

ЛИМФОИДНЫЕ ОПУХОЛИ

LYMPHOID TUMORS

<https://doi.org/10.21320/2500-2139-2024-17-4-376-383>

<https://doi.org/10.21320/2500-2139-2024-17-4-376-383>

Субпопуляционный состав лимфоцитов костного мозга при хроническом лимфоцитарном лейкозе у пациентов с различным ответом на противоопухолевое лечение

Bone Marrow Lymphocyte Subpopulation in Chronic Lymphocytic Leukemia Patients with Different Responses to Chemotherapy

О.Н. Селютина^{ORCID}, Е.Ю. Златник^{ORCID}, Н.К. Гуськова^{ORCID},
И.А. Новикова^{ORCID}, И.Б. Лысенко^{ORCID}, А.Б. Сагакянц^{ORCID},
Т.Ф. Пушкарёва, Л.Ю. Владимирова^{ORCID}

O.N. Selyutina^{ORCID}, E.Yu. Zlatnik^{ORCID}, N.K. Guskova^{ORCID},
I.A. Novikova^{ORCID}, I.B. Lysenko^{ORCID}, A.B. Sagakyants^{ORCID},
T.F. Pushkareva, L.Yu. Vladimirova^{ORCID}

ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России,
ул. 14-я линия, д. 63, Ростов-на-Дону, Российская Федерация, 344037

National Medical Research Center for Oncology,
63 14th line ul., Rostov-on-Don, Russian Federation, 344037

РЕФЕРАТ

ABSTRACT

ЦЕЛЬ. Изучить субпопуляционный состав лимфоцитов костного мозга по результатам прицельной оценки экспрессии маркеров PD-1, PD-L1 и LAG-3 у больных хроническим лимфоцитарным лейкозом (ХЛЛ) в группах с различным ответом на противоопухолевое лечение.

AIM. To analyze the bone marrow lymphocyte subpopulation based on targeted assessment of PD-1, PD-L1, and LAG-3 marker expression in chronic lymphocytic leukemia (CLL) patients with different responses to chemotherapy.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. У 33 больных ХЛЛ до лечения и после 6 циклов противоопухолевой терапии, включавшей ритуксимаб, методом проточной цитофлюориметрии изучена экспрессия антигенов PD-1, PD-L1, LAG-3 на B-, T-, NK-клетках костного мозга (КМ). Больные были в возрасте 58–68 лет (медиана 64 года); женщин — 14, мужчин — 19. Гематологический ответ оценивался по величине минимальной остаточной болезни (МОБ). На этом основании выделены две группы больных: I ($n = 20$) — с удовлетворительным гематологическим ответом (МОБ < 1%), II ($n = 13$) — с неудовлетворительным гематологическим ответом (МОБ $\geq 1\%$).

MATERIALS & METHODS. In 33 CLL patients, PD-1, PD-L1, and LAG-3 antigen expression on B-, T-, and NK-cells of the bone marrow (BM) was analyzed by flow cytometry prior to treatment and after 6 cycles of chemotherapy with rituximab. Patients were aged 58–68 years (median 64 years); there were 14 women and 19 men. Hematologic response was assessed by measurements of minimal residual disease (MRD). On this basis, patients were divided into two groups: group 1 ($n = 20$) with satisfactory hematologic response (MRD < 1%) and group 2 ($n = 13$) with unsatisfactory hematologic response (MRD $\geq 1\%$).

РЕЗУЛЬТАТЫ. До лечения в КМ число опухолевых В-клеток, экспрессирующих PD-1, LAG-3, CD38, ZAP-70, у пациентов группы I было ниже, чем в группе II. После лечения их снижение более выражено в группе I. До лечения в КМ больных группы I отмечалось более высокое число Т-лимфоцитов с фенотипом CD3+, CD4+, CD8+, CD8+/CD28+, CD8+/CD28–, CD8+/CD38+, включая Т-клетки, экспрессирующие PD-1, но не PD-L1 и LAG-3. После лечения выявлен рост числа Т-клеток с фенотипом CD3+, CD4+, CD8+, Treg, CD8+/CD28+, CD8+/CD28–, включая Т-лимфоциты PD-1+, в обеих группах, но бо-

RESULTS. Prior to treatment, the count of PD-1-, LAG-3-, CD38-, and ZAP-70-expressing BM tumor B-cells was lower in patients of group 1 than in those of group 2. After treatment, their decrease was more pronounced in group 1. Prior to treatment, patients in group 1 had a higher count of BM T-lymphocytes with CD3+, CD4+, CD8+, CD8+/CD28+, CD8+/CD28–, and CD8+/CD38+ phenotype including PD-1- but neither PD-L1- nor LAG-3-expressing T-cells. After treatment, increased T-cells with CD3+, CD4+, CD8+, Treg, CD8+/CD28+, and CD8+/CD28– phenotype including PD-1+ T-lymphocytes were detected in both groups but more pronounced in group 2. In this group, CD3+ and CD4+ T-lymphocytes maintained LAG-3 expression. Prior to treatment,

лее выражено во II. В группе II сохранялась экспрессия LAG-3 на Т-лимфоцитах CD3+ и CD4+. До лечения у всех больных число NK-клеток в КМ было сниженным. После лечения в группе I оказалось больше NK-клеток с фенотипом CD3-/CD16+/CD56+, CD3-/CD16+/CD56+/PD-1+ и меньше с фенотипом CD3-/CD16+/CD56+/LAG-3+. Экспрессия PD-L1 на NK-клетках не обнаружена, а на Т- и В-клетках она была умеренной до лечения и не определялась после достижения гематологического ответа.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Показатели, определенные по результатам прицельной оценки экспрессии PD-1 и LAG-3 на В-, Т-, NK-клетках КМ до начала противоопухолевой терапии, вполне могут использоваться в клинической практике в качестве дополнительных факторов прогноза течения ХЛЛ. Гиперэкспрессия маркеров PD-1 и LAG-3 на Т-лимфоцитах и NK-клетках у больных ХЛЛ с МОБ-положительным статусом после противоопухолевого лечения свидетельствует о функциональной дефектности этих клеток.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: хронический лимфоцитарный лейкоз, костный мозг, PD-1, PD-L1, LAG-3, гематологический ответ, минимальная остаточная болезнь.

Получено: 5 февраля 2024 г.

Принято в печать: 6 сентября 2024 г.

Для переписки: Олеся Николаевна Селюткина, ул. 14-я линия, д. 63, Ростов-на-Дону, Российская Федерация, 344037; тел.: +7(961)270-91-40; e-mail: selyutinalesya@yandex.ru

Для цитирования: Селюткина О.Н., Златник Е.Ю., Гуськова Н.К. и др. Субпопуляционный состав лимфоцитов костного мозга при хроническом лимфоцитарном лейкозе у пациентов с различным ответом на противоопухолевое лечение. Клиническая онкогематология. 2024;17(4):376–83. doi: 10.21320/2500-2139-2024-17-4-376-383.

all patients showed decreased NK-cells in BM. After treatment, group 1 showed a higher count of NK-cells with CD3-/CD16+/CD56+ and CD3-/CD16+/CD56+/PD-1+ phenotype and a lower count of NK-cells with CD3-/CD16+/CD56+/LAG-3+ phenotype. PD-L1 expression in NK-cells was not detected, whereas in T- and B-cells it was moderate prior to treatment and was not identified after hematologic response was achieved.

CONCLUSION. The values determined by the targeted assessment of PD-1 and LAG-3 expression in BM B-, T-, and NK-cells prior to chemotherapy may well be used in clinical practice as additional prognostic factors in CLL. PD-1 and LAG-3 overexpression in T-lymphocytes and NK-cells in CLL patients with MRD-positive status after chemotherapy can be regarded as evidence of the functional deficiency of these cells.

KEYWORDS: chronic lymphocytic leukemia, bone marrow, PD-1, PD-L1, LAG-3, hematologic response, minimal residual disease.

Received: February 5, 2024

Accepted: September 6, 2024

For correspondence: Olesya Nikolaevna Selyutina, 63 14th line ul., Rostov-on-Don, Russian Federation, 344037; Tel.: +7(961)270-91-40; e-mail: selyutinalesya@yandex.ru

For citation: Selyutina O.N., Zlatnik E.Yu., Guskova N.K., et al. Bone Marrow Lymphocyte Subpopulation in Chronic Lymphocytic Leukemia Patients with Different Responses to Chemotherapy. Clinical oncohematology. 2024;17(4):376–83. doi: 10.21320/2500-2139-2024-17-4-376-383. (In Russ).

ВВЕДЕНИЕ

Хронический лимфолейкоз (ХЛЛ) относится к злокачественным В-клеточным опухолям с характерной экспрессией на мембране В-клеток CD19+ иммунофенотипических маркеров CD5, CD23, CD43 [1, 2]. К настоящему времени остается востребованным персонализированный подход к лечению ХЛЛ с учетом факторов риска, позволяющих прогнозировать ответ на терапию с возможностью своевременной ее коррекции [3, 4]. При этом известно, что взаимодействие опухолевых В-клеток и иммунного микроокружения имеет важное значение для прогноза при различных злокачественных заболеваниях, включая ХЛЛ [5, 6].

С внедрением в клиническую практику метода проточной цитофлуориметрии в качестве прогностических показателей при ХЛЛ стали рассматривать экспрессию ряда иммунофенотипических маркеров на различных клетках. Наиболее известные среди них активационный антиген CD38 и белок ZAP-70, экспрессия которых при ХЛЛ считается фактором

неблагоприятного прогноза [7–9]. Показано, что CD38 на В-лимфоцитах связывается с комплексом В-клеточного рецептора (BCR) CD19/CD21/CD81 и усиливает интенсивность сигнала, передаваемого через него, стимулируя клеточную пролиферацию [10]. Экспрессия ZAP-70 при ХЛЛ также ассоциируется с усилением передачи сигналов от BCR, что, в свою очередь, способствует более тяжелому клиническому течению заболевания [11, 12].

В нашем исследовании 2022 г. было также показано, что повышенный уровень экспрессии CD38 и ZAP-70 на В-лимфоцитах до начала лечения у больных ХЛЛ может служить предвестником неудовлетворительного гематологического ответа на терапию [8].

Особый интерес у исследователей вызывают рецепторы программируемой клеточной гибели PD-1 (CD279), лиганд PD-L1 (CD274) и белок активационного гена 3 лимфоцитов LAG-3 (CD223). Перечисленные молекулы участвуют в регуляции иммунного ответа, препятствуют запуску аутоиммунных процессов, а также модулируют его, уменьшая вызванные иммунными клетками повреждения в органах и тканях [13, 14].

В контексте взаимодействия опухолевых В-клеток с иммунным микроокружением у больных ХЛЛ показано, что клон злокачественных В-лимфоцитов индуцирует прогрессирующее нарушение иммунной системы, приводит к клинически выраженной иммунной супрессии, которая, в свою очередь, причастна к потере контроля над заболеванием [15, 16]. Наряду с этим опухолевые В-лимфоциты инициируют нарушение цитотоксических функций Т-клеток и повышение экспрессии рецепторов иммунных контрольных точек (ИКТ), что обеспечивает им преимущества в выживании [17].

Изменения в иммунном микроокружении при ХЛЛ также способствуют нарушению функции Т- и НК-клеток [18, 19]. При этом у больных ХЛЛ подавление популяции НК-клеток приводит к увеличению количества регуляторных Т-клеток [18–23]. Кроме того, известно, что при ХЛЛ на НК-клетках происходит активация экспрессии LAG-3, TIM3, VISTA и GITR [24–27].

Взаимодействие между опухолевыми В-клетками и реактивным микроокружением при ХЛЛ способствует его фенотипическим и функциональным изменениям, приводящим к различным состояниям, в основе которых лежат иммунные нарушения. Это повышенная восприимчивость к инфекциям, аутоиммунные осложнения, прогрессирование ХЛЛ и развитие других злокачественных новообразований, устойчивых к терапии [17, 28, 29].

Актуальность изучения взаимодействия опухолевых В-клеток с реактивным микроокружением у больных ХЛЛ представляется очевидной, особенно в контексте поиска новых прогностических маркеров. Это тем более важно, т. к. изученные к настоящему времени иммунофенотипические маркеры, к сожалению, не нашли широкого применения в клинической практике ввиду противоречивости данных в отношении их прогностической значимости в целом и в качестве факторов прогноза гематологического ответа на противоопухолевую терапию.

Цель настоящего исследования — изучить субпопуляционный состав лимфоцитов костного мозга по результатам прицельной оценки экспрессии маркеров PD-1, PD-L1 и LAG-3 у больных ХЛЛ в группах с различным ответом на противоопухолевое лечение.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование включено 33 больных (19 мужчин, 14 женщин) с впервые диагностированным ХЛЛ (стадии В и С по Binet), получавших лечение в отделении онкогематологии ФГБУ «НМИЦ онкологии» МЗ РФ Ростова-на-Дону в период с 2020 по 2023 г. Медиана возраста больных составила 64 года. Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании. Сбор клинической информации, забор биологического материала, соблюдение правовых норм проведены согласно разработанным алгоритмам действий подразделений исследовательских и клинических групп нашего центра [30].

У 33 больных ХЛЛ до лечения и после завершения 6 циклов противоопухолевой терапии, включавшей ритуксимаб, исследовали состав лимфоцитов в аспи-

рате костного мозга по результатам определения экспрессии маркеров PD-1, PD-L1, LAG-3 на В-, Т- и НК-клетках (подсчет проводился в процентах от всех лимфоцитов). Гематологический ответ на лечение оценивали по количеству остаточных аберрантных В-клеток после завершения 6 циклов терапии, т. е. по значению величины минимальной остаточной болезни (МОБ; в процентах от всех ядродержащих клеток костного мозга).

Исследования выполняли с применением метода 10-цветной проточной цитофлуориметрии (Navios 10/3, Beckman Coulter, США). Используемая комбинация моноклональных антител, меченных флюорохромами, включала CD45 PB/CrO, CD19 ECD/PC7/APC, CD5 PE/PC7/APC, CD10 PC5, CD20 PC5.5/PC7/APC, CD22 PE, CD23 FITC/PE, CD3 FITC/ECD/PC7/APC, CD4 FITC/PC5.5/APC, CD8 ECD/APC/APC-A750, CD25 PC5, CD38 FITC/PB, CD43 APC-A700, FMC7 FITC, CD16/56 PE, CD56 PC5/PC7, CD223 PE, CD274 (FITC), CD279 (PC7), kappa FITC, lambda PE (Beckman Coulter, BD Biosciences, США). Данные иммунофенотипирования анализировали с использованием программы Kaluza v2.1 (Beckman Coulter, США). Стратегию гейтирования строили согласно международному стандартизованному протоколу [31].

В зависимости от гематологического ответа на проводимую терапию выделены две группы больных: первая ($n = 20$) — с удовлетворительным гематологическим ответом (МОБ < 1 %), вторая ($n = 13$) — с неудовлетворительным (МОБ \geq 1 %).

Статистический анализ

Статистическую обработку результатов исследования выполняли в программе Statistica 13.0 с применением критерия Шапиро—Уилка для малых выборок. Сравнение групп проводилось с помощью непараметрического *U*-критерия Манна—Уитни. Результаты представлены в виде медианы и межквартильного интервала (Q25–Q75). Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Имунофенотипирование костного мозга у больных ХЛЛ позволило выявить ряд различий в составе лимфоцитов до начала лечения и после 6 циклов противоопухолевой терапии, включавшей ритуксимаб, при различном гематологическом ответе. Так, до лечения в составе костного мозга при иммунофенотипировании преобладала популяция опухолевых В-клеток с фенотипом CD19+/CD5+/CD23+. Относительное содержание опухолевых В-клеток у пациентов группы I с МОБ < 1 % было в 1,4 раза меньше в сравнении с группой II (МОБ \geq 1 %) (табл. 1).

После противоопухолевого лечения в обеих группах отмечалось статистически значимое снижение числа опухолевых В-клеток. Однако их количество в группе I уменьшилось в 554,6 раза, а в группе II — только в 14,4 раза. Сходная динамика прослеживается и в отношении субпопуляции В-клеток CD19+/CD5+/CD23+/CD38+. Так, в группе I, характеризующейся более низким уровнем показателя до лечения, отме-

Таблица 1. Субпопуляционный состав В-лимфоцитов костного мозга в группах больных ХЛЛ с различным гематологическим ответом на противоопухолевую терапию

Субпопуляция В-лимфоцитов	До лечения		После лечения	
	Группа I	Группа II	Группа I	Группа II
CD19+/CD5-/CD23-	0,65* (0,3; 0,9)	0,0* (0,0; 0,1)	7,4*** (6,4; 9,7)	0,0*** (0,0; 0,9)
CD19+/CD5+/CD23+	66,55* (58,35; 80,00)	92,4* (90,0; 96,0)	0,12*** (0,05; 0,30)	6,4*** (3,0; 11,5)
CD19+/CD5+/CD23+/CD38+	3,0* (0,65; 29,70)	14,2* (3,0; 70,4)	0,1*** (0,05; 0,20)	3,5*** (1,6; 9,2)
CD19+/CD5+/CD23+/ZAP-70+	2,75 (0,2; 25,6)	13,5 (3,7; 33,1)	0,0 (0,0; 0,0)	0,0** (0,0; 0,7)
CD19+/CD5-/CD23-/PD-1+	0,0 (0,0; 0,05)	0,0 (0,0; 0,1)	0,0 (0,0; 0,0)	0,0 (0,0; 0,0)
CD19+/CD5+/CD23+/PD-1+	24,1* (20,9; 29,8)	70,1* (69,3; 75,2)	0,1*** (0,05; 0,25)	6,0*** (2,0; 10,9)
CD19+/CD5+/CD23+/PD-L1+	0,25 (0,15; 0,85)	0,3 (0,1; 1,0)	0,0 (0,0; 0,0)	0,0 (0,0; 0,0)
CD19+/CD5+/CD23+/LAG-3+	13,9* (12,7; 17,9)	43,4* (39,9; 46,6)	0,025*** (0,0; 0,2)	5,2*** (2,0; 11,0)

Данные представлены как медиана (Q25; Q75) числа клеток (%).

* Статистически значимые различия между группами I и II ($p < 0,001$).

** Статистически значимые различия в сравнении с показателями до лечения ($p < 0,001$).

чено статистически значимое более интенсивное снижение экспрессии CD38 после лечения в сравнении с группой II (в 30 и 4 раза соответственно). До лечения относительное содержание субпопуляции В-клеток CD19+/CD5+/CD23+/ZAP-70+ в группе I было в 4,9 раза меньше в сравнении с группой II, однако различия оказались статистически незначимыми. Наряду с этим число В-клеток CD19+/CD5+/CD23+/ZAP-70+ после лечения снизилось до нулевых значений в обеих группах больных. По-разному представлена и экспрессия PD-1, PD-L1, LAG-3 на опухолевых В-клетках при различном с точки зрения МОБ-статуса ответе пациентов на противоопухолевую терапию. До лечения относительное содержание В-клеток CD19+/CD5+/CD23+/PD-1+ в группе I было в 2,9 раза ниже, чем в группе II. После лечения их число снизилось в группе I в 241 раз, а в группе II — в 11,6 раза. До начала терапии относительное содержание В-клеток CD19+/CD5+/CD23+/PD-L1+ обнаруживалось в следовых количествах в обеих группах. После лечения данная субпопуляция В-лимфоцитов вовсе отсутствовала в костном мозге у всех больных. Наряду с этим до лечения число В-клеток CD19+/CD5+/CD23+/LAG-3+ в группе I было в 3,1 раза ниже, чем в группе II. После лечения число В-клеток этой субпопуляции снизилось в группе I в 556 раз, а в группе II — в 8,3 раза.

Среди В-лимфоцитов в костном мозге больных ХЛЛ присутствует и субпопуляция неопухолевых В-лимфоцитов CD19+/CD5-/CD23-. Обращает на себя внимание, что у больных группы I имел место более высокий исходный уровень неопухолевых В-клеток со статистически значимым нарастанием их числа после противоопухолевого лечения более чем в 10 раз. В то же время группа II отличалась следовым числом неопухолевых В-лимфоцитов в костном мозге как до, так и после лечения ХЛЛ. Экспрессия антигенов CD38 и ZAP-70 на мембране неопухолевых В-лимфоцитов отсутствовала у всех больных ХЛЛ.

Поскольку в микроокружении опухоли при ХЛЛ в костном мозге присутствуют Т-клетки, мы изучили их субпопуляционный состав в динамике на фоне лечения (табл. 2).

Согласно нашим данным, в костном мозге до лечения у больных из группы I отмечалось статистически значимо более высокое число Т-лимфоцитов популяций CD3+, CD4+, CD8+, включая экспрессирующие

PD-1, но не PD-L1 и LAG-3. Оценка экспрессии ряда дополнительных маркеров на Т-лимфоцитах основных субпопуляций показала, что исходное количество Т-клеток CD8+/CD28+, CD8+/CD28-, а также Т-клеток CD8+/CD38+ было выше в группе I в сравнении с группой II. При этом количество Т-регуляторных клеток (Treg) CD4+/CD25high+ в анализируемых группах статистически значимо не различалось.

После противоопухолевого лечения ХЛЛ происходит ряд изменений в Т-клеточном составе костного мозга, а именно наблюдается увеличение относительного содержания Т-клеток CD3+, CD4+, CD8+, включая экспрессирующие PD-1, но не PD-L1 и LAG-3, которые остаются без изменения или снижаются до нулевых значений. Различия между больными I и II групп после лечения отмечались в относительном содержании субпопуляции Т-лимфоцитов CD3+ преимущественно за счет экспрессирующих PD-1 Т-клеток. Количество Т-клеток CD3+/PD-1+ увеличилось у больных группы I в 2,5 раза, а группы II — в 18,2 раза. Менее выражено и повышение числа Т-лимфоцитов CD4+/PD-1+ у больных группы I по сравнению с группой II (в 3,4 и 8 раз соответственно). Эти различия, по-видимому, обусловлены увеличением количества Treg в обеих группах, однако с меньшей интенсивностью у больных с МОБ < 1%, чем с МОБ ≥ 1% (в 20,6 и 39,7 раза соответственно). Экспрессия PD-L1, исходно умеренная, снижалась до нулевых значений после лечения вне зависимости от МОБ-статуса. Наряду с этим у всех больных ХЛЛ до терапии отмечался низкий уровень экспрессии LAG-3 на Т-лимфоцитах CD3+ и CD4+. Однако после лечения экспрессия LAG-3 не определялась только у больных группы I. После терапии регистрировалось статистически значимое повышение числа всех исследованных субпопуляций Т-лимфоцитов CD8+, преимущественно за счет Т-клеток, экспрессирующих PD-1. Так, у больных группы I отмечалось повышение уровня Т-клеток CD8+ в 3,3 раза, а в группе II — в 29,4 раза. Число Т-клеток CD8+/CD28+ повысилось в 2,7 и 52,6 раза в группах I и II соответственно, а количество Т-клеток CD8+/CD28- — в 5,4 и 19 раз соответственно ($p < 0,001$). При этом до лечения экспрессия PD-1 обнаруживалась на всех Т-клетках CD8+/CD38+, а после лечения отмечалось значительное увеличение их количества: в группе I — в 46,9 раза, в группе II — в 147 раз.

Таблица 2. Субпопуляционный состав Т-лимфоцитов костного мозга в группах больных ХЛЛ с различным гематологическим ответом на противоопухолевую терапию

Субпопуляция Т-лимфоцитов	До лечения		После лечения	
	Группа I	Группа II	Группа I	Группа II
CD3+	30,5* (18,00; 38,35)	5,8* (2,1; 8,5)	78,0** (74,6; 80,5)	83,6** (74,5; 86,8)
CD3+/PD-1+	13,35* (9,45; 16,40)	4,0* (0,8; 5,1)	33,3*** (23,9; 64,1)	73,1*** (56,5; 83,1)
CD3+/PD-L1+	0,1 (0,0; 0,3)	0,1 (0,0; 0,35)	0,0 (0,0; 0,0)	0,0 (0,0; 0,0)
CD3+/LAG-3+	0,34 (0,20; 0,45)	0,35 (0,25; 0,55)	0,0 (0,0; 0,0)	0,25 (0,25; 0,35)
CD3+/CD4+	16,1* (10,15; 22,30)	3,8* (1,3; 5,5)	40,5*** (39,0; 41,7)	31,1** (28,2; 33,2)
CD3+/CD4+/PD-1+	10,4* (7,7; 11,1)	3,5* (1,2; 4,9)	35,6*** (32,9; 38,4)	28,1** (27,3; 30,0)
CD3+/CD4+/PD-L1+	0,1 (0,0; 0,2)	0,1 (0,1; 0,3)	0,0 (0,0; 0,1)	0,0 (0,0; 0,0)
CD3+/CD4+/LAG-3+	0,3 (0,25; 0,50)	0,3 (0,2; 0,4)	0,0 (0,0; 0,0)	0,2 (0,2; 0,3)
CD3+/CD4+/CD25high+	0,32 (0,2; 0,4)	0,36 (0,3; 0,5)	6,6*** (4,4; 11,3)	14,3*** (11,0; 14,8)
CD3+/CD4+/CD25high+/PD-1+	0,32 (0,2; 0,4)	0,36 (0,3; 0,5)	6,1*** (4,2; 7,3)	14,1*** (10,5; 14,8)
CD3+/CD8+	10,7* (7,35; 17,90)	1,8* (0,9; 3,6)	36,7*** (35,0; 37,9)	55,6*** (46,0; 56,7)
CD3+/CD8+/PD-1+	9,95* (7,10; 17,45)	1,5* (0,8; 3,0)	32,8*** (30,2; 36,5)	44,2*** (42,6; 53,7)
CD3+/CD8+/LAG-3+	0,0 (0,0; 0,02)	0,02 (0,0; 0,02)	0,0 (0,0; 0,0)	0,0 (0,0; 0,0)
CD3+/CD8+/CD28+	4,8* (2,8; 8,6)	0,7* (0,1; 0,9)	12,9*** (12,3; 14,0)	36,8*** (30,0; 37,0)
CD3+/CD8+/CD28+/PD-1+	4,35* (2,05; 7,70)	0,5* (0,1; 0,7)	12,8*** (11,0; 15,3)	31,1*** (29,3; 36,1)
CD3+/CD8+/CD28-	4,25* (2,50; 6,75)	0,9* (0,3; 1,0)	23,0*** (20,2; 25,0)	17,2*** (13,6; 19,9)
CD3+/CD8+/CD28-/PD-1+	3,35* (2,15; 6,05)	0,4* (0,1; 0,7)	21,1*** (19,5; 24,3)	16,9*** (12,6; 19,2)
CD3+/CD8+/CD38+	0,7* (0,45; 1,05)	0,3* (0,3; 0,5)	32,8*** (30,2; 36,5)	44,2*** (42,6; 53,7)
CD3+/CD8+/CD38+/PD-1+	0,7* (0,45; 1,05)	0,3* (0,3; 0,5)	32,8*** (30,2; 36,5)	44,2*** (42,6; 53,7)

Данные представлены как медиана (Q25; Q75) числа клеток (%).

* Статистически значимые различия между группами I и II ($p < 0,001$).

** Статистически значимые различия в сравнении с показателями до лечения ($p < 0,001$).

Таблица 3. Субпопуляционный состав NK-клеток костного мозга в группах больных ХЛЛ с различным гематологическим ответом на противоопухолевую терапию

Субпопуляция NK-клеток	До лечения		После лечения	
	Группа I	Группа II	Группа I	Группа II
CD3-/CD16+/CD56+	1,4 (0,95; 2,00)	1,0 (0,7; 1,6)	15,6*** (14,6; 17,1)	10,1*** (9,2; 14,0)
CD3-/CD16+/CD56+/PD-1+	0,0 (0,0; 0,1)	0,0 (0,0; 0,1)	12,1*** (11,3; 13,9)	9,4*** (8,1; 12,6)
CD3-/CD16+/CD56+/LAG-3+	0,1 (0,1; 0,2)	0,2 (0,1; 0,3)	1,0*** (0,9; 1,2)	1,6*** (1,2; 2,1)

Данные представлены как медиана (Q25; Q75) числа клеток (%).

* Статистически значимые различия между группами I и II ($p < 0,001$).

** Статистически значимые различия в сравнении с показателями до лечения ($p < 0,001$).

Анализ популяции NK-клеток в костном мозге больных ХЛЛ также показал ряд отличий (табл. 3).

До начала противоопухолевого лечения ХЛЛ отмечалось пониженное число NK-клеток в костном мозге больных обеих групп без статистически значимых различий между ними. После лечения обращало на себя внимание значительное статистически значимое повышение числа NK-клеток в обеих группах, но с разной интенсивностью (в группе I в 11,2 раза, в группе II в 10,1 раза). Группа I характеризовалась более высоким содержанием лимфоцитов CD3-/CD16+/CD56+, включая NK-клетки, экспрессирующие PD-1. Однако относительное содержание NK-клеток CD3-/CD16+/CD56+/LAG-3+ у этих больных было ниже, чем в группе II. Таким образом, при персистенции МОБ $\geq 1\%$ после лечения в костном мозге отмечались более низкий уровень клеток CD3-/CD16+/CD56+, более высокая доля клеток CD3-/CD16+/CD56+/LAG-3+ и уменьшение количества клеток CD3-/CD16+/CD56+/PD-1+, что может указывать на прогностически неблагоприятные изменения в микроокружении опухоли

при ХЛЛ. Экспрессия PD-L1 на NK-клетках костного мозга у больных ХЛЛ не обнаружена.

ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно полученным в настоящем исследовании данным, до лечения костный мозг у больных с впервые диагностированным ХЛЛ характеризуется выраженным преобладанием клона опухолевых В-клеток (CD19+/CD5+/CD23+), многие из которых экспрессируют LAG-3 и PD-1, но не его лиганд PD-L1. Эффективная противоопухолевая терапия сопровождается постепенным частичным восстановлением пула неопухолевых В-лимфоцитов (CD19+/CD5-/CD23-). Однако, несмотря на то что опухолевые В-клетки полностью не элиминируются, Т-лимфоцитарное и NK-клеточное микроокружение опухоли имеет тенденцию к восстановлению, судя по их количеству. При этом, если данное явление сопровождается восстановлением функциональной

активности клеток микроокружения опухоли, то это может обеспечить длительную ремиссию. О функциональной активности Т-клеток косвенно можно судить по экспрессии на их мембране молекул PD-1 и LAG-3, характеризующих «истощение». Маркер PD-1 после лечения ХЛЛ экспрессируется на большей части Т- и NK-клеток костного мозга, а экспрессия LAG-3 незначительная.

В динамике на фоне противоопухолевого лечения выявлены различия в лимфоцитарном составе костного мозга как до начала терапии, так и после 6 циклов. Так, у пациентов группы II еще до начала лечения в костном мозге отмечался значительно более низкий уровень неопухолевых В-лимфоцитов и более высокий — опухолевых В-клеток, экспрессирующих PD-1 и LAG-3, в сравнении с группой I. Аналогичные данные были получены нами ранее при определении экспрессии PD-1 и LAG-3 на В-лимфоцитах периферической крови больных ХЛЛ. Экспрессия указанных маркеров была выявлена на поверхности В-клеток у больных ХЛЛ еще до начала лечения. При этом более высокий исходный уровень экспрессии PD-1 и LAG-3 отмечался у пациентов с МОБ $\geq 1\%$ после завершения терапии [32, 33]. Нами ранее разработан способ прогнозирования течения ХЛЛ, который вполне может использоваться при стратификации больных ХЛЛ на группы риска с учетом экспрессии PD-1 и LAG-3 на В-лимфоцитах периферической крови до лечения (патент на изобретение № 2788816 С1 от 24.01.2023 г.) [34].

Более высокая экспрессия LAG-3 на клетках CD4+, CD3-/CD16+/56+ костного мозга и PD-1 на Т-клетках CD8+/CD28+, отмеченная после лечения у больных группы II по сравнению с группой I, в свою очередь, свидетельствует об истощении субпопуляций Т- и NK-клеток. Известно, что LAG-3 экспрессируется на различных типах клеток, включая Т-клетки CD4+, CD8+ и Treg. Экспрессия LAG-3 необходима для обеспечения нормального гомеостаза Т-лимфоцитов [35]. Однако постоянная антигенная стимуляция, наблюдаемая при злокачественных новообразованиях, вызывает постоянную экспрессию LAG-3 на Т-клетках, что приводит к функциональному их истощению, следствием чего становится подавление иммунного ответа. Экспрессия LAG-3 на Т-клетках обуславливает снижение продукции цитокинов и гранзимов, угнетение их пролиферации, но с сохранением способности к дифференцировке в направлении Treg. В последних LAG-3 способствует продукции иммуносупрессивных цитокинов интерлейкина-10 и трансформирующего фактора роста- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) [36, 37].

Обычно LAG-3 рассматривают в контексте экспрессии PD-1, подчеркивая тем самым способность этих молекул потенцировать иммуносупрессивное действие, в частности, на антигенспецифические Т-лимфоциты CD8+ [38, 39]. Однако до настоящего времени не установлено, какие сигнальные пути могут быть задействованы для обеспечения синергизма функционирования молекул LAG-3 и PD-1 и всегда ли этот синергизм реализуется. Среди проблемных моментов, упомянутых в обзоре E. Ruffo и соавт., отмечена возможность использования экспрессии LAG-3 в качестве прогностического биомаркера и описано,

при каких опухолях это может быть наиболее информативно [40]. Согласно полученным нами данным, имеются все основания полагать, что оценка экспрессии LAG-3 и PD-1 вполне может использоваться при прогнозировании течения ХЛЛ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установлены различия по содержанию субпопуляций В-, Т-лимфоцитов и NK-клеток, экспрессирующих PD-1, LAG-3, в костном мозге больных ХЛЛ с различным ответом на противоопухолевую терапию, включающую ритуксимаб. Выявлен ряд потенциально прогностических показателей, предопределяющих возможность достижения гематологического ответа. Гиперэкспрессия PD-1 и LAG-3 на Т-лимфоцитах микроокружения ХЛЛ у больных с МОБ $\geq 1\%$ свидетельствует о том, что, несмотря на количественное восстановление Т-клеток после лечения, большая часть из них имеет фенотип «истощенных» и, следовательно, функционально дефектных клеток. Таким образом, прицельная оценка экспрессии PD-1 и LAG-3 на В-, Т- и NK-клетках костного мозга у больных ХЛЛ до начала терапии может служить дополнительным критерием, определяющим степень иммунной дисфункции, а также фактором прогноза течения ХЛЛ, что может быть полезным при назначении противоопухолевой терапии.

УВЕДОМЛЕНИЯ/ACKNOWLEDGMENT

ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ КОНФЛИКТЫ ИНТЕРЕСОВ.

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

DISCLOSURE. The authors declare no conflicts of interest.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ. Исследование не имело спонсорской поддержки.

FUNDING. This study received no external financial support.

ВКЛАД АВТОРОВ. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства, согласно международным критериям ICMJE. При этом наибольший вклад распределен следующим образом.

Концепция и дизайн: О.Н. Селютина.

Сбор и обработка данных: О.Н. Селютина, Е.Ю. Златник, Н.К. Гуськова, И.Б. Лысенко, Т.Ф. Пушкарева.

Предоставление материалов исследования: О.Н. Селютина, И.Б. Лысенко.

Анализ и интерпретация данных: О.Н. Селютина, Е.Ю. Златник, Н.К. Гуськова, И.А. Новикова, А.Б. Сагакянц, Л.Ю. Владимирова.

Подготовка рукописи: О.Н. Селютина, Е.Ю. Златник, Н.К. Гуськова.

Окончательное одобрение рукописи: все авторы.

AUTHOR CONTRIBUTION. All authors meet the ICMJE criteria for authorship and declare their special contribution as follows:

Conception and design: O.N. Selyutina.

Data collection and processing: O.N. Selyutina, E.Yu. Zlatnik, N.K. Guskova, I.B. Lysenko, T.F. Pushkareva.

Research materials provision: O.N. Selyutina, I.B. Lysenko.

Data analysis and interpretation: O.N. Selyutina, E.Yu. Zlatnik, N.K. Guskova, I.A. Novikova, A.B. Sagakyants, L.Yu. Vladimirova.

Manuscript writing: O.N. Selyutina, E.Yu. Zlatnik, N.K. Guskova.

Final approval of manuscript: all authors.

СОГЛАСИЕ НА ПУБЛИКАЦИЮ. От всех пациентов получено письменное информированное согласие на публикацию.

CONSENT FOR PUBLICATION. Written informed consent for publication was obtained from all patients.

ЭТИЧЕСКОЕ ОДОБРЕНИЕ. Исследование было одобрено локальным этическим комитетом ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России Ростова-на-Дону 15.10.2020 г. (протокол № 39).

ETHICS APPROVAL. This study was approved by the local Ethics Committee of the Rostov-on-Don National Medical Research Centre for Oncology 15.10.2020 (protocol #39).

ORCID

О.Н. Селютин — <https://orcid.org/0000-0001-6762-0835>

Е.Ю. Златник — <https://orcid.org/0000-0002-1410-122X>

Н.К. Гуськова — <https://orcid.org/0000-0002-4222-1579>

И.А. Новикова — <https://orcid.org/0000-0002-6496-9641>

И.Б. Лысенко — <https://orcid.org/0000-0003-4457-3815>

А.Б. Сагакянц — <https://orcid.org/0000-0003-0874-5261>

Л.Ю. Владимировна — <https://orcid.org/0000-0002-4822-5044>

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Никитин Е.А., Бялик Т.Е., Зарицкий А.Ю. и др. Хронический лимфоцитарный лейкоз/лимфома из малых лимфоцитов. Современная онкология. 2020;22(3):24–44. doi: 10.26442/18151434.2020.3.200385. [Nikitin E.A., Bialik T.E., Zaritskii A.I., et al. Chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma. *Journal of Modern Oncology*. 2020;22(3):24–44. doi: 10.26442/18151434.2020.3.200385. (In Russ)]
2. Гуськова Н.К., Селютин О.Н., Новикова И.А. и др. Морфологические и иммунофенотипические особенности моноклональной популяции В-лимфоцитов при хроническом лимфолейкозе. Южно-российский онкологический журнал. 2020;1(3):27–35. doi: 10.37748/2687-0533-2020-1-3-3. [Guskova N.K., Selyutina O.N., Novikova I.A., et al. Morphological and immunophenotypic features of the monoclonal population of B-lymphocytes in chronic lymphocytic leukemia. *South Russian Journal of Cancer*. 2020;1(3):27–35. doi: 10.37748/2687-0533-2020-1-3-3. (In Russ)]
3. Iyer P, Wang L. Emerging Therapies in CLL in the Era of Precision Medicine. *Cancers (Basel)*. 2023;15(5):1583. doi: 10.3390/cancers15051583.
4. Shadman M. Diagnosis and Treatment of Chronic Lymphocytic Leukemia: A Review. *JAMA*. 2023;329(11):918–32. doi: 10.1001/jama.2023.1946.
5. Златник Е.Ю., Новикова И.А., Ульянова Е.П. и др. Иммунологическое микроокружение некоторых злокачественных опухолей: биологические и клинические аспекты. Исследования и практика в медицине. 2019;6(5):120.

- [Zlatnik E.Yu., Novikova I.A., Ulyanova E.P., et al. Immunological microenvironment of some malignancies: biological and clinical aspects. *Issledovaniya i praktika v meditsine*. 2019;6(5):120. (In Russ)]
6. Семенова Н.Ю., Бессмельцев С.С., Ругаль В.И. Роль дефектов кровяной и лимфоидной ниш в генезе хронического лимфолейкоза. Клиническая онкогематология. 2016;9(2):176–90. doi: 10.21320/2500-2139-2016-9-2-176-190. [Semenova N.Yu., Bessmel'tsev S.S., Rugal' V.I. Role of Defects of Hematopoietic and Lymphoid Niches in Genesis of Chronic Lymphocytic Leukemia. *Clinical oncohematology*. 2016;9(2):176–90. doi: 10.21320/2500-2139-2016-9-2-176-190. (In Russ)]
7. Starostka D, Kriegova E, Kudelka M, et al. Quantitative assessment of informative immunophenotypic markers increases the diagnostic value of immunophenotyping in mature CD5-positive B-cell neoplasms. *Cytometry B Clin Cytom*. 2018;94(4):576–87. doi: 10.1002/cyto.b.21607.
8. Селютин О.Н., Гуськова Н.К., Лысенко И.Б., Коновальчик М.А. Профиль экспрессии иммунофенотипических маркерных молекул на В-лимфоцитах у больных хроническим лимфолейкозом на этапах иммунохимиотерапии. Южно-Российский онкологический журнал. 2022;3(4):49–57. doi: 10.37748/2686-9039-2022-3-4-5. [Selyutina O.N., Guskova N.K., Lysenko I.B., Konovalchik M.A. Expression profile of immunophenotypic marker molecules on B-lymphocytes in patients with chronic lymphocytic leukemia at the stages of immunochemotherapy. *South Russian Journal of Cancer*. 2022;3(4):49–57. doi: 10.37748/2686-9039-2022-3-4-5. (In Russ)]
9. Manna A, Aulakh S, Jani P, et al. Targeting CD38 Enhances the Antileukemic Activity of Ibrutinib in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Clin Cancer Res*. 2019;25(13):3974–85. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-18-3412.
10. Funaro A, De Monte LB, Dianzani U, et al. Human CD38 is associated to distinct molecules which mediate transmembrane signaling in different lineages. *Eur J Immunol*. 1993;23(10):2407–11. doi: 10.1002/eji.1830231005.
11. Chen L, Widhopf G, Huynh L, et al. Expression of ZAP-70 is associated with increased B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2002;100(13):4609–14. doi: 10.1182/blood-2002-06-1683.
12. Wiestner A, Rosenwald A, Barry TS, et al. ZAP-70 expression identifies a chronic lymphocytic leukemia subtype with unmutated immunoglobulin genes, inferior clinical outcome, and distinct gene expression profile. *Blood*. 2003;101(12):4944–51. doi: 10.1182/blood-2002-10-3306.
13. Marin-Acevedo JA, Dholaria B, Soyano AE, et al. Next generation of immune checkpoint therapy in cancer: new developments and challenges. *J Hematol Oncol*. 2018;11(1):39. doi: 10.1186/s13045-018-0582-8.
14. Ключагина Ю.И., Соколова З.А., Барышникова М.А. Роль рецептора PD1 и его лигандов PD-L1 и PDL-2 в иммунотерапии опухолей. Онкопедиатрия. 2017;4(1):49–55. doi: 10.15690/onco.v4i1.1684. [Klyuchagina Yu.I., Sokolova Z.A., Baryshnikova M.A. Role of PD1 receptor and its ligands PD-L1 and PD-L2 in cancer immunotherapy. *Onkopediatria*. 2017;4(1):49–55. doi: 10.15690/onco.v4i1.1684. (In Russ)]
15. Purroy N, Wu C.J. Coevolution of Leukemia and Host Immune Cells in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2017;7(4):a026740. doi: 10.1101/cshperspect.a026740.
16. Van Attekum MH, Eldering E, Kater AP. Chronic lymphocytic leukemia cells are active participants in microenvironmental cross-talk. *Haematologica*. 2017;102(9):1469–76. doi: 10.3324/haematol.2016.142679.
17. Palma M, Gentilcore G, Heimersson K, et al. T cells in chronic lymphocytic leukemia display dysregulated expression of immune checkpoints and activation markers. *Haematologica*. 2017;102(3):562–72. doi: 10.3324/haematol.2016.151100.
18. Yano M, Byrd JC, Muthusamy N. Natural Killer Cells in Chronic Lymphocytic Leukemia: Functional Impairment and Therapeutic Potential. *Cancers (Basel)*. 2022;14(23):5787. doi: 10.3390/cancers14235787.
19. D'Arcena G, Laurenti L, Minervini MM, et al. Regulatory T-cell number is increased in chronic lymphocytic leukemia patients and correlates with progressive disease. *Leuk Res*. 2011;35(3):363–8. doi: 10.1016/j.leukres.2010.08.010.
20. Littwitz-Salomon E, Malyszkina A, Schimmer S, Dittmer U. The Cytotoxic Activity of Natural Killer Cells Is Suppressed by IL-10+ Regulatory T Cells During Acute Retroviral Infection. *Front Immunol*. 2018;9:1947. doi: 10.3389/fimmu.2018.01947.
21. Ghiringhelli F, Menard C, Terme M, et al. CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor-beta-dependent manner. *J Exp Med*. 2005;202(8):1075–85. doi: 10.1084/jem.20051511.
22. Lad D, Hoeppli R, Huang Q, et al. Regulatory T-cells drive immune dysfunction in CLL. *Leuk Lymphoma*. 2018;59(2):486–9. doi: 10.1080/10428194.2017.1330475.
23. Mpakou VE, Ioannidou HD, Konsta E, et al. Quantitative and qualitative analysis of regulatory T cells in B cell chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res*. 2017;60:74–81. doi: 10.1016/j.leukres.2017.07.004.
24. Hadadi L, Hafezi M, Amirzargar AA, et al. Dysregulated Expression of Tim-3 and Nkp30 Receptors on NK Cells of Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia. *Oncol Res Treat*. 2019;42(4):202–8. doi: 10.1159/000497208.
25. Sordo-Bahamonde C, Lorenzo-Herrero S, Gonzalez-Rodriguez AP, et al. BTLA/HVEM Axis Induces NK Cell Immunosuppression and Poor Outcome in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cancers (Basel)*. 2021;13(8):1766. doi: 10.3390/cancers13081766.
26. Buechele C, Baessler T, Wirths S, et al. Glucocorticoid-induced TNFR-related protein (GITR) ligand modulates cytokine release and NK cell reactivity in chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Leukemia*. 2012;26(5):991–1000. doi: 10.1038/leu.2011.313.
27. Sordo-Bahamonde C, Lorenzo-Herrero S, Gonzalez-Rodriguez AP, et al. LAG-3 Blockade with Relatlimab (BMS-986016) Restores Anti-Leukemic Re-

sponses in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cancers (Basel)*. 2021;13(9):2112. doi: 10.3390/cancers13092112.

28. Griggio V, Perutelli F, Salvetti C, et al. Immune Dysfunctions and Immune-Based Therapeutic Interventions in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Front Immunol*. 2020;11:594556. doi: 10.3389/fimmu.2020.594556.

29. Long M, Beckwith K, Do P, et al. Ibrutinib treatment improves T cell number and function in CLL patients. *J Clin Invest*. 2017;127(8):3052–64. doi: 10.1172/JCI89756.

30. Кит О.И., Тимофеева С.В., Ситковская А.О. и др. Биобанк ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России как ресурс для проведения исследований в области персонализированной медицины. *Современная онкология*. 2022;24(1):6–11. doi: 10.26442/18151434.2022.1.201384. [Kit O.I., Timofeeva S.V., Sitkovskaya A.O., et al. The biobank of the National Medical Research Centre for Oncology as a resource for research in the field of personalized medicine: A review. *Journal of Modern Oncology*. 2022;24(1):6–11. doi: 10.26442/18151434.2022.1.201384. (In Russ)]

31. 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.

32. Селютина О.Н., Лысенко И. Б., Гуськова Н.К. и др. Экспрессия LAG-3 на В-лимфоцитах как маркер прогноза ответа на терапию у больных хроническим лимфолейкозом. *Сибирский онкологический журнал*. 2023;22(2):34–42. doi: 10.21294/1814-4861-2023-22-2-34-42. [Selyutina O.N., Lysenko I.B., Guskova N.K., et al. Expression of LAG-3 on B-lymphocytes as a marker for prediction of response to therapy in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Siberian journal of oncology*. 2023;22(2):34–42. doi: 10.21294/1814-4861-2023-22-2-34-42. (In Russ)]

33. Селютина О.Н., Лысенко И.Б., Гуськова Н.К. и др. PD-1 и LAG-3 как ранние маркеры прогноза при терапии больных хроническим лимфолейкозом. *Онкогематология*. 2023;18(4):156–62. doi: 10.17650/1818-8346-2023-18-4-156-162. [Selyutina O.N., Lysenko I.B., Guskova N.K., et al. PD-1 and LAG-3 as early prognostic markers in the treatment of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Oncohematology*. 2023;18(4):156–62. doi: 10.17650/1818-8346-2023-18-4-156-162. (In Russ)]

34. Кит О.И., Селютина О.Н., Лысенко И.Б. и др. Способ прогнозирования течения хронического лимфолейкоза. Патент на изобретение № 2788816 С1 от 24.01.2023. [Kit O.I., Selyutina O.N., Lysenko I.B., et al. A method for predicting the course of chronic lymphocytic leukemia. Patent No. 2788816 С1, 24.01.2023. (In Russ)]

35. Huard B, Mastrangeli R, Prigent P, et al. Characterization of the major histocompatibility complex class II binding site on LAG-3 protein. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997;94(11):5744–9. doi: 10.1073/pnas.94.11.5744.

36. Graydon CG, Mohideen S, Fowke KR. LAG3's Enigmatic Mechanism of Action. *Front Immunol*. 2021;11:615317. doi: 10.3389/fimmu.2020.615317.

37. Chen J, Chen Z. The effect of immune microenvironment on the progression and prognosis of colorectal cancer. *Med Oncol*. 2014;31(8):82. doi: 10.1007/s12032-014-0082-9.

38. Andrews LP, Marciscano AE, Drake CG, Vignali DA. LAG3 (CD223) as a cancer immunotherapy target. *Immunol Rev*. 2017;276(1):80–96. doi: 10.1111/imr.12519.

39. Wherry EJ, Kurachi M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat Rev Immunol*. 2015;15(8):486–99. doi: 10.1038/nri3862.

40. Ruffo E, Wu RC, Bruno TC, et al. Lymphocyte-activation gene 3 (LAG3): The next immune checkpoint receptor. *Semin Immunol*. 2019;42:101305. doi: 10.1016/j.smim.2019.101305.

