

Особенности экспрессии антигенов, участвующих в формировании иммунологического синапса, при хроническом лимфолейкозе

Д.С. Бадмажапова, И.В. Гальцева, Е.Е. Звонков, Ю.О. Давыдова, Н.М. Капранов,
Н.Г. Чернова, Н.Г. Габеева, Т.Н. Моисеева, А.М. Ковригина, В.Н. Двирнык,
У.Л. Джулакян, Е.Н. Паровичникова, В.Г. Савченко

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава России;
Россия, 125167 Москва, Новый Зыковский проезд, 4

Контакты: Дарима Сэмункоевна Бадмажапова badmazhapova-darima@mail.ru

Введение. Хронический лимфолейкоз (ХЛЛ) – злокачественное лимфопролиферативное заболевание, которое проявляется накоплением опухолевых моноклональных В-лимфоцитов с характерным иммунофенотипом в костном мозге, периферической крови и вторичных лимфоидных органах. В настоящее время установлено, что клетки ХЛЛ способны образовывать иммунологические синапсы с клетками микроокружения, прямо и косвенно влияя на их функцию. Поэтому стало понятно, что в патогенезе заболевания лежит не только нарушение апоптоза опухолевых клеток, но и их способность вызывать анергию Т-лимфоцитов, тем самым избегая иммунного надзора.

Цель исследования – изучение экспрессии FAS, костимуляторных молекул CD80 и CD86, PD-1, PD-L1 на клетках ХЛЛ, а также основных субпопуляций Т-клеток (наивные, памяти, эффекторные).

Материалы и методы. В исследовании приняли участие 46 пациентов с ХЛЛ. Из них у 16 заболевание прогрессировало после химиотерапии, а 30 имели впервые установленный диагноз ХЛЛ (первичные). Последних категоризировали согласно стадиям ХЛЛ по J. Vinet. Стадия А установлена у 14 участников, В – у 10, С – у 6. В контрольную группу вошли 29 здоровых доноров. В качестве материала для анализа использовали периферическую кровь. Исследование проводили на 6-цветном проточном цитофлуориметре BD FACS Canto II (BD Biosciences, США).

Результаты. У больных ХЛЛ доля CD80⁺, CD86⁺, FAS⁺ В-клеток была достоверно ниже, чем у доноров. У первичных пациентов доля CD80⁺ клеток ХЛЛ была выше, чем у больных в стадии прогрессирования. Среди первичных пациентов доля CD80⁺ и CD86⁺ клеток оказалась ниже при продвинутых стадиях заболевания. У пациентов в стадии прогрессирования ХЛЛ доля FAS⁺ В-клеток была выше, чем у первичных. Доля PD-1⁺ В-клеток у лиц с ХЛЛ была выше, чем у доноров, а среди первичных пациентов доля PD-1⁺ опухолевых клеток была достоверно ниже при продвинутых стадиях заболевания. Доля PD-L1⁺ В-клеток у пациентов с ХЛЛ была ниже, чем у доноров. У первичных больных доля PD-L1⁺ В-лимфоцитов была выше при стадии А. Доля PD-1⁺ Т-хелперов была выше у пациентов с ХЛЛ по сравнению с группой доноров, а среди первичных пациентов выше при продвинутых стадиях заболевания. Доля PD-L1⁺ Т-хелперов и цитотоксических Т-клеток у лиц с ХЛЛ была ниже, чем у доноров. Обнаружено снижение доли CD95⁺CD28⁺ клеток, в состав которых входят наивные клетки, у пациентов по сравнению с донорами и увеличение доли эффекторных клеток (CD95⁺CD28⁻), клеток памяти (CD95⁺CD28⁺), причем доля CD8⁺ клеток памяти была выше при продвинутой стадии заболевания.

Заключение. Таким образом, снижение доли CD80/CD86⁺ В-клеток при ХЛЛ может служить причиной неэффективности формирования иммунологического синапса опухолевых клеток с Т-клетками, что приводит к анергии Т-лимфоцитов. Снижение экспрессии FAS-рецептора позволяет опухолевым клеткам ХЛЛ избежать FAS-опосредованного апоптоза. Изменение пула Т-клеток в сторону клеток памяти и эффекторов, приобретение ими CD4⁺PD-1⁺ («истощенного») фенотипа приводит к усугублению нарушенного противоопухолевого иммунитета и, возможно, к прогрессированию заболевания.

Ключевые слова: хронический лимфолейкоз, иммунологический синапс, наивные клетки, клетки памяти, эффекторные клетки, нарушение противоопухолевого иммунитета

Для цитирования: Бадмажапова Д.С., Гальцева И.В., Звонков Е.Е. и др. Особенности экспрессии антигенов, участвующих в формировании иммунологического синапса, при хроническом лимфолейкозе. Онкогематология 2018;13(1):103–114.

DOI: 10.17650/1818-8346-2018-13-1-103-114

Expression features of antigens involved in the formation of immunological synapse in chronic lymphocytic leukemia

D.S. Badmazhapova, I.V. Galtseva, E.E. Zvonkov, Yu.O. Davydova, N.M. Kapranov, N.G. Chernova, N.G. Gabeeva, T.N. Moiseeva,
A.M. Kovrigina, V.N. Dvirnyk, U.L. Dzhalakyan, E.N. Parovichnikova, V.G. Savchenko
National Research Center for Hematology; 4 Noviy Zykovskiy proezd, Moscow 125167, Russia

Background. Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is a lymphoproliferative disease that manifests by the accumulation of tumor monoclonal B-lymphocytes in the bone marrow, peripheral blood and secondary lymphoid organs. Recently it was found that CLL cells are able to form

immunological synapses with microenvironment cells, directly and indirectly affecting their function. Therefore, it became clear that the pathogenesis of CLL is not only escape of apoptosis but also the ability of CLL cells to cause T-lymphocyte anergy, thereby avoiding immune surveillance.

Objective: to study the expression of FAS, co-stimulatory molecules CD80 and CD86, PD-1, PD-L1 on CLL cells, and also to study the basic subpopulations of T-cells (naïve, memory, effector cells).

Materials and methods. The study included 46 CLL patients: 16 patients with disease progression after chemotherapy and 30 patients with newly diagnosed CLL. "Primary" patients are categorized according to J. Binet's CLL stages. Stage A was established in 14 patients, B – 10, C – 6. The control group included 29 healthy donors. Peripheral blood was used as a material for analysis. The study was performed on a 6-color flow cytometer BD FACS Canto II (BD Biosciences, USA).

Results. In CLL patients, the proportion of CD80⁺, CD86⁺, FAS⁺ B-cells was significantly lower than in donors. In "primary" patients the proportion of CD80⁺ CLL cells was higher than in patients with CLL progression. Among "primary" patients the proportion of CD80⁺ and CD86⁺ was lower in advanced stages of the disease. In patients with CLL progression the proportion of FAS⁺ B cells was higher than in "primary" patients. The proportion of PD-1⁺ B cells in CLL patients was higher than in donors and "primary" patients. The proportion of PD-1⁺ tumor cells was significantly lower in advanced stages of the disease. The proportion of PD-L1⁺ B cells in CLL patients was lower than in donors. Among the "primary" patients, the proportion of PD-L1⁺ B-lymphocytes was higher in stage A. The proportion of PD-1⁺ T-helpers was higher in CLL patients than in donors, and among "primary" patients it was higher in advanced stages of the disease. The proportion of PD-L1⁺ T-helpers and cytotoxic T-cells in CLL patients was lower than in donors. The proportion of naïve cells (CD95⁺ CD28⁻) in patients compared with donors was lower and the proportion of effector cells (CD95⁺ CD28⁻), memory cells (CD95⁺ CD28⁺) was higher, a proportion of CD8⁺ memory T-cells was higher among patients in the advanced stage of CLL.

Conclusion. Therefore, a decline the CD80/CD86⁺ B-cells in CLL can cause ineffectiveness of an immunological synapse between tumor cells and T-cells, which leads to anergy of T-lymphocytes. Decline expression of the FAS receptor allows tumor CLL cells to avoid FAS-mediated apoptosis. A change in the T-cell pool toward memory cells and effectors, the acquisition of a CD4⁺ PD-1⁺ ("exhausted") phenotype impaired antitumor immunity and possible leads to disease progression.

Key words: chronic lymphocytic leukemia, immunological synaps, naïve cells, memory cells, effector cells, impaired antitumor immunity

For citation: Badmazhapova D.S., Galtseva I.V., Zvonkov E.E. et al. Expression features of antigens involved in the formation of immunological synapse in chronic lymphocytic leukemia. *Onkogematologiya = Oncohematology* 2018;13(1):103–14.

Введение

Хронический лимфолейкоз (ХЛЛ) — злокачественное лимфопролиферативное заболевание, которое проявляется накоплением опухолевых моноклональных В-лимфоцитов с характерным иммунофенотипом в костном мозге, периферической крови и вторичных лимфоидных органах. Это самый распространенный вид лейкоза у людей старшего возраста [1, 2]. Вследствие высокой частоты встречаемости и простоты определения и получения опухолевых клеток из периферической крови ХЛЛ служит идеальной моделью для исследования В-клеточных лимфопролиферативных заболеваний.

ХЛЛ — гетерогенное заболевание. Система стадирования (Binet, Rai) не позволяет полностью оценить прогноз таких пациентов, поэтому разработан международный прогностический индекс (CLL-IPI), включающий 5 параметров: возраст >65 лет, мутация гена TP53/del17p13.1, немутированный статус IgVH, количество β₂-микроглобулина (более 3,5 г/л), стадия В/С по Binet или III–IV по Rai. Выделено 4 группы риска: низкого (0–1 балл), промежуточного (2–3 балла), высокого (4–6 баллов) и очень высокого (7–10 баллов) [1]. Однако к настоящему времени установлено, что важным фактором развития заболевания является взаимодействие опухолевых клеток с клетками микроокружения (моноциты, дендритные клетки, Т-клетки и т. д.).

Принятая на сегодняшний день концепция, предложенная G. Dunn и соавт. в 2002 г., объясняет процесс

развития опухоли, состоящий из 3 фаз: элиминация, равновесие и уклонение от иммунного ответа. Фаза элиминации характеризуется адекватным иммунным ответом: антигенпрезентирующие клетки (АПК) распознают опухолевые антигены и активируют Т-лимфоциты. АПК экспрессируют на своей поверхности молекулы CD80 и CD86, взаимодействующие с молекулой CD28 на поверхности Т-клеток и отвечающие за ко-стимуляторный сигнал. Фаза равновесия является субклинической, поскольку наблюдается неполная элиминация опухолевых клеток, а оставшиеся клетки приобретают новые биологические свойства. Фаза уклонения от иммунного ответа — стадия манифестации опухоли. На данном этапе опухолевые В-лимфоциты могут снижать экспрессию молекул МНС класса I и FAS (CD95) на своей поверхности, секретировать противовоспалительные цитокины (интерлейкины (ИЛ) 10), ингибировать созревание АПК (снижается способность экспрессии ими молекул CD80 и CD86), воздействовать на метаболизм клеточного микроокружения, который также приводит к ингибированию Т-клеточного ответа [3–10]. Таким образом, данная концепция заключается в том, что в процессе иммунного ответа происходит селекция клонов опухолевых клеток, что обеспечивает выживание только тех клонов, которые способны уклоняться от иммунного контроля [11]. Поэтому приобретение клетками опухолевого фенотипа — многоступенчатый процесс, в ходе которого они получают уникальные биологические свойства.

Известно, что в развитии опухолевых заболеваний основное место занимает анергия иммунной системы [11, 12]. Помимо уменьшения ко-стимуляторных сигналов на АПК, большое значение в развитии анергии иммунной системы имеет PD-1/PD-L1-путь, играющий важную роль при функционировании иммунологического синапса. PD-1 (program death 1, CD279) – рецептор, который экспрессируется на Т-клетках после их активации. Благодаря взаимодействию с его лигандами (PD-L1 (CD274), PD-L2 (CD273)) PD-1 отрицательно влияет на пролиферацию клеток, производство цитокинов и цитотоксические возможности Т-клеток, поддерживая процесс периферической толерантности [13]. PD-L1 может экспрессироваться на Т- и В-клетках, моноцитах, макрофагах, дендритных клетках, и обычно экспрессия PD-L1 повышается при активации клеток. PD-L1 также представлен в ряде негематологических тканей [13, 14]. Экспрессия PD-L1 негематологическими тканями играет важную роль в регуляции иммунных реакций. В дополнение к этому PD-L1 часто чрезмерно экспрессируется при опухолевых заболеваниях как один из механизмов уклонения опухолевых клеток от иммунного надзора [15–18].

Для понимания механизмов развития опухоли важна не только оценка иммунофенотипических особенностей опухолевых клеток, но и изучение Т-клеточного звена иммунной системы. Оценить состояние Т-клеточного звена иммунитета можно с помощью разделения Т-клеток на различные субпопуляции: CD28⁺CD95⁻-клетки (в их состав входят наивные клетки), эффекторные (CD28⁻CD95⁺) и клетки памяти (CD28⁺CD95⁺). Эти клетки отличаются пролиферативным потенциалом, иммунофенотипом. Наивные клетки обладают наибольшим пролиферативным потенциалом, на их поверхности отсутствует экспрессия FAS (CD95). В ответ на стимуляцию антигеном наивные клетки переходят в состояние клеток памяти – на их поверхности начинает экспрессироваться CD95, пролиферативный потенциал незначительно снижается и появляются некоторые эффекторные функции. После дальнейшей активации клетки памяти становятся эффекторными – они теряют способность получать костимуляторные сигналы и обладают наиболее выраженными эффекторными функциями (секреция цитокинов, цитотоксическое действие) [19].

Цель исследования – установление взаимосвязи между течением ХЛЛ, фенотипом опухолевых В-лимфоцитов и особенностями Т-клеточного звена иммунитета. У пациентов с ХЛЛ мы исследовали экспрессию FAS, PD-L1, PD-1, CD80 и CD86 на опухолевых CD19⁺/CD5⁺-В-лимфоцитах. Определяли долю Т-хелперов (CD4⁺) и цитотоксических Т-клеток (CD8⁺) с коэкспрессией PD-1, PD-L1. Кроме того, определяли соотношение популяций CD95⁻CD28⁺ клеток, эффекторных (CD95⁺CD28⁻) и Т-клеток памяти (CD95⁺CD28⁺).

Материалы и методы

С 2016 по 2017 г. в исследовании приняли участие 46 пациентов с ХЛЛ. Из них у 16 человек заболевание прогрессировало после химиотерапии, у 30 впервые установлен диагноз ХЛЛ (первичные больные), ранее специфическую терапию они не получали. Первичные пациенты категоризированы согласно стадиям ХЛЛ по J. Binet. Стадия А установлена у 14 пациентов, В – у 10, С – у 6. Характеристики пациентов представлены в табл. 1.

В контрольную группу вошли 29 здоровых доноров. Медиана возраста составила 37 лет (24–54 года), соотношение мужчин и женщин – 8:21.

В качестве материала для анализа использовали периферическую кровь с этилендиаминтетрауксусной кислотой (ЭДТА). Сначала проводили лизис эритроцитов раствором, содержащим хлорид аммония, Pharm-Lyse (BD Biosciences, США), затем клетки осаждали центрифугированием и отмывали в растворе CellWash (BD Biosciences, США). Панель моноклональных антител включала антитела против: CD19 PE (SJ25C1), CD5 PerCP-Cy5.5 (L17F12), CD4 APC-Cy7 (SK3), CD8 PerCP (SK1), CD3 APC (SK7), CD279 (PD-1) FITC (M1H4), CD274 (PD-L1) PE-Cy7 (M1H1), CD80 FITC (L307.4), CD86 APC (2331), CD95 (FAS) PE-Cy7 (DX2), CD28 PE (CD28.2), CD45 APC-Cy7 (2D1) производства BD Biosciences. Исследование проводили на 6-цветном проточном цитофлуориметре BD FACS Canto II (BD Biosciences, США).

Опухолевые В-клетки у пациентов с ХЛЛ выделяли по экспрессии CD19 и CD5 и определяли долю В-клеток, экспрессирующих CD80, CD86, PD-1, PD-L1 и FAS. В-клетки здоровых доноров выделяли на основании экспрессии CD19. Пример цитометрического анализа приведен на рис. 1. Для выделения субпопуляции, экспрессирующей определенный антиген, использовали так называемый метод флуорохром-минус-один (ФМО).

Т-клетки выделяли по экспрессии CD3 и подразделяли на CD4⁺ Т-хелперы и CD8⁺ цитотоксические Т-клетки. Среди Т-хелперов и цитотоксических Т-клеток определяли долю CD95⁻CD28⁺ клеток (включающих в свой состав наивные клетки), эффекторных клеток (клетки CD95⁺CD28⁻, включающие эффекторные клетки памяти и терминальные эффекторные клетки [19]) и клеток памяти (CD95⁺CD28⁺ – клетки, включающие стволовые клетки центральной памяти, клетки центральной памяти и транзиторные клетки памяти [19]) (табл. 2). Также подсчитывали долю клеток CD4⁺ и CD8⁺, экспрессирующих молекулы PD-1 и PD-L1.

Статистический анализ проводили с помощью GraphPadPrism 6.01. Данные представлены в виде среднего ± стандартной ошибки среднего. Нормальность распределения данных проверяли, используя критерий Шапиро–Уилка (при $p < 0,05$ распределение не нормальное). Проверку достоверности различий средних выборок с нормальным распределением

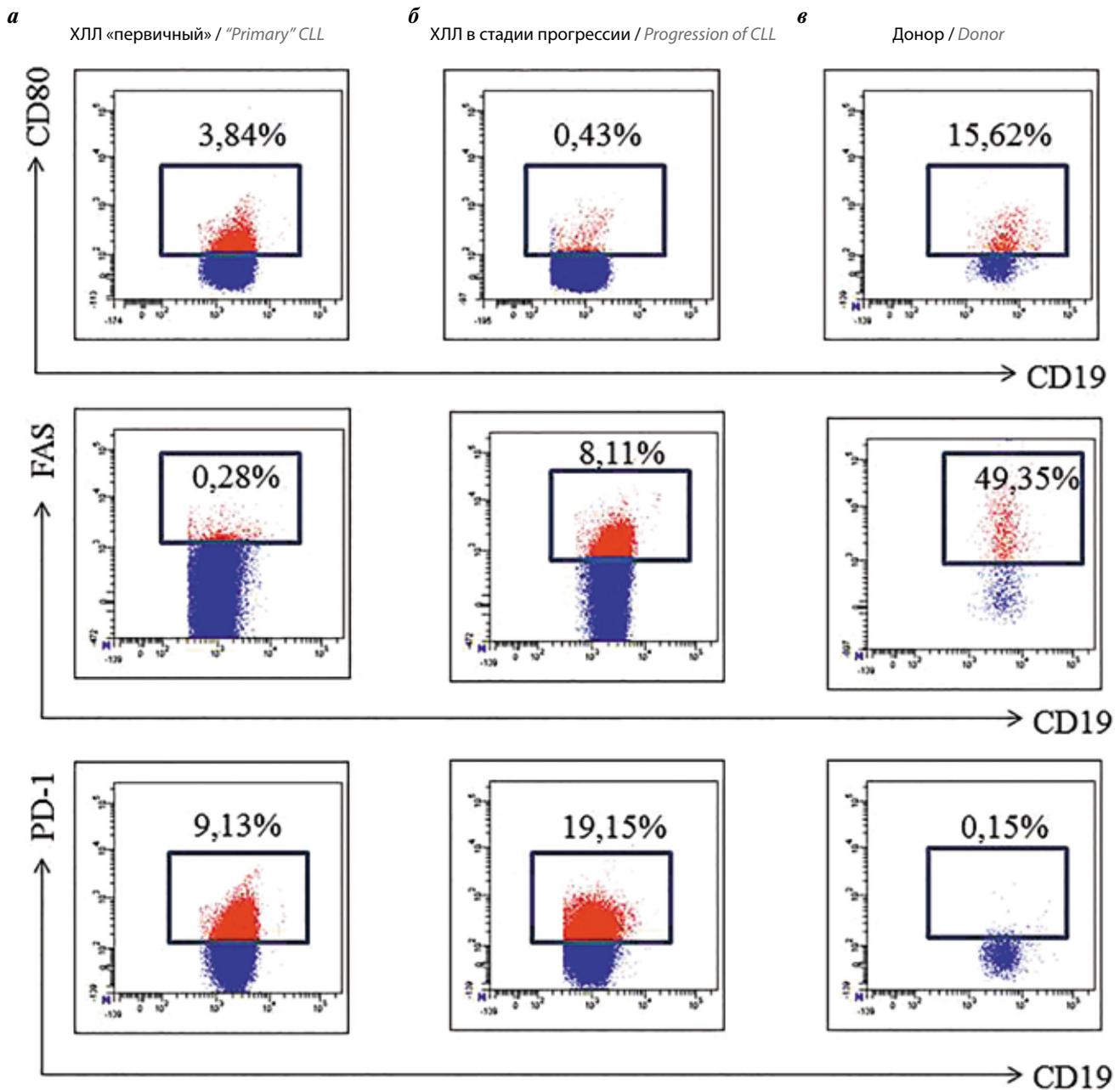


Рис. 1. Примеры точечных диаграмм экспрессии CD80, FAS, PD-1 на В-клетках: а – у первичных пациентов с хроническим лимфолейкозом; б – у пациентов с прогрессирующим хроническим лимфолейкозом; в – у доноров

Fig. 1. Point diagrams examples of CD80, FAS, PD-1 expression on B-cells: а – patients with «primary» chronic lymphocytic leukemia; б – patients with progression of chronic lymphocytic leukemia; в – donors

осуществляли с помощью критерия Стьюдента. Для проверки достоверности различий выборок, подчиняющихся ненормальному распределению, использовали критерий Манна–Уитни. Достоверными считали различия при $p < 0,05$.

Результаты

Мы провели сравнение исследуемых параметров В- и Т-клеток в 3 группах пациентов: 1-я группа – первичные с ХЛЛ без терапии, 2-я – с ХЛЛ в стадии прогрессии после терапии и 3-я – здоровые доноры. Доля В-клеток, экспрессирующих ко-стимуляторные

молекулы CD80 и CD86, у лиц с ХЛЛ обеих групп была достоверно ниже, чем у доноров (табл. 3). У первичных пациентов доля CD80⁺ В-клеток ХЛЛ была выше, чем у больных, находящихся в стадии прогрессии ($4,02 \pm 1,04$ % против $1,15 \pm 0,43$ %, $p = 0,04$) (см. табл. 3).

Доля PD-1⁺ В-клеток у пациентов с ХЛЛ была выше, чем у доноров, а доля PD-L1⁺ В-клеток ХЛЛ оказалась ниже. У пациентов 1-й и 2-й групп отличий по экспрессии PD-1 и PD-L1 не наблюдалось (табл. 3). Доля FAS⁺ В-клеток у лиц с ХЛЛ была ниже, чем у доноров. У участников в стадии прогрессии ХЛЛ доля

Таблица 1. Характеристика участников исследования с хроническим лимфолейкозом

Table 1. Characteristics of CLL patients included in the study

Показатель Parameter	Пациенты в стадии прогрессирования ХЛЛ (n = 16) CLL patients with progression (n = 16)	Пациенты с впервые установленным диагнозом ХЛЛ Primary diagnosed CLL patients			
		A (n = 14)	B (n = 10)	C (n = 6)	Всего (n = 30) Total (n = 30)
Медиана возраста Age, mediane	57	58	62	63,5	60,5
Соотношение мужчины: женщины Males:females ratio	12:4	9:5	5:5	5:1	19:11

Примечание: ХЛЛ – хронический лимфолейкоз.

Note: CLL – chronic lymphocytic leukemia.

Таблица 2. Иммунофенотип исследуемых субпопуляций Т-клеток

Table 2. Immunophenotype of T-cell subpopulation

Антиген Antigen	Наивные Т-клетки Naive T-cells	Т-клетки памяти Memory T-cells	Т-клетки эффекторы Effector T-cells
CD28	+	+	–
CD95	–	+	+

FAS⁺ В-клеток была выше, чем у первичных пациентов (11,34 ± 2,60 против 6,14 ± 1,21, p = 0,036) (табл. 3).

Доля PD-1⁺ Т-хелперов была выше у участников с ХЛЛ по сравнению с участниками группы доноров. Доля PD-1⁺ Т-хелперов у больных с прогрессирующим ХЛЛ выше, чем у первичных пациентов. Однако среди цитотоксических клеток отличий между группами ХЛЛ и донорами по экспрессии PD-1 не наблюдалось. Доля PD-L1⁺ Т-хелперов и цитотоксических Т-клеток у лиц с ХЛЛ была ниже, чем у доноров (табл. 3).

Доля CD95-CD28⁺ Т-хелперов у первичных пациентов с ХЛЛ была такой же, как в группе доноров. У лиц с прогрессирующим заболеванием она была ниже, чем у доноров (5,35 ± 1,90 % против 40,20 ± 3,83 %, p < 0,0001) и первичных пациентов (5,35 ± 1,90 % против 30,93 ± 3,74 %, p < 0,0001). Доля CD95-CD28⁺ цитотоксических Т-клеток оказалась ниже у пациентов обеих групп по сравнению с донорами, а у пациентов в стадии прогрессии – ниже, чем у первичных пациентов (3,76 ± 1,61 % против 16,92 ± 3,39 %, p = 0,0001). Доля CD4⁺ клеток памяти (CD4⁺CD95⁺CD28⁺) была выше у лиц с прогрессирующим ХЛЛ по сравнению с первичными пациентами и донорами. Доля эффекторных цитотоксических клеток (CD8⁺CD95⁺CD28⁻) была выше среди участников 1-й и 2-й групп по сравнению с донорами. Среди CD8⁺ клеток памяти (CD8⁺CD95⁺CD28⁺), эффекторных Т-хелперов (CD4⁺CD95⁺CD28⁻) отличий не было (см. табл. 3).

Нами было проведено сравнение опухолевых В-лимфоцитов и Т-клеток у первичных пациентов (ранее

не получавших терапию) по стадиям заболевания. Доля CD80⁺ и CD86⁺ клеток среди опухолевых В-лимфоцитов у пациентов с ХЛЛ в стадии С была ниже в сравнении с больными со стадией А. Доля CD86⁺ В-клеток была ниже у пациентов в стадии В, чем у лиц в стадии А (табл. 4, рис. 2).

Доля PD-1⁺ опухолевых клеток была достоверно выше у пациентов с ХЛЛ в стадиях В и С, чем у лиц с заболеванием в стадии А. Доля PD-L1⁺ В-лимфоцитов у пациентов в стадии А была выше, чем у больных со стадией В. Экспрессия FAS у пациентов в разных стадиях не различалась (см. табл. 4).

Доля CD4⁺PD-1⁺ клеток была выше у лиц с ХЛЛ в стадии С, чем В (27,43 ± 4,75 % против 14,43 ± 2,51 %, p = 0,046). При этом доля CD8⁺PD-1⁺ клеток не различалась у больных в разных стадиях. Доля CD8⁺ клеток памяти (CD8⁺CD95⁺CD28⁺) была выше у пациентов со стадией С по сравнению со стадией А. Различий по CD95⁺CD28⁺ клеткам и эффекторным Т-клеткам (CD95⁺CD28⁻) у пациентов с ХЛЛ в разных стадиях не наблюдалось (см. табл. 4).

Одним из факторов, от которого могут зависеть особенности Т-клеточного иммунитета, является возраст. Группы первичных пациентов и лиц с заболеванием в стадии прогрессии, вошедшие в исследование, не различались по возрасту (p = 0,462). В группе первичных пациентов различий между стадиями также не было. Медиана возраста доноров составила 35,5 года и была достоверно ниже (p < 0,0001), чем у первичных пациентов (медиана возраста – 60,5 года) и у больных в стадии прогрессии (57 лет).

Обсуждение

ХЛЛ – заболевание, динамически протекающее в течение длительного времени. В отличие от солидных опухолей, при ХЛЛ, как и при других лимфомах, опухолевые В-лимфоциты экспрессируют МНС класса II и костимуляторные молекулы CD80 и CD86, которые функционально активны [20]. Мы обнаружили, что при ХЛЛ доля CD80/CD86⁺ В-клеток ХЛЛ ниже по сравнению с нормальными В-лимфоцитами [21].

Таблица 3. Сравнение особенностей иммунофенотипа В-лимфоцитов и Т-клеток у лиц с ХЛЛ в стадии прогрессирования, первичных пациентов с ХЛЛ и доноров

Table 3. Comparison of B-lymphocytes and T-cells immunophenotype in «primary» CLL patients, in patients with progression and healthy donors

Показатель Parameter	Больные ХЛЛ первичные, % «Primary» CLL patients	Больные ХЛЛ в стадии прогрессирования, % CLL patients with progression	Доноры, % Healthy donors
В-лимфоциты B-lymphocytes			
CD19 ⁺ CD80 ⁺	4,02 ± 1,04	1,15 ± 0,43**	16,89 ± 1,55*
CD19 ⁺ CD86 ⁺	5,81 ± 1,62	2,46 ± 0,66	9,77 ± 2,32*
CD19 ⁺ PD-1 ⁺	12,31 ± 2,64	19,57 ± 3,75	1,27 ± 0,23*
CD19 ⁺ PD-L1 ⁺	5,17 ± 2,78	4,14 ± 2,99	35,76 ± 3,13*
CD19 ⁺ FAS ⁺	6,14 ± 1,21	11,34 ± 2,60**	16,59 ± 1,99*
Т-клетки T-cells			
CD4 ⁺ PD-1 ⁺	19,8 ± 2,21	30,05 ± 3,90**	10,78 ± 0,93*
CD8 ⁺ PD-1 ⁺	18,14 ± 2,30	15,35 ± 2,39	16,89 ± 1,36
CD4 ⁺ PD-L1 ⁺	0,93 ± 0,15	0,59 ± 0,12	1,21 ± 0,16***
CD8 ⁺ PD-L1 ⁺	0,43 ± 0,08	0,25 ± 0,05	1,09 ± 0,26*
Наивные CD4 ⁺ “Naive” CD4 ⁺ cells	30,93 ± 3,74	5,35 ± 1,90**	40,20 ± 3,83***
CD4 ⁺ клетки памяти “Memory” CD4 ⁺ cells	59,47 ± 3,53	78,76 ± 4,54**	54,36 ± 3,27***
CD4 ⁺ эффекторные “Effectors” CD4 ⁺ cells	9,32 ± 2,17	15,75 ± 4,68	5,24 ± 1,85
Наивные CD8 ⁺ “Naive” CD8 ⁺ cells	16,92 ± 3,39	3,76 ± 1,61**	34,39 ± 3,90*
CD8 ⁺ клетки памяти “Memory” CD8 ⁺ cells	26,75 ± 2,49	33,74 ± 4,60	27,97 ± 2,03
CD8 ⁺ эффекторные “Effectors” CD8 ⁺ cells	9,32 ± 2,17	15,75 ± 4,68	5,24 ± 1,85*

Примечание: ХЛЛ – хронический лимфолейкоз. *Различия между донорами и обеими группами пациентов с ХЛЛ, **различия между 2 группами пациентов с ХЛЛ, ***различия между донорами и пациентами с прогрессирующим ХЛЛ.

Note: CLL – chronic lymphocytic leukemia. *Differences between donors and both groups of CLL patients, **differences between the two groups of CLL patients, ***differences between donors and CLL patients in progression.

Эти данные соответствуют результатам других групп исследователей [22, 23]. Данный факт служит доказательством неэффективности формирования ИС клеток ХЛЛ с Т-клетками, что приводит к снижению функциональной способности Т-лимфоцитов и к неэффективному противоопухолевому иммунитету. У лиц с прогрессирующим заболеванием доля CD80 и CD86 на опухолевых клетках ниже, чем у первичных пациентов с ХЛЛ, а у пациентов в стадии С доля В-клеток с экспрессией этих антигенов оказалась ниже, чем у больных в стадиях А и В. У первичных пациентов в менее продвинутой стадии заболевания Т-клеточный иммунитет в большей степени способен контролировать опухоль, поскольку при отсутствии ко-стимулирующего сигнала происходит апоптоз или анергия

Т-клеток [24], что служит показателем более глубокого нарушения формирования ИС. Однако при ХЛЛ происходят и другие изменения В- и Т-клеток, которые нарушают формирование ИС, например снижение экспрессии молекул адгезии [25].

Известно, что доля FAS⁺ опухолевых клеток ХЛЛ снижена [26, 27], это подтверждается и в нашем исследовании. И у первичных пациентов с ХЛЛ, и у больных в стадии прогрессии доля FAS⁺ В-клеток была ниже, чем у здоровых доноров. Это свидетельствует о наличии дополнительного механизма опухолевого уклонения клеток ХЛЛ от иммунного контроля, обусловленного блокированием FAS-опосредованного пути апоптоза. Интересно, что у лиц в стадии прогрессии ХЛЛ доля FAS⁺ В-клеток была выше, чем у первичных

Таблица 4. Особенности иммунофенотипа опухолевых В-лимфоцитов и Т-клеток у первичных пациентов с хроническим лимфолейкозом без предшествующей терапии в зависимости от стадии заболевания по J. Binet

Table 4. Immunophenotype features of tumor B-lymphocytes and T-cells in patients with “primary” chronic lymphocytic leukemia without prior therapy depending on the J. Binet disease stage

Показатель Parameter	Стадия А Stage A	Стадия В Stage B	Стадия С Stage C	p
В-лимфоциты B-lymphocytes				
CD19 ⁺ CD80 ⁺	5,94 ± 1,61	3,49 ± 1,95	0,43 ± 1,67	А против С, p = 0,0006 A vs C, p = 0,0006
CD19 ⁺ CD86 ⁺	8,95 ± 2,49	4,04 ± 3,11	1,45 ± 0,75	А против С, p = 0,046 А против В, p = 0,008 A vs C, p = 0,046 A vs B, p = 0,008
CD19 ⁺ PD-1 ⁺	15,37 ± 4,38	12,40 ± 4,72	5,02 ± 2,01	А против В, p < 0,0001 В против С, p = 0,005 A vs B, p < 0,0001 B vs C, p = 0,005
CD19 ⁺ PD-L1 ⁺	10,02 ± 5,75	0,25 ± 0,03	2,05 ± 1,32	А против В, p = 0,004 A vs B, p = 0,004
CD19 ⁺ FAS ⁺	8,87 ± 2,04	2,91 ± 1,48	5,13 ± 1,90	—
Т-клетки T-cells				
CD4 ⁺ PD-1 ⁺	20,37 ± 3,61	14,43 ± 2,51	27,43 ± 4,75	В против С, p = 0,046 B vs C, p = 0,046
CD4 ⁺ PD-L1 ⁺	1,04 ± 0,27	0,63 ± 0,14	1,17 ± 0,30	—
CD8 ⁺ PD-1 ⁺	17,06 ± 3,20	14,46 ± 1,98	26,78 ± 7,70	—
CD8 ⁺ PD-L1 ⁺	0,42 ± 0,13	0,31 ± 0,08	0,65 ± 0,22	—
CD4 ⁺ “CD95-5CD28 ⁺ ”	35,75 ± 6,74	27,87 ± 5,24	26,48 ± 7,77	—
CD4 ⁺ клетки памяти “Memory” CD4 ⁺ cells	51,54 ± 6,16	63,61 ± 4,19	68,64 ± 7,38	—
CD4 ⁺ эффекторы “Effectors” CD4 ⁺ cells	12,41 ± 4,54	8,18 ± 2,22	4,82 ± 2,57	—
CD8 ⁺ “CD95-CD28 ⁺ ”	20,65 ± 6,68	15,62 ± 4,87	11,34 ± 2,16	—
CD8 ⁺ клетки памяти “Memory” CD8 ⁺ cells	20,48 ± 3,16	30,28 ± 4,41	33,48 ± 4,48	А против С, p = 0,028 A vs C, p = 0,028
CD8 ⁺ «эффекторы» “Effectors” CD8 ⁺ cells	51,03 ± 6,34	48,73 ± 7,76	53,04 ± 4,75	—

пациентов. Предполагается, что в стадии прогрессии заболевания опухолевые клетки активно пролиферируют, а за счет взаимодействия с Т-клетками посредством связывания с CD40 индуцируется экспрессия FAS на клетках ХЛЛ, но парадоксальным образом это приводит к сильным опосредованным NF-κB сигналам, которые были необходимы для выживания лейкоэмических клеток в условиях *in vitro* [28]. Не исключаются и дополнительные механизмы преодоления FAS-опосредованного апоптоза при прогрессировании заболевания.

Недавно при изучении функционирования нормальных В-лимфоцитов стало известно, что экспрессия рецептора PD-1 регулируется и индуцируется поступлением сигнала через В-клеточный рецептор (BCR — B-cell receptor), и не исключено, что антиген PD-1 может играть роль в выборе клона В-лимфоцитов, так как позволяет отобрать наиболее аффинный BCR [29]. Установлено, что PD-1 экспрессируется как на наивных, так и на В-клетках памяти, при активации Т- и В-клеток, а также на моноцитах и дендритных клетках. Стоит сказать, что на активированных

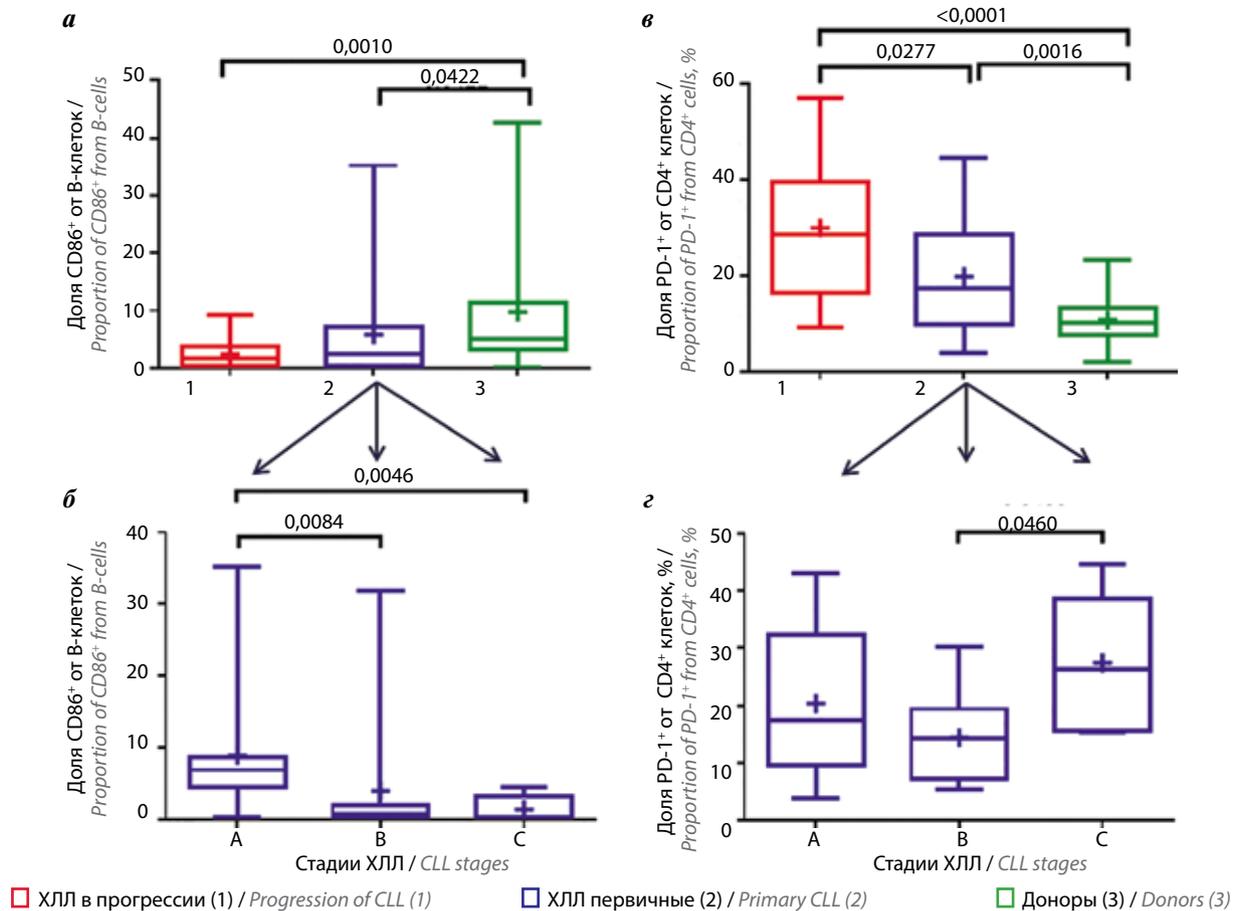


Рис. 2. Экспрессия CD86 и PD-1 на В-лимфоцитах доноров и опухолевых клетках пациентов с хроническим лимфолейкозом: а – доля CD86⁺ В-клеток в периферической крови у лиц с прогрессирующим хроническим лимфолейкозом, первичных пациентов с хроническим лимфолейкозом и доноров; б – доля CD86⁺ В-клеток в периферической крови у первичных пациентов с хроническим лимфолейкозом в зависимости от стадии заболевания (А, В, С); в – доля PD-1⁺CD4⁺ Т-клеток в периферической крови у лиц с хроническим лимфолейкозом в стадии прогрессии, у первичных пациентов с хроническим лимфолейкозом и доноров; г – доля PD-1⁺CD4⁺ Т-клеток в периферической крови у первичных пациентов с хроническим лимфолейкозом в зависимости от стадии заболевания (А, В, С)

Fig. 2. Expression of CD86 and PD-1 on donors B-lymphocytes and CLL patients tumor cells: а – proportion of CD86⁺ B-cells in peripheral blood of CLL patients with progression, “primary” CLL patients and donors; б – the proportion of CD86⁺ B-cells in peripheral blood of “primary” CLL patients, depending on disease stage (A, B, C); в – the proportion of PD-1⁺CD4⁺ T-cells in the peripheral blood of CLL patients with progression, “primary” CLL patients and donors; г – the proportion of PD-1⁺CD4⁺ T-cells in peripheral blood of “primary” CLL patients, depending on disease stage (A, B, C)

В-клетках экспрессия PD-1 выше, чем на наивных В-клетках [30, 31]. При входе В-лимфоцита в герминальный центр экспрессия PD-1 снижается или полностью исчезает. После выхода В-клетки из герминального центра PD-1 вновь начинает экспрессироваться. Это свидетельствует о том, что PD-1 является регулятором неконтролируемой активации В-лимфоцитов [31].

По нашим данным, доля PD-1⁺ В-клеток как у первичных пациентов, так и у лиц с прогрессирующим ХЛЛ была выше, чем у доноров, что свидетельствует о наиболее выраженной негативной регуляции BCR, возможном активированном фенотипе данных клеток, прошедших деление в герминальных центрах лимфоузлов. У пациентов в стадии прогрессии после терапии доля PD-1⁺ В-клеток была выше, чем у первичных. С другой стороны, среди первичных пациентов доля PD-1⁺ опухолевых клеток была ниже в более продвинутых стадиях. В настоящее время клиническое значение этого факта остается невыясненным. Можно

предположить, что сниженная экспрессия PD-1 на опухолевых клетках также свидетельствует об их наивном фенотипе и высокой способности к активации BCR и, соответственно, более агрессивному течению заболевания.

Лигандом PD-1 рецептора выступает PD-L1, который широко экспрессируется гемопоэтическими (Т- и В-клетки, моноциты, макрофаги, дендритные клетки, миелоидные супрессорные клетки) и негематологическими клетками (эндотелиальные, эпителиальные, мышечные, клетки трофобласта, клетки островков Лангерганса поджелудочной железы и др.). При взаимодействии PD-L1 с его рецептором происходит инактивация и/или апоптоз клетки, этот механизм играет важную роль в регуляции иммунного ответа и препятствует аутоагрессии Т-клеток. Предполагается также, что данный механизм широко используется опухолевыми клетками для уклонения от иммунного контроля. Однако в ходе исследования мы

выяснили, что доля PD-L1⁺ В-клеток была ниже у пациентов с ХЛЛ, чем у здоровых доноров. Вероятно, что в патогенезе ХЛЛ данный механизм уклонения от иммунного контроля не играет значительной роли. В большей степени клетки ХЛЛ вызывают анергию Т-клеток за счет снижения экспрессии ко-стимулирующих молекул CD80 и CD86 и избегают FAS-опосредованного апоптоза. С другой стороны, клетки ХЛЛ у больных в стадии А в большей степени экспрессируют не только CD80 и CD86, но и PD-L1, чем в более продвинутых стадиях. Вполне вероятно, что в менее продвинутых стадиях опухолевые клетки в большей степени используют PD-1-опосредованный механизм уклонения от Т-клеточной агрессии. Данный факт также можно объяснить и тем, что клетки ХЛЛ в периферической крови значительно отличаются от опухолевых клеток, расположенных в лимфатических узлах. Имеются данные о том, что клетки ХЛЛ в лимфатических узлах способны к активации, взаимодействуя с Т-клетками и другими клетками микроокружения, а клетки ХЛЛ в периферической крови такой способностью не обладают или обладают в меньшей степени [3].

В работе М. Grzywnowicz и соавт. [32] показано, что доля PD1⁺ клеток ХЛЛ и доля PD1⁺ Т-лимфоцитов выше, чем у здоровых доноров. Не отмечено взаимосвязи экспрессии PD-1 с полом, возрастом, стадией заболевания согласно классификации Binet, экспрессией ZAP-70 и CD38, хромосомными aberrациями. В образцах крови пациентов с мутированными генами *IGHV* экспрессия PD-1 была выше, чем при немутированном статусе [32]. В работе J. Lee и соавт. [33] также показано повышение экспрессии PD-1 у пациентов с ХЛЛ, однако не наблюдалась корреляции с PD-1 и мутационным статусом *IGHV* или экспрессией CD38. Показано, что гипометилирование ДНК в области промотора *PD-1* приводит к aberrантной сверхэкспрессии PD-1 на поверхности В-клеток ХЛЛ [33]. В работе J. Li и соавт. [34] PD-1 и PD-L1 были высокоэкспрессированы на клетках ХЛЛ и коррелировали со стадией заболевания по Rai, наличием CD38, ZAP-70, аномальным кариотипом, но не с β_2 -микроглобулином. Предполагается, что PD-1 и PD-L1 может быть прогностическим фактором при ХЛЛ [34]. В исследованиях D. Brusa и соавт. [45], A. Ramsay и соавт. [39] продемонстрирована высокая экспрессия PD-L1, однако в данных работах проводилась предварительная стимуляция опухолевых клеток, что, вероятно, и повлияло на данные результаты. Как известно, стимуляция В-клеток приводит к повышению экспрессии PD-L1.

В течение заболевания клетки ХЛЛ постоянно взаимодействуют с Т-клетками. Поэтому мы изучали основные характеристики Т-клеточного звена, а именно доли CD95⁺CD28⁺ клеток, в состав которых входят наивные клетки, эффекторных (CD95⁺CD28⁻) и Т-клеток памяти (CD95⁺CD28⁺) среди CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток.

В результате наших исследований было установлено, что доля CD95⁺CD28⁺ Т-хелперов ниже у паци-

ентов с прогрессирующим заболеванием, чем у доноров и первичных пациентов. Доля наивных цитотоксических Т-лимфоцитов была ниже среди пациентов 1-й и 2-й групп, чем у доноров, причем доля CD95⁺CD28⁺ цитотоксических Т-клеток была ниже у пациентов в стадии прогрессии по сравнению с «первичными» пациентами. Уменьшение пула CD95⁺CD28⁺ Т-клеток у пациентов с ХЛЛ в стадии прогрессирования могло быть связано с воздействием предшествующей терапии или угнетающего действия опухолевых клеток ХЛЛ. Более низкое количество CD95⁺CD28⁺ цитотоксических Т-клеток у первичных пациентов с ХЛЛ по сравнению с донорами, скорее всего, связано с тем, что они были разного возраста, а, как известно, у людей более молодых количество наивных Т-клеток, входящих в данную Т-клеточную субпопуляцию, выше [35]. Доля Т-хелперов памяти оказалась выше у пациентов с прогрессирующим ХЛЛ по сравнению с первичными пациентами и донорами. Доля эффекторных цитотоксических Т-клеток была выше среди пациентов обеих групп по сравнению с донорами. Среди эффекторных Т-хелперов различий не зарегистрировано. В группе первичных пациентов различия наблюдали только в компартменте цитотоксических Т-клеток памяти: в стадии А их было меньше, чем в стадии С.

Также мы изучили экспрессию негативного регулятора PD-1 и его лиганда — PD-L1 на Т-хелперах и цитотоксических Т-клетках. По нашим данным, доля PD-1⁺ Т-хелперов была выше у пациентов ХЛЛ, чем у доноров, а у пациентов в стадии прогрессии она была выше, чем у первичных пациентов. У первичных пациентов в стадии В доля PD-1⁺ Т-хелперов была ниже, чем в стадии С. Среди цитотоксических клеток никаких различий между группами ХЛЛ и между донорами по экспрессии PD-1 не было. Доля PD-L1 на Т-хелперах у пациентов в стадии прогрессии была ниже по сравнению с донорами, а среди цитотоксических Т-клеток — ниже по сравнению с донорами в обеих группах пациентов.

В настоящее время известно, что при ХЛЛ наблюдается сужение репертуара Т-лимфоцитов, что, вероятно, связано с постоянным взаимодействием В-клеток ХЛЛ с Т-лимфоцитами, специфичными к тому же антигену [36]. В других исследованиях отмечено смещение иммунофенотипа CD8⁺ Т-клеток в сторону терминальной дифференцировки (CD8⁺CCR7⁻CD45RO⁻) и приобретение «старяющего» Т-клеточного фенотипа (CD57⁺CD28⁻CD27⁻), что являлось фактором неблагоприятного прогноза заболевания [37, 38]. A. Ramsay и соавт. [39] показали, что экспрессия PD-1 на Т-клетках значительно выше у пациентов с ХЛЛ по сравнению со здоровыми донорами и связана с плохим прогнозом. Нами так же было установлено, что Т-клетки лиц с прогрессирующим ХЛЛ характеризуются большей экспрессией PD-1, чем у первичных пациентов. Было показано, что Т-клетки (CD4⁺ и CD8⁺) ХЛЛ имеют

так называемый истощенный фенотип ($CD4^+PD-1^+$ и $CD8^+PD-1^+$), т. е. имеют гиперэкспрессию PD-1, а также нарушена их секреторная функция [40, 41]. Подобное истощение Т-клеточного звена иммунитета было отмечено и при хронических инфекциях (цитомегаловирусной, вирусе иммунодефицита человека и Эпштейна–Барр) и связано с повышенной экспрессией PD-1 [42, 43]. Под влиянием PD-1 возникает снижение пролиферации Т-клеток наряду с уменьшением количества воспалительных цитокинов, включая фактор некроза опухоли α , интерферон γ и ИЛ-2. Одним из регулирующих экспрессию PD-1 факторов является T-bet, необходимый для развития Т-хелперов 1-го типа и осуществления цитотоксического иммунного ответа. После повторных антигенных стимуляций T-bet снижается, что приводит к экспрессии PD-1 и истощению Т-клеточного звена [43, 44]. Обнаружены эпигенетические механизмы, регулирующие PD-1 посредством метилирования ДНК, вирусная инфекция приводит к его потере в $CD8^+$ Т-клетках, следствием чего является транскрипция гена *PD-1*. Полученные нами данные могут свидетельствовать о постоянном антигенном воздействии опухолевых клеток на Т-лимфоциты, истощении пула $CD95^-CD28^+$ Т-клеток, увеличении доли Т-клеток памяти и Т-эффektorных клеток и повышении доли Т-клеток с ко-экспрессией PD-1.

Заключение

Нами показано, что опухолевые В-лимфоциты характеризуются иммунофенотипом, отличным от фенотипа В-клеток здоровых доноров, позволяющим им избегать иммунного контроля. Отмечено снижение доли $CD80^+$ и $CD86^+$ среди В-клеток пациентов с ХЛЛ, которая тем ниже, чем более продвинута стадия заболевания, — определялась более высокая доля $PD-1^+$

В-клеток ХЛЛ и более низкая FAS^+ и $PD-L1^+$ В-клеток по сравнению со здоровыми донорами. Снижение экспрессии FAS-рецептора позволяет опухолевым клеткам ХЛЛ избегать FAS-опосредованного апоптоза. Снижение ко-стимулирующего сигнала приводит к хронической антигенной стимуляции Т-клеток и их истощению, что подтвердилось тем, что у лиц с ХЛЛ уменьшен пул $CD95^-CD28^+$ Т-клеток и повышена экспрессия PD-1 на Т-хелперах. Хотя возможно, что снижение доли $CD95^-CD28^+$ Т-клеток у пациентов с ХЛЛ в стадии прогрессии было связано с предшествующей терапией, а более низкая доля $CD95^-CD28^+$ цитотоксических Т-клеток у первичных пациентов с ХЛЛ по сравнению с донорами могла быть связана с принадлежностью их к разным возрастным группам. Однако в группе первичных пациентов с ХЛЛ доля $PD-1^+$ Т-хелперов клеток была выше в стадии С, чем В, хотя участники были одного возраста.

Современная терапия ХЛЛ дает возможность получить хорошие результаты, но не позволяет добиться эрадикации опухолевых клеток. Остаются рефрактерные формы ХЛЛ или заболевание прогрессирует даже на фоне терапии. В настоящее время продолжают поиски новых подходов в обследовании пациентов и разработке препаратов. Воздействие на ко-стимулирующие и ко-ингибирующие молекулы, так называемые иммунные контрольные точки, является перспективным направлением в лечении ХЛЛ. Для применения данной терапии необходимы дополнительное обследование пациентов с ХЛЛ, определение наличия или отсутствия на опухолевых клетках антигенов, позволяющих им уклониться от иммунного ответа, а понимание механизмов регуляции данных молекул поможет применить адекватную иммунотерапию на различных этапах болезни.

Л И Т Е Р А Т У Р А / R E F E R E N C E S

- Hallek M., Cheson B.D., 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. PMID: 11492984.
- Eichhorst B., Robak T., Montserrat E. et al. Chronic lymphocytic leukaemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2015;26(Suppl 5):v78–v84. DOI: 10.1093/annonc/mdv303. PMID: 26314781.
- Vladimirova R., Popova D., Vikentjeva E., Guenova M. Chronic Lymphocytic Leukemia – Microenvironment and B Cells. In: *Leukemias – Updates and New Insights*. Ed.: M. Guenova, G. Balatzenko, 2015. InTech. DOI: 10.5772/60761.
- Mellor A.L., Munn D.H. Tryptophan Catabolism and Regulation of Adaptive Immunity. *J Immunol* 2003;170(12):5809–13. DOI: 10.4049/jimmunol.170.12.5809. PMID: 12794104.
- Burger J.A., Chiorazzi N. B cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Trends Immunol* 2014;34(12):592–601. DOI: 10.1016/j.it.2013.07.002. PMID: 23928062.
- Han T.T., Fan L., Li J.-Y. et al. Role of chemokines and their receptors in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Biol Ther* 2014;15(1):3–9. DOI: 10.4161/cbt.26607. PMID: 24149438.
- Burger J.A. Targeting the microenvironment in chronic lymphocytic leukemia is changing the therapeutic landscape. *Curr Opin Oncol* 2012;24(6):643–9. DOI: 10.1097/CCO.0b013e3283589950. PMID: 22960555.
- Казанский Д.Б. Т-лимфоциты в развитии хронического лимфолейкоза. *Клиническая онкогематология* 2012;5(2):85–95. [Kazanskiy D.B. T-lymphocytes in development of chronic lymphocytic leukemia. *Klinicheskaya onkogematologiya = Clinical oncology* 2012;5(2):85–95. (In Russ.)].
- Qorraj M., Böttcher M., Mougiakakos D. PD-L1/PD-1: new kid on the “immune metabolic” block. *Oncotarget* 2017;8(43):73364–5. DOI: 10.18632/oncotarget.20639. PMID: 29088710.

10. Kirkwood J.M., Tarhini A.A., Panelli M.C. et al. Next generation of immunotherapy for melanoma. *J Clin Oncol* 2008;26(20):3445–55. DOI: 10.1200/JCO.2007.14.6423. PMID: 18612161.
11. Dunn G.P., Bruce A.T., Ikeda H. et al. Cancer immunoeediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 2002;3(11):991–8. DOI: 10.1038/ni1102–991. PMID: 12407406.
12. Pizzi M., Boi M., Bertoni F., Inghirami G. Emerging therapies provide new opportunities to reshape the multifaceted interactions between the immune system and lymphoma cells. *Leukemia* 2016;30(9):1805–15. DOI: 10.1038/leu.2016.161. PMID:27389058.
13. Freeman G.J., Long A.J., Iwai Y. et al. Engagement of the Pd-1 Immunoinhibitory Receptor by a Novel B7 Family Member Leads to Negative Regulation of Lymphocyte Activation. *J Exp Med* 2000;192(7):1027–34. DOI: 10.1084/jem.192.7.1027. PMID: 11015443.
14. Dong H., Zhu G., Tamada K. et al. B7-H1, a third member of the B7 family, costimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nat Med* 1999;5(12):1365–9. DOI: 10.1038/70932. PMID:10581077.
15. Upadhyay R., Hammerich L., Peng P. et al. Lymphoma: Immune evasion strategies. *Cancers (Basel)* 2015;7(2):736–62. DOI: 10.3390/cancers7020736. PMID: 25941795
16. Brahmer J.R., Drake C.G., Wollner I. et al. Phase I study of single-agent anti-programmed death-1(MDX-1106) in refractory solid tumors: Safety, clinical activity, pharmacodynamics, and immunologic correlates. *J Clin Oncol* 2010;28(19):3167–75. DOI: 10.1200/JCO.2009.26.7609. PMID: 20516446.
17. Xia Y., Jeffrey Medeiros L., Young K.H. Signaling pathway and dysregulation of PD1 and its ligands in lymphoid malignancies. *Biochim Biophys Acta* 2016;1865(1):58–71. DOI: 10.1016/j.bbcan.2015.09.002. PMID: 26432723
18. Armand P. Immune checkpoint blockade in hematologic malignancies. *Blood* 2015;125(22):3393–401. DOI: 10.1182/blood-2015-02-567453. PMID:26637703.
19. Mahnke Y.D., Brodie T.M., Sallusto F. et al. The who's who of T-cell differentiation: Human memory T-cell subsets. *Eur J Immunol* 2013;43(11):2797–809. DOI: 10.1002/eji.201343751. PMID: 24258910.
20. Xu-Monette Z.Y., Zhou J., Young K. PD-1 expression and clinical PD-1 blockade in B-cell lymphomas. *Blood* 2018;131(1):68–83. DOI: 10.1182/blood-2017-07-740993. PMID: 29118007.
21. Greaves P., Gribben J.G. The role of B7 family molecules in hematologic malignancy. *Blood* 2013;121(5):734–44. DOI: 10.1182/blood-2012-10-385591. PMID: 23223433.
22. Vyth-Dreese F.A., Boot H., Dellemijn T.A. et al. Localization in situ of costimulatory molecules and cytokines in B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Immunology* 1998;94(4):580–6. DOI: 10.1046/j.1365-2567.1998.00550.x. PMID: 9767448.
23. Dakappagari N., Ho S.N., Gascoyne R.D. et al. CD80(B7.1) is expressed on both malignant B cells and nonmalignant stromal cells in non-Hodgkin lymphoma. *Cytometry B Clin Cytom* 2012;82(2):112–9. DOI: 10.1002/cyto.b.20631. PMID: 22076940.
24. Suvas S., Singh V., Sahdev S. et al. Distinct role of CD80 and CD86 in the regulation of the activation of B cell and B cell lymphoma. *J Biol Chem* 2002;277(10):7766–75. DOI: 10.1074/jbc.M105902200. PMID: 11726649.
25. Ramsay A.G., Johnson A.J., Lee A.M. et al. Chronic lymphocytic leukemia T cells show impaired immunological synapse formation. *J Clin Invest* 2008;118(7):2427–37. DOI: 10.1172/JCI35017. PMID: 18551193.
26. Williams J.F., Petrus M.J., Wright J.A. 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. PMID: 10520029.
27. Schattner E.J. CD40 ligand in CLL pathogenesis and therapy. *Leuk Lymphoma* 2000;37(5–6):461–72. DOI: 10.3109/10428190009058499. PMID: 11042507.
28. Agata Y., Kawasaki A., Nishimura H. et al. Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. *Int Immunol* 1996;8(5):765–72. DOI: 10.1093/intimm/8.5.765. PMID: 8671665.
29. Ishida Y., Agata Y., Shibahara K. et al. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J* 1992;11(11):3887–95. DOI: 10.1128/MCB.25.21.9543. PMID: 1396582.
30. Chang T.T., Kuchroo V.K., Sharpe A.H. Role of the B7-CD28 / CTLA-4 Pathway. *Curr Dir Autoimmun* 2002;5(1):113–30. DOI: 10.1159/000060550. PMID:11826754.
31. Thibult M.-L., Mamessier E., Gertner-Dardenne J. et al. PD-1 is a novel regulator of human B-cell activation. *Int Immunol* 2013;25(2):129–37. DOI: 10.1093/intimm/dxs098. PMID: 23087177.
32. Grzywnowicz M., Karabon L., Karczmarczyk A. et al. The function of a novel immunophenotype candidate molecule PD-1 in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 2015;56(10):2908–13. DOI: 10.3109/10428194.2015.1017820. PMID: 25682964.
33. Lee J., Liu J., Speir E. et al. DNA Hypomethylation Leads to Aberrant Expression of PD-1 in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood* 2012;120:3504. Abstr. 3504.
34. Li J., Pang N., Zhang Z. PD-1/PD-L1 expression and its implications in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi* 2017;38(03):198–203. [Article in Chinese, Abstract in English]. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253–2727.2017.03.005. PMID: 28395442.
35. Pfister G., Weiskopf D., Lazuardi L. et al. Naïve T cells in the elderly: Are they still there? *Ann N Y Acad Sci* 2006;1067(1):152–57. DOI: 10.1196/annals.1354.018. PMID: 16803980.
36. Hofbauer J.P., Heyder C., Denk U. et al. Development of CLL in the TCL1 transgenic mouse model is associated with severe skewing of the T-cell compartment homologous to human CLL. *Leukemia* 2011;25(9):1452–8. DOI: 10.1038/leu.2011.111. PMID: 21606964.
37. Walton J.A., Lydyard P.M., Nathwani A. et al. Patients with B cell chronic lymphocytic leukaemia have an expanded population of CD4+ perforin expressing T cells enriched for human cytomegalovirus specificity and an effector-memory phenotype. *Br J Haematol* 2010;148(2):274–84. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2009.07964.x. PMID: 19895614.
38. Nunes C., Wong R., Mason M. et al. Expansion of a CD8+PD-1+ replicative senescence phenotype in early stage CLL patients is associated with inverted CD4:CD8 ratios and disease progression. *Clin Cancer Res* 2012;18(3):678–87. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-11-2630. PMID: 22190592.
39. Ramsay A.G., Clear A.J., Fatah R. Multiple inhibitory ligands induce impaired T-cell immunologic synapse function in chronic lymphocytic leukemia that can be blocked with lenalidomide. *Blood* 2013;120(7):1412–21. DOI: 10.1182/blood-2012-02-411678. PMID: 22547582.
40. Riches J.C., Davies J.K., McClanahan F. et al. T cells from CLL patients exhibit features of T-cell exhaustion but retain capacity for cytokine production. *Blood* 2013;121(9):1612–21.

- DOI: 10.1182/blood-2012-09-457531. PMID: 23247726.
41. Brown J.A., Dorfman D.M., Ma F.-R. et al. Blockade of Programmed Death-1 Ligands on Dendritic Cells Enhances T Cell Activation and Cytokine Production. *J Immunol* 2003;170(3):1257–66. DOI: 10.4049/jimmunol.170.3.1257. PMID: 12538684.
42. Duraiswamy J., Ibegbu C.C., Masopust D. et al. Phenotype, function, and gene expression profiles of programmed death-1(hi) CD8 T cells in healthy human adults. *J Immunol* 2011;186(7):4200–12. DOI: 10.4049/jimmunol.1001783. PMID: 21383243.
43. Rosignoli G., Lim C.H., Bower M. et al. Programmed death (PD) – 1 molecule and its ligand PD-L1 distribution among memory CD4 and CD8 T cell subsets in human immunodeficiency virus-1-infected individuals. *Clin Exp Immunol* 2009;157(1):90–7. DOI: 10.1111/j.1365-2249.2009.03960.x. PMID: 19659774.
44. Chinai J.M., Janakiram M., Chen F. et al. New immunotherapies targeting the PD-1 pathway. *Trends Pharmacol Sci* 2015;36(9):587–95. DOI: 10.1016/j.tips.2015.06.005. PMID: 26162965.
45. Brusa D., Serra S., Coscia M. et al. The PD-1/PD-L1 axis contributes to T-cell dysfunction in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 2013;98(6):953–63. DOI: 10.3324/haematol.2012.077537. PMID: 23300177.

Вклад авторов

Д.С. Бадмажапова: концепция, дизайн и написание статьи, сбор данных;
 И.В. Гальцева, Е.Е. Звонков, Е.Н. Паровичникова: интерпретация данных, участие в написании статьи;
 Т.Н. Моисеева: ведение больных, предоставление материалов;
 Н.Г. Чернова, Н.Г. Габеева, У.Л. Джулакян: участие в написании статьи;
 Ю.О. Давыдова, Н.М. Капранов: проведение статистического анализа, участие в написании статьи, сбор данных;
 А.М. Ковригина: выполнение гистологического и иммуногистохимического исследования биопсийного материала, верификация диагноза;
 В.Н. Двирнык: выполнение цитологического исследования пунктатов костного мозга, периферической крови, иммунофенотипирование крови, костного мозга, биопсийного материала, верификация диагноза;
 В.Г. Савченко: концепция, окончательное одобрение рукописи.

Authors' contributions

D.S. Badmazhapova: concept, design and article writing, data collection;
 I.V. Galtseva, E.E. Zvonkov, E.N. Parovichnikova: interpretation of data, article writing;
 T.N. Moiseeva: management of patients, provision of materials;
 N.G. Chernova, N.G. Gabeeva, U.L. Dzhulakyan: article writing;
 Yu.O. Davidova, N.M. Kapranov: statistical analysis, article writing, data collection;
 A.M. Kovrigina: performance of histological and immunohistochemistry of biopsy specimen, verification of diagnosis;
 V. N. Dvirnyk: performance of cytological examination of peripheral blood, bone marrow, flow cytometry of blood, bone marrow, biopsy specimen, diagnosis verification;
 V.G. Savchenko: concept, final approval of the article.

ORCID авторов

Д.С. Бадмажапова: <https://orcid.org/0000-0002-4223-2366>
 И.В. Гальцева: <https://orcid.org/0000-0002-8490-6066>
 Е.Е. Звонков: <https://orcid.org/0000-0002-2639-7419>

ORCID of authors

D.S. Badmazhapova: <https://orcid.org/0000-0002-4223-2366>
 I.V. Galtseva: <https://orcid.org/0000-0002-8490-6066>
 E.E. Zvonkov: <https://orcid.org/0000-0002-2639-7419>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Financing. The study was performed without external funding.

Статья поступила: 11.01.2018. **Принята к публикации:** 14.03.2018

Article received: 11.01.2018. **Accepted for publication:** 14.03.2018