

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
дополнительного профессионального образования
РОССИЙСКАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ НЕПРЕРЫВНОГО
ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
Министерства здравоохранения Российской Федерации

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

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научный руководитель
доктор медицинских наук, профессор
Луговская Светлана Алексеевна

Оглавление	
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. НОВЫЕ МАРКЕРЫ В ДИАГНОСТИКЕ И МОНИТОРИНГЕ ХРОНИЧЕСКОГО ЛИМФОЛЕЙКОЗА. ВЛИЯНИЕ ТЕРАПИИ НА ИЗМЕНЕНИЯ СУБПОПУЛЯЦИОННОГО СОСТАВА Т-ЛИМФОЦИТОВ, НК-КЛЕТОК И МОНОЦИТОВ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)	15
1.1. Маркеры CD180 и ROR-1 в диагностике ХЛЛ	16
1.1.1 Структура и функции CD180	16
1.1.2 Структура и функции ROR-1	20
1.1.3 Оценка минимальной остаточной болезни при ХЛЛ	24
1.2 Оценка субпопуляционного состава Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов и НК-клеток при ХЛЛ	29
1.2.1 Субпопуляции Т-лимфоцитов	31
1.2.2 Субпопуляции В-лимфоцитов	37
1.2.3. Субпопуляции НК-клеток	38
1.2.4 Клеточный и неспецифический иммунный ответ при ХЛЛ	38
1.2.5. Влияние терапии ХЛЛ на субпопуляционный состав лимфоцитов	43
1.3. Оценка субпопуляционного состава моноцитов при ХЛЛ	49
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	54
2.1. Характеристика пациентов	54
2.2 Материалы и методы исследования	58
Статистические методы	68
ГЛАВА 3. ЗНАЧЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ МАРКЕРОВ ROR-1 И CD180 В ДИАГНОСТИКЕ И МОНИТОРИНГЕ ТЕРАПИИ ПРИ ХЛЛ	70
3.1 Оценка экспрессии маркеров ROR-1 и CD180 на В-лимфоцитах	70
3.2 Сравнение двух подходов оценки МОБ при ХЛЛ	76
ГЛАВА 4. ОЦЕНКА СУБПОПУЛЯЦИЙ Т-ЛИМФОЦИТОВ, НК-КЛЕТОК И МОНОЦИТОВ У ПАЦИЕНТОВ С ХЛЛ В ДЕБЮТЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ И НА ФОНЕ ТЕРАПИИ	81

4.1 Оценка субпопуляций Т-лимфоцитов и НК-клеток в периферической крови до и в динамике терапии больных хроническим лимфолейкозом	81
4.2. Оценка субпопуляционного состава Т-лимфоцитов и НК-клеток в группах пациентов в зависимости от наличия или отсутствия del17p	90
4.3. Оценка субпопуляционного состава моноцитов крови при ХЛЛ	94
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	99
ВЫВОДЫ	111
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	113
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ	113
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	114

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ХЛЛ - хронический лимфолейкоз

ЛПУ – лечебно-профилактические учреждения

МГГЦ – Московский городской гематологический центр

CD – cluster of differentiation - кластер дифференцировки

МОБ –минимальная остаточная болезнь

ROR1 - receptor tyrosine kinase like orphan receptor-1- орфанный рецептор 1

ERIC – European Research Initiative on CLL - Европейская исследовательская инициатива по ХЛЛ

Th – Т-хелперы

Tcyt – цитотоксические Т-клетки

Treg – Т-регуляторные клетки

T-NK – Т-НК-клетки

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения

МКА – моноклональные антитела

ИП – истинно положительный результат

ЛО – ложноотрицательный результат

ЛП – ложноположительный результат

ИО – истинно отрицательный результат

ИРИ – иммунорегуляторный индекс

ЦТП – цитотоксический потенциал

ВТК – тирозинкиназа Брутона (Bcr tyrosine kinase)

КМ – костный мозг

ЛУ – лимфатические узлы

ЛПЗ – лимфопролиферативные заболевания

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы 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} [107, 23, 31, 163].

Некоторые В-клеточные лимфопролиферативные новообразования, такие как, лимфома из клеток мантии, лимфома маргинальной зоны, лимфоплазмочитарная лимфома имеют сходные клиничко-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 лейкоэмических 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. [43,144,105]. 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 [101]. 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 солидных опухолей и др. [156, 151, 174]. 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 [90,149,178,155]. Согласно литературным данным ROR-1 может стимулировать различные сигнальные пути, что приводит к повышению выживаемости, пролиферации и метастазированию опухолевых клеток [8]. 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 анализировалась экспрессия CD180 в зависимости

от мутированного статуса генов IGVH) [56,69], а в работах Gordiienko I. с соавторами, 2017 [168] 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 лейкоэмических клеток, а остаточная опухолевая популяция является источником рецидива заболевания [28,26,39,9]. 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 [2,10] либо CD4⁺ и CD8⁺ лимфоциты [75, 173]. 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) [172] и Kowalska W. et al., (2022) [140] отмечалось увеличение относительного содержания неклассических моноцитов, в то время как Damasceno D. et al., (2016) [82] 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 ХЛЛ.
2. Сопоставить результаты двух иммунофенотипических подходов в оценке минимальной остаточной болезни при ХЛЛ: стандартизированный 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 исследования

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 об 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 клинко-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 определяется во всех случаях ХЛЛ на опухолевых В-лимфоцитах и не выявляется на В-лимфоцитах доноров и пациентов с реактивным лимфоцитозом. 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 в 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 (MO1) и повышению субпопуляции неклассических моноцитов (MO3). 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 Navios (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% перцентиль 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 иммунокорректирующей 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, заключения, выводов, практических рекомендаций и указателя литературы. Библиографический указатель включает 196 источников, из которых 41 отечественных и 155 зарубежных авторов.

ГЛАВА 1. НОВЫЕ МАРКЕРЫ В ДИАГНОСТИКЕ И МОНИТОРИНГЕ ХРОНИЧЕСКОГО ЛИМФОЛЕЙКОЗА. ВЛИЯНИЕ ТЕРАПИИ НА ИЗМЕНЕНИЯ СУБПОПУЛЯЦИОННОГО СОСТАВА Т-ЛИМФОЦИТОВ, НК-КЛЕТОК И МОНОЦИТОВ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

Согласно классификации ВОЗ, 2022 г. хронический лимфолейкоз/лимфоцитарная лимфома, относится к группе В-клеточных лимфопролиферативных заболеваний (В-ЛПЗ) и характеризуется клональной пролиферацией В-лимфоцитов антигензависимых стадий дифференцировки и их экспансией в костном мозге, периферической крови, вторичных лимфоидных органах [107, 23, 31, 163].

ХЛЛ один из наиболее часто встречающихся лейкозов, на его долю приходится около 30% всех В-ЛПЗ. Частота ХЛЛ в европейских странах составляет 5:100000 в год. С возрастом заболеваемость ХЛЛ возрастает и после 70 лет достигает 20:100000 в год [187,52,63]. В Российской Федерации ХЛЛ выявляется реже, в 2017г. частота встречаемости составила 2,95:100000, с медианой возраста 68 лет. Мужчины болеют значительно чаще женщин (соотношение 1,7:1). Заболеваемость ХЛЛ у родственников больных в 3 раза выше по сравнению с общей популяцией [19,8,20].

Благодаря детальному анализу генов иммуноглобулинов клонального В-клеточного рецептора, выделено два варианта ХЛЛ, отличающихся по мутационному статусу IGHV-генов. Случаи ХЛЛ, в которых гены IGHV, более чем на 98% идентичны их герминальным последовательностям, считаются немутированными (U-CLL) и характеризуются агрессивным течением и плохим прогнозом, в то время как ХЛЛ с мутированными IGHV-генами (M-CLL) имеют благоприятное течение и хороший прогноз. Определение мутационного статуса генов IGHV дает возможность не только точно предсказать клиническое течение заболевания, но и важно для принятия

решения о выборе терапии. Клиническое течение ХЛЛ коррелирует со степенью соматической гипермутации генов IGHV [31].

Основными диагностическими критериями ХЛЛ в соответствии с рекомендациями ВОЗ 2022 гг. года являются:

- наличие в периферической крови более 5000 в 1 мкл моноклональных В-лимфоцитов;
- моноклональная пролиферация лимфоцитов с фенотипом CD19⁺CD5⁺CD23^{bright or intermed} + CD79b^{dim}+CD20^{dim}+CD22^{dim}+ CD81^{dim}+ sIg^{dim} +
- рестрикция легких цепей (каппа либо лямбда)

Несмотря на известный фенотип опухолевых клеток при ХЛЛ, в настоящее время продолжается поиск новых диагностических маркеров, экспрессия которых остается стабильной при лечении пациентов с ХЛЛ и может быть использована как в диагностике, так и в оценке остаточной опухолевой популяции. В немногочисленных литературных источниках обсуждается роль таких маркеров, как CD180, CD148, CD150, ROR-1 [107, 31, 88].

1.1. Маркеры CD180 и ROR-1 в диагностике ХЛЛ

1.1.1 Структура и функции CD180

CD180, известный также как RP105 и антиген лимфоцитов 64 (LY64), является трансмембранным гликопротеином I типа, принадлежащим к семейству патоген-распознающих рецепторов, которые называются Toll-подобные рецепторы (TLR). CD180 участвует в активации и пролиферации нормальных В-клеток, регуляции распознавания липополисахарида В-клетками [154].

Филогенетический анализ позволил отнести человеческий CD180 к семейству TLR, наиболее тесно связанных с TLR4 [121]. CD180 состоит из внеклеточных 22-х лейцин-обогащенных повторов (LRR) и короткого цитоплазматического концевой участка [51]. Внеклеточные LRR

связываются с молекулой под названием MD-1 и образуют рецепторный комплекс клеточной поверхности CD180/MD-1. MD-1 необходим для поверхностной экспрессии и функционирования CD180 [145]. Этот комплекс, действуя согласованно с TLR4, контролирует распознавание В-клетками липополисахарида (ЛПС), мембранного компонента грамотрицательных бактерий и передачу соответствующего сигнала (Рис.1-1) [111, 110, 147, 181].

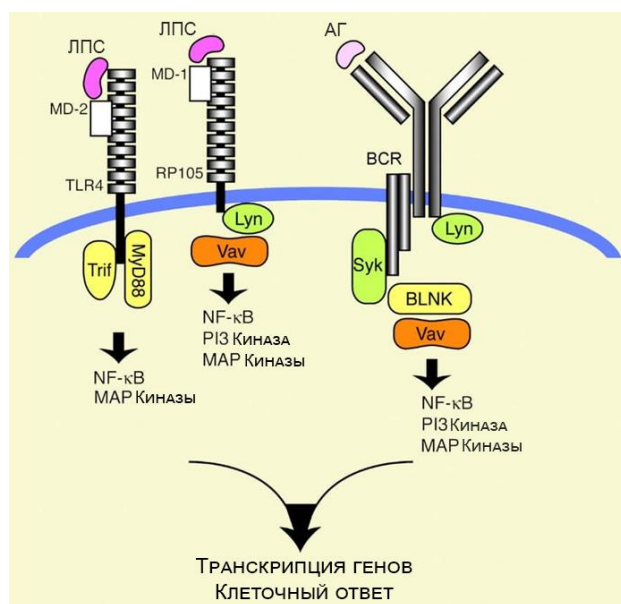


Рис.1-1. Структура CD180 (RP-105) и взаимодействие с другими молекулами.

Обозначения: АГ – антиген;
ЛПС - липополисахариды

<https://www.creative-biolabs.com/adc/target-cd180-8.htm>

В норме CD180 экспрессируется на поверхности В-клеток-предшественниц, В-лимфоцитов мантийной и маргинальной зоны и в небольшой степени, либо вообще не экспрессируется, на поверхности В-клеток герминального центра. Кроме того, экспрессия CD180 обнаруживается на мембране моноцитов периферической крови и дендритных клеток [177, 121, 145].

Современное представление о CD180-опосредованной сигнальной активности в В-клетках в основном получено из исследований с использованием анти- CD180 антител. Стимуляция В-клеток селезенки этими антителами приводила к фосфорилированию CD19, что указывало на центральную роль взаимодействия CD180 /CD19 в активации В-лимфоцитов. Следствием активации CD180 является пролиферация В-лимфоцитов, синтез антител, экспрессия поверхностных активационных маркеров В-клеток, что

сопровождается повышенной экспрессией костимулирующих молекул CD69 и CD86 и увеличением размера клетки (рис.1-2) [154,92].

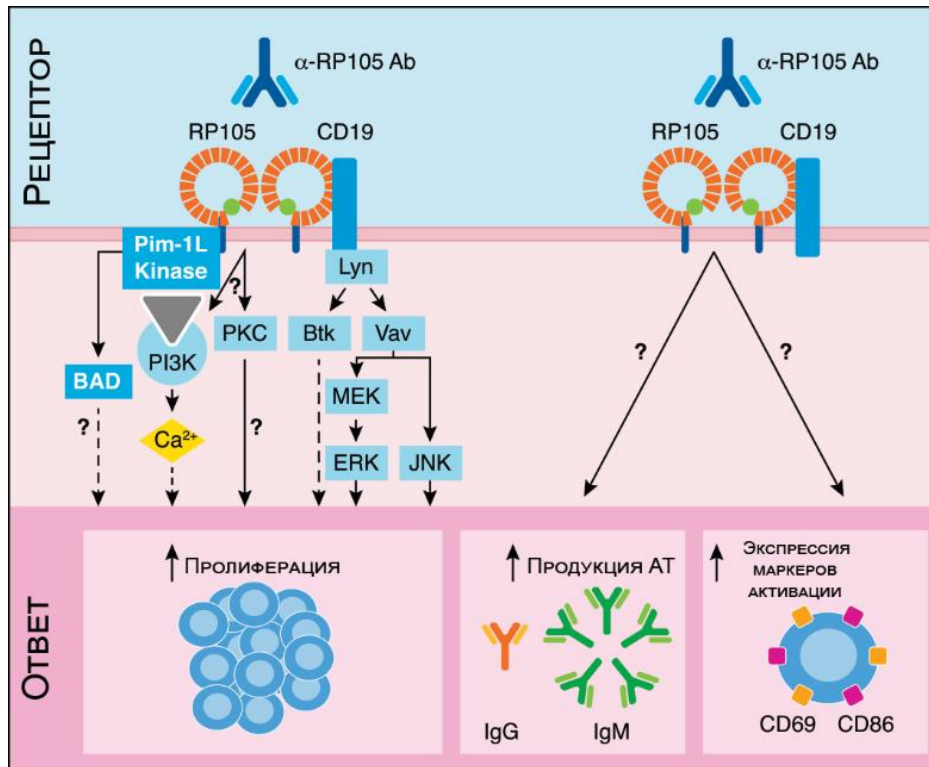


Рис.1-2. Механизм действия RP105 (CD180). Активирующее анти-RP105 антитело вызывает пролиферацию В-лимфоцитов, продукцию ими антител и экспрессию поверхностных маркеров активации. Молекулярные связи, определяющие RP105-опосредованную пролиферацию В-клеток, наиболее изучены с использованием метода на мышах и включают в себя следующие пути: 1) сигнальный путь CD19/Lyn/Vav с последующей активацией пути MAPKs, включающего JNK и MEK/ERK [57,171,186], 2) активация CD19/Lyn с активацией Btk, участвующего в пролиферации клеток [171] и 3) CD19-независимая активация PI3K и мобилизация Ca²⁺. Активация CD180 на В-клетках человека вовлекает каскад событий с участием киназы Pim-1L, с последующей активацией проапоптотического белка BAD и в конечном итоге усиливает пролиферацию В-лимфоцитов. В тоже время, сигнальные механизмы продукции АТ и экспрессии маркеров активации (CD69, CD86) на В-лимфоцитах человека изучены недостаточно. [92]. Schultz T.E., Blumenthal A. [154].

В работах Porakishvili N с соавторами было показано, что экспрессия CD180 обнаружена в 60% случаев ХЛЛ. Уровень экспрессии CD180 на В-клетках ХЛЛ варьируется, но всегда более низкий, чем на нормальных В-лимфоцитах крови, и остается стабильным. Значительно более высокую плотность CD180 экспрессировали клетки ХЛЛ с мутированными генами IGVH по сравнению с немутированными генами IGVH [56,69], что позволило считать CD180 суррогатным маркером прогноза при ХЛЛ.

В последние годы значительное внимание уделяется исследованиям, направленным на изучение факторов взаимодействия клеток ХЛЛ и микроокружения. Было показано, что взаимодействие В-клеток ХЛЛ с микроокружением посредством рецептора CD180 может способствовать их активации, жизнеспособности и экспансии [56], что может иметь важное прогностическое значение.

Кроме того, вызывает интерес коэкспрессия CD180 и CD150 на опухолевых клетках ХЛЛ, которая встречается в более чем 50% случаев ХЛЛ. Предполагают, что сочетание сигналов, идущих через CD150 и CD180 приводит к взаимному ингибированию сигнальных путей Akt и MAPK, что может быть сдерживающим фактором пролиферации В-клеток ХЛЛ, и ассоциируется с благоприятным прогнозом [168].

Кроме того, выявлено участие CD150 и CD180 в регуляции цитокинов. Показано, что повышенный уровень экспрессии CCL3/CCL4 и сниженный уровень экспрессии IL-6/IL-10 являются специфическими особенностями клеток ХЛЛ, коэкспрессирующих CD150 и CD180. Подавление CD150 и CD180 не влияло на уровень экспрессии мРНК CCL3/CCL4 в В-клетках ХЛЛ, в то время как уровень экспрессии IL-6 и IL-10 был значительно снижен. После стимуляции опухолевых В-клеток, экспрессирующих CD150 и CD180, наблюдалось снижение в супернатантах культуры клеток уровня IL-10, но не IL-6. Отмечена корреляция между базальными уровнями экспрессии мРНК CCL3, CCL4, IL-6 и IL-10 в В-клетках ХЛЛ и их чувствительностью к химиотерапевтическим препаратам *ex vivo*. Так, высокий уровень экспрессии

мРНК CCL3/CCL4 и низкий уровень экспрессии мРНК IL-10 связаны с чувствительностью опухолевых В-клеток к бендамустину (BEN), в то время как высокий уровень IL-6 является признаком резистентности клеток ХЛЛ к флударабину (FLU) [55]. Показано, что рецепторы CD150 и CD180 участвуют в регуляции чувствительности клеток ХЛЛ к флударабину (FLU) и бендамустину (BEN). Кроме того, CD150 и CD180 являются положительными регуляторами экспрессии CD20, что способствует повышению чувствительности клеток ХЛЛ к CD20-направленной иммунотерапии [54]. Определение уровня экспрессии цитокинов вместе со статусом экспрессии CD150 и CD180 может быть использовано для прогнозирования ответа клеток ХЛЛ и оптимизации персонализированной схемы химиотерапии.

Таким образом, экспрессия CD180 на опухолевых клетках может быть использована как прогностический маркер ответа на терапию.

1.1.2 Структура и функции ROR-1

ROR-1(receptor tyrosine kinase like orphan receptor-1) относится к семейству рецепторов с тирозинкиназной активностью [151,90] и одному из двадцати семейств RTK [85]. Он состоит из 937 аминокислотных остатков с вне- и внутриклеточными доменами. Внеклеточная часть включает 3 области: Ig-подобный (IG), богатый цистеином домен (CRD) и домен Крингла (кольцевой) (KNG или KD) домены. CRD домен модулирует неканоническую сигнализацию WNT путем связывания с лигандом Wnt5a [152, 153]. KD домен опосредует взаимодействие ROR-1 с другими рецепторами, такими как ROR-2 [194]. Цитоплазматическая (внутриклеточная) часть ROR-1 содержит тирозинкиназный домен, два серин/треонин-богатых домена и пролин-богатый домен. Подробные сигнальные процессы, активируемые ROR-1, были рассмотрены сравнительно недавно [124]. Функция тирозинкиназного домена остается недостаточно изученной. Пролин-богатый домен отвечает за активацию сигналов миграции и пролиферации клеток путем присоединения SH3-домен-содержащих белков, включая HS1, DOCK2 и кортактин

[190,89,192]. Серин/треониновый домен взаимодействует с адапторными белками, такими как 14-3-3 zeta, что приводит к устойчивости к апоптозу [191,167,182]. (рис.1-3)

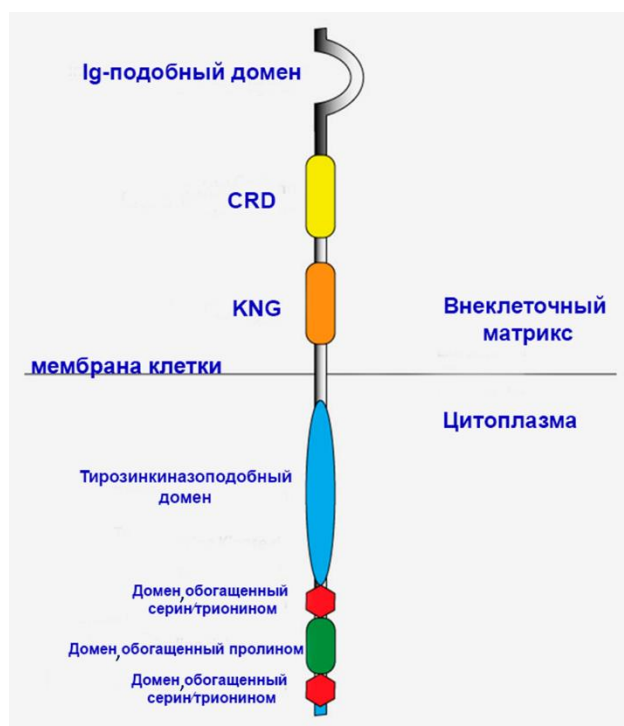


Рис.1-3 Структура ROR-1. Внеклеточная часть: Ig-подобный обогащенный цистеином домен (CRD) и домен Крингла (кольцевой) (KNG или KD) домены; цитоплазматическая (внутриклеточная) часть: тирозинкиназный домен, два серин/треонин-обогащенный домена и пролин-богатый домен.
Caroline E. Ford, Sean Si Qian Ma, Ashfaque Quadir and Robyn L. Ward [167]

Рецепторные тирозинкиназы и связанные с ними сигнальные пути выполняют важные функции в регуляции роста как злокачественных, так и нормальных клеток. Дисрегуляция их способствует ускользанию от апоптоза, неограниченной репликации и росту злокачественных клеток, способности к метастазированию [89,148].

Ген, кодирующий ROR-1, был впервые идентифицирован в человеческой линии клеток нейробластомы в 1992 году [179], и последующие исследования показали, что ROR-1 экспрессируется преимущественно во время эмбриогенеза на клетках центральной нервной системы, а также на кардиомиоцитах, клетках скелетных мышцах и легочной системы [109]. Выключение ROR-1 приводит к гибели эмбрионов, что указывает на важную роль ROR-1 в эмбриогенезе [153]. После рождения и в течении всей жизни экспрессия ROR-1 обнаруживается на клетках жировой ткани, верхнего отдела желудочно-кишечного тракта (участков пищевода, желудка,

двенадцатиперстной кишки и панкреатических островков), парациотовидных желез. На остальных клетках экспрессия ROR-1 не встречается. Функция ROR-1 на клетках этих тканей в настоящее время неизвестна [182]. Имеются данные, что ROR-1 участвует в различных сигнальных путях, регулирующих рост клеток и эпителиально-мезенхимальный переход [152]. В течение короткого периода времени ROR-1 экспрессируется на клетках предшественницах В-лимфоцитов [48, 156, 164].

В ряде работ показано, что ROR-1 способен активировать сигнальные молекулы, такие как RAC-1 (Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1) и контрактин [193,190], которые способствуют пролиферации, выживанию и миграции клеток [193,190,89]. Как отмечалось в некоторых исследованиях, ROR-1 является рецептором для Wnt5a [49]. Активация сигнального пути Wnt через комплекс TCL1 (T-Cell Leukemia/Lymphoma 1A oncogene) и коактиватор АКТ (RAC-alpha serine/threonine-protein kinase, Protein kinase B alpha) усиливает миграцию, пролиферацию и выживание ROR-1-позитивных клеток ХЛЛ и, таким образом, влияет на прогрессирование заболевания [194,50,175].

Сигнальный механизм ROR1, способствующий поддержанию, самообновлению и лекарственной устойчивости опухолевых стволовых клеток (CSCs - cancer stem cells) был обнаружен при некоторых видах рака [104]. Связывание Wnt5a с ROR-1 вызывает внутриклеточную сигнализацию, что приводит к усилению активации АКТ, которая, в свою очередь, может фосфорилировать BMI-1 (B lymphoma Mo-MLV insertion region 1 homolog), способствуя геномной нестабильности, пролиферации опухолевых клеток и лекарственной устойчивости (Рис. 1-4).

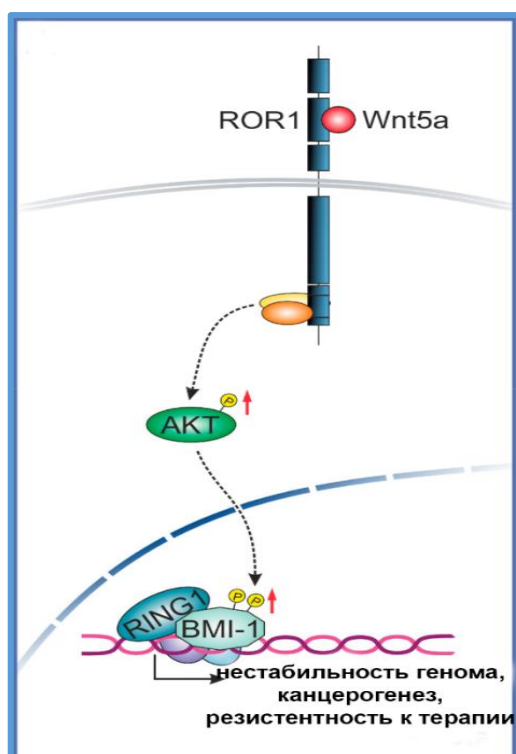


Рис.1-4 Механизм активации сигнальных путей с участием Wnt5a и ROR-1.

Hanna Karvonen, Harlan Barker, Laura Kaleva, Wilhelmiina Niininen, Daniela Ungureanu [118]

Предполагается, что ROR-1 является фактором выживания опухолевых клеток при различных злокачественных новообразованиях, включая ХЛЛ, рак молочной железы, аденокарциному легких, рак яичников и поджелудочной железы и глиобластому [178]. Использование моноклональных антител к ROR-1 и ROR-1-специфическим молекулам РНК-интерференции (RNAi) вызывало апоптоз и нарушение роста нескольких типов злокачественных клеток, экспрессирующих ROR-1, в том числе рак поджелудочной железы [156,151,174]. По-видимому, ROR-1 играет важную роль в клеточных сигнальных путях, имеющих значение для формирования опухоли, таких как, путь PI3K/AKT/mTOR и EGFR [152].

Согласно немногочисленным исследованиям, экспрессия ROR-1 регистрируется на В-клетках лимфоидных опухолей, включая ХЛЛ/лимфоцитарную лимфому, мантийноклеточную и лимфому маргинальной зоны, диффузную В-крупноклеточную лимфому, фолликулярную лимфому, В-клеточный острый лимфобластный лейкоз, то

время как на нормальных зрелых В-лимфоцитах экспрессия ROR-1 практически не обнаруживается [90, 149,178,155]. В исследованиях М.К. Hasan и соавторов было показано, что ROR-1 является доминирующим маркером хронического лимфолейкоза [193,190], что подтверждено и в других исследованиях [90,151,183]. Этот маркер регистрируется практически во всех случаях ХЛЛ (около 98%), независимо от установленных прогностических маркеров, таких как мутационный статус генов варибельной области тяжелой цепи иммуноглобулина или экспрессия ZAP-70 [183,49,152,151,59]. Примерно в 2-5% случаев ХЛЛ экспрессия ROR1 на опухолевых В-лимфоцитах крайне низкая или отсутствует. Изучение уровня экспрессии ROR1 при ХЛЛ показало, что он может существенно отличаться у разных пациентов, но всегда значительно выше уровня нормальных В-лимфоцитов. При этом уровень экспрессии ROR-1 существенно не меняется с течением времени и не зависит от проводимой терапии. Высокий уровень экспрессии ROR1 ассоциируется с прогрессией заболевания, IGVH мутационным статусом, укорочением общей выживаемости и выживаемости свободной от болезни [62,90,72].

Таким образом, CD180 и ROR-1 являются важными молекулами В-лимфоцитов, играющих существенную роль в выживаемости опухолевых клеток ХЛЛ, их пролиферации и активации. Учитывая тот факт, что экспрессия ROR-1 регистрируется на всех В-лимфоцитах при ХЛЛ, этот маркер является привлекательной мишенью для новой таргетной терапии. Изучение новых маркеров при ХЛЛ может способствовать более детальной характеристике опухолевых клеток, что необходимо, как для понимания патогенеза, так и последующего развития иммунотерапии ХЛЛ.

1.1.3 Оценка минимальной остаточной болезни при ХЛЛ

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) у пациентов в состоянии полной ремиссии. В настоящее время отдают предпочтение термину "определяемая (measurable residual disease, МОБ) или неопределяемая остаточная болезнь". МОБ-негативный ХЛЛ в настоящее время определяется как наличие менее 1 клетки ХЛЛ на 10 000 лейкоцитов ($<10^{-4}$) [106].

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 [28,26,39,9]. Срок наступления рецидива зависит от биологических характеристик опухоли, поэтому при одинаковом уровне МОБ рецидив может развиваться в разные сроки наблюдения. Прогностическое значение статуса МОБ для выживаемости было неоднократно доказано в многочисленных рандомизированных исследованиях [87,116]. Применение новых препаратов в первой линии и при рецидивах существенно улучшило результаты лечения. У пациентов с ХЛЛ, достигших неопределяемого уровня МОБ после терапии, беспрогрессивная выживаемость была значительно больше. [116,44,184,128,113,137,117,176,77]. Так в работе Kwok M. et al., 2016 [115] было показано, что у пациентов с ХЛЛ с сопутствующими заболеваниями величина МОБ коррелирует с полной безрецидивной выживаемостью (PFS) и общей выживаемостью (OS) и может использоваться в качестве суррогатного маркера в клинических испытаниях. Кроме того, использование протокола G-S1b (обинутузумаб-хлорамбуцил) позволяет большему числу пациентов достичь МОБ-негативной ремиссии.

В настоящее время для оценки МОБ при ХЛЛ используются два метода – иммунофенотипический с использованием многоцветной проточной цитометрии (МПЦ) и молекулярный (количественная аллель – специфичная полимеразная цепная реакция (ПЦР) в реальном времени (RQPCR) и высокопроизводительное секвенирование (NGS), каждый из которых имеет свои специфические преимущества (Таблица 1-1) [26,114,39].

Таблица 1-1. Сравнение разных методов оценки МОБ

Метод	Проточная цитометрия		Молекулярные методы	
	4-цветная	6-цветная	Аллель-специфичная ПЦР в реальном времени	Секвенирование нового поколения (NGS)
Нижний уровень, при котором измерение достоверно	0,01% (10^{-4})	0,001% (10^{-5})	0,001% (10^{-5})	0,0001% (10^{-6})
Нижний предел чувствительности	0,005% (2×10^{-5})	0,001% (10^{-5})	0,001% (10^{-5})	0,0001% (10^{-6})
Кол-во материала для исследования	>5 миллионов клеток	>3 миллионов клеток	500 нг ДНК в трех повторах (>1 миллиона клеток)	14 мкг ДНК > 2 миллионов клеток
Нужен ли образец до терапии	нет	нет	да	да
Нужен ли подбор индивидуальных условий	нет	нет	да	нет
Может ли образец храниться	нет	нет	да	да
Порядок вычисления и предоставления результата	прямой подсчет	прямой подсчет	число копий пациент-специфичных IGH калибруется по стандартной кривой, полученной при исследовании разведений образца ДНК, взятого до терапии	число копий пациент-специфичных IGH калибруется по референсной последовательности и представляется как доля от общего числа лейкоцитов, высчитанного исходя из общего количества ДНК
Недостатки	Интерпретация данных требует экспертизы	Интерпретация данных требует экспертизы	Высокая трудоемкость Интерпретация данных требует экспертизы	Высокая стоимость Нет валидации в клинических исследованиях

Группой ученых Европейской исследовательской инициативы по ХЛЛ (European Research Initiative in CLL, ERIC) после исследования 50 комбинаций МКА в 2007 г. разработан стандартизованный международный протокол для определения МОБ методом 4-цветной ПЦ и затем 6-цветной ПЦ (таб. 1-2) [105, 102].

Таблица 1-2. Панели МКА, применяемые для диагностики МОБ ХЛЛ с использованием 4-х и 6-ти цветной проточной цитометрии [102]

FITC	PE	PerCP- Cy5,5	PE-Cy 7	APC	APC-H7
	κ	CD19	-	CD5	-
CD45	CD14	CD19	-	CD3	-
CD20	CD38	CD19		CD5	-
CD81	CD22	CD19		CD5	-
CD43	CD79b	CD19		CD5	-
CD3	CD38	CD5	CD19	CD79b	CD20
CD81	CD22	CD5	CD19	CD43	CD20

Дальнейшее совершенствование проточной цитометрии, появления новых флюорохромов позволило оптимизировать анализ МОБ ХЛЛ до 8-10-цветного [144, 43].

Рекомендуемая в настоящее время минимальная диагностическая панель включает следующие маркеры: CD19, CD5, CD23, CD20, CD45, κ и λ легкие цепи иммуноглобулинов. В качестве дополнительных диагностических маркеров предложено использовать CD43, CD200, CD81, CD79b, ROR-1, CD10 [105].

Нижним порогом чувствительности ПЦ, позволяющим регистрировать МОБ, является 1 клетка ХЛЛ на 10 000 лейкоцитов (0,01% или 10^{-4}) [106].

Использование многоцветной ПЦ позволяет повысить чувствительность метода до 10^{-5} (1 клетка ХЛЛ на 100 000 лейкоцитов). (Табл. 1-3)

Таблица 1-3. Изменение чувствительности метода ПЦ в оценке МОБ ХЛЛ.

Andy C. Rawstron лекция «MRD in CLL»

Панель	Число пробирок	Чувствительность	Число событий, необходимое для достижения чувствительности 0,01%
4 цвета	4	0,005%	4-20 млн
6 цветов	2	0,001%	2-10 млн
8 цветов	1	0,001%	1-5 млн

Совершенствование ПЦ, так называемой проточной цитометрии нового поколения (NGS-Flow), позволит приблизиться по чувствительности к высокопроизводительному секвенированию нового поколения (NGS) (10^{-6}).

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.

Как было сказано выше, экспрессия ROR-1 регистрируется на В-лимфоцитах практически во всех случаях ХЛЛ, поэтому представляет интерес оценка стабильности его экспрессии в процессе лечения с последующим использованием в панели для оценки МОБ. Однако исследования, касающиеся этого направления, крайне немногочисленны [150]. В работе Миролюбовой Ю.В. с соавт., изучавших 64 образца аспирата костного мозга от 37 пациентов ХЛЛ, были показаны высокие дифференцирующие свойства ROR-1 в отношении клеток ХЛЛ и зрелых В-лимфоцитов. Во всех проанализированных образцах была выявлена яркая мономорфная экспрессия ROR-1 на клетках ХЛЛ и В-клеточных предшественницах и отсутствие на нормальных В-лимфоцитах. Продемонстрирована эффективность

использования ROR-1 в 4-х цветной панели для оценки МОБ ХЛЛ. Однако, высокая экспрессия ROR-1 на нормальных В-клеточных предшественницах требует применения ROR-1 в сочетании с маркером, дифференцирующим клетки ХЛЛ от клеток-предшественниц (CD81) [28].

В 2017 году фирма Beckman Coulter выпустила набор реагентов DuraClone RE CLB tube для восьмицветного анализа МОБ ХЛЛ, в состав которого входит ROR-1. Данный набор представляет собой готовую к применению пробирку с лиофилизированными моноклональными антителами: CD20/ROR-1/CD45/CD81/CD79b/CD19/CD5/CD43 [129]. Использование данных реагентов позволило стандартизировать методику определения МОБ, снизить число преаналитических ошибок, связанных с пробоподготовкой и повысить сходимость межлабораторных исследований образцов крови с ХЛЛ [131]. Кроме того, использование ROR-1 в панели МОБ возможно позволит исключить оценку экспрессии легких цепей, как маркера клональности В-лимфоцитов. Оценка рестрикции легких цепей необходима для надежного распознавания опухолевых клеток ХЛЛ, но требует определенных навыков в выполнении методики и поэтому не всегда применяется [144].

Таким образом, появление современных схем терапии ХЛЛ с включением таргетных препаратов, требует поиска новых маркеров для оценки МОБ, одним из которых может явиться ROR-1.

1.2 Оценка субпопуляционного состава Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов и НК-клеток при ХЛЛ

Несмотря на успехи современной терапии ХЛЛ, возможности которой расширились благодаря использованию новых препаратов (ингибиторы тирозинкиназы Брутона (ВТК), BCL-2, иммуномодуляторы, ингибиторы контрольных точек, моноклональные антитела), позволяющих достичь глубокого молекулярного ответа, иммунологическая дисфункция по-прежнему является ключевым фактором, определяющим развитие

инфекционных осложнений, которые становятся основной причиной в структуре смертности этих пациентов.

По данным датского регистра, который включал 10 455 пациентов с ХЛЛ в течение почти 50-летнего периода наблюдения, инфекции являлись основной причиной смерти у 10-20% больных [101]. Результаты других исследований показали, что частота фатальных инфекций колеблется от 30 до 50% [166,136,119].

Инфекционные осложнения развиваются вследствие снижения гуморального иммунитета, как результата опухолевой прогрессии, так и иммуносупрессии, связанной с таргетной терапией. Характер инфекционных осложнений может быть различным: бактериальный, вирусный (из-за устойчивого снижения субпопуляции CD4+ Т-лимфоцитов), грибковый и смешанный [127,158].

Восприимчивость к инфекциям отмечается еще на предстадии ХЛЛ – моноклональном В-клеточном лимфоцитозе, что свидетельствует о развитии иммунологических дефектов в клетках врожденного и адаптивного иммунитета на очень ранних стадиях, еще до развития значительной инфильтрации органов и тканей клетками ХЛЛ, гипогаммаглобулинемии и проведения химиотерапии. Частота тяжелых инфекций у пациентов рефрактерных к иммунохимиотерапии высокая и достигает около 80% [83]. Согласно клиническим рекомендациям по профилактике и лечению инфекционных осложнений у пациентов ХЛЛ ключевая роль в развитии инфекции принадлежит нейтропении, однако, кроме этого, необходимо учитывать уровень иммуноглобулинов (IgG <5г/л) и количество CD4+ лимфоцитов (<200/мкл) [26].

У пациентов с ХЛЛ в ходе опухолевой прогрессии было отмечено модифицирующее действие опухолевых клеток на ферментативную активность нейтрофильных гранулоцитов, которая выражалась в стимуляции продукции нейтрофилами активных форм кислорода. У пациентов в ремиссии

ферментативная активность нейтрофилов не достигала нормальных значений [2].

При ХЛЛ клеточно-опосредованный иммунитет всегда нарушен, а частота и тяжесть инфекций коррелируют с прогрессирующей иммунологической дисфункцией. Ключевым фактором, определяющим эту дисфункцию, является влияние клеток ХЛЛ на стромальное микроокружение, которое с одной стороны поддерживает пролиферацию опухолевых клеток, с другой – изменяет функции нормальных В- и Т-лимфоцитов, макрофагов и других клеток стромы [32]. Очевидно, этим же обусловлены многочисленные дефекты, как со стороны специфической (Т- и В-лимфоциты), так и неспецифической иммунной системы (НК-клетки, дисфункция нейтрофилов и моноцитов, активность системы комплемента).

1.2.1 Субпопуляции Т-лимфоцитов

В последние годы расширились представления о субпопуляционном составе Т-лимфоцитов. Описаны их фенотипические характеристики и функциональное значение. Среди Т-лимфоцитов выделяют значительное число субпопуляций Т-хелперов: Th1, Th2, наивные Т-клетки, Т-клетки памяти, регуляторные Т-клетки (Treg) и Т-хелперы 17 (Th17). Популяция цитотоксических Т-лимфоцитов также гетерогенная, среди которых определяют «наивные» Т-клетки, клетки центральной памяти, эффекторные клетки памяти (EM), эффекторные клетки-TEMRA (терминально-дифференцированные эффекторные клетки) [30]

Одним из основных маркеров Т-лимфоцитов является Т-клеточный рецептор (TCR – T-cell Receptor). Выделяют два типа рецепторов: TCR $\alpha\beta$, состоящий из α - и β -цепей и TCR $\gamma\delta$, состоящий из γ - и δ -цепей [80, 157]. Большая часть Т-лимфоцитов периферической крови (81,4 – 98,4%) [30] имеют TCR $\alpha\beta$ и представлены как Т-хелперами, так и цитотоксическими Т-клетками. На долю циркулирующих TCR $\gamma\delta$ -Т-клеток приходится 1,6 – 8,9% [30], причем большая часть из них CD4-CD8- и лишь небольшая популяция

экспрессирует CD8 и CD56, в отличие от тканевой популяции, имеющей на своей поверхности CD8. Данные клетки обладают цитотоксической активностью против бактериальных и вирусных антигенов, кроме того, они играют важную роль в противоопухолевом иммунитете. К основным механизмам противоинфекционной защиты TCR $\gamma\delta$ -Т-клеток относится как их цитолитическая активность, так и способность проникать в лимфоузлы, участвовать в созревании дендритных клеток и выступать в роли антиген-представляющих клеток. При попадании в организм патогенного фактора TCR $\gamma\delta$ -Т-клетки в течении 4-6 дней активно пролиферируют, при этом число антиген-специфических TCR $\gamma\delta$ -Т-клеток может достигать 98,0% от общего количества циркулирующих TCR $\gamma\delta$ -Т-клеток. Длительность ответа может достигать 7 месяцев [61]. Увеличение данной популяции клеток может рассматриваться как показатель недавней или прогрессирующей (хронической) инфекции особенно слизистых оболочек и [30].

Существует несколько подходов к оценке гетерогенности Т-клеточной популяции. Первый подход основан на определении экспрессии поверхностных антигенов клеток, применяемых для оценки степени дифференцировки субпопуляций Т-лимфоцитов, второй – на анализе способности клеток к пролиферации и/или поддержанию определенной численности в периферической крови и лимфоидных органах, третий – на определении уровня продукции и/или секреции цитокинов [22].

На основании фенотипа Т-лимфоцитов выделяют следующие субпопуляции: покоящиеся наивные Т-клетки, покоящиеся Т-клетки памяти и активированные Т-клетки, которые появляются в процессе стимуляции наивных клеток антигеном *in vivo* [27].

«Покоящиеся наивные» Т-лимфоциты имеют фенотип: CD3+CD45RA+CD45R0-CD62L+CCR7+CD27+CD28+, среди которых могут быть как Т-хелперы, так и цитотоксические Т-лимфоциты. Коэкспрессия CD62L вместе с CD197 (CCR7 – рецептор для хемокинов С-С семейства CCL19 и CCL21) способствует прочной адгезии «наивных» клеток на клетки

эндотелия и запуску механизмов трансэндотелиальной миграции. Данные клетки способны секретировать IL-2, но не IL-4, IL-5 и IFN γ .

В свою очередь «покоящиеся» Т-клетки памяти имеют фенотип CD3+CD45RA-CD45R0+.

Кроме того, выделяют клетки *центральной памяти (СМ)* с фенотипом CD3+CD45RA-CD45R0+CD62L+CCR7+CD27+CD28+ и клетки *эффекторной памяти (ЕМ)*, имеющие фенотип CD3+CD45RA-CD45R0+CD62L-CCR7-CD27+CD28+. В число Т-клеток центральной памяти входят как Т-хелперы, так и цитотоксические Т-лимфоциты, прошедшие антигензависимую стадию дифференцировки. Наличие на поверхности клеток СМ CD62L и CCR7 позволяет им длительное время циркулировать в организме и локализоваться преимущественно во вторичных лимфоидных органах. Высокий уровень CD27 и CD28 позволяет этим клеткам быстро активизироваться и развить иммунный ответ. Клетки ЕМ не способны проникать в периферические лимфоидные органы, т.к. не имеют CD62L и CCR7, но они содержат на своей поверхности большое количество адгезионных молекул и хемокиновых рецепторов и способны к миграции в определенные органы и ткани, где и реализуют свои функции.

Эффекторные Т-клетки (терминально дифференцированные CD45RA-позитивные клетки (TEMRA)) имеют фенотип CD3+CD45RA+CD45R0-CD62L-CCR7- и рассматриваются как финальная стадия дифференцировки Т-лимфоцитов, которую можно выявить в периферической крови. В свою очередь по уровню экспрессии CD27 и CD28 подразделяются на минорные субпопуляции [27].

Дифференцировка наивных Т-клеток в эффекторные значительно повышает их функциональный потенциал. Этот процесс необходим для освобождения организма от патогенов. В значительной степени это происходит под действием цитокинов, продуцируемых клетками врожденной иммунной системы, которые, в свою очередь, были активированы при взаимодействии с патогенами. По современным данным, TEMRA необходимы

для немедленной элиминации патогена при реинфекции [6], тогда как Т-СМ обеспечивают защиту от системных воздействий, активируясь дендритными клетками во вторичных лимфоидных органах, генерируя антигенспецифический клон эффекторов, способных полностью элиминировать патоген. Существуют данные, что при повторном контакте с антигеном Т-СМ могут пополнять пул ТЕМРА, которые инфильтрируют периферические ткани, обеспечивая клиренс патогена [37].

Это вторичное обучение посттимических Т-клеток обеспечивает механизм соответствия адаптивного иммунитета и врожденной иммунной системы подтверждают факт линейной дифференцировки ТСМ в ТЕМ/ТЕМРА под действием γ с-цитокинов. Данные, полученные в экспериментах *in vitro* Юровой К.А. с соавторами в 2018г [41] подтверждают факт линейной дифференцировки Т-лимфоцитов памяти (СМ) в ТЕМ/ТЕМРА под действием γ с-цитокинов.

Среди Т-хелперов в настоящее время выделяют следующие субпопуляции: Т-хелперы 1 (Th1), Т-хелперы 2 (Th2), Treg, Th17 и активированные Т-хелперы [38]. В зависимости от секретируемых цитокинов Т-хелперы разделяют на Th1 (CD3+CD4+), которые продуцируют провоспалительные цитокины IFN γ и TNF α , а также IL -2, IL -15 и отвечают за хроническое воспаление и Th2 (CD45RA-CD45R0+CD25+CD294+), которые продуцируют IL -6, IL -9, IL -10, и IL- 13. Данные клетки являются антиген активированными эффекторными Т-хелперами, которые участвуют в аллергических и аутоиммунных процессах. Экспрессия молекул CD25 на поверхности Т-лимфоцитов обычно рассматривается в качестве специфического признака активации. Активированные Т-лимфоциты характеризуются экспрессией CD3+CD4+CD45RA+CD45R0+. Самым ранним маркером активации является появление маркера CD69 (первые часы). Количество CD3+CD4+CD69+ у доноров составляет около 1,0-4,0%. Появление CD25 на мембране Т-лимфоцитов появляется через 18-24 часа и также относится к маркерам «ранней» активации. Максимальный уровень

экспрессии CD25 на Т-хелперах и цитотоксических Т-клетках определяется на 3 сутки и затем начинает снижаться. Экспрессия HLA-DR на поверхности Т-лимфоцитов рассматривается как маркер «поздней» активации, т.к. уровень его экспрессии повышается на 3 сутки. Увеличение экспрессии данного маркера на Т-лимфоцитах у ВИЧ-инфицированных пациентов, позволило отнести его к маркерам «хронической» активации [30].

Регуляторные Т-клетки (Treg) – основная популяция клеток периферической крови, способная подавлять развитие воспалительной реакции. Процент Treg в гейте CD3+CD4+ практически не зависит от возраста и составляет около 7,5%. Абсолютное количество Treg в детском возрасте прогрессивно снижается и после 10 лет выходит на плато [13]. Регуляторные Т-клетки являются супрессорами, они препятствуют развитию аутоиммунных и аллергических заболеваний, реакции трансплантат против хозяина (РТПХ), регулируют созревание дендритных клеток, с другой стороны, подавляют инфекционный и противоопухолевый иммунитет. Увеличение данной популяции отмечается при прогрессировании опухолевых заболеваний, тяжелых септических состояниях [30]. На фоне аутоиммунных заболеваний их популяция может как увеличиваться, так и снижаться [29].

Регуляторные Т-клетки (Treg) имеют фенотип CD3+CD4+CD25^{bright}+CD127^{dim-to-neg}+FOXP3⁺. Экспрессия CD25 (альфа цепь рецептора IL-2) на Treg позволяет связывать IL-2, тем самым ингибируя активацию других Т-клеток. Снижая концентрацию IL-2, Treg вызывают апоптоз IL-2-зависимых клеток, что было показано при некоторых клинических состояниях, включая ВИЧ [108].

Популяция Treg неоднородна. Выделяют «тимические» или «натуральные» (tTreg или nTreg) с фенотипом CD45RA+CD45RO-CD62L+CCR7+ и «периферические» или «адаптивные» (pTreg или aTreg) с фенотипом: CD45RA-CD45RO+CD62L-CCR7-. Treg могут также подразделяться по экспрессии HLA-DR на HLA-DR+ (обычно это Т-клетки памяти CD45RO+), обладающие выраженной супрессорной активностью и

HLA-DR-. Было показано, что Treg-клетки могут преобразовываться в IL-17-продуцирующие Т-клетки. Способностью к продукции IL-17 обладали клетки с фенотипом CD4⁺CD25⁺⁺CD127^{low}CD45RA⁻ [141].

Th17-клетки являются важными эффекторными клетками в защите хозяина против некоторых патогенов типа *Candida albicans* и определенных внеклеточных бактерий. Th17 и продуцируемые ими провоспалительные цитокины и хемокины могут вызывать воспаление с деструкцией тканей и аутоиммунные расстройства. В работах Турцевич И.З. с соавт., 2015г. [1] было выявлено повышение уровня Th17 и индицируемые ими цитокинами при ювенильном артрите у детей.

Кроме основных субпопуляций Т-лимфоцитов (CD3⁺CD4⁺ и CD3⁺CD8⁺) в периферической крови здоровых людей присутствует 1,0-3,0% (от всех Т-лимфоцитов) *дубль позитивных* CD8⁺CD4⁺Т-клеток (DP). При вирусных инфекциях доля этих клеток значительно возрастает и может достигать 20,0%, например, при ВИЧ инфекции и инфицировании вирусом Эпштейна-Барр [58,133]. Было показано увеличение DP Т-клеток при воспалительных заболеваниях и аутоиммунных процессах [44,134]. Анализ их фенотипа показал, что они не экспрессируют активационные маркеры CD25 и HLA-DR, маркеры пролиферации CD38, CD71, а также CD16. При этом высоко экспрессируют CD56, CD57 и CD29. Популяция DP Т-клеток в 100% случаев экспрессирует CD45R0, т.е. является клетками памяти. По интенсивности экспрессии CD8⁺ и CD4⁺ DP Т-клетки подразделяют на 2 субпопуляции: CD4^{dim} /CD8^{bright} и CD4^{bright} / CD8^{dim} [67,195]. В работах Ober et al,1998 [185] и Zuskermann, Husmann,1996 [196] с использованием моделей животных была показана роль этих клеток, как антиген-специфических клеток памяти, индуцируемых при вакцинации.

Установлено, что иммунный ответ на любой антиген включает индукцию не только эффекторных Т-клеток, осуществляющих элиминацию антигена, но и регуляторных Т-лимфоцитов, специфичных к антигену и ограничивающих экспансию эффекторных Т-лимфоцитов и иммунный ответ

в целом [7]. Показано влияние патоген-специфических Treg на баланс Th1/Th2 в ходе иммунного ответа, с которым тесно связана его эффективность и исход инфекции [7]. Успешная элиминация возбудителя инфекции осуществляется в результате необходимого баланса между эффекторными и регуляторными механизмами защиты, а его нарушение лежит в основе неблагоприятного ее течения или исхода. Фактические данные показывают, что различные возбудители индуцируют преимущественно те или иные супрессорные механизмы, поэтому разные субпопуляции Treg, по-видимому, играют неодинаковую роль в патогенезе разных инфекций.

1.2.2 Субпопуляции В-лимфоцитов

В-клетки – популяция лимфоцитов, ответственная за выработку антител (АТ). В настоящее время среди В-лимфоцитов выделяют 3 субпопуляции: В-1 (CD19+CD5+CD27-), В-2 (CD19+CD5-) и В-клетки памяти (19+CD5-CD27+). Отличительной характеристикой субпопуляции В1-лимфоцитов является их способность к синтезу поли- и аутореактивных АТ, которые могут обнаруживать и удалять из организма не только патогены, но и аутоантигены, в связи с чем В1-лимфоциты играют важную роль при аутоиммунных заболеваниях [169]. Гриффин и соавт. [86] описали фенотип данных клеток как CD20+CD27+CD43+CD70-. Кроме того, в работах Савченко А.А. и соавт., 2014 [33] отмечается увеличение В1-популяции лимфоцитов на фоне снижения TCR $\gamma\delta$ -Т-клеток при неблагоприятном исходе распространенного гнойного перитонита.

В 2011г. Luning Prak et al [46] была предложена классификация В-лимфоцитов периферической крови на основании оценки экспрессии CD27 и CD38, согласно которой все В-клетки делят на 6 субпопуляций:

- «наивные» зрелые клетки с фенотипом CD38+CD27-;
- переходные или «транзиторные» с фенотипом CD38++CD27-;
- активированные клетки памяти с фенотипом CD38+CD27+;
- покоящиеся клетки памяти с фенотипом CD38-CD27+;

- предшественники плазматических клеток или плазмобласты с фенотипом CD38⁺⁺CD27⁺⁺;
- дубль негативные клетки CD38⁻ CD27⁻.

При воспалительных заболеваниях наблюдается снижение числа В-лимфоцитов, особенно при острых гнойных инфекциях. При острых и хронических вирусных гепатитах, наоборот, число В-клеток возрастает.

1.2.3. Субпопуляции НК-клеток

Популяция НК-клеток является важным компонентом врожденного иммунитета, основными функциями которых являются лизис опухолевых и вирусинфицированных клеток и регуляция врожденного и адаптивного иммунных ответов за счет секреции цитокинов и хемокинов. В периферической крови НК-клетки составляют 5,0-20,0% от лимфоцитов. Маркерами НК-клеток являются CD56 и CD16. По мере дифференцировки экспрессия CD56 снижается, в то время как экспрессия CD16 возрастает. Циркулирующие зрелые НК-клетки имеют фенотип CD3⁻CD56⁺CD16⁺CD2^{dim+}, среди которых выделяют несколько субпопуляций: CD56^{dim+} CD16^{bright+} (основная популяция, клетки которой содержат перфорин) и минорные популяции, не содержащие перфорин CD56^{bright+}CD16^{dim+} и CD56⁻CD16^{dim+}. При активации НК-клетки экспрессируют CD38, незначительная часть клеток может экспрессировать CD8. В последние годы для оценки субпопуляционного состава НК-клеток используют в качестве маркера дифференцировки CD57 который появляется на поверхности клетки по мере накопления перфорина и гранзима В.

1.2.4 Клеточный и неспецифический иммунный ответ при ХЛЛ

Интерес к анализу субпопуляций Т-клеток и НК-клеток у пациентов с ХЛЛ возник в конце 90-х годов, когда было обнаружено снижение уровня НК- и Т-НК-клеток у больных с впервые выявленным ХЛЛ по сравнению со здоровыми лицами, что указывало на нарушение противоопухолевого

иммунитета [5]. Согласно данным Зотиной Е.Н. и соавт.[10] степень угнетения клеточного иммунитета зависит от стадии и варианта течения заболевания. Наиболее высокое количество НК- и Т-НК-клеток наблюдается у пациентов со стадией А (по Binet), в период ремиссии заболевания и у больных с «застывшей» формой ХЛЛ. Наиболее низкие показатели НК- и Т-НК-клеток свойственны пациентам с продвинутыми стадиями и прогрессирующим течением ХЛЛ, а также с рецидивом заболевания. Таким образом, определение уровня НК- и Т-НК-клеток можно использовать в качестве дополнительного критерия прогноза ХЛЛ [2].

У пациентов с нелеченым ХЛЛ наблюдается увеличение абсолютного количества Т-лимфоцитов, относительное увеличение числа CD8⁺ Т-клеток и инверсия иммунорегуляторного индекса (ИРИ) по сравнению со здоровыми донорами. Инверсия ИРИ ассоциируется с более высокой прогрессией заболевания и более коротким временем до начала терапии [99,78].

Исаева Н. В. и Зотина Е. Н. в своей совместной работе (2019г.) [16] отмечали, что популяция Т-лимфоцитов периферической крови больных ХЛЛ характеризуется снижением экспрессии CD45 и CD3. На Т-хелперах было выявлено снижение интенсивности флюоресценции CD4, в то время как экспрессия CD8 на субпопуляции цитотоксических Т-лимфоцитов оставалась неизменной.

Первое доказательство олигоклональной экспансии Т-клеток при ХЛЛ было выявлено методом Southern blot в 1990 году [188]. Последующее исследование с использованием секвенирования следующего поколения (NGS) показало выраженную олигоклональность CD8⁺ Т-клеток с клонами, которые сохраняются и расширяются с течением времени. Олигоклональные Т-лимфоциты характеризуются ограниченным репертуаром Т-клеточного рецептора. Участвуют ли опухолевые неоантигены в селекции и экспансии Т-клеток, до конца не выяснено [147].

В работах Hofland et al 2019 [75], а также в более ранних работах Pourgheysari et al 2010 [173] показано увеличение числа как CD4⁺, так и CD8⁺

клеток в крови пациентов ХЛЛ. В отличие от здоровых людей при ХЛЛ отмечается уменьшение количества наивных клеток и увеличение числа Т-клеток памяти, вне зависимости от активации Т-клеток антигенами [66,161,65]. Показано, что при ХЛЛ происходит увеличение обеих субпопуляций Т-хелперов (Th1 и Th2) и, хотя четкого перекоса TH1/TH2 не наблюдается, экспансия TH2 коррелирует с прогрессированием заболевания [75,161]. При ХЛЛ также увеличиваются другие субпопуляции CD4⁺ Т-клеток. Так, описано увеличение фолликулярных хелперных клеток (Tfh), которые поддерживают пролиферацию и выживание клеток ХЛЛ посредством CD40L и выработки интерлейкина IL-21. Они чаще встречаются в крови и в лимфатических узлах пациентов с ХЛЛ, и их частота увеличивается при прогрессировании заболевания [180,74,142].

Кроме того, в крови и лимфатических узлах увеличивается число Т-регуляторных клеток, которые снижают противоопухолевый иммунитет. Отмечено, что число Treg коррелирует с опухолевой нагрузкой [180, 74,142,100,64,139].

При ХЛЛ отмечаются функциональные нарушения CD8⁺ Т-клеток, которые характеризуются невозможностью формирования иммунных синапсов с клетками-мишенями, сниженной цитотоксичностью и уменьшенной пролиферацией. CD8⁺ Т-клетки при ХЛЛ имеют повышенную экспрессию нескольких ингибирующих рецепторов на поверхности клетки, таких как PD-1, CD160, CD244 и TIGIT (Т-клеточный иммунорецептор с Ig- и ITIM-доменам), которые были вовлечены в формирование замедленного иммунного синапса [180,160,120]. Повышенная экспрессия ингибирующих рецепторов в сочетании с увеличением количества CD8⁺ Т-клеток обусловили предположение, что CD8⁺ Т-клетки при ХЛЛ могут находиться в состоянии Т-клеточного истощения, что является процессом постепенной дисфункции, обусловленной хроническим воздействием антигенов. Несмотря на увеличение CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток, способных распознавать опухолевые В-клетки, функциональная модуляция опухолевого клона приводит к

подавлению Т-клеточных опосредованных иммунных реакций и неадекватному контролю над опухолью [75].

При ХЛЛ наблюдается рестрикция Т-клеточных рецепторов (TCR) Т-хелперов и цитотоксических Т-лимфоцитов. В работах Vardi, A. et al 2017г. и Blanco, G. et al 2018г. было выявлено снижение степени вариабельности и перекос клональной экспрессии. Со временем при ХЛЛ происходило нарастание числа Т-клеточных клонов, что коррелировало с опухолевой нагрузкой. Это привело к гипотезе о том, что увеличенные Т-клеточные клоны содержат опухольспецифические Т-клеточные популяции [147,146]. В работах Rajasagi et al 2014г. и Hu, Z. et al 2018г. было показано наличие антиген-специфичных Т-клеток при ХЛЛ, которые реагируют на мутировавшие пептиды внутри опухолевых клеток и коррелируют с улучшенным контролем опухоли [159,42].

В работе Исаевой Н.В. и др. 2015г. [17] было выявлено, что у пациентов с ХЛЛ относительное содержание Т- и НК-лимфоцитов значительно варьировало, например, для Т-лимфоцитов диапазон значений составил 0,5-43,0%, а для натуральных киллеров – 0,6-19,3%. На долю В-лимфоцитов (CD3-CD19+) приходилось 45,1-97,0% клеток. При этом отмечалось увеличение абсолютного числа Т-лимфоцитов, их субпопуляций и НК-клеток, что могло быть связано с угнетением в этих клетках механизмов апоптоза. Подобные данные отмечались также в работе Казанского Д.Б. 2012г [18]. Число больных ХЛЛ со снижением абсолютного количества Т- и НК-лимфоцитов было значительно меньше. Учитывая функциональную значимость вышеупомянутых клеток, именно эти пациенты могут рассматриваться в качестве группы риска по присоединению инфекционных осложнений, снижению противоопухолевой защиты и прогрессированию заболевания.

В периферической крови пациентов ХЛЛ обнаружена активация и значительное увеличение числа НК-клеток и субпопуляций Т-лимфоцитов

CD4+ и CD8+, что может быть вызвано разными причинами, в том числе реакцией на антитела, продуцируемые патологическим клоном ХЛЛ [36,103].

Высокое число НК-клеток коррелирует с хорошим прогнозом ХЛЛ. Показано, что НК -клетки способны целенаправленно воздействовать на опухолевые клетки, подчеркивая их потенциальную терапевтическую активность [153,73]. Однако опухолевые В-лимфоциты, как правило, не вызывают сильных реакций у аутологичных НК -клеток, что говорит о том, что опухолевые клетки при ХЛЛ имеют механизмы маскировки от распознавания их НК -клетками [45,135].

В работах Alexander W. MacFarlane IV et al 2017 выявлено увеличенная экспрессии CD27 на CD56dim – НК - клетках у пациентов ХЛЛ по сравнению с донорами. Кроме того, НК -клетки пациентов ХЛЛ характеризуются сниженной реакцией дегрануляции в отношении трансформированных В-клеток и более чувствительны к индукции апоптоза [122].

В многочисленных исследованиях было показано, что модуляция клеточного ответа НК клетками при ХЛЛ приводит к снижению цитотоксических реакций [75,135,47,79,123,122]. Однако, в отличие от функции Т-клеток, цитотоксичность НК -клеток при ХЛЛ не проявляется. Лечение анти-CD20 МКА приводит к ориентации клеток ХЛЛ на антителозависимую клеточную цитотоксичность (antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC)) НК-клетками [75,135,123]. Кроме того, выделение НК-клеток из опухолевой среды восстанавливает их функциональную активность [75,91]. Это свидетельствует о том, что опухолевые клетки ХЛЛ нарушают баланс между активирующими и ингибирующими сигналами НК-клеток, тем самым препятствуя распознаванию ими опухоли, что приводит к отсутствию противоопухолевого ответа.

В работе Исаевой Н. В. и Зотиной Е. Н. (2019г.) [16] было показано, что на поверхности НК-клеток больных ХЛЛ экспрессия CD8 и CD16 остается на нормальном уровне, в то время как экспрессия CD56 существенно снижается.

Таким образом, при ХЛЛ отмечается увеличение абсолютного числа Т-лимфоцитов, среди которых регистрируются изменения как в субпопуляционном составе, так и их функциональной активности. Роль Т-лимфоцитов в патогенезе ХЛЛ остается до конца не изученной. С одной стороны, Т-клетки способны продуцировать сигналы, способствующие пролиферации и выживаемости опухолевых В-лимфоцитов, с другой стороны они имеют признаки активации и «истощения», включая сверхэкспрессию ингибирующих молекул, подобных PD-1, CTLA-4 [3].

Учитывая выше сказанное, при ХЛЛ имеет место выраженный иммунологический дисбаланс в сторону преобладания Т-хелперов, как в периферической крови и КМ, так и в ЛУ, где значительная их часть представлена фолликулярными Т-хелперами и иммуносупрессивными регуляторными Т-клетками. Несмотря на то, что отмечается значительное увеличение Т-лимфоцитов при ХЛЛ, их функциональная активность снижена, что доказывается слабой цитотоксичностью и секрецией гранул, что позволяет клеткам ХЛЛ избежать киллерного эффекта Т-лимфоцитов и сохранить свою пролиферативную активность.

1.2.5. Влияние терапии ХЛЛ на субпопуляционный состав лимфоцитов

Эволюция лечения хронического лимфолейкоза (ХЛЛ) включает множество этапов – от первично-сдерживающей терапии до возможности достижения молекулярных ремиссий. Схема FCR (флударабин, циклофосфамид, ритуксимаб) долгое время остается «золотым стандартом» лечения пациентов моложе 65 лет и с сохранным соматическим статусом [4]. Возможности терапии ХЛЛ расширились, благодаря появлению новых препаратов, таких как ингибиторы тирозинкиназы Брутона (ВТК), BCL-2, моноклональных антител, CAR-T-клеточной терапии. Однако таргетные препараты обладают дополнительной иммуносупрессией, вызывая деплецию В- и Т-лимфоцитов, подавление сигнальных путей, определяющих жизнеспособность В-клеток. Эти воздействия усугубляют вторичный

иммунодефицит, повышая риск возникновения инфекций, которые чаще возникали у пациентов с персистирующей нейтропенией [11,21,76,135,166,136]. Дефекты клеточного, гуморального и неспецифического иммунитета представлены в таблице 1-4.

Таблица 1-4. Характеристика иммунодефицита у пациентов ХЛЛ [26]

В-лимфоциты	Гипогаммаглобулинемия
	Слабая продукция специфических АТ в ответ на вакцинацию
	Сниженная презентация антигенов
	Анергия
	Подавление регуляторной активности В-лимфоцитов клетками ХЛЛ
Т-лимфоциты	Инверсия ИРИ
	Повышение количества Treg
	Дефекты иммунологических синапсов Т-клеток
	Снижение ответа на митоген
	Аберрантное взаимодействие Т-лимфоцитов с другими клетками
Нейтрофилы и фагоцитарная функция	Снижение числа нейтрофилов
	Снижение фагоцитарной активности и аномальный хемотаксис нейтрофилов
	Снижение МПО, лизоцима, β -глюкуронидазы в гранулах нейтрофилов
	Функциональные и ферментативные дефекты моноцитов
Цитокины	Гиперэкспрессия ИЛ-10 и трансформирующего ростового фактора β
	Снижение ИЛ-2
Комплемент	Снижение всех фракций комплемента, дефект активации связывания

По данным Чуксиной Ю. Ю. с соавт. 2014 [15], у пациентов ХЛЛ, находящихся на терапии по протоколу FCR, наблюдается выраженное снижение абсолютного числа Т-хелперов за счет наивных Т-лимфоцитов (CD4+/ CD45RA+ и CD3+CD62L+). При прогрессировании заболевания

усугубляется дисбаланс между числом цитотоксических Т-клеток и Т-хелперов и отмечается рост количества НК-клеток. Выраженная активация Т-лимфоцитов по экспрессии HLA-DR- и CD95-антигенов отражает интенсивность антигенной нагрузки и повышенную готовность к апоптозу.

Введение моноклональных антител в терапии, в частности ритуксимаба, дополнительно увеличивает иммунодепрессию, повышается риск возникновения инфекций, которые чаще возникали у пациентов с персистирующей нейтропенией [11, 21,76]. Использование в терапии анти-CD20 антител сопровождается изменением антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) НК-клеток [75,135,123].

В исследовании Хоробрых М.Н. и др., 2010г. [14] были проанализированы ряд иммунологических показателей крови у больных ХЛЛ до и после лечения алемтузумабом (анти CD52 МКА). По сравнению с группой контроля у больных до начала лечения были достоверно снижены относительное содержание CD3+ и CD4+ лимфоцитов, ИРИ, а также уровень содержания в сыворотке крови IFN γ и IL-4, при незначительном повышении концентрации TNF α . После окончания терапии алемтузумабом отмечалось достоверное снижение абсолютного числа зрелых Т-лимфоцитов, Т-хелперов, цитотоксических Т-лимфоцитов, а также CD20+ клеток и относительного числа CD16+ лимфоцитов.

В последние годы достигнуты большие успехи в понимании биологии и механизмов развития хронического лимфолейкоза. В патогенезе ХЛЛ ведущим звеном является резистентность опухолевых клеток к апоптозу. Одними из основных регуляторов процессов программированной клеточной гибели являются белки семейства Bcl-2, что делает их привлекательной мишенью для терапевтического воздействия. Препарат из этой группы Венетоклак (ABT-199) является низкомолекулярным селективным ингибитором белков семейства Bcl-2, обладающих апоптоз-блокирующим действием. Он избирательно блокирует белок Bcl-2, связываясь с ним с

высокой аффинностью и практически не воздействует на $V\alpha_L$ и $V\alpha_w$, что в результате позволило преодолеть лимитирующую токсичность [4].

Взаимодействие опухолевых клеток ХЛЛ с их микроокружением вызывает активацию В-клеточного рецептора (BCR), что поддерживает рост и выживание опухоли [170]. Ингибирование BCR-сигнального пути стало весьма успешной стратегией лечения ХЛЛ и других В-клеточных ЛЛЗ. В последние годы одним из ведущих препаратов в лечении ХЛЛ является ибрутиниб - ингибитор тирозинкиназы Брутона (ВТК) [12]. ВТК является центральным звеном передачи сигнала через В-клеточный рецептор и активирует множество других сигнальных путей, включая NF κ B (транскрипционный фактор каппа би) [165]. Ибрутиниб связывается необратимо с ВТК за счет формирования ковалентной связи с цистеином 481 около активного сайта ВТК. Мутации в гене ВТК приводят к развитию X-сцепленной агаммаглобулинемии, что в свою очередь сопровождается значительным снижением В-лимфоцитов периферической крови, иммуноглобулинов крови и повышенной восприимчивости к инфекционным осложнениям [98].

Одной из задач терапии злокачественных новообразований является содействие развитию специфических Т-клеток, которые могут эффективно воздействовать на опухолевые клетки и обеспечивать долгосрочный противоопухолевый защитный иммунный ответ. У пациентов с нелеченом ХЛЛ наблюдается незначительный сдвиг Т-клеток в сторону более дифференцированных клеток центральной памяти (CD45RA-CCR7+) и клеток эффекторной памяти (CD45RA-CCR7-) по сравнению со здоровыми людьми. Предполагается, что накопление Т-клеток памяти обусловлено хронической антигенной стимуляцией наивных Т-клеток опухолевыми лимфоцитами при ХЛЛ [78,130,134]. Ибрутиниб сдвигает дифференцировку и функцию Т-клеток в сторону улучшения противоопухолевого иммунологического контроля, влияя на дифференцировку наивных Т-хелперов в Т-клетки памяти. После лечения ибрутинибом увеличивается количество более дифференцированных

Т-клеток памяти, включая клетки центральной памяти, эффекторной памяти и терминально-дифференцированных эффекторных клеток (TEMRA) [96, 112] (Рис. 1-5).

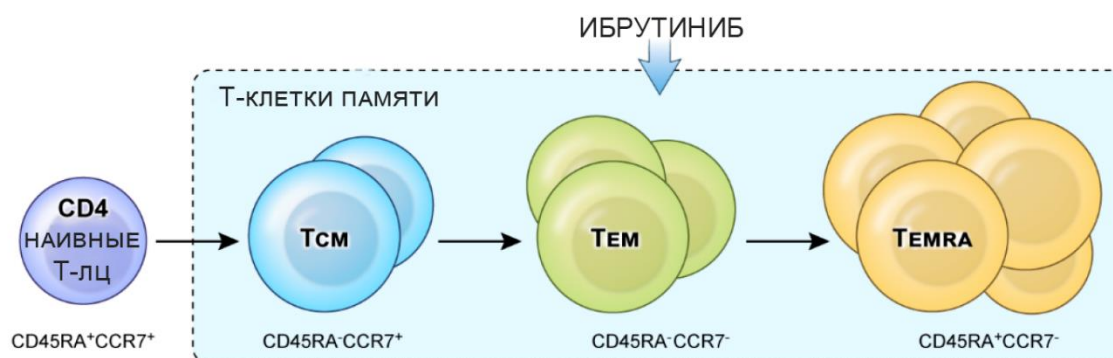


Рис. 1-5. Влияние ибрутиниба на дифференцировку наивных CD4 T-клеток в T-клетки памяти. Mhibik M., Wiestner A. and Sun C., 2020.

Противоопухолевый иммунный контроль поддерживается цитокиновым ответом Т-хелперов 1 типа (Th1) с продукцией IL-2, IFN- α и TNF- γ , и может быть нарушен ответом Т-хелперов 2 типа (Th2) с секрецией цитокинов IL-4, IL-5 и IL-13 [166]. Несмотря на то, что Т-клетки пациентов с ХЛЛ имеют дефекты пролиферации и цитотоксичности, они продуцируют повышенные уровни TNF- α и IFN- γ [160]. Определяя субпопуляции Т-хелперов с экспрессией хемокиновых рецепторов CCR6 и CXCR3 методом проточной цитометрии, Palma M. с соавт. (2017г.) выявили увеличение количества Th1, Th2, Th17 и регуляторных Т-клеток у пациентов с ХЛЛ по сравнению со здоровыми донорами [134]. Однако при ХЛЛ преобладает сдвиг поляризации Th1 к Th2, а более сильная поляризация Th2 связана с прогрессированием заболевания [162,58]. Ибрутиниб может повлиять на баланс поляризации между Th1 и Th2. Он подавляет поляризацию Th17 и Th2 клеток, что приводит к сдвигу в сторону Th1 и благоприятствует противоопухолевому иммунитету (Рис. 1-6а). Кроме того, лечение ибрутинибом восстанавливает формирование иммунологического синапса между Т-клетками и клетками ХЛЛ путем усиления поляризации F-актина, продукции гранзима В и снижения

экспрессии ингибирующих рецепторов, таких как PD-1 и CTLA4 (Рис. 1-6б) [112,94].

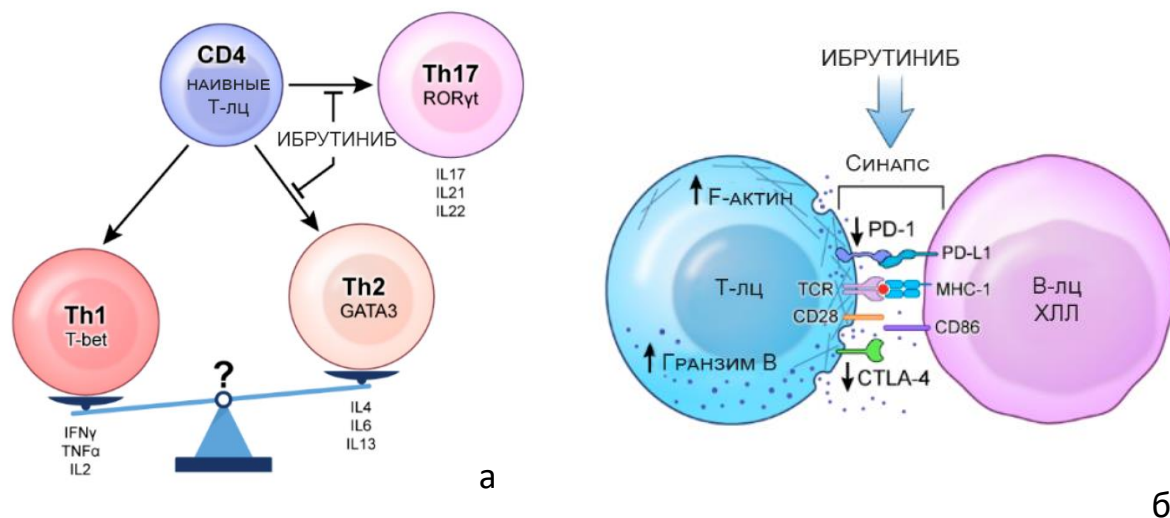


Рис.1-б(а,б). Влияние терапии ибрутинибом на перераспределение субпопуляций Т-хелперов (а) и формирование иммунологического синапса (б). Mhibik M., Wiest-ner A. and Sun C., 2020.

При ХЛЛ ибрутиниб подавляет жизнеспособность клеток в клеточных культурах, независимо от присутствия стромальных клеток и цитокинов. Он также снижает содержание хемокинов CCL3 и CCL4 в плазме крови, повышение которых, как предполагают, есть результат активной передачи сигналов через BCR в клетках ХЛЛ, находящихся в микроокружении лимфатических узлов. Ингибирование ВТК ибрутинибом блокирует поступление клеток ХЛЛ в пролиферативные центры лимфатических узлов и способствует их выходу в циркуляцию, что объясняет перераспределительный лимфоцитоз в крови после назначения ибрутиниба [165,25]. В последующих исследованиях было установлено, что ибрутиниб ингибирует пролиферацию и индуцирует каспазозависимый апоптоз опухолевых клеток ХЛЛ ex vivo [60].

Данные по изучению влияния ибрутиниба на субпопуляционный состав лимфоцитов противоречивы. По данным ряда авторов, у пациентов с исходно высоким уровнем Т-лимфоцитов периферической крови на фоне приема ибрутиниба к 6-12 месяцам от начала терапии наблюдается снижение количества Т-клеток до нормальных значений [70,95,138]. В отличие от этого,

Long M. с соавторами сообщили об увеличении количества CD4 и CD8 Т-лимфоцитов в течение первых шести циклов терапии у пациентов, получавших ибрутиниб [96].

Помимо ВТК, ибрутиниб ингибирует и другие киназы из семейства Тес, включая интерлейкин-2-индуцируемую Т-клеточную киназу (ИТК), экспрессируемую Т-клетками, чем могут объясняться некоторые побочные эффекты, такие как диарея, сыпь, мерцательная аритмия и кровоподтеки, вызываемые приемом ибрутиниба [189,93].

Терапия ибрутинибом вызывает вопросы, касающиеся его воздействия на уже имеющийся иммунодефицит – происходит ли дальнейшая иммуносупрессия или, наоборот, ибрутиниб частично восстанавливает иммунный дефект при ХЛЛ. В соответствии с этим, изучение субпопуляционного состава клеток специфической и неспецифической иммунной защиты у нелеченых пациентов ХЛЛ и в динамике лечения ибрутинибом является актуальным для выявления дефектов иммунной системы и установления влияния таргетной терапии на изменения показателей иммунной системы.

1.3. Оценка субпопуляционного состава моноцитов при ХЛЛ

Моноциты относятся к клеткам врожденного иммунитета. Благодаря антигенпрезентирующей, фагоцитарной и секреторной функциям им принадлежит центральная роль в развитии адекватного иммунного ответа при бактериальной инфекции.

Комитетом по номенклатуре Международного союза иммунологических обществ в 2010 году по экспрессии высокоаффинного рецептора к липополисахариду (CD14) и низкоаффинного рецептора к IgG (CD16) было одобрено разделение моноцитов на 3 субпопуляции: классические (MO1), промежуточные (MO2) и неклассические моноциты (MO3) (Рис.1-7) [125].

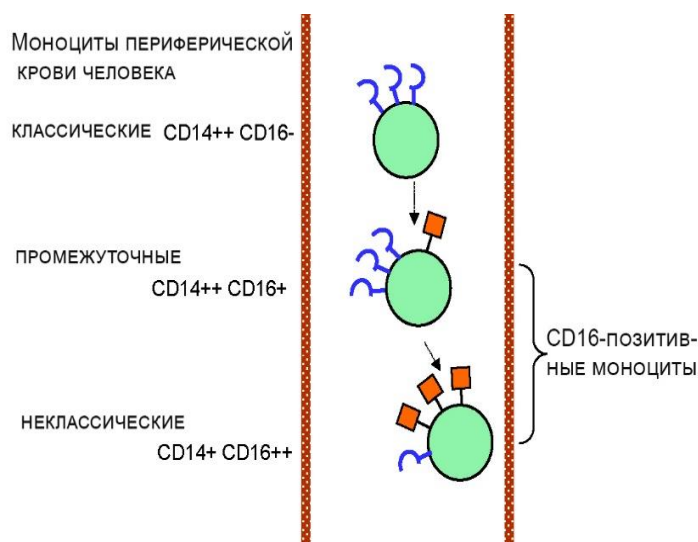


Рис.1-7. Номенклатура моноцитов периферической крови. Число символов характеризует плотность рецепторов на клетке. Стрелки – этапы развития. Расположение неклассических моноцитов ближе к стенке сосуда указывает на предпочтительную локализацию данных клеток в маргинальной зоне сосудистого русла, в составе пристеночного пула клеток. (Ziegler-Heitbrock L. et al, 2010) [125]

К классическим моноцитам (MO1) относят популяцию клеток с фенотипом CD14⁺⁺CD16⁻. В норме они составляют около 80-85% всей популяции моноцитов и их основная функция – фагоцитоз. Классические моноциты способны продуцировать цитокины TNF α , IL-1 β , IL-10 и др. [132].

Промежуточные моноциты (MO2) CD14⁺CD16⁺ составляют одну из минорных субпопуляций моноцитов. Считается, что эти клетки образуются в результате активации и дифференцировки классических моноцитов [126]. Основными их функциями являются: IgG-опосредованный фагоцитоз, распознавание патоген-ассоциированных молекулярных паттернов (Pathogen-associated molecular patterns (PAMP)), синтез цитокинов (как противовоспалительного IL-10, так и провоспалительных TNF α , IL-1 β и др.) и презентации антигенов.

Субпопуляция неклассических моноцитов (MO3) (CD14⁺dimCD16⁺) с минимальной плотностью экспрессируют CD14 и с максимальной плотностью

экспрессируют HLA-DR и костимуляторные молекулы. Одна из основных их функций - антигенпрезентирующая. Активация этих клеток приводит также к синтезу цитокинов. В исследованиях Skrzeczynska-Moncznik J. et al (2008) [132] и Mukherjee R. et al (2015) [126] отмечался высокий уровень продукции TNF α и IL-1 β неклассическими моноцитами в ответ на стимуляцию LPS и *S.aureus*, а также низкий уровень продукции IL-10.

Разделение моноцитов на субпопуляции осуществляется методом проточной цитометрии с использованием МКА CD14 и CD16, после выделения гейта моноцитов (Рис.1-8).

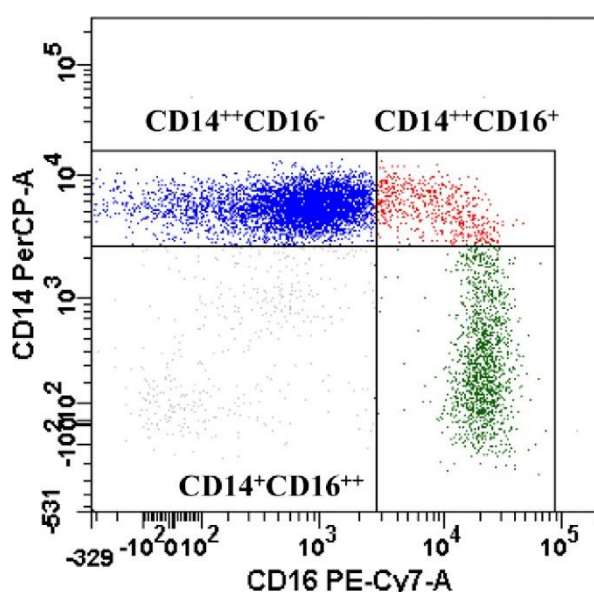


Рис.1-8. Выделение субпопуляций моноцитов. По экспрессии CD14 и CD16 моноциты разделяются на 3 субпопуляции. Rogacev K.S. et al, JACC Vol. 60, No. 16, 2012 [53].

При сепсисе по данным Калашниковой А.А. с соавт. (2018) [35] происходит увеличение абсолютного количества моноцитов, снижение классических и увеличение относительного и абсолютного числа переходных форм, при этом субпопуляция неклассических моноцитов меняется незначительно.

Наибольшее число работ по оценке субпопуляционного состава моноцитов приходится на работы при инфекционных заболеваниях и осложнениях [34]. В работе Rogacev K.S. et al. 2012г. [53] при проспективном

анализе сердечно-сосудистых событий у 951 пациентов, направленных на плановую коронарную ангиографию, было показано, что только увеличение субпопуляции промежуточных (CD14⁺⁺CD16⁺) является независимым предиктором развития сердечно-сосудистых осложнений у данной группы пациентов.

Работы по анализу количества и субпопуляционного состава моноцитов при ХЛЛ малочисленны и противоречивы. В работе Maffei R et al., (2013) [172] отмечалось значительное увеличение относительного содержания неклассических моноцитов. Однако, процент промежуточных моноцитов был выше в группе здоровых добровольцев, чем в группе пациентов с ХЛЛ. Так же в этой работе не обнаружена корреляция между относительным содержанием отдельных субпопуляций и стадией ХЛЛ, количеством лейкоцитов и экспрессией CD38 или ZAP-70, и не выявлено связи между тремя субпопуляциями моноцитов и мутационным статусом гена IGVH. В работе Kowalska W. et al.,(2022) [140] отмечалось повышение процента неклассических моноцитов у пациентов с ХЛЛ, который снижался с увеличением стадии ХЛЛ и обратно коррелировал с экспрессией таких прогностических факторов, как ZAP-70 и CD38. Более того, он был ниже у пациентов с ХЛЛ, нуждающихся в лечении, что по мнению автора может указывать на благоприятное влияние неклассических моноцитов на противоопухолевый ответ. В тоже время, в работе Damasceno D. et al., (2016) [82] отмечалось, что определение субпопуляций моноцитов на основе экспрессии SLAN (6-sulfo LacNAc) значительно увеличивает процент промежуточных SLAN негативных моноцитов. В работе Mikulkova Z. et al., 2021[68] было показано, что активация циркулирующих моноцитов и Т-клеток коррелирует с количеством опухолевых клеток при ХЛЛ и применяемой терапией. Наименьшая активация моноцитов наблюдается у пациентов с прогрессирующей формой заболевания, а самая высокая активация – при индолентном течении ХЛЛ, у больных без лечения и получающих терапию новыми препаратами (ибрутиниб, иделалисиб и венетоклакс).

Учитывая важную роль моноцитов как компонентов микроокружения клеток ХЛЛ, а также имеющиеся на сегодняшний день противоречивые данные в оценке субпопуляций моноцитов, заслуживает внимание дальнейшее изучение субпопуляционного состава моноцитов в зависимости от стадии ХЛЛ и проводимой терапии.

Таким образом, современная диагностика ХЛЛ базируется на иммунофенотипической характеристике опухолевых клеток. Учитывая тот факт, что экспрессия многих В-клеточных антигенов изменяется на фоне иммунохимиотерапии поиск новых и более стабильных маркеров остается актуальным. В связи с этим, экспрессия ROR-1, CD180 представляет интерес, поскольку может быть полезна как в качестве дополнительных диагностических маркеров при дифференциальной диагностике с другими В-ЛПЗ, имеющих схожий фенотип, прогноза ХЛЛ, а также для мониторинга МОБ.

Изучение клеточных компонентов иммунной системы представляется актуальной задачей с точки зрения количественной и качественной информации, касающейся субпопуляционного состава Т-лимфоцитов, НК-клеток и В-лимфоцитов. Анализ клеточного звена иммунитета может дать дополнительную информацию о прогнозе развития инфекционных осложнений, а также о возможном восстановлении нарушенного иммунологического баланса при использовании постоянно развивающихся терапевтических стратегий лечения ХЛЛ.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Характеристика пациентов

В исследование включено 296 пациентов с диагнозом ХЛЛ, из них 50 с первично выявленным, нелеченым ХЛЛ и 246 - находящихся на терапии. Все пациенты проходили обследование и лечение в Московском городском гематологическом центре (МГГЦ, заведующий дневным стационаром д.м.н., профессор Никитин Е.А.) и 6-ом гематологическом отделении ГБУЗ «Городская клиническая больница им. С.П. Боткина» ДЗМ (заведующий отделением Доронин В.А.). В работе соблюдались нормы, утвержденные в Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации 1964 года.

Критерии включения в клиническую часть исследования:

1. Практически здоровые люди, обследованные в отделении клинической, производственной трансфузиологии и гравитационной хирургии крови «НИИ Скорой помощи им. Н.В. Склифосовского» ДЗМ.
2. Пациенты с реактивным лимфоцитозом, проходившие обследование в МГГЦ после исключения у них лимфопролиферативных заболеваний.
3. Пациенты с первично выявленным ХЛЛ
4. Пациенты ХЛЛ на фоне терапии, наблюдавшиеся в МГГЦ.
5. Информированное согласие на участие в исследовании в письменной форме.

Критерии невключения в клиническую часть исследования:

1. Пациенты с неверифицированным диагнозом.
2. Пациенты с В-клеточными зрелоклеточными лимфомами.
3. Отказ пациента от участия в исследовании.

Диагноз ХЛЛ устанавливали в соответствии с классификацией ВОЗ, 2022 г. [163], используя морфологическое, иммунофенотипическое, стандартное цитогенетическое и молекулярное исследования.

Группу сравнения составили 20 пациентов с реактивным лимфоцитозом (инфекционный мононуклеоз и другие вирусные инфекции, ревматоидный артрит) терапевтического отделения ГБУЗ «Городская клиническая больница им. С.П. Боткина» ДЗМ.

В качестве контрольной группы исследовалась периферическая кровь 30 здоровых доноров (Отделение клинической, производственной трансфузиологии и гравитационной хирургии крови ГБУЗ «НИИ Скорой помощи им. Н.В. Склифосовского» ДЗМ, заведующий отделением к.м.н. Костин А.И.), из которых 20 мужчин и 10 женщин. Медиана возраста доноров составила 38 лет (от 21 до 54 лет).

Определение стадии у больных ХЛЛ проводилось согласно классификации J.Binet 1981г. [163,158]. У 17 пациентов была установлена А стадия, у 168 – В стадия и у 73 – С стадия ХЛЛ (таблица 2-1).

Медиана возраста пациентов составила 65 лет, соотношение мужчин к женщинам – 125/101. Общий анализ крови выполнялся у 196 пациентов с ХЛЛ, 20 пациентов с реактивным лимфоцитозом и доноров. Стандартное цитогенетическое и FISH-исследование (Молекулярно-биологическая лаборатория Московского городского гематологического центра ГКБ им. С.П. Боткина, заведующий лабораторией к.м.н. Кобзев Ю.Н.) выполнено у 102 (52,0%) пациентов с ХЛЛ, мутационный статус IGHV-генов определен у 75 пациентов (38,2%). Распределение пациентов по полу, возрасту и стадии приведено в таблице 2-1. Выбор тактики терапии зависел от соматического статуса пациента и результатов клинико-лабораторных исследований.

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 образцов крови 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.

Таблица 2-1. Характеристика пациентов, включенных в исследование

Параметры	Пациенты ХЛЛ			Реактивный лимфоцитоз (n=20)
	первичные, без терапии (n=50)	терапия ибрутинибом (n=116)	иная терапия (n=60)	
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)
<i>Стадия заболевания по Vinet:</i>				-
A	17	-	-	
B	32	108	28	
C	1	40	32	
<i>Мутационный статус IGHV-генов:</i>				-
Мутированный вариант (M-CLL)	1	4	-	
Немутированный вариант (U-CLL)	1	57	12	
Нет данных	48	55	48	
<i>Цитогенетический риск:</i>				-
Наличие del17p	1	31	13	
Отсутствие del17p	2	52	4	
Нет данных	47	32	43	
<i>Общий анализ крови</i>				
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	-

Для сравнительного исследования двух подходов оценке МОБ проанализировано 64 образца костного мозга (КМ) и 6 - периферической крови пациентов с ХЛЛ. Использование анти-CD20-препаратов (ритуксимаб, обинутузумаб в схемах: FCR, iRB, iGVen, RB и др.) проводилось у 32 пациентов, у оставшихся 38 использовались режимы венетоклакса (Ven), либо ибрутиниб с венетоклаксом (iVen).

Оценка субпопуляций Т-лимфоцитов, НК-клеток и В-лимфоцитов, а также субпопуляций моноцитов проводилась в 226 образцах периферической крови, из них у 30 доноров (11 женщин и 22 мужчин) - группа D и 196 (86 женщин и 110 мужчин) - пациентов ХЛЛ. Группа больных ХЛЛ была разделена на 4 группы (рис. 2-1):

I группа (50 человек; 27 женщин и 23 мужчин) - с первично установленным и нелеченым ХЛЛ.

II группа (116 человек; 48 женщин и 68 мужчин) – пациенты с ХЛЛ, получавших ибрутинибсодержащие схемы лечения с длительностью заболевания от 1 до 20,5 лет. Число предшествующих линий терапии (лейкеран, FCR, FCR-lite, RB, RCVP, RClb, BR, R-CHOP, преднизолон-R, GB/G, CVP/RCVP и др.) варьировало от 0 до 12 (медиана – 2,5). По длительности приема ибрутиниба данная группа была разделена на две подгруппы: группа IIa – пациенты, получавшие ибрутиниб от 8 до 24 недель (медиана 19,0 недель) – 59 человек (23 женщины и 36 мужчин); группа IIb – пациенты, получавшие ибрутиниб от 25 до 58 недель (медиана 39,0 недель) - 57 человек (25 женщин и 32 мужчины).

III группа (30 человек; 11 женщин и 19 мужчин) - пациенты с ХЛЛ, получавшие различные флюдарабин-содержащие схемы.

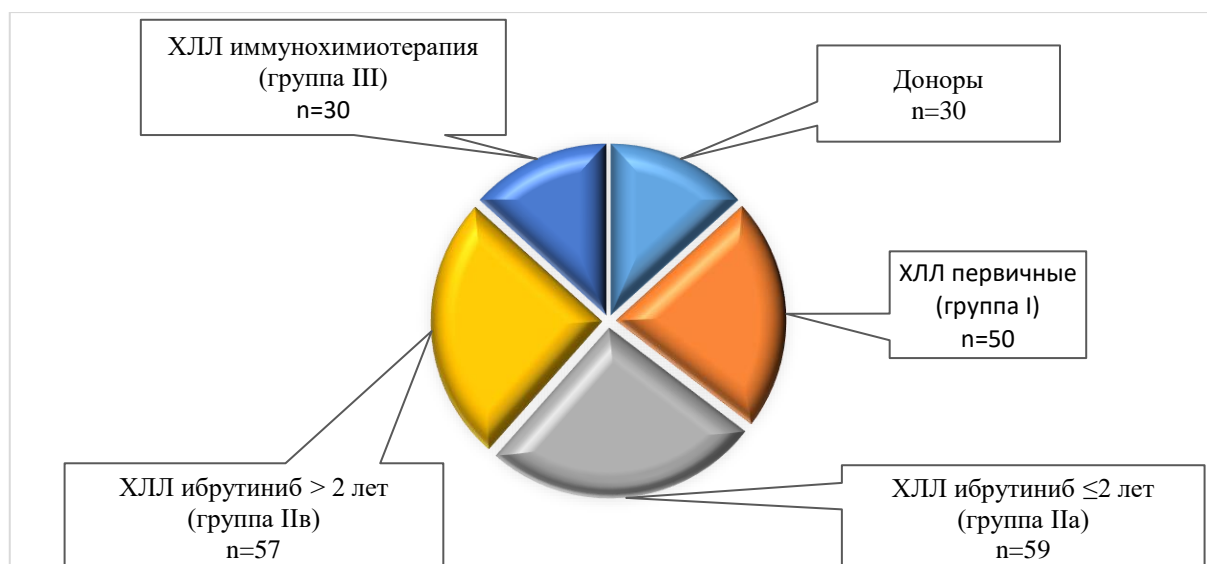


Рис.2-1. Распределения пациентов по группам при оценке субпопуляционного состава лимфоцитов

В работе в общей сложности проанализировано 64 образца костного мозга и 392 образца периферической крови.

2.2 Материалы и методы исследования

Материалом для исследования служила цельная венозная кровь и костный мозг (КМ), стабилизированные антикоагулянтом К₂-ЭДТА. Все образцы крови и КМ исследовались в тот же день, в течение двух часов после взятия. Общий анализ крови выполнялся на гематологическом анализаторе BC6800 (Mindray, Китай).

Имунофенотипирование с использованием многоцветной диагностической панели для оценки экспрессии маркеров ROR-1 и CD180 на В-лимфоцитах, определения минимальной остаточной болезни, субпопуляционного состава Т-лимфоцитов, НК-клеток, В-лимфоцитов и субпопуляций моноцитов осуществлялось на проточном цитометре FACSCanto II (BD Biosciences, США) с использованием программного обеспечения BD FACSDiva Software version 6.1.3. Оценка минимальной остаточной болезни при ХЛЛ с использованием DuraClone RE CLB Tube (Beckman Coulter) выполнялась на проточном цитометре Navios (BC) с

использованием программного обеспечения Cytometry List Mode Data Acquisition and Analysis Software.

Для оценки экспрессии ROR-1 и CD180 на В-лимфоцитах использовалась панель МКА, включающая CD19, ROR-1, CD180, CD20 и CD45 (Таблица 1-2). Пробоподготовка осуществлялась по схеме "окрашивание – лизис - отмывка". Для окрашивания в пробирку отбирали исследуемый образец и добавляли МКА из расчёта 5 мкл МКА на 50 мкл пробы, содержащей до $10,0 \cdot 10^9$ /л лейкоцитов, инкубировали в темноте при комнатной температуре в течение 20 минут, затем осуществляли лизис с использованием FACS™ Lysing Solution (BD) и отмывку. Для проведения анализа в каждом образце исследовали 10 000 событий.

Таблица 2-2. Панель МКА для оценки экспрессии ROR-1 и CD180

FITC	PE	PC-Cy5	PC-Cy7
CD19	CD180	CD20	CD45
CD19	ROR-1	CD20	CD45

С целью оценки экспрессии маркеров ROR-1 и CD180 на В-лимфоцитах пациентов с ХЛЛ было проанализировано 160 проб периферической крови.

Исследование МОБ с использованием многоцветной проточной цитометрии проведено в 64 образцах КМ и 6 образцах периферической крови пациентов с ХЛЛ. Схема терапии учитывалась при оценке МОБ, так как даже однократное введение ритуксимаба или обинутузумаб (анти CD20 МКА) приводит к отсутствию экспрессии CD20 на В-лимфоцитах либо за счет маскировки эпитопов CD20, либо за счет интернализации CD20. Поэтому во время лечения или сразу после лечения этими препаратами целесообразно оценивать экспрессию CD22 вместо CD20. В случае отдаленного лечения анти CD20 МКА и восстановления В-клеточного звена иммунитета предпочтительнее использовать в панели совместно CD20 и CD22.

Оценка МОБ осуществлялась 2 подходами, одним из которых был стандартизированный протокол, утвержденный в 2007 г. Европейской

группой по исследованию ХЛЛ (European Research Initiative on CLL - ERIC) [105] и модифицированный для 8-цветного анализа в 2016 г. [43]. Панель используемых МКА приведена в таблице 2-3. Все образцы КМ сначала пропускали через фильтры CellTrics фирмы Partec для очистки от крупных фрагментов (костных и жировых включений), после чего проводили пробоподготовку по схеме "лизис-отмывка-окрашивание". Лизис эритроцитов осуществляли лизирующим раствором Pharm Lyse Lysing Buffer (BD). Для окрашивания в пробирку отбирали исследуемый образец и добавляли МКА из расчёта 5мкл на 50 мкл пробы, содержащей до $10,0 \cdot 10^9$ /л лейкоцитов, инкубировали в темноте при комнатной температуре в течение 20 минут. Панель МКА, используемая для оценки МОБ по протоколу ERIC представлена в табл.2-3.

Таблица 2-3. Панель МКА, используемая для оценки МОБ по протоколу ERIC (European Research Initiative on CLL)

№ пробирки	FITC	PE	PerCP	PY-Cy7	APC	APC-Cy7	PB
1	κ	λ	CD19	CD3	CD22	CD45	CD5
2	CD43	CD81	CD38	CD19	CD3	CD45	CD5

Стратегия последовательного гейтирования для оценки МОБ при ХЛЛ по протоколу ERIC методом 6-цветной ПЦ приведена на рис.2-1.

В первой пробирке, используя график CD45 vs SSC выделяли популяцию лейкоцитов (гейт WBC) и лимфоцитов (гейт LY), необходимую для контроля при сборе материала (рис.2-2 А). График CD19 vs SSC строился в зависимости от гейта WBC, где выделяли гейт CD19+ (голубой цвет) В-лимфоцитов из популяции лейкоцитов (рис.2-2Б). График FSC vs SSC строили в зависимости от гейта [WBC AND CD19+], для исключения дублетов и дебриса, из зоны анализа В-лимфоцитов выделяли гейт STR (структура) (рис.2-2 В). Согласно гейту [WBC AND CD19+ AND STR] строили графики Г, Д и Е, на которых последовательно выделяются из В-лимфоцитов популяции

CD5+CD22low (бордовый цвет), CD5+CD19+ (бордовый цвет). График KAPPA vs LAMBDA строили в зависимости от гейта [WBC AND CD19+ AND Str AND CD5+CD22low AND CD5+CD19+], в результате последовательного гейтирования выделялась моноклональная популяция В-лимфоцитов (на рисунке она представлена в виде карра цепей с более низкой их экспрессией и фенотипом ХЛЛ (бордовый цвет)) и поликлональная популяция В-лимфоцитов (голубой цвет). Размер МОБ ХЛЛ рассчитывается от лейкоцитов, объем опухолевой популяции соответствует количеству клеток в регионе KAPPA (рис.2-2 Ж).

Для выявления МОБ ХЛЛ в пробе CD43/CD81/CD38/CD19/CD5/CD45 повторялись графики А, Б и В, затем применяли последовательное гейтирование и объединение гейтов, полученных на графиках И, К, Л; выделяли из В-лимфоцитов популяцию CD5+CD43+ (рис.2-2 И); популяцию CD43+CD38- (рис.2-2 К) и популяцию CD5+CD81low (рис.2-2 Л).

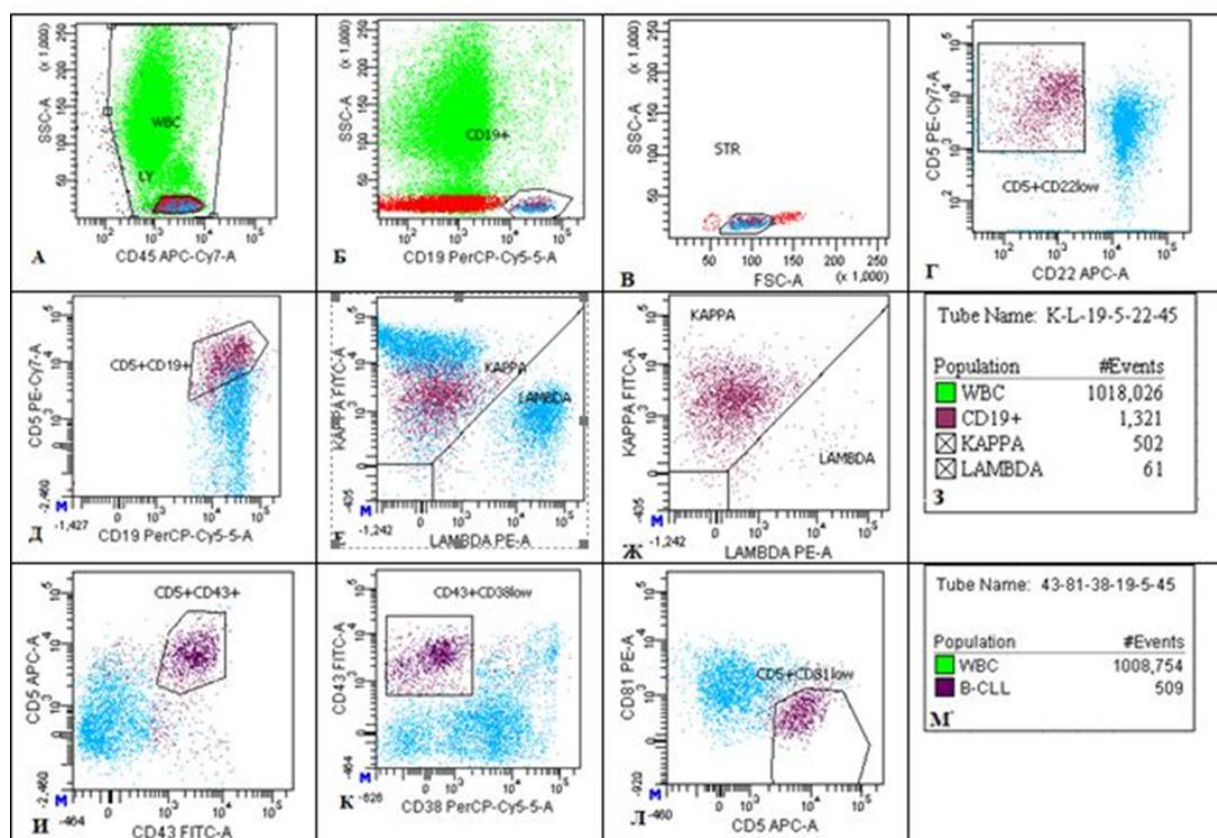


Рис.2-2. Костный мозг. Определение МОБ при ХЛЛ. Принцип гейтирования с использованием протокола ERIC. Опухолевая популяция В-лимфоцитов выделена бордовым цветом, популяция нормальных В-лимфоцитов – синим.

Процент остаточного опухолевого клона рассчитывался как среднее арифметическое значение, полученное после исследования проб. Результат исследования МОБ считали положительным, если выявлялся кластер (не менее 50 клеток) с сочетанием экспрессии антигенов, характерных для опухолевых клеток ХЛЛ. Для проведения анализа в каждом образце исследовали от 1000000 до 2500000 событий в зависимости от клеточности образца. Необходимая чувствительность метода составляет 0,01%. Чувствительность МПЦ зависит от общего количества проанализированных клеток. Если за минимальную принимается популяция, состоящая из 50 клеток, чувствительность определяется по формуле:

$$\text{Чувствительность} = \frac{50}{\text{количество ЯСК}} \times 100\%$$

(ЯСК- ядродержащие клетки)

Параллельно оценка МОБ осуществлялась с использованием набора DuraClone RE CLB (BD Biosciences, США), включающего в себя стандартизованный набор 8 лиофилизированных МКА (Таблица 2-4). Анализ проводился на проточном цитометре Navios (BC).

Таблица 2-4. Панель МКА DuraClone RE CLB Tube

PВ	KrO	FITC	PE	PC5.5	PC7	APC	APC-AF750
CD20	CD45	CD81	ROR-1	CD79b	CD19	CD5	CD43

В ходе исследования после выделения гейта лейкоцитов (CD45+), гейта В-лимфоцитов (CD19+) и очистки последнего от дедриса и дуплетов последовательно выполнялось гейтирование популяций: «CD20dim+ROR-1+», «CD81dim+CD79d+», «CD43+ROR-1+» и «CD5+CD43+». В результате последовательного гейтирования выделяли популяцию В-лимфоцитов с фенотипом CD45+CD19+ROR-1+CD5++CD43++CD81dim+CD20dim+

CD79bdim+. С помощью программного обеспечения Cytometry List Mode Data Acquisition and Analysis Software рассчитывался процент (%) опухолевых клеток и суммарный процент (%) В-лимфоцитов. Принцип последовательного гейтирования с использованием набора DuraClone RE CLB приведен на рис.2-3.

МОБ-позитивность диагностировалась при выявлении опухолевой популяции клеток в количестве $\geq 0,01\%$ (1 опухолевая клетка на 10^4 CD45-позитивных клеток).

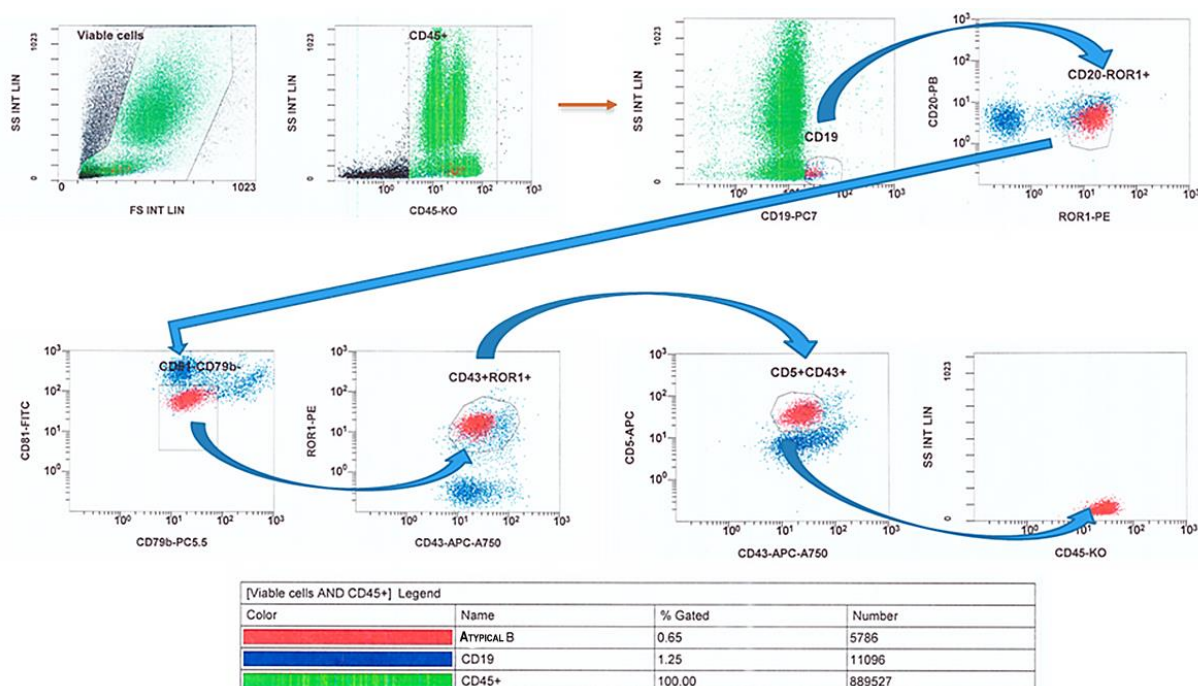


Рис. 2-3. Принцип последовательного гейтирования для определения МОБ при ХЛЛ с использованием DuraClone RE CLB. Опухолевая популяция выделена красным цветом

Имунофенотипирование лимфоцитов периферической крови для оценки субпопуляций Т-лимфоцитов и НК-клеток в периферической крови до и в процессе терапии больных ХЛЛ выполнялось с использованием 8-цветной панели МКА, включающей: CD19 PE, CD3 FITC, CD4 PerCP-Cy5-5, CD8 PerCP-Cy5-5, TCR $\gamma\delta$ 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 (Табл. 2-5). Пробоподготовку проводили по схеме "окраска-лизис-отмывка". Для окрашивания в пробирку

отбирали исследуемый образец и добавляли МКА из расчёта 5мкл на 50 мкл пробы, содержащей до $10,0 \cdot 10^9$ /л лейкоцитов, инкубировали в темноте при комнатной температуре в течение 20 минут. Затем осуществлялся лизис эритроцитов с помощью лизирующего раствора FACS™ Lysing Solution (BD).

Таблица 2-5. Панель МКА, применяемая для оценки субпопуляций Т-лимфоцитов и НК-клеток в периферической крови при ХЛЛ

№ пробирки	FITC	PE	PerCP – Cy5-5	PE-Cy7	APC	APC-Cy7	PВ
1	CD3	CD56	CD8	CD16	CD14	CD45	CD57
2	CD3	HLA-DR	CD4	CD25	CD127	CD45	-
3	TCR $\gamma\delta$	CD19	CD4	CD45RA	CD45R0	CD45	CD3

В ходе данного исследования определяли 16 субпопуляций Т-лимфоцитов и НК-клеток: Т-хелперы (Th), цитотоксические Т-лимфоциты (Tcyt), Т-регуляторные клетки (Treg), Т-НК-клетки (Т-НК), Т-хелперы наивные и памяти, активированные Т-лимфоциты и НК-клетки по экспрессии соответствующих антигенов (Таблица 2-6).

Выделение субпопуляций лимфоцитов производилось путем последовательного гейтирования. Сначала, используя графики FSC/SSC, исключали из зоны исследования дуплеты и дебрис, после чего на скатерограмме SSC/CD45 выделялась область лимфоцитов. Далее лимфоциты разделялись по маркеру CD3 на две популяции: CD3⁺ и CD3⁻ клетки. Среди CD3⁺ лимфоцитов по скатерограмме CD56/CD16 выделяли популяцию Т-НК-клеток, а в гейте CD3-негативных лимфоцитов – популяцию НК-клеток. Среди субпопуляции CD3-негативных лимфоцитов, используя дот-плоты CD16/CD57 и CD8/CD57, оценивали ЦТП CD8⁺ и CD16⁺ клеток. В лимфоцитарном гейте, применяя дот-плоты CD3/CD16 и CD3/CD56 выделяли цитотоксические и цитокинпродуцирующие субпопуляции НК клеток. Определение цитотоксических Т-лимфоцитов проводили на скатерограмме

CD3/CD8 (Рис. 2-4). Во второй пробирке лимфоциты оценивались в дот-плотах CD3/HLA-DR и CD3/CD25 для выделения активированных Т-лимфоцитов (ранняя и поздняя активация). Далее среди лимфоцитов выделяли Т-хелперы/индукторы в гейте CD3⁺/CD4⁺ и уже из этого гейта по скатерограмме CD25/CD127 определяли регуляторные Т-лимфоциты (Рис. 2-5).

Таблица 2-6. 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-to-neg}
Активированные Т-лимфоциты (поздняя активация)	CD3 ⁺ HLA-DR ⁺
Активированные Т-лимфоциты (ранняя активация)	CD3 ⁺ CD25 ⁺
TCR $\gamma\delta$ Т-клетки	CD3 ⁺ TCR $\gamma\delta$ ⁺
Цитотоксический потенциал (ЦТП) CD8 ⁺ клеток	CD3 ⁻ CD8 ⁺ CD57 ⁺
НК-клетки:	CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺
НК-клетки цитолитические	CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁻
НК-клетки цитокинпродуцирующие	CD3 ⁻ CD56 ⁺ CD16 ⁻
Цитотоксический потенциал (ЦТП) CD16 ⁺ клеток	CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD57 ⁺

Анализируя дотплоты CD3/CD19, CD3/TCR $\gamma\delta$ и CD3/CD4 оценивали популяции В-лимфоцитов, TCR $\gamma\delta$ Т-клеток и Т-хелперов/индукторов. Далее

среди популяции CD3+CD4+ клеток, по скатерограмме CD45RA/CD45RO выделяли наивные Т-хелперы и Т-хелперы памяти (Рис. 2-5).

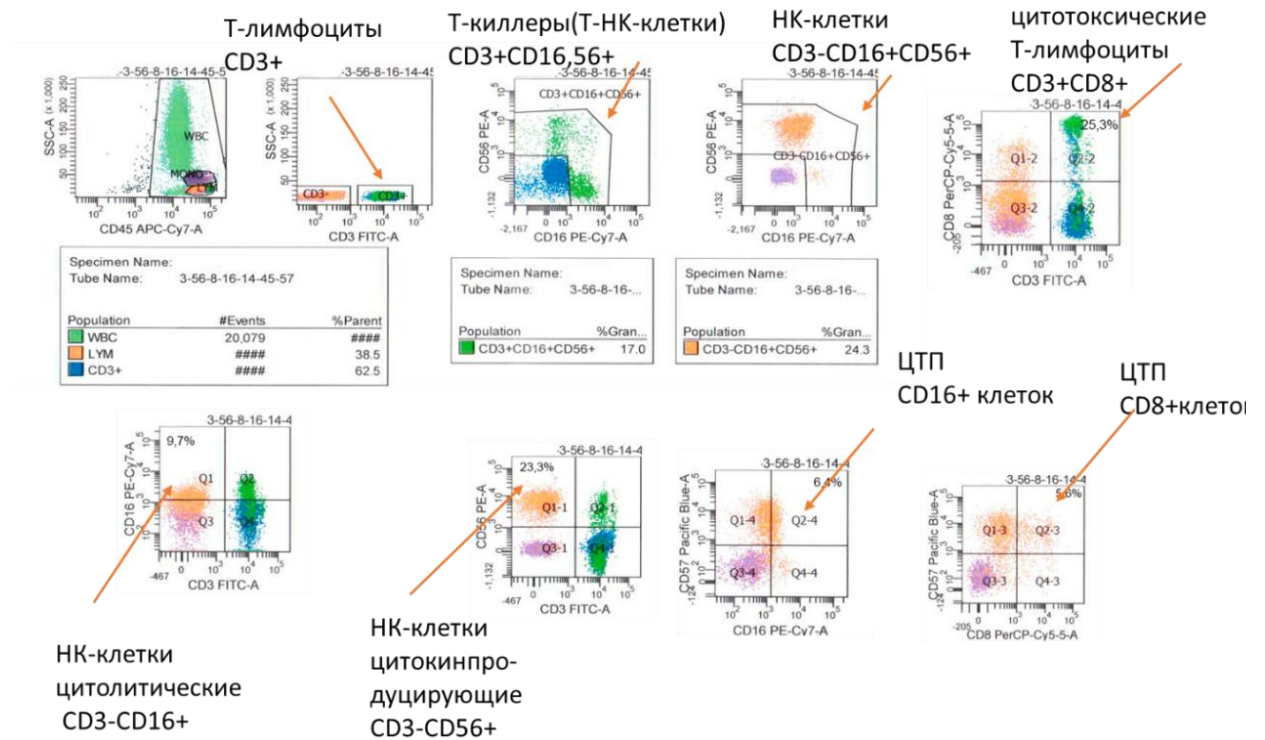


Рис.2-4. Анализ Т-лимфоцитов, Т-НК-клеток, НК-клеток и их субпопуляций, цитотоксических Т-лимфоцитов и ЦТП CD16+ и CD8+ клеток.

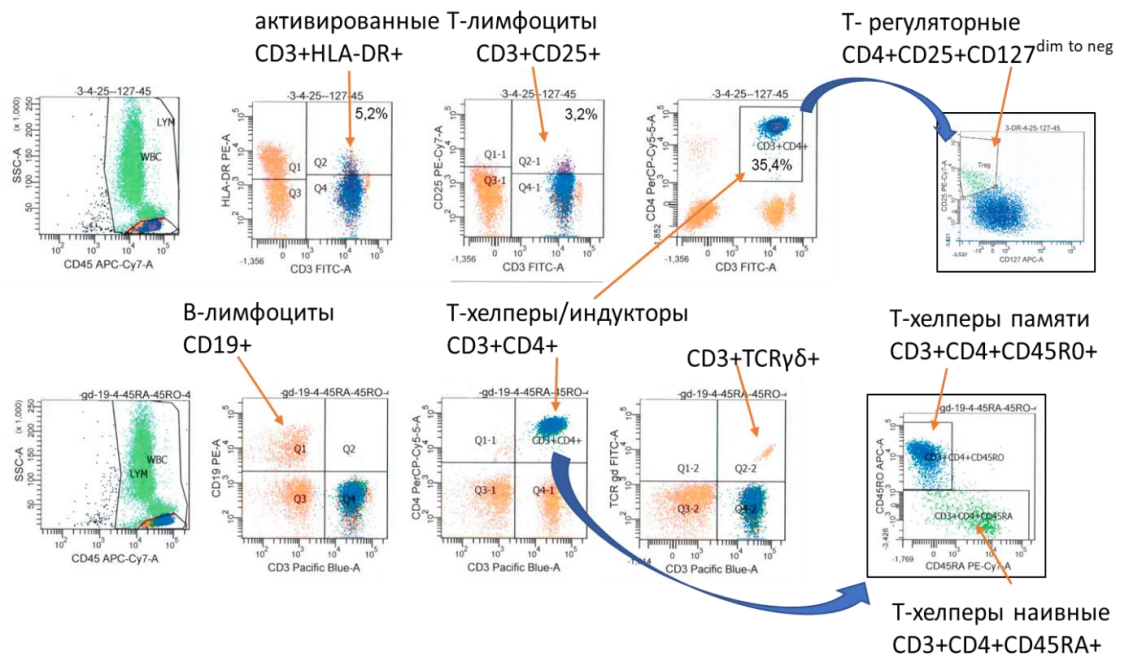


Рис.2-5. Анализ активированных Т-лимфоцитов, Т-регуляторных клеток, Т-хелперов (общее число, наивные и клетки памяти), TCRγδ T-клетки и В-лимфоцитов.

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.

Оценка субпопуляционного состава моноцитов периферической крови проводилась в тех же образцах, что и субпопуляционный состав лимфоцитов. Для оценки субпопуляционного состава моноцитов крови использовалась панель МКА, включающая: CD3 FITC, CD56 PE, CD16 PE-Cy7, CD14 APC и CD45PE-Cy7 производства BD Biosciences и Beckman Coulter, которые входили в состав первой пробирки для оценки субпопуляционного состава лимфоцитов крови (табл. 2-6).

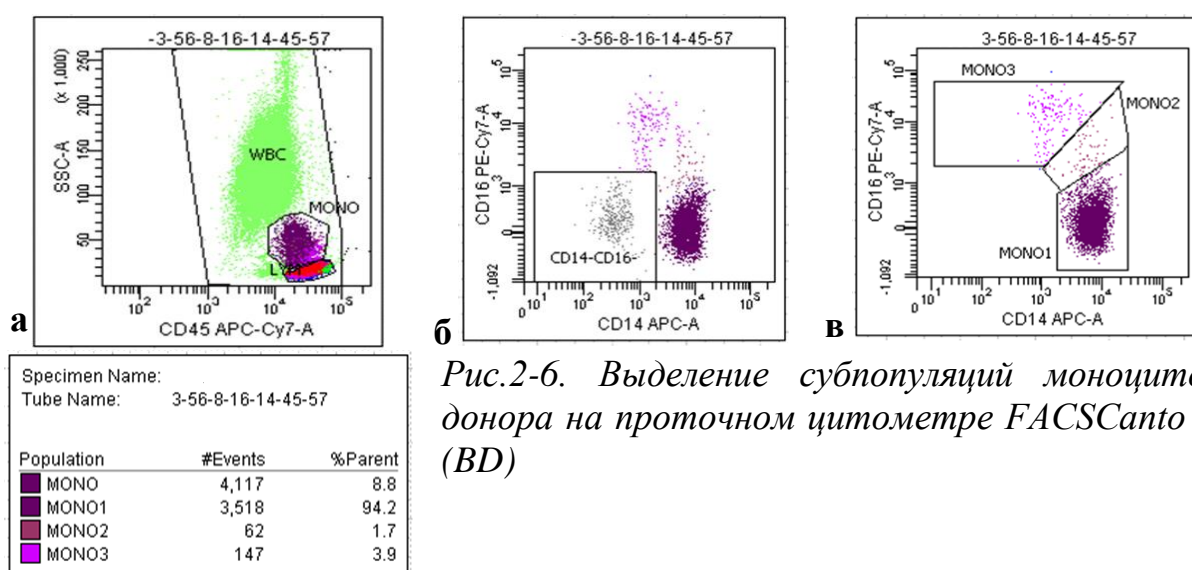


Рис.2-6. Выделение субпопуляций моноцитов донора на проточном цитометре FACSCanto II (BD)

В ходе данного исследования определяли 3 субпопуляции моноцитов: классические моноциты (MO1-CD14++CD16-), промежуточные (MO2-CD14++CD16+) и неклассические (MO3-CD14+CD16++) (Рис. 2-6). Для этого, используя график CD45 vs SSC, выделяли популяцию лейкоцитов (гейт WBC) и моноцитов (гейт MONO) (Рис.2-6а). Исключали из гейта Т-лимфоциты (по CD3) и НК-клетки (по CD56). График CD14 vs CD16 строился в зависимости от гейта MONO not CD3 not CD56, где выделяли гейт CD14-CD16- (серый

цвет) (Рис.2-6б). Затем на еще одном графике CD14 vs CD16 выделяли 3 популяции моноцитов с учетом исключения последнего гейта [CD14-CD16-]. (Рис.2-6в).

Статистические методы

Обработка статистических данных выполнялась с использованием 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). Для сравнения двух групп непрерывных данных с парными выборками применялся парный t-критерий, с независимыми выборками – критерий Стьюдента. В группах непрерывных данных при числе сравниваемых групп 3 и более: с парными выборками – статистический критерий ANOVA повторных измерений, с независимыми выборками – дисперсионный анализ ANOVA. Для выявления взаимосвязи между двумя приблизительно нормально распределенными непрерывными переменными, использовался коэффициент корреляции Пирсона (r). Корреляцию считали сильной при $r > 0,7$; умеренной – при $r = 0,5-0,7$; слабой- при $r < 0,5$.

Если распределение данных не соответствовало нормальному закону распределения, то результаты исследования представлялись в виде медианы, 10% и 90% процентиля и для анализа значимости различий использовались непараметрические методы. Для сравнения двух групп непрерывных данных с парными выборками применялся критерий знаков Уилкоксона; с независимыми выборками – критерий Манна-Уитни. В группах непрерывных данных с парными выборками при числе сравниваемых групп 3 и более с парными выборками применялся статистический критерий «однофакторный дисперсионный анализ Фридмана», с независимыми выборками применялся статистический анализ с использованием теста Kruskal-Wallis. Для выявления взаимосвязи между двумя непрерывными переменными, не распределенными

по нормальному закону, использовался коэффициент ранговой корреляции Спирмена (ρ).

Критический уровень достоверности нулевой гипотезы принимался равным 0,05.

Диагностические характеристики различных методов определения МОБ рассчитывали с помощью четырехпольной таблицы (Таблица 2-7), которая дает представление о том, насколько совпадают результаты исследуемого метода (DuraClone RE CLB Tube) с результатами контрольного (эталонного) метода (ERIC).

Таблица 2-7. Четырехпольная таблица для оценки чувствительности и специфичности метода определения остаточного опухолевого клона ХЛЛ с помощью набора DuraClone RE CLB Tube

		Проверяемый диагностический тест DuraClone RE CLB Tube		
		МОБ+	МОБ-	Общее число исследований
ERIC – эталонный метод	МОБ+	ИП чувствительность	ЛО	ИП+ЛО
	МОБ-	ЛП	ИО специфичность	ЛП+ИО
	Общее число исследований	ИП+ЛП	ЛО+ИО	ИП+ЛО+ЛП+ИО

Примечание: МОБ+ - наличие остаточной опухолевой популяции клеток, МОБ- - отсутствие остаточной опухолевой популяции клеток; ИП- истинноположительные результаты, ЛП – ложноположительные результаты, ЛО – ложноотрицательные результаты, ИО – истинноотрицательные результаты тестов

На основе четырехпольной таблицы рассчитывали основные диагностические характеристики тестов - чувствительность и специфичность по следующим формулам:

Чувствительность = доля истинно положительных результатов = $\text{ИП}/(\text{ИП}+\text{ЛО})$

Специфичность = доля истинно отрицательных результатов = $\text{ИО}/(\text{ЛП}+\text{ИО})$

ГЛАВА 3. ЗНАЧЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ МАРКЕРОВ ROR-1 И CD180 В ДИАГНОСТИКЕ И МОНИТОРИНГЕ ТЕРАПИИ ПРИ ХЛЛ

3.1 Оценка экспрессии маркеров ROR-1 и CD180 на В-лимфоцитах

Проведен анализ экспрессии маркеров ROR-1 и CD180 на В-лимфоцитах доноров (n=30), пациентов с реактивным лимфоцитозом (n=20), пациентов с первичным, нелеченым ХЛЛ (n=50) и на фоне проводимой терапии (n=60).

Результаты проведенных исследований приведены в таблице 3-1.

Таблица 3-1. 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±0,04	0,05±0,05

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 среди доноров и пациентов с реактивным лимфоцитозом практически все В-лимфоциты экспрессировали CD180 (Рис.3-1, 3-2 и 3-3).

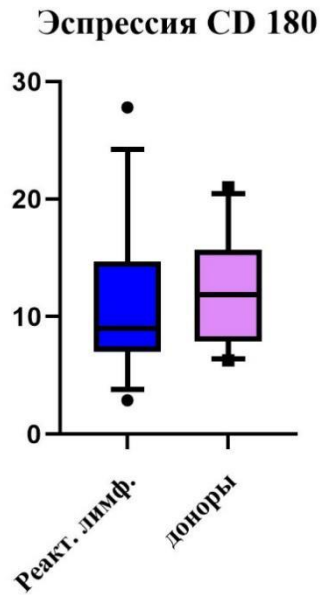


Рис.3-1. Сравнительная диаграмма экспрессии CD180 на В-лимфоцитах пациентов с реактивным лимфоцитозом и доноров

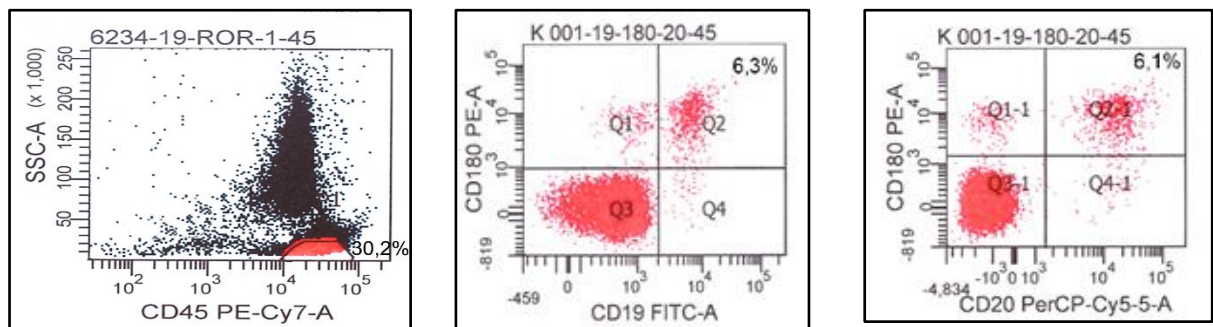


Рис.3-2. Экспрессия CD180 на В-лимфоцитах доноров

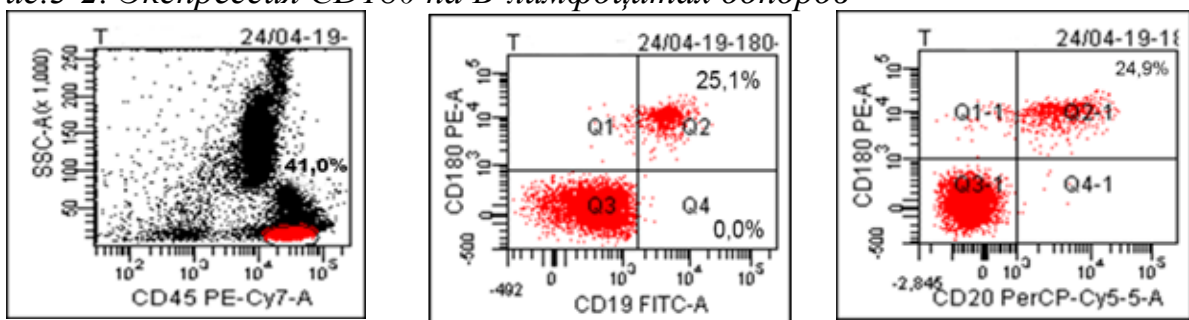


Рис.3-3. Экспрессия CD180 на В-лимфоцитах пациента с инфекционным мононуклеозом

Экспрессия ROR-1 на В-лимфоцитах среди доноров выявлена у 10 человек (в 33,3% случаев), при этом процент экспрессирующих клеток был крайне низким (на уровне следовых значений) и не превышал 0,1% (среднее значение с учетом всех проб - $0,05 \pm 0,05\%$). Среди пациентов с реактивным лимфоцитозом экспрессия ROR-1 была обнаружена только у 6 пациентов

(30,0% случаев) и колебалась в интервале от 0,01% до 0,08% (среднее значение с учетом всех проб - $0,04 \pm 0,04\%$) (Рис.3-4, 3-5, 3-6).

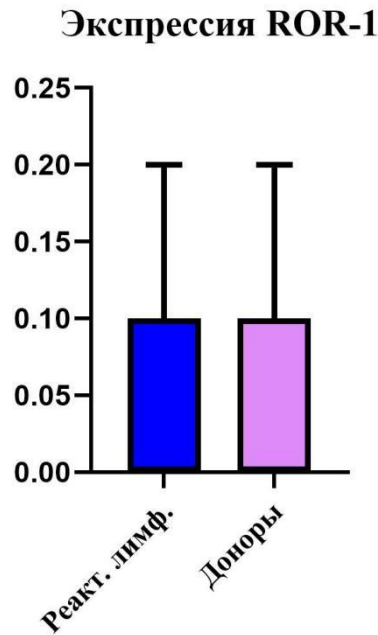


Рис.3-4. Сравнительная диаграмма экспрессии ROR-1 на В-лимфоцитах пациентов с реактивным лимфоцитозом и доноров

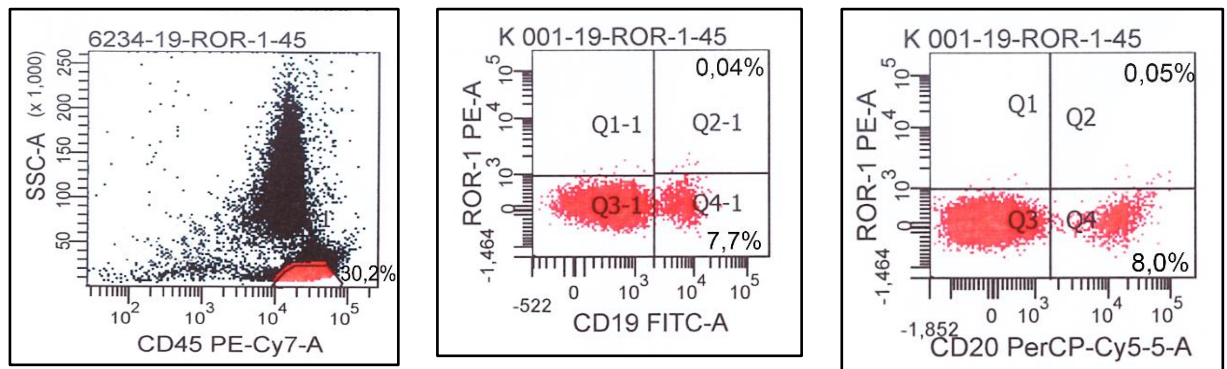


Рис.3-5. Экспрессия ROR-1 на В-лимфоцитах доноров

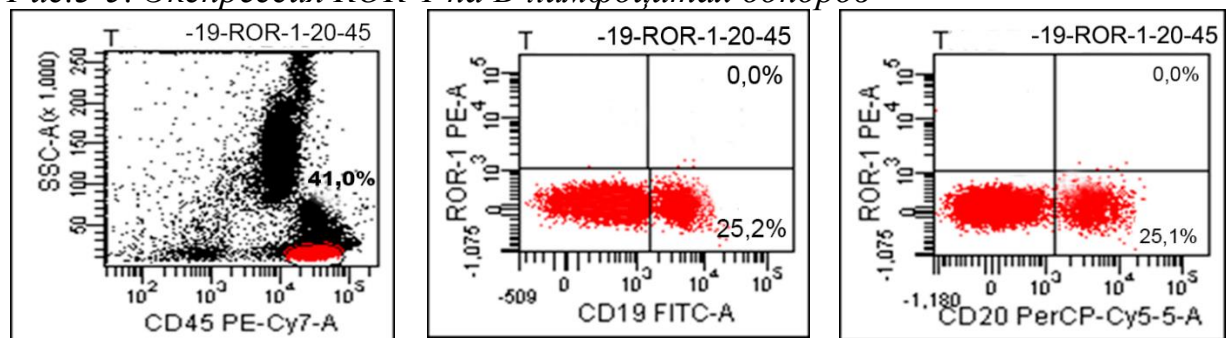


Рис.3-6. Экспрессия ROR-1 на В-лимфоцитах пациента с реактивным лимфоцитозом

Среди пациентов с ХЛЛ экспрессия CD180 была выявлена у 38 человек (76,0%) в дебюте заболевания и у 39 человек (65,0%) на фоне проводимой терапии, при этом процент В-лимфоцитов экспрессирующих CD180, не всегда совпадал с общим их числом, у 1/3 пациентов он был на 30,0% - 60,0% ниже. Средний процент экспрессии CD180 на В-лимфоцитах у первичных пациентов составлял 71,2 %, а у пациентов на терапии - 55,2 %. В то же время экспрессия ROR-1 определялась на мембране опухолевых В-лимфоцитов при ХЛЛ как в дебюте заболевания ($77,7 \pm 2,7\%$), так и на фоне лечения ($87,0 \pm 1,8\%$) (Рис.3-7, 3-8).

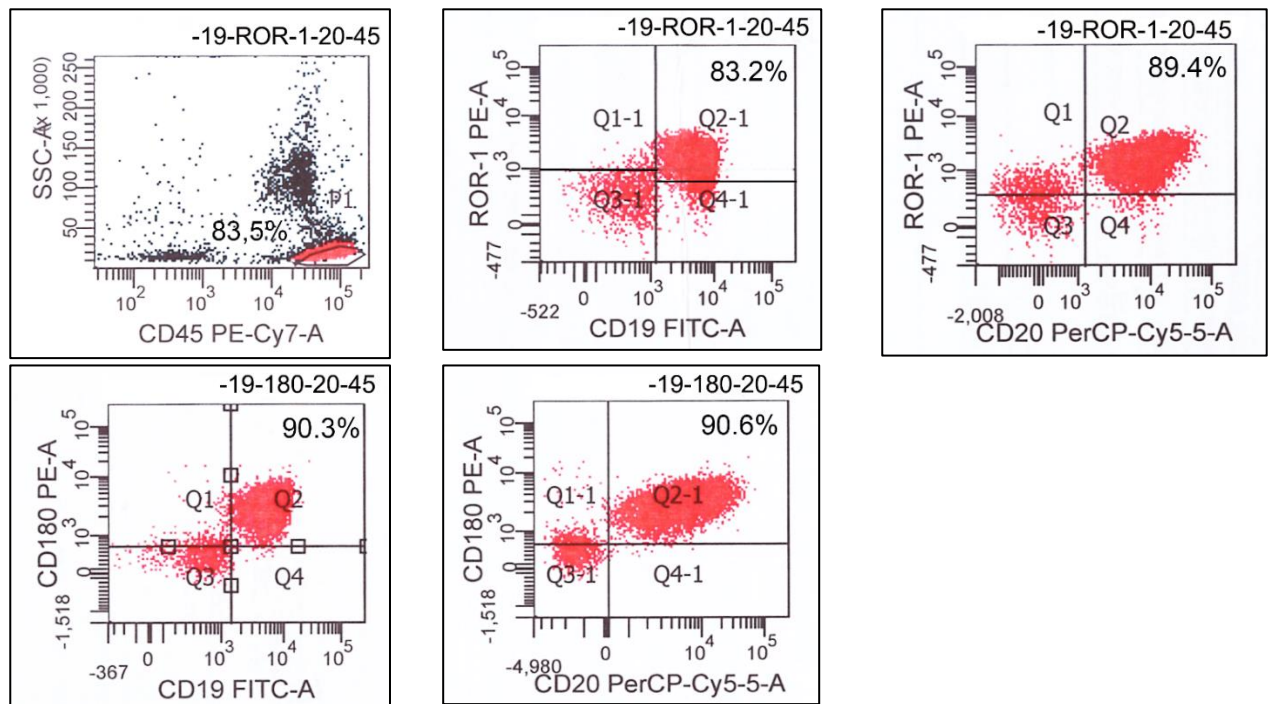


Рис.3-7. Позитивная экспрессия ROR-1 и CD180 на В-лимфоцитах пациента с первичным нелеченым ХЛЛ

У пациентов с реактивным лимфоцитозом и доноров процент CD19+ROR-1+ и CD20+ROR-1+лимфоцитов не отличались (Рис.3-5, Рис.3-6). Для пациентов с первично диагностированным нелеченым ХЛЛ отмечалась та же тенденция (Рис.3-7), в то время как при терапии, в схемы которой были включены анти-CD20 МКА, наблюдалось отсутствие экспрессии CD20 на опухолевых клетках, а, следовательно, и снижение процента ROR-1+CD20+ клеток (Рис.3-9). Поэтому в дальнейшем анализ экспрессии ROR-1 изучался на CD19-позитивных лимфоцитах.

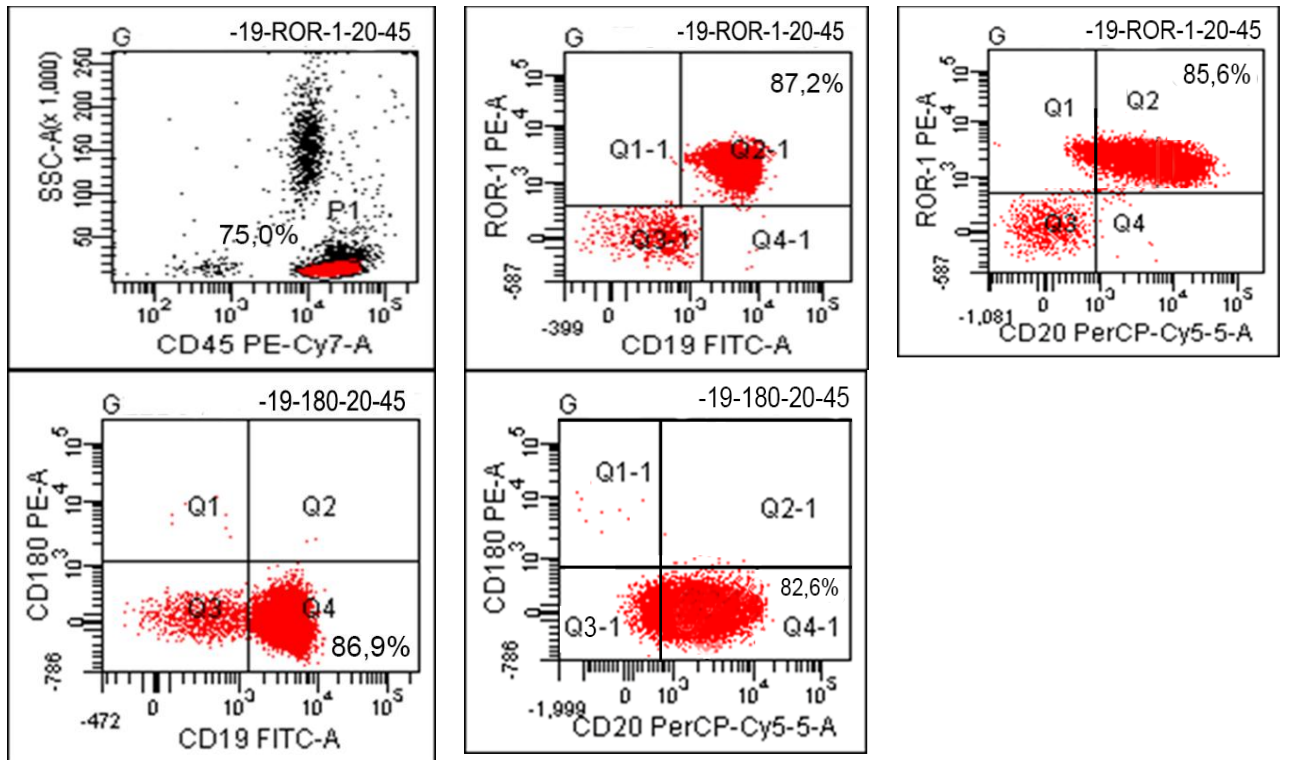


Рис.3-8. Позитивная экспрессия *ROR-1* и отсутствие экспрессии *CD180* на В-лимфоцитах пациента с первичным нелеченым ХЛЛ

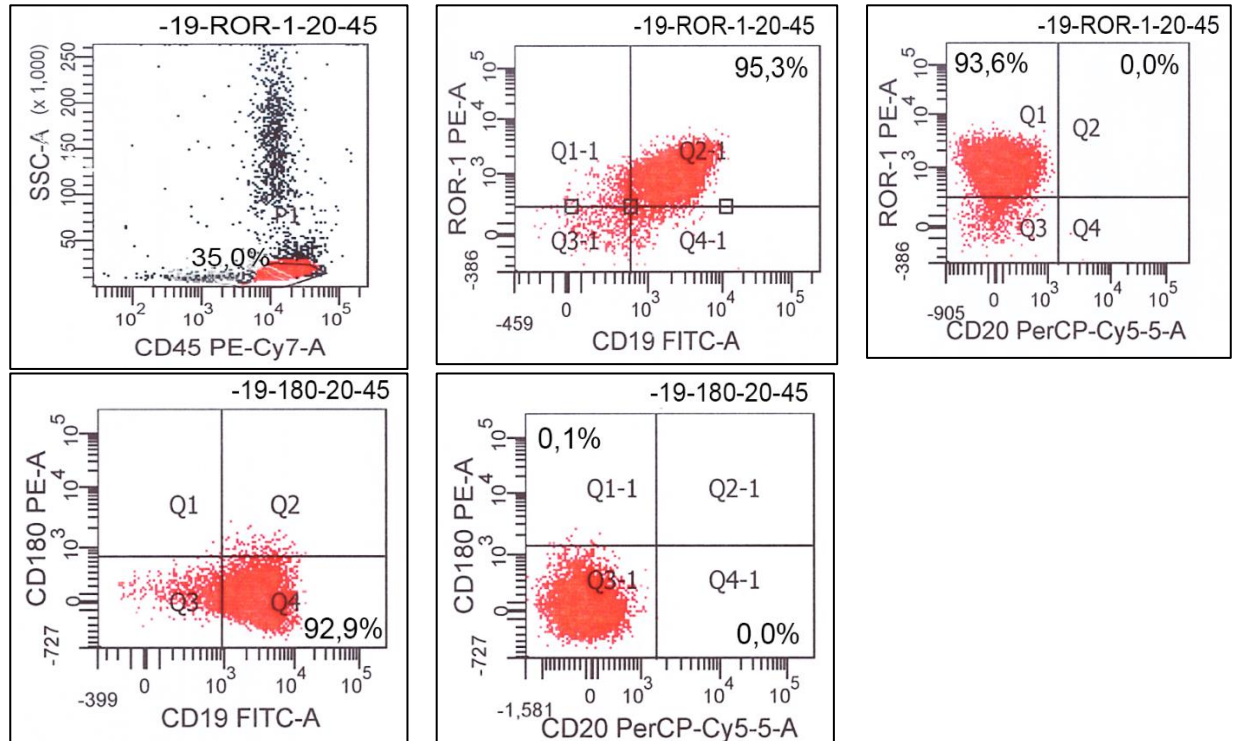


Рис.3-9. Доля клеток, экспрессирующих *ROR-1* и отсутствие экспрессии *CD180* на В-лимфоцитах пациента с ХЛЛ на фоне лечения ритуксимаб содержащими схемами.

Ниже приведены сравнительные диаграммы экспрессии маркеров CD180 и ROR-1 на В-лимфоцитах пациентов ХЛЛ до и на фоне терапии по сравнению с донорами и пациентами с реактивным лимфоцитозом (Рис.3-10 и Рис.3-11).

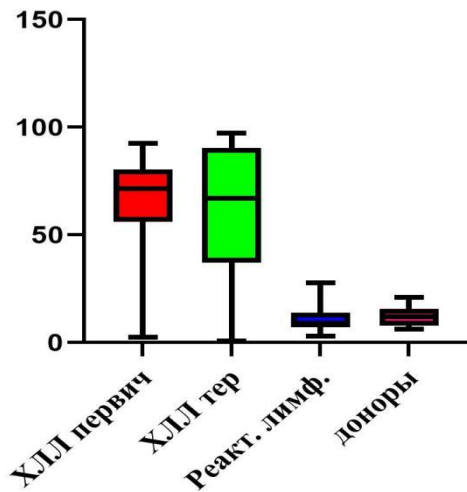


Рис.3-10. Сравнительная диаграмма экспрессии CD180 на В-лимфоцитах пациентов ХЛЛ, реактивным лимфоцитозом и доноров

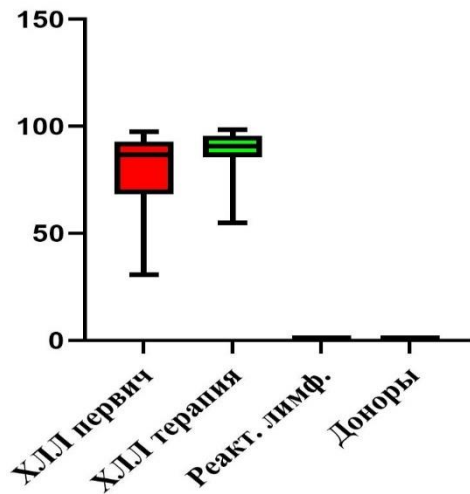


Рис.3-11. Сравнительная диаграмма экспрессии ROR-1 на В-лимфоцитах пациентов ХЛЛ, реактивным лимфоцитозом и доноров

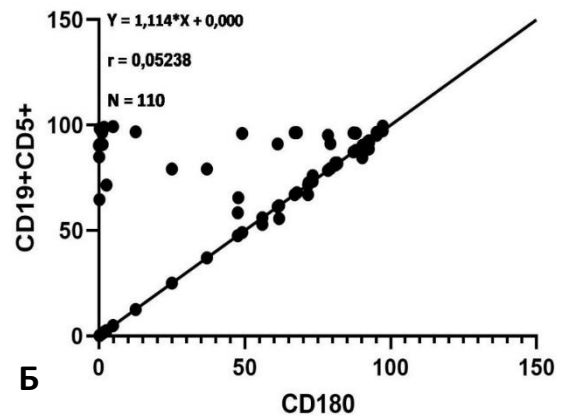
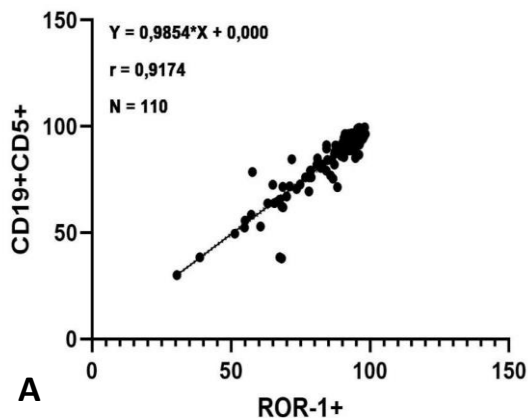


Рис.3-12 (А, Б). Графики корреляции экспрессии ROR-1 (А) и CD180 (Б) с CD19+CD5+клетками при ХЛЛ

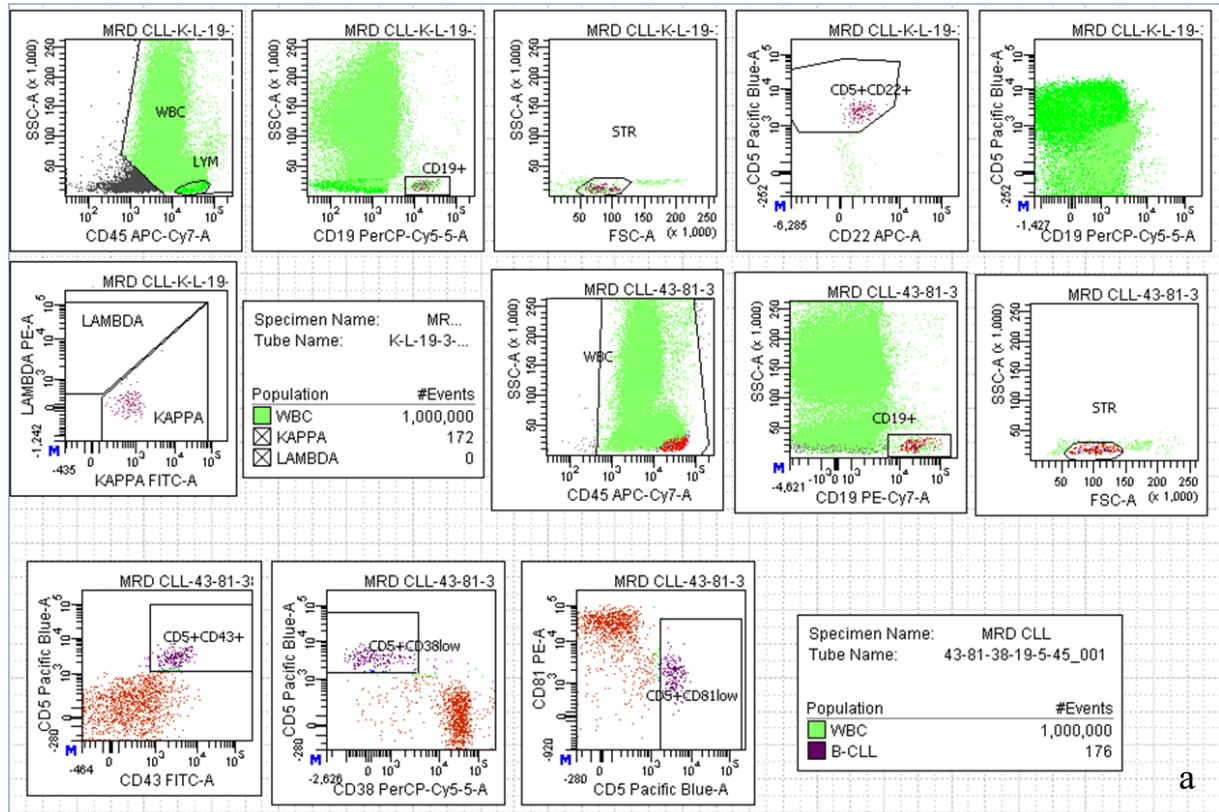
Примечание. В левом верхнем углу графиков даны компоненты математического анализа регрессии: уравнение линейной регрессии ($y=x$), коэффициент корреляции Спирмена (r), объем выборки (N).

Нами проведено сопоставление числа CD19+ROR-1+ клеток с количеством опухолевых CD19+CD5+B-клеток. В результате этого анализа получен высокий уровень корреляции экспрессии ROR-1 и числа опухолевых клеток ($r=0,9174$) (рис.3-8), в отличие от корреляции числа опухолевых (CD19+CD5+) клеток с В-лимфоцитами, экспрессирующими CD180 (CD19+CD180+) ($r=0,0524$) (Рис.3-12).

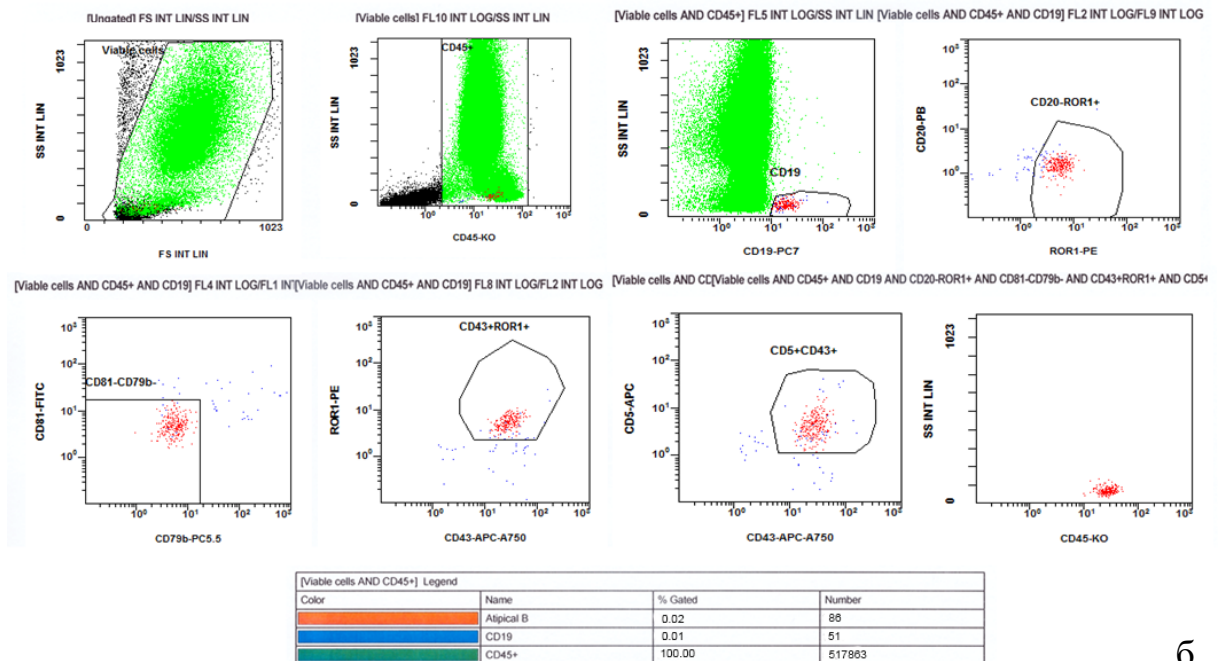
Таким образом, проведенное исследование показало, что у доноров и пациентов с реактивным лимфоцитозом практически все В-лимфоциты экспрессировали CD180 и не экспрессировали ROR-1. В то же время у пациентов с впервые выявленным ХЛЛ экспрессия CD180 наблюдалась только у 76,0%, а в группе больных, получавших терапию - у 65,0%. Процент CD180-позитивных В-лимфоцитов соответствовал 71,2% и 55,2%, соответственно. Напротив, экспрессия ROR-1 отмечалась на большинстве В-лимфоцитов как в дебюте заболевания ($77,7\pm 2,7\%$), так и на фоне проводимой терапии, независимо от используемых схем ($87,0\pm 1,8\%$). Учитывая 100,0% экспрессию ROR-1 на опухолевых клетках, данный маркер может быть использован для оценки МОБ ХЛЛ.

3.2 Сравнение двух подходов оценки МОБ при ХЛЛ

В работе проведено сравнительное исследование остаточного опухолевого клона ХЛЛ двумя методами - согласно стандартному протоколу, предложенному ERIC и с помощью набора DuraClone RE CLB Tube (BC). Для этого использовано 64 образца костного мозга и 6 - периферической крови. Сопоставление результатов определения остаточного опухолевого клона ХЛЛ стандартизированным методом по протоколу ERIC и набором DuraClone RE CLB Tube показало высокую корреляцию полученных результатов ($r=0,9986$) (Рис.3-15). В 39 случаях ХЛЛ (55,7%) был выявлен опухолевый клон, который колебался в интервале от 0,01% до 59,0% (Рис. 3-13 а и б). В 31 случае (44,3%) была установлена МОБ-негативная ремиссия (остаточная опухолевая популяция составляла менее 0,01% (Рис.3-14 а и б).

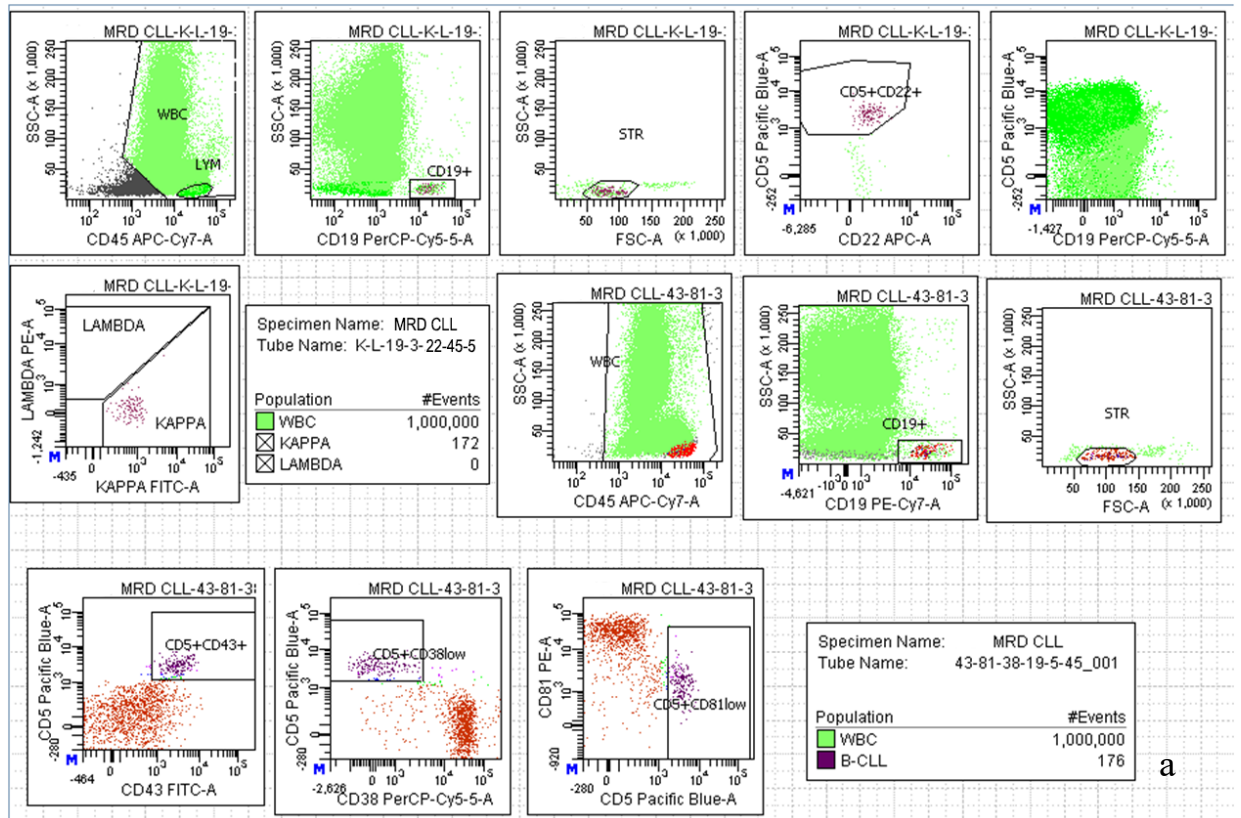


a

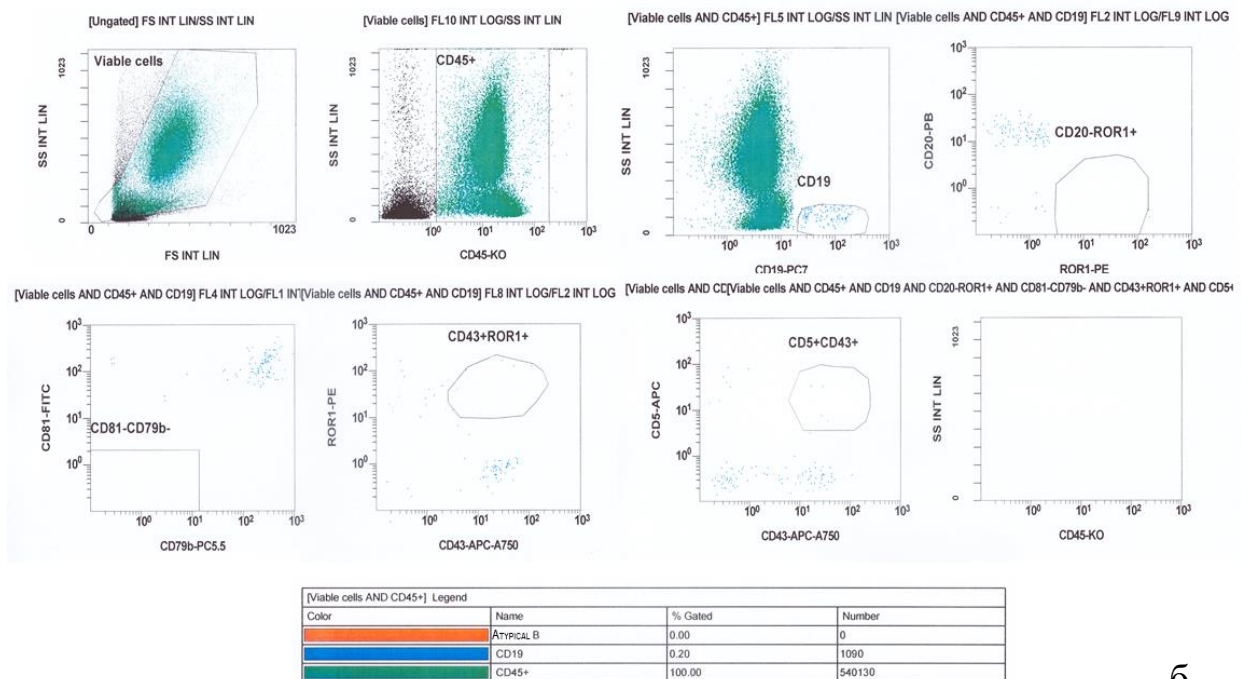


b

Рис.3-13 (а, б). Пример МОБ-позитивного ХЛЛ, определенный по протоколу ERIC (остаточный опухолевый клон составляет 0,017%) (а) и набором DuraClone RE CLB Tube (остаточный опухолевый клон составляет 0,02%) (б)



a



б

Рис.3-14 (а,б). Пример МОБ-негативного ХЛЛ, определенный по протоколу ERIC (а) и набором DuraClone RE CLB Tube (б). Популяция В-лимфоцитов поликлональная

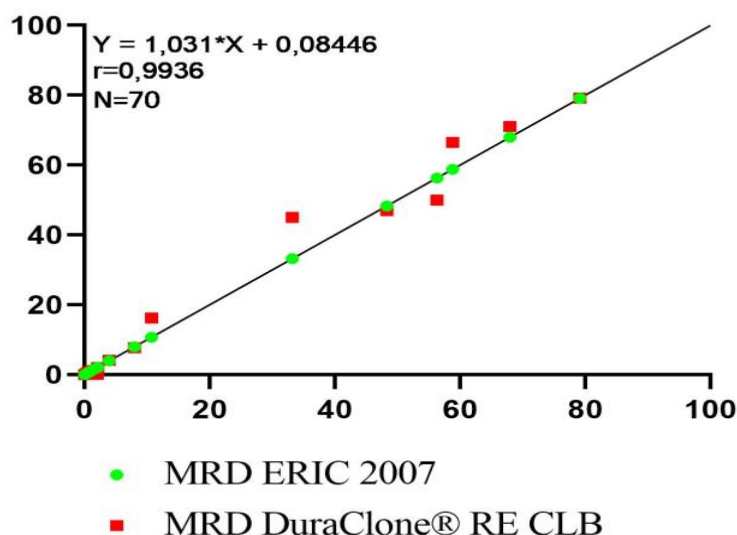


Рис.3-15. Сравнительное иммунофенотипическое исследование 2-х методов оценки минимальной остаточной болезни

Определение чувствительности и специфичности 2-х методов оценки остаточного опухолевого клона ХЛЛ с использованием четырехпольной таблицы приведено в табл.6.

Таблица 3-2. Четырехпольная таблица для вычисления чувствительности и специфичности метода определения остаточного опухолевого клона ХЛЛ набором 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 составила 97,4%, специфичность - 87,1%, что позволяет рекомендовать его для мониторинга опухолевой популяции В-лимфоцитов в динамике терапии.

Таким образом, 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 применять данный маркер в мониторинге МОБ при ХЛЛ. Использование в панели ROR-1 имеет ряд преимуществ, 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.

ГЛАВА 4. ОЦЕНКА СУБПОПУЛЯЦИЙ Т-ЛИМФОЦИТОВ, НК-КЛЕТОК И МОНОЦИТОВ У ПАЦИЕНТОВ С ХЛЛ В ДЕБЮТЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ И НА ФОНЕ ТЕРАПИИ

4.1 Оценка субпопуляций Т-лимфоцитов и НК-клеток в периферической крови до и в динамике терапии больных хроническим лимфолейкозом

Оценка нормальности распределения субпопуляций Т-лимфоцитов, НК-клеток и В-лимфоцитов с использованием критериев Колмогорова-Смирнова и Шапиро-Уилки показала, что общее количество Т-лимфоцитов, Т-НК-клеток, НК-клеток и их субпопуляций, Т-хелперов/индукторов, наивных Т-хелперов и Т-хелперов памяти, а также цитотоксических Т-лимфоцитов, Т-регуляторных клеток и активированных Т-лимфоцитов распределены не по нормальному закону. Поэтому в нашей работе мы применили непараметрические методы для сравнения данных субпопуляций лимфоцитов. Полученные результаты исследования вышеперечисленных субпопуляций лимфоцитов периферической крови пациентов ХЛЛ и доноров представлены в таблице 4-1.

Таблица 4-1. Сравнение субпопуляционного состава Т-лимфоцитов и НК-клеток в исследуемых группах пациентов ХЛЛ и доноров

Субпопуляции лимфоцитов	Абсолютное число клеток (*10 ⁹ /л)					p
	I группа (n=50) Me (P ₁₀ – P ₉₀)	IIa группа (n=59) Me (P ₁₀ – P ₉₀)	IIb группа (n=57) Me (P ₁₀ – P ₉₀)	III группа (n=30) Me (P ₁₀ – P ₉₀)	Доноры (n=30) Me (P ₁₀ – P ₉₀)	
Т-лимфоциты (CD3+)	3,27 (1,44-8,23)	1,97 (0,91-4,52)	1,5 (0,58-3,39)	3,37 (1,37-8,89)	1,39 (0,97-1,89)	I/D < 0,0001 IIa/D - 0,004 III/D < 0,0001 IIa/I – 0,01 IIb/I < 0,0001 IIa/IIb – 0,035 III/IIa – 0,014 III/IIb < 0,0001
Т-НК-клетки (CD3+CD16,56+)	0,27 (0,05-1,74)	0,54 (0,11-1,62)	0,38 (0,08-1,26)	0,36 (0,002-1,21)	0,15 (0,09-0,38)	IIa/D < 0,0001 IIb/D – 0,0032

НК-клетки (CD3- CD16,56+)	0,73 (0,3-2,80)	0,24 (0,07-0,59)	0,21 (0,07-0,73)	0,83 (0,25-2,26)	0,22 (0,10-0,44)	I/D < 0,0001 III/D < 0,0001 IIa/I < 0,0001 IIb/I < 0,0001 III/IIa < 0,0001 III/IIb < 0,0001
НК-клетки цитолитические (CD3- CD16+CD56-)	0,48 (0,11-2,57)	0,17 (0,04-0,60)	0,14 (0,04-0,56)	0,54 (0,12-1,54)	0,08 (0,03-0,35)	I/D < 0,0001 III/D < 0,0001 IIa/I – 0,0002 IIb/I < 0,0001 III/IIa-0,0037 III/IIb < 0,0001
НК-клетки цитокинпродуцирующие (CD3- CD56+CD16-)	0,44 (0,18-1,43)	0,21 (0,05-0,54)	0,15 (0,04-0,44)	0,41 (0,10-1,21)	0,12 (0,04-0,40)	I/D < 0,0001 III/D - 0,0004 IIa/I < 0,0001 IIb/I < 0,0001 IIb/III-0,0015
Т-хелперы/ индукторы (CD3+CD4+)	1,54 (0,79-5,25)	0,81 (0,39-2,2)	0,62 (0,3-1,55)	1,34 (0,72-3,96)	0,82 (0,58-1,22)	I/D < 0,0001 III/D - 0,0079 IIa/I < 0,0001 IIb/I < 0,0001 III/IIa-0,0049 III/IIb < 0,0001
Т-хелперы наивные (CD3+CD4+CD45RA+)	0,54 (0,22-2,09)	0,14 (0,04-0,44)	0,11 (0,03-0,40)	0,29 (0,14-1,22)	0,32 (0,16-0,66)	IIa/D -0,0007 IIb/D < 0,0001 IIa/I < 0,0001 IIb/I < 0,0001 III/IIa-0,0017 III/IIb < 0,0001
Т-хелперы памяти (CD3+CD4+CD45RO+)	0,93 (0,53-2,54)	0,64 (0,28-1,75)	0,50 (0,23-1,13)	1,29 (0,2-2,45)	0,49 (0,30-0,75)	I/D < 0,0001 III/D < 0,0001 IIa/I – 0,028 IIb/I < 0,0001 III/IIb < 0,0001 III/IIa - 0,0017
Цитотоксические Т-лимфоциты (CD3+CD8+)	1,44 (0,44-3,50)	1,14 (0,48-3,00)	0,83 (0,27-2,19)	1,88 (0,52-5,39)	0,47 (0,32-0,83)	I/D < 0,0001 IIa/D < 0,0001 IIb/D-0,0094 III/D < 0,0001

						IIb/I-0,0051 III/IIb-0,0005
ИРИ (CD3+CD4+/ CD3+CD8+)	1,27 (0,50-2,66)	0,70 (0,41-1,60)	0,81 (0,37-1,66)	1,06 (0,31-2,14)	1,67 (0,96-2,70)	IIa/D < 0,0001 IIb/D < 0,0001 III/D-0,0002 IIa/I-0,0002 IIb/I-0,0147
Т- регуляторные (CD4+CD25+ CD127 ^{dim-to-neg})	0,13 (0,06-0,35)	0,02 (0,0-0,10)	0,01 (0,0-0,05)	0,21 (0,06-0,69)	0,05 (0,03-0,10)	I/D - 0,0109 IIa/D-0,0073 IIb/D-0,0001 III/D-0,0027 IIa/I < 0,0001 IIb/I < 0,0001 IIa/III < 0,0001 IIb/III < 0,0001
Активированн ые Т- лимфоциты (CD3+CD25+)	0,40 (0,10-1,27)	0,11 (0,04-0,34)	0,11 (0,03-0,30)	0,28 (0,005-0,88)	0,05 (0,02-0,09)	I/D < 0,0001 IIa/D - 0,0001 IIb/D - 0,0033 III/D < 0,0001 IIa/I < 0,0001 IIb/I < 0,0001 III/IIb-0,0131
Активированн ые Т- лимфоциты (CD3+HLA- DR+)	0,44 (0,08-1,09)	0,21 (0,09-0,48)	0,19 (0,06-0,39)	0,25 (0,04-0,89)	0,07 (0,04-0,16)	I/D < 0,0001 IIa/D < 0,0001 IIb/D - 0,0005 III/D - 0,0005 IIa/I-0,0234 IIb/I-0,0021
В-лимфоциты (CD3-CD19+)	24,12 (4,27- 140,70)	2,66 (0,03-34,50)	0,48 (0,05-7,14)	62,32 (5,05-220,4)	0,32 (0,13-0,47)	I/D < 0,0001 IIa/D-0,0062 III/D < 0,0001 IIa/I < 0,0001 IIb/I < 0,0001 IIa/III < 0,0001 IIb/III < 0,0001

Примечание. Данные представлены в виде: Ме-медиана, P₁₀ – 10% процентиль, P₉₀-90% процентиль, n - объем выборки ; p - уровень значимости отличий; «I/D» , «IIa/D» , «IIb/D» , «III/D» - между показателями доноров и пациентов I-й группы, IIa-й группы, IIb-й группы и III-й группы соответственно, «I/IIa» – между показателями пациентов I-й и IIa-й групп, «I/IIb» – между показателями пациентов I-й и IIb-й групп, «I/III» - между показателями пациентов I-й и III-й группами и т.д.

Статистический анализ результатов исследования цитотоксического потенциала (ЦТП) CD8⁺ клеток, цитотоксического потенциала (ЦТП) CD16⁺ клеток и числа CD3⁺TCR $\gamma\delta$ ⁺клеток показал, что полученные данные имеют нормальное распределение независимо от анализируемых групп. Это дало нам возможность использовать параметрические методы анализа при сравнении данных субпопуляций лимфоцитов у пациентов ХЛЛ и доноров. Полученные результаты приведены в таблице 4-2.

Таблица 4-2. Оценка цитотоксического потенциала (ЦТП) CD8⁺ клеток, ЦТП CD16⁺ клеток и CD3⁺TCR $\gamma\delta$ ⁺клеток

Субпопуляции лимфоцитов	Абсолютное число клеток (*10 ⁹ /л)					p
	ХЛЛ (I группа) (n=50) Mean (SD)	ХЛЛ (IIa группа) (n=59) Mean (SD)	ХЛЛ (IIb группа) (n=57) Mean (SD)	ХЛЛ (III группа) (n=30) Mean (SD)	Доноры (n=30) Mean (SD)	
ЦТП CD8 ⁺ клеток (CD3 ⁻ CD8 ⁺ CD57 ⁺)	0,055 (0,066)	0,066 (0,092)	0,047 (0,081)	0,028 (0,053)	0,018 (0,013)	IIa/D – 0,0279
ЦТП CD16 ⁺ клеток (CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD57 ⁺)	0,108 (0,14)	0,105 (0,14)	0,107 (0,27)	0,057 (0,105)	0,013 (0,015)	Все результаты недостоверны
CD3 ⁺ TCR $\gamma\delta$ ⁺	0,302 (0,462)	0,156 (0,198)	0,147 (0,111)	0,172 (0,216)	0,058 (0,034)	I/D - 0,0003 IIa/I - 0,0317 IIb/I – 0,001

Примечание. Данные представлены в виде: Mean-среднее значение, SD- стандартное отклонение, n- объем выборки. p - уровень значимости отличий: «I/D», «IIa/D», «IIb/D», «III/D» - между показателями доноров и пациентов I-й группы, IIa-й группы, IIb-й группы и III-й группы соответственно, «I/IIa» – между показателями пациентов I-й и IIa-й групп, «I/IIb» – между показателями пациентов I-й и IIb-й групп, «I/III» - между показателями пациентов I-й и III-й группами и т.д.

Анализ субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови показал, что в дебюте ХЛЛ (I группа пациентов) и у пациентов, находящихся на флюдарабин-содержащих схемах терапии (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 обеих группах), так и

НК-клеток ($p < 0,0001$ в обеих группах), а также субпопуляций НК-клеток ($p < 0,0001$ и $p = 0,0004$, соответственно). У пациентов групп Па и Пб, 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 обеих подгрупп), цитолитических НК-клеток ($p = 0,0002$ и $p < 0,0001$ соответственно), цитокинпродуцирующих НК-клеток ($p < 0,0001$ для обеих подгрупп) по сравнению с пациентами I группы. При этом значения вышеперечисленных субпопуляций за исключением общего числа Т-лимфоцитов в группе Па (пациенты, принимавшие ибрутиниб до 2 лет) достоверно не отличались от показателей доноров (см. табл.4-1, рис. 4-2).

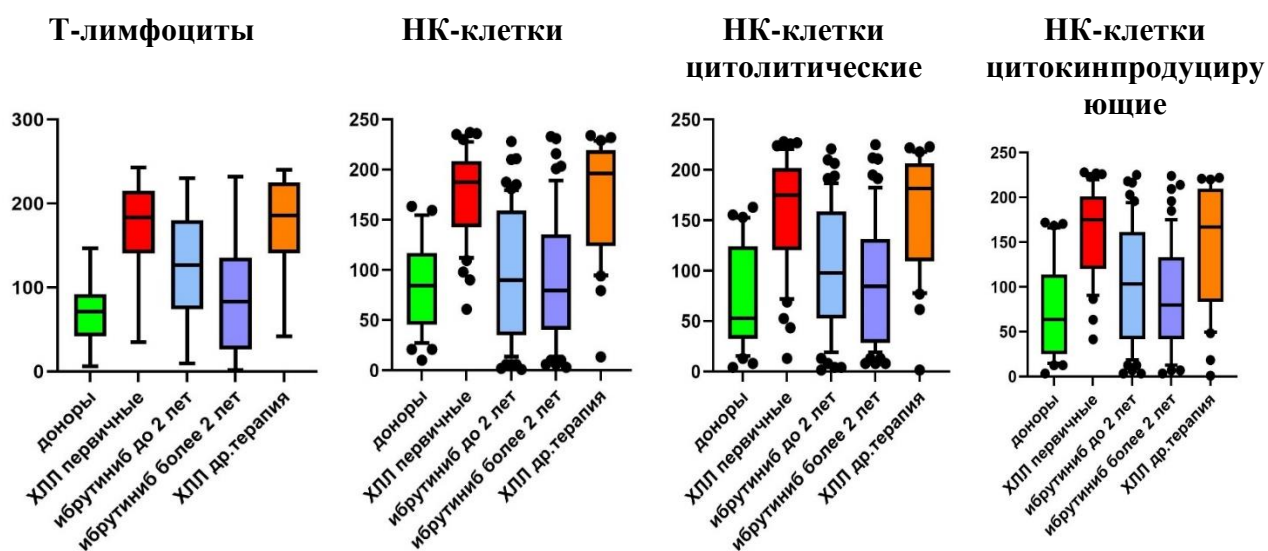


Рис.4-2. Соотношение Т-лимфоцитов, НК-клеток и их субпопуляций в исследуемых группах. Данные представлены в виде медианы и размаха 10% и 90% процентиля

Статистическая оценка результатов исследования цитотоксического потенциала (ЦТП) CD16⁺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 Па (пациенты, принимавшие ибрутиниб до 2 лет), где выявлены достоверные отличия от доноров ($p = 0,0279$).

Анализ абсолютного числа Т-НК-клеток среди первичных пациентов ХЛЛ и пациентов ХЛЛ на флюдарабин-содержащих схемах терапии (группы I и III), несмотря на существенный разброс результатов не выявил достоверных различий с данными доноров. Среди пациентов на терапии ибрутинибом (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 (см. табл.4-1, табл.4-2, рис.4-3).

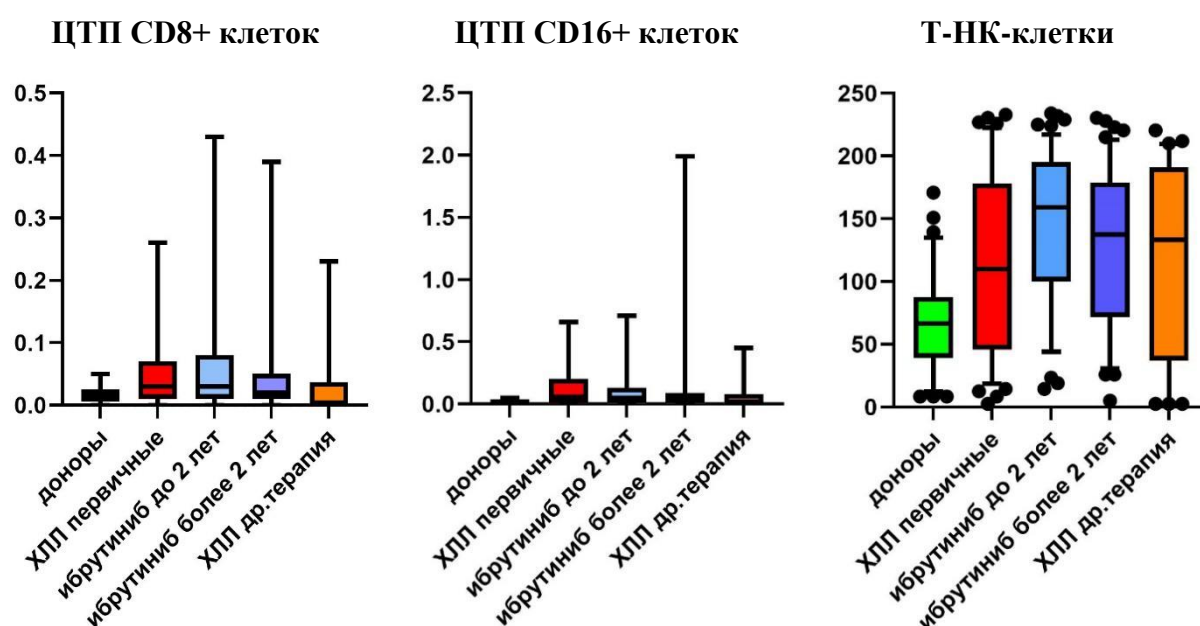


Рис. 4-3. Соотношение ЦТП CD8+ и CD16+ лимфоцитов и Т-НК-клеток у пациентов с ХЛЛ и доноров. Данные представлены для 1 и 2 графиков в виде среднего значения и стандартного отклонения, для 3 графика - в виде медианы и размаха 10% и 90% перцентиля

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 ($p < 0,0001$ для обеих подгрупп по отношению к пациентам I группы и $p = 0,0049$ и $p < 0,0001$ соответственно по отношению к пациентам III группы), при этом отличия становились более выраженными по мере увеличения длительности терапии ибрутинибом, и постепенно приближались к нормальным величинам (различия с донорами недостоверны).

Количество цитотоксических Т-лимфоцитов у пациентов IIa и IIb подгрупп недостоверно снижались по сравнению с пациентами I группы, оставаясь выше показателей доноров ($p < 0,0001$ и $p = 0,0094$ соответственно), приводя к инверсии ИРИ ($p < 0,0001$ для обеих подгрупп) (см. таб. 4-1, рис.4-4).

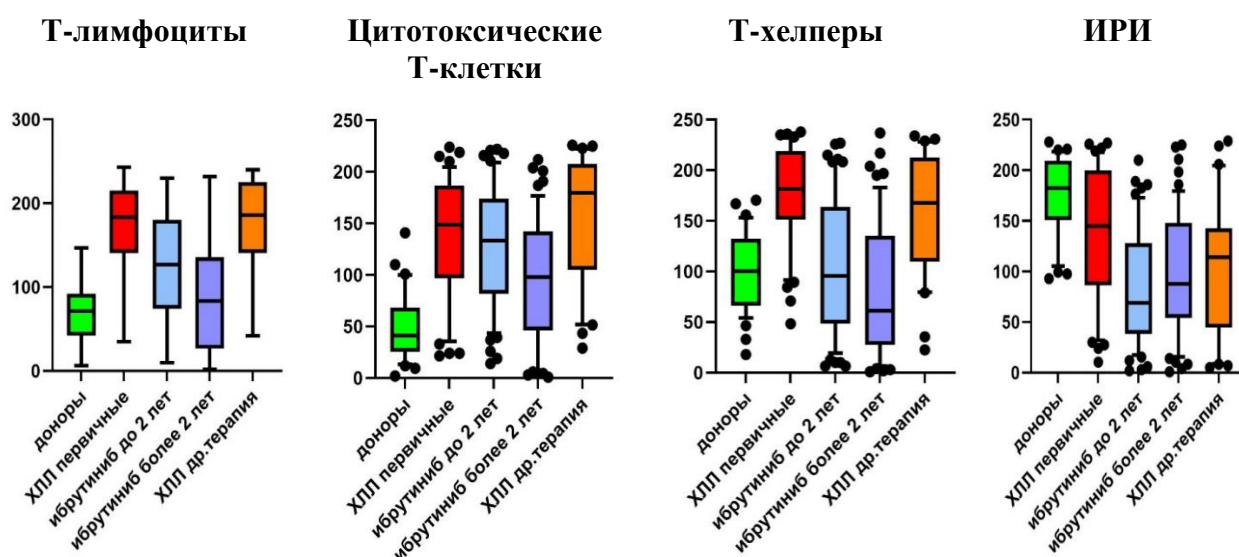


Рис.4-4. Соотношение Т-лимфоцитов, цитотоксических Т-клеток, Т-хелперов и ИРИ в исследуемых группах. Данные представлены в виде медианы и размаха 10% и 90% процентиля

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.

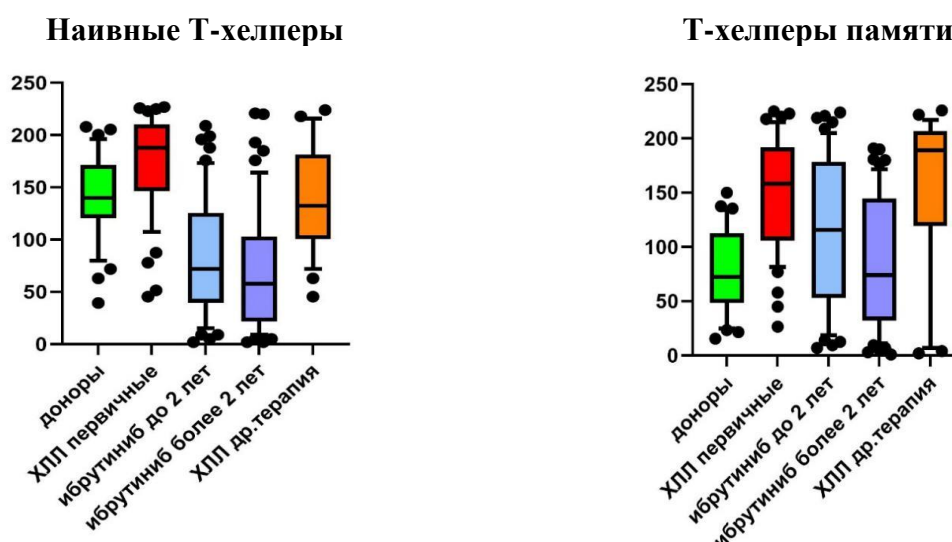


Рис.4-5. Соотношение наивных Т-хелперов и Т-хелперов памяти в исследуемых группах. Данные представлены в виде медианы и размаха 10% и 90% перцентилей

Среди пациентов на терапии ибрутинибом (группы IIa и IIb) выявлено достоверное снижение наивных Т-хелперов ниже нормальных значений ($p=0,0007$ и $p<0,0001$, соответственно). В то время, как значения Т-хелперов памяти достоверно снижались по отношению к пациентам I и III групп, и в тоже время не отличались от показателей доноров (см. таб. 4-1, рис.4-5).

Проведенные нами исследования указывают на достоверное увеличение у пациентов I и III групп по сравнению с донорами числа Т-регуляторных клеток ($p=0,0109$ и $p=0,0002$ соответственно), в то время как в IIa и IIb группах больных наблюдалось снижение по отношению ко всем остальным группам числа Т-регуляторных клеток ($p<0,0001$ по сравнению с I и III группами и $p=0,0109$ и $p=0,0001$, соответственно по отношению к донорам), более выраженное при длительном (более 2 лет) приеме ибрутиниба (см. табл. 4-1, рис.4-5).

Достоверное увеличение по сравнению с донорами количества TCR δ -Т-лимфоцитов наблюдалось только у пациентов I группы ($p=0,0003$). На фоне проведения терапии ибрутинибом (группы IIa и IIb) наблюдалось снижение данной субпопуляции Т-лимфоцитов по сравнению с пациентами I группы

($p=0,0317$ и $p=0,001$, соответственно), однако различия по данному показателю по сравнению с донорами были статистически недостоверными (см. табл.4-2, рис.4-6).

Кроме того, в I и III группах пациентов нами выявлено достоверное повышение абсолютного числа активированных Т-лимфоцитов с маркером как ранней активации ($CD3+CD25+$, $p<0,0001$ для обеих групп), так и поздней ($CD3+HLA-DR+$, $p<0,0001$ для обеих групп). В группах пациентов 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), но 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) (см. таб.4-1, рис.4-6).

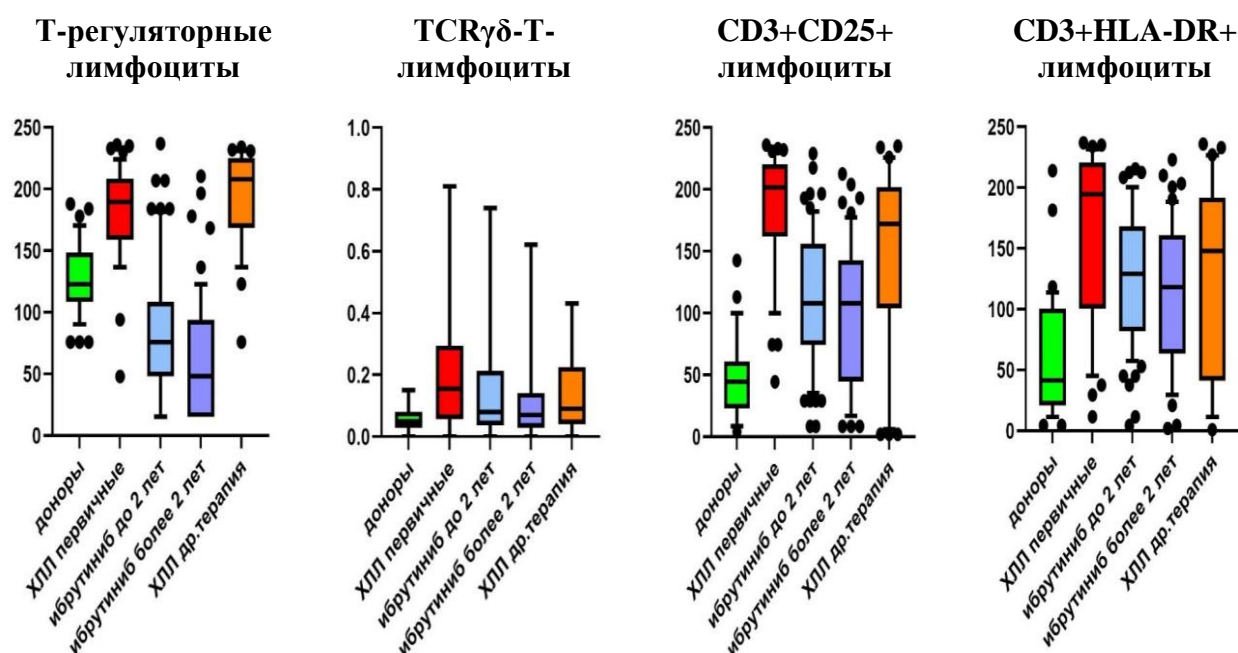


Рис.4-6. Соотношение Т-регуляторных клеток, $TCR\gamma\delta$ -клеток, активированных Т-лимфоцитов ($CD25+$ и $HLA-DR+$) у пациентов с ХЛЛ и доноров. Данные представлены для 1,3 и 4 графиков в виде медианы и размаха 10% и 90% перцентилей, для 2 - в виде среднего значения, стандартного отклонения, min и max значений

Таким образом, иммунофенотипическое исследование субпопуляционного состава лимфоцитов показало, что при ХЛЛ имеют место

существенные нарушения количественного состава НК-клеток, Т-лимфоцитов и их субпопуляций в дебюте заболевания и на фоне проводимой терапии. У первичных пациентов с ХЛЛ отмечается увеличение Т-лимфоцитов, Т-хелперов, цитотоксических Т-лимфоцитов и натуральных киллеров. При ХЛЛ 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 изменялся у первичных больных ХЛЛ за счет повышения как 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 TCR $\gamma\delta$ -Т-лимфоцитов.

Количество активированных Т-лимфоцитов, имеющих маркеры ранней и поздней активации, а также цитотоксических Т-лимфоцитов увеличивалось у нелеченых пациентов и пациентов на иммунотерапии 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.

4.2. Оценка субпопуляционного состава Т-лимфоцитов и НК-клеток в группах пациентов в зависимости от наличия или отсутствия del17p

Среди всех групп пациентов с ХЛЛ цитогенетическое исследование на наличие делеции del17p выполнено было только у 103 пациентов, при этом

данная цитогенетическая поломка выявлена у 45 человек (43,7%). Оценка нормальности распределения субпопуляций Т-лимфоцитов и НК-клеток в группах пациентов с делецией del17p и без таковой показало наличие нормального распределения данных только для Т-регуляторных клеток, TCR $\gamma\delta$ -клеток, ЦТП CD8+ и CD16+, в остальных группах распределение носило логонормальный характер.

Полученные данные представлены в таблице 4-3, 4-4, 4-5, 4-6 и на рис. 4-7 и 4-8.

Таблица 4-3. Сравнение субпопуляционного состава Т-лимфоцитов, Т-НК клеток, НК-клеток и их субпопуляций в исследуемых группах пациентов ХЛЛ

	Т-лимфоциты (CD3+)	Т-НК-клетки (CD3+CD16,56+)	НК-клетки (CD3-CD16,56+)	НК-клетки цитолитические (CD3-CD16+CD56-)	НК-клетки цитокинпродуцирующие (CD3-CD56+CD16-)
Группа 1 (с del17p) (n=45) Me (P10 – P90)	1,76 (0,91-3,11)	0,33 (0,09-1,53)	0,25 (0,07-0,48)	0,17 (0,034-0,41)	0,18 (0,044-0,42)
Группа 2 (без del17p) (n=58) Me (P10 – P90)	1,73 (0,67-3,79)	0,55 (0,09-1,31)	0,19 (0,06-0,92)	0,14 (0,034-0,87)	0,18 (0,04-0,66)
p	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

Таблица 4-4. Сравнение субпопуляционного состава Т-лимфоцитов и иммунорегуляторного индекса в исследуемых группах пациентов ХЛЛ

	Т-хелперы/индукторы (CD3+CD4+)	Т-хелперы naive (CD3+CD4+CD45RA+)	Т-хелперы памяти (CD3+CD4+CD45RO+)	цитотоксические Т-лимфоциты (CD3+CD8+)	ИРИ (CD3+CD4+/CD3+CD8+)
Группа 1 (с del17p) (n=45) Me (P10 – P90)	0,81 (0,35-1,89)	1,05 (90,41-1,74)	0,59 (0,30-1,27)	1,05 (0,41-1,74)	0,88 (0,42-1,61)
Группа 2 (без del17p) (n=58) Me (P10 – P90)	0,66 (0,32-2,01)	1,02 (0,30-2,47)	0,55 (0,22-1,28)	1,02 (0,30-2,47)	0,73 (0,36-1,68)
p	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

Таблица 4-5. Сравнение ЦТП НК-клеток, Т-регуляторных и TCR $\gamma\delta$ -клеток в исследуемых группах пациентов ХЛЛ

	ЦТП CD8+клеток	ЦТП CD16+клеток	Т- регуляторные (CD4+CD25+ CD127 ^{dim-to-neg})	CD3+TCR $\gamma\delta$ +
Группа 1 (с del17p) (n=45) Mean (SD)	0,0372 (0,389)	0,0372 (0,0389)	0,0326 (0,0398)	0,117 (0,13)
Группа 2 (без del17p) (n=58) Mean (SD)	0,0659 (0,105)	0,0659 (0,105)	0,02259 (0,0335)	0,118 (0,149)
p	N/A	N/A	N/A	N/A

Таблица 4-6. Сравнение субпопуляционного состава активированных Т-лимфоцитов в исследуемых группах пациентов ХЛЛ

	Активированные Т-лимфоциты (CD3+CD25+)	Активированные Т-лимфоциты (CD3+HLA-DR+)
Группа 1 (с del17p) (n=45) Me (P10 – P90)	0,14 (0,04-0,33)	0,21 (0,09-0,61)
Группа 2 (без del17p) (n=58) Me (P10 – P90)	0,1 (0,03-0,296)	0,2 (0,06-0,35)
p	N/A	N/A

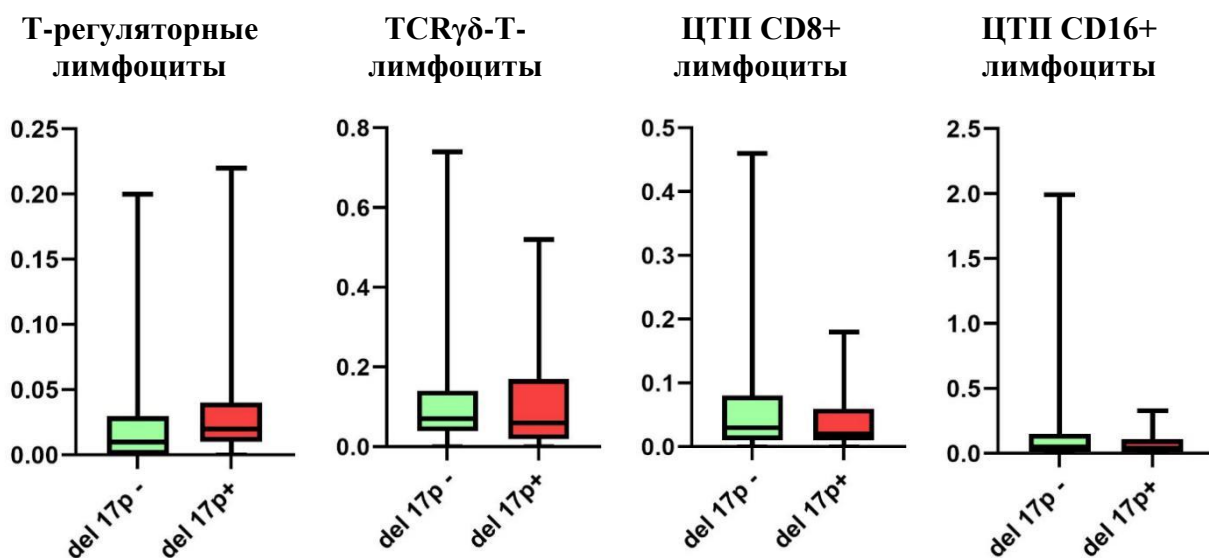


Рис.4-7. Соотношение Т-регуляторных лимфоцитов, TCR $\gamma\delta$ - лимфоцитов, ЦТП CD8+ и CD16+ лимфоцитов у пациентов с ХЛЛ. Данные представлены в виде среднего значения, стандартного отклонения, min и max значений

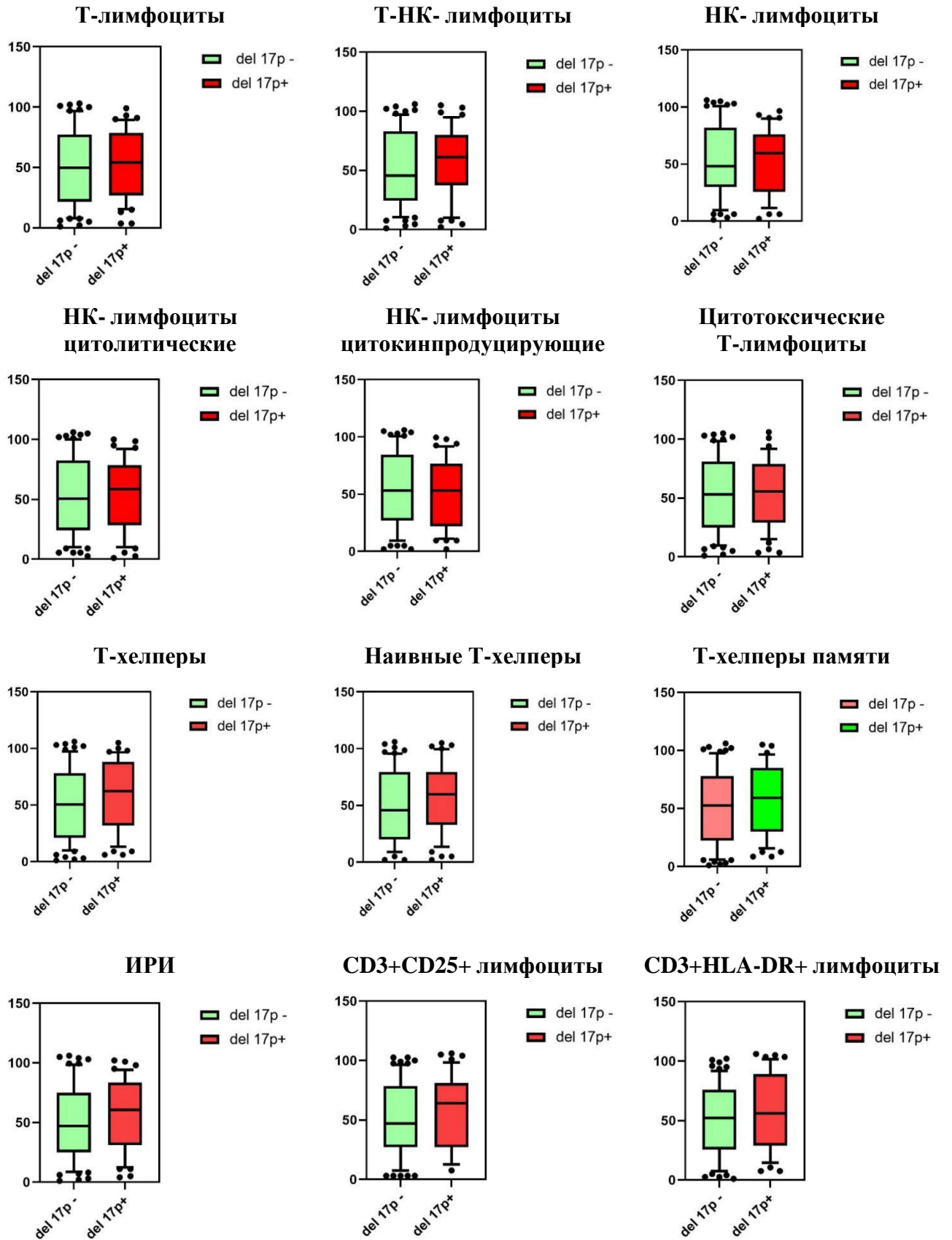


Рис.4-8. Соотношение Т-лимфоцитов, НК-клеток и их субпопуляций в исследуемых группах пациентов ХЛЛ. Данные представлены в виде медианы и размаха 10% и 90% процентиля

Согласно полученным данным статистически достоверных отличий в субпопуляционном составе Т-лимфоцитов и НК-клеток у пациентов с ХЛЛ с делецией del17p (Группа 1) и группой пациентов с отсутствием del17p (Группа 2) не выявлено.

Таким образом, 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.

4.3. Оценка субпопуляционного состава моноцитов крови при ХЛЛ

Оценка субпопуляционного состава моноцитов периферической крови проводилась в тех же образцах пациентов ХЛЛ и доноров, что и оценка субпопуляций лимфоцитов. При этом анализировались как процентное соотношение субпопуляций моноцитов, так и их абсолютные значения.

Анализ нормальности распределения субпопуляций моноцитов в группах пациентов ХЛЛ и доноров показал наличие нормального распределения данных только для относительного числа классических моноцитов (МО1%). Относительное число промежуточных и неклассических моноцитов (МО2% и МО3%), а также абсолютное количество МО1, МО2 и МО3 носило логонормальный характер. В связи с этим, анализ субпопуляций МО1% проводился с использованием параметрических, а МО2%, МО3%, МО1#, МО2# и МО3# – с применением непараметрических статистических методов. Результаты исследований приведены на рис.4-9, 4-10, 4-11 и в таблице 4-7.

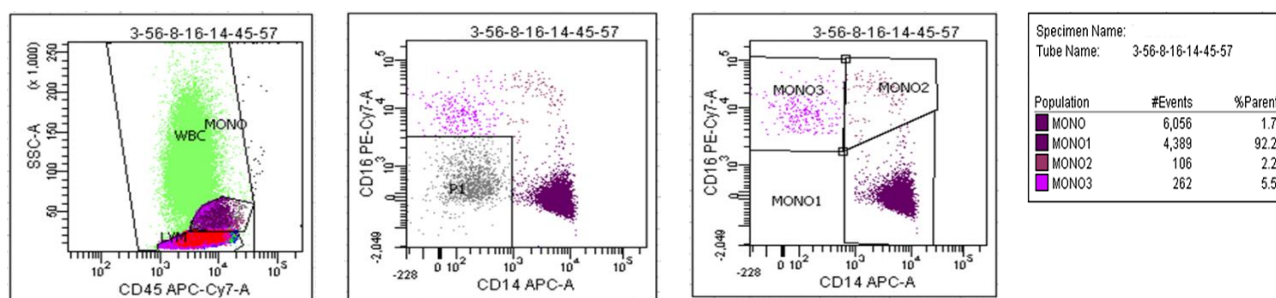


Рис.4-9. Пример субпопуляционного состава моноцитов периферической крови пациента с первичным нелеченым ХЛЛ

Таблица 4-7. Сравнение субпопуляционного состава моноцитов по относительным значениям (%) в исследуемых группах пациентов ХЛЛ и доноров

Субпопуляции моноцитов	Абсолютное число клеток (*10 ⁹ /л)					p
	ХЛЛ (I группа) (n=50) Me (P ₁₀ – P ₉₀)	ХЛЛ (IIa группа) (n=59) Me (P ₁₀ – P ₉₀)	ХЛЛ (IIb группа) (n=57) Me (P ₁₀ – P ₉₀)	ХЛЛ (III группа) (n=30) Me (P ₁₀ – P ₉₀)	Доноры (n=30) Me (P ₁₀ – P ₉₀)	
классические (MO1) (CD14+CD16-) % Mean (SD)	88,31 (8,27)	86,49 (11,57)	87,87 (8,73)	79,38 (13,10)	90,08 (6,69)	III/D - 0,0003 III/I - 0,0019 III/IIa - 0,017 III/IIb - 0,0025
классические (MO1) (CD14+CD16-) # (10 ⁹ /л) Me (P ₁₀ – P ₉₀)	0,37 (0,08-1,19)	0,43 (0,19-0,83)	0,45 (0,16-0,65)	0,31 (0,03-1,78)	0,43 (0,25-0,68)	NS
промежуточные (MO2) (CD14+CD16+) % Me (P ₁₀ – P ₉₀)	5,5 (1,44-16,36)	5,9 (1,58-12,44)	6,2 (2,0-14,9)	5,75 (1,55-14,11)	2,9 (1,04-6,5)	I/D - 0,0234 IIa/D - 0,0051 IIb/D - 0,0061 III/D - 0,0332
промежуточные (MO2) (CD14+CD16+) # (10 ⁹ /л) Me (P ₁₀ – P ₉₀)	0,018 (0,004-0,06)	0,026 (0,004-0,099)	0,025 (0,007-0,081)	0,024 (0,001-0,09)	0,016 (0,003-0,033)	NS
Провоспалительные (MO3) (CD14-CD16+) % Me (P ₁₀ – P ₉₀)	3,4 (0,26-14,94)	3,9 (0,5-12,55)	4,4 (0,68-12,48)	10,8 (3,96-31,8)	4,35 (1,03-11,59)	III/D - 0,0026 III/I < 0,0001 III/IIa - 0,0002 III/IIb - 0,0001
Провоспалительные (MO3) (CD14-CD16+) # (10 ⁹ /л) Me (P ₁₀ – P ₉₀)	0,013 (0,001-0,09)	0,014 (0,003-0,118)	0,014 (0,003-0,084)	0,03 (0,0001-0,2)	0,023 (0,006-0,049)	NS

Примечание. Данные для MO1 представлены в виде: Mean-среднее значение, SD- стандартное отклонение, n- объем выборки. p - уровень значимости отличий: «III/D», «III/I», «III/IIa», «III/IIb» - между показателями пациентов III-й группы и донорами, пациентами IIa- группы и IIb- группы соответственно. Данные для MO2 и MO3 представлены в виде: Me-медиана, P₁₀ – 10% процентиль, P₉₀- 90% процентиль, n - объем выборки ; p - уровень значимости отличий: «I/D», «IIa/D», «IIb/D», «III/D» - между показателями доноров и пациентов I-й группы, IIa- группы, IIb- группы и III-й группы соответственно,

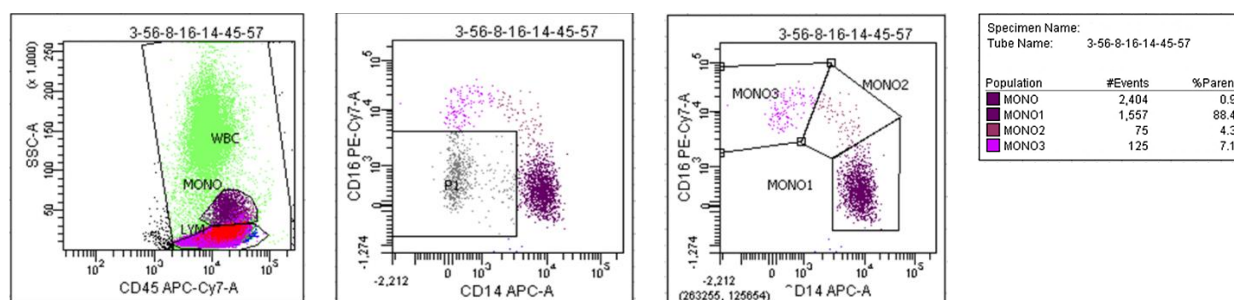


Рис.4-10. Пример субпопуляционного состава моноцитов периферической крови пациента ХЛЛ на терапии ибрутинибом

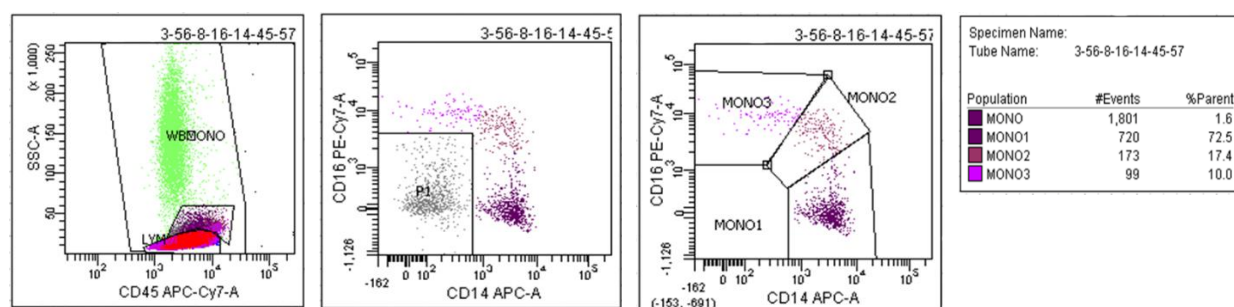
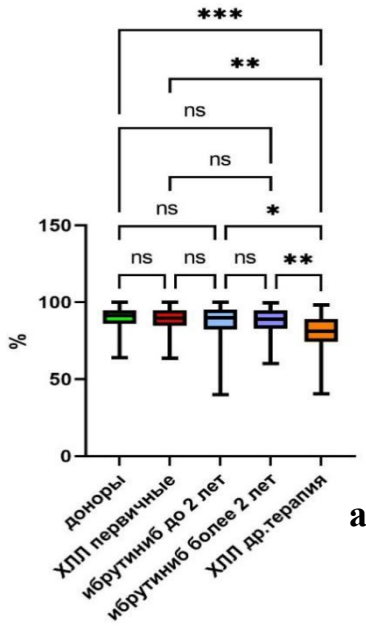


Рис.4-11. Пример субпопуляционного состава моноцитов периферической крови пациента ХЛЛ на фоне терапии, не содержащей ибрутиниба

Проведенное исследование субпопуляционного состава моноцитов крови показало, что основная субпопуляция моноцитов периферической крови при ХЛЛ представлена классическими моноцитами. У пациентов с ХЛЛ на терапии, не содержащей ибрутиниба, наблюдалось достоверное снижение относительного числа классических (МО1) моноцитов по отношению к другим исследуемым группам ($p=0,0003$, $p=0,0019$, $p=0,017$ и $p=0,0025$ соответственно) (Рис.4-12а). Также отмечалось достоверное увеличение относительного числа субпопуляций промежуточных (МО2%) моноцитов во всех группах пациентов ХЛЛ по отношению к группе доноров ($p=0,0234$, $p=0,0051$, $p=0,0061$ и $p=0,0332$ соответственно) (Рис.4-13а). Анализ относительного числа субпопуляции неклассических (МО3) моноцитов выявил достоверное ее увеличение данной популяции у пациентов, находящихся на терапии, не содержащей ибрутиниба по отношению к донорам и другим группам пациентов ХЛЛ ($p=0,0026$, $p<0,0001$, $p=0,0002$ и $p=0,0001$ соответственно) (Рис.4-14а).

Классические моноциты (MO1%)



Классические моноциты (MO1#)

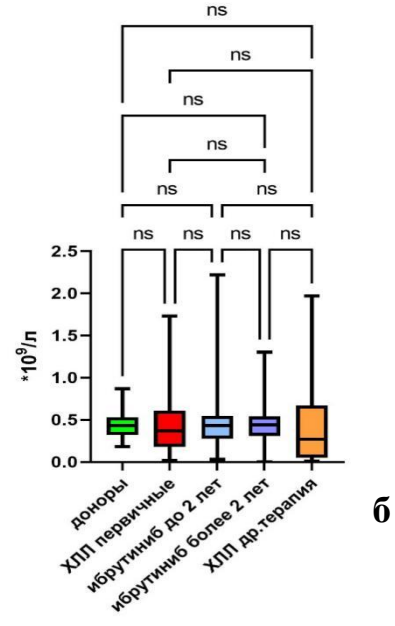
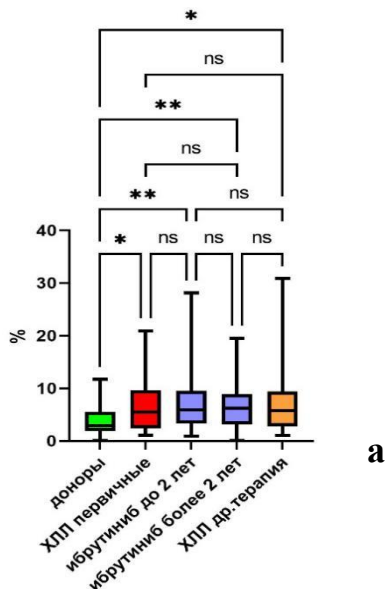


Рис.4-12. Соотношение субпопуляций M1 моноцитов в относительных (а) и абсолютных (б) значениях у пациентов с ХЛЛ и доноров. Данные представлены для 1 графика в виде среднего значения, стандартного отклонения, *tip* и *тах* значений; для 2 - в виде медианы и размаха 10% и 90% процентиля

Промежуточные моноциты (MO2%)



Промежуточные моноциты (MO2#)

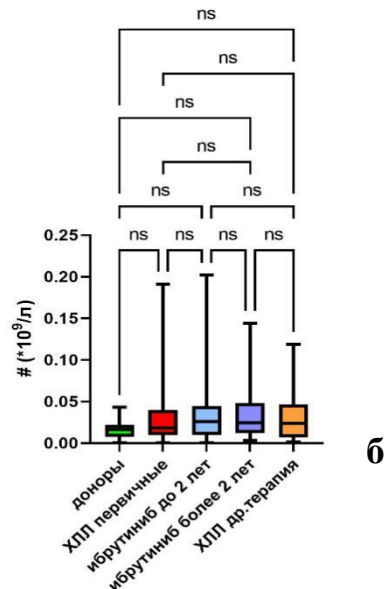
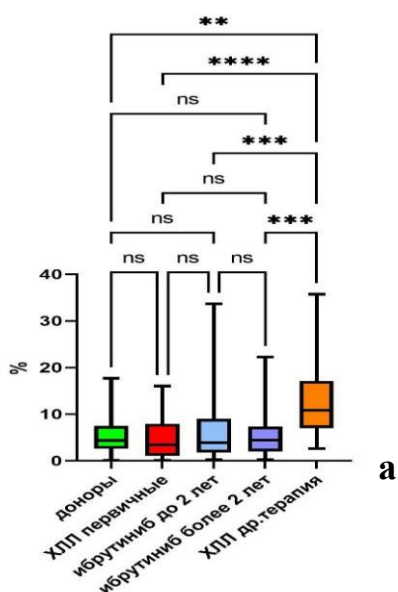


Рис.4-13. Соотношение субпопуляций MO2 моноцитов в относительных (а) и абсолютных (б) значениях у пациентов с ХЛЛ и доноров. Данные представлены для 1 графика в виде среднего значения, стандартного отклонения, *tip* и *тах* значений; для 2 - в виде медианы и 10% и 90% процентиля

Неклассические моноциты (МО3%)



Неклассические моноциты (МО3#)

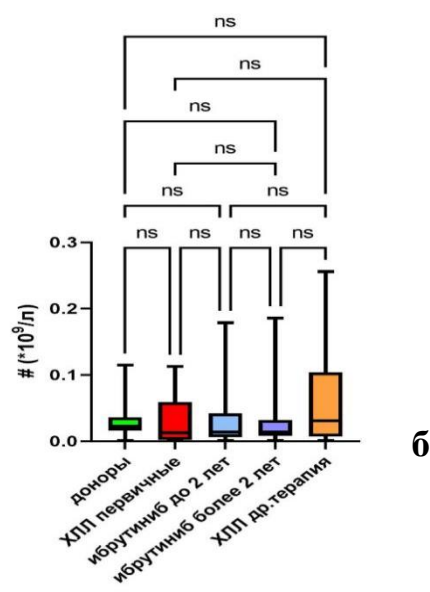


Рис.4-14. Соотношение субпопуляций МО3 моноцитов в относительных (а) и абсолютных значениях (б) у пациентов с ХЛЛ и доноров. Данные представлены в виде медианы и размаха 10% и 90% процентиля

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.4-12б, 4-13б, 4-14б).

Таким образом, 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. Однако, анализ абсолютных значений исследуемых субпопуляций не выявил достоверных различий.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Хронический лимфолейкоз, относящийся к гетерогенной группе В-клеточных лимфопролиферативных заболеваний, является одним из распространенных лейкозов и характеризуется крайне разнообразным клиническим течением и прогнозом. Несмотря на известный иммунологический фенотип опухолевых В-лимфоцитов, нередко встречаются случаи ХЛЛ, которые не соответствуют его классической характеристике, например, «атипичный вариант» ХЛЛ, что затрудняет интерпретацию полученных результатов. Некоторые В-ЛПЗ, такие как лимфома из клеток мантии, лимфома маргинальной зоны, лимфоплазмочитарная лимфома и др. могут иметь сходную морфологическую и иммунофенотипическую характеристики. В связи с этим, актуальность исследования заключалась в поиске информативных дополнительных маркеров в дифференциально-диагностической панели иммунофенотипирования В-клеточных ЛПЗ с целью точной диагностики ХЛЛ.

Совершенствование терапии ХЛЛ, возможности которой расширились, благодаря использованию новых таргетных препаратов (ритуксимаб, обинутузумаб, венетоклакс, ибрутиниб и др.), привело к достижению молекулярного ответа и длительной ремиссии заболевания даже у пациентов с неблагоприятными прогностическими факторами, такими как делеция (del(17p), немутированный вариант IGHV-генов и мутация в гене TP53. Однако воздействие этих препаратов на опухолевую клетку изменяет экспрессию многих мембранных молекул. Так, воздействие ритуксимаба и обинутузумаба (анти-CD20 моноклональных антител I и II типа) приводит к исчезновению CD20 на поверхности В-лимфоцитов за счет интернализации или других механизмов его потери. Ибрутиниб снижает экспрессию CD200, CD20, CD22, CD23, поэтому поиск новых маркеров, сохраняющихся в условиях современной терапии, является также актуальным. Одними из таких маркеров в работе рассматривались CD180 и ROR-1, являющихся важными

мембранными молекулами В-лимфоцитов, играющих существенную роль в пролиферации, активации и выживаемости опухолевых клеток.

Проведенное исследование показало, что экспрессия CD180 на клетках ХЛЛ непостоянна и встречалась у 76% пациентов в дебюте заболевания и у 65% пациентов на различных схемах лечения. В группе доноров и больных с реактивным лимфоцитозом все В-лимфоциты экспрессировали CD180 в отличие от ХЛЛ, где в среднем процент CD180- позитивных В-лимфоцитов составил 71,2% в дебюте заболевания и 55,2% в процессе лечения. Результаты нашего исследования согласуются с данными литературы [56,69]. Ряд авторов указывают на возможность использования коэкспрессии CD180 и CD150 в качестве благоприятного прогностического маркера течения ХЛЛ, объясняя это взаимным ингибированием сигнальных путей Akt и MAPK [168].

Однако, нестабильность экспрессии CD180 на клетках ХЛЛ не позволяет рекомендовать использование данного маркера в дифференциально-диагностической панели В-ЛПЗ, а также в оценке кинетики элиминации остаточной опухолевой популяции. Основное требование, предъявляемое к маркерам, используемым для оценки МОБ, является стабильность их экспрессии, как в дебюте заболевания, так и на фоне проводимой терапии.

Наши исследования показали, что ROR-1 ограниченно экспрессируется в нормальных тканях и практически не экспрессируется на нормальных В-лимфоцитах, что в свою очередь, согласуется с литературными данными [81,22]. ROR-1 aberrантно экспрессируется на клетках различных опухолевых заболеваний, включая хронический лимфолейкоз/лимфоцитарную лимфому, мантийноклеточную лимфому, лимфому маргинальной зоны, диффузную В-крупноклеточную лимфому, фолликулярную лимфому [149]. Экспрессия белка ROR-1 на опухолевых В-лимфоцитах при ХЛЛ была подтверждена другими исследованиями [84, 143, 151, 155]. Несмотря на то, что экспрессия ROR-1 не является специфическим маркером клеток ХЛЛ, и обнаруживается при других В-клеточных неходжкинских лимфомах, интерес к данному маркеру

сохраняется, так как ROR-1 экспрессируется только на опухолевых В-лимфоцитах и может служить мишенью для таргетной терапии.

Исследование показало, что экспрессия данного маркера на клетках ХЛЛ выявляется как в начале заболевания, так и сохраняется на протяжении терапии, независимо от выбранных схем лечения.

Таким образом, отсутствие экспрессии ROR-1 у доноров и пациентов с реактивным лимфоцитозом позволяет использовать его в дифференциально-диагностической панели В-ЛПЗ, включая ХЛЛ, а стабильность его экспрессии на опухолевых клетках в ходе терапии - для оценки МОБ.

В последние годы в связи с внедрением в практику многоцветной многопараметрической проточной цитометрии (МПЦ) стало возможно мониторировать кинетику элиминации опухолевого клона в костном мозге, периферической крови и других биологических жидкостях, что имеет значение в оценке эффективности терапии. Определение МОБ является ключевым показателем оценки глубины ответа на терапию при ХЛЛ, а МОБ-негативный статус при ХЛЛ - показателем благоприятного прогноза [86,71]. В связи с этим оптимизация протоколов оценки МОБ в условиях таргетной терапии ХЛЛ является актуальной [28, 24].

В настоящее время для оценки МОБ при ХЛЛ используются разные подходы – иммунофенотипический с использованием МПЦ и молекулярный (количественная аллель – специфичная полимеразная цепная реакция (ПЦР) в реальном времени (RQPCR) и высокопроизводительное секвенирование (NGS). Наиболее широко в мировой практике используется многоцветная проточная цитометрия. Разработанный в 2007 г. стандартизованный международный протокол для определения МОБ методом 4-цветной МПЦ с течением времени был оптимизирован для 6-8-10-цветного МПЦ анализа [105, 102]. Совершенствование МПЦ, так называемой проточной цитометрии нового поколения (NGS-Flow), позволило приблизиться по чувствительности к высокопроизводительному секвенированию нового поколения (NGS). Несмотря на оптимизацию метода МПЦ ключевые маркеры, предложенные

European Research Initiative in CLL (ERIC), остаются неизменными (λ , κ , CD5, CD3, CD81, CD79b, CD22, CD19, CD43, CD20, CD45).

Одним из важнейших критериев принадлежности В-лимфоцитов к опухолевым клеткам является определение их клональности по рестрикции легких цепей иммуноглобулинов. Методика их определения довольно трудоемка и требует определённых навыков выполнения. Использование маркера ROR-1 с его избирательной экспрессией на опухолевых В-лимфоцитах позволяет считать его альтернативой определению клональности В-лимфоцитов. В связи с этим стандартизированный набор DuraClone RE CLB (BC) с готовыми лиофилизированными антителами для 8-цветного анализа (CD20, ROR-1, CD45, CD81, CD79b, CD19, CD5, CD43) позволяет не только стандартизировать пробоподготовку и избежать преаналитических ошибок, сократить время иммунофенотипического исследования и число МКА (с 14 до 8), но и исключить этап определения легких цепей иммуноглобулинов.

Проведенное нами сравнительное определение остаточного опухолевого клона ХЛЛ стандартизированным методом и с помощью набора DuraClone RE CLB Tube показало высокую корреляцию результатов ($r=0,9986$), что позволило рекомендовать использовать данный набор для оценки МОБ.

Таким образом, стабильность экспрессии ROR-1 на опухолевых В-лимфоцитах при использовании различных схем иммунохимиотерапии позволяет использовать данный маркер в оценке МОБ при ХЛЛ.

Особенностью ХЛЛ является вовлечение в опухолевый процесс клеток иммунной системы, что влечет за собой нарушение их функциональных свойств, развитие вторичного иммунодефицита и, как следствие, появление различных инфекционных осложнений, которые нередко становятся непосредственной причиной смерти пациентов. В связи с этим оценка субпопуляционного состава лимфоцитов и моноцитов при ХЛЛ у нелеченых и леченых больных является важной задачей, позволяющей оценить

состояние клеточного и неспецифического звена иммунитета и качество его восстановления после терапии.

Известно, что восприимчивость к инфекциям развивается уже на предстадии ХЛЛ – моноклональном В-клеточном лимфоцитозе. Степень подавления иммунитета у нелеченых пациентов ХЛЛ повышается со временем после установления диагноза и связана с прогрессированием заболевания. Ключевым фактором в усугублении иммунодефицита является воздействие ХЛЛ на микроокружение в органах и тканях иммунной системы, обеспечивающих защиту от инфекций [127]. Вследствие этого у пациентов ХЛЛ определяются различные комплексные дефекты всех звеньев иммунной системы (фагоцитоз, активность комплемента, клеточный и гуморальный иммунитет, дисфункция моноцитов и нейтрофилов).

При ХЛЛ отмечается увеличение абсолютного числа Т-лимфоцитов, среди которых регистрируются изменения как в субпопуляционном составе, так и функциональной активности. Роль Т-лимфоцитов в патогенезе ХЛЛ остается до конца не изученной. С одной стороны, Т-клетки способны продуцировать сигналы, способствующие пролиферации и выживаемости опухолевых В-лимфоцитов, с другой стороны они имеют признаки активации и «истощения», включая сверхэкспрессию ингибирующих молекул, подобных PD-1, CTLA-4 [3]. Из-за функциональных дефектов, таких как утрата костимуляторных молекул, аномальный профиль экспрессии цитокинов, нарушение формирования иммунологического синапса способность Т-лимфоцитов препятствовать экспансии опухолевого клона снижена.

Согласно полученным нами результатам, у нелеченых пациентов с ХЛЛ в периферической крови отмечается абсолютное увеличение Т-лимфоцитов, Т-хелперов (CD4+), цитотоксических Т-лимфоцитов (CD8+) и натуральных киллеров (НК) (рис.5-1), что может быть вызвано разными факторами, в том числе и реакцией на аутоантитела, продуцируемых патологическим клоном ХЛЛ [16, 18, 75, 173]. При ХЛЛ 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 вне зависимости от активации Т-клеток антигенами. Показано, что при ХЛЛ происходит увеличение всех субпопуляций Т-хелперов - Th1, Th2, Tfh, Treg. Повышение числа Th2 коррелирует с прогрессированием ХЛЛ, что предположительно свидетельствует о их значении в поддержании пролиферации опухолевых клеток [75,161]. Изменение фенотипической дифференцировки Т-лимфоцитов обусловлено прямым влиянием на них опухолевых клеток, также, как и изменения в экспрессии генов, которые индуцируются при культивировании нормальных Т-лимфоцитов с клетками ХЛЛ [75,173, 64,161,65].

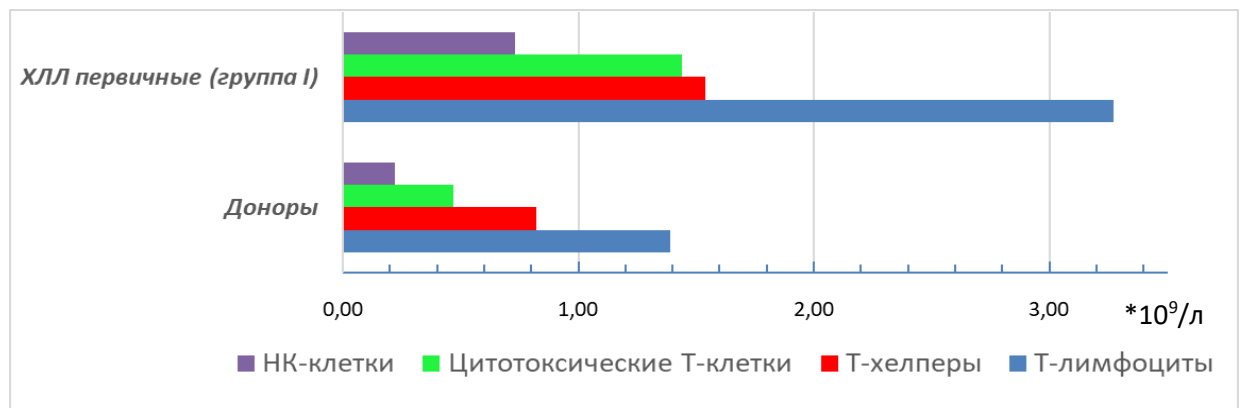


Рис.5-1. Изменение числа Т-лимфоцитов, Т-хелперов, цитотоксических Т-лимфоцитов и натуральных киллеров у нелеченых пациентов с ХЛЛ по сравнению с донорами.

Результаты нашего исследования показали, что субпопуляционный состав Т-хелперов изменялся у первичных больных ХЛЛ за счет повышения абсолютных значений, как 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 TCR $\gamma\delta$ -Т-лимфоцитов, способных мигрировать в лимфоузлы и играющих существенную роль в противоопухолевом ответе (рис.5-2)[65,180, 74,153,100,64,139]. Сходные изменения были получены другими авторами,

изучавшими регуляторные Т-клетки в крови и лимфатических узлах больных ХЛЛ, которые также отметили их увеличение, что коррелировало с опухолевой нагрузкой [65,180,74,142,100,64,139].

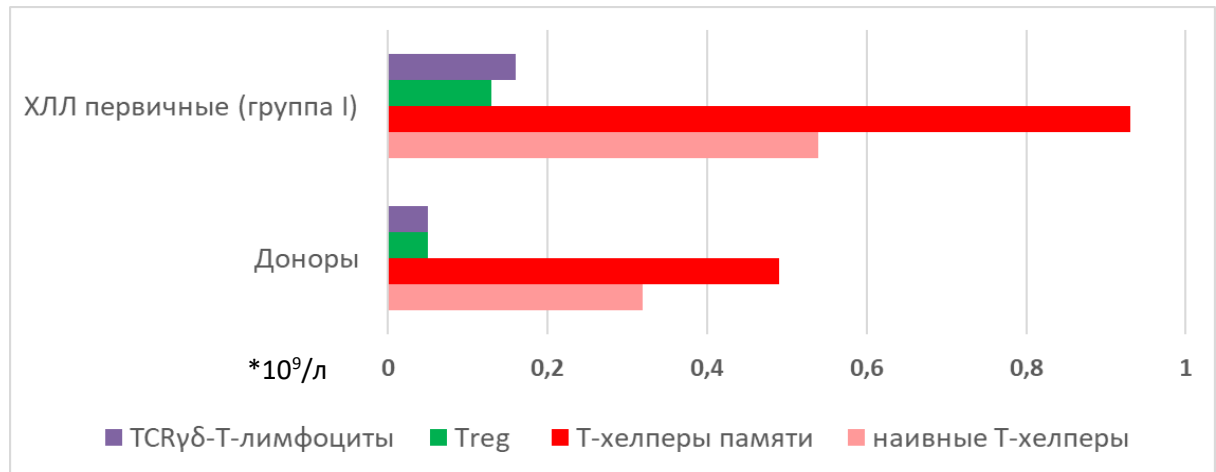


Рис.5-2. Изменение числа наивных Т-хелперов, Т-хелперов памяти, Т-регуляторных клеток и TCRγδ-Т-лимфоцитов у нелеченых пациентов с ХЛЛ по сравнению с донорами.

Абсолютное количество активированных Т-лимфоцитов, имеющих маркеры ранней и поздней активации, а также цитотоксических Т-лимфоцитов увеличивалось у нелеченых пациентов ХЛЛ, что приводило к снижению иммунорегуляторного индекса. Цитотоксический потенциал этих клеток был также повышен (Рис.5-3). Несмотря на повышение числа CD3+CD8+ клеток при ХЛЛ, многочисленными исследованиями показано, что эти клетки не способны формировать иммунологический синапс с целевыми клетками, характеризуются снижением пролиферативной и секреторной активности. Так, в работе Бадмажаповой Д.С. с соавт. показано, что CD3+CD8+ клетки при ХЛЛ имеют повышенную экспрессию ряда ингибирующих молекул на своей мембране, таких как PD-1, CD160, CD244 и др., которые вовлечены в нарушение формирования иммунологического синапса. Дисфункция Т-лимфоцитов, вызванная влиянием опухолевых клеток ХЛЛ, приводит к подавлению Т-клеточного иммунного ответа и неадекватному контролю за

опухолью, что обеспечивает их выживаемость и лекарственную устойчивость [3].

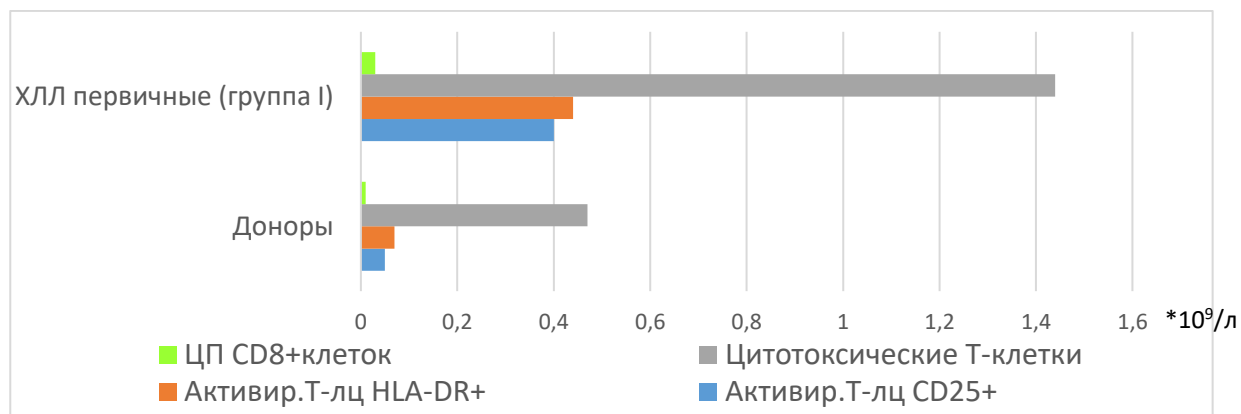


Рис.5-3. Изменение числа активированных Т-лимфоцитов (ранней и поздней активации), цитотоксических Т-лимфоцитов и цитотоксического потенциала CD8+ клеток у нелеченых пациентов с ХЛЛ по сравнению с донорами.

Оценка НК-клеточного звена неспецифического иммунитета при ХЛЛ показала, что у всех исследованных пациентов отмечалось повышение абсолютного числа НК-клеток. Эта популяция лимфоцитов выполняет важные функции в противоопухолевой и противовирусной защите. Данные по изучению НК-клеток при ХЛЛ немногочисленны. Известно, что их повышение коррелировало с хорошим прогнозом течения ХЛЛ, в то же время есть сведения, согласно которым клетки ХЛЛ способны избегать цитотоксического эффекта НК-клеток. Опухолевые В-лимфоциты могут также нарушать баланс между активирующими и ингибирующими сигнальными молекулами, продуцируемыми НК-клетками, что приводит к ускользанию и снижению противоопухолевого ответа. Однако, по сравнению с нарушенной функциональной активностью Т-лимфоцитов, цитотоксическая функция НК-клеток, как считают ряд авторов, не изменена [75]. При изучении субпопуляций НК-клеток нами было показано повышение как НК-клеток с цитолитической, так и цитокинпродуцирующей активностью, что свидетельствует о повышенной функциональной активности НК-клеток при

ХЛЛ (Рис.5-4). Полученные нами результаты могут свидетельствовать об активации иммунной системы в ответ на опухолевую экспансию клеток при ХЛЛ. Несмотря на это, эффективность активации иммунного ответа может быть нарушена в результате снижения экспрессии костимулирующих антигенов на опухолевых клетках (CD28, CD80/CD86). Имеются данные, что при ХЛЛ нарушение функции Т-клеток является следствием не только нарушения формирования иммунного синапса, но и приобретения клетками «истощенного» фенотипа [3].

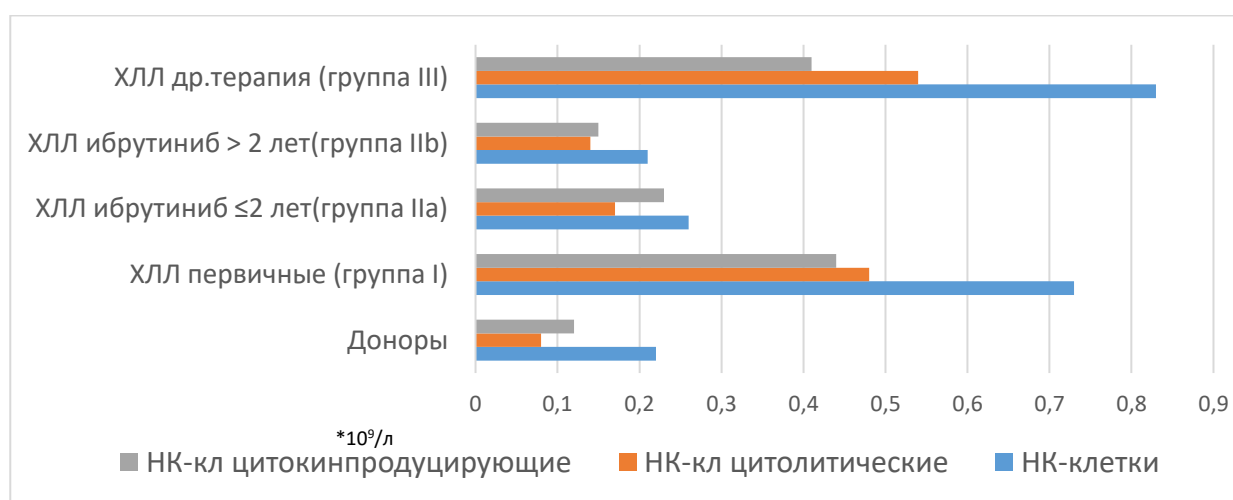


Рис.5-4. Изменение числа НК-клеток, НК-клеток с цитолитической и цитокинпродуцирующей активностью у нелеченых пациентов с ХЛЛ и пациентов ХЛЛ на различных схемах терапии по сравнению с донорами.

Использование препаратов в лечении ХЛЛ с разными механизмами действия могут усугублять вторичный иммунодефицит за счет подавления сигнальных путей, определяющих жизнеспособность В-лимфоцитов, деплеции В- и Т-лимфоцитов или восстанавливать качество иммунного ответа. Так, ибрутиниб (ингибитор тирозинкиназы Брутона) применяется преимущественно у пациентов с рефрактерным течением ХЛЛ, делецией 17p, а также со значительным числом предшествующих линий терапии. Известно, что ибрутиниб способен подавлять, индуцируемую ИЛ-2 тирозинкиназу в Т-лимфоцитах, которая имеет большое значение в развитии и функционировании Т-клеток [40]. В ряде работ показано позитивное влияние

ибрутиниба на Т-клеточные компартменты, в том числе снижение регуляторных Т-клеток и «псевдоистощенных» эффекторных Т-лимфоцитов, восстановление пролиферативной Т-клеточной активности, снижение ингибирующих молекул, таких как PD-1, CTLA-4, повышение активности популяции Th1. В результате терапии ибрутинибом восстанавливалось формирование иммунологического синапса, цитотоксичность Т-лимфоцитов по отношению к клеткам ХЛЛ *in vitro* [75]. Согласно данным I. G. Solman и соавт. [97] улучшение эффекторных функций Т-лимфоцитов при лечении ибрутинибом может приводить к снижению частоты инфекций при ХЛЛ и/или поддержке адаптивного иммунного ответа. Нами показано, что терапия ибрутинибом приводит не только к снижению числа В-лимфоцитов (Рис.5-5), но одновременно к значительным изменениям в субпопуляционном составе Т- и НК-клеток.

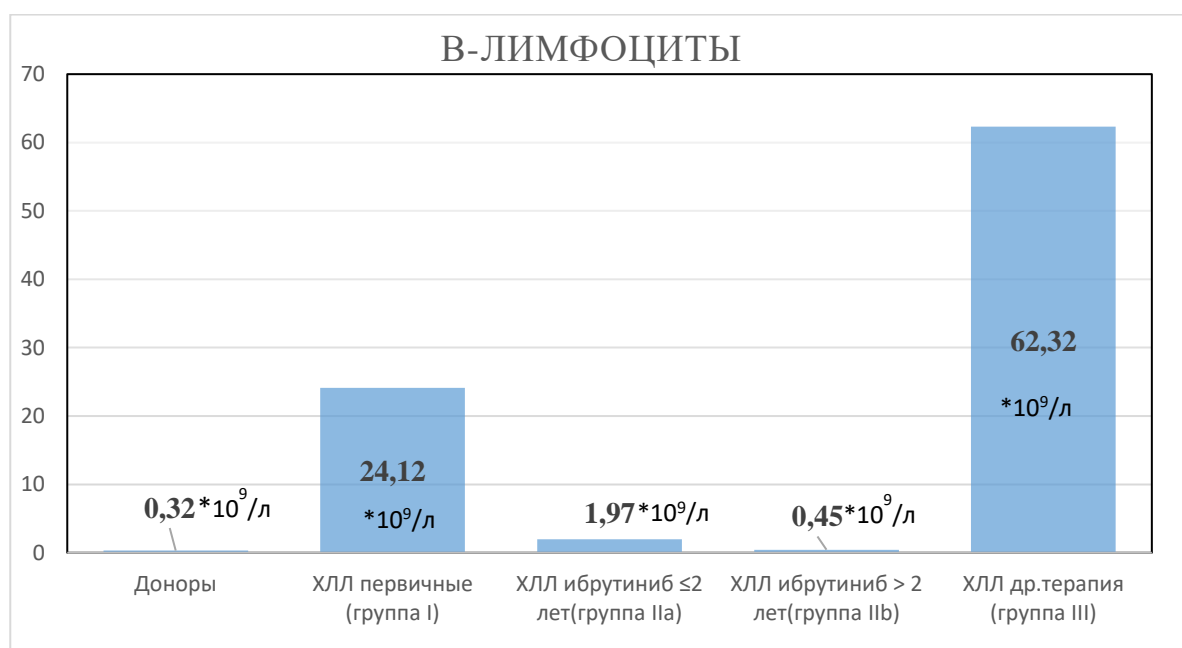


Рис.5-5. Изменение числа В-лимфоцитов у нелеченых пациентов с ХЛЛ и пациентов ХЛЛ на различных схемах терапии по сравнению с донорами.

Отмечалось достоверное снижение общего числа Т-лимфоцитов, абсолютного числа Т-хелперов, в особенности наивных Т-хелперов, которые снижались ниже нормальных значений. Абсолютное число цитотоксических

Т-лимфоцитов имело тенденцию к снижению, тем не менее, оставаясь выше, чем в контрольной группе. На фоне приема ибрутиниба наблюдалось снижение активации Т-лимфоцитов, резкое увеличение числа Т-НК клеток и значительное снижение ИРИ. Такие же изменения регистрировались и в популяции НК-клеток, абсолютное число которых, также, как и их субпопуляций, приближалось к показателям доноров. Анализ изменений со стороны регуляторных Т-клеток показал положительную динамику в сторону снижения их абсолютного числа, что свидетельствует о повышении противоопухолевого ответа при терапии ибрутинибом (Рис.5-6).

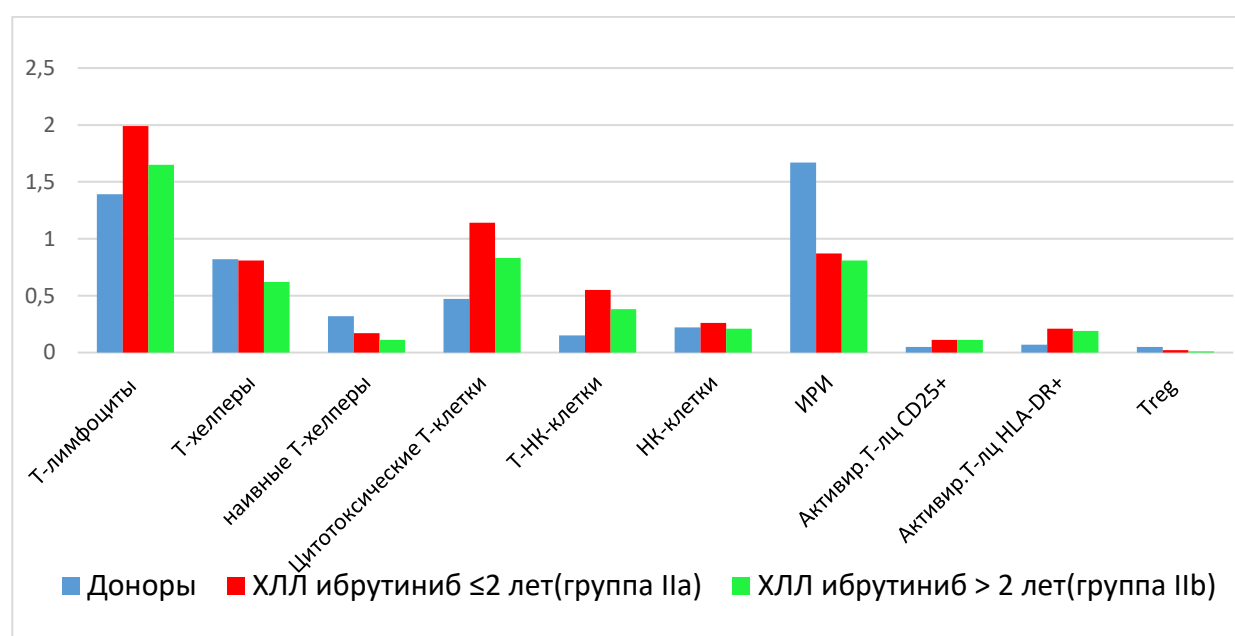


Рис.5-6. Изменение числа Т-лимфоцитов, НК-клеток, Т-НК-клеток, Т-хелперов, наивных Т-хелперов, ИРИ, Т-регуляторных клеток и активированных Т-лимфоцитов у пациентов с ХЛЛ терапии ибрутинибом по сравнению с донорами.

Эффективное лечение ибрутинибом устраняет имеющийся при ХЛЛ иммунологический дисбаланс, что подтверждается нормализацией показателей клеточного и неспецифического иммунитета, а, следовательно, снижением риска возникновения инфекционных осложнений. Так, по данным Никитина Е. А. с соавт. частота инфекций III-IV степени составила 26% у пациентов с рецидивами ХЛЛ, получавших ибрутиниб. В тоже время у

пациентов, находящихся на традиционной химиотерапии и иммунохимиотерапии частота тяжелых инфекций колебалась от 40 до 89% [12].

Тканевое микроокружение играет ключевую роль в патогенезе ХЛЛ, однако, сложная архитектура микроокружения циркулирующей крови у пациентов с данным заболеванием еще не полностью охарактеризована. В немногочисленных опубликованных работах, посвященных анализу субпопуляционного состава моноцитов периферической крови при ХЛЛ, традиционно анализировались относительные значения субпопуляций. В нашем исследовании было показано снижение процентного содержания классических моноцитов (МО1) у пациентов ХЛЛ, находящихся на терапии, не содержащей ибрутиниб (III группа), по сравнению с контролем и другими группами пациентов с ХЛЛ. Выявлено увеличение относительного числа промежуточных (МО2) моноцитов у всех пациентов ХЛЛ по отношению к донорам. Кроме того, у пациентов III группы отмечалось увеличение процентного содержания неклассических моноцитов (МО3) по отношению к донорам и другим группам пациентов ХЛЛ, что согласуется с литературными данными [68, 140]. Однако, анализ абсолютных значений субпопуляций моноцитов периферической крови не выявил достоверных различий среди всех анализируемых групп пациентов с ХЛЛ, как между собой, так и в сравнении с контрольной группой. Данный факт может быть обусловлен высокой межиндивидуальной гетерогенностью и различной степенью активации циркулирующих моноцитов.

Полученные результаты показали стабильность экспрессии ROR-1 на опухолевых В-лимфоцитах при ХЛЛ, что позволяет использовать его не только в качестве диагностического маркера, но и в оценке МОБ. Проведенное исследование демонстрирует выраженные изменения во всех звеньях иммунитета (клеточного, неспецифического, гуморального) и детализирует особенности изменения субпопуляционного состава Т-лимфоцитов, НК-клеток и моноцитов при ХЛЛ в дебюте 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 (BC), 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 TCR $\gamma\delta$ -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, TCR $\gamma\delta$ -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 (MO1) и увеличение неклассических моноцитов (MO3) 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 (MO2) 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 лимфоцитов, а также оценке МОБ может быть рекомендовано, как врачам клинической лабораторной диагностики, специалистам занимающимся проточной цитометрией, так и врачам-гематологам.

Персонализированный 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 ЛИТЕРАТУРЫ

1. Th17-фенотип ювенильного идиопатического артрита / И.З. Турцевич, Г.А. Новик, Н.В. Бычкова, Н.М. Калинина, Н.И. Давыдова // Педиатрическая фармакология. – 2015. - Т.12, №1. - С.30-37.
2. Акинфеева, О.В. Значение активности иммунорегуляторных Т-лимфоцитов и естественных киллерных клеток в противоопухолевом иммунном ответе у больных хроническим лимфолейкозом / О.В. Акинфеева // Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук: 14.01.21; 14.03.09. Санкт-Петербург. - 2011. - 23с.
3. Бадмажапова, Д.С. Роль иммунологического синапса в биологии хронического лимфолейкоза / Д.С. Бадмажапова, И.В. Гальцева, Е.Е. Звонков // Клиническая онкогематология. - 2018. – Т.11, №4. - С. 313–318.
4. Беляк, Т.Е. Венетоклакс в лечении хронического лимфолейкоза (обзор литературы) / Т.Е. Беляк // Онкогематология. - 2018. – Т.13, №2. - С. 32-38.
5. Вагапова, Д.Р. Значение комплексной оценки клеточных и гуморальных факторов защиты в диагностике хронического лимфолейкоза и подборе иммунокорректирующих средств / Д.Р. Вагапова // Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата медицинских наук: 14.01.21. Уфа. -1996. - 19 с.
6. Возрастная динамика экспрессии изоформ CD45 Т-хелперами и Т-цитотоксическими лимфоцитами крови здоровых доноров / А.П. Топтыгина, Е.Л. Семикина, Е.А. Копыльцова, В.А. Алешкин // Иммунология. - 2014. - № 4. - С. 229-232.
7. Железникова, Г.Ф. Регуляторные Т-клетки в иммунном ответе на инфекцию / Г.Ф. Железникова // Журнал инфектологии. - 2011. – Т.3, №1. - С. 6-13.

8. Злокачественные новообразования в России в 2017 году (заболеваемость и смертность). Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России. - 2018. - 250 с.
9. Значение минимальной остаточной болезни при хроническом лимфолейкозе в эру таргетных лекарственных препаратов / А.Ю. Кувшинов, С.В. Волошин, И.С. Мартынкевич, Е.В. Клеина, А.В. Чечеткин //Гематология и трансфузиология. - 2016. - Т.61, №4. - С.190-196.
10. Зотина, Е.Н. Нарушение естественных киллерных клеток при хроническом лимфолейкозе / Е.Н. Зотина, Т.П. Загоскина, О.В. Малых, И.В. Гришина // Фундаментальные исследования. - 2012. - №4. - С. 57-62.
11. Зотина, Е.Н. Инфекционные осложнения у больных хроническим лимфолейкозом на фоне лечения алемтузумабом / Е.Н. Зотина, О.В. Малых, Т.П. Загоскина //Фундаментальные исследования. - 2011. - №9. - С.404 -407.
12. Ибрутиниб в лечении рефрактерного хронического лимфолейкоза / Е.А. Никитин, Е.А. Дмитриева, М.А. Пантелеев, Е.И. Емелина, В.Л. Иванова, Ю.Б. Кочкарева, Е.Г. Аршанская, И.Е. Лазарев, Е.Е. Маркова, Л.А. Муха, Н.Г. Новицкая, М.М. Панкрашкина, В.В. Глазунова, А.В. Шубина, С.А. Черныш, Н.К. Хуажева, Е.В. Наумова, С.А. Луговская, М.Е. Почтарь, Т.Н. Обухова, О.Ю. Виноградова, Г.Е. Гендлин, В.В. Птушкин //Клиническая онкогематология. - 2017. - Т.10, №3. - С.271–281.
13. Изменение уровня субпопуляций Т-регуляторных клеток и Т-хелперов 17 в периферической крови здоровых людей в зависимости от возраста / А.П. Топтыгина, Е.Л. Семикина, С.В. Петричук, Р.Ш.

- Закиров, О.В. Курбатова, Е.А. Копыльцова, Ю.А. Комах // Медицинская иммунология. - 2017. - Т 19, №4. - С. 409-420
14. Иммунный и цитокиновый статус у больных хроническим лимфолейкозом, получающих терапию алектузумабом / М.Н. Хоробрых, Т.П. Загоскина, В.И. Шардаков, Е.Л. Назарова, А.В. Йовдий // Медицинская иммунология. – 2010. - Т. 12, №4-5. - С 447-452.
 15. Иммунофенотипическая характеристика лимфоцитов периферической крови при оценке эффективности лечения больных хроническим лимфолейкозом по программе R-FC / Ю.Ю. Чуксина, С.В. Шевелев, Е.В. Катаева, А.К. Голенков // Российский иммунологический журнал, Тематический выпуск «Российский научный форум на Урале». -2014. - С.633-635. Режим доступа: <https://naukarus.com/immunofenotipicheskaya-harakteristika-limfotsitov-perifericheskoy-krovi-pri-otsenke-effektivnosti-lecheniya-bolnyh-hronic>
 16. Исаева, Н.В. Распределение некоторых функциональных молекул на Т-лимфоцитах и естественных киллерных клетках при хроническом лимфолейкозе / Н.В. Исаева, Е.Н. Зотина // Цитология. – 2019. – Т.61, №2. - С. 119-129.
 17. Исаева, Н.В. Характеристики иммунокомпетентных клеток у больных хроническим лимфолейкозом на этапе диагностики / Н.В. Исаева, Г.А. Зайцева, И.А. Докшина // Медицинская иммунология. - 2015. - Т.17, №6. - С. 573-578.
 18. Казанский, Д.Б. Т-лимфоциты в развитии хронического лимфолейкоза / Д.Б. Казанский // Клиническая онкогематология. - 2012. - Т.5, №2. - С. 85-95.
 19. Кислицина, М.А. Характеристика кариотипа иммуностимулированных В-лимфоцитов больных хроническим лимфолейкозом. Диссертация на соискание ученой степени

- кандидата биологических наук: 14.01.21 / М.А. Кислицина - Москва. - 2021.
20. Клинические рекомендации РФ 2018-2020 (Россия) <https://diseases.medelement.com/disease/хронический-лимфолейкоз-лимфома-из-малых-лимфоцитов-кр-рф-2020/16519>
 21. Козак, Д.М. Неоптерин: иммунологический маркер инфекционных осложнений у больных с хроническим лимфолейкозом / Д.М. Козак // Modern scientific researches. - 2018. - №4-3. - С.109-114.
 22. Кудрявцев, И.В. Т-клетки-памяти: основные популяции и стадии дифференцировки / И.В. Кудрявцев // Российский иммунологический журнал. - 2014. - Т.8, №4(17). - С.947-964.
 23. Луговская, С.А. Гематологический атлас. 4-е издание, дополненное / С.А. Луговская, М.Е. Почтарь // Москва. - 2016. - 434 с.
 24. Миролюбова, Ю.В. Клиническая значимость достижения МОБ-негативности у больных хроническим лимфолейкозом / Ю.В. Миролюбова, Е.А. Стадник // Современная онкология. - 2018. - Т.20, №1. - С.17-22.
 25. Никитин, Е.А. Передача сигнала через В-клеточный рецептор: механизмы и ингибиторы / Е.А. Никитин // Клиническая онкогематология. - 2014. - Т.7, №3. - С. 251-63.
 26. Никитин, Е.А. Хронический лимфолейкоз. Современная диагностика и лечение. Руководство для клиницистов / Е.А. Никитин; под ред. Е.А. Никитина // М.:Буки-Веди. - 2021. - 436с.
 27. Определение основных субпопуляций цитотоксических Т-лимфоцитов методом многоцветной проточной цитометрии // И.В. Кудрявцев, А.Г. Борисов, И.И. Кробинец, А.А. Савченко, М.К. Серебрякова // Медицинская иммунология. - 2015. - Т.17, № 6. - С. 525-538.

28. Орфанный рецептор ROR1 для детекции минимальной остаточной болезни при хроническом лимфолейкозе / Ю.В. Миролубова, Н.С. Тимофеева, В.А. Барт и др. // Медицинский алфавит. - 2020. - №5. - С. 19–24.
29. Пашнина, И.А. Регуляторные Т-клетки у детей с аутоиммунными заболеваниями / И.А. Пашнина // Медицинская иммунология. – 2014. - Т.16, №4 - С.353-360.
30. Проточная цитометрия в биомедицинских исследованиях /А.В. Зурочка, С.В. Хайдуков, И.В. Кудрявцев, В.А. Черешнев // Екатеринбург. - 2018. - 719 с.
31. Российские клинические рекомендации по диагностике и лечению лимфопролиферативных заболеваний / Под редакцией И.В. Поддубной, В.Г. Савченко // Москва. - 2018. - 356 с.
32. Семенова, Н.Ю. Роль дефектов кроветворной и лимфоидной ниш в генезе хронического лимфолейкоза / Н.Ю. Семенова, С.С. Бессмельцев, В.И. Ругаль // Клиническая онкогематология. - 2016. - Т.9, №2. - С.176-90.
33. Состояние клеточного и гуморального иммунитета в зависимости от исхода распространенного гнойного перитонита / А.А. Савченко, А.Г. Борисов, Д.Э. Здзитовецкий, И.В. Кудрявцев // Инфекция и иммунитет – 2015. – Т.5, № 1. - С 63–70.
34. Субпопуляции моноцитов крови у больных с генерализованной гипоксией / С.П. Чумакова, М.В. Винс, О.И. Уразова, Д.А. Азарова, В.М. Шипулин, А.С. Пряхин, Е.Б. Букреева, А.А. Буланова, А.П. Кошель, Е.Г. Чурина, А.В. Ситникова, Н.П. Гарганеева, В.В. Новицкий // Бюллетень сибирской медицины. - 2019. - Т.18, №1. - С.277–285.
35. Субпопуляции моноцитов у здоровых лиц и у пациентов с сепсисом /А.А. Калашникова, Т.М. Ворошилова, Л.В. Чиненова, Н.И.

- Давыдова, Н.М. Калинина //Медицинская иммунология. - 2018. - Т.20, № 6. - С. 815-824.
36. Субпопуляционный состав иммунокомпетентных клеток периферической крови при В-клеточном хроническом лимфолейкозе/лимфоме из малых лимфоцитов / Е.Г. Кузьмина, Т.Ю. Мушкарина, Т.В. Константинова, С.В. Зацаренко, С.В. Шахтарина, А.Ю. Терехова, Н.А. Фалалеева, Л.Ю. Гривцова // Клиническая онкогематология. - 2020. -Т.13, №4. - С. 395-405.
37. Фенотипические характеристики и внутриклеточные цитокины Т-клеток памяти у больных рассеянным склерозом после Т-клеточной вакцинации / И.П. Иванова, И.В. Савкин, Г.В. Селедцова, А.А. Шишков, В.И. Селедцов // Acta Biomedica Scientifica. - 2012. – Т. 85, № 3(2). - С. 79-82.
38. Хайдуков, С.В. Цитометрический анализ субпопуляций Т-хелперов (Th1, Th2, Treg, Th17, Т-хелперов активированные) / С.В. Хайдуков, А.В. Зурочка // Медицинская иммунология. – 2011. - Т. 13, № 1. – С. 7-16.
39. Хронический лимфолейкоз: прогностическое значение минимальной остаточной болезни, возможности современных методов ее выявления и коррекции (обзор литературы) / А.Ю. Кувшинов, С.В. Волошин, И.С. Мартынкевич, Е.В. Клеина, М.А. Михалева, К.М. Абдулкадыров //Клиническая онкогематология. - 2016. - Т.9, №2. - С.191–198.
40. Частота и факторы, предрасполагающие к инфекциям, у больных хроническим лимфолейкозом, получающих ибрутиниб / Е.А. Дмитриева, Е.А. Никитин, Е.Е. Маркова, Н.Ю. Дмитриева, В.В. Птушкин //Клиническая онкогематология. - 2019. - Т12, №4. - С. 438-448.

41. Эффекты γ с-цитокинов (IL-2, IL-7 И IL-15) на созревание и дифференцировку CD45RO+CD4+/ CD8+Т-лимфоцитов in vitro / К.А. Юрова, О.Г. Хазиахматова, Н.М. Тодосенко, Л.С. Литвинова //Медицинская иммунология - 2018, - Т. 20, № 1. - С. 45-52
42. A cloning and expression system to probe T cell receptor specificity and assess functional avidity to neoantigens / Z. Hu, A.J. Anandappa, J. Sun, J. Ki, D.E. Leet, D.J. Bozym, C. Chen, L. Williams, S.A. Shukla, W. Zhang et al. // Blood. – 2018. – V.132. – P.1911–1921.
43. A complementary role of multiparameter flow cytometry and high-throughput sequencing for minimal residual disease detection in chronic lymphocytic leukemia: an European Research Initiative on CLL study / A.C. Rawstron, C. Fazi, A. Agathangelidis et al. //Leukemia. – 2016. – V.30. – P.929–936.
44. A model for predicting effect of treatment on progression-free survival using MRD as a surrogate end point in CLL / N. Dimier, P. Delmar, C. Ward et al. //Blood. – 2018. – V.131. - P.955–962.
45. Activated Allogeneic NK Cells Preferentially Kill Poor Prognosis B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia Cells / D. Sanchez-Martinez, P.M. Lanuza, N. Gomez, A. Muntasell, E. Cisneros, M. Moraru, G. Azaceta, A. Anel, L. Martinez-Lostao, M. Villalba et al.// Front. Immunol. – 2016. – V.7. – 454p.
46. Age-related trends in pediatric B-cell subsets / E.T. Luning Park, J. Ross, J. Sutter, K.E. Sullivan. // Pediatr. Dev.Pathol. – 2011. – V.14. – P.45-52.
47. Analysis of CD16+CD56dim NK cells from CLL patients: Evidence supporting a therapeutic strategy with optimized anti-CD20 monoclonal antibodies / M. Le Gar-Tavernier, J. Decocq, C. de Romeuf, C. Parizot, C.A. Dutertre, E. Chapiro, F. Davi, P. Debre, J.F. Prost, J.L. Teillaud et al. // Leukemia. – 2011. – V.25. – P.101–109.

48. Analysis of ROR1 protein expression in human cancer and normal tissues / A. Balakrishnan, T. Goodpaster, J. Randolph-Habecker, B.G. Hoffstrom, F.G. Jalikis, L.K. Koch, C. Berger, P.L. Kosasih, A. Rajan, D. Sommermeyer, P.L. Porter, S.R. Riddell // *Clin Cancer Res.* - 2017 June. – V.23, N.12. - P.3061–3071.
49. Antisera induced by infusions of autologous Ad-CD154-leukemia B cells identify ROR1 as an oncofetal antigen and receptor for Wnt5a / T. Fukuda, L. Chen, T. Endo, L. Tang, D. Lu, J.E. Castro et al. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2008. – V.105, N.8. – P.3047-3052.
50. Autocrine signaling by Wnt-5a deregulates chemotaxis of leukemic cells and predicts clinical outcome in chronic lymphocytic leukemia / P. Janovska, L. Poppova, K. Plevova, et al. // *Clin Cancer Res.* – 2016. – V.22, N.2. – P.459-69.
51. Botos, I. The structural biology of Toll-like receptors / I. Botos, D.M. Segal, D.R. Davies // *Structure.* – 2011. – V.19. – P. 447–459.
52. Cancer statistics, 2007. /A. Jemal, R. Siegel, E. Ward et al. // *CA. Cancer J. Clin.* - 2007. – V.57, N.1. - P. 43–66.
53. CD14⁺⁺CD16⁺ Monocytes independently predict cardiovascular events / K.S. Rogacev, B. Cremers, A.M. Zawada, S. Seiler, N. Binder, P. Ege, G. Grobe-Dunker, I. Heisel, F. Hornof, J. Jeken, N.M. Rebling, C. Ulrich, B. Scheller, M. Böhm, D. Fliser, G.H. Heine // *Journal of the American College of Cardiology.* – 2012. – V.60, N.16. – P.1512-1520.
54. CD150 and CD180 are involved in regulation of transcription factors expression in chronic lymphocytic leukemia cells / I.M. Gordiienko, L.M. Shlapatska, V.M. Kholodniuk, L.M. Kovalevska, T.S. Ivanivskaya, S.P. Sidorenko // *Experimental Oncology.* – 2017. – V.39. – P.291–298.
55. CD150 and CD180 are negative regulators of IL-10 expression and secretion in chronic lymphocytic leukemia B cells / V. Shcherbina, I.

- Gordiienko, L. Shlapatska, D. Gluzman, S. Sidorenko //Neoplasma. – 2021. – V.68, N.4. – P.760-769.
56. CD180 functions in activation, survival and cycling of B chronic lymphocytic leukaemia cells / N. Porakishvili, A. Memon, K. Vispute, N. Kulikova, E.A. Clark, K.R. Rai, A. Nathwani, D.N Rajendra., N. Chiorazzi, P.M. Lydyard. //British Journal of Haematology. – 2011. – V.153. – P.486–498.
 57. CD19 regulates innate immunity by the Toll-like receptor RP105signaling in B lymphocytes / N. Yazawa, M. Fujimoto, S. Sato, K. Miyake, N. Asano, Y. Nagai, O. Takeuchi, K. Takeda, H. Okochi, S. Akira, T.F. Tedder, K. Tamaki //Blood. – 2003. – V.102. – P.1374–1380.
 58. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells / P. Pandiyan, L. Zheng, S. Ishihara, J. Reed, M.J. Lenardo //Nat. Immunol. – 2007. – V.8. – P.1353–1362.
 59. CD49d (ITGA4) expression is a predictor of time to first treatment in patients with chronic lymphocytic leukaemia and mutated IGHV status / T. Baumann, J. Delgado, R. Santacruz et al. //British Journal of Haematology. – 2016. – V.172. – P.48–55.
 60. Cell-intrinsic determinants of ibrutinib-induced apoptosis in Chronic Lymphocytic Leukemia / N.A. Amin, S. Balasubramanian, K. Saiya-Cork, K. Shedden, N. Hu, S.N. Malek //Clin. Cancer Res. – 2017. – V.23, N.4. – P.1049–1059.
 61. Chen, Z.W. Adaptive immune response of Vgamma2Vdelta2 T cells: a new paradigm / Z.W. Chen, N.L. Letvin //Trends. Immunol. – 2003. – V.24. – P. 213-219.
 62. Chronic Lymphocytic Leukaemia (CLL) and CLL Type Monoclonal B-Cell Lymphocytosis (MBL) Show Differential Expression of Molecules Involved in Lymphoid Tissue Homing / A.C. Rawstron, J. Shingles, R. de

- Tute, F. Bennett et al. // *Cytometry Part B (Clinical Cytometry)*. – 2010. – V.78B. (Suppl. 1), - P.42–46.
63. Chronic lymphocytic leukaemia and small lymphocytic lymphoma: Overview of the descriptive epidemiology / G.M. Dores, W.F. Anderson, E.C. Curtis et al. // *Br. J. Haematol.* - 2007. – V.139, N.5. - P.809–819.
64. Chronic lymphocytic leukaemia cells drive the global CD4+ T cell repertoire towards a regulatory phenotype and leads to the accumulation of CD4+ forkhead box P3+ T cells / K.P. Piper, M. Karanth, A. McLarnon, E. Kalk, N. Khan, J. Murray, G. Pratt, P.A. Moss // *Clin. Exp. Immunol.* – 2011. – V.166. – P.154–163.
65. Chronic lymphocytic leukemia cells induce changes in gene expression of CD4 and CD8 T cells / G. Gorgun, T.A. Holderried, D. Zahrieh, D. Neuberg, J.G. Gribben // *J. Clin. Investig.* - 2005. – V.115. – P.1797–1805.
66. CMV-specific CD8+ T-cell function is not impaired in chronic lymphocytic leukemia / G.D. Te Raa, M.F. Pascutti, J.J. Garcia-Vallejo, E. Reinen, E.B. Remmerswaal, I.J. ten Berge, R.A. van Lier, E. Eldering, M.H. van Oers, S.H. Tonino et al. // *Blood* – 2014. – V.123. – P.717–724.
67. Cytofluorimetric identification of two populations of double positive (CD4+, CD8+) T lymphocytes in human peripheral blood / C. Ortolani, E. Forti, E. Radin, R. Cibin, A. Cossarizza // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1993. – V.191. – P.601-609.
68. Deciphering the complex circulating immune cell microenvironment in chronic lymphocytic leukaemia using patient similarity networks / Z. Mikulkova, G. Manukyan, P. Turcsanyi, M. Kudelka, R. Urbanova, J. Savara, E. Ochodkova, Y. Brychtova, J. Molinsky, M. Simkovic, D. Starostka, J. Novak, O. Janca, M. Dihel, P. Ryznerova, L. Mohammad, T. Papajik, E. Kriegova // *Scientific Reports*. – 2021. – V.11. – 322p.

69. Differentiation expression of CD180 by B chronic lymphocytic leukaemic cells with mutated and unmutated Ig Vh genes / N. Porakishvili, N. Kulikova, A.P. Jewell, P.Y. Youinou, K. Yong, A. Nathwani, B. Heelan, V. Duke, T.J. Hamblin, P. Wallace, P. Ely, E.A. Clark, P.M. Lydyard //British Journal of Haematology. – 2005. – V.131. - P.313–319.
70. Disruption of in vivo Chronic Lymphocytic Leukemia Tumor-Microenvironment Interactions by Ibrutinib—Findings from an Investigator-Initiated Phase II Study / C.U. Niemann, S.E. Herma, I. Maric, J. Gomez-Rodriguez, A. Biancotto, B.Y. Chang, S. Martyr, M. Stetler-Stevenson, C.M. Yuan, K.R. Calvo et al. //Clin. Cancer Res. – 2016. – V.22. - P.1572–1582.
71. EHA Conference Coverage. Roche Announces Data at EHA2021. Reinforcing Efficacy of Venclexta/Venclyxto Combinations in Chronic Lymphocytic Leukaemia And Acute Myeloid Leukaemia. - 2021.Jun. <https://www.roche.com/media/releases/med-cor-2021-06-11b.htm>.
72. Eight-year follow up of a case of persistent polyclonal B cell lymphocytosis: Immunophenotypic findings pre- and postsplenectomy / R. Tavarozzi, E. Manzato, P. Sammuri et al. //Clinical Cytometry. – 2021. – V.100. – P.687–688.
73. Elevated absolute NK cell counts in peripheral blood predict good prognosis in chronic lymphocytic leukemia / W.T. Wang, H.Y. Zhu, Y.J. Wu, Y. Xia, J.Z. Wu, W. Wu, J.H. Liang, L. Wang, L. Fan, J.Y. Li et al. // J. Cancer Res. Clin. Oncol. – 2018. – V.144. – P.449–457.
74. Elevated levels of follicular T-helper cells and their association with therapeutic effects in patients with chronic lymphocytic leukaemia / L. Qiu, Y. Zhou, Q. Yu, S. Zheng, Z. Wang, Q. Huang. // Immunol. Lett. – 2018. – V.197. – P.15–28.
75. Engaging Cytotoxic T and NK Cells for Immunotherapy in Chronic Lymphocytic Leukemia / T. Hofland, E. Eldering, A.P. Kater and S.H.

- Tonino // International Journal of Molecular Sciences. – 2019. – V.20. - 4315p. www.mdpi.com/journal/ijms
76. Epidemiology of bloodstream infections in patients with chronic lymphocytic leukemia: a longitudinal nation-wide cohort study / M.A. Andersen, C.E. Moser, J. Lundgren, C.U. Niemann //Leukemia. – 2018. Dec. Published online.
 77. Eradication of bone marrow minimal residual disease may prompt early treatment discontinuation in CLL / P. Strati, M.J. Keating, S.M. O'Brien et al. //Blood. – 2014. – V.123. – P.3727–3732.
 78. Expansion of a CD8(+) PD-1(+) replicative senescence phenotype in early stage CLL patients is associated with inverted CD4:CD8 ratios and disease progression / C. Nunes, R. Wong, M. Mason, C. Fegan, S. Man, C. Pepper //Clin. Cancer Res. – 2012. – V.18. – P.678–687.
 79. Expansion of NK cells and reduction of NKG2D expression in chronic lymphocytic leukemia. Correlation with progressive disease / L. Huergo-Zapico, A. Acebes-Huerta, A.P. Gonzalez-Rodriguez, J. Contesti, E. Gonzalez-Garcia, A.R. Payer, M. Villa-Alvarez, A. Fernandez-Guizan, A. Lopez-Soto, S. Gonzalez // PLoS ONE. – 2014. –V.9. - e108326.
 80. Expression of T-cell receptors TcR1 (gamma/delta) and TcL2 (alpha/beta) in the human intestinal mucosa / L.K. Trejdosiewicz, C.J. Smart, D.J. Oakes, P.D. Howdle, G. Malizia, D. Campana, A.W. Bolston //Immunology – 1989. – V.68. – P.7-12.
 81. Expression of the Ror1 and Ror2 receptor tyrosine kinase genes during mouse development / R. Al-Shawi, S.V. Ashton, C. Underwood, J.P. Simons //Dev. Genes Evol. – 2001. – V.211. – P.161–71.
 82. Expression Profile of Novel Cell Surface Molecules on Different Subsets of Human Peripheral Blood Antigen- Presenting Cells / D. Damasceno, M.P. Andrés, W.B. van den Bossche, J. Flores-Montero, S. de Bruin, C.

- Teodosio, J.J. van Dongen, A. Orfao, J. Almeida // *Clin. Transl. Immunol.* - 2016. – V.5. - 100p.
83. Frequency and type of serious infections in fludarabine-refractory B-cell chronic lymphocytic leukemia and small lymphocytic lymphoma: implications for clinical trials in this patient population / J.G. Perkins, J.M. Flynn, R.S. Howard, J.C. Byrd // *Cancer.* – 2002. – V.94 (7). – P.2033-2039.
 84. Gene expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia reveals a homogeneous phenotype related to memory B cells / U. Klein, Y. Tu, G.A. Stolovitzky et al. // *J Exp Med.* – 2001. – V.194, N.11. – P.1625–1638.
 85. Green, J.L. Ror receptor tyrosine kinases: orphans no more / J.L. Green, S.G. Kuntz, P.W. Sternberg // *Trends Cell Biol.* -2008. –V.18, N.11. - P.536-544.
 86. Griffin, D.O. Human B1 cells in umbilical cord and adult peripheral blood express the novel phenotype CD20+CD27+CD43+CD70- / D.O. Griffin, N.E. Holodick, T.L. Rothstein // *J. Exp. Med.* – 2011. – V.208. – P.67-80.
 87. Hallek, M. Chronic lymphocytic leukaemia / M. Hallek, T.D. Shanafelt, B. Eichhorst // *Lancet (London, England).* – 2018. – V.391. - P.1524–1537.
 88. Hallek, M. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute – Working Group 1996 guidelines / M. Hallek, B.D. Cheson, D. Catovsky, F. Caligaris-cappio, G. Dighiero, H. Do // *Blood.* – 2008. – V. 111, N.12. – P.5446–5456.
 89. Hanahan, D. Hallmarks of cancer: the next generation / D. Hanahan, R.A. Weinberg // *Cell.* – 2011. – V.144, N.5. – P.646-674.
 90. High-level ROR1 associates with accelerated disease progression in chronic lymphocytic leukemia / B. Cui, E.M. Ghia, L. Chen, L.Z. Rassenti,

- C. De Boever, G.F. Widhopf et al. //Blood. – 2016. – V.128, N.25. – P.2931–2940.
91. Hofland, T. XVII International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia //Leuk. Lymphoma. New York. – 2017. May. – V.58. – P.1–240. abstract 289.
92. Human CD180 transmits signals via the PIM-1L kinase / N. Egli, A. Zajonz, M.T. Burger, T. Schweighoffer //PLoS One. – 2015. – V.10. – e0142741.
93. Ibrutinib is an irreversible molecular inhibitor of ITK driving a Th1-selective pressure in T lymphocytes / J.A. Dubovsky, K.A. Beckwith, G. Natarajan, J.A. Woyach, S. Jaglowski, Y. Zhong, J.D. Hessler, T.M. Liu, B.Y. Chang, K.M. Larkin et al. //Blood. – 2013. – V.122. – P.2539–2549.
94. Ibrutinib modulates the immunosuppressive CLL microenvironment through STAT3-mediated suppression of regulatory B-cell function and inhibition of the PD-1/PD-L1 pathway / K. Kondo, H. Shaim, P.A. Thompson, J.A. Burger, M. Keating, Z. Estrov, D. Harris, E. Kim, A. Ferrajoli, M. Daher et al. //Leukemia. – 2018. – V.32. – P.960–970.
95. Ibrutinib Therapy Increases T Cell Repertoire Diversity in Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia / Q. Yin, M. Sivina, H. Robins, E. Yusko, M. Vignali, S. O'Brien, M.J. Keating, A. Ferrajoli, Z. Estrov, N. Jain et al. //J. Immunol. – 2017. – V.198. – P.1740–1747.
96. Ibrutinib treatment improves T cell number and function in CLL patients / M. Long, K. Beckwith, P. Do, B.L. Mundy, A. Gordon, A.M. Lehman, K.J. Maddocks, C. Cheney, J.A. Jones, J.M. Flynn et al. //J. Clin. Investig. – 2017. – V.127. – P. 3052–3064.
97. Ibrutinib Treatment Improves T-Cell Proliferative Ability and Effector Function in Relapsed/Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) Patients / I. Solman, M. Taylor, H. You, S. O'Brien, S. Mulligan, J. Byrd, J.P. Dean, D.F. James, A. Mongan //Blood. – 2018. – V.132. – 3114p.

98. Ibrutinib versus ofatumumab in previously treated chronic lymphoid leukemia / J.C. Byrd, J.R. Brown, S. O'Brien et al. // *N Engl J Med.* – 2014. – V.371, N.3. - P.213–23.
99. Imbalance of T cell subpopulations in patients with chronic lymphocytic leukaemia of the B cell type / F. Herrmann, A. Lochner, H. Philippen, B. Jauer, H. Ruhl // *Clin. Exp. Immunol.* – 1982. – V.49. – P.157–162.
100. Immunosuppressive Treg cells acquire the phenotype of effector-T cells in chronic lymphocytic leukemia patients / S. De Matteis, C. Molinari, G. Abbati, T. Rossi, R. Napolitano, M. Ghetti, A.G.L. Di Rora, G. Musuraca, A. Lucchesi, G.M. Rigolin et al. // *J. Transl. Med.* – 2018. – V.6. – 172p.
101. Improved survival for patients diagnosed with chronic lymphocytic leukemia in the era of chemo-immunotherapy: a Danish population-based study of 10455 patients / C. da Cunha-Bang, J. Simonsen, K. Rostgaard, C. Geisler et al. // *Blood Cancer J.* – 2016. –V.11(6). – 499p.
102. Improving efficiency and sensitivity: European Research Initiative in CLL (ERIC) update on the international harmonised approach for flow cytometric residual disease monitoring in CLL / A.C. Rawstron, S. Bottcher, R. Letestu et al. // *Leukemia.* – 2013. – V.27. – P.142–149.
103. Increased Frequency of CD8+ and CD4+ Regulatory T cell in Chronic Lymphocytic Leukemia: Association with Disease Progression / F. Jadidi-Niaragh, M. Yousefi, A. Memarian et al. // *Cancer Invest.* – 2013. – V.31, N.2. – P.121-131.
104. Inhibition of chemotherapy resistant breast cancer stem cells by a ROR1 specific antibody / S. Zhang, H. Zhang, E.M. Ghia, J. Huang, L. Wu, J. Zhang, S. Lam, Y. Lei, J. He, B. Cui et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* – 2019. – V.116. – P.1370–1377.
105. International standardized approach for flow cytometric residual disease monitoring in chronic lymphocytic leukaemia / A.C. Rawstron, N. Villamor, M. Ritgen et al. // *Leukemia.* – 2007. – V.21.- P.956–996.

106. iwCLL guidelines for diagnosis, indications for treatment, response assessment, and supportive management of CLL / M. Hallek, B.D. Cheson, D. Catovsky et al. //Blood. - 2018. – V.131. – P.2745–2760.
107. Jaffe, E.S. World Health Organization Classification of Tumors. Pathology and genetics of tumors of hematopoietic and lymphoid tissues / E.S. Jaffe, N.L. Harris, J.W. Vardiman // Lyon – IARC Press. – 2016. – P. 121-132.
108. Low-dose IL-2 reduces lymphocyte apoptosis and increases naïve CD4 cells in HIV-1 patients treated with HAART / F. Pandolfi, M. Pierdominici, M. Marziali, M.L. Bernardi, G. Antonelli, V. Galati, G. D’Offizi, F. Aiuti //Clinical. Immunology. – 2000. – V.94. - P. 153-159.
109. Masiakowski, P.A Novel Family of Cell Surface Receptors With Tyrosine Kinase-Like Domain / P. Masiakowski, R.D. Carroll //J Biol Chem. – 1992. – V.267. – P.26181–26190.
110. Md1 and Rp105 regulate innate immunity and viral resistance in zebrafish / S. Candel, M.P. Sepulcre, R. Espín-Palazón, S.D. Tyrkalska, S. de Oliveira, J. Meseguer, V. Mulero //Dev. Comp. Immunol. – 2015. – V.50. – P.155–165.
111. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4 / R. Shimazu, S. Akashi, H. Ogata, Y. Nagai, K. Fukudome, K. Miyake, M. Kimoto //J. Exp. Med. – 1999. – V.189. – P.1777–1782.
112. Mhibik, M. Harnessing the Effects of BTKi on T Cells for Effective Immunotherapy against CLL / M. Mhibik, A. Wiestner, C. Sun //International Journal Molecular Sciences. – 2020. – V.21.68. – P.1-14.
113. Minimal residual disease assessment improves prediction of outcome in patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL) who achieve partial response: comprehensive analysis of two phase III studies of the German CLL study group / G. Kovacs, S. Robrecht, A.M. Fink et al. //J Clin Oncol: Off J Am Soc Clin Oncol. – 2016. – V.34. – P.3758–3765.

114. Minimal Residual Disease Assessment in CLL: Ready for Use in Clinical Routine? / M. Fürstenau, N. De Silva, B. Eichhorst, M. Hallek // *HemaSphere*. – 2019. – V.3. -5p.
115. Minimal residual disease is an independent predictor for 10-year survival in CLL / M. Kwok, A.C. Rawstron, A. Varghese et al. // *Blood*. – 2016. – V.128. – P.2770–2773.
116. Minimal residual disease quantification is an independent predictor of progression-free and overall survival in chronic lymphocytic leukemia: a multivariate analysis from the randomized GCLLSG CLL8 trial / S. Bottcher, M. Ritgen, K. Fischer et al. // *J Clin Oncol: Off J Am Soc Clin Oncol*. – 2012. – V.30. – P.980–988.
117. Minimal residual disease quantification using consensus primers and high-throughput IGH sequencing predicts post-transplant relapse in chronic lymphocytic leukemia / A.C. Logan, B. Zhang, B. Narasimhan et al. // *Leukemia*. – 2013. – V.27. – P.1659–1665.
118. Molecular Mechanisms Associated with ROR1-Mediated Drug Resistance: Crosstalk with Hippo-YAP/TAZ and BMI-1 Pathways / H. Karvonen, H. Barker, L. Kaleva, W. Niininen, D. Ungureanu // *Cells*. – 2019. – V.8. – 812p.
119. Molica, S. Infections in chronic lymphocytic leukemia: risks factors and impact on survival and treatment / S. Molica // *Leuk. Lymphoma*. – 1994. – V.13. - P.203-214.
120. Multiple inhibitory ligands induce impaired T-cell immunologic synapse function in chronic lymphocytic leukemia that can be blocked with lenalidomide: Establishing a reversible immune evasion mechanism in human cancer / A.G. Ramsay, A.J. Clear, R. Fatah, J.G. Gribben // *Blood*. – 2012. – V.120. – P.1412–1421.
121. Negative regulation of Toll-like receptor 4 signaling by the Toll-like receptor homolog RP105 / S. Divanovic, A. Trompette, S.F. Atabani, R.

- Madan, D.T. Golenbock, A. Visintin, R.W. Finberg, A. Tarakhovsky, S.N. Vogel, Y. Belkaid, E.A. Kurt-Jones, C.L. Karp // *Nat. Immunol.* – 2005. – V.6. – P.571–578.
122. NK cell dysfunction in chronic lymphocytic leukemia is associated with loss of the mature cells expressing inhibitory killer cell Ig-like receptors / A.W. MacFarlane IV, M. Jilaba, M.R. Smithc, R.K. Alpaugh, M.E. Colec, S. Litwind, M.M. Millensonc, T. Al-Saleemb, A.D. Cohenc, K. S. Campbell // *Oncoimmunology* – 2017. – V.6. – N. - e1330235 (11 pages).
123. NK cell function is markedly impaired in patients with chronic lymphocytic leukaemia but is preserved in patients with small lymphocytic lymphoma / H.M. Parry, T. Stevens, C. Oldreive, B. Zadran, T. McSkeane, Z. Rudzki, S. Paneesha, C. Chadwick, T. Stankovic, G. Pratt et al. // *Oncotarget* – 2016. – V.7. – P.68513–68526.
124. Nkx2-1/Titf1/Ttf-1-Induced ROR1 Is Required to Sustain EGFR Survival Signaling in Lung Adenocarcinoma / T. Yamaguchi, K. Yanagisawa, R. Sugiyama, Y. Hosono, Y. Shimada, C. Arima et al. // *Cancer Cell* – 2021. – V.21(3). P.48–61.
125. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood / L. Ziegler-Heitbrock, P. Ancuta, S. Crowe, M. Dalod, V. Grau, D.N. Hart et al. // *Blood.* – 2010. – V.116. N16. P.74-80.
126. Non-Classical monocytes display inflammatory features: Validation in sepsis and System Lupus Erythematosus / R. Mukherjee, P. Kanti Barman, P. Kumar Thatoi, R. Tripathy, B. Kumar Das, B. Ravindran // *Sci. Rep.* – 2015. – V.5. – 13886p.
127. Nosari, A. Infectious Complications in Chronic Lymphocytic Leukemia. / A. Nosari // *Mediterranean J. of Hematology and Infection Diseases.* – 2012. – V.4. N1. – P.2035-3006.

128. Obinutuzumab plus chlorambucil in patients with CLL and coexisting conditions / V. Goede, K. Fischer, R. Busch et al. // *N Engl J Med.* – 2014. – V.370. – P.1101–1110.
129. Patz, M. A high recovery and high purity data analysis strategy for rare abnormal CD5+ ROR-1+ B cells using the DuraClone RE CLB Tube / M. Patz, M. Kapinsky // *Application note.* 2017 Beckman Coulter Life Sciences.
130. Pepper, M. Origins of CD4(+) effector and central memory T cells / M. Pepper, M.K. Jenkins // *Nat. Immunol.* – 2011. – V.12. – P.467–471.
131. Performance of eight-color dry antibody reagent in the detection of minimal residual disease in chronic lymphocytic leukemia samples / L. Bento, R. Correia, F. de Sousa, A. Vaz, E. Pedro, D. Schimidell, N. Millan, M. Passaro, R. Barroso, N. Bacal // *Cytometry.* - 2020. – V.98. – P.529–535.
132. Peripheral blood CD14^{high}CD16⁺ monocytes are main producers of IL-10 / J. Skrzeczynska-Moncznik, M. Browska, S. Loseke, E. Grage-Griebenow, M. Zembala, J. Pryjma // *Scand. J. Immunol.*, - 2008. – V.67, N2. - P.152-159.
133. Persistent expansion, in a human immunodeficiency virus-infected person, of V beta-restricted Cd4+CD8+ T lymphocytes that express cytotoxicity-associated molecules and are committed to produce interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha / L. Wiss, A. Roux, S. Garcia, C. Demouchy, N. Haeffner-Cavaillon, M.D. Kazatchkine, M.L. Gougeon // *J.Infect.Dis.* - 1998. – V.178. – P.1158-1162.
134. Presence of CD4+CD8+ double-positive T cell with very high interleukin-4 production potential in lesional skin of patients with systemic sclerosis / Y. Parel, M. Aurrand-Lions, A. Scheja, J.M. Dayer, E. Roosnek, C. Chizzolini // *Arthritis.Rheum.* – 2007. – V.56. – P.3459-3467.

135. Primary B-CLL resistance to NK cell cytotoxicity can be overcome in vitro and in vivo by priming NK cells and monoclonal antibody therapy / C. Veuillen, T. Aurran-Schleinitz, R. Castellano, J. Rey, F. Mallet, F. Orlanducci, L. Pouyet, S. Just-Landi, D. Coso, V. Ivanov et al. // *J. Clin. Immunol.* – 2012. – V.32. – P.632–646.
136. Prognosis of chronic lymphocytic leukemia: a multivariate regression analysis of 325 untreated patients / J.S. Lee, D. Dixon, H. Kantarjian, M.J. Keating, P. Talpaz // *Blood.* – 1987. - V.69. – P.929-936.
137. Prognostic value of MRD in CLL patients with comorbidities receiving chlorambucil plus obinutuzumab or rituximab / A.W. Langerak, M. Ritgen, V. Goede et al. // *Blood.* – 2019. – V.133. - P.494–497.
138. Randomized trial of ibrutinib vs. ibrutinib plus rituximab in patients with chronic lymphocytic leukemia / J.A. Burger, M. Sivina, N. Jain, E. Kim, T. Kadia, Z. Estrov, G.M. Nogueras-Gonzalez, X. Huang, J. Jorgensen, J. Li et al. // *Blood.* – 2019. – V.133. – P.1011–1019.
139. Reduced frequencies and suppressive function of CD4⁺CD25^{hi} regulatory T cells in patients with chronic lymphocytic leukemia after therapy with fludarabine / M. Beyer, M. Kochanek, K. Darabi, A. Popov, M. Jensen, E. Endl, P.A. Knolle, R.K. Thomas, M. von Bergwelt-Baildon, S. Debey et al. // *Blood* – 2005. – V.106. – P.2018–2025.
140. Reduced Percentage of CD14^{dim}CD16⁺SLAN⁺ Mono-cytes Producing TNF and IL-12 as an Immunological Sign of CLL Progression / W. Kowalska, M. Zarobkiewicz, W. Tomczak, J. Woś, I. Morawska, A. Bojarska-Junak // *Int. J. Mol. Sci.* – 2022. – V.23. - 3029p.
141. Regulatory T-Cell Development in the Human Thymus / Í. Caramalho, H. Nunes-Cabaço, R.B. Foxall, A.E. Sousa // *Front. Immunol.* - 2015. – V.6. – 395p.
142. Regulatory T-cell number is increased in chronic lymphocytic leukemia patients and correlates with progressive disease / G. D’Arena, L. Laurenti,

- M.M. Minervini, S. Deaglio, L. Bonello, L. De Martino, L. De Padua, L. Savino, M. Tarnani, V. De Feo et al. // *Leuk. Res.* – 2011. – V.35. – P.363–368.
143. Relation of gene ex-pression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia / A. Rosenwald, A.A. Alizadeh, G. Widhopf et al. // *J. Exp. Med.* – 2001. – V.194(11). – P.1639–1647.
144. Reproducible diagnosis of chronic lymphocytic leukemia by flow cytometry: an European Research Initiative on CLL (ERIC) & European Society for Clinical Cell Analysis (ESCCA) Harmonisation project / A.C. Rawstron, K.A. Kreuzer, A. Soosapilla et al. // *Cytometry Part B Clin Cytometry.* – 2018. – V.94. – P.121–128.
145. Requirement for MD-1 in cell surface expression of RP105/CD180 and B-cell responsiveness to lipopolysaccharide / Y. Nagai, R. Shimazu, H. Ogata, S. Akashi, K. Sudo, H. Yamasaki, S. Hayashi, Y. Iwakura, M. Kimoto, K. Miyake // *Blood.* – 2002. – V.99. – P.1699–1705.
146. Restricted T cell receptor repertoire in CLL-like monoclonal B cell lymphocytosis and early stage CLL / G. Blanco, A. Vardi, A. Puiggros, A. Gomez-Llonin, M. Muro, M. Rodriguez-Rivera, E. Stalika, E. Abella, E. Gimeno, M. Lopez-Sanchez et al. // *Oncoimmunology.* – 2018. – V.7. - e1432328.
147. Restrictions in the T-cell repertoire of chronic lymphocytic leukemia: High-throughput immunoprofiling supports selection by shared antigenic elements / A. Vardi, E. Vlachonikola, M. Karypidou, E. Stalika, V. Bikos, K. Gemenetzi, C. Maramis, A. Siorenta, A. Anagnostopoulos, S. Pospisilova et al. // *Leukemia.* – 2017. – V.31. – P.1555–1561.
148. ROR1 and ROR2 play distinct and opposing roles in endometrial cancer / C.E. Henry, E. Llamosas, B. Daniels, A. Coopes, K. Tang, C.E. Ford // *Gynecol Oncol.* – 2018. Mar. - V.148(3). – P.576-584.

149. ROR1 expression is not a unique marker of CLL / G. Barna, R. Mihalik, B. Timarr et al. //Hematological Oncology. – 2011. – V.29. – P.17–21.
150. ROR1 is an accurate and reliable marker of minimal residual disease in chronic lymphocytic leukaemia / M.S. De Propris, S. Intoppa, M.L. Milani, P. Mariglia, M.G. Nardacci, N. Peragine, R. Foa, A. Guarini //British Journal of Haematology. – 2020. – V.190. – P.329–363.
151. Ror1, a cell surface receptor tyrosine kinase is expressed in chronic lymphocytic leukemia and may serve as a putative target for therapy / A.H. Daneshmanesh, E. Mikaelsson, M. Jeddi-Tehrani, A.A. Bayat, R. Ghods, M. Ostadkarampour et al. //Int J Cancer. – 2008. – V.123(5). - P.1190-1195.
152. ROR1, an embryonic protein with an emerging role in cancer biology / N. Borcharding, D. Kusner, G.H. Liu, W. Zhang //Protein Cell. – 2014. – V.5(7). – P.496-502.
153. Saldanha, J. Identification of a Frizzled-Like Cysteine Rich Domain in the Extracellular Region of Developmental Receptor Tyrosine Kinases / J. Saldanha, J. Singh, Mahadevan D //Protein Sci. – 1998. – V.7. – P.1632–1635.
154. Schultz, T.E. The RP105/MD-1 complex: molecular signaling mechanisms and pathophysiological implications / T.E. Schultz, A. Blumenthal // Journal of Leukocyte Biology. – 2017. – V.101. – P.183-192.
155. Shabani, M., Asgarian-Omran H., Jeddi-Tehrani M., et al. Overexpression of orphan receptor tyrosine kinase Ror1 as a putative tumor-associated antigen in Iranian patients with acute lymphoblastic leukemia / M. Shabani, H. Asgarian-Omran, M. Jeddi-Tehrani et al. //Tumour Biol. – 2007. – V.28(6). – P.318–326.
156. Silencing of ROR1 and FMOD with siRNA results in apoptosis of CLL cells / A. Choudhury, K. Derkow, A.H. Daneshmanesh, E. Mikaelsson, S. Kiaii, P. Kokhaei et al. //Br J Haematol. – 2010. – V.151(4). P.327-335.

157. Subsets of CD3⁺ (T cell receptor alpha/beta or gamma/delta) and CD3-lymphocytes isolated from normal human gut epithelium display phenotypical features different from their counterparts in peripheral blood / A. Jarry, N. Cerf-Bensussan, N. Brousse, F. Selz, D. Guy-Grand // *Eur.J.Immunol.* – 1990. – V.20. – P.1097-1103.
158. Sudhoff, T. Prophylactic strategies to meet infectious complications in fludarabine-treated CLL / T. Sudhoff, M. Arning, W. Schneider // *Leukemia.* – 1997. – V.11. suppl. 2. – P.38-41.
159. Systematic identification of personal tumor-specific neoantigens in chronic lymphocytic leukemia / M. Rajasagi, S.A. Shukla, E.F. Fritsch, D.B. Keskin, D. DeLuca, E. Carmona, W. Zhang, C. Sougnez, K. Cibulskis, J. Sidney et al. // *Blood* – 2014. – V.124. – P.453–462.
160. T cells from CLL patients exhibit features of T-cell exhaustion but retain capacity for cytokine production / J.C. Riches, J.K. Davies, F. McClanahan, R. Fatah, S. Iqbal, S. Agrawal, A.G. Ramsay, J.G. Gribben // *Blood* – 2013. – V.121. – P.1612–1621.
161. T cells in chronic lymphocytic leukemia display dysregulated expression of immune checkpoints and activation markers / M. Palma, G. Gentilcore, K. Heimersson, F. Mozaari, B. Nasman-Glaser, E. Young, R. Rosenquist, L. Hansson, A. Osterborg, H. Mellstedt // *Haematologica.* – 2017. – V.102. – P. 562–572.
162. T type 1/type 2 subsets balance in B-cell chronic lymphocytic leukemia—the three-color flow cytometry analysis / M. Podhorecka, A. Dmoszynska, J. Rolinski, E. Wasik // *Leuk. Res.* – 2002. – V.26. - P.657–660.
163. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Lymphoid Neoplasms / R. Alaggio, C. Amador, I. Anagnostopoulos, A. D. Attygalle, I. B. de Oliveira Araujo, E. Berti, G. Bhagat, A.M. Borges, D. Boyer, M. Calaminici, A. Chadburn, et al. // *Leukemia* – 2022. – V.36. – P.1720–1748.

164. The B-cell Tumor-Associated Antigen ROR1 can be Targeted With T Cells Modified to Express a ROR1-specific Chimeric Antigen Receptor / M. Hudecek, T.M. Schmitt, S. Baskar, M.T. Lupo-Stanghellini, T. Nishida, T.N. Yamamoto et al. //Blood. – 2010. – V.116. – P.4532–4541.
165. The Bruton tyrosine kinase inhibitor PCI-32765 thwarts chronic lymphocytic leukemia cell survival and tissue homing in vitro and in vivo / S. Ponader, S.S. Chen, J.J. Buggy, K. Balakrishnan, V. Gandhi, W.G. Wierda et al. //Blood. – 2012. – V.119(5). – P.1182–1189.
166. The critical role of Th1-dominant immunity in tumor immunology / T. Nishimura, M. Nakui, M. Sato, K. Iwakabe, H. Kitamura, M. Sekimoto, A. Ohta, T. Koda, S. Nishimura //Cancer Chemother. Pharmacol. – 2000. – V.46 (Suppl. S1). – P.52–61.
167. The dual role of the novel Wnt receptor tyrosine kinase, ROR2, in human carcinogenesis / C.E. Ford, S. Ma, Q. Si, A. Quadir and R.L. Ward // International Journal of Cancer. – 2012. – V.133. - P.779–787.
168. The interplay of CD150 and CD180 receptor pathways contribute to the pathobiology of chronic lymphocytic leukemia B cells by selective inhibition of Akt and MAPK signaling / I. Gordiienko, L. Shlapatska, V. Kholodniuk, L. Sklyarenko, D.F. Gluzman, E.A. Clark, S.P. Sidorenko //PLOS ONE. - 2017 Oct.
169. The Leo-1 B-cell subpopulation in patients with rheumatoid arthritis / O. Taniguchi, H. Miyajima, T. Hirano, M. Noguchi, A. Ueda et al. // J. Clin. Immunol. – 1987. – V.7. – P.441-448.
170. The lymph node microenvironment promotes B-cell receptor signaling, NF-kappaB activation, and tumor proliferation in chronic lymphocytic leukemia / Y. Herishanu, P. Pérez-Galán, D. Liu, A. Biancotto, S. Pittaluga, B. Vire, F. Gibellin, N. Njuguna, E. Lee, L. Stennett et al. //Blood. – 2011. – V.117. – P.563–574.

171. The molecular mechanism of B cell activation by Toll-like receptor protein RP-105 / V.W. Chan, I. Mecklenbräuer, I. Su, G. Texido, M. Leitges, R. Carsetti, C.A. Lowell, K. Rajewsky, K. Miyake, A. Tarakhovsky // *J. Exp. Med.* – 1998. – V.188. - P.93–101.
172. The Monocytic Population in Chronic Lymphocytic Leukemia Shows Altered Composition and Deregulation of Genes Involved in Phagocytosis and Inflammation / R. Maffei, J. Bulgarelli, S. Fiorcari, L. Bertoncelli, S. Martinelli, C. Guarnotta, I. Castelli, S. Deaglio, G. Debbia, S. De Biasi et al. // *Haematologica.* – 2013. – V.98. – P.1115–1123.
173. The number of cytomegalovirus-specific CD4+ T cells is markedly expanded in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia and determines the total CD4+ T-cell repertoire / B. Pourgheysari, R. Bruton, H. Parry, L. Billingham, C. Fegan, J. Murray, P. Moss. // *Blood* – 2010. – V.116. – P.2968–2974.
174. The onco-embryonic antigen ROR1 is expressed by a variety of human cancers / S. Zhang, L. Chen, J. Wang-Rodriguez, L. Zhang, B. Cui, W. Frankel et al. // *Am J Pathol.* – 2012. – V.181(6). – P.1903-1910.
175. The planar cell polarity pathway drives pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia by the regulation of B-lymphocyte migration / M. Kauck, K. Plevova, S. Pavlov et al. // *Cancer Res.* – 2013. – V.73(5). – P.1491-1501.
176. The prognostic impact of minimal residual disease in patients with chronic lymphocytic leukemia requiring first-line therapy / R. Santacruz, N. Villamor, M. Aymerich et al. // *Haematologica.* – 2014. – V.99. – P.873–880.
177. The radioprotective 105/MD-1 complex links TLR2 and TLR4/MD-2 in antibody response to microbial membranes / Y. Nagai, T. Kobayashi, Y. Motoi, K. Ishiguro, S. Akashi, S. Saitoh, Y. Kusumoto, T. Kaisho, S. Akira,

- M. Matsumoto, K. Takatsu, K. Miyake //J. Immunol. – 2005. – V.174. – P.7043–7049.
178. The receptor tyrosine kinase ROR1 an oncofetal antigen for targeted cancer therapy / M. Hojjat-Farsangi, A. Moshfegh, A.H. Daneshmanesh, A.S. Khan, E. Mikaelsson, A. Osterborg et al. //Semin Cancer Biol. – 2014. – V.29. - P21-31.
179. The WNT/ROR Pathway in Cancer: From Signaling to Therapeutic Intervention / K. Menck, S. Heinrichs, C. Baden, A. Bleckmann //Cells. – 2021. – V.10(1). – 142p.
180. TIGIT expressing CD4+T cells represent a tumor-supportive T cell subset in chronic lymphocytic leukemia / K. Catakovic, F.J. Gassner, C. Ratswohl, N. Zaborsky, S. Rebhandl, M. Schubert, M. Steiner, J.C. Gutjahr, L. Pleyer, A. Egle et al. // Oncoimmunology – 2017. – V.7. - e1371399.
181. Toll-like receptors on hematopoietic progenitor cells stimulate innate immune system replenishment / Y. Nagai, K. P. Garrett, S. Ohta U., Bahrun, T. Kouro, S. Akira, K. Takatsu, P.W. Kincade //Immunity. - 2006; - V.24. - P.801–812.
182. Tyrosine Kinase ROR1 as a Target for Anti-Cancer Therapies / Y. Zhao, D. Zhang, Y. Guo, B. Lu, Z. Joe, X. Xu, Y. Chen //Frontiers in Oncology. – 2021. – V.11. – P.1-8.
183. Unique cell surface expression of receptor tyrosine kinase ROR1 in human B-cell chronic lymphocytic leukemia / S. Baskar, K.Y. Kwong, T. Hofer et al. //Clin Cancer Res. – 2008. – V.14(2) – P.396–404.
184. Updated results from the phase 3 HELIOS study of ibrutinib, bendamustine, and rituximab in relapsed chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma / G. Fraser, P. Cramer, F. Demirkan et al. //Leukemia. – 2019. – V.33. – P.969–980.
185. Vaccine-induced, pseudorabies virus-specific, extrathymic CD4+CD8+ memory T-helper cells in swine / B.T. Ober, A. Summerfield, C.

- Mattlinger, K.H. Wiesmuller, G. Jung, E. Pfaff, A. Saalmuller, H.J. Rziha // *J. Virol.* – 1998. – V.72. – P.4866-4873.
186. Vav proteins are required for B-lymphocyte responses to LPS / B. Hebeis, E. Vigorito, D. Kovesdi, M. Turner // *Blood.* – 2005. – 106. – P.635–640.
187. Watson, L. Disease burden of chronic lymphocytic leukaemia within the European Union / L. Watson, P. Wyld, D. Catovsky // *Eur. J. Haematol.* - 2008. – V.81, N4. - P.253–258.
188. Wen, T. Presence of clonal T cell populations in chronic B lymphocytic leukemia and smoldering myeloma / T. Wen, H. Mellstedt, M. Jondal // *J. Exp. Med.* – 1990. – V.171. – P.659–666.
189. Wiestner, A. The role of B-cell receptor inhibitors in the treatment of patients with chronic lymphocytic leukemia / A. Wiestner // *Haematologica.* – 2015. – V.100. – P.1495–1507.
190. Wnt5a Causes ROR1 to Complex and Activate Cortactin to Enhance Migration of Chronic Lymphocytic Leukemia Cells / K. Hasan, L. Rassenti, G.F. Widhopf, J. Yu, T.J. Kipps // *Leukemia.* – 2019. – V.33. – P.653–661.
191. Wnt5a Induces ROR1 to Associate With 14-3-3zeta for Enhanced Chemotaxis and Proliferation of Chronic Lymphocytic Leukemia Cells / J. Yu, L. Chen, Y. Chen, M.K. Hasan, E.M. Ghia, L. Zhang et al. // *Leukemia* – 2017. – V.31. – P.2608–2614.
192. Wnt5a Induces ROR1 to Complex With HS1 to Enhance Migration of Chronic Lymphocytic Leukemia Cells / M.K. Hasan, J. Yu, L. Chen, B. Cui, G.F. Widhopf II, L. Rassenti et al. // *Leukemia.* – 2017. – V.31. – P.2615–2622.
193. Wnt5a Induces ROR1 to Recruit DOCK2 to Activate Rac1/2 in Chronic Lymphocytic Leukemia / K. Hasan, J. Yu, G.F. Widhopf 2nd, L.Z. Rassenti, L. Chen, Z. Shen et al. // *Blood.* – 2018. – V.132. – P.170–178.

194. Wnt5a induces ROR1/ROR2 heterooligomerization to enhance leukemia chemotaxis and proliferation / J. Yu, L. Chen, B. Cui et al. // *J. Clin. Invest.* – 2016. – V.126. – P.585–598.
195. Zuckermann, F.A. Extrathymic CD4/CD8 double positive T cell / F.A. Zuckermann // *Veterinari. Immunol. // Immunopathol.* – 1999. – V.2. – P.55-66.
196. Zuckermann, F.A., Husmann R. J. Functional and phenotypic analysis of porcine peripheral blood CD4/CD8 double-positive T cells / F.A. Zuckermann, R.J. Husmann // *Immunology* – 1996. – V.87. – P.500-512.