

## ЛИМФОИДНЫЕ ОПУХОЛИ

## LYMPHOID TUMORS

### Субпопуляционный состав иммунокомпетентных клеток периферической крови при В-клеточном хроническом лимфолейкозе/лимфоме из малых лимфоцитов

### Pattern of Immunocompetent Peripheral Blood Cell Subpopulations in B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia/Small Lymphocytic Lymphoma

*Е.Г. Кузьмина, Т.Ю. Мушкарина, Т.В. Константинова, С.В. Зацаренко, С.В. Шахтарина, А.Ю. Терехова, Н.А. Фалалева, Л.Ю. Гривцова*

*EG Kuzmina, TYu Mushkarina, TV Konstantinova, SV Zatsarenko, SV Shakhtarina, AYu Terekhova, NA Falaleeva, LYu Gritsova*

Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба — филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, ул. Королева, д. 4, Обнинск, Калужская область, Российская Федерация, 249036

AF Tsyb Medical Radiological Research Centre, branch of the NMRC of Radiology, 4 Koroleva str., Obninsk, Kaluga Region, Russian Federation, 249036

#### РЕФЕРАТ

**Актуальность.** Согласно классификации ВОЗ, лимфома из малых лимфоцитов (ЛМЛ) и В-клеточный хронический лимфолейкоз (В-ХЛЛ) с учетом сходного иммунофенотипа опухолевых клеток объединены в один нозологический вариант лимфоидных опухолей. До настоящего времени единого мнения относительно их общности и различий нет. Разграничение В-ХЛЛ и ЛМЛ лежит в сфере клинических и гематологических проявлений опухолей. Причиной различий, обуславливающих степень распространенности опухолевого процесса у конкретного больного, могут служить особенности состояния отдельных звеньев иммунитета. Сопоставление показателей иммунной системы в модели ХЛЛ/ЛМЛ дает уникальную возможность проследить характер изменений показателей иммунитета при локализованном и распространенном патогенетически сходных опухолевых процессах и выявить возможные факторы прогноза.

**Цель.** Сравнение количественного состава субпопуляций лимфоцитов периферической крови при ЛМЛ и В-ХЛЛ.

**Материалы и методы.** Иммунокомпетентные клетки (относительное и абсолютное число Т-лимфоцитов, NK-клеток), иммунофенотип и объем опухолевого клона оценены методом многоцветной проточной цитометрии по экспрессии антигенов CD3, CD4, CD8, CD16, CD19, CD20, CD23, CD5, CD79b, FMC7, CD22, CD43, CD38, легких цепей иммуноглобулинов Igk и Igl. До начала противоопухолевой терапии мы сопоставили данные 17 пациентов с ЛМЛ и 81 — с ХЛЛ (22 с числом В-лимфоцитов в формуле крови 35–79 % и 59 — с 80–99 %). В качестве контрольной группы проанализированы субпопуляции лимфоцитов периферической крови у 50 условно здоровых лиц (доноров крови).

**Результаты.** Анализ NK-клеток и субпопуляций Т-лимфоцитов при ЛМЛ показал сохранность количества киллерных/цитотоксических клеток врожденного

#### ABSTRACT

**Background.** In the WHO classification small lymphocytic lymphoma (SLL) and B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) are combined into one nosological entity of lymphoid tumors due to their similar tumor cell immunophenotype. Up to now, there is no consensus on either their similarities or the differences between them. Distinction between B-CLL and SLL is drawn with respect to clinical and hematological manifestations of tumors. The reason for the differences that determine tumor spreading in a patient may lie in specific states of some immune system components. Comparison of immune system parameters within the CLL/SLL model provides a unique opportunity to trace the behavior of immunity indicators in local und disseminated pathogenetically similar neoplastic processes and to identify possible prognostic factors.

**Aim.** To compare quantitative representations of peripheral blood lymphocyte subpopulations in SLL and B-CLL.

**Materials & Methods.** Immunocompetent cells (relative and absolute T- and NK-cell counts), immunophenotype, and tumor clone volume were assessed using multicolor flow cytometry based on the expression of CD3, CD4, CD8, CD16, CD19, CD20, CD23, CD5, CD79b, FMC7, CD22, CD43, CD38 antigens, and immunoglobulins light chain Igk and Igl. Before chemotherapy onset, the data of 17 SLL and 81 CLL patients (22 of them with B-lymphocyte count of 35–79 % and 59 with 80–99 %) were compared. As a control, peripheral blood lymphocyte subpopulations in 50 relatively healthy individuals (blood donors) were analyzed.

**Results.** The analysis of NK-cells and T-lymphocyte subpopulations in SLL showed the preserved number of killer/cytotoxic cells of innate and adaptive immunity (CD16+, CD8+), the reduction of CD4+ T-cell count, and CD4/CD8 ratio. In CLL a considerable increase of main subpopulations of residual normal lymphocytes was detected. However, the ex-

и адаптивного иммунитета (CD16+, CD8+), снижение числа Т-клеток CD4+ и соотношения CD4/CD8. При ХЛЛ установлено значительное повышение основных субпопуляций резидуальных нормальных лимфоцитов. Однако степень их повышения оказалась значительно ниже увеличения объема злокачественного В-клеточного клона, что свидетельствует о нарастающем истощении эффекторных звеньев иммунитета.

**Заключение.** В ходе проведенного исследования установлены особенности субпопуляционного состава резидуальных нормальных лимфоцитов при ЛМЛ и ХЛЛ с различным уровнем лейкоцитоза. Группу ЛМЛ характеризовало снижение относительного и абсолютного числа Т-клеток с фенотипом Т-хелперов (CD3+, CD4+) и увеличение количества цитотоксических Т-клеток CD8+ и NK-клеток. Лимфоцитоз (35–79 %) в группе ХЛЛ-I был обусловлен не только опухолевыми В-клетками, но и абсолютным числом Т-киллеров (CD16+, CD8+) и Т-хелперов (CD4+), уровень которых был в 1,7–2,5 раза выше, чем при ЛМЛ и в группе контроля. Субпопуляционный состав резидуальных лимфоцитов (80–99 %) в группе ХЛЛ-II в сравнении с группой контроля отличался значимым повышением абсолютного числа Т-клеток CD8+ и NK-клеток CD16+, а также увеличением Т-регуляторного индекса в сравнении с группами ЛМЛ и ХЛЛ-I. Полученные данные указывают на необходимость более детального изучения субпопуляционного состава резидуальных лимфоцитов в модели ЛМЛ/ХЛЛ с целью поиска дополнительных факторов развития болезни.

**Ключевые слова:** хронический лимфоцитарный лейкоз/лимфома из малых лимфоцитов, клон опухолевых В-клеток, субпопуляции лимфоцитов периферической крови, проточная цитометрия.

tent of their increase proved to be considerably lower than increase in the volume of tumor B-cell clone, which signifies a rising exhaustion of immune system effector components.

**Conclusion.** The present study yielded characteristic features of residual normal lymphocyte subpopulations in SLL and CLL with different leukocytosis grades. SLL patients demonstrated the reduction of relative and absolute T-cell counts with T-helper (CD3+, CD4+) phenotype, and the increase of cytotoxic CD8+ T-cells and NK-cells. Lymphocytosis (35–79 %) in the CLL-I group was due not only to tumor B-cells but also to T-killer (CD16+, CD8+) and T-helper (CD4+) absolute counts, which were 1.7–2.5 times higher than in SLL and the control group. Residual lymphocyte subpopulation pattern (80–99 %) in the CLL-II group compared with the control group was characterized by a significantly higher absolute count of CD8+ T-cells and CD16+ NK-cells, as well as higher T-regulatory index compared with SLL and CLL-I groups. These data point to the necessity for further and more detailed study of residual lymphocyte subpopulation pattern within the CLL/SLL model in order to identify additional predisposing factors.

**Keywords:** chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma, tumor B-cell clone, peripheral blood lymphocyte subpopulations, flow cytometry.

**Получено:** 22 апреля 2020 г.

**Принято в печать:** 30 августа 2020 г.

*Для переписки:* Светлана Валерьевна Зацаренко, ул. Королева, д. 4, Обнинск, Калужская обл., Российская Федерация, 249031; e-mail: vesper04@mail.ru

*Для цитирования:* Кузьмина Е.Г., Мушкарина Т.Ю., Константинова Т.В. и др. Субпопуляционный состав иммунокомпетентных клеток периферической крови при В-клеточном хроническом лимфолейкозе/лимфоме из малых лимфоцитов. Клиническая онкогематология. 2020;13(4):395–405.

DOI: 10.21320/2500-2139-2020-13-4-395-405

**Received:** April 22, 2020

**Accepted:** August 30, 2020

*For correspondence:* Svetlana Valer'evna Zatsarenko, 4 Koroleva str., Obninsk, Kaluga Region, Russian Federation, 249031; e-mail: vesper04@mail.ru

*For citation:* Kuzmina EG, Mushkarina TYu, Konstantinova TV, et al. Pattern of Immunocompetent Peripheral Blood Cell Subpopulations in B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia/Small Lymphocytic Lymphoma. Clinical oncohematology. 2020;13(4):395–405. (In Russ).

DOI: 10.21320/2500-2139-2020-13-4-395-405

## ВВЕДЕНИЕ

Хронический лимфоцитарный лейкоз/лимфома из малых лимфоцитов — наиболее распространенная, часто встречающаяся форма заболеваний кроветворной и лимфоидной тканей В-клеточной природы. В классификации Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ; 2001, 2008, 2016 гг.) лимфома из малых лимфоцитов (ЛМЛ) и В-клеточный хронический лимфолейкоз (В-ХЛЛ) рассматриваются в единой биологической группе опухолей, происходящих из

зрелых В-клеток. Диагностическим критерием В-ХЛЛ является присутствие более  $5 \times 10^9$  В-клеток CD5+ в 1 л периферической крови в течение более 3 мес., а также поражение лимфатических узлов и костного мозга. В то же время для ЛМЛ характерно поражение лимфатических узлов и костного мозга без выраженного лимфоцитоза в крови ( $< 5 \times 10^9$ /л В-клеток CD5+) [1–5].

ХЛЛ/ЛМЛ — как правило, длительно текущее заболевание. Выделяют определенные этапы функционирования опухолевых В-лимфоцитов: образование и накопление пула опухолевых клеток в костном мозге

и других лимфоидных органах и тканях; частичный выход в циркуляцию преимущественно покоящихся клеток с замедленной гибелью; возврат в костный мозг и лимфатическую систему, где они включаются в пролиферативный цикл с формированием новых и расширением прежних пролиферативных центров (ранее называвшихся псевдофолликулами). В крови обнаруживают преимущественно слабо пролиферирующие, долгоживущие клоны В-клеток с фенотипом CD20+CD5+ и сниженной способностью опухолевых лимфоцитов к апоптозу [6–8].

Внедрение многоцветной проточной цитометрии, в частности 4-цветного европейского протокола ERIC, позволило усовершенствовать первичную диагностику ХЛЛ и стандартизовать многие ее подходы. В последующем диагностическая панель моноклональных антител, внедренная А. Rawston в клиническую практику и включающая антитела к антигенам CD81, CD22, CD5, CD43, CD19, CD20, упрочила и унифицировала подходы и возможности проточной цитометрии в диагностике В-ХЛЛ [9, 10]. Их разработка продолжается и в настоящее время: предложена 8-цветная панель, позволяющая проводить дифференциальную диагностику всех типов В-зрелоклеточных лимфо-пролиферативных заболеваний [11, 12].

Значительная роль в патогенезе В-ХЛЛ на этапе антигензависимого функционирования наивных В-клеток с измененной структурой В-клеточного рецептора отводится нарушениям их взаимодействия с Т-клетками и нарушениям иммунного противоопухолевого реагирования эффекторных Т-клеток [13–15]. В связи с этим изучение особенностей функционирования иммунитета на начальных этапах развития и при прогрессировании злокачественных лимфо-пролиферативных заболеваний остается актуальным для понимания фундаментальных основ патологии, выяснения специфических проблем развития и прогрессирования периферических В-клеточных лимфом, а также для выявления дополнительных маркеров прогноза исхода болезни.

ЛМЛ и ХЛЛ представляют собой две реально существующие клинические формы злокачественного лимфо-пролиферативного заболевания: локализованного в лимфатических узлах и с минимальной пролиферацией опухолевых лимфоидных клеток в костном мозге без выхода их в кровь (ЛМЛ) и более системного распространенного процесса с развернутым лейкоэмическим составом костного мозга и крови (В-ХЛЛ) [1, 2, 5]. До сих пор нет единства мнений относительно их общности и различий. Если исходить из предположения, что ЛМЛ и ХЛЛ представляют собой один и тот же злокачественный процесс, различающийся только по характеру и степени распространенности, то, возможно, различия клинического течения между ними обусловлены нарушениями функционального состояния иммунной системы. Таким образом, модель ХЛЛ/ЛМЛ является уникальной для оценки и сопоставления уровня и компетенции клеток врожденного и адаптивного иммунитета при условно локализованном (преимущественно внекостномозговом) и распространенном (преимущественно костномозговом) опухолевых процессах: ЛМЛ и В-ХЛЛ соответственно.

**Цель настоящего исследования** — сравнить количественные показатели субпопуляций лимфоцитов периферической крови при ЛМЛ и В-ХЛЛ.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Пациенты

В исследовании проанализировано 98 образцов периферической крови: 17 больных с ЛМЛ и 81 — с В-ХЛЛ, проходивших обследование и лечение в МРНЦ им. А.Ф. Цыба — филиале ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России. В качестве группы контроля изучались субпопуляции иммунокомпетентных клеток 50 здоровых доноров крови.

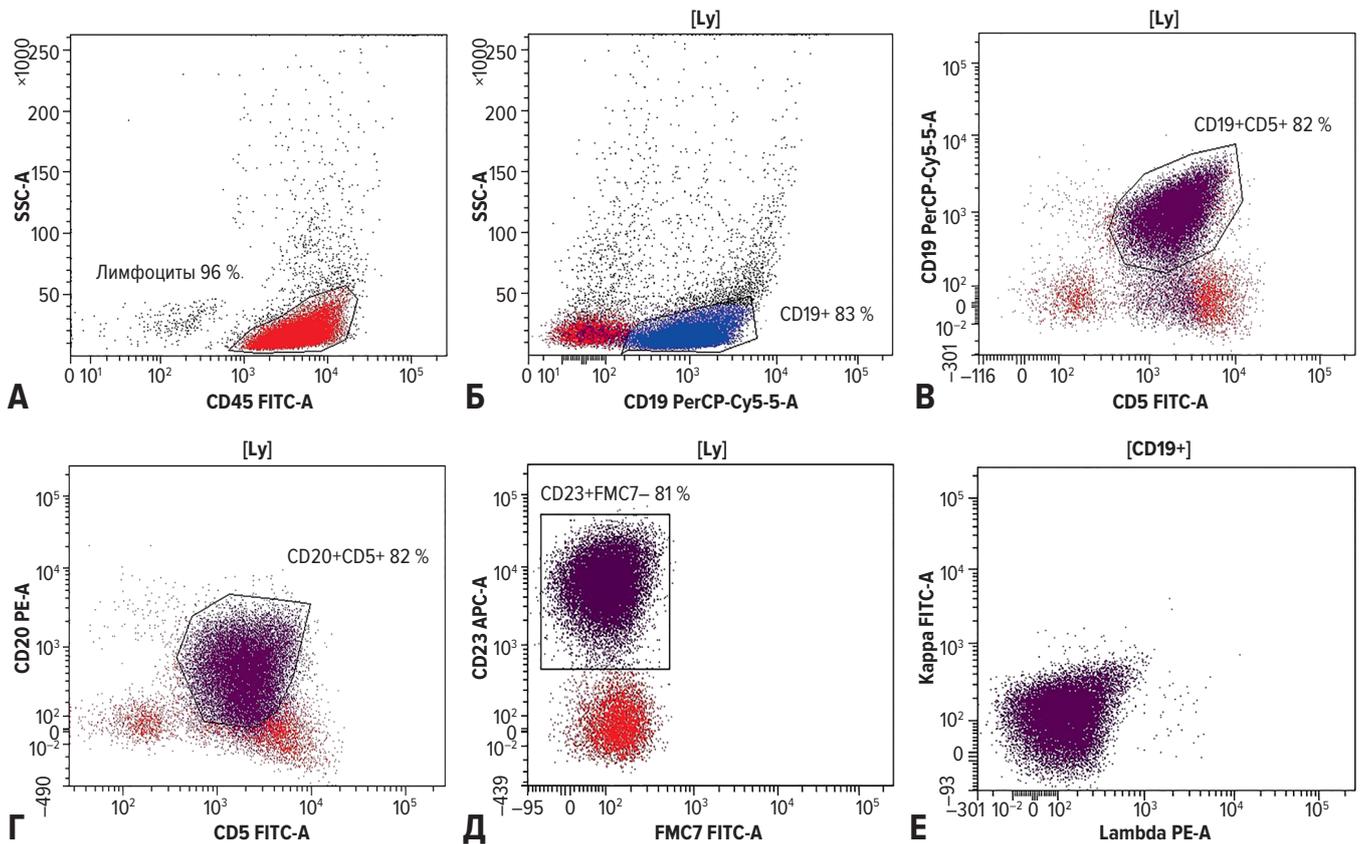
Диагноз ЛМЛ и ХЛЛ установлен в соответствии с критериями классификации опухолей кроветворной и лимфоидной тканей ВОЗ (2016 г.). Выполняли ультразвуковое, магнитно-резонансное исследования, иммуногистохимическое исследование материала лимфатических узлов и иммунофенотипирование образцов периферической крови и костного мозга [2, 3].

Среди больных, включенных в исследование, выделено три группы: 1-я группа — 17 больных ЛМЛ с условно локализованным процессом в лимфатических узлах без выраженных признаков поражения костного мозга по показателям миелограммы. Количество В-клеток CD19+CD5+CD23+ не превышало 10 % ( $4,86 \pm 0,91$  %), а абсолютное число составило в среднем  $0,17 \pm 0,07 \times 10^9$ /л. Больные ХЛЛ подразделены на группы в зависимости от числа лимфоцитов периферической крови. Во 2-ю группу (ХЛЛ-I) включено 22 пациента, у которых наряду с патологическим процессом в лимфатических узлах и костном мозге лимфоцитоз крови был на уровне 35–79 %, число аберрантных опухолевых В-лимфоцитов CD19+CD5+CD23+ составило  $8,93 \pm 1,40 \times 10^9$ /л. 3-я группа (ХЛЛ-II) — 59 пациентов с диагнозом В-ХЛЛ, у которых помимо специфического поражения костного мозга и лимфатических узлов лимфоцитоз крови был в пределах 80–99 %, а число аберрантных В-клеток составляло  $48,9 \pm 7,31 \times 10^9$ /л.

### Имунофенотипирование

Имунофенотип В-лимфоцитов и субпопуляции иммунокомпетентных клеток охарактеризованы методом многопараметрической (6-цветной) проточной цитометрии на приборе FACSCanto II (BD Biosciences, США). Во всех случаях оценена экспрессия антигенов CD19, CD5, CD23, CD20, CD79b, FMC7, CD22, CD43, CD38, легких цепей иммуноглобулинов Igκ и Igλ. В отдельных случаях дополнительно изучалась экспрессия антигенов CD81 и CD200.

Определение относительного и абсолютного числа Т-, В-, NK-клеток проводилось двухплатформенным методом. Использовались моноклональные антитела к CD45, CD3, CD4, CD8, CD20, CD16, HLA-DR. Подсчитывали количество лейкоцитов, относительное и абсолютное число лимфоцитов по гемограмме. С учетом этих данных оценивали количество Т-клеток CD3+CD16–, Т-хелперов CD3+CD4+, Т-цитотоксических (киллерных) клеток CD3+CD8+, NK-клеток CD16+CD3–, В-лимфоцитов и их субпопуляций (CD19, CD20+CD5+, CD19+CD5+CD23+).



**Рис. 1.** Алгоритм иммунофенотипирования при хроническом лимфолейкозе:

А — выделен гейт лимфоцитов; Б — определено относительное содержание В-лимфоцитов; В–Д — показан уровень клональных В-клеток (CD19+CD20+CD5+CD23+FMC7–) в пределах гейта лимфоцитов; Е — четкой рестрикции легких цепей иммуноглобулинов на клональных В-клетках не выявлено

**Fig. 1.** Immunophenotyping algorithm in chronic lymphocytic leukemia:

А — lymphocyte gate is detected; Б — relative B-lymphocyte count is determined; В–Д — clonal B-cell (CD19+CD20+CD5+CD23+FMC7–) level is shown within the lymphocyte gate; Е — no clear immunoglobulin light chain restriction is detected on clonal B-cells

Последовательность диагностического иммунофенотипирования клеток В-ХЛЛ приведена на рис. 1.

#### Статистический анализ

Для сравнения средних групповых показателей использовали *t*-критерий Стьюдента и непараметрический *U*-критерий Манна–Уитни. Оценка различий проводилась по общепринятому порогу значимости  $p \leq 0,05$ . Для выявления взаимодействия показателей применяли корреляционный анализ Спирмена [16, 17].

Данные в таблицах представлены в виде средних с указанием ошибок средних ( $M \pm m$ ).

Статистическая обработка проведена в программе STATISTICA 8.0.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

#### Объем моноклональной пролиферации В-лимфоцитов периферической крови у пациентов с ЛМЛ и ХЛЛ

У подавляющего большинства пациентов (90 %) пролиферирующие опухолевые клетки имели классический иммунофенотип ХЛЛ: CD19+CD5+CD23+CD20dim с рестрикцией легких цепей иммуноглобулина. В 10 % случаев выявлен нетипичный

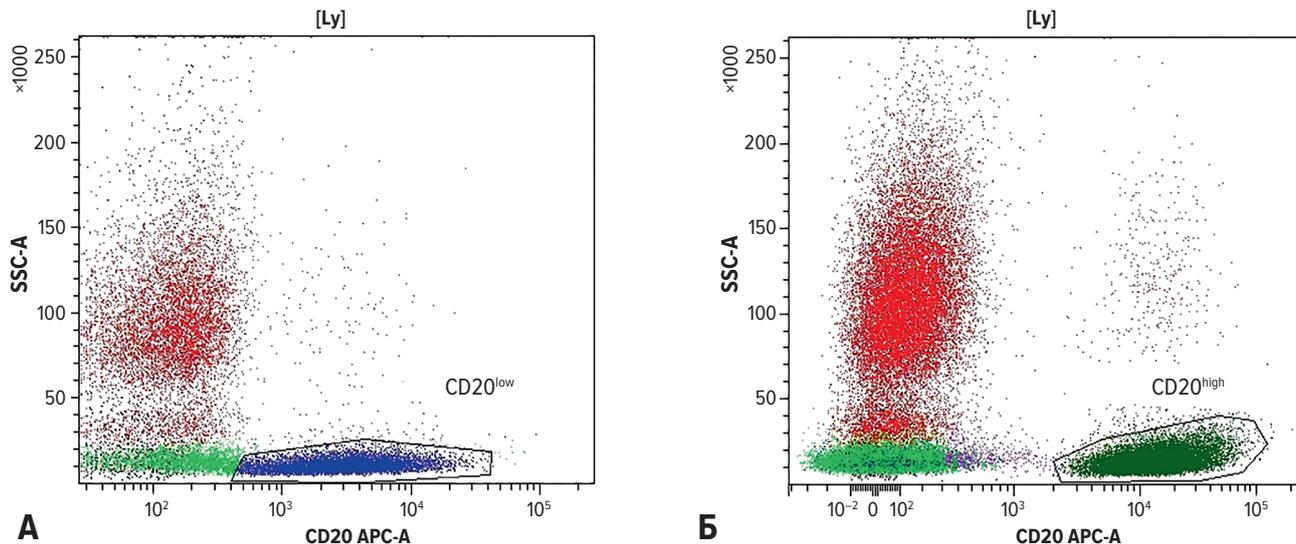
для В-ХЛЛ иммунофенотип: со слабой или нечеткой экспрессией CD23 либо CD5, яркой экспрессией CD20 (рис. 2 и 3). Диагноз В-ХЛЛ при этом подтвержден данными иммуногистохимических исследований материала биопсии, а также определением иммунофенотипа лимфоцитов периферической крови.

Сопоставлено относительное и абсолютное число В-лимфоцитов в периферической крови, выявляемых по коэкспрессии В-клеточных маркеров (CD19, CD20, CD23, CD5) в группах доноров крови (контроль), пациентов с ЛМЛ с отсутствием/низкой опухолевой пролиферацией в крови и в двух группах пациентов с ХЛЛ с выраженной моноклональной В-клеточной пролиферацией в крови. Во 2-й группе уровень лимфоцитов в крови колебался в интервале 35–79 %, а в 3-й группе — в интервале 80–99 % (табл. 1).

В контрольной группе (доноры) коэкспрессия CD20+CD5+ обнаружена на 1,5 % В-лимфоцитов. В-клетки с коэкспрессией CD5+CD23+ не выявлены.

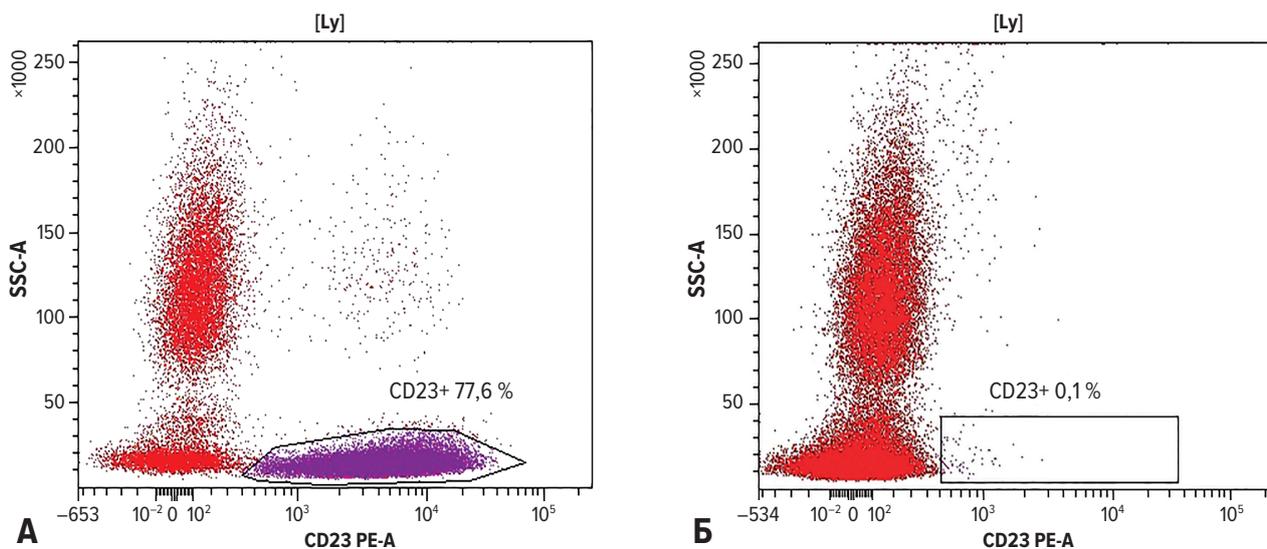
В группе ЛМЛ относительное и абсолютное число клеток CD20+CD5+ в 2,5–3 раза статистически значимо превышали таковые в группе контроля ( $p < 0,05$ ). Среднее количество опухолевых В-клеток с фенотипом CD19+CD5+CD23+ составило  $0,17 \pm 0,08 \times 10^9/\text{л}$ .

В группе ХЛЛ-I относительное число клональных В-клеток в 10–12 раз превышало их уровень при ЛМЛ, а абсолютное их количество — в 25–50 раз. В 3-й



**Рис. 2.** Интенсивность экспрессии антигена CD20 при хроническом лимфолейкозе: А — низкая интенсивность экспрессии антигена (CD20<sup>low</sup>) при классическом иммунофенотипе ХЛЛ; Б — высокая интенсивность экспрессии антигена (CD20<sup>high</sup>) при нетипичном иммунофенотипе ХЛЛ

**Fig. 2.** Expression intensity of CD20 antigen in chronic lymphocytic leukemia: А — low intensity of antigen expression (CD20<sup>low</sup>) in classical CLL immunophenotype; Б — high intensity of antigen expression (CD20<sup>high</sup>) in atypical CLL immunophenotype



**Рис. 3.** Экспрессии антигена CD23 при хроническом лимфолейкозе: А — уровень CD23 при классическом иммунофенотипе ХЛЛ; Б — отсутствие экспрессии CD23 при нетипичном иммунофенотипе ХЛЛ

**Fig. 3.** CD23 antigen expression in chronic lymphocytic leukemia: А — CD23 expression in classical CLL immunophenotype; Б — no CD23 expression in atypical CLL immunophenotype

группе относительное число В-клеток CD5+CD20+ было в 14–15 раз больше по сравнению с группой ЛМЛ, а В-клеток CD20+CD5+ и CD19+CD5+CD23+ — в 100–300 раз больше. Выявлен логарифмический темп прироста абсолютного числа опухолевых В-лимфоцитов при ХЛЛ.

Таким образом, при ХЛЛ с тотальным замещением нормальных лимфоцитов aberrантными В-клетками темпы прироста опухолевых клеток на порядок превышают их прирост при относительно стабильном течении процесса. Абсолютные показатели объема клональной пролиферации более выразительно, чем относительные, характеризуют различия между сравниваемыми группами.

**Особенности субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови у пациентов с ЛМЛ**

В табл. 2 представлены данные о состоянии иммунитета в группах ЛМЛ/ХЛЛ. При ЛМЛ в 40 % случаев выявлено повышенное число лейкоцитов, статистически значимо отличающееся от уровня лейкоцитов доноров ( $p < 0,05$ ).

Вместе с тем в данной группе относительное и абсолютное число лимфоцитов, естественных киллеров, NK-клеток CD16+ и Т-цитотоксических лимфоцитов CD8+ не отличались от показателей в контрольной группе ( $p > 0,05$ ). При этом относительное и абсолютное число Т-клеток CD4+ и их соотношение с Т-ци-

Таблица 1. Характеристика показателей В-клеток в анализируемых группах пациентов с ЛМЛ и ХЛЛ

Показатель	Группа контроля (доноры крови), М ± m	1-я группа (ЛМЛ, условно локализованный процесс), М ± m	2-я группа (ХЛЛ-I), М ± m	3-я группа (ХЛЛ-II), М ± m
Число пациентов	50	17	22	59
Лейкоциты, ×10 <sup>9</sup> /л	6,19 ± 0,16	9,55 ± 0,76	26,03 ± 5,95 <sup>а,б</sup>	68,31 ± 8,86 <sup>а,б,в</sup>
Лимфоциты, %	33,73 ± 1,02	36,65 ± 4,72	68,35 ± 2,28 <sup>а,б,г</sup>	87,92 ± 0,73 <sup>а,б,в</sup>
Лимфоциты, ×10 <sup>9</sup> /л	2,05 ± 0,06	2,56 ± 0,69	18,60 ± 4,74 <sup>а,б,г</sup>	62,02 ± 8,61 <sup>а,б,в</sup>
CD19, %	8,27 ± 0,33	17,88 ± 4,95	72,48 ± 2,64 <sup>а,б</sup>	83,57 ± 1,67 <sup>а,б</sup>
CD19, ×10 <sup>9</sup> /л	0,17 ± 0,01	0,81 ± 0,53	15,19 ± 5,02 <sup>а,б</sup>	50,39 ± 6,89 <sup>а,б,в</sup>
CD20+CD5+, %	1,50 ± 0,25	3,72 ± 0,77 <sup>а</sup>	47,17 ± 5,43 <sup>а,б</sup>	57,17 ± 3,37 <sup>а,б</sup>
CD20+CD5+, ×10 <sup>9</sup> /л	0,030 ± 0,006	0,33 ± 0,10 <sup>а</sup>	9,22 ± 2,98 <sup>а,б</sup>	36,65 ± 5,81 <sup>а,б,в</sup>
CD19+CD5+CD23+, %	—	4,86 ± 0,91	56,68 ± 4,35 <sup>б</sup>	73,02 ± 2,74 <sup>а,б</sup>
CD19+CD5+CD23+, ×10 <sup>9</sup> /л	—	0,17 ± 0,09	8,93 ± 1,40 <sup>б</sup>	48,93 ± 7,31 <sup>а,б,в</sup>

ЛМЛ — лимфома из малых лимфоцитов; ХЛЛ — хронический лимфолейкоз.

<sup>а</sup> Различия статистически значимы по сравнению с группой контроля ( $p < 0,05$ ).

<sup>б</sup> Различия статистически значимы по сравнению с 1-й группой ( $p < 0,05$ ).

<sup>в</sup> Различия статистически значимы по сравнению со 2-й группой ( $p < 0,05$ ).

<sup>г</sup> Различия статистически значимы по сравнению с 3-й группой ( $p < 0,05$ ).

Таблица 2. Субпопуляции Т-лимфоцитов и NK-клеток периферической крови в анализируемых группах пациентов с ЛМЛ и ХЛЛ

Показатель	Группа контроля (доноры крови), М ± m	1-я группа (ЛМЛ, условно локализованный процесс), М ± m	2-я группа (ХЛЛ-I), М ± m	3-я группа (ХЛЛ-II), М ± m
Число пациентов	50	17	22	59
Лейкоциты, ×10 <sup>9</sup> /л	6,11 ± 0,18	9,06 ± 0,79 <sup>а</sup>	26,03 ± 5,95 <sup>а,б</sup>	68,31 ± 8,86 <sup>а,б,в</sup>
Лимфоциты, %	33,73 ± 1,02	36,65 ± 4,72	68,35 ± 2,28 <sup>а,б,г</sup>	87,92 ± 0,73 <sup>а,б,в</sup>
Лимфоциты, ×10 <sup>9</sup> /л	2,05 ± 0,06	2,43 ± 0,69	18,60 ± 4,74 <sup>а,б,г</sup>	62,02 ± 8,61 <sup>а,б,в</sup>
CD3+, %	69,57 ± 0,84	61,24 ± 4,07	23,86 ± 2,64 <sup>а,б,г</sup>	12,47 ± 1,25 <sup>а,б</sup>
CD3, ×10 <sup>9</sup> /л	1,43 ± 0,05	1,20 ± 0,22	3,21 ± 1,47 <sup>а,б</sup>	5,26 ± 0,44 <sup>а,б</sup>
CD4+, %	42,53 ± 0,89	31,35 ± 2,16 <sup>а</sup>	11,50 ± 1,33 <sup>а,б</sup>	6,37 ± 0,60 <sup>а,б,в</sup>
CD4, ×10 <sup>9</sup> /л	0,87 ± 0,03	0,60 ± 0,10 <sup>а</sup>	1,49 ± 0,13 <sup>а,б,г</sup>	2,71 ± 0,25
CD8+, %	26,87 ± 0,75	31,29 ± 3,13	10,50 ± 1,39 <sup>а,б</sup>	4,77 ± 0,45 <sup>а,б</sup>
CD8, ×10 <sup>9</sup> /л	0,56 ± 0,024	0,61 ± 0,13	1,42 ± 0,20 <sup>а,б</sup>	2,20 ± 0,24 <sup>а,б</sup>
CD4/CD8	1,73 ± 0,05	1,30 ± 0,22 <sup>а</sup>	1,29 ± 0,15 <sup>а</sup>	1,37 ± 0,09 <sup>а</sup>
CD16+, %	16,89 ± 0,83	16,00 ± 1,92	5,50 ± 0,81 <sup>а,б</sup>	3,28 ± 0,35 <sup>а,б,в</sup>
CD16+, ×10 <sup>9</sup> /л	0,31 ± 0,016	0,31 ± 0,05	0,78 ± 0,11 <sup>а,б,г</sup>	1,73 ± 0,29 <sup>а,б</sup>

ЛМЛ — лимфома из малых лимфоцитов; ХЛЛ — хронический лимфолейкоз.

<sup>а</sup> Различия статистически значимы по сравнению с группой контроля ( $p < 0,05$ ).

<sup>б</sup> Различия статистически значимы по сравнению с 1-й группой ( $p < 0,05$ ).

<sup>в</sup> Различия статистически значимы по сравнению со 2-й группой ( $p < 0,05$ ).

<sup>г</sup> Различия статистически значимы по сравнению с 3-й группой ( $p < 0,05$ ).

тотоксическими лимфоцитами CD8+ (иммунорегуляторный индекс, соотношение CD4/CD8) были значимо ниже, чем в контрольной группе ( $p < 0,05$ ). В то же время количество В-клеток CD20+CD5+ было больше, чем в контроле ( $p < 0,05$ ; см. табл. 1).

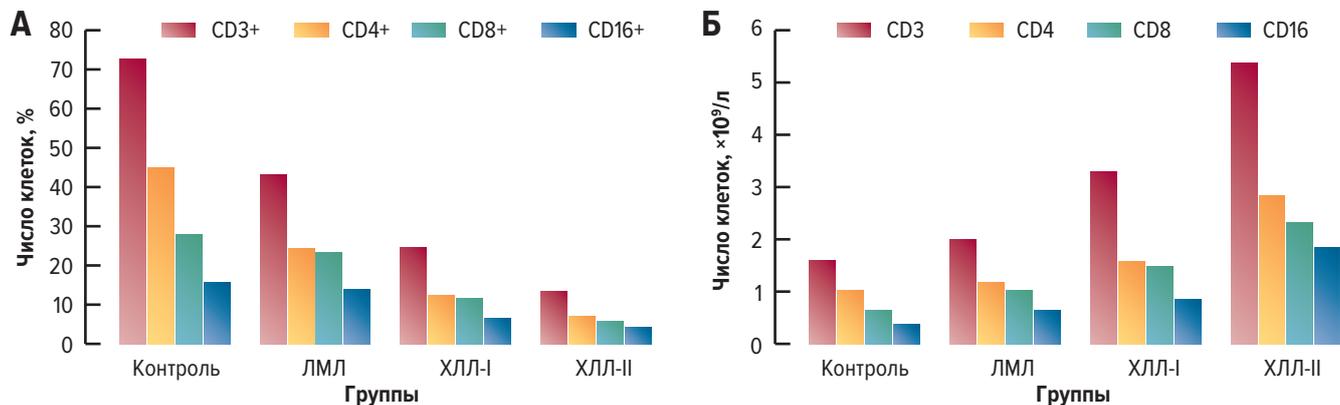
При сравнении средних показателей выявлена обратная корреляция абсолютного числа клональных опухолевых В-лимфоцитов с относительным и абсолютным числом Т-лимфоцитов CD8+ ( $r = -0,69$  и  $r = -0,55$  соответственно) и NK-клеток CD16+ ( $r = -0,72$  и  $r = -0,55$  соответственно), что косвенно указывает на подавление опухоли в первую очередь цитотоксического/киллерного звена иммунитета. Вместе с тем в 30 % случаев количество Т-лимфоцитов CD8+ в 1,5–2 раза превышало их уровень в контрольной группе. Такая же тенденция отмечена в 20 % случаев для NK-клеток CD16+. Данный факт подтверждает необходимость дальнейшего изучения киллерного звена для установления его роли и прогностической значимости при ЛМЛ.

Таким образом, к особенностям иммунитета группы ЛМЛ относятся наличие в крови у части больных аберрантного клона В-лимфоцитов, снижение относительного и абсолютного числа Т-клеток с фенотипом Т-хелперов (CD3+CD4+), снижение их соотношения с Т-цитотоксическими лимфоцитами (CD3+CD4+/CD3+CD8+) при увеличении количества цитотоксических Т-лимфоцитов (CD8+) и NK-клеток.

#### Особенности субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови у пациентов 2-й группы (ХЛЛ-I)

В настоящем разделе проанализирована иммунореактивность 22 больных ХЛЛ с уровнем лимфоцитов в среднем 68,35 % (диапазон 35–79 %) и абсолютным числом  $18,6 \times 10^9$ /л.

При значительном количестве опухолевых В-лимфоцитов в периферической крови резко снижено относительное содержание всех типов иммунокомпе-



**Рис. 4.** (А) Снижение относительного и (Б) повышение абсолютного числа Т-клеток (CD3+), Т-хелперов (CD4+), Т-киллеров (CD8+) и NK-клеток (CD16+) в периферической крови при ЛМЛ и в двух группах ХЛЛ. В группе ХЛЛ-I лимфоциты составляют 35–79 %, в группе ХЛЛ-II — 80–99 %. Данные о статистической значимости различий показателей между группами представлены в табл. 2  
ЛМЛ — лимфома из малых лимфоцитов; ХЛЛ — хронический лимфолейкоз.

**Fig. 4.** (A) Reduction of the relative and (B) increase of the absolute T-cell (CD3+), T-helper (CD4+), T-killer (CD8+), and NK-cell (CD16+) count in peripheral blood of patients in SLL and two CLL groups. In the CLL-I group lymphocytes account for 35–79 %, in the CLL-II group they account for 80–99 %. Data on significance of the differences between the groups are presented in Table 2

ЛМЛ — small lymphocytic lymphoma; ХЛЛ — chronic lymphocytic leukemia.

тентных клеток по сравнению с соответствующими клетками в группе доноров крови ( $p < 0,05$  для CD4+, CD8+, CD16+). Эта зависимость также находит отражение в отрицательных корреляционных связях количества опухолевых В-клеток с процентом Т-хелперов, Т-цитотоксических лимфоцитов и NK-клеток ( $r = -0,51$ ,  $r = -0,43$  и  $r = -0,36$  соответственно).

Однако выраженный лимфоцитоз формируется не только за счет опухолевых В-клеток. Естественные и специфические Т-киллеры (CD16+, CD8+) и Т-хелперы CD4+ также вносят свой вклад в повышение лимфоцитоза. Их уровни в 1,7–2,5 раза выше, чем при ЛМЛ и в группе контроля (рис. 4; см. табл. 2).

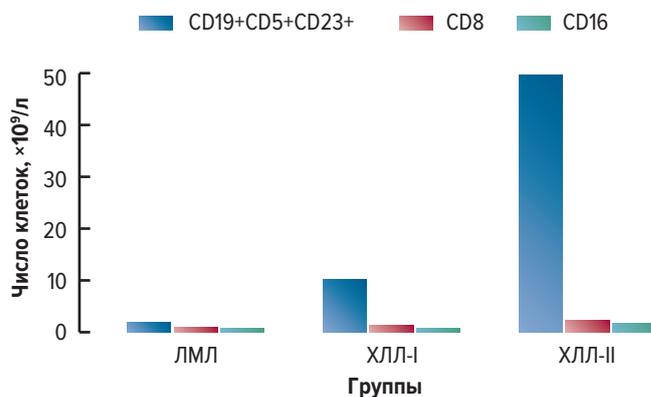
Количество aberrантных В-клеток (CD20+CD5+, CD19+CD5+CD23+) было значимо больше, чем при ЛМЛ (рис. 5).

Прирост клона обусловлен повышением числа лимфоцитов (прямая положительная корреляция,  $r = 0,95$ ). При этом возрастание абсолютного числа клональных В-лимфоцитов, отражающего опухолевый рост, и число нормальных Т-лимфоцитов и NK-клеток, характеризующих состояние иммунитета, различается более чем на порядок.

### Особенности субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови у пациентов 3-й группы (ХЛЛ-II)

В 3-й анализируемой группе (ХЛЛ с высоким уровнем опухолевых В-лимфоцитов в периферической крови) более отчетливо прослеживаются процессы активации иммунного ответа. Количество Т-клеток значительно увеличено. В 3,5–5 раз выше, чем в группах контроля и ЛМЛ, абсолютное число Т-клеток (субпопуляций CD4 и CD8) и NK-клеток (см. рис. 4). Различия по данным показателям между группами ЛМЛ, ХЛЛ-I и ХЛЛ-II статистически значимы ( $p < 0,05$ ; см. табл. 2).

Из-за резкого возрастания доли aberrантных В-клеток в группе ХЛЛ-II более выражено снижение относительного числа Т-хелперов, Т-цитотоксических лимфоцитов и NK-клеток ( $p < 0,05$  для всех показателей).



**Рис. 5.** Темп повышения в периферической крови числа Т-цитотоксических (CD8+) и естественных киллерных (CD16+) клеток по сравнению с темпами роста лимфоцитов В-клона (CD19+CD5+CD23+) при ЛМЛ и ХЛЛ. Данные о статистической значимости различий показателей между группами представлены в табл. 1 и 2

ЛМЛ — лимфома из малых лимфоцитов; ХЛЛ — хронический лимфолейкоз.

**Fig. 5.** Rate of peripheral blood T-cytotoxic (CD8+) and natural killer (CD16+) cell increase compared to the rate of B-clone (CD19+CD5+CD23+) lymphocyte increase in SLL and CLL. Data on significance of the differences between the groups are presented in Tables 1 and 2

ЛМЛ — small lymphocytic lymphoma; ХЛЛ — chronic lymphocytic leukemia.

Еще в большей степени проявляются различия в темпах роста абсолютного числа клональных В-лимфоцитов, количества нормальных Т-лимфоцитов и NK-клеток. Абсолютное число опухолевых В-клеток в 100–300 раз больше, чем при ЛМЛ, и в 4–6 раз больше, чем в группе ХЛЛ-I.

## ОБСУЖДЕНИЕ

В-ХЛЛ представляет собой особую форму злокачественного роста, при которой число лимфоцитов

в периферической крови значительно превышает норму. Большая часть из них опухолевые, другие — нормальные резидуальные иммунокомпетентные клетки. В абсолютном выражении количество Т-клеток в периферической крови велико.

Особенности субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови изучаются в основном при ХЛЛ или ХЛЛ в сравнении с моноклональным В-клеточным лимфоцитозом [5, 18–21]. Модель ХЛЛ/ЛМЛ является уникальной, поскольку позволяет сопоставить взаимосвязи иммунокомпетентных клеток с темпом опухолевого роста при локальных и системных проявлениях лимфопролиферации фактически в рамках одной нозологической формы. ЛМЛ изначально протекает в виде условно локализованного процесса с поражением лимфатических узлов и возможным минимальным вовлечением костного мозга, а В-ХЛЛ — системный распространенный процесс, при котором помимо лимфатических узлов и костного мозга аберрантные опухолевые лимфоциты обнаруживаются в периферической крови. В настоящее время обе формы объединены экспертами ВОЗ в одну общую биологическую группу — ХЛЛ/ЛМЛ [1–3].

Мы сопоставили уровни иммунокомпетентных клеток в трех группах пациентов: 1) ЛМЛ без признаков лейкоза ( $n = 17$ ); 2) ХЛЛ с числом лимфоцитов в крови 35–79 % ( $n = 22$ ); 3) ХЛЛ с числом лимфоцитов в крови 80–99 % ( $n = 59$ ). Проведены анализ и межгрупповое сравнение относительного и абсолютного числа субпопуляций Т-лимфоцитов и NK-клеток.

В настоящее время высказывается предположение о том, что при хронической стимуляции аутологичными или вирусными антигенами могут создаваться условия, способствующие выживанию лимфоцитов В-1, специфичных для индуцирующих их аутоантигенов, из которых при формировании ответа может быть выделена популяция клеток В-1а [22]. Популяция аутореактивных В-клеток предшествует развитию опухолевого клона при ХЛЛ/ЛМЛ и встречается у взрослых людей с частотой до 3,5 % [23]. Накопление таких лимфоцитов классифицируется как моноклональный В-клеточный лимфоцитоз, который в 1–4 % случаев может трансформироваться в В-ХЛЛ [3].

Результаты исследований показывают, что отбор опухолевых В-клеток и их эволюционные изменения при ЛМЛ/ХЛЛ во многом зависят от количества и функционального состояния Т- и NK-лимфоцитов [13–15, 24–35].

По нашим данным, у пациентов из группы ЛМЛ в крови обнаружено около 5 % опухолевых В-клеток (CD19+CD5+CD23+) в сочетании с дефицитом Т-клеточного иммунитета. Дефицит Т-клеток и/или их функциональная недостаточность у больных ЛМЛ, не подвергавшихся лечению, проявляются снижением уровня Т-хелперов CD4+ и соотношения Т-лимфоцитов CD4/CD8. Нарушения этих показателей ограничивают этап успешной элиминации локальных проявлений роста клональных В-клеток. Возможно, в этот период в зонах первоначального опухолевого роста (пролиферативных центрах, псевдофолликулах лимфатических узлов и костного мозга) нарушается баланс прироста и элиминации опухолевых клеток [36]. Определенный

дефицит Т- и NK-клеточного иммунитета в этот период способствует начинающемуся системному выходу в кровь опухолевых В-лимфоцитов.

Лейкемическая картина при ХЛЛ с умеренным лимфоцитозом в крови и костном мозге сопровождается активацией и значительным приростом NK-клеток и субпопуляций Т-лимфоцитов CD4+ и CD8+ в крови, значительно превышающих норму и уровень данных показателей при ЛМЛ. Причины, вызывающие активацию лимфоцитов, многочисленны. В лимфогенезе активаторами иммунитета служат мутационный статус опухолевых клеток (мутации генов *TP53*, *NOTCH1*, *SF3B1*, *ATM* и *BIRC3*), изменения структуры В-клеток (аберрантные В-клеточные рецепторы, CD38, Zap-70, нарушения тяжелых цепей иммуноглобулинов IGHV), продукты распада опухолевых В-клеток (опухоль-ассоциированные антигены в циркуляции крови) [37–46]. Кроме того, количество активированных Т-лимфоцитов у больных ХЛЛ/ЛМЛ может увеличиваться за счет реакции на антитела, продуцируемые патологическим клоном В-ХЛЛ [47].

Наблюдаемая нами активация иммунитета при ХЛЛ, описанная и другими исследователями [29–33], выражается в повышении числа лимфоцитов (CD3+, CD4+, CD8+, CD16+) и несопоставима с темпами прироста опухолевых клеток. Несмотря на резко выраженное увеличение в крови количества иммунокомпетентных клеток, отмечается нарастание диспропорции числа NK- и Т-клеток и количества опухолевых В-лимфоцитов. Темпы прироста опухолевых лимфоцитов при ХЛЛ в десятки и сотни раз превышают темпы прироста иммунокомпетентных клеток по сравнению с ЛМЛ. По мере нарастания клонального В-клеточного лимфоцитоза усиливается дефицит иммунитета. В связи с этим полученные результаты следует рассматривать как этапы развития выраженной недостаточности и истощения Т- и NK-клеточных звеньев иммунной системы, в т. ч. и за счет первичной гиперактивации иммунитета.

Основным препятствием эффективной реализации противоопухолевого иммунного ответа служит нарушение баланса стимулирующих и ингибирующих сигналов регуляции амплитуды и качества ответа Т-клеток, управляемого Т-клеточным рецептором (TCR). Чрезмерная активация Т-клеток может привести к потере аутоотолерантности, а повышенное ингибирование относится к числу важных причин снижения иммунитета при опухолевых заболеваниях. Недостаточность и истощение Т-клеточного иммунитета при ЛМЛ/ХЛЛ могут быть обусловлены преобладанием механизмов отрицательной негативной регуляции, снижающей и останавливающей развитие иммунного ответа.

Ряд исследований обосновывает возможность реализации негативной регуляции иммунитета при ХЛЛ. Факторами, снижающими эффективность активации Т-лимфоцитов при ХЛЛ, считают структурные мутационные изменения В-клеток, не способствующие оптимальному представлению антигена Т-клеткам при индукции иммунного ответа. В таком случае генерация и передача сигнала активации слабые или отсутствуют из-за недостаточного контакта взаимодействующих

клеток при формировании иммунного синапса [28, 48, 49]. В число причин, тормозящих развитие иммунного ответа, могут быть включены нарушения внутриклеточного транспорта везикул и функционирования цитоскелета цитотоксических Т-клеток [50].

Эффективность активации Т-лимфоцитов обеспечивается костимуляцией через молекулу CD28, конститутивно экспрессируемую Т-клетками CD4+CD8+, при ее взаимодействии с молекулами CD80/CD86, присутствующими на антигенпрезентирующих клетках [48]. Активация иммунного ответа при ХЛЛ может нарушаться из-за снижения экспрессии молекул, участвующих в костимуляции клеток (CD28 и CD80/CD86) [28, 51].

К факторам, играющим роль иммуносупрессоров при опухолевом росте, относят также незрелые миелоидные клетки, макрофаги 2-го типа, конститутивно существующие и индуцированные супрессорные регуляторные Т-лимфоциты (Treg). Супрессоры действуют контактно или через продукцию цитокинов (таких, как трансформирующий фактор роста  $\beta$  и интерлейкин-10), снижают киллерную активность Т-, НК-и других типов клеток. При опухолевых заболеваниях, в т. ч. онкогематологических (острых миелоидных лейкозах, неходжкинских лимфомах и ХЛЛ), обнаружено повышение их числа, которое коррелирует со стадией заболевания и, подавляя противоопухолевый иммунный ответ, способствует усилению опухолевого роста и прогрессированию заболевания [52–58].

Соответственно при развитии и прогрессировании ХЛЛ/ЛМЛ развивается дисбаланс сигналов активации и ингибирования, пролиферации и остановки деления, выживания иммунокомпетентных клеток; увеличивается действие иммунных супрессорных механизмов. Выживание и распространение опухолевых клеток продолжается на фоне нарастающего истощения и анергии иммунитета.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучение динамики развития опухолевого клона и иммунокомпетентных клеток в системе ХЛЛ/ЛМЛ выявило поэтапное более выраженное нарастание опухолевой массы по сравнению с увеличением количества резидуальных лимфоцитов. Исходное угнетение показателей Т-клеточного иммунитета коррелирует с началом системного выхода опухолевых В-лимфоцитов в кровь и ограничивает этап успешного контроля и сдерживания роста опухолевого клона. Сопоставление иммунного ответа с объемом опухолевого клона в крови может служить дополнительным критерием, определяющим степень дисфункции противоопухолевого иммунитета, а также фактором прогноза течения ХЛЛ. Для установления прогностической роли отдельных субпопуляций резидуальных иммунокомпетентных клеток при ХЛЛ/ЛМЛ необходимы дальнейшие детальные исследования.

## КОНФЛИКТЫ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

## ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование не имело спонсорской поддержки.

## ВКЛАД АВТОРОВ

**Концепция:** Е.Г. Кузьмина, Л.Ю. Гривцова.

**Дизайн:** Л.Ю. Гривцова, Е.Г. Кузьмина, С.В. Зацаренко, Т.Ю. Мушкарина.

**Клинические данные:** С.В. Шахтарина, Н.А. Фалалева, А.Ю. Терехова.

**Проточная цитометрия:** Т.Ю. Мушкарина, Т.В. Константинова.

**Статистический анализ и интерпретация данных:** Е.Г. Кузьмина, С.В. Зацаренко.

**Подготовка рукописи:** Е.Г. Кузьмина, Л.Ю. Гривцова.

**Подготовка иллюстраций:** Е.Г. Кузьмина, С.В. Зацаренко, Т.Ю. Мушкарина.

**Редактирование рукописи:** Л.Ю. Гривцов, Е.Г. Кузьмина.

**Окончательное одобрение рукописи:** все авторы.

## ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

- Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW (eds). World Health Organization Classification of Tumors. Pathology and genetics of tumors of hematopoietic and lymphoid tissues. Lyon: IARC Press; 2016. pp. 121–32.
- Луговская С.А., Почтарь М.Е. Гематологический атлас. 4-е издание, дополненное. М.: Триада, 2016. 434 с.  
[Lugovskaya SA, Pochtar ME. Gematologicheskii atlas. (Hematology Atlas.) 4th revised edition. Moscow: Triada Publ.; 2016. 434 p. (In Russ)]
- Российские клинические рекомендации по диагностике и лечению лимфопролиферативных заболеваний. Под ред. И.В. Поддубной, В.Г. Савченко. М., 2018. 356 с.  
[Poddubnaya IV, Savchenko VG, eds. Rossiiskie klinicheskie rekomendatsii po diagnostike i lecheniyu limfoproliferativnykh zabolevaniy. (National Russian guidelines on diagnosis and treatment of lymphoproliferative disorders.) Moscow; 2018. 356 p. (In Russ)]
- Луговская С.А., Козинец Г.И. Гематология пожилого возраста. М.: Триада, 2010. 193 с.  
[Lugovskaya SA, Kozinets GI. Gematologiya pozhilogo vozrasta. (Hematology of the elderly.) Moscow: Triada Publ.; 2010. 193 p. (In Russ)]
- Tees MT, Flinn IW. Chronic lymphocytic leukemia and small lymphocytic lymphoma: two faces of the same disease. Expert Rev Hematol. 2017;10(2):137–46. doi: 10.1080/17474086.2017.1270203.
- Tibaldi E, Brunati AM, Zonta F, et al. Lyn-mediated SHP-1 recruitment to CD5 contributes to resistance to apoptosis of B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. Leukemia. 2011;25(11):1768–81. doi: 10.1038/leu.2011.152.
- Williams JF, Petrus MJ, Wright JA, et al. Fas-mediated lysis of chronic lymphocytic leukaemia cells: role of type I versus type II cytokines and autologous FasL-expressing T cells. Br J Haematol. 1999;107(1):99–105. doi: 10.1046/j.1365-2141.1999.01670.x.
- Захаров С.Г., Голенков А.К., Мисурин А.В. и др. Экспрессия основных генов внешнего пути апоптоза у больных с впервые выявленным хроническим лимфолейкозом в сравнении с клиническими данными. Российский биотерапевтический журнал. 2018;17(2):41–6. doi: 10.17650/1726-9784-2018-17-2-41-46.  
[Zakharov SG, Golenkov AK, Misyurin AV, et al. Expression of the apoptosis-related genes in patients with newly diagnosed chronic lymphocytic leukemia in clinical data context. Russian Journal of Biotherapy. 2018;17(2):41–6. doi: 10.17650/1726-9784-2018-17-2-41-46. (In Russ)]
- Rawstron AC, Villamor N, Ritgen M, et al. International standardized approach for flow cytometric residual disease monitoring in chronic lymphocytic leukaemia. Leukemia. 2007;21(5):956–64. doi: 10.1038/sj.leu.2404584.
- Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, et al. 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. Blood. 2008;111(12):5446–56. doi: 10.1182/blood-2007-06-093906.
- Купрышина Н.А., Тупицын Н.Н. Проточная цитометрия в онкогематологии. Часть II. Основы и нововведения в диагностике хронического лимфолейкоза. Клиническая онкогематология. 2012;5(4):349–54.

- [Kupryshina NA, Tupitsyn NN. Flow cytometry in oncohematology. Part II. Fundamentals and innovations in chronic lymphocytic leukemia diagnosis. *Klinicheskaya onkogematologiya*. 2012;5(4):349–54. (In Russ)]
12. Тупицына Д.Н., Купрышина Н.А., Гривцова Л.Ю. Критерии минимальной остаточной болезни В-клеточного хронического лимфолейкоза в диагностике индолентных лимфом. *Вестник гематологии*. 2011;7(1):52–3. [Tupitsyna DN, Kupryshina NA, Grivtsova LYU. Criteria for minimal residual disease of B-cell chronic lymphocytic leukemia in the diagnosis of indolent lymphomas. *Vestnik gematologii*. 2011;7(1):52–3. (In Russ)]
  13. Bagnara D, Kaufman MS, Calissano C, et al. A novel adoptive transfer model of chronic lymphocytic leukemia suggests a key role for T lymphocytes in the disease. *Blood*. 2011;117(20):5463–72. doi: 10.1182/blood-2010-12-324210.
  14. Казанский Д.Б. Т-лимфоциты в развитии хронического лимфолейкоза. *Клиническая онкогематология*. 2012;5(2):85–95. [Kazanskii DB. T-lymphocytes in progression of chronic lymphocytic leukemia. *Klinicheskaya onkogematologiya*. 2012;5(2):85–95. (In Russ)]
  15. Свирновский А.И. Хронический лимфоцитарный лейкоз: парадигмы и парадоксы. *Медицинские новости*. 2008;13:7–19. [Svirnovskii AI. Chronic lymphocytic leukemia: paradigms and paradoxes. *Meditsinskie novosti*. 2008;13:7–19. (In Russ)]
  16. Халафян А.А. *Statistica 6. Статистический анализ данных*. М.: Бинوم-Пресс, 2007. 512 с. [Khalafyan AA. *Statistika 6. Statisticheskii analiz dannykh*. (Statistica 6. Statistical data analysis.) Moscow: Binom-Press Publ.; 2007. 512 p. (In Russ)]
  17. Дубровская Л.И., Князев Г.Б. Компьютерная обработка естественно-научных данных методами многомерной прикладной статистики. Томск: ТМЛ-Пресс, 2011. 120 с. [Dubrovskaya LI, Knyazev GB. *Komp'yuternaya obrabotka estestvenno-nauchnykh dannykh metodami mnogomernoi prikladnoi statistiki*. (Computer processing of natural science data by methods of multivariate applied statistics.) Tomsk: TML-Press Publ.; 2011. 120 p. (In Russ)]
  18. Marti GE, Rawstron AC, Ghia P, et al. Diagnostic criteria for monoclonal B-cell lymphocytosis. *Br J Haematol*. 2005;130(3):325–32. doi: 10.1111/j.1365-2141.2005.05550.x.
  19. Rawstron AC, Bennett FL, O'Connor SJ, et al. Monoclonal B-cell lymphocytosis and chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2008;359(6):575–83. doi: 10.1056/NEJMoa075290.
  20. Kern W, Bacher U, Haferlach C, et al. Monoclonal B-cell lymphocytosis is closely related to chronic lymphocytic leukaemia and may be better classified as early-stage CLL. *Br J Haematol*. 2012;57(1):86–96. doi: 10.1111/j.1365-2141.2011.09010.
  21. Shanafelt TD, Kay NE, Call TG, et al. MBL or CLL: which classification best categorizes the clinical course of patients with an absolute lymphocyte count  $\geq 5 \times 10^9/L$  but a B-cell lymphocyte count  $< 5 \times 10^9/L$ . *Leuk Res*. 2008;32(9):458–61. doi: 10.1016/j.leukres.2007.11.030.
  22. Berland R, Wortis HH. Origins and function of B-1 cells with notes on the role of CD5. *Ann Rev Immunol*. 2002;20(1):253–300. doi: 10.1146/annurev.immunol.20.100301.064833.
  23. Rawstron AC, Green MJ, Kuzmicki A, et al. Monoclonal B lymphocytes with the characteristics of "indolent" chronic lymphocytic leukemia are present in 3.5% of adults with normal blood counts. *Blood*. 2002;100(2):635–9. doi: 10.1182/blood.v100.2.635.
  24. Dameshek W. Chronic lymphocytic leukemia—an accumulative disease of immunologically incompetent lymphocytes. *Blood*. 1967;29(4):566–84. doi: 10.1182/blood-2016-05-716159.
  25. Zhen JF, Bao F, Zhu MX, et al. Relationship of the changes of peripheral blood immuno-cell subsets with the prognosis of B cell lymphoma patients. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Hue Za Zhi*. 2018;26(6):1657–62. doi: 10.7534/j.issn1009-2137.2018.06.013.
  26. Cantwell M, Hua T, Pappas J, Kipps TJ. Acquired CD40-ligand deficiency in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Med*. 1997;9(3):984–9. doi: 10.1038/nm0997-984.
  27. Ravandi F, O'Brien S. Immune defects in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Immunol Immunother*. 2006;55(2):197–209. doi: 10.1007/s00262-005-0015-8.
  28. Бадмажапова Д.С., Гальцева И.В., Звонков Е.Е. и др. Особенности экспрессии антигенов, участвующих в формировании иммунологического сигнала, при хроническом лимфолейкозе. *Онкогематология*. 2018;13(1):103–14. doi: 10.17650/1818-8346-2018-13-1-103-114. [Badmazhapova DS, Galtseva IV, Zvonkov EE, et al. Expression features of antigens involved in the formation of immunological synapse in chronic lymphocytic leukemia. *Oncohematology*. 2018;13(1):103–14. doi: 10.17650/1818-8346-2018-13-1-103-114. (In Russ)]
  29. Dianzani U, Omede P, Marmont F, et al. Expansion of T cells expressing low CD4 or CD8 levels in B-cell chronic lymphocytic leukemia: correlation with disease status and neoplastic phenotype. *Blood*. 1994;83(8):2198–205. doi: 10.1182/blood.V83.8.2198.2198.
  30. Jadidi-Niaragh F, Yousefi M, Memarian A, et al. Increased Frequency of CD8+ and CD4+ Regulatory T Cells in Chronic Lymphocytic Leukemia: Association with Disease Progression. *Cancer Invest*. 2013;31(2):121–31. doi: 10.3109/07357907.2012.756110.
  31. Mackus WJ, Frakking FN, Grummels A, et al. Expansion of CMV-specific CD8+CD45RA+CD27- T cells in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2003;102(3):1057–63. doi: 10.1182/blood-2003-01-0182.
  32. Porakishvili N, Roschupkina T, Kalber T, et al. Expansion of CD4+ T cells with a cytotoxic phenotype in patients with B-chronic lymphocytic leukaemia (B-CLL). *Clin Exper Immunol*. 2001;126(1):29–36. doi: 10.1046/j.1365-2249.2001.01639.x.
  33. Serrano D, Monteiro J, Allen SL, et al. Clonal expansion within the CD4+CD57+ and CD8+CD57+ T cell subsets in chronic lymphocytic leukemia. *J Immunol*. 1997;158(3):1482–9.
  34. de Toter D, Reato G, Mauro F, et al. IL4 production and increased CD30 expression by a unique CD8+ T-cell subset in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 1999;104(3):589–99. doi: 10.1046/j.1365-2141.1999.01219.x.
  35. Ticchioni M, Essafi M, Jeandel PY, et al. Homeostatic chemokines increase survival of B-chronic lymphocytic leukemia cells through inactivation of transcription factor FOXO3a. *Oncogene*. 2007;50(26):7081–91. doi: 10.1038/sj.onc.1210519.
  36. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, et al. Cancer immunoeediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol*. 2002;11(3):991–8. doi: 10.1038/ni1102-991.
  37. Rassenti LZ, Jain S, Keating MJ, et al. Relative value of ZAP-70, CD38, and immunoglobulin mutation status in predicting aggressive disease in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2008;112(5):1923–30. doi: 10.1182/blood-2007-05-092882.
  38. Nuckel H, Rebmann V, Durig J, et al. HLA-G expression is associated with an unfavorable outcome and immunodeficiency in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2005;105(4):1694–8. doi: 10.1182/blood-2004-08-3335.
  39. Kantor AB, Meril CE, Gercenberg LA, Hillson JL. An unbiased analysis of V-H-D-J(H) sequences from B-1a, B-1b, and conventional B cells. *J Immunol*. 1997;158(3):1175–86.
  40. Sasson SC, Smith S, Seddiki N, et al. IL-7 receptor is expressed on adult pre-B-cell acute lymphoblastic leukemia and other B-cell derived neoplasms and correlates with expression of proliferation and survival markers. *Cytokine*. 2010;50(1):58–68. doi: 10.1016/j.cyto.2009.2.001.
  41. Gaidano G, Foa R, Dalla-Favera R. Molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Invest*. 2012;122(10):3432–8. doi: 10.1172/JCI64101.
  42. Lam QLK, Wang S, Ko OKH, et al. Leptin signaling maintains B-cell homeostasis via induction of Bcl-2 and Cyclin D1. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010;107(31):13812–7. doi: 10.1073/pnas.1004185107.
  43. Mainou-Fowler T, Proctor SJ, Miller S, Dickinson AM. Expression and production of interleukin 4 in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Leuk Lymphoma*. 2001;42(4):689–98. doi: 10.3109/10428190109099331.
  44. Majolini MB, D'Elis MM, Galienu P, et al. Expression of the T-cell-specific tyrosine kinase Lck in normal B-1 cells and in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood*. 1998;91(9):3390–6. doi: 10.1182/blood.V91.9.3390.
  45. Frishman J, Long B, Knospe W, et al. Genes for interleukin 7 are transcribed in leukemic cell subsets of individuals with chronic lymphocytic leukemia. *J Exper Med*. 1993;177(4):955–64. doi: 10.1084/jem.177.4.955.
  46. Scrivener S, Kaminski ER, Demaine A, Prentice AG. Analysis of the expression of critical activation/interaction markers on peripheral blood T cells in B-cell chronic lymphocytic leukaemia: evidence of immune dysregulation. *Br J Haematol*. 2001;112(4):959–64. doi: 10.1046/j.1365-2141.2001.02672.x.
  47. Sthoeger ZM, Wakai M, Tse DB, et al. Production of autoantibodies by CD5-expressing B-lymphocytes from patients with chronic lymphocytic leukemia. *J Exper Med*. 1989;169(1):255–68. doi: 10.1084/jem.169.1.255.
  48. Ярилин А.А. *Иммунология*. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. 752 с. [Yarilin AA. *Immunologiya*. (Immunology.) Moscow: GEOTAR-Media Publ.; 2010. 752 p. (In Russ)]
  49. Ramsay AG, Johnson AJ, Lee AM, et al. Chronic lymphocytic leukemia T cells show impaired immunological synapse formation that can be reversed with an immunomodulating drug. *J Clin Invest*. 2008;118(7):2427–37. doi: 10.1172/JCI35017.
  50. Billadeau DD, Burkhardt JK. Regulation of Cytoskeletal Dynamics at the Immune Synapse: New Stars Join the Actin Troupe. *Traffic*. 2006;11(7):1451–60. doi: 10.1111/j.1600-0854.2006.00491.x.
  51. Gorgun G, Holderried TA, Zahrieh D, et al. Chronic lymphocytic leukemia cells induce changes in gene expression of CD4 and CD8 T cells. *J Clin Invest*. 2005;115(7):1797–805. doi: 10.1172/JCI24176.
  52. Mittal S, Marshall NA, Duncan L, et al. Local and systemic induction of CD4+CD25+ regulatory T-cell population by non-Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2008;111(11):3539–70. doi: 10.1182/blood-2007-08-105395.
  53. D'Arena G, Simeon V, D'Auria F, et al. Regulatory T-cells in chronic lymphocytic leukemia: actor or innocent bystander? *Am J Blood Res*. 2013;3(1):52–7.
  54. Кузьмина Е.Г., Мушкарина Т.Ю., Константинова Т.В. Регуляторные Т-лимфоциты (Treg) при лимфопролиферативных заболеваниях. *Современная онкология*. 2016;18(5):41–2. [Kuzmina EG, Mushkarina TYu, Konstantinova TV. Regulatory T-cells (Treg) in lymphoproliferative diseases. *Sovremennaya onkologiya*. 2016;18(5):41–2. (In Russ)]
  55. Тупицына Д.Н., Ковригина А.М., Тумян Г.С. и др. Клиническое значение внутриопухолевых FOXP3+ T-регуляторных клеток при солидных опухолях и фолликулярных лимфомах: обзор литературы и собственные данные. *Клиническая онкогематология*. 2012;5(3):193–203. [Tupitsyna DN, Kovrigina AM, Tumyan GS, et al. Clinical significance of intra-tumoral FOXP3+ T-regulatory cells in solid tumors and follicular lymphomas: literature review and own experience. *Klinicheskaya onkogematologiya*. 2012;5(3):193–203. (In Russ)]

**56.** Yang ZZ, Novak AJ, Ziesmer SC, et al. CD70+ non-Hodgkin lymphoma B cells induce Foxp3 expression and regulatory function in intratumoral CD4+CD25– T cells. *Blood*. 2007;110(7):2537–44. doi: 10.1182/blood-2007-03-082578.

**57.** Beyer M, Kochanek M, Darabi K, et al. Reduced frequencies and suppressive function of CD4+CD25hi regulatory T cells in patients with chronic lymphocytic leukemia after therapy with fludarabine. *Blood*. 2005;106(6):2018–25. doi: 10.1182/blood-2005-02-0642.

**58.** Мушкарина Т.Ю., Кузьмина Е.Г., Константинова Т.В., Гривцова Л.Ю. Регуляторные Т-клетки в костном мозге и периферической крови при В-клеточном хроническом лимфолейкозе. *Иммунология гемопоеза*. 2019;17(2):32–8.

[Mushkarina TYu, Kuzmina EG, Konstantinova TV, Gritsova LYu. Regulatory T-cells in bone marrow and peripheral blood in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Immunologiya gemopoeza*. 2019;17(2):32–8. (In Russ)]

