

БАДМАЖАПОВА ДАРИМА СЭМУНКОВНА

ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ АНТИГЕНОВ ИММУНОЛОГИЧЕСКОГО СИНАПСА У
БОЛЬНЫХ ЛЕЙКЕМИЗИРОВАННЫМИ В - КЛЕТОЧНЫМИ
ЛИМФОПРОЛИФЕРАТИВНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ

14.01.21 – гематология и переливание крови

АВТОРЕФЕРАТ

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении
«Национальный медицинский исследовательский центр гематологии»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

Доктор медицинских наук Звонков Евгений Евгеньевич

Кандидат медицинских наук Гальцева Ирина Владимировна

Официальные оппоненты:

Семочкин Сергей Вячеславович – доктор медицинских наук, профессор кафедры онкологии, гематологии и лучевой терапии, федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Луговская Светлана Алексеевна – доктор медицинских наук, профессор, профессор кафедры клинической лабораторной диагностики федерального государственного бюджетного образовательного учреждения дополнительного профессионального образования «Российской медицинской академии непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н.Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита состоится «25» сентября 2019 года в ____ часов
на заседании диссертационного совета Д208.135.01 при федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу:
125167, г. Москва, Новый Зыковский проезд, 4

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации и на сайте www.blood.ru

Автореферат разослан «__» _____ 2019 года

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат медицинских наук

Сысоева Е.П.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

В-клеточные лимфопролиферативные заболевания (В-ЛПЗ) представляют собой крайне гетерогенную группу опухолей. Установление точного диагноза требует применения различных лабораторных и инструментальных методов диагностики [Swerdlow S.H., 2017]. Патогенез этих заболеваний различен, в связи с чем применяется разные подходы к терапии. При В-ЛПЗ эффективность противоопухолевого лечения также отличается. С появлением иммунохимиотерапии достигнуты значительные успехи в лечении В-ЛПЗ. Однако при ряде нозологических форм, таких как хронический лимфолейкоз (ХЛЛ), лимфома из клеток мантийной зоны (ЛКМ) и лимфома из клеток маргинальной зоны селезенки (ЛМЗС) даже при использовании самых современных схем иммунохимиотерапии удается достигнуть лишь временный эффект [Савченко В.Г., 2018].

На сегодняшний день согласно общепринятой концепции развития опухолевых заболеваний [Dunn G.P., 2002] одним из основных механизмов «уклонения» опухолевых клеток от «иммунного надзора» является подавление функциональной активности Т-клеток благодаря использованию опухолевыми клетками так называемых «ингибиторов контрольных точек» (ИКТ) иммунного ответа, которые необходимы для предотвращения аутоиммунного повреждения тканей. Эти «ингибиторы контрольных точек» входят в состав иммунологического синапса (ИС). Известно, что Т-лимфоциты взаимодействуют с другими клетками благодаря формированию ИС. На основании этого постулата было создано новое направление иммунотерапии, предполагающее использование антител к ИКТ. Эффективность анти-ИКТ терапии оказалась высокой, в частности, при такой резистентной к химиотерапии опухоли, как меланома [Kirkwood J.M., 2008, Luke J.J., 2014]. В гематологии данная терапия с успехом применяются в лечении резистентных форм лимфомы Ходжкина [Ansell S.M., 2015, Anas Y., 2016]. Очевидна необходимость изучения возможностей использования данного вида иммунотерапии и при других В-ЛПЗ. Однако это требует глубоких знаний о функционировании ИКТ иммунного ответа при В-ЛПЗ, а также иммунологических особенностях опухолевых клеток, их микроокружения и системы противоопухолевой защиты. Поэтому в свете расширения перспектив и возможностей таргетной терапии актуальным направлением является изучение антигенов (Аг) ИС при разных В-ЛПЗ. Это позволит выявить наиболее значимые механизмы «уклонения» опухолевых клеток от иммунного ответа в каждой отдельной нозологии, что в перспективе позволит оптимизировать противоопухолевую терапию для конкретной лимфатической опухоли в зависимости от стадии и варианта заболевания.

В тоже время обращает внимание противоречивость данных об экспрессии Ag ИС при В-ЛПЗ, опубликованных в доступной литературе, что связано с различиями в экспериментальном дизайне и сложностями с воспроизведением результатов исследований [Xu-Monette Z.Y., 2018, Grzywnowicz M., 2015, Vladimirova R., 2015]. Имеются лишь единичные исследования с комплексной оценкой Ag ИС с детальным изучением особенностей их функционирования на опухолевых клетках и Т-лимфоцитах при В-ЛПЗ, что требует дальнейшего изучения.

Основные работы по изучению ИС до настоящего времени проводились с использованием иммуногистохимического (ИГХ) метода. Последний имеет ряд сложностей в интерпретации полученных результатов, что связано с такими факторами, как особенности подготовки биоматериала и качество реагентов в различных лабораториях. Также при использовании ИГХ метода на исследуемых клетках невозможно определить экспрессию более двух антигенов одновременно. Данный метод неприменим при исследовании опухолевых клеток в периферической крови при лейкомизации опухоли, что также является существенным ограничением [Петров С.В., 2012]. Проточная цитофлуориметрия лишена указанных недостатков, что позволяет провести мультипараметрический анализ клеточных суспензий [Brown M., 2000], ко-экспрессионную оценку стимулирующих и ингибирующих Ag ИС на опухолевых В-клетках и оценить субпопуляционный состав Т-лимфоцитов периферической крови у больных с лейкомизацией опухолевого процесса.

В качестве модели для изучения «нозологических особенностей» функционирования ИС оптимально исследование опухолевых клеток при ХЛЛ, ЛКМ и ЛМЗС. Указанные виды В-ЛПЗ объединяет наличие частой лейкомизации, возможности исследования опухолевых В-клеток и состав Т-лимфоцитов периферической крови.

Таким образом, данное проспективное исследование направлено на изучение особенностей экспрессии Ag ИС на опухолевых клетках и Т-лимфоцитах для выявления «иммунологически» неблагоприятных вариантов при лейкомированных В-ЛПЗ (ХЛЛ, ЛКМ и ЛМЗС).

Цель исследования

Изучить особенности экспрессии антигенов CD80, CD86, PD-1, PD-L1 и FAS, составляющих основу иммунологического синапса, на опухолевых В-клетках и на Т-лимфоцитах методом проточной цитофлуориметрии и их связь с клинико-лабораторными характеристиками больных хроническим лимфолейкозом и лимфомой из клеток мантийной зоны, лимфомой из клеток маргинальной зоны селезенки, протекающих с лейкомизацией опухолевого процесса.

Задачи исследования

1. Изучить и сравнить экспрессию антигенов CD80, CD86, PD-1, PD-L1, FAS на опухолевых В-клетках у больных ХЛЛ, ЛКМ и ЛМЗС и В-клетках здоровых доноров в периферической крови.
2. Оценить и сравнить экспрессию антигенов PD-1 и PD-L1 на Т-лимфоцитах периферической крови больных ХЛЛ, ЛКМ, ЛМЗС и здоровых доноров.
3. Провести сравнение экспрессии антигенов CD80, CD86, PD-1, PD-L1, FAS на опухолевых В-клетках и Т-лимфоцитах в зависимости от клинико-лабораторных характеристик больных ХЛЛ, ЛКМ и ЛМЗС.

Научная новизна

Впервые определена ко-экспрессия антигенов CD80, CD86, FAS, PD-1, PD-L1 у пациентов ХЛЛ и ЛКМ, ЛМЗС с лейкемизацией, и получены данные о нозологических особенностях экспрессии антигенов иммунологического синапса, выявлена взаимосвязь профиля экспрессии указанных антигенов и клинико-лабораторных характеристик опухоли.

Практическая значимость

Разработанный протокол исследования основных компонентов ИС методом проточной цитометрии может использоваться в рутинной клинической практике. Данные об экспрессии антигенов иммунологического синапса (CD86, PD-1, PD-L1, FAS) на опухолевых В-клетках и нормальных Т-лимфоцитах в крови помогут определить показания к терапии блокаторами «ингибиторов контрольных точек» у больных В-ЛПЗ. Выявление «иммунологически неблагоприятных» признаков у больных В-ЛПЗ (ХЛЛ, ЛКМ, ЛМЗС) может послужить основанием для более раннего начала терапии. Оценка экспрессии антигенов CD80, CD86, PD-1, PD-L1, FAS на субпопуляциях Т-лимфоцитов периферической крови может использоваться для детализации механизмов развития реакции трансплантат против хозяина у пациентов после аллогенной трансплантации костного мозга и подбора эффективной терапии, в частности, индукторами деплеции Т-хелперов 2 типа.

Положения, выносимые на защиту

1. Опухолевые В-клетки при разных нозологических формах В-ЛПЗ применяют различные механизмы уклонения от Т-клеточного контроля, о чем свидетельствуют отличия в экспрессии антигенов ИС: В-клетки ЛМЗС «используют» PD-1 – PD-L1 путь, а клетки ХЛЛ и ЛКМ ингибируют ко-стимулирующий путь (CD28 – CD80/CD86) и избегают FAS-опосредованного апоптоза.
2. Опухолевые В-клетки ХЛЛ отличаются по количеству клеток с экспрессией PD-1, CD80 и CD86 в зависимости от стадии по классификации J.Binet и факторов прогноза (цитогенетические aberrации).

3. Механизмы ингибирования функции Т-лимфоцитов различаются в зависимости от нозологии: ХЛЛ – анергия, ЛКМЗ – анергия и «истощение» и ЛМЗС – «истощение».

4. В-ЛПЗ являются не только клинически и морфологически, но и «иммунологически» гетерогенной группой заболеваний, что требует дифференцированного подхода к иммунотерапии блокаторами ингибиторов контрольных точек.

Внедрение результатов исследования

Результаты исследования внедрены в практическую деятельность лаборатории иммунофенотипирования крови и костного мозга ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, осуществляющей обследование больных В-ЛПЗ.

Апробация

Основные положения, материалы и результаты диссертационной работы доложены и обсуждены на следующих конференциях:

1. V Евразийский гематологический форум, семинар EAFO по онкопатологии "Клиническая гематология" (Санкт-Петербург, 2017 г.)

2. XI Мемориальный симпозиум имени Р. Горбачевой. Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток. Генная и клеточная терапия (Санкт-Петербург, 2017 г.)

3. 23 Ежегодный конгресс европейской ассоциации гематологов (Стокгольм, 2018г.)

4. VI Ежегодный конгресс сообщества онкогематологов (Хьюстон, 2018г.)

Апробация диссертации состоялась на объединенном заседании проблемных комиссий «Клинические исследования в гематологии (гемобластозы, депрессии кроветворения; ТКМ; миело- и лимфопролиферативные заболевания; опухоли лимфатической системы; патология красной крови; ИТП; порфирии), трансфузиологии, патологии гемостаза, хирургической гематологии, анестезиологии и интенсивной терапии» и «Фундаментальные исследования в гематологии, трансплантологии, трансфузиологии: Гемопоэз, молекулярная биология, биотехнология, иммуногематология; биохимия; биофизика» ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России 9 июля 2018 года.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 7 работ, из которых – 2 в журналах, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки Российской Федерации, а также 5 тезисных сообщений (2 на русском языке и 3 на английском языке).

Объем и структура работы

Работа изложена на 176 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, клинической характеристики больных и методов исследования, результатов, обсуждения, выводов, списка литературы, приложений. Текст работы содержит 49 таблиц, 44

рисунка, 2 приложения. Список литературы включает 10 отечественных и 208 зарубежных источников. Работа выполнена в нескольких отделениях: отделение интенсивной высокодозной химиотерапии лимфом с круглосуточным и дневным стационаром (заведующий отделением, д.м.н. Е.Е. Звонков), консультативном гематологическом отделении с дневным стационаром по проведению интенсивной высокодозной химиотерапии (заведующая отделением, к.м.н. Т.Н. Моисеева), лаборатории иммунофенотипирования клеток крови и костного мозга (заведующая лабораторией, к.м.н. И.В. Гальцева), при научном сотрудничестве с другими отделениями и лабораториями ФГБУ «НМИЦ гематологии» МЗ РФ (Генеральный директор – академик РАН, д.м.н., профессор В.Г. Савченко).

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Клиническая характеристика больных

В исследование были включены 53 пациента, среди них 31 пациент с впервые выявленным ХЛЛ (20 мужчин и 11 женщин, медиана возраста 60 лет (34-87)), 12 пациентов ЛКМ (7 мужчин и 5 женщин, медиана возраста 58,5 лет (42-69)) и 10 пациентов ЛМЗС (3 мужчин и 7 женщин, медиана возраста 61 год (47-74)), обследовавшихся и/или поступивших на лечение в ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России с сентября 2015 года по январь 2018 года. В качестве контрольной группы исследовалась периферическая кровь 25 здоровых доноров (12 мужчин и 13 женщин, медиана возраста 48 лет (40 - 64)).

ХЛЛ был классифицирован по стадиям в соответствии классификации J. Binet (1981г.): А стадия у 13 пациентов, В стадия – 13, С стадия – 5. Шестнадцати (51%) пациентам ХЛЛ потребовалось проведение терапии. Семи пациентам ХЛЛ была проведена терапия «флударабин – циклофосфамид – ритуксимаб» (FCR), 5 – терапия хлорамбуцилом, 1 – пациенту выполнена терапия ритуксимабом, 3 пациентам – терапия ибрутинибом.

У части пациентов ХЛЛ были исследованы клиничко-лабораторные параметры, влияющие на прогноз заболевания. Активность ЛДГ была определена у 18 (58%) пациентов, среди них у 6 (19%) пациентов активность ЛДГ была в пределах референсных значений, а у 12 (39%) – повышена. Экспрессия CD38 на клетках ХЛЛ определена у 16 (51%) пациентов, из них у 6 (38%) опухолевые клетки были CD38⁺, а 10 (62%) – CD38⁻. Двадцати пациентам ХЛЛ (65%) выполнено цитогенетическое (ЦГ) исследование (стандартное ЦГ и FISH-исследование). Благоприятная ЦГ группа (нормальный кариотип и/или наличие моноаллельной del13q14) состояла из 5 (25%) пациентов, промежуточная ЦГ группа (+12 и/или del11q22) – 12 (60%) и неблагоприятная (комплексный кариотип и/или del17p13) – 3 (15%). Концентрация β_2 -микроглобулина сыворотки крови была определена 12 (38%) пациентам, из них у 10 (83%) пациентов она была повышена, а у 2 (17%) – в пределах референсных значений. Мутационный

статус IGHV-генов был определен у 10 (32%) пациентов, из них мутированный и немутированный статус был выявлен у 5 (50%) соответственно.

Стадирование ЛКМ и ЛМЗС проводилось в соответствии с клинической классификацией Ann Arbor 1971г., дополненной в Cotswald 1989г. У всех пациентов ЛКМ и ЛМЗС установлена IV стадия заболевания. Всем пациентам ЛКМ была определена группа риска в соответствии с международным прогностическим индексом (IPI): в группы низкого, промежуточного и высокого риска ЛКМ вошли по 4 пациента. Всем пациентам ЛКМ определен гистологический вариант ЛКМ: 8 пациентов (67%) имеют "классический" вариант, а 4 - бластоидный (33%). Активность ЛДГ у 1 пациента (8%) была в пределах референсных значений и у 11 (92%) – повышена. β_2 -микроглобулин сыворотки крови был определен у 6 (50%) пациентов ЛКМ, из них у 1 (17%) пациента концентрация β_2 -микроглобулина была в пределах референсных значений и у 5 (83%) - повышена. Мутационный статус IGHV-генов был выполнен 10 пациентам ЛКМ (88%), из них у 4 (40%) пациентов – мутированный статус IGHV-генов и у 6 (60%) – немутированный. Цитогенетическое исследование биоптата опухоли или костного мозга было выполнено 11 (92%) больным ЛКМ, из них у 6 (54%) были обнаружены неблагоприятные цитогенетические аберрации, к которым относятся комплексный кариотип и/или del17p13 в сочетании с t(11;14) и у 5 (46%) пациентов - обнаружена только t(11;14). 8 (67%) пациентам проводилась терапия по программе R-BAC/R-Hd-ARA-C с последующим выполнением высокодозной консолидацией с ауто-ТГСК, 4 пациентам проводились непрограммные курсы ПХТ (флюдарабин содержащие курсы, монотерапия ритуксимабом, VR-CAP, R-COP, R-CHOP, RB) в связи с тяжелым соматическим статусом.

У всех пациентов ЛМЗС отмечалась спленомегалия более 15 см, в связи с чем с лечебной целью была выполнена спленэктомия. Размеры селезенки были от 15 до 30 см. У всех пациентов ЛМЗС (100%) активность ЛДГ была выше референсных значений.

Методы исследования

У больных ХЛЛ, ЛКМ и ЛМЗС анализировали экспрессию Ag CD80, CD86, PD-1, PD-L1, FAS на поверхности опухолевых клеток, а также субпопуляционный состав Т-лимфоцитов и экспрессию AgPD-1, PD-L1 на их поверхности в дебюте заболевания. В группе контроля анализируемые Ag исследовали на В- и Т-лимфоцитах, оценены основные субпопуляции Т-клеток.

Материалом для иммунофенотипического исследования служили образцы периферической крови доноров и больных ХЛЛ, ЛКМ, ЛМЗС. Исследование выполнялось на проточном цитометре FACSCantoII, Becton Dickinson. Для исследования использовали следующие моноклональные антитела (MкАТ):CD45, CD19, CD5, CD25, CD3, CD4, CD8, CD279, CD80, CD86, CD28, CD95, CD274. Перед окраской MкАТ в исследуемый образец крови

добавляли лизирующий раствор, содержащий хлорид аммония «PharmLyse», с целью лизиса эритроцитов. Клеточную взвесь отмывали фосфатно-солевым буфером «CellWash», после чего повторно ресуспендировали и осаждали центрифугированием в течение 3,5 минут при 400G. В пробирку с клеточной взвесью добавляли раствор «CellWash» в объеме 200 мкл, далее в 4 пробирки вносили взвесь клеток в объеме 50 мкл, после чего добавляли в требуемом объеме МкАТ. После окраски проводили 15-ти минутную инкубацию в темноте при комнатной температуре, клеточную взвесь отмывали раствором «CellWash», ресуспендировали и осаждали центрифугированием в течение 3,5 минут при 400G. Супернатант удаляли. К полученной клеточной суспензии добавляли по 100 мкл раствора «CellWash», далее проводили анализ на проточном цитофлуориметре. Сначала проводили выделение клеток по параметру прямого светорассеяния (FSC-H против FSC-A), отбирали одиночные клетки, исключали «дебрис» (FSC-A против SSC-A). По маркеру CD45 выделяли только лейкоциты (CD45-позитивные клетки). Далее отбирали В-клетки, экспрессирующие CD19 при ЛМЗС и у здоровых доноров, или CD19⁺CD5⁺ клетки – при ХЛЛ и ЛКМ. Клональность В-клеток подтверждалась рестрикцией по легким цепям иммуноглобулинов. После выделения опухолевого гейта определяли долю опухолевых В-клеток, экспрессирующих AgCD80, CD86, PD-1, PD-L1, FAS. Далее отбирали Т-клетки, экспрессирующие Ag CD3, проводили разделение Т-лимфоцитов по экспрессии CD8 и CD4. Выделяли популяции CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺CD8⁺, CD4⁻CD8⁻Т-лимфоцитов. Среди CD4⁺Т-клеток определяли долю Т-регуляторных клеток (Т-рег) по высокой экспрессии антигена CD25. Среди Т-хелперов и цитотоксических Т-клеток по экспрессии маркеров CD95 и CD28 определяли долю «наивных клеток» (CD28⁺CD95⁻), «клеток эффекторов» (CD95⁺CD28⁻) и «клеток памяти» (CD28⁺CD95⁺). Также подсчитывали долю CD4⁺ и CD8⁺ клеток, экспрессирующих AgPD-1 и PD-L1. Для выделения субпопуляции, экспрессирующей определенный Ag, использовали метод «флуорохром-минус-один» (ФМО). Результаты иммунофенотипирования оценивались при помощи программного обеспечения FACSDiva 8.2 (BD, США).

Результаты исследования подвергались статистической обработке с помощью программы «SAS» (Statistical Analysis System) и «GraphPadPrism 6.01». Результаты считали достоверными (статистически значимыми) при значении $p < 0,05$. Звездочками (*) на рисунках указывали наличие достоверных отличий между группами пациентов (**** – $p \leq 0,0001$; *** – $p \leq 0,001$; ** – $p \leq 0,01$; * – $p < 0,05$). Использовались методы описательной статистики: параметрический и непараметрический дисперсионный анализ, методы пошагового дискриминантного анализа, однофакторный и многофакторный ковариационный анализ. Данные представлены в виде медианы (нижняя граница – верхняя граница 95% доверительного интервала). Графические изображения представлены в виде диаграмм размаха (бокс-плот), где горизонтальная черта -

медиана, а размах - минимальное и максимальное значение. Проведен ROC-анализ для определения порогового значения исследуемых Ag, снижение или превышение которого, указывало бы на вероятность начала терапии. По установленному пороговому значению пациенты были разделены на 2 группы в зависимости от порога экспрессии исследуемых Ag, после чего оценивали вероятность наступления терапии. Точкой цензурирования считалась дата последнего контакта с больным, или дата проведения любого лабораторного анализа для больных, находящихся под наблюдением в стационаре на этот момент.

Результаты исследований

Сравнение иммунофенотипических параметров В- и Т-клеток доноров и пациентов

С помощью многоцветной проточной цитометрии была определена доля В-клеток, экспрессирующих CD80, CD86, PD-1, PD-L1 и FAS у доноров ($n = 25$) и пациентов ($n = 53$), из которых 31 пациент с диагнозом ХЛЛ, 12 пациентов - ЛКМ, 10 пациентов - ЛМЗС. Было обнаружено, что в группе пациентов доля В-клеток, экспрессирующих антиген PD-1, была статистически значимо выше, чем в контрольной группе (5,6% и 1,5% соответственно, $p < 0,0001$), а FAS (2,1% и 14,8% соответственно, $p = 0,0003$), PD-L1 (0,7% и 9,1% соответственно, $p < 0,0001$), CD80 (3,5% и 11,3% соответственно, $p = 0,0148$) и CD86 (1,0% и 4,8% соответственно, $p = 0,0002$) - ниже (рисунок 1).

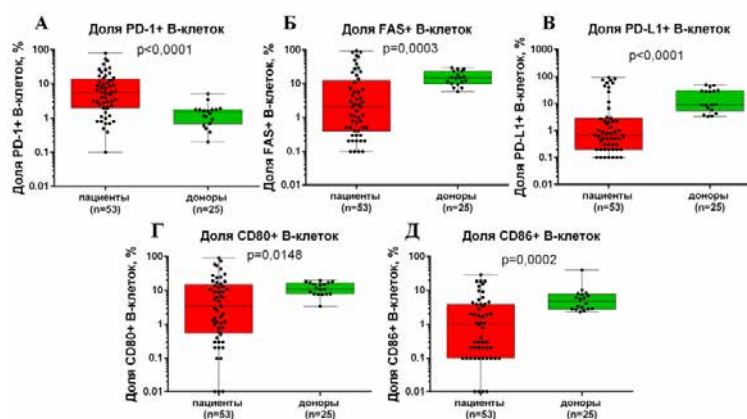


Рисунок 1. Доля В-клеток, экспрессирующих антигены, участвующие в формировании ИС, в группе пациентов и контрольной группе: А - PD-1, Б - FAS, В - PD-L1, Г - CD80, Д - CD86.

При исследовании Т-лимфоцитов было обнаружено, что у пациентов доля $CD4^+PD-1^+$ Т-клеток больше, чем у доноров (9,4% и 3,7% соответственно, $p = 0,0006$), а доля $CD8^+PD-1^+$ Т-клеток (7,1% и 5,7% соответственно, $p = 0,1975$) достоверно не отличалась. Относительное количество $CD4^+PD-L1^+$ и $CD8^+PD-L1^+$ Т-клеток было статистически значимо меньше в группе

пациентов, чем у доноров (0,3% и 1,0%, 0,3% и 0,9%, $p = 0,0008$ и $p = 0,0005$ соответственно) (рисунок 2).

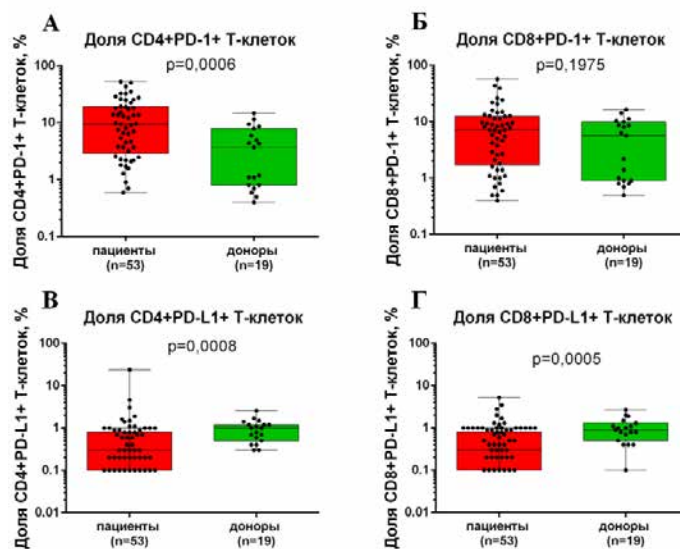


Рисунок 2. Доля Т-клеток, экспрессирующих PD-1 и PD-L1, в группе пациентов и контрольной группе доноров: А – CD4⁺PD-1⁺, Б – CD8⁺PD-1⁺, В – CD4⁺PD-L1⁺, Г – CD8⁺PD-L1⁺

Анализ зависимости относительного количества FAS⁺, CD80⁺, CD86⁺, PD-1⁺, PD-L1⁺ В-клеток и субпопуляций Т-клеток у доноров и пациентов В-ЛПЗ от возраста

По результатам проведенного исследования, было установлено, что группа доноров моложе, чем группа пациентов ХЛЛ и ЛМЗС (p^{***} , p^{**}), а группы заболеваний были сбалансированы по возрасту. Данные представлены на рисунке 3.

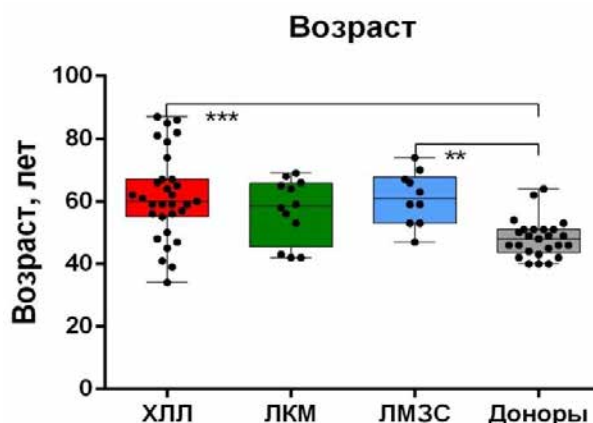


Рисунок 3. Анализ сбалансированности различных исследуемых групп от возраста

Полученные результаты послужили поводом для анализа зависимости относительного количества FAS⁺, CD80⁺, CD86⁺, PD-1⁺, PD-L1⁺ В-клеток и субпопуляций Т-клеток у доноров и пациентов от возраста. Было обнаружено, что доли FAS⁺, CD80⁺, CD86⁺, PD-1⁺, PD-L1⁺ В-

клеток от возраста не зависели ни в группе доноров, ни в группе пациентов. Данные представлены в таблице 1.

Таблица 1. Данные по анализу корреляции доли FAS⁺, CD80⁺, CD86⁺, PD-1⁺, PD-L1⁺ В-клеток от возраста

Параметр	Доноры		Пациенты	
	R ²	p	R ²	p
FAS ⁺	0,0000008	0,9947	0,008606	0,7143
PD-1 ⁺	0,005978	0,3067	0,02648	0,5188
PD-L1 ⁺	0,006029	0,5805	0,0002205	0,9534
CD80 ⁺	0,002507	0,7218	0,02197	0,5573
CD86 ⁺	0,008136	0,6974	0,056818	0,0921

Примечание: R² - коэффициент корреляции, p – показатель значимости

В группе доноров не было обнаружено зависимости относительного количества CD4⁺ наивных Т-клеток, CD4⁺ Т-клеток эффекторов, CD4⁺ и CD8⁺ клеток памяти, CD4⁺CD8⁺, CD4⁻CD8⁻ клеток, CD4⁺PD-1⁺, CD8⁺PD-1⁺ и CD4⁺PD-L1⁺ и CD8⁺PD-L1⁺ клеток от возраста. В группе пациентов ХЛЛ, ЛКМ и ЛМЗС не было обнаружено корреляции относительного количества CD4⁺ и CD8⁺ клеток, CD4⁺ клеток эффекторов, CD8⁺ клеток памяти, Т-регуляторных клеток, CD4⁺CD8⁺, CD4⁻CD8⁻ клеток, CD4⁺PD-1⁺, CD8⁺PD-1⁺, CD4⁺PD-L1⁺ и CD8⁺PD-L1⁺ клеток от возраста. Данные представлены в таблице 2.

Таблица 2. Данные по анализу корреляции относительного количества субпопуляций Т-лимфоцитов и Т-клеток, экспрессирующих PD-1 и PD-L1 от возраста

Параметр	Доноры		Пациенты	
	R ²	p	R ²	p
CD4 ⁺	0,2926	0,0250	0,01443	0,4212
CD8 ⁺	0,2774	0,0299	0,02872	0,2548
CD4 ⁺ наивные	0,1122	0,1888	0,1158	0,0127
CD8 ⁺ наивные	0,3785	0,00086	0,2723	<0,0001
CD4 ⁺ эффекторы	0,03502	0,4720	0,003830	0,6598
CD8 ⁺ эффекторы	0,4028	0,0062	0,1140	0,0134
CD4 ⁺ памяти	0,08262	0,2633	0,09194	0,0383
CD8 ⁺ памяти	0,1461	0,1300	0,006870	0,5797
CD4 ⁺ CD8 ⁺	0,07145	0,2996	0,02424	0,2960
CD4 ⁻ CD8 ⁻	0,04874	0,3945	0,009887	0,5061
Т-reg	0,2534	0,0394	0,01975	0,3461
CD4 ⁺ PD-1 ⁺	0,02021	0,3507	0,0003183	0,8991

CD8 ⁺ PD-1 ⁺	0,0003402	0,9403	0,001198	0,8056
CD4 ⁺ PD-L1 ⁺	0,01522	0,6148	0,0000006	0,9530
CD8 ⁺ PD-L1 ⁺	0,1225	0,1418	0,01689	0,3537

Примечание: R^2 - коэффициент корреляции, p – показатель значимости, жирным шрифтом указано наличие корреляции между исследуемыми параметрами от возраста

Была обнаружена зависимость относительного количества CD4⁺ и CD8⁺ лимфоцитов, Т-регуляторных клеток, CD8⁺ наивных и эффекторных клеток от возраста в контрольной группе. При этом доля CD8⁺ наивных клеток, CD4⁺ клеток с возрастом уменьшалась, а доля CD8⁺ клеток, CD8⁺ клеток эффекторов и Т-регуляторных клеток – увеличивалась (рисунок 4).

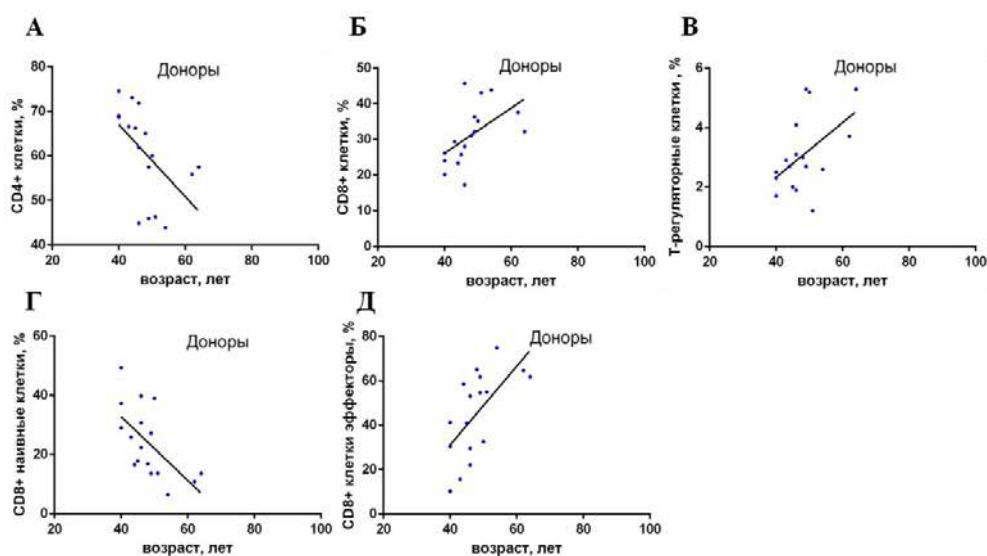


Рисунок 4. Зависимость относительного количества субпопуляций Т-клеток от возраста в группе доноров

А - CD4⁺ клетки, Б - CD8⁺клетки, В - Т-регуляторные клетки, Г - CD8⁺ наивные клетки, Д - CD8⁺клетки эффекторы

Была определена обратная зависимость доли наивных CD4⁺ и CD8⁺ клеток от возраста пациентов. Обнаружена зависимость доли CD8⁺ клеток эффекторов и CD4⁺ клеток памяти от возраста, при этом доля CD8⁺ клеток эффекторов и CD4⁺ клеток памяти с возрастом нарастала (рисунок 5).

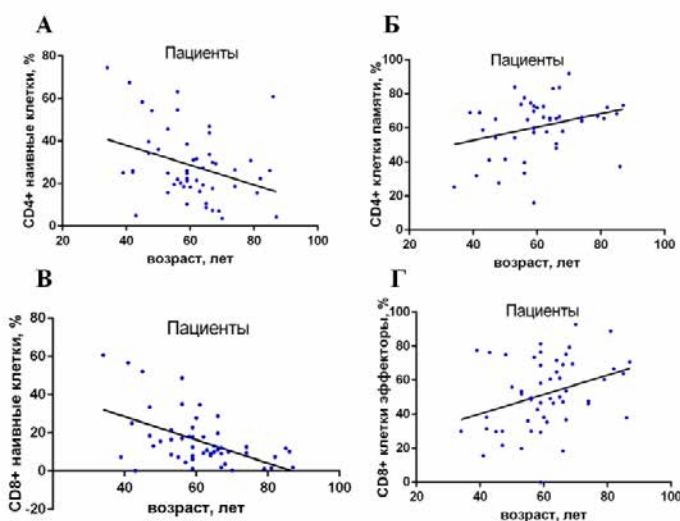


Рисунок 5. Зависимость относительного количества субпопуляций Т-клеток от возраста в группе пациентов

А - $CD4^+$ наивные клетки, Б - $CD4^+$ клетки памяти, В - $CD8^+$ наивные клетки, Г - $CD8^+$ клетки эффекторы

Таким образом, было установлено, что среди доноров относительное количество $CD4^+$ и $CD8^+$ клеток, $CD8^+$ наивных, эффекторных и Т-регуляторных клеток зависит от возраста, при исследовании остальных параметров такой корреляции получено не было. В группе пациентов имелась корреляционная зависимость возраста и относительного количества наивных $CD4^+$, $CD8^+$ клеток, $CD8^+$ клеток эффекторов и $CD4^+$ клеток памяти. Относительное количество $CD4^+$, $CD8^+$ клеток и Т-регуляторных клеток не демонстрировало корреляционной зависимости от возраста в отличие от доноров. И наоборот, в группе доноров корреляционной зависимости относительного количества наивных $CD4^+$, $CD4^+$ клеток памяти от возраста не было обнаружено.

Многофакторный корреляционный анализ параметров, зависящих от возраста, в исследуемых группах

В связи с тем, что при выполнении корреляционного анализа была обнаружена зависимость относительного количества $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток, $CD4^+$ и $CD8^+$ наивных клеток, $CD4^+$ клеток памяти и $CD8^+$ клеток эффекторов и Т-регуляторных клеток в исследуемых группах от возраста, был проведен многофакторный анализ зависимости этих параметров с учетом возраста в исследуемых группах пациентов и группой доноров. В результате было показано, что значимым фактором различия между группами является возраст ($p < 0,0135$) и доля $CD4^+$ наивных клеток ($p < 0,0001$). При исключении доноров из многофакторного анализа,

фактор возраста не оказывал значимого влияния, что свидетельствовало о сбалансированности групп пациентов с различными лимфомами. Из полученных результатов следует, что фактор возраста нужно учитывать при сравнении зависящих от возраста параметров (доли CD4⁺ и CD8⁺ наивных клеток, CD8⁺ клеток памяти и клеток эффекторов) в группе доноров и пациентов.

Сравнение иммунофенотипических параметров опухолевых клеток и Т-лимфоцитов в группе В-ЛПЗ и контрольной группе

При исследовании доли В-клеток, экспрессирующих Аг, входящих в ИС, были обнаружены различия в исследуемых параметрах у больных ХЛЛ, ЛКМ, ЛМЗС и у доноров. Данные представлены в таблице 3.

Таблица 3. Относительное количество В-клеток, экспрессирующих антигены FAS, PD-1, PD-L1, CD80, CD86 у пациентов В-ЛПЗ и у доноров

Параметр	Доля В-клеток ХЛЛ, %	Доля В-клеток ЛКМ, %	Доля В-клеток ЛМЗС, %	Доля В-клеток доноров, %
FAS	1,1(0,5-2,5)****	0,8 (0,2-22,3)**	56,7 (10,9-87,8)	14,8(10,0-24,3)
PD-1	5,5(2,8-9,3)**	3,8 (0,7-17,2)	16,9 (0,8-48,8)***	1,5(0,7-1,8)
PD-L1	0,3(0,2-0,9)****	0,6 (0,4-3,1)**	57,7 (2,2-82,3)****	9,1(5,9-30,3)*
CD80	1,2(0,3-2,6)****	9,1 (1,1-17,3)*	29,0 (5,6-75,4)	11,3(7,9-17,0)***
CD86	0,3(0,1-1,9)**	1,0 (0,1-3,9)*	2,0 (0,4-15,8)	4,8(2,8-7,6)

Примечание: данные представлены в виде: медиана (нижняя граница – верхняя граница 95% доверительного интервала), * указывает на наличие достоверных отличий между исследуемыми группами, жирным шрифтом указаны сравниваемые группы

При ЛКМ и ХЛЛ доля FAS⁺ опухолевых В-клеток была достоверно ниже, чем в группе доноров (0,8 % и 14,8%, p** ; 1,1% и 14,8%, p**** соответственно) и в группе ЛМЗС (0,8% и 56,7%, p**; 1,1% и 56,7%, p**** соответственно). Доля FAS⁺ опухолевых В-клеток при ЛМЗС достоверно не отличалась от группы доноров (56,7% и 14,8%, p > 0,05). Относительное количество PD-1⁺ В-клеток при ЛМЗС и ХЛЛ было статистически значимо выше, чем у доноров (16,9% и 1,5%, p***; 5,5% и 1,5%, p**, соответственно). Доля PD-1⁺ В-клеток при ЛКМ достоверно не отличалась от доноров (3,8% и 1,5%, p > 0,05). Доля PD-L1⁺ В-клеток в сравнении с донорами была ниже в группе ЛКМ (9,1% и 0,6%, p*), группе ХЛЛ (9,1% и 0,3%, p****). Доля PD-L1⁺ В-клеток в сравнении с ЛМЗС была ниже в группе ЛКМ (57,7% и 0,6%, p**), группе ХЛЛ (0,3% и 57,7%, p****). Доля PD-L1⁺ В-клеток в группе ЛМЗС в сравнении с донорами достоверно не отличалась (57,7% и 9,1%, p > 0,05). Доля CD80⁺ В-клеток в группе

ХЛЛ по сравнению с контрольной группой, группой ЛКМ и ЛМЗС была ниже (1,2% и 11,3%, p^{***} ; 1,2% и 9,1%, p^* ; 1,2% и 29,0% p^{****} соответственно). Группы ЛМЗС и ЛКМ по относительному количеству $CD80^+$ В-клеток достоверно не отличались от контрольной группы (29,0% и 11,3%, $p > 0,05$; 9,1% и 11,3%, $p > 0,05$ соответственно). Доля $CD86^+$ В-клеток по сравнению с контрольной группой была ниже в группе ХЛЛ (0,3% и 4,8%, p^{**}) и ЛКМ (1,0% и 4,8%, p^*). Достоверных отличий в относительном количестве $CD86^+$ В-клеток при сравнении контрольной группы и ЛМЗС не обнаружено (4,8% и 2,0%, $p > 0,05$) (рисунок 6).

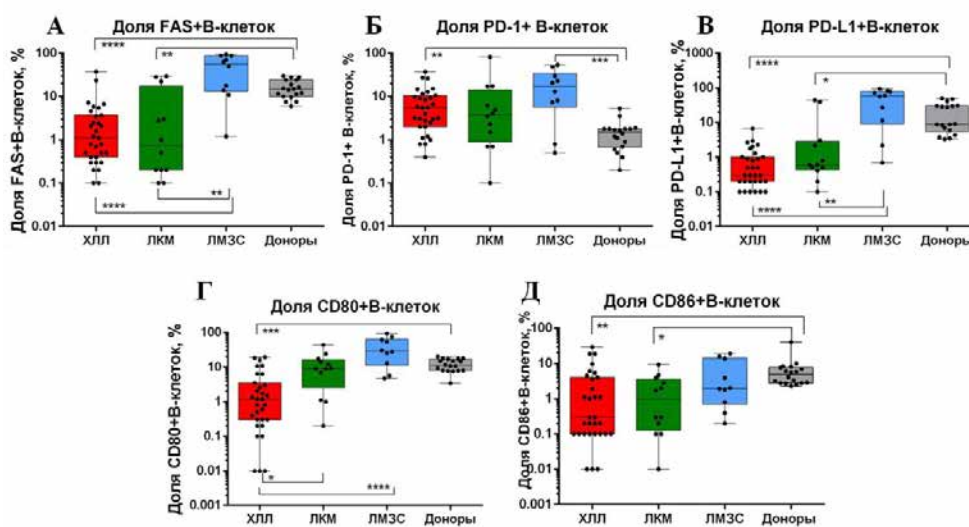


Рисунок 6. Сравнение относительного количества В-клеток, экспрессирующих антигены, входящих в состав ИС, между донорами и пациентами ХЛЛ, ЛКМ и ЛМЗС

А - FAS, Б - PD-1, В - PD-L1, Г - CD80, Д - CD86

Выполнена оценка относительного количества $CD4^+$ и $CD8^+$ лимфоцитов, экспрессирующих Аг PD-1 и PD-L1. Данные представлены в таблице 4.

Таблица 4. Относительное количество $PD-1^+$ и $PD-L1^+$ Т-клеток у пациентов В-ЛПЗ и у доноров

Параметр	Доля Т-клеток при ХЛЛ, %	Доля Т-клеток при ЛКМ, %	Доля Т-клеток при ЛМЗС, %	Доля Т-клеток доноров, %
$CD4^+PD-1^+$	4,7(2,5-9,4)*	13,9(6,4-32,3)**	20,8(9,2-32,4)***	3,7(0,8-7,9)
$CD4^+PD-L1^+$	0,2(0,1-0,4)**	0,5(0,1-0,8)	0,8(0,2-4,6)	1,0(0,5-1,2)
$CD8^+PD-1^+$	3,8(1,4-7,8)	9,4(6,6-12,6)	10,2(5,0-39,4)	5,7(0,9-9,9)
$CD8^+PD-L1^+$	0,2(0,1-0,8)*	0,3(0-0,7)*	0,4(0-1,2)	0,9(0,5-1,3)

Примечание: данные представлены в виде: медиана (нижняя граница – верхняя граница 95% доверительного интервала), * указывает на наличие достоверных отличий между исследуемыми группами, жирным шрифтом указаны сравниваемые группы

При оценке относительного количества PD-1⁺ Т-клеток было обнаружено, что при ЛМЗС и ЛКМ доля CD4⁺PD-1⁺ клеток была выше, чем в контрольной группе (20,8% и 3,7%, p***; 13,9% и 3,7%, p** соответственно). В группе ХЛЛ доля CD4⁺PD-1⁺ клеток была ниже, чем в группе ЛМЗС (4,7% и 20,8%, p*), а доля CD8⁺PD-1⁺ клеток в исследуемых группах достоверно не отличалась. Доля PD-L1⁺CD4⁺ и PD-L1⁺CD8⁺ клеток при ХЛЛ была ниже, чем у доноров (0,2% и 1,0%, p**; 0,2% и 0,9%, p*, соответственно). Доля CD8⁺PD-L1⁺ клеток была ниже при ЛКМ, чем у доноров (0,3% и 0,9%, p*) (рисунок 7).

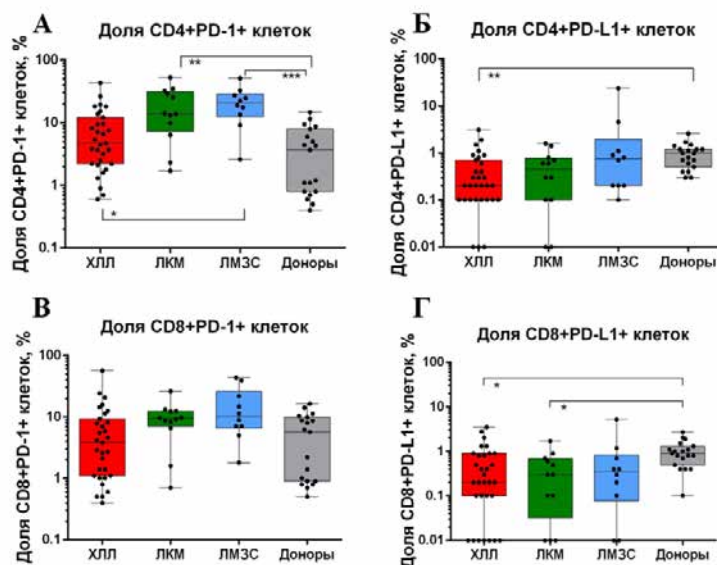


Рисунок 7. Сравнение доли Т-клеток, экспрессирующих PD-1 и PD-L1, при В-ЛЛПЗ и у доноров

А - Доля CD4⁺PD-1⁺ клеток, Б - Доля CD4⁺PD-L1⁺ клеток, В - Доля CD8⁺PD-1⁺ клеток, Г - Доля CD8⁺PD-L1⁺ клеток

Относительное количество PD-1⁺ и PD-L1⁺ Т-хелперов, PD-L1⁺ цитотоксических Т-клеток различалось в зависимости от форм заболевания В-ЛЛПЗ и от контрольной группы, относительное количество PD-1⁺ цитотоксических Т-клеток достоверно не отличалось (рисунок 7).

Таким образом, было обнаружено, что опухолевые В-клетки ХЛЛ, ЛКМ и ЛМЗС имеют индивидуальные нозологические особенности в экспрессии антигенов CD80, CD86, PD-1, PD-L1, FAS и отличаются от В-клеток здоровых доноров. Различия в относительном количестве PD-1⁺ и PD-L1⁺ Т-клеток указывают на различные варианты подавления функции Т-лимфоцитов при каждой нозологической форме В-ЛЛПЗ: «истощение» функции Т-лимфоцитов или анергии (рисунок 8).

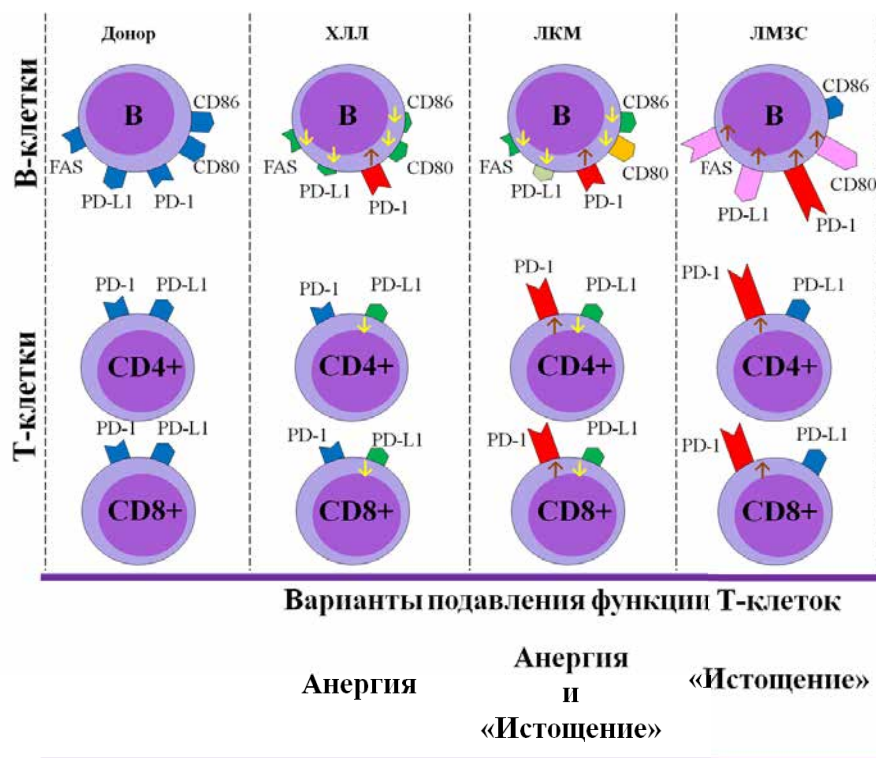


Рисунок 8. Схематичное изображение антигенов ИС на В- и Т-клетках у доноров и пациентов ХЛЛ, ЛКМ, ЛМЗС

Клинико-лабораторная характеристика больных В-ЛПЗ

в зависимости от наличия экспрессии CD80, CD86, PD-1, PD-L1, FAS

При сравнительном анализе клинико-лабораторных характеристик больных ХЛЛ обнаружена корреляционная взаимосвязь между стадией ХЛЛ и относительным количеством PD-L1⁺, CD80⁺, CD86⁺ опухолевых клеток, относительным количеством CD4⁺PD-1⁺ Т-клеток. Данные представлены в таблице 5.

Таблица 5. Относительное количество В-клеток, экспрессирующих антигены, участвующие в формировании иммунологического синапса (FAS, PD-1, PD-L1, CD80, CD86) в группе пациентов ХЛЛ в зависимости от стадии по классификации Binet.

Параметр	Доля В клеток ХЛЛ при А стадии, %	Доля В клеток ХЛЛ при В стадии, %	Доля В клеток ХЛЛ при С стадии, %
FAS	2,4(0,5-6,8)	0,5(0,3-2,1)	1,6(0,2-7,2)
PD-1	3,2(2,0-14,8)	9,0(1,1-12,8)	3,0(0,8-9,3)
PD-L1	0,9(0,2-2,7)*	0,2(0,1-0,3)	0,5(0,1-2,3)
CD80	3,0(1,2-10,9)*	0,4(0,2-1,7)	0,1(0-1,3)
CD86	4,0(0,1-9,8)*	0,2(0,1-1,0)	0,1(0-1,1)

Примечание: данные представлены в виде: медиана (нижняя граница – верхняя граница 95% доверительного интервала), * указывает на наличие достоверных отличий между исследуемыми группами, жирным шрифтом указаны сравниваемые группы

Доля $PD-L1^+$, $CD80^+$ и $CD86^+$ В-клеток ХЛЛ в стадии А была больше в сравнении со стадией В (p^*) (рисунок 9 В, Г, Д). Доля $CD80^+$ и $CD86^+$ В-клеток ХЛЛ при стадии С была достоверно меньше, чем в стадии А (p^*) (рисунок 9: Г, Д).

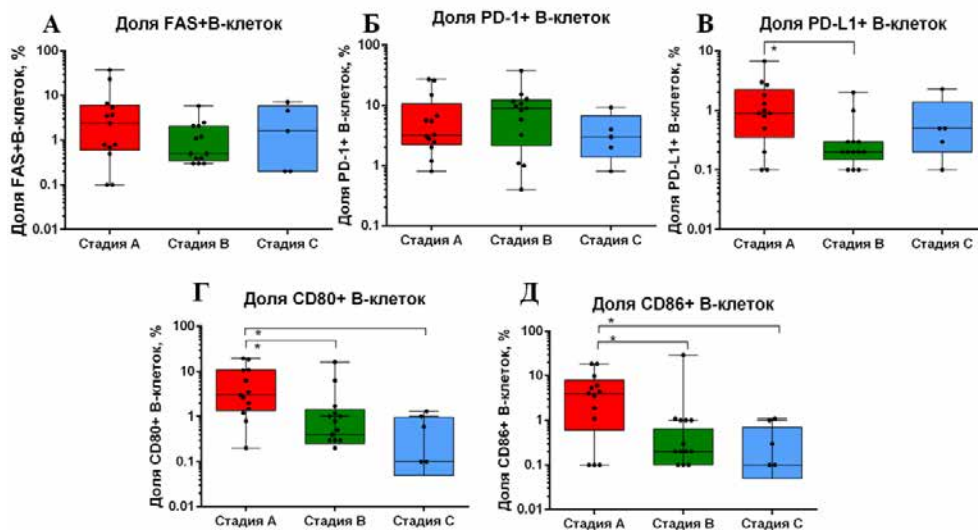


Рисунок 9. Доля В-клеток, экспрессирующих антигены, участвующие в формировании иммунологического синапса, в группе пациентов ХЛЛ в зависимости от стадии Binet А - FAS, Б - PD-1, В - PD-L1, Г - CD80, Д - CD86.

Доля $CD4^+PD-1^+$ клеток ХЛЛ была меньше при А стадии, чем при В и С (2,2% и 7,5%, $p = 0,0327$; 2,2% и 6,6%, $p = 0,0490$ соответственно) (рисунок 10:А).

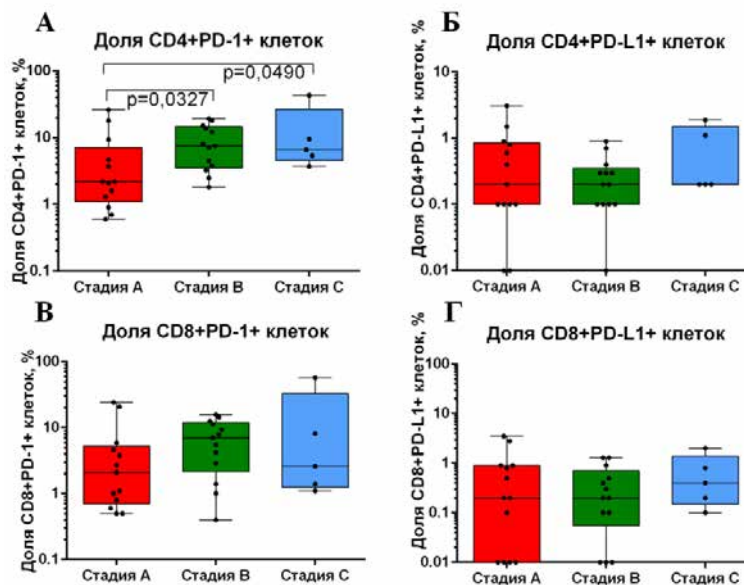


Рисунок 10. Доля Т-клеток, экспрессирующих PD-1 и PD-L1, при ХЛЛ в зависимости от стадии Binet

А - $CD4^+PD-1^+$ клетки, Б - $CD4^+PD-L1^+$ клетки, В - $CD8^+PD-1^+$ клетки, Г - $CD8^+PD-L1^+$ клетки

Доля $CD86^+$ клеток ХЛЛ была больше в группе пациентов с ЦГ группой благоприятного прогноза (18,8%) в сравнении с ЦГ группой промежуточного риска (0,1%) ($p = 0,0360$) (Рисунок 11).

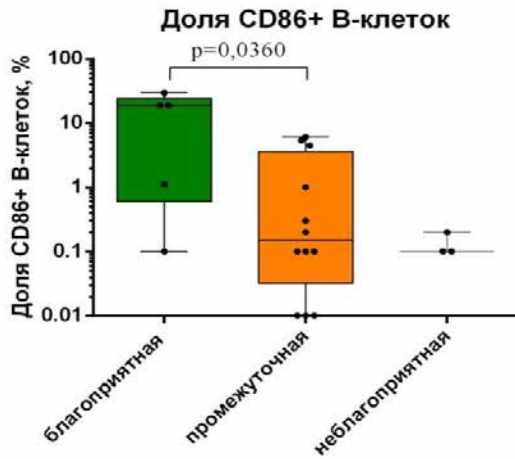


Рисунок 11. Относительное количество $CD86^+$ В-клеток у пациентов ХЛЛ в зависимости от цитогенетической группы.

Доля $PD-L1^+$ и $CD86^+$ клеток ХЛЛ была достоверно больше у пациентов, не нуждавшихся в терапии (рисунок 12).

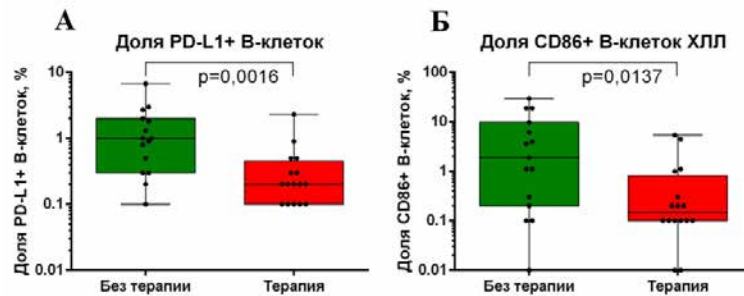


Рисунок 12. Относительное количество клеток ХЛЛ с экспрессией антигенов, входящих в состав ИС, в зависимости потребности терапии: А - $PD-L1^+$ В-клетки, Б - $CD86^+$ В-клетки.

При сравнительном анализе клинично-лабораторных данных больных ХЛЛ, не обнаружена корреляция между экспрессией антигенов CD80, CD86, PD-1, PD-L1, FAS на опухолевых клетках, субпопуляционным составом Т-лимфоцитов, экспрессии на них PD-1 и PD-L1 с полом, активностью ЛДГ, экспрессией CD38 на клетках ХЛЛ, концентрацией β_2 -микроглобулина, мутационным статусом IGHV-генов.

Обнаружена корреляционная зависимость между гистологическим вариантом и мутационным статусом IGHV-генов при ЛКМ и относительным количеством FAS^+ и $PD-L1^+$ опухолевых клеток (рисунок 13).

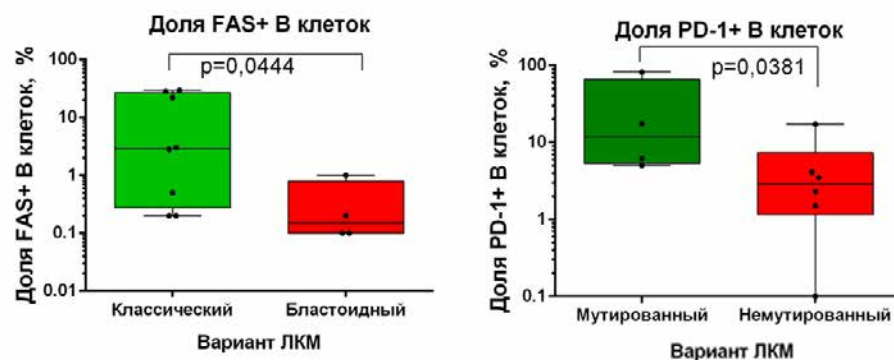


Рисунок 13. Доля FAS⁺ В-клеток при ЛКМ в зависимости от гистологического варианта заболевания, доля PD-1⁺ В-клеток при ЛКМ в зависимости от мутационного статуса IGHV-генов

При сравнительном анализе клинико-лабораторных характеристик больных ЛКМ, не выявлена корреляция между экспрессией антигенов CD80, CD86, PD-1, PD-L1, FAS на опухолевых клетках, субпопуляционным составом Т-лимфоцитов, экспрессии на них PD-1 и PD-L1 с полом, активностью ЛДГ, эффективностью терапии.

При сравнительном анализе клинико-лабораторных характеристик больных ЛМЗС, не найдена корреляция между экспрессией антигенов CD80, CD86, PD-1, PD-L1, FAS на опухолевых клетках, субпопуляционным составом Т-лимфоцитов, экспрессией на них PD-1 и PD-L1 с полом, размерами селезенки, эффективностью терапии.

Взаимосвязь экспрессии антигенов ИС и характера клинического течения В-ЛПЗ

Для определения порогового значения показателей, превышение которых могло бы приводить к необходимости в терапии, был проведен ROC-анализ и по установленному пороговому значению пациенты ХЛЛ были разделены на 2 группы в зависимости от экспрессии исследуемых антигенов, и далее проведена оценка вероятности начала терапии. Данные представлены в таблице 7.

Таблица 7. Данные ROC-анализа в группе пациентов ХЛЛ

Параметр	AUC	p	Пороговое значение	Чувствительность, %	Специфичность, %
CD19 ⁺ CD86 ⁺	0,7395	0,0237*	>1,0	76,47	64,29
CD19 ⁺ CD80 ⁺	0,6954	0,06498	>1,0	64,71	71,43
CD19 ⁺ FAS ⁺	0,5672	0,5254	>0,95	47,06	50,0
CD19 ⁺ PD-L1 ⁺	0,7983	0,0048*	>0,95	94,12	57,14
CD19 ⁺ PD-1 ⁺	0,5273	0,7964	>5,55	52,94	50,0
CD4 ⁺ PD-1 ⁺	0,5126	0,9052	>5,05	52,94	57,14
CD4 ⁺ PD-L1 ⁺	0,5	1,0	>0,65	29,41	78,57
CD8 ⁺ PD-1 ⁺	0,6155	0,2751	>3,35	58,82	64,29
CD8 ⁺ PD-L1 ⁺	0,5210	0,8427	>0,25	47,06	50,0

Среди исследуемых параметров были определены достоверные пороговые значения для CD86 ($p=0,0237$), PD-L1 ($p=0,0048$) и пограничное значение определено для CD80 ($p = 0,06498$). Для данных параметров были построены графики вероятности начала терапии при ХЛЛ (рисунок 15).

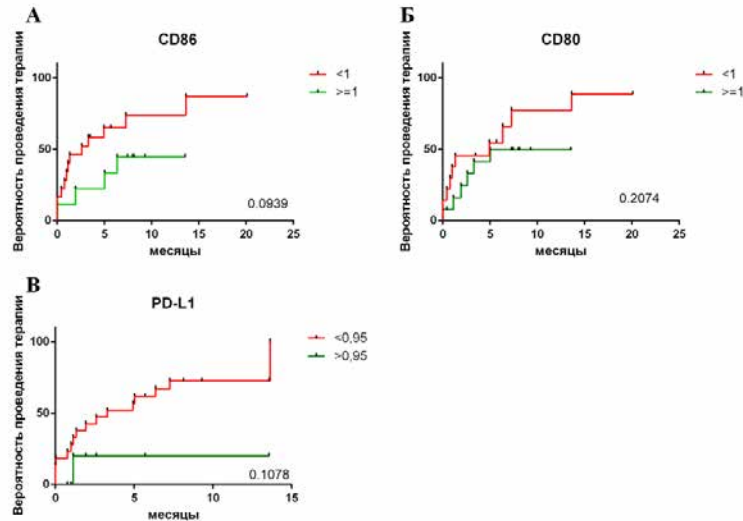


Рисунок 15. **Необходимость в начале терапии в зависимости от экспрессии на опухолевых клетках: А - CD80, Б - CD86, В - PD-L1**

Достоверных различий не обнаружено, однако имелась тенденция, что при большем количестве опухолевых клеток ХЛЛ с экспрессией CD80, CD86, PD-L1, вероятность начала терапии была наименьшей, чем у пациентов с отсутствием экспрессии данных Аг.

При ЛКМ и ЛМЗС не было обнаружено корреляции прогрессирования заболевания в зависимости от экспрессии исследуемых Аг на опухолевых клетках и Т-лимфоцитах.

Заключение

Актуальность исследования подтверждается многочисленными публикациями в литературе, посвященными данной проблеме. Полученные в ходе исследования результаты согласуются и дополняют ранее известные факты.

Проведенное исследование демонстрирует особенности экспрессии антигенов FAS, PD-1, PD-L1, CD80, CD86 на опухолевых В-клетках среди ХЛЛ, ЛКМ и ЛМЗС и на В-клетках здоровых доноров. Также обнаружены различия в экспрессии антигенов PD-1 и PD-L1 на Т-клетках при анализируемых В-ЛПЗ. Полученные результаты доказывают, что ХЛЛ, ЛКМ и ЛМЗС используют различные механизмы регуляции экспрессии антигенов ИС, которые позволяют опухолевым клеткам подавлять функцию Т-лимфоцитов. Для ХЛЛ характерно

уменьшение количества опухолевых клеток с экспрессией антигенов FAS, CD80 и CD86, что способствует подавлению FAS-опосредованного апоптоза и анергии Т-лимфоцитов, которое проявляется в виде уменьшения количества Т-клеток с экспрессией PD-L1. Анергия Т-лимфоцитов объясняет отсутствие ответа на иммунотерапию МкАТ против анти-PD-1 в многочисленных клинических исследованиях.

Для ЛКМ характерно снижение экспрессии на опухолевых клетках антигенов FAS и CD86, что способствует анергии Т-лимфоцитов и подавлению FAS-опосредованного апоптоза. При ЛКМ также наблюдается увеличение количества PD-1⁺ Т-хелперов, что отражает «истощение» функции Т-хелперов. Таким образом, ЛКМ характеризуется наиболее глубоким подавлением Т-клеточного контроля, что, возможно, объясняет более агрессивное клиническое течение заболевания в отличие от ХЛЛ.

ЛМЗС отличаются от ХЛЛ и ЛКМ большим количеством клеток с экспрессией антигенов FAS, PD-L1, CD80, CD86, а от доноров – антигеном PD-1. Для ЛМЗС характерно увеличение количества PD-1⁺ Т-хелперов, а количество PD-L1⁺ Т-клеток не отличается от доноров. Таким образом, для ЛМЗС наиболее значимым механизмом уклонения от Т-клеточного иммунного ответа является "истощение" функции Т-хелперов через PD-1-PD-L1 взаимодействие.

При ХЛЛ относительное количество клеток с экспрессией антигенов PD-1, CD80, CD86 коррелировало с клинико-лабораторными характеристиками (стадия и хромосомными aberrациями). При ЛКМ относительное количество опухолевых В-клеток с экспрессией антигена FAS и PD-1 и Т-клеток, экспрессирующих PD-1 и PD-L1, коррелировало с гистологическим вариантом заболевания и мутационным статусом IGHV-генов.

Полученные результаты позволили выявить и уточнить особенности механизмов подавления функции Т-лимфоцитов при каждом из исследуемых В-ЛПЗ, знание которых имеет важное значение при применении иммунотерапии.

Выводы

1. Обнаружено, что относительное количество опухолевых В-клеток у больных ХЛЛ, ЛКМ, ЛМЗС и В-клеток здоровых доноров, экспрессирующих CD80, CD86, PD-1, PD-L1, FAS достоверно различалось ($p < 0,05$), что свидетельствует об использовании опухолевыми клетками В-ЛПЗ разных механизмов «уклонения» от Т-клеточного иммунного ответа, путем изменения профиля экспрессии антигенов иммунологического синапса. Обнаружены уникальные отличия в профиле экспрессии антигенов иммунологического синапса при каждой нозологической форме В-ЛПЗ.

2. Опухолевые клетки ЛМЗС избегают Т-клеточного «контроля», используя PD-1–PD-L1 взаимодействие: выявлено достоверно большее количество PD-L1⁺ опухолевых В-клеток (57,7%), чем при ХЛЛ (0,3%) и ЛКМ (0,6%), $p < 0,05$. Опухолевые клетки ХЛЛ и ЛКМ «уклоняются» от Т-клеточного иммунного ответа, подавляя второй ко-стимуляторный сигнал CD28–CD80/CD86 и избегая внешнего FAS–опосредованного пути апоптоза, что подтверждается меньшим количеством опухолевых клеток CD80⁺ (1,2%), CD86⁺ (0,3%) и FAS⁺ (1,1%) при ХЛЛ и CD86⁺ (1,0%), FAS⁺ (6,8%) – при ЛКМ.

3. Относительное количество PD-1⁺ и PD-L1⁺ Т-лимфоцитов у больных В-ЛПЗ достоверно отличалось от Т-лимфоцитов здоровых доноров ($p = 0,0006$ и $p < 0,0008$ соответственно) и зависело от нозологической формы В-ЛПЗ.

4. Обнаружено, что у больных ХЛЛ подавление функции Т-лимфоцитов осуществляется через механизм анергии, что подтверждается меньшим относительным количеством PD-L1⁺ Т-хелперов и цитотоксических клеток ($p < 0,05$), а также меньшим количеством PD-1⁺ Т-лимфоцитов по сравнению с ЛКМ и ЛМЗС ($p < 0,05$). Ингибирование Т-лимфоцитов больных ЛКМ осуществляется через механизм анергии и «истощения» Т-хелперов, так как количество PD-L1⁺ цитотоксических лимфоцитов было меньше, а количество PD-1⁺ Т-хелперов - больше, чем в группе доноров. Опухолевые клетки ЛМЗС избегают Т-клеточного иммунного ответа через «истощение» функции Т-клеток, что подтверждается увеличением относительного количества PD-1⁺ Т-хелперов по сравнению с группой доноров.

5. Доказано, что в процессе прогрессирования и «агрессивной» трансформации опухоли происходит специфическое для каждого В-ЛПЗ изменение профиля экспрессии антигенов иммунологического синапса. В группе пациентов ХЛЛ по мере развития опухоли (стадия В и С по Binet) наблюдается уменьшение количества CD80⁺, CD86⁺ опухолевых клеток и увеличение PD-1⁺ Т-хелперов. У больных ЛКМ относительное количество FAS⁺ опухолевых клеток коррелировало с вариантом заболевания: при бластоидном варианте FAS⁺ клеток было меньше в сравнении с классическим вариантом ЛКМ.

6. Выявлена связь относительного количества PD-1⁺ опухолевых клеток ЛКМ с мутационным статусом IGHV-генов: при мутированном варианте ЛКМ PD-1⁺ клеток было больше, чем при немутированном варианте и составило 11,9% и 2,9% соответственно.

Практические рекомендации

Данные об экспрессии антигенов иммунологического синапса (CD86, PD-1, PD-L1, FAS) на опухолевых В-клетках и на Т-лимфоцитах различных субпопуляций в периферической крови должны использоваться для определения показаний к терапии блокаторами «ингибиторов контрольных точек» у больных В-ЛПЗ. Выявление «иммунологически неблагоприятной» группы больных В-ЛПЗ (ХЛЛ, ЛКМ, ЛМЗС) может служить основанием для изменения терапевтической тактики.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Бадмажапова, Д.С. Исследование CD80, CD86, PD-1, PD-L1, FAS и FASL на В- и Т-клетках у больных хроническим лимфолейкозом / Д.С. Бадмажапова, И.В. Гальцева, Ю.О. Давыдова, Н.М. Капранов, Е.Е. Звонков, Е.Н. Паровичникова // Клиническая онкогематология. – 2017. – Т.10. – №4. – С.522-523.
2. Бадмажапова, Д.С. Особенности экспрессии антигенов, участвующих в формировании иммунологического синапса при хроническом лимфолейкозе / Д.С. Бадмажапова, Е.Е. Звонков, И.В. Гальцева, Ю.О. Давыдова, Н.М. Капранов, Н.Г. Чернова, Н.Г. Габеева, Т.Н. Моисеева, Л.С. Аль-Ради, А.М. Ковригина, В.Н. Двирнык, С.Р. Горячева, Т.В. Сорокина, Е.Н. Паровичникова, В.Г. Савченко // Гематология и трансфузиология. – 2018 – Т.63. – №S1. – С. 115.
3. Бадмажапова, Д.С. 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 // Онкогематология. – 2018. – Т.13. – №1. – С.103-114.
4. Бадмажапова, Д.С. Роль иммунологического синапса в биологии хронического лимфолейкоза / Д.С. Бадмажапова, И.В. Гальцева, Е.Е. Звонков // Клиническая онкогематология. – 2018. – Т.11. – №4. – С.313-318.
5. Badmazhapova, D.S. Study of immunomodulating effect of lenalidomide in up front therapy of follicular lymphoma / D.S. Badmazhapova, I.V. Galtseva, Yu.O. Davydova, N.M. Kapranov, E.E. Zvonkov, E.N. Parovichnikova // Cellular Therapy and Transplantation. – 2017. – Т.6. – №3. – С. 20-22.
6. Badmazhapova, D. Can immune synapse parameters determine lymphoma type? / D. Badmazhapova, I. Galtseva, E. Zvonkov, Yu. Davydova, N. Kapranov, T. Moiseeva, A. Kovrigina, Hu. Julhakyanyan, E. Parovichnikova, V. Savchenko // Clinical Lymphoma, Myeloma and Leukemia. – 2018. – Т.18. – №S1. – С. S301.

7. Badmazhapova, D.S. Expression of antigens involved in the formation of an immunological synapse in chronic lymphocytic leukemia / D. Badmazhapova, I. Galtseva, E. Zvonkov, Yu. Davydova, N. Kapranov, E. Parovichnikova, V. Savchenko // HemaSphere. – 2018.– Т.2.– №S1.– С.496-497.

Список сокращений

В-ЛПЗ – В-клеточные лимфопрролиферативные заболевания

ХЛЛ – хронический лимфолейкоз

ЛКМ – лимфома из клеток мантийной зоны

ЛМЗС – лимфома из клеток маргинальной зоны селезенки

Аг – антиген

ИКТ – «ингибиторы контрольных точек»иммунного ответа

ИС – иммунологического синапса

ИГХ – иммуногистохимическийметод исследования

CD – кластер дифференцировки

FCR – курс химиотерапии «флударабин + циклофосфамид + ритуксимаб»

МкАТ – моноклональное антитело

ФМО – метод «флуорохром-минус-один»

FISH – цитогенетический метод исследования гибридизация insitu