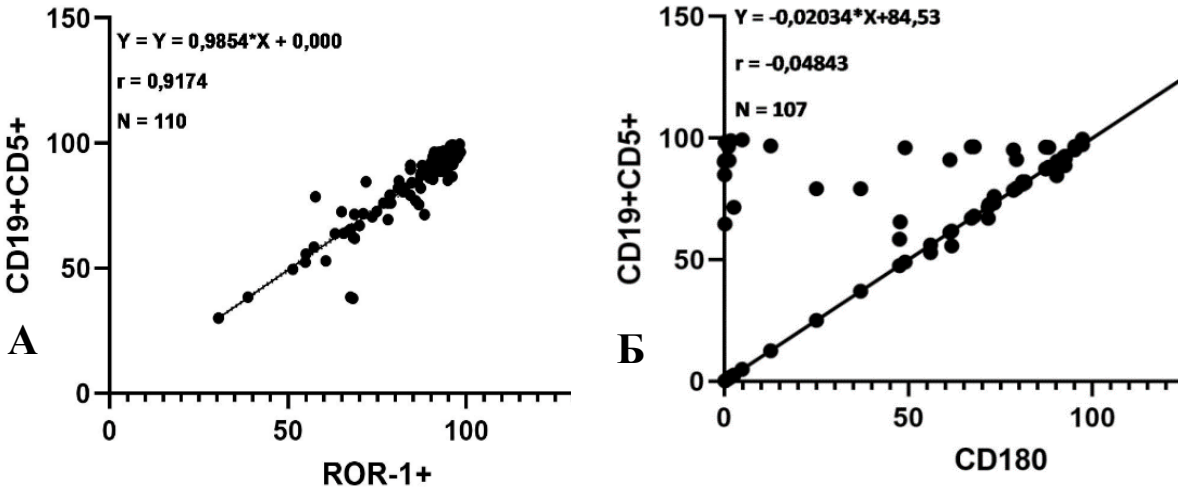

Рис.2 (А,Б). Корреляция экспрессии ROR-1 (А) и CD180 (Б) с CD19+CD5+клетками при ХЛЛ.
Примечание. В левом верхнем углу графиков даны компоненты математического анализа регрессии: уравнение линейной регрессии (y=x), коэффициент корреляции Спирмена (r), объем выборки (N).

Проведенное исследование показало, что у доноров и пациентов с реактивным лимфоцитозом практически все В-лимфоциты экспрессировали CD180 и не экспрессировали ROR-1. В то же время у пациентов с первичным нелеченым ХЛЛ экспрессия CD180 наблюдалась только у 76,0%, а в группе больных, получавших терапию у 65,0%, при этом не все В-лимфоциты экспрессировали CD180. Напротив, экспрессия ROR-1 отмечалась на большинстве В-лимфоцитов как в дебюте заболевания, так и на фоне проводимой терапии, независимо от используемых схем. Учитывая тот факт, что экспрессия ROR-1 определялась на В-лимфоцитах во всех случаях ХЛЛ и оставалась стабильной в процессе лечения, данный маркер может быть использован для оценки МОБ ХЛЛ.

В четвертой главе проведено сравнение двух иммунофенотипических подходов в оценке МОБ при ХЛЛ.

Оценка МОБ осуществлялась с использованием многоцветной многопараметрической проточной цитометрии в соответствии со стандартизированным протоколом Европейской группы по исследованию ХЛЛ (ERIC, 2007 г.), модифицированным для 8-цветного анализа с использованием следующей комбинации МКА: 1-я проба - κ, λ, CD19, CD3, CD22, CD45, CD5; 2-я - CD43, CD81, CD38, CD19, CD3, CD45, CD5. В первой пробе определялась клональность В-лимфоцитов, во 2-й - путем последовательного гейтирования выделялась опухолевая популяция В-лимфоцитов с фенотипом CD19+CD5+CD43+CD38dim+CD81dim+. Процент остаточного опухолевого клона рассчитывался как среднее арифметическое значений, полученных в 2-х пробах.

Параллельно сравнительная оценка МОБ осуществлялась с использованием набора DuraClone RE CLB, включающего в себя стандартизованный набор 8 лиофилизированных МКА (CD20, CD45, CD81, ROR-1, CD79b, CD19, CD5, CD43).

Путем последовательного гейтирования выделялась популяция клеток CD45+CD19+ROR-1+CD5++CD43++CD81^{dim}CD20^{dim} CD79b^{dim}. По результатам исследования рассчитывался процент опухолевых В-лимфоцитов и суммарный процент В-клеток.

Параллельное определение остаточного опухолевого клона ХЛЛ стандартизированным методом и с помощью набора DuraClone RE CLB Tube показало высокую корреляцию полученных результатов (r=0,9986) (Рис.3).

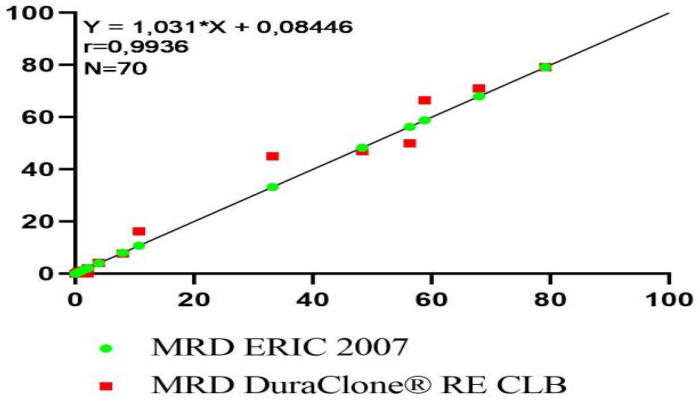

Рис.3. Сравнительное исследование двух иммунофенотипических подходов в оценке МОБ при ХЛЛ

Определение чувствительности и специфичности двух подходов в оценке остаточного опухолевого клона при ХЛЛ приведено в табл.4.

Таблица 4. Четырехпольная таблица для вычисления чувствительности и специфичности метода определения остаточного опухолевого клона при ХЛЛ с помощью набора DuraClone RE CLB Tube

DuraClone / ERIC	МОБ+	МОБ-	Общее число исследований
МОБ+	ИП=38	ЛО=1	39
МОБ-	ЛП=4	ИО=27	31
Общее число исследований	42	28	70

Чувствительность метода определения остаточного опухолевого клона ХЛЛ с помощью набора DuraClone RE CLB Tube составляла 97,4%, специфичность 87,1%, что позволяет рекомендовать его для мониторинга опухолевой популяции В-лимфоцитов в динамике терапии.

Оценка экспрессии ROR-1 может быть использована в диагностической панели ХЛЛ. Экспрессия ROR-1 на опухолевых В-лимфоцитах остается стабильной на фоне проводимой терапии, что позволяет применить данный маркер в мониторинге МОБ при ХЛЛ. Использование в панели ROR-1 имеет преимущество, так как позволяет сократить число анализируемых пробирок с двух до одной, снизить расходные материалы (CD45, CD19, CD5; лизирующий реагент), а также заменить оценку легких цепей для определения клональности В-лимфоцитов.

В пятой главе проведена оценка субпопуляций Т-лимфоцитов и НК-клеток в периферической крови до начала лечения и в динамике терапии больных хроническим лимфолейкозом.

Оценка субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови проводилась на основе исследования 226 образцов крови, среди которых 50, полученных у пациентов с первичным ХЛЛ, 116 – с ХЛЛ на фоне терапии с включением в схемы ибрутиниба, подразделенных на 2 группы в зависимости от длительности терапии (до 2-х лет (группа IIa) и более 2-х лет (группа IIb)) и 30 – доноры.

Анализ субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови показал, что в дебюте ХЛЛ (I группа пациентов) и у пациентов, находящихся на терапии, не содержащей ибрутиниб (III группа), несмотря на заметное снижение относительного числа Т-лимфоцитов и НК-клеток, отмечается достоверное значительное увеличение по сравнению с донорами абсолютного количества как Т-лимфоцитов ($p<0,0001$ в обоих группах), так и НК-клеток ($p<0,0001$ в обоих группах), а также субпопуляций НК-клеток ($p<0,0001$ и $p=0,0004$, соответственно). В группах IIa и IIb по мере увеличения длительности терапии происходит постепенное снижение абсолютного числа Т-лимфоцитов ($p=0,01$ и $p<0,0001$, соответственно), НК-клеток ($p<0,0001$ для обоих подгрупп), цитолитических НК-клеток (p-0,0002 и $p<0,0001$, соответственно), цитокинпродуцирующих НК-клеток ($p<0,0001$ для обоих подгрупп) по сравнению с пациентами I группы. При этом значения вышеперечисленных субпопуляций, за исключением общего числа Т-лимфоцитов в группе IIa (пациенты с

длительностью приема ибрутиниба до 2 лет), достоверно не отличались от показателей доноров (рис. 4).

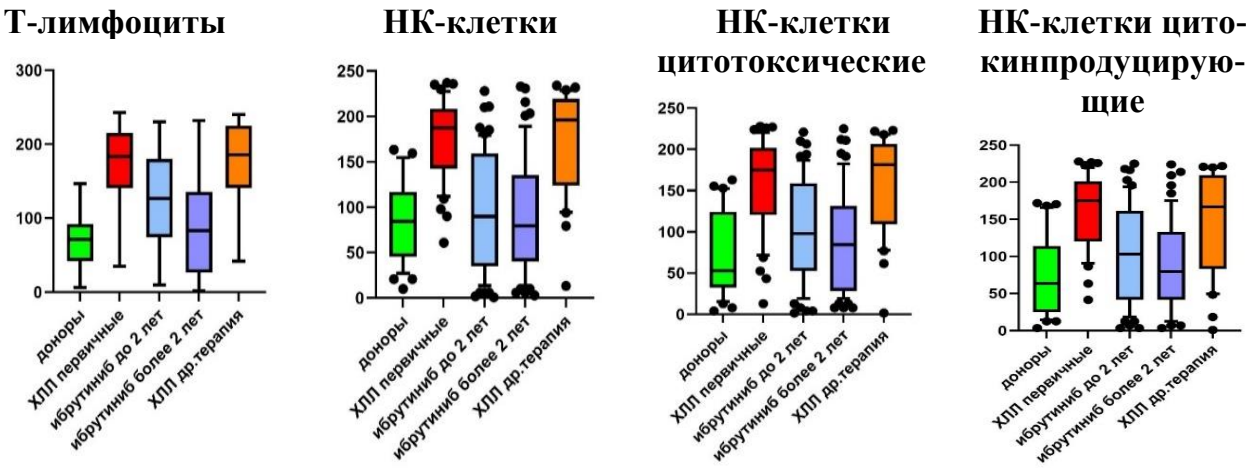

Рис.4. Соотношение Т-лимфоцитов, НК-клеток и их субпопуляций в исследуемых группах.
Данные представлены в виде медианы и размаха от 10-го до 90-го процентиля.

Статистическая оценка результатов исследования цитотоксического потенциала (ЦТП) НК-клеток во всех группах пациентов ХЛЛ не выявила достоверных отличий от таковых у доноров. Похожая картина наблюдалась и при оценке цитотоксического потенциала (ЦТП) CD8+клеток, за исключением группы IIа (пациенты с длительностью приема ибрутиниба до 2 лет), где выявлены достоверные отличия от доноров (p=0,0279).

Анализ абсолютного числа Т-НК-клеток среди первичных пациентов ХЛЛ и пациентов на терапии, не содержащей ибрутиниб (группы I и III), несмотря на существенный разброс результатов, не выявил достоверных различий с данными доноров (рис.5).

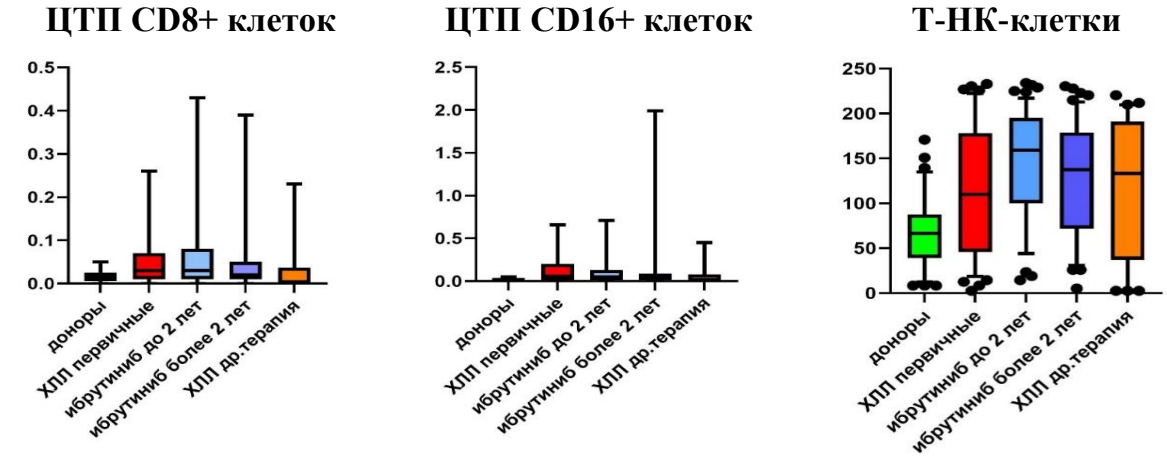

Рис. 5. Соотношение ЦТП CD8+ и CD16+ лимфоцитов и Т-НК-клеток у пациентов с ХЛЛ и доноров.
Данные представлены для 1 и 2 графиков в виде среднего значения и стандартного отклонения, для 3 графика - в виде медианы и размаха от 10-го до 90-го процентиля.

Среди пациентов на терапии, содержащей ибрутиниб, (группы IIa и IIb) отмечается достоверное увеличение по сравнению с донорами абсолютного количества субпопуляции Т-НК-клеток ($p<0,0001$ и $p=0,0007$, соответственно). Однако, эти изменения достоверно не отличались от таковых у пациентов I и III групп.

Увеличение абсолютного количества Т-лимфоцитов у пациентов I и III групп по сравнению с донорами происходило как за счет повышения числа цитотоксических Т-лимфоцитов ($p<0,0001$ для обеих групп), так и за счет Т-хелперов ($p<0,0001$ и $p=0,0079$, соответственно). Более выраженное увеличение цитотоксических Т-лимфоцитов по сравнению с Т-хелперами, особенно у пациентов III группы, приводило к снижению ИРИ. У пациентов IIa и IIb групп по сравнению с пациентами I и III групп наблюдалось снижение общего числа Т-хелперов (I/IIa $p<0,0001$, I/IIb $p<0,0001$, IIa/III $p=0,0049$ и IIb/III $p<0,0001$). По мере увеличения длительности терапии ибрутинибом эти различия становились более выраженными, постепенно приближаясь к референсным значениям.

Количество цитотоксических Т-лимфоцитов у пациентов IIa и IIb подгрупп недостоверно снижались по сравнению с пациентами I группы, оставаясь выше показателей у доноров ($p<0,0001$ и $p=0,0094$, соответственно), приводя к инверсии ИРИ ($p<0,0001$ для обеих подгрупп) (рис. 6). Субпопуляционный состав Т-хелперов у пациентов I и III групп отличался повышением числа Т-клеток памяти ($p<0,0001$ для обеих групп), в то время как абсолютные значения наивных Т-хелперов достоверно не отличались от таковых у доноров.

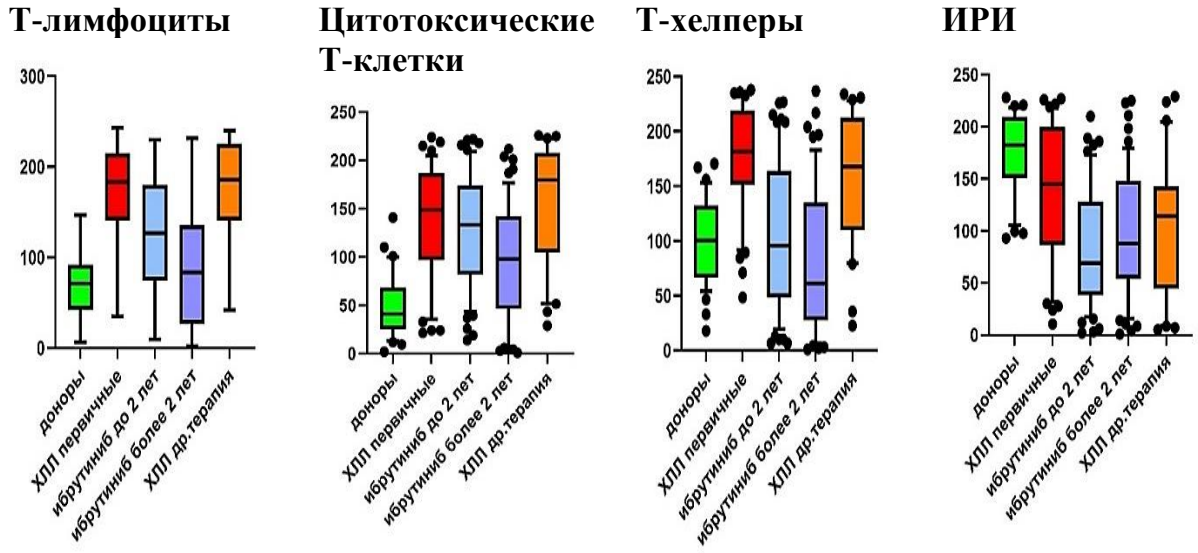

Рис.6. Соотношение Т-лимфоцитов, цитотоксических Т-клеток, Т-хелперов и ИРИ в исследуемых группах.
Данные представлены в виде медианы и размаха от 10-го до 90-го процентиля.

У пациентов на терапии, содержащей ибрутиниб (IIa и IIb) выявлено достоверное снижение наивных Т-хелперов ниже референсных значений ($p=0,0007$ и $p<0,0001$, соответственно), в то время как значения Т-хелперов памяти достоверно снижались по сравнению с I и III группой, и не отличались от показателей доноров (рис.7).

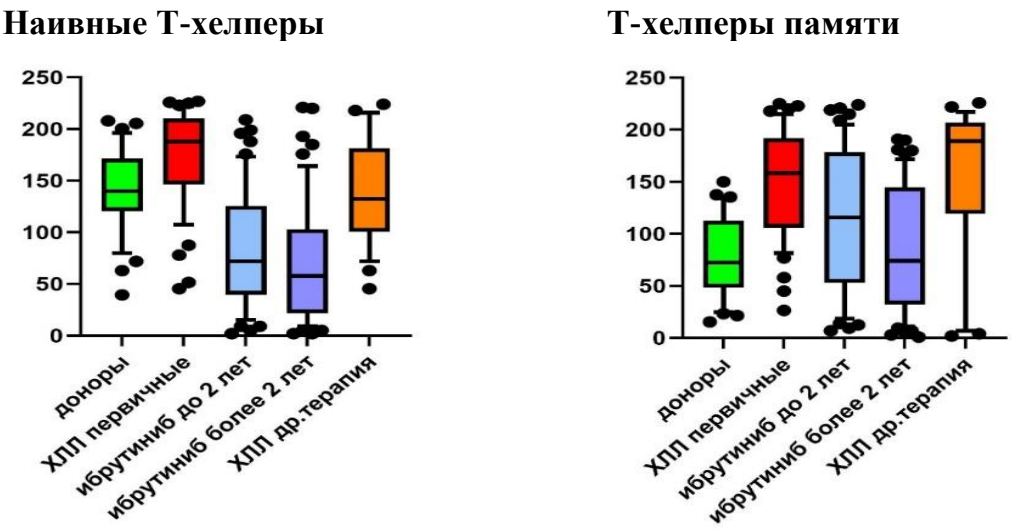

Рис.7. Соотношение наивных Т-хелперов и Т-хелперов памяти в исследуемых группах. Данные представлены в виде медианы и размаха от 10-го до 90-го процентиля.

Исследование регуляторных Т-лимфоцитов показало достоверное увеличение их у пациентов I и III групп по сравнению с донорами (p=0,0109 и p=0,0002, соответственно), в то время как во IIa-IIb группах наблюдалось их снижение по отношению ко всем остальным группам (p<0,0001 по сравнению с I и III группами и p=0,0109 и p=0,0001, соответственно по отношению к донорам). Это снижение было более выраженное при длительном (более 2 лет) приеме ибрутиниба (рис.8).

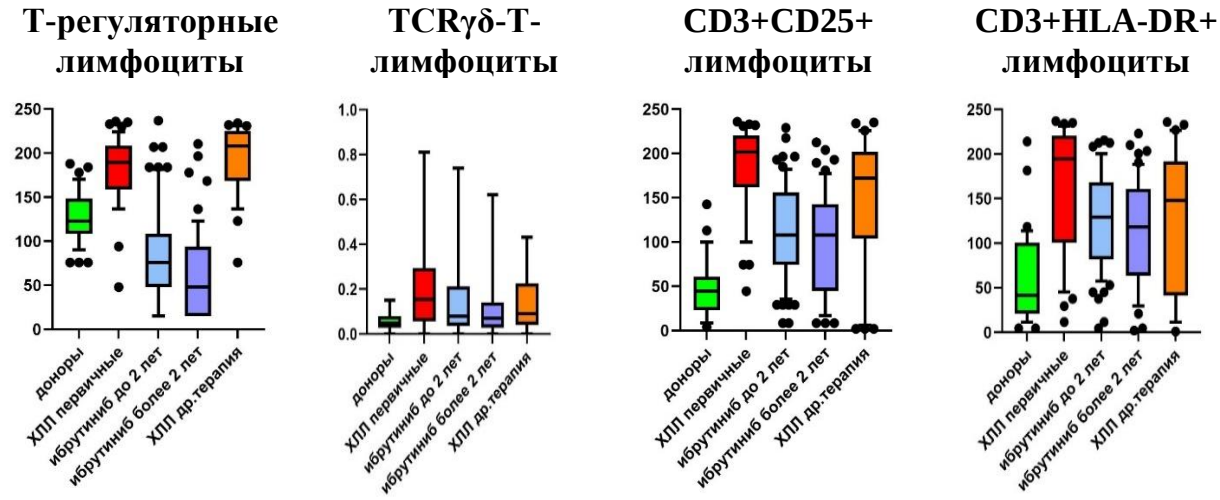

Рис.8. Соотношение Т-регуляторных клеток, TCRγδ Т-клеток, активированных Т-лимфоцитов (CD25+ и HLA-DR+) у пациентов с ХЛЛ и доноров. Данные представлены для 1,3 и 4 графиков в виде медианы и размаха от 10-го до 90-го процентиля, для 2 - в виде среднего значения, стандартного отклонения, min и max значений.

Достоверное увеличение по сравнению с донорами количества TCRγδ-Т-лимфоцитов наблюдалось только у пациентов I группы (p=0,0003). Терапия ибрутинибом (группы IIa и IIb) приводила к снижению данной субпопуляции по

сравнению с пациентами I группы (p=0,0317 и p=0,001, соответственно), однако различия этого показателя с донорами было статистически недостоверным.

Исследование активационных маркеров позволило выявить в I и III группах пациентов достоверное повышение абсолютного числа Т-лимфоцитов как с маркерами ранней (CD3+CD25+, p<0,0001 для обоих групп), так и поздней активации (CD3+HLA-DR+, p<0,0001 для обоих групп). В группах пациентов, находившихся на терапии ибрутинибом, отмечалось достоверное снижение Т-лимфоцитов с маркерами ранней и поздней активации по сравнению с пациентами I и III групп (p<0,0001 для всех подгрупп), при этом значения этих популяций оставались достоверно выше показателей у доноров (p=0,0001 и p= 0,0033, соответственно для CD3+CD25+клеток и p=0,0001 и p= 0,003, соответственно для CD3+HLA-DR+клеток) (рис. 8).

Таким образом, комплексное иммунофенотипическое исследование субпопуляционного состава лимфоцитов показало, что при ХЛЛ имеют место существенные нарушения клеточного и неспецифического иммунитета. У первичных пациентов с ХЛЛ отмечается увеличение Т-лимфоцитов, Т-хелперов, цитотоксических Т-лимфоцитов и натуральных киллеров. Как Т-хелперы, так и цитотоксические Т-лимфоциты отличаются повышением эффекторной дифференцировки со снижением числа наивных Т-клеток и экспансией эффекторных субпопуляций Т-клеток памяти.

Результаты нашего исследования показали, что субпопуляционный состав Т-хелперов изменен у нелеченых больных ХЛЛ, как за счет повышения наивных Т-хелперов, так и Т-хелперов памяти по сравнению с контрольной группой. В этой же группе пациентов отмечалось увеличение абсолютного числа Т-регуляторных клеток, которые играют важную роль в снижении противоопухолевого иммунитета, а также субпопуляции TCRγδ-Т-лимфоцитов.

Количество активированных Т-лимфоцитов, имеющих маркеры ранней и поздней активации, а также цитотоксических Т-лимфоцитов увеличивалось у нелеченых пациентов и пациентов на терапии ХЛЛ, что приводило к снижению иммунорегуляторного индекса. Цитотоксический потенциал этих клеток был также повышен.

Оценка НК-клеточного звена неспецифического иммунитета при ХЛЛ показала, что у всех исследованных пациентов отмечалось повышение абсолютного числа НК-клеток как с цитолитической, так и цитокинпродуцирующей активностью, что свидетельствует о повышенной функциональной активности НК-клеток при ХЛЛ. Полученные нами результаты могут свидетельствовать об активации иммунной системы в ответ на опухолевую экспансию клеток при ХЛЛ.

Нами проведена оценка субпопуляционного состава Т-лимфоцитов и НК-клеток в группах пациентов в зависимости от наличия или отсутствия del17p.

Согласно литературным данным, del17p у пациентов с ХЛЛ ассоциируется с наихудшей выживаемостью. Среди всех групп пациентов цитогенетическое исследование на наличие делеции del17p выполнено было только у 103 пациентов, при этом данная цитогенетическая поломка выявлена у 45 человек (43,7%). Согласно полученным данным статистически достоверных отличий в субпопуляционном составе Т-лимфоцитов и НК-клеток у пациентов ХЛЛ с делецией del17p и группой пациентов с отсутствием del17p не выявлено.

Изменения субпопуляционного состава Т-лимфоцитов, НК-клеток и их субпопуляций не зависят от наличия или отсутствия del17p и, по-видимому, обусловлены длительностью заболевания и проводимой терапией.

Оценка субпопуляционного состава моноцитов периферической крови проводилась в тех же образцах крови, что и субпопуляционный состав лимфоцитов. Выделялись три субпопуляции моноцитов: классические моноциты (МО1- CD14+CD16-), промежуточные (МО2- CD14+CD16+) и провоспалительные (МО3- CD14-CD16+).

Проведенное исследование показало, что основная субпопуляция моноцитов периферической крови при ХЛЛ представлена классическими моноцитами. У пациентов с ХЛЛ на терапии, не содержащей ибрутиниб, наблюдалось достоверное снижение относительного числа классических (МО1) моноцитов по сравнению с другими группами (p=0,0003, p=0,0019, p=0,017 и p=0,0025, соответственно) (Рис.9). Кроме того, отмечалось достоверное увеличение относительного числа промежуточных (МО2) моноцитов во всех группах пациентов ХЛЛ по сравнению с донорами (p=0,0234, p=0,0051, p=0,0061 и p=0,0332, соответственно) (Рис.10). Относительное число неклассических (МО3) моноцитов было достоверно повышено у пациентов, находящихся на терапии, не содержащей ибрутиниб, по отношению к донорам и другим группам пациентов с ХЛЛ (p=0,0026, p<0,0001, p=0,0002 и p=0,0001 соответственно) (Рис.11).

С целью изучения истинного повышения отдельных субпопуляций моноцитов, а не сдвига в распределении, нами была проведена оценка их абсолютных значений. В ходе проведенного статистического анализа было обнаружено, что достоверных отличий абсолютного числа моноцитов всех анализируемых субпопуляций в подгруппах пациентов ХЛЛ как между собой, так и по отношению к донорам отмечено не было (Рис.9, 10, 11).

Классические моноциты (МО1%) **Классические моноциты (МО1#)**

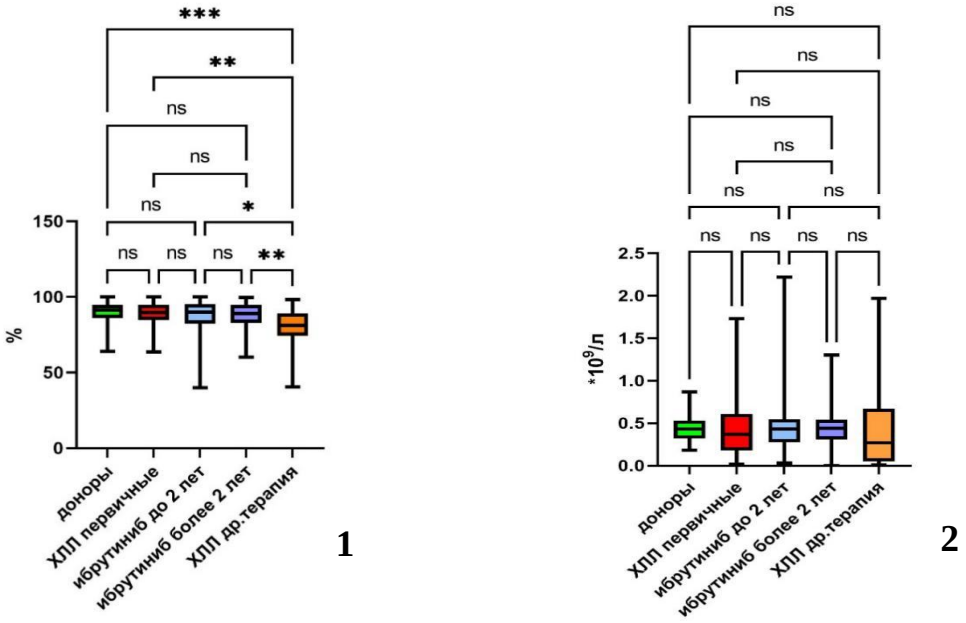

Рис.9. Соотношение субпопуляций МО1 в относительных (1) и абсолютных (2) значениях у пациентов с ХЛЛ и доноров. Данные представлены для 1 графика в виде среднего значения, стандартного отклонения, min и max значений; для 2 - в виде медианы и размаха от 10-го до 90-го процентиля

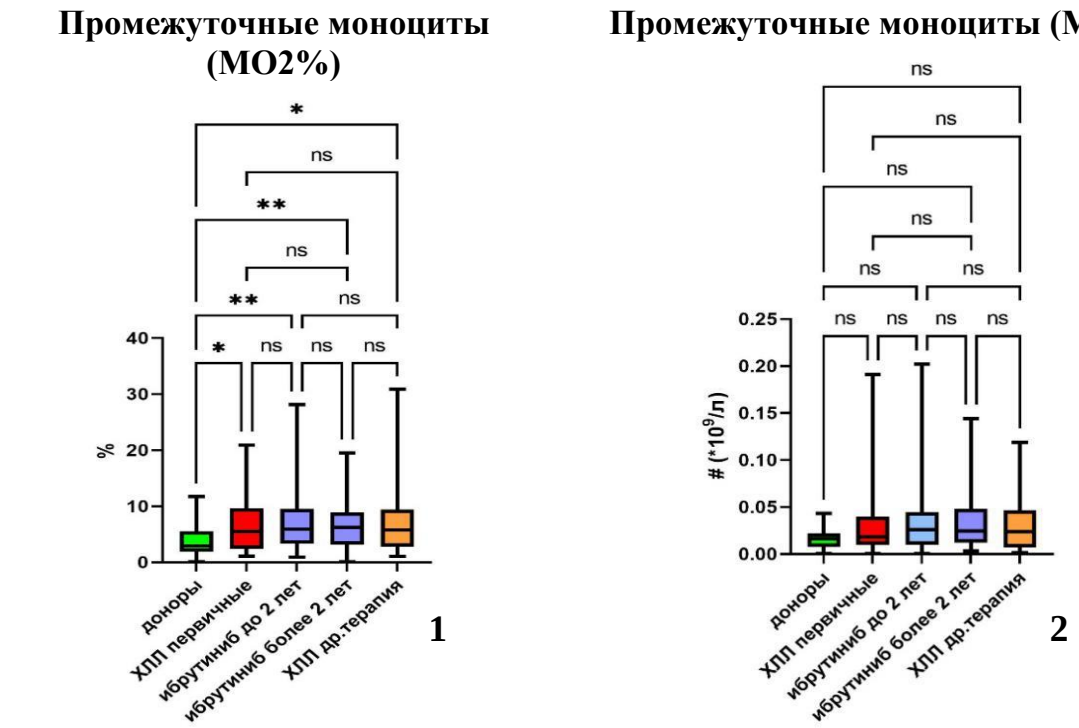

Рис.10. Соотношение субпопуляций МО2 в относительных (1) и абсолютных (2) значениях у пациентов с ХЛЛ и доноров. Данные представлены для 1 графика в виде среднего значения, стандартного отклонения, min и max значений; для 2 - в виде медианы и размаха от 10-го до 90-го процентиля

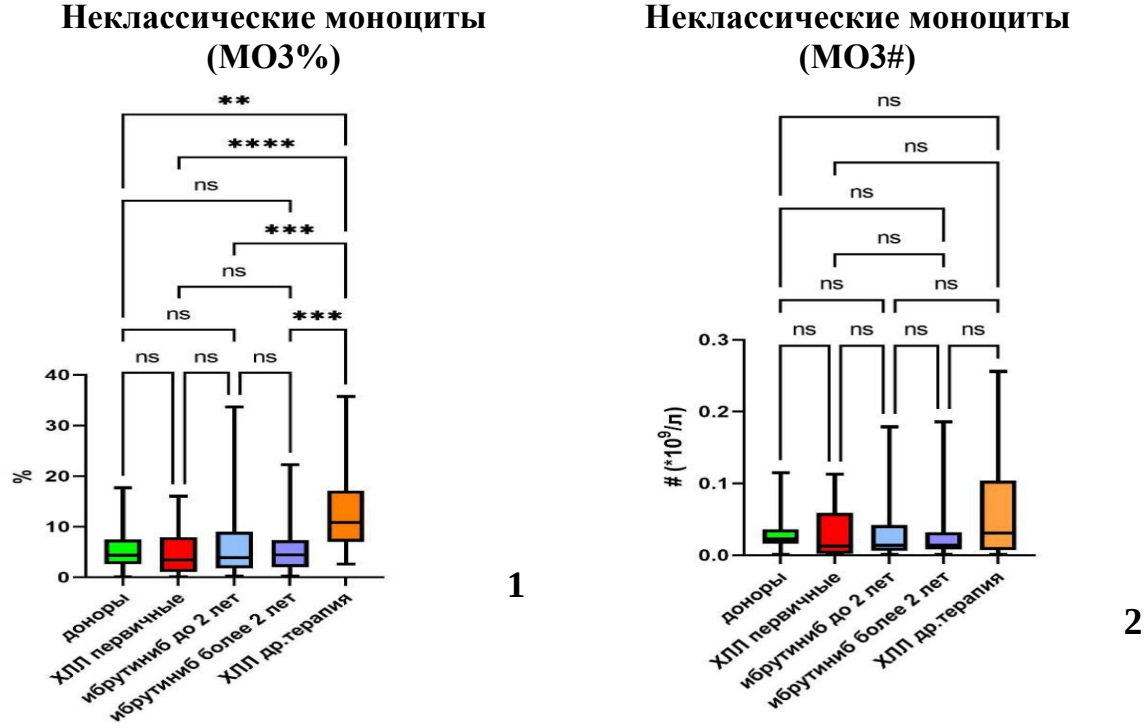

Рис.11. Соотношение субпопуляций МО3 в относительных (1) и абсолютных значениях (2) у пациентов с ХЛЛ и доноров. Данные представлены в виде медианы и размаха от 10-го до 90-го процентиля

Согласно вышеизложенному, во всех группах пациентов с ХЛЛ наблюдаются изменения субпопуляционного состава моноцитов за счет увеличения относительного числа промежуточных форм. Снижение процентного содержания классических моноцитов (МО1) и увеличение процента неклассических моноцитов (МО3) отмечалось у пациентов на терапии, не содержащей ибрутиниб. Анализ абсолютных значений исследуемых субпопуляций не выявил достоверных различий.

В заключении обобщены результаты проведенного исследования. Полученные результаты позволили выявить стабильность экспрессии ROR-1 на опухолевых В-лимфоцитах при ХЛЛ, что позволяет использовать его в качестве как диагностического маркера, так и в панели оценки МОБ. Проведенное исследование демонстрирует выраженные изменения во всех звеньях иммунитета (клеточного, неспецифического) при ХЛЛ. Полученные данные уточняют особенности изменения субпопуляционного состава Т-лимфоцитов, НК-клеток и моноцитов в дебюте ХЛЛ и на фоне терапии, что имеет значение для оценки глубины иммунодефицита и качества восстановления иммунитета после лечения.

ВЫВОДЫ

1. Диагностическое значение маркеров ROR-1 и CD180 в оценке течения ХЛЛ заключается в стабильной экспрессии ROR-1 на всех опухолевых В-лимфоцитах, в отличие от доноров и пациентов с реактивным лимфоцитозом, у которых В-клетки не экспрессировали ROR-1. Экспрессия мембранного рецептора ROR-1 не изменялась, независимо от длительности и применяемых схем лечения (r=0,9174), что позволяет рекомендовать этот маркер для детекции минимальной остаточной болезни при ХЛЛ. Экспрессия CD180 на В-лимфоцитах отличалась вариабельностью и регистрировалась у 76,0% пациентов в дебюте заболевания и 65,0% пациентов, находящихся на терапии. Относительное содержание В-лимфоцитов, экспрессирующих CD180, в дебюте ХЛЛ в среднем составило 71,2 %, на фоне терапии - 55,2%.
2. Сравнение двух подходов в иммунофенотипической оценке минимальной остаточной болезни при ХЛЛ – стандартизированного (ERIC) и набора Dura Clone (ВС), включающего ROR-1, показало их высокую корреляцию (r=0,9936.)
3. Установлены особенности субпопуляционного состава Т-лимфоцитов и НК-клеток, которые свидетельствуют об активации иммунной системы при ХЛЛ. У пациентов с первично выявленным ХЛЛ по сравнению с контролем отмечается достоверное увеличение абсолютного числа Т-лимфоцитов ($p<0,0001$), Т-хелперов ($p<0,0001$) за счет Т-хелперов памяти ($p<0,0001$), цитотоксических Т-клеток ($p<0,0001$), активированных Т-лимфоцитов с маркерами ранней ($p<0,0001$) и поздней активации ($p<0,0001$). Значительное увеличение абсолютного числа регуляторных Т-лимфоцитов ($p=0,0109$), субпопуляции TCRγδ-Т-клеток ($p=0,0003$) и НК-клеток ($p<0,0001$) возможно отражает их противоопухолевую активность.
4. Терапия ибрутинибом приводила к восстановлению иммунологического дисбаланса, снижению количества активированных Т-лимфоцитов ($p<0,0001$), наивных Т-хелперов, TCRγδ-Т-лимфоцитов, а также В-лимфоцитов ($p<0,0001$). Анализ изменений абсолютного числа регуляторных Т-клеток показал положительную динамику их снижения при использовании ибрутиниба, что свидетельствует о повышении противоопухолевого ответа.
5. Установлено, что у пациентов, находящихся на терапии, не содержащей ибрутиниб, отмечается значительное увеличение абсолютного количества Т-

лимфоцитов (преимущественно за счет Т-хелперов-памяти) ($p<0,0001$), НК-клеток ($p<0,0001$), а также субпопуляций НК-клеток, несмотря на заметное снижение относительного числа Т-лимфоцитов и НК-клеток. Выявлено достоверное повышение абсолютного числа активированных Т-лимфоцитов с маркерами ранней и поздней активации ($p<0,0001$ и $p=0,0005$ соответственно) и регуляторных Т- клеток ($p=0,0002$) по сравнению с донорами.

6. Иммунофенотипический анализ субпопуляционного состава моноцитов крови пациентов ХЛЛ показал снижение относительного числа классических моноцитов (МО1) и увеличение неклассических моноцитов (МО3) у пациентов ХЛЛ, находящихся на терапии, не содержащей ибрутиниб, по сравнению с контролем и другими группами пациентов ХЛЛ ($p=0,0003$, $p=0,0019$, $p=0,017$ и $p=0,0025$, соответственно и $p=0,0026$, $p<0,0001$, $p=0,0002$ и $p=0,0001$, соответственно), а также увеличение процента промежуточных форм моноцитов (МО2) во всех исследуемых группах по отношению к донорам ($p=0,0234$, $p=0,0051$, $p=0,0061$ и $p=0,0332$, соответственно). Однако анализ абсолютных значений субпопуляций моноцитов периферической крови при ХЛЛ не выявил достоверных различий с контрольной группой и между анализируемыми подгруппами пациентов.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Использование маркера ROR-1 в иммунофенотипической диагностике ХЛЛ, дифференциальной диагностике реактивных и опухолевых лимфоцитозов, а также оценке МОБ может быть рекомендовано, как врачам клинической лабораторной диагностики, специалистам занимающимся проточной цитометрией, так и врачам-гематологам.

Персонифицированный подход к изучению состояния клеточного и неспецифического звена иммунитета делает возможным выявление не только изменений в субпопуляционном составе Т-лимфоцитов, НК-клеток и моноцитов до терапии, но и осуществление мониторинга в динамике лечения пациентов с ХЛЛ, что позволяет оценить восстановление иммунологического дисбаланса и прогнозировать развитие инфекционных осложнений.

Результаты проведенного исследования могут быть рекомендованы для включения в программы циклов дополнительного профессионального образования (повышения квалификации, профессиональной переподготовки) для врачей клинической лабораторной диагностики**.**

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Учитывая важность определения МОБ в динамике терапии необходимо дальнейшее изучение стабильности экспрессии маркера ROR-1 при использовании новых препаратов в лечении ХЛЛ и других В-клеточных лимфопролиферативных новообразований.

Необходимо продолжить исследование клеточного и неспецифического иммунитета при ХЛЛ в динамике лечения комбинированными препаратами с различным механизмом действия, расширяя интерес к другим клеткам иммунной системы, что позволит глубже оценить динамику восстановления нарушенного иммунологического профиля и прогнозировать снижение риска развития инфекционных осложнений.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК, и включенных в международную базу SCOPUS

1. **Почтарь Е.В.** Экспрессия ROR-1 в диагностике и мониторинге минимальной остаточной болезни при хроническом лимфолейкозе / Е.В. **Почтарь,** С.А. Луговская, Е.В. Наумова, Е.А. Дмитриева, В.В. Долгов // Клиническая онкогематология. - 2022. - Т. 15, №2. - С.148–155.

Публикации в рецензируемых научных изданиях, включенных в международную базу SCOPUS

1. **Почтарь Е.В.** Особенности Т- и НК-клеточного звена иммунитета при хроническом лимфолейкозе / **Е.В. Почтарь**, С.А. Луговская, Е.В. Наумова, Е.А. Дмитриева, А.И. Костин, В.В. Долгов // Клиническая лабораторная диагностика. - 2021. – Т.66, №6. - С. 345-352.
2. **Почтарь Е.В.** Динамика изменения относительного и абсолютного числа Т-лимфоцитов и их субпопуляций у пациентов с хроническим лимфолейкозом / **Е.В. Почтарь,** С.А. Луговская, Е.В. Наумова // Клиническая лабораторная диагностика. - 2021. – Т.66, №4. - С. 57-58.

Основные работы, опубликованные в других изданиях

1. **Почтарь Е.В.** Оценка экспрессии маркеров ROR1 и CD180 на В-лимфоцитах при В-клеточном хроническом лимфолейкозе / **Е.В. Почтарь**, С.А. Луговская // Материалы научно-практических конференций в рамках V Российского конгресса лабораторной медицины 11-13 сентября. - 2019. - С.175-176.
2. **Почтарь Е.В.** Оценка субпопуляций Т-лимфоцитов, НК-клеток в периферической крови у больных хроническим лимфолейкозом / **Е.В. Почтарь,** Е.В. Наумова, Е.А. Дмитриева, М.Е Почтарь, Е.А. Никитин., С.А. Луговская // Материалы научно-практической конференции в рамках VI Российского конгресса лабораторной медицины. - 2020. - С.40-41.
3. **Почтарь Е.В.** Применение маркера ROR-1 в диагностике и оценке минимальной остаточной болезни при хроническом лимфолейкозе / **Е.В. Почтарь,** С.А. Луговская // Материалы XII Конференции молодых ученых с международным участием «Трансляционная медицина: возможное и реальное». - 2021. - С.192-194.
4. **Почтарь Е.В.** Динамика изменений числа регуляторных Т-клеток у пациентов хроническим лимфолейкозом до и на фоне терапии / **Е.В. Почтарь**, С.А. Луговская, Е.В. Наумова, Е.А. Дмитриева, Н.В. Дегтярева // Материалы XXVII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Лабораторная медицина: вклад в борьбу с пандемией». - 2022. - С.100.
5. **Почтарь Е.В.** Оценка клеточного и неспецифического звена иммунитета при хроническом лимфолейкозе / **Е.В. Почтарь,** Е.В. Наумова, Е.А. Дмитриева, Н.В. Дегтярева, С.А. Луговская // Гематология и трансфузиология. - 2022. - Т. 67. №2. - С.282-283.
6. Ольховский И.А. Молекулярно-генетическое и иммунофенотипическое

определение экспрессии ROR1 в лейкоцитах крови при ХЛЛ / И.А. Ольховский, **Е.В. Почтарь**, А.С. Горбенко, М.А. Столяр, Е.А. Дмитриева, В.И. Бахтина, М.А. Михалёв, С.А. Луговская // Гематология и трансфузиология. -2022. - Т. 67. № 2.- С. 268.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения
ИО – истинно отрицательный результат
ИП – истинно положительный результат
ИРИ – иммунорегуляторный индекс
КМ – костный мозг
ЛО – ложноотрицательный результат
ЛП – ложноположительный результат
ЛПУ – лечебно-профилактические учреждения
МГГЦ – Московский городской гематологический центр
МКА – моноклональные антитела
МОБ –минимальная остаточная болезнь
ХЛЛ - хронический лимфолейкоз
ЦТП – цитотоксический потенциал
BTK – тирозинкиназа Брутона (Bruton tyrosine kinase)
ERIC – European Research Initiative on CLL - Европейская исследовательская инициатива по ХЛЛ
ROR1 - receptor tyrosine kinase like orphan receptor-1- орфанный рецептор 1
Tcyt – цитотоксические Т-клетки
Th – Т-хелперы
T-NK – Т-НК-клетки
Treg – Т-регуляторные клетки
CD – cluster of differentiation - кластер дифференцировки