

Предварительная версия статьи, поступившей в редакцию журнала.
Дата поступления: 05.02.2024

НА ЗАМЕТКУ

Данная статья поступила в редакцию журнала и будет опубликована после прохождения рецензирования, корректуры, редактуры и вёрстки. После этого будет назначен том и номер выпуска журнала, в котором статья будет опубликована в окончательной редакции. После публикации в окончательной редакции статья будет удалена из данного раздела.

Следует обратить внимание на то, что статьи в данном разделе не содержат всех библиографических данных. Они будут присвоены только после включения статьи в тот или иной номер журнала.

Кроме того, в процессе подготовки статьи к публикации, после снятия вопросов с авторами могут произойти изменения в её содержании, текст статьи может измениться перед окончательной публикацией.

Субпопуляционный состав лимфоцитов костного мозга у больных ХЛЛ при различном ответе на химиотерапию

О.Н. Селютина, Е.Ю. Златник, Н.К. Гуськова, И.А. Новикова, И. Б. Лысенко, А.Б. Сагакянц, Т.Ф. Пушкарёва

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, ул. 14-я линия, д. 63, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация, 344037

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

Цель. Изучить клеточный состав лимфоцитов костного мозга, их иммунофенотип, экспрессию иммунных контрольных точек PD-1, PD-L1 и LAG-3 у больных хроническим лимфоцитарным лейкозом при различном ответе на химиотерапию.

Материалы и методы. В аспирате костного мозга 33 больных хроническим лимфоцитарным лейкозом (ХЛЛ) до лечения и после 6 курсов химиотерапии методом проточной цитометрии исследовали иммунофенотип лимфоцитов с экспрессией PD-1, PD-L1 и LAG-3. Гематологический ответ на лечение оценивали по величине минимальной определяемой болезни (МОБ). Выделены 2 группы больных: I (n=20) – с хорошим гематологическим ответом (МОБ<1%), II (n=13) – с неудовлетворительным ответом (МОБ≥1%). Статистическую обработку результатов проводили в Statistica 13.0.

Результаты. До лечения число опухолевых клеток, экспрессирующих PD-1, LAG-3, CD38, ZAP-70 в группе I ниже, чем во II, после лечения их снижение более выражено. Среди Т-клеток костного мозга до лечения в группе I отмечен более высокий уровень популяций CD3+, CD4+ и CD8+, CD8+CD28+, CD8+CD28-, CD8+CD38+, включая экспрессирующие PD-1, но не PD-L1 и LAG-3. После лечения возрастает содержание CD3+, CD4+, CD8+, T-regs, CD8+CD28+, CD8+CD28-, включая PD-1+, в обеих группах, но более выражено во II; в ней же сохраняется экспрессия LAG-3 на CD3+ и CD4+ лимфоцитах. До лечения у всех больных ХЛЛ уровень NK-клеток снижен, после - в группе I было больше клеток CD3-/CD16+/CD56+, CD3-/CD16+/CD56+/PD-1+ и меньше CD3-/CD16+/CD56+/LAG-3+. Экспрессия PD-L1 на

НК-клетках не обнаружена, а на Т- и В-клетках была незначительной до лечения и не выявлялась после него.

Заключение. Исходно повышенные уровни опухолевых LAG-3+ и PD-1+ В-клеток в костном мозге больных ХЛЛ прогнозируют персистенцию МОБ после терапии. Гиперэкспрессия этих маркеров на Т- и НК-лимфоцитах больных с МОБ-положительным статусом после лечения свидетельствует об их функциональной дефектности.

Ключевые слова: хронический лимфолейкоз, LAG-3, PD-1, PD-L1 лимфоцитарное микроокружение, минимальная определяемая болезнь.

The Subpopulation Composition of Bone Marrow Lymphocytes in Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia with Different Response to Chemoimmunotherapy

ON Selyutina, EYu Zlatnik, NK Guskova, IA Novikova, IB Lysenko, AB Sagakyants, TF Pushkareva, LYu Vladimirova

National Medical Research Centre for Oncology, 63, 14-th Liniya St., 344037, Rostov-on-Don, Russian Federation.

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

ABSTRACT

Aim. To study the cellular composition of bone marrow lymphocytes, their immunophenotype, and the expression of immune checkpoints PD-1, PD-L1 and LAG-3 in patients with chronic lymphocytic leukemia with different responses to chemoimmunotherapy.

Materials and methods. In the bone marrow aspirate of 33 patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL) before treatment and after 6 courses of chemoimmunotherapy, the immunophenotype of lymphocytes with expression of PD-1, PD-L1 and LAG-3 was studied using flow cytometry. Hematological response to treatment was assessed by minimal residual disease (MRD) value. Patients were divided in 2 groups: I (n=20) – with a good hematological response (MRD<1%), II (n=13) – with an unsatisfactory response (MRD≥1%). Statistical processing of the results was carried out in Statistica 13.0.

Results. Before treatment, the number of leukemic cells expressing PD-1, LAG-3, CD38, ZAP-70 in group I was lower than in group II; after treatment, their decrease was more pronounced. Among bone marrow T cells before treatment in group I, a higher level of CD3+, CD4+ and CD8+, CD8+CD28+, CD8+CD28-, CD8+CD38+ populations was noted, including those expressing PD-1, but not PD-L1 and LAG-3. After treatment, the content of CD3+, CD4+, CD8+, T-regs, CD8+CD28+, CD8+CD28-, including PD-1+, increased in both groups, but was more pronounced in group II; the expression of LAG-3 on CD3+ and CD4+ lymphocytes retained in group II. Before treatment, in all patients with CLL the level of NK cells was reduced, after treatment prevailed CD3-/CD16+/CD56+, CD3-/CD16+/CD56+/PD-1+ cells and were reduced CD3-/CD16+/CD56+/LAG-3+ cells in group I. PD-L1 expression on NK cells was not detected, was insignificant on T and B cells it before treatment and was not detected at all after it.

Conclusion. Initially elevated levels of tumor LAG-3+ and PD-1+ B cells in the bone marrow of CLL patients predict MRD persistence after therapy. Overexpression of these markers on T- and

NK-lymphocytes of patients with MRD-positive status after treatment indicates their functional defect.

Key words: chronic lymphocytic leukemia, LAG-3, PD-1, PD-L1, lymphocytic microenvironment, minimal residual disease.

ВВЕДЕНИЕ

ХЛЛ относится к злокачественным В-клеточным заболеваниям с характерной экспрессией на мембране В-клеток (CD19) иммунофенотипических маркеров CD5, CD23, CD43 [1,2]. На сегодняшний день востребован персонализированный подход к лечению с учетом факторов риска, дающих возможность прогнозировать ответ на терапию и своевременно ее корректировать [3,4]. При этом известно, что взаимодействие опухолевых клеток и иммунологического микроокружения имеет важное значение для прогноза различных злокачественных заболеваний, включая ХЛЛ [5,6].

С внедрением в клиническую практику метода проточной цитофлюориметрии в качестве прогностических показателей 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 [7,8,9]. Показано, что CD38 на В-лимфоцитах связывается с комплексом В-клеточных рецепторов (BCR) CD19/CD21/CD81 и усиливает интенсивность сигнала, передаваемого через комплекс, стимулируя клеточную пролиферацию [10]. Экспрессия ZAP-70 при ХЛЛ также ассоциируется с усилением передачи сигналов от В-клеточного рецептора (BCR), что, в свою очередь, способствует более тяжелому клиническому течению заболевания [11,12].

В наших исследованиях ранее было показано, что повышенный уровень экспрессии CD38 и ZAP-70 на В-лимфоцитах до начала лечения у больных ХЛЛ может предвещать неудовлетворительный гематологический ответ на терапию [8].

С открытием иммунных контрольных точек (ИКТ) к иммунофенотипическим прогностическим показателям добавились некоторые белки-рецепторы ИКТ, роль которых в патогенезе ХЛЛ активно изучается [13]. Наиболее исследуемыми на сегодняшний день являются рецепторы программируемой клеточной гибели PD-1 (Programmed cell death-1; CD279) с его лигандом PD-L1 (Programmed cell death - ligand 1, CD274) и белок активационного гена 3 лимфоцитов LAG-3 (lymphocyte-activation gene 3; CD223), которые регулируют активацию иммунного ответа, препятствуя запуску аутоиммунных процессов, а также модулируют его, уменьшая вызванные иммунными клетками повреждения в органах и тканях [14].

В контексте взаимодействия опухолевых В-клеток с иммунологическим микроокружением у больных ХЛЛ показано, что злокачественный клон В-лимфоцитов индуцирует прогрессирующее нарушение иммунной системы, приводя к состоянию 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 ИКТ, обеспечивая тем самым себе преимущества в выживаемости [17].

Изменения в иммунологическом микроокружении при ХЛЛ также способствуют нарушению функции Т- и NK-клеток [18,19]. При этом у больных ХЛЛ подавление популяции NK-клеток приводит к увеличению количества регуляторных Т-клеток [18-23]. Известно также, что при ХЛЛ на NK-клетках происходит активация экспрессии рецепторов ИКТ – LAG-3, TIM3, VTLA и GITR [24-27].

Взаимодействия между опухолевыми В-клетками и лимфоидным микроокружением при ХЛЛ способствуют его фенотипическим и функциональным изменениям, приводящим к различным состояниям, в основе которых иммунологические нарушения: повышенной восприимчивости к инфекциям, аутоиммунным проявлениям, толерантности к опухолевым антигенам, вследствие чего нередко развивается прогрессирование опухоли и возникновение других злокачественных новообразований, устойчивых к терапии [17, 28, 29].

В этой связи, очевидна актуальность изучения взаимодействия опухолевых В-клеток с лимфоидным микроокружением у больных ХЛЛ, особенно в контексте поиска новых прогностических маркеров. Тем более, что изученные к настоящему моменту иммунофенотипические маркеры, до сих пор не нашли широкого применения в клинической практике ввиду противоречивости данных в отношении их прогностической значимости в целом и в качестве маркеров прогноза ответа больных ХЛЛ на терапию.

Цель исследования — Изучить клеточный состав лимфоцитов костного мозга, их иммунофенотип, экспрессию иммунных контрольных точек PD-1, PD-L1 и LAG-3 у больных хроническим лимфоцитарным лейкозом при различном ответе на химиоиммунотерапию.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование включены 33 больных (19 мужчин, 14 женщин) с впервые установленным диагнозом ХЛЛ в стадиях В и С по Binet, проходивших лечение в отделении онкогематологии ФГБУ «НМИЦ онкологии» МЗ РФ в период с 2020 по 2023 годы. Медиана возраста больных 64 года. Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании. Сбор клинической информации, биологического материала, соблюдение правовых норм проведено согласно разработанным алгоритмам действий подразделений исследовательских и клинических групп НМИЦ онкологии [30]. В аспирате костного мозга больных до лечения и после завершения 6 курсов химиоиммунотерапии (ХИТ) с ритуксимабом исследовали клеточный состав лимфоцитов, их иммунофенотип, экспрессию ИКТ, характеризующих клеточную гибель: PD-1, PD-L1 и LAG-3 (подсчет производили в процентах от всех лимфоцитов). Гематологический ответ на лечение оценивали по количеству оставшихся аберрантных CD19+клеток после завершения 6 курсов терапии, то есть величине МОБ (в процентах от всех ядродержащих клеток). 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 в программном обеспечении Kaluza v2.1 (Beckman Coulter, США). Стратегию гейтирования строили согласно международному стандартизованному протоколу [31]. В зависимости от гематологического ответа на проводимую терапию выделены 2 группы больных: I (n=20) – с хорошим гематологическим ответом (МОБ<1%), II (n=13) – с неудовлетворительным ответом (МОБ≥1%). Статистическую обработку результатов исследования выполняли в программе Statistica 13.0 с применением критерия Шапиро–Уилка для малых выборок. Сравнение групп проводилось с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни (U-критерий). Результаты представлены в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха (LQ – 25% и UQ – 75%). Статистически значимыми считали различия при p<0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Иммунофенотипирование костного мозга больных ХЛЛ выявило ряд различий в составе лимфоцитов до начала лечения и после 6 курсов ХИТ при различном гематологическом ответе на терапию. Так, до лечения в составе костного мозга преобладает популяция злокачественных В-клеток CD19+/CD5+/CD23+, относительное содержание которой в 1,4 раза меньше в группе I в сравнении с группой II (табл. 1).

Таблица 1. Состав некоторых субпопуляций В-лимфоцитов костного мозга больных ХЛЛ с различным гематологическим ответом на терапию (% клеток), Me (LQ; UQ)

Показатели	До лечения		После лечения	
	Группы больных			
	I	II	I	II
CD19+/CD5-/CD23-	0,650	0,000*	7,4**	0,000*

	[0,3; 0,9]	[0,000; 0,1]	[6,4; 9,7]	[0,000; 0,9]
CD19+/CD5+/CD23+	66,55 [58,35; 80,0]	92,4* [90,0; 96,0]	0,12** [0,053; 0,299]	6,4*,** [3,0; 11,5]
CD19+/CD5+/CD23+/CD38+	3,0 [0,65; 29,7]	14,2* [3,0; 70,4]	0,1** [0,05; 0,2]	3,5*,** [1,6; 9,2]
CD19+/CD5+/CD23+/ZAP-70+	2,75 [0,2; 25,6]	13,5 [3,7; 33,1]	0,000 [0,000; 0,000]	0,000** [0,000; 0,7]
CD19+/CD5-/CD23-/PD-1+	0,5 [0,35; 0,95]	0,000 [0,000;0,000]	0,000 [0,000;0,000]	0,000 [0,000;0,000]
CD19+/CD5+/CD23+/PD-1+	24,1 [20,85; 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]	0,000 [0,000;0,000]	0,000 [0,000;0,000]
CD19+/CD5+/CD23+/LAG-3+	13,9 [12,7; 17,9]	43,4* [39,9; 46,6]	0,025** [0,000; 0,2]	5,2*,** [2,0; 11,0]

Примечание: * - статистически значимые отличия от группы I ($p < 0,001$)

** - статистически значимые отличия от данных до лечения ($p < 0,001$)

После лечения в обеих группах отмечается статистически значимое снижение числа злокачественных В-клеток, однако их уровень в группе I уменьшается в 554,6 раза, а в группе II только в 14,4 раза. Схожая динамика прослеживается и в отношении субпопуляции CD19+/CD5+/CD23+/CD38+ клеток. Так, в группе I, характеризующейся более низким уровнем показателя до лечения, отмечено статистически значимое более интенсивное снижение экспрессии CD38 после лечения в сравнении с группой II (в 30,0 и в 4,0 раза, соответственно). До лечения относительное содержание субпопуляции CD19+/CD5+/CD23+/ZAP-70+ в группе I в 4,9 раз меньше в сравнении с группой II, однако различия статистически не значимы вследствие широкой индивидуальной вариабельности данных. Наряду с этим, число CD19+/CD5+/CD23+/ZAP-70+ клеток после лечения снижается до нуля в обеих сопоставляемых группах больных. По-разному представлена и экспрессия PD-1, PD-L1 и LAG-3 на В-клетках злокачественного клона при различном ответе на терапию. До лечения относительное содержание CD19+/CD5+/CD23+/PD-1+ клеток в группе I в 2,9 раза ниже, чем в группе II. После лечения их уровень снижается в группе I в 241 раз, а в группе II - в 11,6 раза. До начала терапии относительное содержание CD19+/CD5+/CD23+/PD-L1+ клеток обнаруживается в следовых количествах в обеих группах и не имеет статистически значимых отличий. После лечения данная популяция вовсе отсутствует в костном мозге всех больных. Наряду с этим, до лечения число CD19+/CD5+/CD23+/LAG-3+ клеток в группе I в 3,1 раз ниже, чем в группе II, и еще более выражены различия по снижению их уровня после лечения: в группе I в 556 раз, в группе II - в 8,3 раза.

Среди В-лимфоцитов в костном мозге больных ХМЛ присутствует и субпопуляция нормальных В-лимфоцитов CD19+/CD5-/CD23-. Обращает внимание, что у больных группы I исходно более высокий уровень нормальных В-клеток со статистически значимым нарастанием их содержания после лечения более, чем в 10 раз, тогда как группа II характеризуется наличием их в следовых количествах как до-, так и после лечения. Экспрессия CD38+ и ZAP-70+ на мембране нормальных В-лимфоцитов отсутствует у всех больных ХМЛ. Примечательно, что из исследуемых ИКТ представлена лишь экспрессия PD-1 и только у пациентов группы I до лечения.

Поскольку в микроокружении опухолевых клеток ХМЛ в костном мозге присутствуют Т-клетки, нами был изучен их состав в динамике лечения (табл. 2).

Таблица 2. Состав некоторых субпопуляций Т-лимфоцитов костного мозга больных ХМЛ с различным гематологическим ответом на терапию (% клеток), Me (LQ; UQ)

Показатели, %	До лечения		После лечения	
	Группы больных			
	I	II	I	II

CD3+	30,5 [18,0; 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; 16,4]	0,3* [0,000; 2,9]	33,3** [23,9; 64,1]	73,1* ** [56,5; 83,1]
CD3+/PD-L1+	0,2 [0,2; 0,35]	0,1* [0,000; 0,3]	0,000 [0,000; 0,4]	0,000 [0,000; 0,000]
CD3+/LAG3+	0,35 [0,25; 0,55]	0,34 [0,20; 0,45]	0,000 [0,000; 0,000]	0,25 [0,25; 0,35]
CD3+/CD4+	16,1 [10,15; 22,3]	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; 5,1]	35,6** [32,9; 38,4]	28,1* ** [27,3; 30,0]
CD3+/CD4+/PD-L1+	0,1 [0,000; 0,2]	0,1 [0,1; 0,3]	0,000 [0,000; 0,1]	0,000 [0,000; 0,000]
CD3+/CD4+/LAG-3+	0,3 [0,25; 0,5]	0,3 [0,2; 0,4]	0,000 [0,000 ;0,000]	0,2 [0,2; 0,3]
CD3+/CD4+/CD25high+	1,35 [0,5; 1,75]	0,2 [0,1; 0,3]	6,6** [4,4; 11,3]	14,3* ** [11,0; 14,8]
CD3+/CD4+/CD25high+/PD-1+	1,35 [0,5; 1,75]	0,2 [0,1; 0,3]	6,1** [4,2; 7,3]	14,1* ** [10,5; 14,8]
CD3+/CD8+	10,7 [7,35; 17,9]	1,8* [0,9; 3,6]	36,7** [35,0; 37,9]	55,6* ** [46,0; 56,7]
CD3+/CD8+/PD-1+	9,95 [7,1; 17,45]	1,5* [0,8; 3,0]	32,8** [30,2; 36,5]	44,2* ** [42,6; 53,7]
CD3+/CD8+/LAG-3+	0,000 [0,000; 0,015]	0,02 [0,000; 0,02]	0,000 [0,000;0,000]	0,000 [0,000;0,000]
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; 7,7]	0,5* [0,1; 0,7]	12,8** [11,0; 15,3]	31,1* ** [29,3; 36,1]
CD3+/CD8+/CD28-	4,25 [2,5; 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]

Примечание: * - статистически значимые отличия от группы I ($p < 0,001$)

** - статистически значимые отличия от данных до лечения ($p < 0,001$)

Согласно данным, Т-клеточный состав костного мозга до лечения у больных группы I характеризуется статистически значимо более высоким уровнем популяций CD3+, CD4+ и CD8+, включая экспрессирующие PD-1, но не PD-L1 и LAG-3 клетки. Оценка экспрессии ряда дополнительных маркеров на Т-лимфоцитах основных субпопуляций показала, что исходные уровни CD8+CD28+, CD8+CD28-, а также CD8+CD38+ клеток были выше в группе I в сравнении с группой II. При этом количество Т-регуляторных клеток CD4+/CD25high+ (Tregs) в анализируемых группах не имело статистически значимых различий.

После лечения происходит ряд изменений Т-клеточного состава костного мозга, а именно, наблюдается увеличение относительного содержания CD3+, CD4+ и CD8+ клеток, включая экспрессирующие PD-1, но не PD-L1 и LAG-3, которые остаются без изменения или снижаются до нулевых значений. Различия между больными обеих групп после лечения отмечены в относительном содержании популяции CD3+, преимущественно, за счет экспрессирующих PD-1 клеток: уровень CD3+PD-1+ клеток увеличивается, но менее

значительно у больных группы I в сравнении с группой II (в 2,5 и в 243,0 раз, соответственно). Менее выражено и увеличение числа CD4+PD-1+ лимфоцитов у больных группы I по сравнению с группой II (в 3,4 и 8,0 раз, соответственно). Эти различия, по-видимому, обусловлены изменением уровня Tregs, который возрастает в обеих группах, однако с меньшей интенсивностью у больных с МОБ-негативным статусом, чем у пациентов с МОБ-позитивным (в 4,9 и 71,5 раз, соответственно). Экспрессия PD-L1, исходно незначительная, снижается до нулевых значений после лечения вне зависимости от значений МОБ. Наряду с этим, у всех больных ХМЛ до лечения наблюдается низкий уровень экспрессии LAG-3 на CD3+ и CD4+ лимфоцитах. Однако, после лечения экспрессия LAG-3 не определяется только у больных группы I. После лечения регистрируется статистически значимое повышение числа всех исследованных субпопуляций CD8+ лимфоцитов, преимущественно, за счет клеток, экспрессирующих PD-1. Так, у больных группы I отмечено повышение уровня CD8+ клеток в 3,3 раза, а в группе II в 29,4 раз. Для CD8+CD28+ клеток увеличение составило 2,7 и 52,6 раз соответственно, для CD8+CD28- - 5,4 и 19,0 раз, соответственно (во всех случаях $p < 0,001$). При этом, до лечения экспрессия PD-1 обнаруживается на всех CD8+CD38+ клетках, а после лечения отмечено значительное увеличение их количества: в группе I в 46,9 раз, в группе II – в 147,0 раз.

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

Таблица 3. Состав некоторых субпопуляций NK-клеток костного мозга у больных ХМЛ с различным гематологическим ответом на терапию (% клеток), Me (LQ; UQ)

Показатели, %	До лечения		После лечения	
	Группы больных			
	I	II	I	II
CD3/CD16+/CD56+	1,4 [0,95;2,0]	1,0 [0,7; 1,6]	15,6* [14,6; 17,1]	10,1*,** [9,2; 14,0]
CD3-/CD16+/CD56+/PD-1+	0,000 [0,000; 0,1]	0,000 [0,000; 0,000]	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]

Примечание: * - статистически значимые отличия от группы I ($p < 0,001$)

** - статистически значимые отличия от данных до лечения ($p < 0,001$)

До начала лечения отмечен пониженный уровень NK-клеток в костном мозге больных ХМЛ обеих групп без статистически значимых различий между ними. После лечения обращало внимание значительное статистически значимое повышение их уровня в обеих группах, но с разной интенсивностью (в группе I в 11,2 раза, в группе II в 10,1 раза). То есть, группа I характеризовалась более высоким содержанием CD3-/CD16+/CD56+ лимфоцитов, включая клетки, экспрессирующие PD-1, однако относительное содержание CD3-/CD16+/CD56+/LAG-3+ клеток у этих больных было ниже, чем в группе II. Таким образом, при персистенции МОБ после лечения отмечены более низкие уровни CD3-/CD16+/CD56+, более высокая доля CD3-/CD16+/CD56+/LAG-3+ клеток и уменьшение доли CD3-/CD16+/CD56+/PD-1+ клеток, что, по-видимому, указывает на неблагоприятные изменения микроокружения ХМЛ под действием клеток опухолевого клона В-лимфоцитов. Экспрессия PD-L1 на NK-клетках костного мозга у больных ХМЛ не обнаружена.

ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно полученным данным, до лечения костный мозг больных ХМЛ характеризуется выраженным преобладанием клона злокачественных В-клеток (CD19+CD5+CD23+), многие из которых экспрессируют LAG-3 и PD-1, но не его лиганд PD-L1. Проведение химиоиммунотерапии вызывает их угнетение с частичным восстановлением

пула нормальных В-лимфоцитов (CD19+CD5-CD23-). Однако несмотря на то, что злокачественные клетки не элиминируются полностью, их Т-лимфоцитарное и НК-клеточное микроокружение имеет тенденцию к восстановлению, судя по их количеству. При этом, если данное явление сопровождается восстановлением функциональной активности, то это может обеспечить длительную ремиссию. О функциональной активности Т-клеток косвенно позволяет говорить экспрессия на них молекул, характеризующих «истощение» (PD-1 и LAG-3). PD-1 после лечения экспрессируется на большей части Т- и НК-клеток костного мозга, экспрессия LAG-3 незначительна.

В динамике лечения выявлены различия в лимфоцитарном составе костного мозга как до начала, так и после ХИТ в зависимости от наличия/отсутствия МОБ. Так у пациентов группы II с МОБ-положительным статусом (МОБ+) еще до начала лечения в костном мозге отмечается значительно более низкий уровень нормальных В-лимфоцитов и более высокий - опухолевых В-клеток, экспрессирующих PD-1 и LAG-3 в сравнении с группой I. По нашим данным, для двух последних маркеров нижние значения у больных, впоследствии с МОБ+, превышают верхние значения у больных с МОБ-отрицательным статусом (МОБ-) в 3,3 и 2,2 раза соответственно, что позволяет рассматривать PD-1 и LAG-3 в качестве возможных факторов прогноза. Аналогичные данные нами были ранее получены при исследовании экспрессии PD-1 и LAG-3 на В-лимфоцитах периферической крови больных ХЛЛ. Так, экспрессия данных маркеров была выявлена на поверхности В-клеток у больных ХЛЛ уже до начала лечения, при этом более высокий исходный уровень экспрессии отмечен при неблагоприятном течении заболевания, у пациентов с МОБ+ после завершения терапии [32,33]. Нами разработан способ прогнозирования течения ХЛЛ, который применим для стратификации больных ХЛЛ на группы риска с учетом экспрессии PD-1 и LAG-3 на В-лимфоцитах периферической крови до лечения [34].

Более высокая экспрессия LAG-3 на CD4+ и CD3-/CD16+/56+ клетках и PD-1 на CD8+CD28+ клетках, отмеченная после лечения у больных с МОБ+ по сравнению с МОБ-, в свою очередь, свидетельствует об «истощенном» состоянии Т- и НК-клеток их костномозгового микроокружения. Известно, что LAG-3 экспрессируется на многих типах клеток, включая CD4+, CD8+ Т-клетки и Tregs. Подобно CD4, с которым он имеет некоторые общие черты строения, LAG-3 связывается с главным комплексом гистосовместимости II (МНС II), но с более высокой аффинностью [35]. Экспрессия LAG-3 необходима для нормального гомеостаза Т-лимфоцитов. Однако постоянная антигенная стимуляция, наблюдающаяся, в частности, при злокачественных новообразованиях, вызывает хроническую экспрессию LAG-3, приводя к функциональному истощению Т-клеток, следствием чего является подавление иммунного ответа. Экспрессия LAG-3 на Т-клетках приводит к снижению продукции ими цитокинов и гранзимов, угнетению их пролиферации и усилению дифференцировки в направлении Tregs, в которых он вызывает продукцию иммуносупрессивных цитокинов IL-10 и TGF-β1 [36,37].

Обычно LAG-3 рассматривают в контексте экспрессии PD-1, подчеркивая способность этих молекул потенцировать иммуносупрессивное действие, в частности, на антиген-специфические CD8+ Т-лимфоциты [38, 39]. Однако до сих пор не установлено, какие сигнальные пути могут быть задействованы для обеспечения синергизма действия LAG-3 и PD-1 и всегда ли этот синергизм наблюдается. Среди проблемных моментов, упомянутых в обзоре Elisa Ruffo et al. (2019) отмечена возможность использования экспрессии LAG-3 в качестве прогностического или предиктивного биомаркера и при каких опухолях это может быть наиболее информативно [40]. На основании полученных нами данных экспрессия LAG-3 и PD-1 может быть использована при прогнозировании МОБ при ХЛЛ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установлены различия по содержанию субпопуляций В-, Т- и НК-клеток и экспрессии на них иммунных контрольных точек PD-1, LAG-3 в костном мозге больных ХЛЛ с различным ответом на химиоиммунотерапию. Выявлен ряд потенциально прогностических показателей, предопределяющих персистенцию МОБ после терапии, в частности, исходно повышенные уровни злокачественного клона В-клеток с мембранной экспрессией PD-1 и LAG-3. Гиперэкспрессия тех же маркеров на Т-лимфоцитах микроокружения ХЛЛ у больных

с МОБ-положительным статусом 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 НК-клетках костного мозга 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 специализированной терапии.

КОНФЛИКТЫ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование не имело спонсорской поддержки.

ВКЛАД АВТОРОВ

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.

ORCID авторов:

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

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

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

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

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

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

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Хронический лимфоцитарный лейкоз/лимфома из малых лимфоцитов. Клинические рекомендации. Современная Онкология. 2020; 22 (3): 24–44. DOI: 10.26442/18151434.2020.3.200385. [Chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma. Clinical recommendations. Journal of Modern Oncology. 2020; 22 (3): 24–44. DOI: 10.26442/18151434.2020.3.200385 (in Russian)].
2. Гуськова Н.К., Селютина О.Н., Новикова И.А., Максимов А.Ю., Ноздричева А.С., Абакумова С.В. Морфологические и иммунофенотипические особенности моноклональной популяции В-лимфоцитов при хроническом лимфолейкозе. Южно-российский онкологический журнал. 2020. № 1 (3). С. 27-35. DOI: 10.37748/2687-0533-2020-1-3-3. [Guskova N.K., Selyutina O.N., Novikova I.A., Maksimov A.Yu., Nozdricheva A.S., Abakumova S.V. Morphological and immunophenotypic features of the monoclonal population of B-lymphocytes in chronic lymphocytic leukemia. South-Russian Journal of Oncology. 2020. No. 1 (3). pp. 27-35. DOI: 10.37748/2687-0533-2020-1-3-3 (in Russian)].
3. Iyer P, Wang L. Emerging Therapies in CLL in the Era of Precision Medicine. Cancers (Basel). 2023;15(5):1583. Published 2023 Mar 3. doi:10.3390/cancers15051583.
4. Shadman M. Diagnosis and Treatment of Chronic Lymphocytic Leukemia: A Review. JAMA. 2023;329(11):918-932. doi:10.1001/jama.2023.1946.
5. Иммунологическое микроокружение некоторых злокачественных опухолей: биологические и клинические аспекты / Е. Ю. Златник, И. А. Новикова, Е. П. Ульянова [и др.] // Исследования и практика в медицине. – 2019. – Т. 6, № S. – С. 120. – EDN QTCKBO. [Immunological microenvironment of some malignant tumors: biological and clinical aspects / E. Yu. Zlatnik, I. A. Novikova, E. P. Ulyanova [et al.] // Research and practice in medicine. – 2019. – Т. 6, No. S. – P. 120. – EDN QTCKBO (in Russian)].

6. Семенова Н.Ю., Бессемельцев С.С., Ругаль В.И. Роль дефектов кроветворной 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 NYu, Bessmel'tsev SS, Rugal' VI. Role of Defects of Hematopoietic and Lymphoid Niches in Genesis of Chronic Lymphocytic Leukemia. Clinical oncohematology. 2016;9(2):176-90. DOI: 10.21320/2500-2139-2016-9-2-176-190B (in Russian)].
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):576-587. doi:10.1002/cyto.b.21607.
8. Селютина 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. <https://doi.org/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. <https://doi.org/10.37748/2686-9039-2022-3-4-5> (in Russian)].
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):3974-3985. doi:10.1158/1078-0432.CCR-18-3412.
10. Funaro A, De Monte LB, Dianzani U, Forni M, Malavasi F. Human CD38 is associated to distinct molecules which mediate transmembrane signaling in different lineages. Eur J Immunol 1993;23(10):2407-2411.
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):4609-4614. 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):4944-4951. doi:10.1182/blood-2002-10-3306.
13. Marin-Acevedo JA, Dholaria B, Soyano AE, Knutson KL, Chumsri S, Lou Y. Next generation of immune checkpoint therapy in cancer: new developments and challenges. J Hematol Oncol. 2018;11(1):39. Published 2018 Mar 15. 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. The role of the PD1 receptor and its ligands PD-L1 and PDL-2 in tumor immunotherapy. Oncopediatrics. 2017;4(1):49-55. DOI: 10.15690/onco.v4i1.1684 (in Russian)].
15. Purroy N, Wu CJ. Coevolution of Leukemia and Host Immune Cells in Chronic Lymphocytic Leukemia. Cold Spring Harb Perspect Med. 2017;7(4):a026740. Published 2017 Apr 3. 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):1469-1476. 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):562-572. 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 Nov 24;14(23):5787. doi: 10.3390/cancers14235787.
19. D'Arena 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):363-368. doi:10.1016/j.leukres.2010.08.010.

20. Littwitz-Salomon E, Malyshkina A, Schimmer S and Dittmer U (2018) The Cytotoxic Activity of Natural Killer Cells Is Suppressed by IL-10+ Regulatory T Cells During Acute Retroviral Infection. *Front. Immunol.* 9:1947. doi: 10.3389/fimmu.2018.01947.
21. Ghiringhelli F, Ménard 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):1075-1085. 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):486-489. 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, Sharifian RA, Abediankenari S, Asgarian-Omran H. Dysregulated Expression of Tim-3 and NKp30 Receptors on NK Cells of Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia. *Oncol Res Treat.* 2019;42(4):202-208. 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. Published 2021 Apr 7. doi:10.3390/cancers13081766.
26. Buechele C, Baessler T, Wirths S, Schmohl JU, Schmiedel BJ, Salih HR. 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, González-Rodríguez AP, et al. LAG-3 Blockade with Relatlimab (BMS-986016) Restores Anti-Leukemic Responses in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cancers (Basel).* 2021;13(9):2112. Published 2021 Apr 27. 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. Published 2020 Nov 18. 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):3052-3064. 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 персонифицированной медицины. *Современная онкология* 2022;24(1):6–11. DOI: 10.26442/18151434.2022.1.201384.
- [Kit OI, Timofeeva SV, Sitkovskaya AO et al. Biobank of the National Medical Research Centre for Oncology as a resource for research in the field of personalized medicine. *Sovremennaya onkologiya = Journal of Modern Oncology* 2022;24(1):6–11. DOI: 10.26442/18151434.2022.1.201384 (In Russian)].
31. Rawstron A.C., 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., Новикова И.А., Златник Е.Ю., Пушкарева Т.Ф., Николаева Н.В., Камаева И.А., Саманева Н.Ю., Капуза Е.А. 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 ON, Lysenko IB, Guskova NK, Novikova IA, Zlatnik EYu, Pushkareva TF, Nikolaeva NV, Kamaeva IA, Samaneva NYu, Kapuza EA. 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 Russian)].
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: <https://doi.org/10.17650/1818-8346-2023-18-4-156-162>. [Selyutina ON, Lysenko I.B, Guskova NK, et al. PD-1 and LAG-3 as early prognostic markers in the treatment of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Onkogematologiya =*

Oncohematology 2023;18(4):156–62. DOI: <https://doi.org/10.17650/1818-8346-2023-18-4-156-162> (In Russian)].

34. Кит О.И., Селютина О.Н., Лысенко И.Б. и др. Способ прогнозирования течения хронического лимфолейкоза. Патент на изобретение 2788816 С1, 24.01.2023. Заявка No 2022129922 от 18.11.2022. [Kit O.I., Selyutina O.N., Lysenko I.B. et al. A method for predicting the course of chronic lymphocytic leukemia. Patent for invention 2788816 C1, 01.24.2023. Application No. 2022129922 dated 11.18.2022 (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 U S A. 1997;94(11):5744-5749. 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. Published 2021 Jan 8. 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):486-499. doi:10.1038/nri3862.

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

Предварительная версия статьи